

黑曲霉乳糖酶催化反应特性 及水解机制的研究

李强军 全文海 许侶康

(食品科学与工程系) (发酵工程系) (食品科学与工程系)

摘要 从黑曲霉 CWL2NU-3 发酵液中分离纯化得到三种分子形式的乳糖酶,对其中含量最丰的 F_1 进行了研究;探讨了 pH、温度、碳水化合物对酶活性的影响;从底物分子的空间构型及电荷分布分析了酶对不同底物 ONPG 和 PNPB 水解能力的显著差别;以 ONPG 和 ONPSG 作为探针,研究了酶作用键的专一性;运用荧光分光光谱法,对作用过程中酶分子的构象进行了分析;提出了乳糖酶的作用机制。

关键词 乳糖酶; β -半乳糖苷酶;乳糖酶的性质;乳糖酶作用机制

0 前言

乳糖酶(Lactase),按国际酶学委员会的命名法,称为 β -D-半乳糖苷半乳糖水解酶(β -D-galactoside galactohydrolase, EC3. 2. 1. 23),简称 β -半乳糖苷酶。有关乳糖酶的研究国外已有不少报道^{[1][2]}。近年来,乳糖酶在食品工业中的应用日益引起人们的重视,我国亦开展了这方面的研究。然而有关乳糖酶催化反应特性及水解机制的研究报道不多,国外的一些报道主要集中在大肠杆菌乳糖酶的研究方面^[1]。

我们从土壤中分离筛选到一株产高温乳糖酶的菌株,该菌对乳糖有较强的水解能力。通过选育,获得一高产突变株 A. niger CWL2NU-3^[3],研究了该酶有关催化反应的特性。

1 材料与方法

1.1 酶的制备

接种 A. niger CWL2NU-3 摇瓶培养,过滤分离, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀, Sephadex G-25 层析,超滤浓缩,所得酶液贮藏于 4℃ 冰箱中备用。荧光光谱测定用酶的纯化过程为:发酵滤液经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀, Sephadex G-25 层析、Sephadex G-150 层析、DEAE-Sephadex A-25 离子交换层析、Octyl-Sephadex CL-4B 疏水层析、CM-Sephadex C-50 离子交换层析,超滤浓缩得三种分子形式的圆盘电泳一条带纯酶^[3],其中含量最丰的 F_1 ,用于本研究。

收稿日期:1993-03-05

1.2 pH和温度对酶活性的影响

pH影响试验所用的缓冲液为:0.1mol/L 甘氨酸—盐酸缓冲液(pH2.0~3.5), 0.1mol/L 醋酸钠缓冲液(pH3.5~6.0)及0.1mol/L 磷酸钠缓冲液(pH6.0~8.0). 以不同pH缓冲液配制的5%乳糖溶液作底物,按酶活测定方法进行,计算不同pH时的反应速率,然后加以比较。

最适温度的测定在30~80℃范围内进行,于最适pH、反应15min后,测定反应混合液中所产生的葡萄糖 μmol ,计算相对活力。

1.3 pH、温度对酶的稳定性影响

pH对酶的稳定性影响于pH1.5~10之间进行试验,所用缓冲液为:0.1mol/L 甘氨酸—盐酸缓冲液(pH1.5~3.5),0.1mol/L 醋酸钠缓冲液(pH3.5~6.0),0.1mol/L 磷酸钠缓冲液(pH6.0~9.0),0.1mol/L 硼酸钠缓冲液(pH9.0~10.5). 用不同pH的缓冲液将酶适当稀释后,于30℃下保温24h,然后按ONPG法测定活力,计算残存酶活百分率。热稳定性试验于30~80℃之间进行,用pH4.0、0.1mol/L 醋酸钠缓冲液将酶适当稀释后,于确定的温度下热处理10min,立即放入冰水浴中冷却,然后按ONPG法测定酶活,计算残存酶活。

1.4 底物特异性

以含有半乳糖残基的ONPG、PNPG、ONPSG、ISOSG、HOSG、乳糖等作底物,进行底物特异性试验。

以乳糖、ONPSG、ISOSG、HOSG为底物,取0.5ml、1.0%的底物(pH4.0),0.1mol/L 醋酸钠缓冲液,加入0.5ml适当稀释的酶液,于55℃下反应30min后,用葡萄糖氧化酶法测定乳糖产生的葡萄糖,计算每分钟产生的葡萄糖 μmol 。以Somogyi Nelson法^[4]测定ONPSG、ISOSG、HOSG所产生的还原糖,计算每分钟产生的还原糖 μmol 。

