

## 重组菌产碱性果胶酯裂解酶酶学性质研究

诸葛斌, 堵国成, 诸葛健, 陈坚\*

(江南大学生物工程学院环境生物技术研究室, 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122)

摘要: 利用盐析-透析-色谱流程建立快速高效纯化工程菌 *E.coli* JM109 (pHsh PL) 所产碱性果胶酯裂解酶 (PL) 的方法, 纯化后酶达到电泳纯, 比酶活为 1079U/mg。重组菌所产 PL 酶促反应适宜的 pH 为 9~10, 适宜温度为 50~66°C, 与酶基因来源野生菌所产 PL 相比, 重组菌所产 PL 适宜 pH 范围有所扩大, 并保持了野生菌 PL 的热稳定性。通过金属离子种类、浓度及存在时间对 PL 酶活力影响考察发现: 在考察的离子中除  $Mg^{2+}$  对酶活有较好的促进作用外, 其余对重组菌 PL 均有抑制作用, 其中  $Fe^{2+}$  对酶活力抑制作用最强。该酶的  $K_m$  值为 20.93 mg/L,  $V_{max}$  为 105.3  $\mu\text{mol}/\text{min}$ , 反应活化能  $E_a$  为 21.74 kJ/mol。对重组菌所产 PL 热稳定动力学进行分析, 发现有底物情况下的失活常数  $k_d$  ( $0.02 \text{ min}^{-1}$ ) 小于无底物情况下的失活常数  $k_d$  ( $0.0342 \text{ min}^{-1}$ ), 说明当酶与底物结合形成复合物时对酶活具有保护作用。利用 HPLC-ESI-MS 对重组菌所产 PL 酶解产物进行测定发现, 产物含有不饱和和二聚半乳糖醛酸 ( $m/z$  350.82) 和不饱和三聚半乳糖醛酸 ( $m/z$  527.04), 同时测定结果中没有发现不饱和半乳糖醛酸单体 ( $m/z$  175), 可以初步推测重组菌 PL 不能以不饱和二聚半乳糖醛酸和不饱和三聚半乳糖醛酸为底物进一步裂解。

关键词: 碱性果胶酯裂解酶; 重组大肠杆菌; 纯化; 酶学性质

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2008)01-0121-05

碱性果胶酯裂解酶 (E.C.4.2.2.2) 是果胶酶的一种, 可以在碱性条件下通过以反式消去作用切断聚乳糖醛酸的  $\alpha$ -1, 4-糖苷键并释放出饱和的寡聚半乳糖醛酸。果胶酯裂解酶已被广泛地应用在食品生产、果汁澄清和洗涤剂生产等方面。此外, 碱性果胶酯裂解酶已被运用在纺织工业上<sup>[1~3]</sup>, 用于替代传统的纺织精炼, 通过酶解精炼的方法解决诸如环境和能源等问题。随着碱性果胶酯裂解酶新用途的不断出现, 对该酶的需求量越来越大, 因此, 碱性果胶酯裂解酶是近年国外研究的热点课题。

目前我国对碱性果胶酶的研究工作主要集中在野生菌株方面的研究, 有关碱性果胶酶基因工程菌的研究报道很少<sup>[4]</sup>, 至今尚未发现有关基因工程菌产碱性果胶酶性质特别是热稳定动力学方面的研究报道。本研究室已从筛选的一株 *Bacillus* sp. 中扩增出碱性

果胶酯裂解酶基因 (PL) 并成功构建大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21DE3 (pET22b(+)-PL)<sup>[4]</sup> 和 *E. coli* JM109 (pHsh PL)<sup>[5]</sup> 产碱性果胶酯裂解酶工程菌。为更好地应用重组菌产碱性果胶酯裂解酶, 本文着重对碱性果胶酯裂解酶工程菌 *E.coli* JM109(pHsh PL) 所产酶的酶学特性进行了较全面的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株: 基因工程菌 *E.coli* JM109 (pHsh PL)<sup>[5]</sup> 为本研究室构建。

