

## 嗜碱细菌环状糊精葡萄糖基转移酶的纯化和性质\*

张庆波 严自正 张树政

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 嗜碱细菌 52-2 除去菌体的培养液经硫酸铵沉淀和 DEAE-纤维素离子交换柱层析, 得到凝胶电泳均一的环状糊精葡萄糖基转移酶, 纯化了 11.5 倍, 酶活力回收为 5.7%。用浓度梯度 PAGE 测分子量为 151 700。酶反应最适温度为 65℃, 50℃ 以下比较稳定。酶反应最适 pH 为 7.0, 在 6.0~9.0 范围内稳定。Zn<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup> 和 Fe<sup>2+</sup> 强烈抑制酶活力。紫外光谱在 270nm 和 244nm 处分别有最大和最小吸收。荧光光谱的最大激发波长和发射波长分别为 283nm 和 335nm。用 NBS、NEM、NAI、DEP 和 EDC 对酶进行了化学修饰, 初步推测组氨酸和色氨酸残基可能为酶活力必需基团, 羧基与酶活力有一定关系。

**关键词** 嗜碱细菌, 环状糊精葡萄糖基转移酶, 纯化与性质

**分类号** Q556

环状糊精葡萄糖基转移酶 (Cyclomaltodextrin glucanotransferase) 系统命名 1, 4- $\alpha$ -D-Glucan 4- $\alpha$ -D-(1, 4- $\alpha$ -D-glucano)-transferase (Cyclizing), EC2.4.1.19, 习惯称环糊精生成酶, 缩写 CGTase, 它使淀粉转化成环糊精 (CD)。CD 是 6~8 个葡萄糖以  $\alpha$ -1, 4 键连成环状的糊精, 6 个葡萄糖为  $\alpha$ -CD, 7 个葡萄糖为  $\beta$ -CD, 8 个葡萄糖为  $\gamma$ -CD。由于环状糊精在食品、医药、农业及轻化工业中有广泛的用途, 因而引起人们的重视。最早 Tilden 和 Hudson 等于 1939 年发现软化芽孢杆菌 (*Bacillus macerans*) 能分泌 CGTase<sup>[1]</sup>, 以后陆续报道有关巨大芽孢杆菌 (*B. megatherium*)<sup>[2]</sup> 及环状芽孢杆菌 (*B. circulans*)<sup>[3]</sup> 的 CGTase 纯化及性质, 近来还报道了环状芽孢杆菌 CGTase 的化学修饰<sup>[4, 5]</sup>。国内 1984 年淡家林等报道了产 CGTase 的嗜碱细菌的筛选及发酵条件的研究<sup>[6]</sup>, 并将该酶用于生产环糊精, 本文对该酶进行了纯化及性质的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要仪器和试剂

J2-21 高速冷冻离心机 (Beckman), 721 型分光光度计 (上海第三分析仪器厂), 5850 pH 计 (Cole-Parmer), UV-120-02 可见紫外分光光度计 (Shimadzu), 850 荧光分光光度计 (Hitachi)。DEAE-纤维素 (Whatman), 分子量及等电点的蛋白质 (Pharmacia), 其他试剂为

\* 中国科学院“八五”生物学重点课题资助项目。

收稿日期: 1996-05-21

分析或优质纯。

粗酶液来源于本所向陕西礼泉化工有限公司提供的菌种及技术所生产的。

## 1.2 酶活力测定

1ml 1% 的马铃薯淀粉, 1ml pH8.3 Tris-HCl缓冲液, 加入适当稀释酶液, 总体积为 3ml, 50℃ 保温10min, 然后在沸水浴中煮 10min 停止反应, 取 0.2ml 反应液于 5ml 0.167mmol / L  $I_2$ -KI溶液中显色, 于 700nm 波长测吸光度, 用蒸馏水代替酶液作为对照。

在上述反应条件下, 降低 10% 吸光度所需酶量定义为 1 个酶活力单位。

## 1.3 蛋白质测定

按 Lowry 方法<sup>[7]</sup>进行测定。

## 1.4 电泳方法

蛋白质纯度测定用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)<sup>[8]</sup>。分子量测定用浓度梯度 PAGE<sup>[9]</sup>。