以ONPG及PNPG等为底物时,取100 μl 、0.25%的ONPG及PNPG,分别加入250 μl 、pH4.0、0.2mol/L的醋酸缓冲液及50 μl 酶液,于55℃下反应15min后,加入0.4ml、5% Na_2CO_3 终止反应,用蒸馏水定容至4ml,测OD值(420nm),计算每分钟产生的半乳糖的 μmol 。

1.5 酶促水解位置

取0.5ml、1%的ONPG及ONPSG(pH4.0、0.1mol/L 醋酸钠缓冲液),加入0.5ml酶液,用酶量20 $\mu\text{l}/\text{ml}$,于55℃下反应12h,将ONPG及ONPSG溶液和它们的反应液分别点样,反应液每个样品点两个点,进行纸上层析^[5],层析结束后,层析纸于室温下晾干,将反应液样品的层析纸一半用于显色,一半用于巯基的测定。

1.6 巯基的测定

将上述用于巯基测定的层析滤纸按样品剪开,然后将各滤纸条分成5等份,分别用蒸馏水浸泡1h,浸泡液中的巯基采用DTNB法^[6]测定。

1.7 碳水化合物对酶活性的影响

取50 μl 各种碳水化合物(pH4.0、0.2mol/L 醋酸钠缓冲液),加入200 μl 、pH4.0、0.2mol/L 醋酸钠缓冲液和100 μl 、0.25%ONPG及50 μl 酶液,于55℃下反应15min后,计算相对酶活。

1.8 酶溶液荧光光谱的测定

取0.25ml、pH6.0、0.2mol/L 磷酸钠缓冲液、0.1ml酶液(蛋白质含量50 μg)和0.5ml

乳糖溶液混合,加去离子水至 2ml,摇匀后立即用 Hitachi650-60 型双光束荧光光度计测定荧光,比色杯直径为 1cm,激发光为 280nm,发射波长为 290~300nm,测定温度为 25℃。

1.9 主要试剂

对-硝基苯酚- β -D-半乳糖苷(PNPG):SERVE 公司产品;邻硝基苯酚- β -D-硫代半乳糖苷(ONPSG):Sigma 公司产品;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(ISOSG):Sigma 公司产品;羟乙基- β -D-硫代半乳糖苷(HOSG):Sigma 公司产品;半乳糖胺(Galactosamine):Sigma 公司产品;邻-硝基苯酚- β -D 半乳糖苷(ONPG):中科院上海生化所产品;乳糖(A. R.):上海试剂一厂产品;5,5-二硫-双二硝基苯甲酸(DTNB):Fluka Chemic AG 产品;Sephadex G-25:瑞典 Pharmacia 公司产品;其它试剂为分析纯或优级纯;荧光光度计:Hitachi650-60 型,日本日立公司。

2 结果与讨论

2.1 pH 及温度对乳糖酶活性的影响

图 1 显示了 pH 对酶活性的影响,以乳糖为底物时,最适 pH 为 3.0~4.0,而以 ONPG 为底物时,最适 pH 为 3.0~4.5。由此可见,pH 对酶活性的影响随着底物的不同而发生变化。这一结果与文献[2]报道相同。

图 2 所示为温度对酶活性的影响。以 ONPG 为底物时,最适温度为 65℃;以乳糖为底物时,最适温度为 70℃。文献报道的黑曲霉乳糖酶最适温度为 55~60℃^[2],而 A.

