

# 葡萄糖异构酶的研究

## ——酶的分离提纯

曹宁军 马春光 程玉华 黄程芳

(无锡轻工业学院发酵系)

(吉林大学)

### 摘 要

葡萄糖异构酶细胞经丙酮处理,缓冲液抽提。DEAE—纤维素离子交换柱层析和 Sephadex G—200 凝胶柱层析等方法得到分离并纯化。该法与超声破碎法相比,比活提高 3.3 倍,活力收率为 74%,得到了高纯度异构酶,经 Sephadex G—200 凝胶柱层析获得较高收率的电泳纯制品。

主题词:葡萄糖异构酶;酶;蛋白质;分离;提纯

### 引 言

葡萄糖异构酶(Glucose Isomerase, GI),又名木糖异构酶,它主要催化葡萄糖与果糖间的可逆转化反应。已知短乳杆菌、链霉菌、游动放线菌等多种微生物能产生此酶,是重要的酶制剂之一。<sup>[1]</sup>

1968 年 Kei Yamanaka 等人从 *L. brevis* 菌体中通过  $MnCl_2$  处理,  $(NH_4)_2SO_4$  沉淀,热处理及用 DEAE-Sephadex A—50 柱层析等手段,首次得到结晶的葡萄糖异构酶纯品,并且证明此酶不但催化 D—木糖的异构化,同时也能催化 D—葡萄糖和 D—核糖的异构化<sup>[2]</sup>。在此之后的十几年中,通过多种分离技术先后从十几种微生物中得到了电泳纯的 GI 纯品<sup>[3,4,5]</sup>,由于该提纯过程复杂,收率低,因此,不适合制备性生产。

为了对国产 GI 有系统完整的了解,同时为较大规模的制备奠定基础,我们以国产玫瑰红链霉菌变异株 No.336 为研究对象,综合参考国外的提纯路线,设计了一条简便、快速、易行的提纯路线,并且在纯酶的基础上进行了较广泛的性质研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌种:选用玫瑰红链霉菌变异株 No.336。

试剂:选用 DEAE—纤维素 DE—52(Wateman), Sephadex G—25, Sephadex G—150

Sephadex G—200(Phamina 公司产品),

药品: 均为国产 1.2.3. 级试剂, 发酵用药品均为国产试剂。

## 1.2 方法

**1.2.1 菌体制备** 采用二级摇瓶发酵, 结束后离心收集菌体(3000转/分), 制成丙酮干粉备用。

**1.2.2 纯酶提取** 粗酶液的制备 以 30 毫升/升干粉的比例加入 0.02 摩尔/升磷酸钠缓冲液(pH=7.5), 磁力搅拌三小时后, 以 3 000 转/分的速度离心半小时, 收集上清即为粗酶液;

**1.2.3 离子交换柱层析** 粗酶液经过 DEAE—纤维素 DE—52 柱(3×11cm)层析分离, 当上样量使柱饱和后, 用含有不同浓度 NaCl 的 0.02 摩尔/升磷酸钠缓冲液梯度洗脱并收集活力峰; Sephadex G—200 柱层析, 将离子交换所得活性组分适当浓缩, 加至平衡后的 Sephadex G—200 柱(2×100cm)上, 280nm 监测下收集活力峰, 圆盘电泳检测为均一带。

**1.2.4 酶活力测定** 1 毫升底物溶液(1 摩/升葡萄糖十含 +0.02 摩尔/1 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 的 0.01 摩尔/升磷酸钠缓冲液 pH=7.5), 加 0.5 毫升 CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 水溶液和 0.5 毫升适当稀释的酶液, 70℃水浴反应 15 分钟后加入 2.0 毫升 0.5 摩尔/升高氯酸终止反应, 所产生的果糖用 Cys—吡唑法<sup>[6]</sup>测定。每分钟转化生成 1 微摩尔果糖为一个活力单位。