1.1.2 主要试剂和仪器: WATERS ZMD4000 高效液相色谱/质谱联用仪 (美国 WATERS 公司); WATERS 2690 高效液相色谱仪, Masslynx4.0 工作站; ENVI-18 固相萃取柱 (500 mg, 美国 SUPELCO 公司)。

基金项目: 国家“863计划”(2003AA322050)

\*通讯作者。Tel: +86-510-85918309; E-mail: jchen@sytu.edu.cn

作者简介: 诸葛斌(1969-), 男, 浙江人, 副教授, 博士, 主要从事环境微生物研究。E-mail: bzhuge@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-05-16; 修回日期: 2007-10-16

1.2 硫酸铵梯度盐析、透析和蛋白质浓缩测定  
参见文献[6] 进行操作。

1.3 SDS-PAGE 分析  
参见文献[7] 进行操作。

1.4 碱性果胶酯裂解酶活力测定  
参见文献[5] 进行操作。

1.5 碱性果胶酯裂解酶 (PL) 酶学性质

1.5.1 适宜 pH: 配制一系列缓冲液, pH 为 8.4~10.5, 缓冲离子强度为 0.1 mol/L。将聚半乳糖醛酸 (PGA) 溶解于不同 pH 的缓冲液中, 配制成 1 g/L 的 PGA 溶液, 其余按酶活力测定方法测定。

1.5.2 适宜温度: 分别在 30°C~80°C 测定酶活, 考察适宜酶促温度。

1.5.3 pH 稳定性: 配制一系列离子强度为 0.1 mol/L 的缓冲液, pH 为 9.4~10.5, 将 0.5 mL 适当稀释的酶液分别加入到 5 mL 系列缓冲液中, 分别在 45°C 保温 0~300 min。对不同时间和不同 pH 的样品测定酶活。

1.5.4 温度稳定性: 分别在 50°C、55°C、57°C 保温 20~90 min。对不同时间和不同温度的样品测定酶活。

1.5.5 金属离子对碱性果胶酯裂解酶(PL)影响: 分别配制含有 0.5 mmol/L 和 1 mmol/L 以下金属离子化合物的酶液, Zn<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup> (阴离子均为 Cl<sup>-</sup>), 以不含金属离子的酶液为参照, 调节 pH 至 9.4。在常温下放置 15 min 和 24h 后立即测酶活 (酶活测定方法同 1.4)。

1.6 液质联用条件

1.6.1 液相条件: Symmetry C18 柱 (2.1 mm×150 mm), 3.0 μm, 柱温 35.0°C; 流动相: 甲醇-水-甲酸 (体积比 4:96:0.5), 流速: 1.0 mL/min; 紫外-检测器: 238 nm; 液相色谱进样体积: 20 μL。

1.6.2 质谱条件: 质谱采用负电子电离方式 (ESI-),

Capillary 3.95 kV, 脱溶温度: 250°C, 源温: 100°C, 离子能量: 1.0V, 锥孔电压: 32 V, 扫描范围: m/z=150~950。质谱条件依据采集的[M+H]<sup>+</sup> 或[M+2H]<sup>2+</sup> 的信号强度的稳定性来进行优化。

## 2 结果和讨论

### 2.1 碱性果胶酯裂解酶 (PL)快速提纯

由于所构建 *E.coli* JM109 (pHsh PL)具有前导序列可向胞外分泌目标蛋白, 具有分泌杂蛋白很少的特点, 故重组菌产碱性果胶酯裂解酶 (PL)提纯较野生菌株要简单得多。将重组菌 *E.coli* JM109 发酵液 6000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 加硫酸铵进行梯度盐析, 室温离心收集饱和度为 50%~60%的沉淀部分, 将盐析沉淀的酶溶解在甘氨酸-氢氧化钠缓冲溶液 (pH9.0)中, 用 20 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲溶液透析处理 24 h。离心所得上清液经反相硅胶色谱柱进行进一步分离纯化后, 比酶活达到 1079 U/mg。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳检测 (图 1),经过上述步骤的分离纯化, 第 3 泳道样品基本已达到电泳纯。表 1 为分离纯化过程的记录。

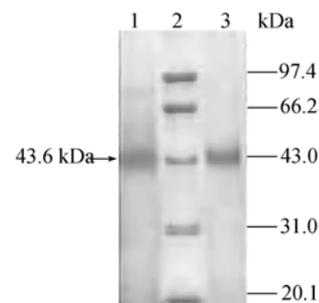


图 1 PL 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE of purified PL. 1. Culture supernatant; 2. Protein marker; 3. Purified recombinant PL.