## 1.5 化学修饰

将蛋白质侧链修饰剂和缓冲液混合, 补足蒸馏水到 125μl, 加入酶溶液 125μl, 30℃ 反应 30min, 然后加蒸馏水 250μl, 及用 pH8.3 20mmol / L Tris-HCl缓冲液配制的 0.5% 淀粉 250μl, 按常规方法测定酶活力。

# 2 结果和讨论

## 2.1 分离纯化

**2.1.1 硫酸铵分级沉淀:** 取 150ml 粗酶液于冰浴中加  $(NH_4)_2SO_4$  至饱和度 30%, 于 4℃ 放置过夜, 然后在 4℃ 11 000r / min 离心 30min, 在上清液中继续加  $(NH_4)_2SO_4$  至饱和度 60% 静置 6h, 在上述条件下离心, 弃去上清液, 保留沉淀。

**2.1.2 透析脱盐:** 将沉淀溶于 10ml 蒸馏水中, 先用蒸馏水透析过夜, 再用 pH8.3 20mmol / L Tris-HCl缓冲液透析。

**2.1.3 DEAE-纤维素 DE-52 离子交换柱层析:** 将酸碱处理后的纤维素用自然沉降法装柱 (1.0 × 20cm) 用 pH8.3 20mmol / L Tris-HCl 缓冲液平衡过夜, 将透析后样品上柱, 用起始缓冲液平衡过夜, 然后用盐浓度梯度洗脱, 下限为起始缓冲液, 上限为在起始缓冲液中加 0.3mol / L NaCl, 上下限洗脱液体积分别为 500ml, 流速 8ml / h, 分部收集, 每 40min 收 1 管; 分别测定酶活力及蛋白质, 将有酶活力的洗脱液进行 PAGE, 合并在凝胶上均一的洗脱液共 20ml。

**2.1.4 纯化结果。** 分别测定各步纯化样品的酶活力、蛋白质含量及进行 PAGE 检测, 发酵液经各步纯化, 纯化了 11.5 倍, 酶收率 5.7% (表 1)。纯化后样品经 PAGE 后的凝胶条与底物淀粉溶液反应, 然后将反应过的凝胶条在  $I_2$ -KI 溶液中浸泡, 结果凝胶条上有酶作用处呈透明状, 其余无酶的背景呈蓝色, 该凝胶上透明带 (即酶谱) 位置与凝胶上蛋白质带位置相一致 (图 1)。以下试验即用此样品进行。

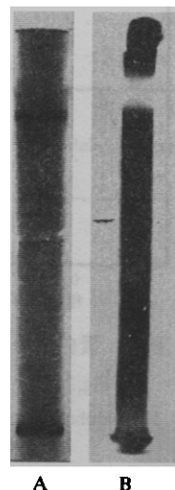


图 1 分离纯化的环糊精葡萄糖基转移酶的凝胶电泳图

Fig.1 PAGE pattern of the purified CGTase

A. 样品 Sample;

B. 酶谱 Zymogram.

2.2 一般性质

2.2.1 分子量: 用浓度梯度 PAGE 测定, 用已知分子量的蛋白质作标准, 以蛋白质分子量

表 1 环糊精葡萄糖基转移酶的纯化

Table 1 Purification of CGTase						
步骤 Step	体积 Volume (ml)	总蛋白 Total protein (mg)	总酶活力 Total activity (u)	比活力 Specific activity (u/mg)	回收 Recovery protein activity (%)	纯化倍数 Purification (fold)
Culture filtrate	150	488.0	19385	39.7	100.0	1.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation	10	73.0	7385	101.2	15.0	2.5
DEAE-Cellulose 52 chromatography	20	2.4	1100	438.3	0.49	11.5