niger CWL2NU-3 乳糖酶最适温度为 65~70℃,可见该酶为高温酶,这在应用上具有重大意义。

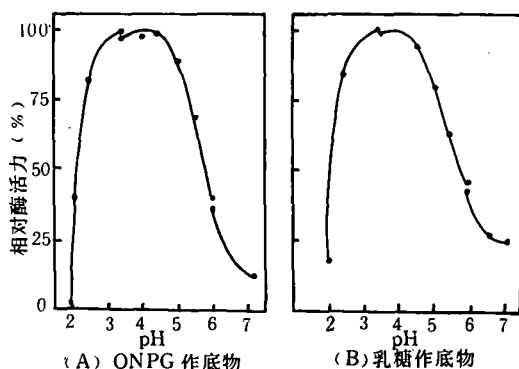


图 1 pH 对酶活性的影响

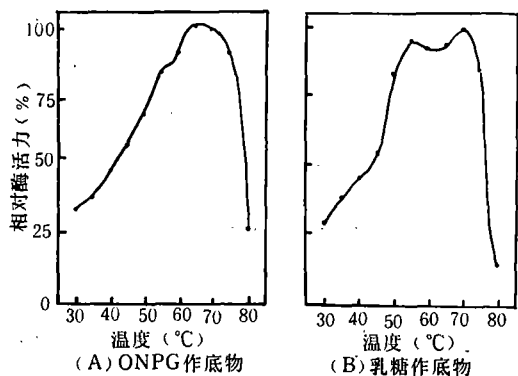


图 2 温度对酶活性的影响

以 ONPG 为底物时,温度-活力曲线在 55℃处有一肩峰;以乳糖为底物时,温度-活力曲线上出现两个峰值,一个位于 55℃,一个位于 70℃。这一现象未见有文献报道。这可能是该酶与不同底物结合后,表现出异常的温度特性所致。

2.2 pH 与温度对乳糖酶稳定性的影响

酶的稳定性的测定是将酶在缓冲液中于规定温度下处理一定时间后,测定残存活力,故它与所用底物无关。图 3 所示为 pH 与温度对 CWL2NU-3 菌株乳糖酶稳定性的影响,在 pH2.5~8.5 及温度 30~70℃时,酶是稳定的。即在上述范围内,酶活随 pH、温度的变化是可逆的,超过上述范围,酶发生不可逆变性。

2.3 碳水化合物对乳糖酶活性的影响

文献[7]报道碳水化合物对糖苷酶活性有影响。乳糖酶属于糖苷酶。本研究试验了半乳糖、葡萄糖等18种碳水化合物(表1)。结果表明,半乳糖、半乳糖醛酸- γ -内酯、ONPSG、ISOSG、HOSG、乳糖、半乳糖胺对酶呈现较明显的抑制作用。这些化合物分子中都含有半乳糖残基,与酶的活性中心具有一定的亲和性,因而对酶具有竞争性抑制作用。在低浓度下,其它化合物无显著影响。

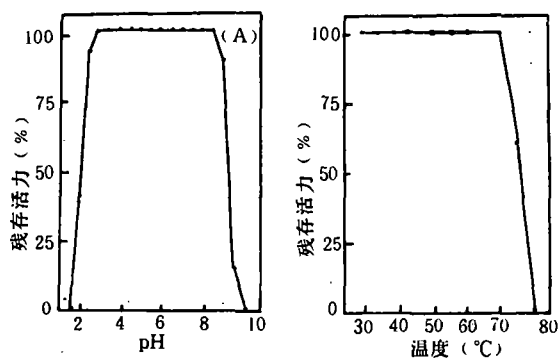


图3 pH与温度对酶稳定性的影响

表1 碳水化合物对酶活力的影响

碳水化合物	浓度 (mmol/L)	相对活力 (%)	浓度 (mmol/L)	相对活力 (%)
ONPSG	1	96.96		575.57
ISOSG	1	97.70	5	83.31
HOSG	1	90.51	5	77.60
半乳糖胺	5	96.41	10	86.64
D-阿拉伯糖	50	91.80	100	89.40
D-木糖	50	95.82	100	89.03
L-岩藻糖	50	108.76	100	97.69
D-半乳糖	10	53.46	50	18.62
D-葡萄糖	50	98.61	100	96.22
乳糖	50	85.16	100	75.94
蜜二糖	50	103.04	100	94.38
棉子糖	50	95.85	100	95.85
麦芽糖	50	83.66	100	89.95
D-葡萄糖醛酸- γ -内酯	50	96.22	100	94.38
D-半乳糖醛酸- γ -内酯	1	66.36	10	23.23
纤维素	50	101.38	100	95.85
D-半乳糖醛酸	50	102.67	100	83.32
D-甘露糖	50	96.41	100	88.85
L-山梨糖	50	100.46	100	97.70
对照		100		

2.4 乳糖酶的底物特异性

以半乳糖的衍生物进行底物特异性试验。设以ONPG为底物的水解速度为100%,其它基质作底物的相对水解速度如表2所示。

由表2可见,CWL2NU-3菌株乳糖酶对以 β -糖苷键结合的半乳糖衍生物具有水解能力,当糖苷中配基不同时,酶的水解速度也发生改变,但仍能被酶水解。这说明CWL2NU-3菌株乳糖酶对糖苷配基要求不严格。Sykes等人^[8]在研究黑曲霉乳糖酶性质时发现这一现象,大肠杆菌乳糖酶^[1]、米曲霉乳糖酶^[9]也有类似的情况,这可能是乳糖酶的共性。糖苷键中