**1.2.5 Disc 凝胶电泳** 按 Clarke 方法进行<sup>[7]</sup>。以溴酚蓝为前沿指示剂, 每管上样为 50~100 微克蛋白, 恒流每管 4 毫安二小时后, 用 1%氨基黑 10 B 染色半小时, 然后用 7.5%乙酸溶液扩散脱色, 薄层扫描仪(CS—910)检测结果。

**1.2.6 蛋白浓度的测定** 应用 Lowry 法测定蛋白浓度<sup>[8]</sup>, 牛血清白蛋白为标准。Folin 酚试剂自制。

## 2 结果与讨论

### 2.1 粗酶液的制备

在已报道的文献中, 粗酶的提取常用超声波破碎法以及在溶菌或去污剂存在下的细胞自溶法。这些方法虽然对酶的释放比较完全, 特别是后一种方法, 但是均需要特定的设备和加入后续工作中需要除去的试剂, 为此, 我们采用缓冲液直接萃取法代替了常规的超声波破碎法, 结果见表 1。

表 1 不同提取法的比较

| 方 法 \ 比 较     | 总活力收率(%) | 比活 (u/mg) |
|---------------|----------|-----------|
| 超 声 破 碎 法     | 90~91    | 0.9       |
| 丙 酮 干 粉 萃 取 法 | 86~88    | 2.93      |

两种方法活力收率相近, 但后者溶液的比活远高于前者, 同时溶液的 OD<sub>280</sub>/OD<sub>250</sub> 比值在 1.0 以上。这些均说明丙酮作用后, 细胞的通透性增加, 有利于酶分子的出入, 而一些

大分子量的杂蛋白和核酸因体积过大而保留在未破坏的完整细胞体内,从而减少了杂蛋白和核酸的污染,提高了酶的比活。

另外,因磁力搅拌作用比较温和,不需要冰水浴,可以在室温下连续进行,并且保持细胞的完整,用常规离心机便可将细胞除去,得到所需要的粗酶液。在一般实验室中均可完成。

## 2.2 纯酶的制备

### 2.2.1 DEAE—纤维素离子交换层析

在制备过程中,一个重要特点是将细胞抽提液直接进行 DEAE—纤维素离子交换柱层析分离,减少常规的分级沉淀等步骤。在超饱和上样的基础上,当出口处有 GI 活性显示时进行 NaCl 梯度洗脱,由图 1 可见:缓冲液中 NaCl 含量为 0.3 摩尔/升时,可得到具有 GI 活性的蛋白峰。

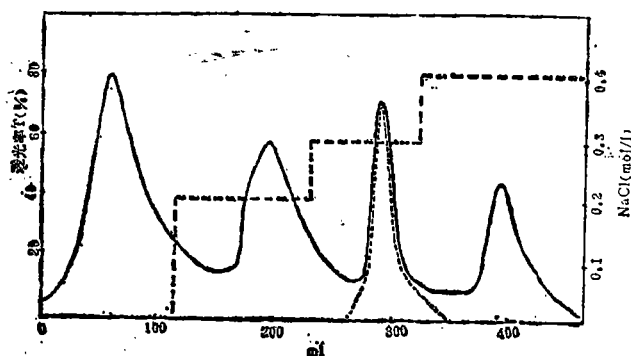


图 1 DEAE—纤维素离子交换柱层析洗脱曲线

经圆盘电泳扫描测定(图 2)只能见到两条明显的蛋白谱带,其他均为背景吸收,经缓冲液萃取测定知谱带(1)为葡萄糖异构酶,这说明:经过离子交换过程所得酶制剂已达到较高的纯度,主要成分为葡萄糖异构酶。酶的收率较高,按活力计达 74%,是常规方法的三倍。因为离子交换过程也是一个可逆的化学平衡过程,受多种因素的影响,如:系统 pH、离子