表 1 碱性果胶酯裂解酶(PL)各步分离纯化结果

Table 1 Purification of recombinant pectate lyase produced by *E.coli* JM109 (pHsh PL)

Procedure	Total protein /mg	Total pectate lyase /U	Specific activity /(U/mg)	Purification (fold)	Yield /%
Culture supernatant	41.7	7,381	177	1	100
Dialysis	9.7	4,229	436	2.46	57.3
ENVI-18	1.4	1,512	1,079	6.21	27.7

### 2.2 PL 的适宜 pH 和温度及 pH 和温度稳定性

重组碱性果胶酯裂解酶适宜 pH 范围为 9.0~10.0, 重组碱性果胶酯裂解酶在 pH9.4 缓冲溶液中较为稳定, 在 300min 的测试过程中几乎没有酶活变化, 在 pH9.4~10.5 缓冲溶液中保温在 50min 的测试过程中酶活没有十分明显的变化, 50min 后随 pH 上升稳定性变差。结果表明, 基因工程菌所产碱性果胶酯裂解酶 pH

稳定性对纺织品的生物精炼等方面的应用十分有利。

重组碱性果胶酯裂解酶最适宜温度范围为 60~66, 且 50 保温 30min 酶活基本不变, 若保温 60min 酶活仍可到原酶活 70%左右, 重组 PL 的适宜酶促反应温度及温度稳定性符合纺织工业要求<sup>[8]</sup>。

### 2.3 重组 PL 与野生菌 PL 部分性质之比较

所构建基因工程菌酶基因带有前导序列, 这可能

导致该酶与自然酶存在一定差别。工程菌 PL 与 基因来源野生菌 *Bacillus* sp. WSHB04-02<sup>[9]</sup> 所产 PL 进行比较, 结果显示 (表 2), 重组 PL 的最适温度及温度稳定性性能与野生 PL 无明显差异, 而重组菌 PL 的最适 pH 有较为宽泛的应用范围。其机理有待于进一步研究。

表 2 重组 PL 与野生菌 PL 之比较

Table 2 Comparison of recombinant PL and PL from *Bacillus* sp. WSHB04-02

Items	Recombinant PL	PL from <i>Bacillus</i> sp. WSHB04-02
Optimal pH	9~10	9.2~9.4
Optimal temperature	60~66	60~65
Thermal stability (1h, >70%)	~50	~50

2.4 各种金属离子对碱性果胶酯裂解酶 PL 的影响

金属离子种类和浓度对 PL 酶活力的影响如表 3 所示。对于所考察的金属离子, 高浓度金属离子比低浓度金属离子更有可能对酶产生较强的抑制作用; 酶与金属离子混和时间越长, 越有可能对酶活力产生负面影响; Mg<sup>2+</sup> 则对酶活有较好的促进作用, Fe<sup>2+</sup> 对酶活力抑制作用最强。

表 3 各种金属离子对 PL 的影响

Table 3 Effect of metal ions and chemical reagents on PL activity

Ion(+)	Relative activity/%			
	15 min		24 h	
	0.5 mmol/L	1 mmol/L	0.5 mmol/L	1 mmol/L
Control	100	100	100	100
Zn <sup>2+</sup>	82.6	77.5	60.7	40.3
Mg <sup>2+</sup>	103.2	122.2	102.25	107.01
Mn <sup>2+</sup>	84.5	53.2	72.1	44.3
Na <sup>+</sup>	83.5	86.3	84.2	62.1
Ba <sup>2+</sup>	71.7	54.6	64.2	46.1
Cu <sup>2+</sup>	45.4	27.4	20.3	18.2
Co <sup>2+</sup>	83.3	81.1	74.8	66.6
Fe <sup>2+</sup>	50.4	/	2.9	/

PL activity was determined spectrophotometrically by measuring the change in absorbance at 235 nm in 50 mmol/L glycine-NaOH (pH 9.4) containing 0.1% (w/v) PGA and 0.6 mM calcium chloride.