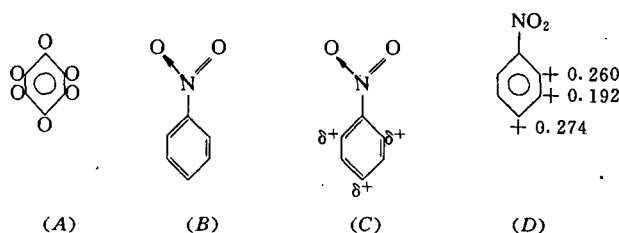
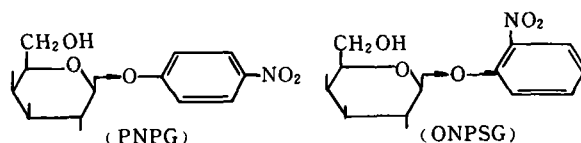
的氧原子被硫原子取代后,仍能被酶水解(ONPSG 0.16%)。Hofstew^[10]在研究大肠杆菌乳糖酶的底物特异性时,发现氧原子被氟原子和氮原子取代后的半乳糖衍生物也能被酶水解。可见微生物乳糖酶对糖苷键中的氧原子并非绝对专一。这对理论研究具有一定的意义。

表2 乳糖酶的底物特异性

底物	相对水解速度(%)	底物	相对水解速度(%)
ONPG	100.00	ISOSG	0
PNPG	282.90	HOSG	0
Lactose	39.00		
ONPSG	0.16		

注 ONPG:0-nitrophenyl- β -D-galactoside
 PNPG:P-nitrophenyl- β -D-galactoside
 ONPSG:0-nitrophenyl- β -D-thiogalactoside
 ISOSG:Isopropyl- β -D-thiogalactoside
 HOSG:Hydroxy- β -D-thiogalactoside

ONPG 和 PNPG 是常用的乳糖酶的底物,具有完全相同的组成,常被用于酶的底物特异性的研究。CWL2NU-3 菌株乳糖酶对 ONPG 和 PNPG 的水解速度相差很大(约 3 倍)。文献[9]也曾报道过,但缺少分析和解释。这一现象可能有两个方面的因素引起的:(1)ONPG 和 PNPG 的区别只是在苯环上连接位置不同,由于 $-\text{NO}_2$ 电负性较大,具有吸电子的性能,将 $\text{N}-\text{C}$ 之间 α -键的电子对吸向 $-\text{NO}_2$,导致苯环上的电子云密度降低,即硝基具有吸电子的诱导效应(图4(B))。另外,硝基上的 π 轨道与苯环上的 π 轨道形成共轭体系,由于氧原子的电负性较强,致使共轭体系的电子云向硝基方面转移,即产生吸电子的共轭效应(图4(C))。由于上述的吸电子效应和共轭效应,结果使苯环上电子云密度重新分布,导致 $-\text{NO}_2$ 对位的电位高于邻位的电位(图4(D))。在 ONPG 与 PNPG 中,半乳糖基分别连接于 $-\text{NO}_2$ 的邻位和对位,由于 $-\text{NO}_2$ 的作用,引起了电子云转移(图5),结果造成 PNPG 中糖苷键比 ONPG 中的弱,故酶对 PNPG 水解速度高于 ONPG;

图4 $-\text{NO}_2$ 对苯环上电子云的影响图5 $-\text{NO}_2$ 对 PNPG 及 ONPG 中糖苷键的影响

(2)ONPG 和 PNPG 的立体结构不同,如图6所示。在 ONPG 中(图6(A)), $-\text{NO}_2$ 与苯环同位于平面 M ,半乳糖残基 $\text{C}_1-\text{O}-\text{苯环}$ C_2 位于另一个平面 N ,由于空间位阻效应,平面

M 与 N 不能自由旋转,酶只能从一个方向向糖苷键进攻。在 PNPG 中(图 6(B)),两个平面可以自由旋转,酶分子可以从几个方向进攻糖苷键。故酶对 PNPG 的水解速度高于 ONPG。