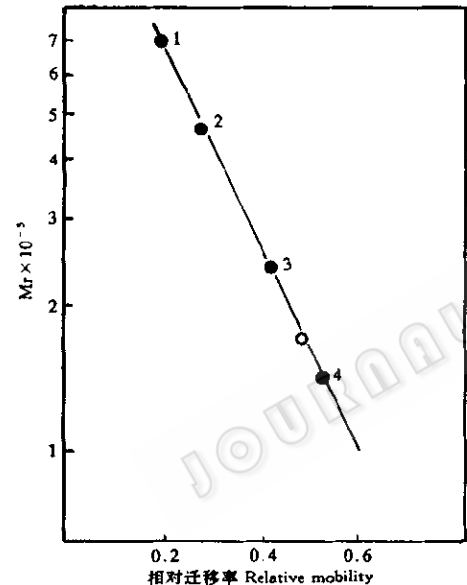


图 2 蛋白质分子量与相对迁移率作图

Fig.2 Mr vs. relative mobility

1. Thyroglobulin (669 000); 2. Ferritin (440 000);  
3. Catalase (232 000);  
4. Lactate dehydrogenase (140 000).  
• Standard protein; ○ Sample.

对相对迁移率作图(图 2), 求出 CGTase 分子量为 151 700, 这比较软化芽孢杆菌 CGTase 分子量(139 300)稍大。

2.2.2 pH对酶活力及稳定性的影响: 用 pH 3.0~8.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液代替常规缓冲液, 分别测定酶活力, 出现两个酶活力高峰 pH4.5 及 pH7.0。将酶在上述缓冲液和 pH9.0~10.0 的甘氨酸-NaOH缓冲液中 40℃ 放置 1h, 然后按常规方法测定酶活力, 该酶在 pH6.0~9.0 范围内稳定。

2.2.3 温度对酶活力及稳定性的影响: 按常规方法, 分别在不同温度下测定酶活力, 最适反应温度为 65℃。酶分别在 27℃、40℃、50℃ 和 60℃ 保温不同时间后按常规方法测定残余酶活力。酶在 50℃ 以下稳定, 60℃ 半衰期为 1.5h。

2.2.4 金属离子及其他化合物对酶活力的影响: 配成一定浓度的各种化合物分别与酶在 30℃ 保温 30min, 然后按常规方法测定酶活力, 以未加化合物的酶活力为 100%。当金属离子最终浓度为 1mmol / L 时 Zn<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>、

Pb<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 和 Fe<sup>2+</sup> 对酶活力有较强抑制作用, Sn<sup>2+</sup> 和 Mn<sup>2+</sup> 稍有抑制作用, 其他化合物最终浓度为 10mmol / L 或 0.2% 时, 水杨素和麦芽糖醇对酶微有激活作用, 茁霉多糖和肌醇微有抑制作用, 其他试剂, 如 Li<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、EDTA、D-葡萄糖、氨基葡萄糖、蔗糖、核糖醇、右旋糖酐、木聚糖和昆布多糖等对酶活力无明显影响。

2.2.5 光谱学性质: 样品在 pH8.3 Tris-HCl缓冲液中进行紫外扫描, 在波长 270nm 和 244nm 分别有最大和最小的吸收(图 3)。在 pH8.3 Tris-HCl缓冲液中测定了荧光光谱,

最大激发波长在 283nm,在该波长下测定了发射光谱,由 300~400nm 扫描,最大发射波长为 335nm(图 4)。从紫外及荧光光谱来看,纯化的 CGTase 具有较典型的蛋白质光谱特性。

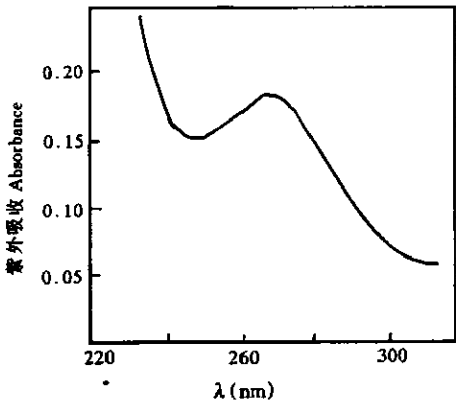


图 3 环糊精葡萄糖基转移酶的紫外光谱  
Fig.3 UV spectrum of CGTase

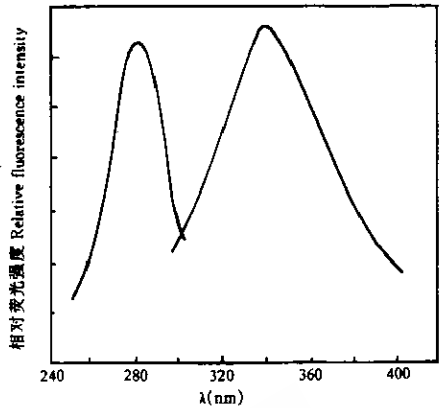


图 4 环糊精葡萄糖基转移酶的荧光光谱  
Fig.4 Fluorescence spectrum of CGTase

2.3 化学修饰

用几种蛋白质侧链修饰剂对酶进行修饰,在一定反应条件下,该酶被 NEM NAI 修饰后,酶活力不受影响(表 2),说明巯基和酪氨酸残基与酶活力无关,而该酶被 DEP NBS 修