2.5 PL 的酶促动力学参数测定

以 5、10、15、20、30、50、100、150 和 200 mg/L 的 PGA 作为底物, 测定酶活力, 用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法(图 2), 计算得 Km 值为 20.93 mg/L, Vmax 为 105.3μmol/min。

2.6 PL 的活化能参数测定

对于酶反应能的过程速率常数和温度的关系用 Arrhenius<sup>[10]</sup>公式表示:

其中 Ea 为活化能; R (8.3144 J/(mol.K))为气体

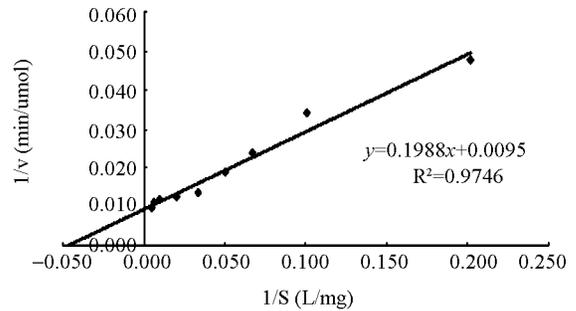


图 2 Lineweaver-Burk 双倒数作图

Fig. 2 The chart of Lineweaver-Burk.

$$kcat=Aexp(-Ea/RT)$$

常数; T 为绝对温度。

对 Arrhenius 公式变形可得:

$$\ln(kcat)=A'+ (-Ea/R)\cdot 1/T$$

以该公式为基础, 根据 Arrhenius 作图法作图, 即以 ln(kcat)和 1/T 作图, 斜率为(-Ea/R)。为避免热失活的影响, 选用 35~55℃测定的 kcat 进行分析, 结果如图 3, 经计算重组菌产 PL 裂解 PGA 反应的活化能 Ea 为 21.74 kJ/mol, 即 5.18 kcal/mol。

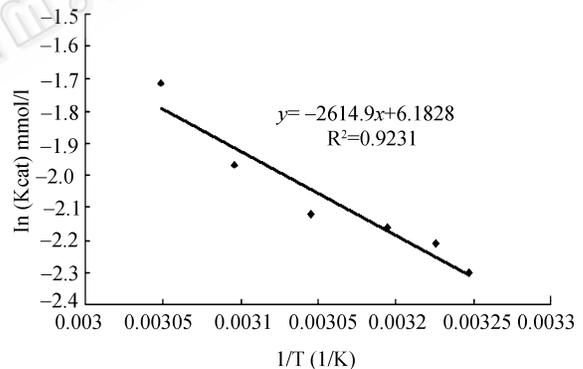


图 3 Arrhenius 图

Fig. 3 The chart of Arrhenius.

2.7 PL 的热稳定动力学

在一定失活温度下保温时间 t 时 PL 的残余酶活性为 e<sub>t</sub>, 则酶失活速率为<sup>[10]</sup>:

$$\frac{de_t}{dt} = -k_d e_t + k_r [d]$$

式中: k<sub>d</sub>、k<sub>r</sub> 为失活和复活反应速率常数。

经实验验证该重组菌产 PL 为不可逆失活, 即 kr=0, 设 e<sub>t</sub>/e<sub>0</sub>=Y, 方程简化为:

$$Y = \exp(-k_d t) + C$$

根据上述方程, 65℃条件下, 以 ln(Y)与 t 绘图即可知失活常数。

由图 4 可知在无底物情况下失活常数 k<sub>d</sub> = 0.0342 min<sup>-1</sup>。



## 参 考 文 献

- [1] Bruhlmann F, Leupin M, Erismann KH, *et al.* Enzymatic degumming of ramie bast fibers. *J Biotechnol*, 2000, **76**: 43–50.
- [2] Zhang J, Henriksson G, Johansson G. Polygalacturonase is the key component in enzymatic retting of flax. *J Biotechnol*, 2000, **81**: 85–89.
- [3] 刘昌龄, 王秀玲. 成本有效对环境有利的前处理的关键. 印染译丛 (*Yin Ran Yi Cong*), 2000, **4**: 41–44.
- [4] 诸葛斌, 堵国成, 陈坚等. 碱性果胶酯裂解酶工程菌的构建. 应用与环境生物学报 (*Chin J Appl Environ Biol*), 2006, **12**(4): 547–549.
- [5] 诸葛斌, 堵国成, 陈坚, 等. 利用温控载体构建碱性果胶酯裂解酶工程菌. 微生物学 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2006, **46**(4): 657–659.
- [6] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [7] 李永明, 赵玉琪. 实用分子生物学方法手册. 北京: 科学出版社, 1998.
- [8] Sakai T, Sakamoto T, Hallaert J, *et al.* Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Adv Appl Microbiol*, 1993, **39**: 231–294.
- [9] 张健红, 李寅, 刘和, 等. 一株碱性果胶酶高产细菌的分离、系统发育分析和产酶条件的初步优化. 应用与环境生物学报. (*Chin J Appl Environ Biol*), 2005, **11**(3): 354–358.
- [10] 山根恒夫著, 邢新会译. 生物反应工程. 北京: 化学工业出版社, 2006.

# Properties of alkaline pectate lyase from recombinant strain *E.coli* JM109 (pHsh PL)

Bin Zhuge, Guocheng Du, Jian Zhuge, Jian Chen\*

(*Lab Environ. Biotechnol., School of Biotechnology, Jiangnan University; The Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Wuxi 214122, China*)

**Abstract:** Alkaline pectate lyase (PL) from recombinant strain *E.coli* JM109(pHsh PL) was purified by a three-step process including (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> precipitation followed by dialysis and chromatography. The purified enzyme appeared homologous on SDS-PAGE. The specific activity of the purified enzyme reached 1079 U/mg. The optimal pH and temperature were in the ranges of pH 9.0 to 10.0 and 50°C to 66°C. The enzyme was preferable in optimal pH range in enzymatic retting of flax. Enzyme activity slightly increased in the presence of Mg<sup>2+</sup> ion, whereas decreased in the presence of other ions, especially Fe<sup>2+</sup>. The K<sub>m</sub> of the purified enzyme for polygalacturonic acid was 20.93 mg/L, the V<sub>max</sub> for polygalacturonic acid hydrolysis was 105.3 μmol of unsaturated products per min and E<sub>a</sub> was 21.74 kJ/mol. The results of the decay constant (*k<sub>d</sub>*) analysis on condition of PL bonding polygalacturonic acid (*k<sub>d</sub>*=0.02 min<sup>-1</sup>) and PL without polygalacturonic acid (*k<sub>d</sub>*=0.0342 min<sup>-1</sup>) showed the substrate was helpful to decrease thermal inactivation of PL. The products (unsaturated oligomers) from polygalacturonic acid degraded by PL were analyzed by electrospray ionization mass spectrometry(ESI-MS). The following data were obtained: ESI-MS m/z, 350.82 (unsaturated bigalacturonic acid, uG2), 527.04 (unsaturated trigalacturonic acid, uG3). However, m/z 175 (unsaturated galacturonic acid, uG1) was not found. These results indicate that the final PGA degradation products was a mixture of unsaturated oligo-galacturonides including uG3 and uG2 except for uG1. It suggests that the recombinant PL cannot degrade uG3 and uG2.

**Keywords:** alkaline pectate lyase; recombinant *E.coli*; purification; enzymatic properties