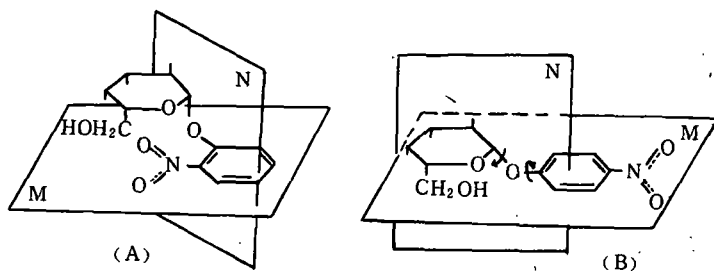
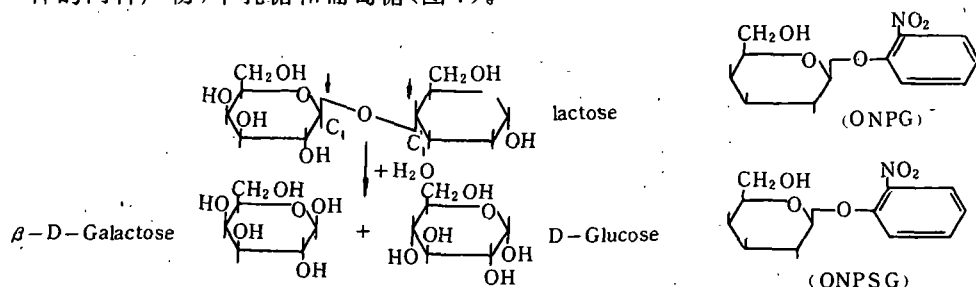


图 6 ONPG 和 PNPG 的立体结构

2.5 乳糖酶水解位置

酶促水解键位置的研究对水解机制的阐明具有重要意义。乳糖是乳糖酶的天然底物,由半乳糖和葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键结合成二聚糖,无论酶水解 C_1-O 或 $O-C_4$,结果产生同样的两种产物,半乳糖和葡萄糖(图 7)。



7 乳糖的水解键位置与产物的关系

图 8 ONPG 和 ONPSG 的立体结构

底物特异性研究表明,该酶可以水解一系列半乳糖苷化合物,在这些化合物中水解键的位置应该是相同的。ONPSG 与 ONPG 分子结构完全相同,只是 ONPG 中糖苷键氧原子为硫原子取代(图 8),其结果导致酶水解产物的不同。如水解的键为 C_1-O ,则 ONPG 和 ONPSG 水解产物中都有半乳糖,此外,ONPG 还产生邻-硝基苯酚,ONPSG 产生邻-巯基硝基苯(图 9)。反之,如水解的键为 $O-C_4$,则 ONPG 和 ONPSG 水解产物中都有邻-硝基苯酚。此外,ONPG 产生半乳糖,ONPSG 产生 1-巯基半乳糖(图 10)。故对水解产物进行成分分析,即可判定水解键位置。

图 11 所示为 ONPG、ONPSG 及水解液纸上层析情况,ONPG 和 ONPSG 呈暗绿色斑点,此移值 $R_f=0.34$ 。ONPG 及 ONPSG 水解后层析斑点与半乳糖相同,比移值 $R_f=0.504$ 。由于 S 取代 ONPG 中的糖苷键 O 原子后,ONPSG 的层析行为与 ONPG 无明显差异,故难以判断 ONPSG 水解产物是半乳糖还是巯基半乳糖。

将 ONPG 及 ONPSG 水解液平行展开的滤纸剪开,晾干,平分成 5 等份(显色斑点对应位置 No. 4),分别洗涤,测定巯基分布。结果(表 3)表明, $R_f=0.504$ 处巯基物质并不高于其他位置,而是较均匀地分布在滤纸上,这就是说 $R_f=0.504$ 处的物质不含巯质,而是半乳糖,滤纸上分布的巯基物质是水解产生的溶于展开剂中的巯基硝基苯。