表 2 化学修饰剂对酶活力的影响

Table 2 Effects of protein modification reagents on CGTase activity

修饰剂 Reagents	终浓度 Final Conc. (mmol/L)	pH	缓冲液 Buffer	相对活力 Relative activity (%)
None	0			100
NAI	1	7.6	citric acid-Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100
NEM	10	7.0	citric acid-Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	94.3
DEP	1	6.0	citric acid-Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	53.7
	10	6.0		17.9
NBS	0.01	4.4	HAc-NaAc	61.0
	0.1	4.4		13.6
	1	4.4		0
EDC	20	4.5	glycine ethyl ester	88.9
	50	4.5	-TEMED	81.5

NAI: N-Acetylimidazole; NEM: N-Ethylmaleimide; DEP: Diethylpyrocarbonate; NBS: N-Bromosuccinimide; EDC: 1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodimide.

饰后,酶活力大幅度下降,推测有可能组氨酸和色氨酸残基为活力必需基团。

Jaquess 等报道用 DEP 修饰环状芽孢杆菌 EI92 CGTase,当两个组氨酸残基被修饰时,酶活力降低 90%,他们认为有两个组氨酸残基位于活性部位,本文所研究的 CGTase 与该报道似有类似性,而色氨酸残基可能与 CGTase 底物结合部位有关。

致谢 感谢本所徐冠珠先生的热情指导与帮助。

### 参 考 文 献

- [1] Tilden E B, Huelson C S. *J Bact*, 1942, 43: 527~544.
- [2] Kitahata M. U. S. Patent. 3988206. Oct. 26. 1976.
- [3] Bovetto L J, Backer D P, Villette J R *et al. Biotechnol Appl Biochem*, 1992, 15: 48~59.
- [4] Villette J R, Sicard P J, Bouquclet S L. *Biotechnol Appl Biochem*, 1992, 15: 69~79.
- [5] Hellman J, Wahlberg M, Karp M *et al. Biotechnol Appl Biochem*, 1990, 12: 387~396.
- [6] 淡家林, 王世卓, 徐冠珠, 等. 微生物学报, 1984, 24(1): 80~85.
- [7] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al. J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265~275.
- [8] Davis B J. *Ann NY Acad Sci*, 1964, 121: 404.
- [9] 王孟淑. 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法测定蛋白质的分子量. 见: 张龙翔等编著. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1984, 119~124.
- [10] Depinto J A, Campbell L L. *Biochemistry*, 1968, 7: 114~125.

## PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CYCLOMALTO- DEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE FROM ALKALIPHILIC BACTERIA

Zhang Qingbo Yan Zizheng Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract** A cyclomaltodextrin glucanotransferase from alkaliphilic bacteria was purified to PAGE homogenous by ammonium sulfate precipitation and DEAE-cellulose DE-52 chromatography with 11.5 fold purification and 5.7% recovery. Mr estimated with concentration gradient PAGE was 151 000. The optimum conditions for activity were pH 7.0, temperature 60℃, stable in the range 6.0~9.0 and below 50℃. The enzyme activity was activated by salicin and maltitol, slightly inhibited by  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , inositol and pullulan, strongly inhibited by  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ . The maximum absorption was at 270nm in ultraviolet spectrum, the maximum emission wavelength in the excitation spectrum was 283nm, the maximum emission spectrum determined at 283nm was 335nm. The effects of some protein modification reagents on the CGTase activity have been studied. Histidine and tryptophan residues may be essential for activity, carboxyl groups might have some effects on the activity.

**Key words** Alkaliphilic bacteria, Cyclomaltodextrin glucanotransferase, Purification and characterization