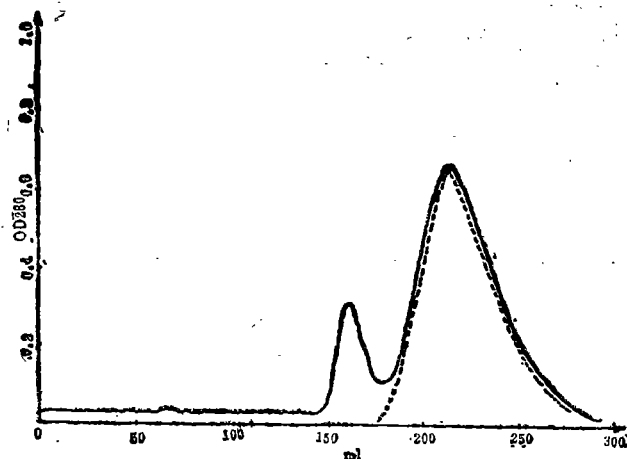


图 2 Sephadex G—200 凝胶柱层析洗脱曲线

强度和带电量等。被交换样品带电荷数越高,与交换剂的亲和力越强。不同种蛋白在特定条件下与纤维素的交换能力因带电荷多寡而不同,这是与反应的 $\Delta G$ 值有关的,一般情况下,增加反应物的浓度, $\Delta G$ 有利于向正反应方向转移,如果一种蛋白质的负电荷含量较高,对阴离子交换物来说相当于增加了反应物浓度,从而提高了对纤维素的交换能力,在pH为7.5这一分离条件下,GI负电荷含量较高,并大于多数杂蛋白的带电量,它不但对纤维素有较强的吸附能力,而且,后续上样的GI分子可以取代已吸附的杂蛋白分子。所以超饱和上样过程自身也是一个GI浓缩并纯化的过程,仅此一步便大大提高了提纯过程的速度,得到纯度在90%左右酶制剂。

**2.2.2 Sephadex 凝胶过滤** 在离子交换柱层析分离的基础上,将所收集的活性组分透析浓缩后,分别在Sephadex G-150和Sephadex G-200两种介质上进行了分离实验,所用柱长从50~120厘米不等,柱内径均为2.5厘米,结果如表2所示

表2 不同介质和柱长的分离结果

| 效果<br>凝 胶     | 柱长(cm) |    |    |    |    |    |     |     |     |
|---------------|--------|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|
|               |        | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| SephadexG-150 |        | -  | -  | -  | -  | -  | -   | ±   | +   |
| SephadexG-200 |        | -  | -  | -  | -  | ±  | +   | W   | W   |

说明:“-”蛋白峰重叠,“±”部分分离,“+”完全分离,“W”蛋白峰变宽

由表2可见:采用Sephadex G-200作为分离介质,柱长选用100厘米,其分离效果最佳。因为葡萄糖异构酶同杂蛋白在分子量等方面是比较接近的,这就决定了分离的难度,当柱长小于90厘米时,不论采用何种介质,均因塔板数过低而达不到分离目的。柱长为90厘米以上时,开始显示出一定的分离效果,因Sephadex G-150和Sephadex G-200凝胶在粒度相同时,其分离的分子量范围有所不同,则效果自然不一致。如果将Sephadex G-