由此可见,该酶水解的键为 C_1-O ,Walleufels^[11]在 H_2O^{18} 中进行 ONPG 的酶促水解反

应,在产物半乳糖中发现有 O^{18} ,由此推测:大肠杆菌乳糖酶水解 C_1-O 键。后来他们用三硝

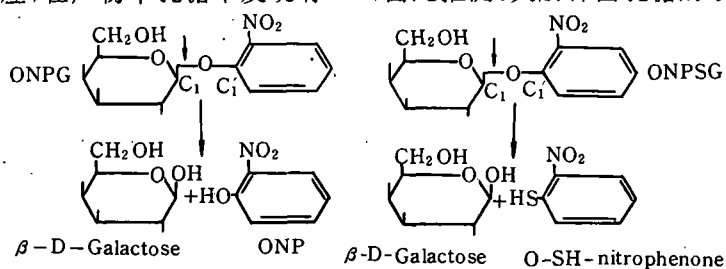


图9 水解 C_1-O 键的产物

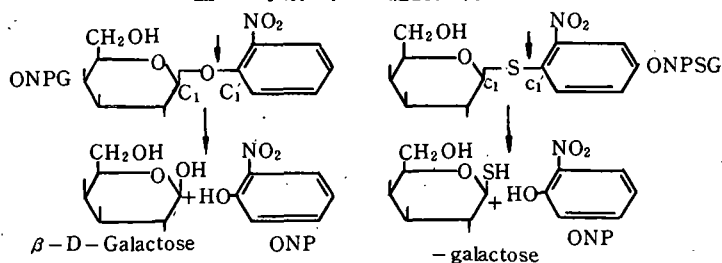


图10 水解 $O-C_1$ 键的产物

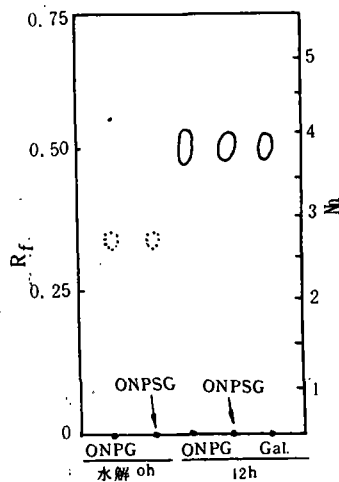


图11 ONPG 及 ONPSG

水解液纸层析图谱

基硫代半乳糖苷作底物进行研究,进一步证实水解的键为 C_1-O ^[12]。看来黑曲霉乳糖酶和大肠杆菌乳糖酶水解键相同。

表3 巯基在层析纸上的分布(O.D 值)

	1	2	3	4	5
ONPG	0	0	0	0	0
ONPSG	0.015	0.013	0.015	0.017	0.003

2.6 乳糖酶的水解机制

图1所示的 pH 对酶活性的影响为一典型的钟形,这说明酶的活性中心至少有两个可解离的活性必需基团。根据 pH 对游离酶或酶-底物复合物的效应可推出,在最适 pH 时, pH 与解离基团的解离常数之间的关系^[13]:

$$pH = \frac{1}{2}(pK_{a_1} + pK_{a_2}) \quad (1)$$

式中 K_{a_1} 和 K_{a_2} 分别为活性中心两个可解离基团的解离常数。

CWL2NU-3 菌株乳糖酶最适 pH 为 4.0,由式(1)可知,活性中心有一个解离基团的 $pK_{a_1} < 4$,另一个 $pK_{a_2} > 4$ 。Yoncyama 等人^[14]报道了黑曲菌中两个解离基团都是 $-COOH$ 。

酶溶液的荧光光谱分析(图12)表明,在底物乳糖存在下,酶的荧光光谱发生显著变化,这种变化是乳糖诱导引起的,酶蛋白的构象改变有利于活性中心与底物的结合和催化反应的进行。

假设 CWL2NU-3 乳糖酶的酶促水解通过正碳离子进行的,则乳糖的水解可用图13所

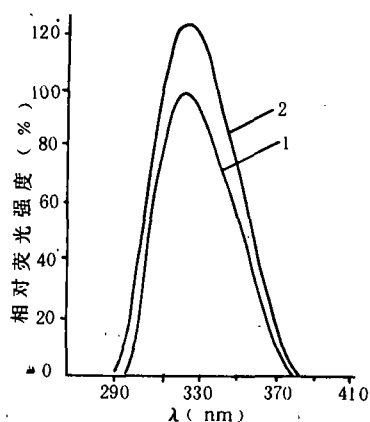


图12 乳糖对酶荧光光谱的影响

1. 0mmol/L 乳糖 2. 10mmol/L 乳糖

示的反应机制表示,即:底物与酶分子靠近,诱导酶蛋白发生向有利于和底物结合的构象变

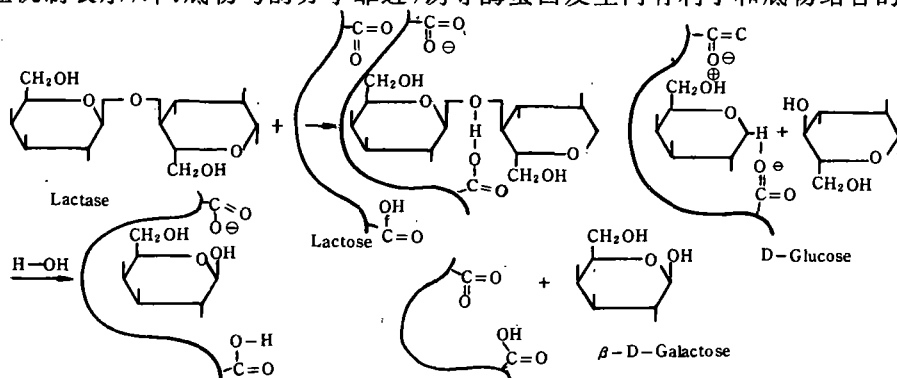


图 13 乳糖的酶促水解机制

化,然后底物与酶的活性中心结合,形成酶-底物复合物。活性中心的两个羧基,一个处于解离状态($-\text{COOH}^-$),另一个处于非解离状态($-\text{C}_2\text{OOH}$),此时非解离状态的 $-\text{C}_2\text{OOH}$ 中质子发生解离,并与糖苷氧结合,致使 C_1-O 间电子对进一步偏向氧原子, C_1 呈正电性,原来处于解离状态的 $-\text{C}_1\text{OO}^-$ 与 C_1 在空间上可能较接近,中和 C_1 的正电性,从而导致 C_1-O 的断裂,水分子发生极化,裂解为 H^+ 和 OH^- , H^+ 与 $-\text{C}_2\text{OO}^-$ 结合成 $-\text{C}_2\text{OOH}$, OH^- 与半乳糖基结合成半乳糖,扩散离开活性中心。底物被水解,酶恢复成游离酶。这一机制还有待进一步证明。

参 考 文 献

- 1 K. Wallenfels, R. Weill, *The Enzymes*, 1972, 7: 617
- 2 Vassitis G. and Miguei L. L., *Process Biochemistry*, 1985, 2: 2
- 3 李强军. 微生物乳糖酶的研究. 博士学位论文, 1989
- 4 Nelson N. J., *Biological Chemistry*, 1944, 153: 375
- 5 Takahiro T. et al., *J. Dairy Sci.* 1981, 64: 185
- 6 Kortt. A. A. et al., *Biochemistry*, 1973, 12: 320
- 7 曾宇成, 张树政. 微生物学论文集. 科学出版社, 1985
- 8 D. E. Sykes et al., *Carbohydrate Research*, 1983, 116: 127
- 9 S. Ogushi, T. Yoshimoto and D. Tsuru, *J. Ferment. Technol.*, 1980, 58(2): 115
- 10 B. Von Hofstew, *BBA*, 1961, 48: 159
- 11 K. Wallenfels and O. P. Malhotra, *Advan. Carbohydrate Chem.* 1961, 12
- 12 K. Wallenfels et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1964, 3: 450
- 13 陈惠黎, 李文杰. 分子酶学. 人民卫生出版社, 1983
- 14 Yoncyama M., Izumi T. and Sakurai H., *Reports on Progress in Polymer Physics in Japan*, 1986, 29: 657

The Catalytic Properties and Mechanism of Lactase from *Aspergillus niger*

Li Qiangjun

Quan Wenhai

Xu Lukang

(Dept. of Food Sci. and Eng.)(Dept. of Fermen. Eng.)(Dept. of Food Sci. and Eng.)

Abstract Three preparations of lactase were obtained from the culture broth of *Aspergillus niger* CWL2NU-3. One of them was used for studying, the effects of pH, temperature and carbohydrates on the activity and stability. From the configuration and charge distribution of the substrate molecule, the dramatic differences between the actions of the enzyme on ONPG and that on PNPG were analysed. With ONPG and ONPSG as probes, the substrate specificities of the enzyme were studied. By fluorescence spectrophotometry, the change of the enzyme conformation in action was measured. Base on these results, a catalytic mechanism of this enzyme was postulated.

Key-words Lactase; β -galactosidase; Properties of lactase; Catalytic mechanism of lactase