表3 不同提纯方法的比较

| 数<br>据<br>处<br>理<br>方<br>法                            | 常 规 法              |                     |                  |                         |                         |                  | 饱 和 法              |                     |                  |                         |                         |                  |
|-------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|--------------------|---------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|
|                                                       | 总<br>活<br>力<br>(μ) | 总<br>蛋<br>白<br>(mg) | 比<br>活<br>(μ/mg) | 活<br>力<br>收<br>率<br>(%) | 蛋<br>白<br>收<br>率<br>(%) | 提<br>纯<br>倍<br>数 | 总<br>活<br>力<br>(μ) | 总<br>蛋<br>白<br>(mg) | 比<br>活<br>(μ/mg) | 活<br>力<br>收<br>率<br>(%) | 蛋<br>白<br>收<br>率<br>(%) | 提<br>纯<br>倍<br>数 |
| 提 纯 步 骤                                               |                    |                     |                  |                         |                         |                  |                    |                     |                  |                         |                         |                  |
| 丙酮干粉上清                                                | 3235.5             | 1105                | 2.93             | 100                     | 100                     | 1.0              | 3235.5             | 1105                | 2.93             | 100                     | 100                     | 1.0              |
| 30%(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 沉淀 | 2455.7             | 685.1               | 3.58             | 75.9                    | 62                      | 1.2              | —                  | —                   | —                | —                       | —                       | —                |
| 60%(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 沉淀 | 1870.1             | 408.9               | 4.57             | 57.8                    | 37                      | 1.56             | —                  | —                   | —                | —                       | —                       | —                |
| Sephadex G-25脱盐                                       | 1446.3             | 344.8               | 4.19             | 44.7                    | 31.2                    | 1.4              | —                  | —                   | —                | —                       | —                       | —                |
| DEAE-纤维素层析                                            | 783                | 54.1                | 14.5             | 24.2                    | 4.94                    | 95.2             | 394.5              | 161.8               | 14.8             | 74                      | 14.6                    | 5.1              |
| Sephadex G-200层析                                      | 158.5              | 6.6                 | 324              | 4.9                     | 0.6                     | 8.2              | 1269               | 50.2                | 25.3             | 39.2                    | 4.5                     | 8.6              |

150 的柱长增大到 120 厘米, 也可以得到较满意的分离效果, 但时间会大大延长, 不符合高效, 省时的层析分离原则, 所以, 100 厘米的 G-200 凝胶柱是最佳的匹配方案。

结果表明, 通过 G-200 凝胶柱层析分离的葡萄糖异构酶已达到电泳纯, 完全适合于酶学性质, 酶结构研究的要求。活力回收达 53%, 是一可行的精化步骤。

**2.2.3 同常规提纯方法的比较** 与常规法相比较, 在完全相同的条件下, 该方法显示出二个明显的优点(表 3), 首先是收率高, 到 DEAE-纤维素柱层析为止, 新方法的活力收率是常规法的三倍; 其次, 新方法操作步骤少, 方法简单, 对设备要求不高, 因没有分级离心等步骤, 整个流程较简单, 在十几小时之内便能完成 DEAE-纤维素层析分离, 这也是减少活力损失的关键。

## 结 论

葡萄糖异构酶在中性 pH 条件下, 因丙酮的作用易于通过细胞壁, 并萃取到相应的缓冲液中, 在这一条件下, 酶带有较多的表面负电荷, 对阴离子交换剂有较强的亲和作用, 可取代其他杂蛋白, 在超饱和上样过程中进行自发性纯化, 大大简化了操作步骤, 为进一步放大确定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] 胡学智. 工业酶制剂. 1984; 574
- [2] Yamanaka Kei. Brochim Brophy. Acta. 1968; 151, 670
- [3] Takasaki Y. et al. Agric. Biol. Chem. 1969; 33, 1527
- [4] Rezchihov A. A. et al. Prihl Biokhim Mikrobiol. 1980; 16, 547
- [5] Lec Y H. et al. Biotechnol Bieng. 1976; 18, 1639
- [6] Dische Z. et al. J. Biol Chem. 1951; 192, 583
- [7] Charke J T. et al. Science. 1964; 121, 428
- [8] Lowry O T. et al. J. Biol Chem. 1951; 193, 265

## Studies on Glucose Isomerase I Separation and Purification of Glucose Isomerase

*Cao Ningjun    Ma Chunguang*

*Cheng Yuhua    Huang Chengfang*

### Abstract

Glucose isomerase was purified by means of acetone treatment of cells, buffer extraction, DEAE-Cellulose column chromatography and sephadex-G-200 column chromatography. The processes of acetone treatment and buffer extraction greatly simplified experimental conditions. Special activity was 3.3 times as much as ultrasonic method. The activity yield was 74%. We not only reduced separation steps, but also raised the yield three times. A high yeild electrophoresis pure GI was gained by sephadex-G-200 column chromatography.

**Subjectwords:** Glucose Isomerase; Enzyme; Protein Purification; Separation