

文章编号 1000-5013(2001)02-194-05

# 细胞粗提液中木糖还原酶的催化特性考察

万 宁<sup>①</sup> 李伟成<sup>②</sup> 方柏山<sup>①</sup> 苏志国<sup>②</sup>

(① 华侨大学材料科学与工程学院, 泉州 362011; ② 中国科学院化工冶金研究所, 北京 100080)

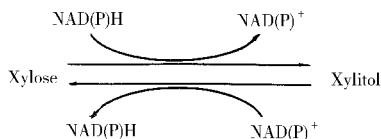
**摘要** 研究从 *Candida M ogii* 细胞中, 提取木糖还原酶(XR)的实验条件及 XR 的催化动力学。(1) 当破碎停留时间为 3 min、离心转速为  $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  时, 提取液中 XR 的酶活保留较好。(2) 适当的  $\text{K}^+$  能够提高酶活, 而  $\text{Mg}^{2+}$  对 XR 有抑制作用。(3) 所得粗提液中的 XR 具备一定的催化能力, 可满足实际应用的要求。(4) 所得粗提液中的 XR 半衰期约为 50 h, 其稳定性还不足以实现长期连续催化生产。

**关键词** 木糖还原酶, 辅酶, 细胞提取液, 木糖醇

**中图分类号** TQ 929<sup>+</sup>.1: TQ 920.1

**文献标识码** A

与传统的微化物转化相比, 直接的酶催化反应更能体现出生物转化的高效、快速和低能耗等优点。但与一般酶催化反应不同, 通常的氧化还原酶的催化反应都需辅酶的参与才能进行。例如, 从木糖(Xylose)到木糖醇(Xylitol)的生物转化, 有  $\text{NAD(P)H}$  或  $\text{NAD(P)}^+$  参与。即



要实现木糖到木糖醇的不断转化, 需要不断地补充  $\text{NAD(P)H}$ 。由于辅酶本身十分昂贵, 只有实现辅酶的连续再生(大于  $1\,000 \sim 2\,000$  次<sup>[1]</sup>), 才能有效地降低生产成本。而有关结合  $\text{NAD(P)H}$  再生的多酶催化体系的研究, 已有一些报道。Kulbe 等人<sup>[2]</sup>利用荷电超滤膜反应器进行辅酶截留, 用甲酸盐脱氢酶完成辅酶再生, 实现醛糖的连续催化。Jose 等人<sup>[3]</sup>利用普通超滤膜反应器截留经 PEI 修饰的  $\text{NAD(H)}$ , 从而实现 L-乳酸盐的连续催化生产。Neuhauser 等人<sup>[4]</sup>利用补料分批反应器, 用甲酸盐脱氢酶实现辅酶的再生, 进行木糖醇的连续催化生产。尽管以上研究取得了较好的结果, 但由于采用的都是经严格分离和提纯的木糖还原酶和商品化的辅酶, 因此成本很高。如根据 Rizzi 等人<sup>[5]</sup>给出的方法, 从细胞粗提液中分离纯化 XR 的步骤, 需包括硫酸链霉素盐析、脱盐(Sephadex G-25)、离子层析(Sephadex A-50)、凝胶层析(Sephadex G-200)和 3 个层次的亲和层析(Blue Sepharose, 2' 5'-ADP Sepharose, Cibacon Yellow)等。此外, 还需多次脱盐和浓缩。显然, 这对于实际的生产应用而言, 其代价是难以承受的。因此, 降低

收稿日期 2000-11-08

作者简介 万 宁(1977-), 男, 助教

基金项目 国家自然科学基金资助项目

提取 XR 的成本是此项技术得以应用的关键。不过, Kulbe<sup>[5]</sup>和 Rizzi<sup>[6]</sup>等人的研究表明, 一般细胞粗提液中的 NADH-XR 的比酶活( $U$ ) 在  $1.0 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$  左右, 而 Nidetzky 等人<sup>[6]</sup>基于纯 NADH-XR 的催化体系的 XR 比酶活( $U$ ) 为  $0.15 \sim 0.2 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。可见, 存在直接由细胞粗提液构建伴有辅酶再生的氧化还原酶催化体系的可能。但是, 此方面的研究上目前还未见报道。本文以木糖醇生产菌 *Candida Mogii* 为研究对象, 主要研究了细胞粗提液中 XR 的催化性质以及影响因素, 从而为进一步构建结合辅酶再生的多酶连续催化体系奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 *Candida Mogii* ATCC 18364, 美国 Rockville MD, 在  $4^\circ\text{C}$  下保存。

1.1.2 仪器及试剂 Dyno-Mill, TypKDL 型, 瑞士 Willy Bachofen 公司; 冷冻离心机, 3K30 型, 德国 Sigma 公司; 高效液相色谱, Beckman 公司; Aminex HPX-87X 型色谱柱, Biorad 公司; 紫外分光光度计, Biotech Ultrospec 2000 型, Pharmacia 公司。木糖, Aldrich 公司; 木糖醇, Sigma 公司; NADH NAD<sup>+</sup>, Sigma 公司; 其余试剂都为分析纯。

### 1.2 酶动力学研究

1.2.1 酶活测定 XR 酶活测定, 用紫外吸光法。在  $340 \text{ nm}$  处测吸光度的减少量。具体参数为:  $V_t = 2.5 \text{ mL}$ , 酶液  $50 \mu\text{L}$ , NADH  $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$ , 木糖  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 缓冲液 PBS ( $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 0.65$ )。定义每分钟消耗  $1 \mu\text{mol}$  NADH 为一个酶活单位。

1.2.2 蛋白浓度测定 Bradford 方法<sup>[7]</sup>, 以牛血清蛋白为标样。

1.2.3 Xylose 和 Xylitol 的浓度测定 高效液相色谱法<sup>[5,6]</sup>, 示差折光检测。

1.2.4 菌体培养 参见文献 [8]。

1.2.5 细胞破碎 *Candida Mogii* 细胞(湿)含量为  $3.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 液珠比 =  $80 \text{ mL} : 90 \text{ mL}$ ; 缓冲液 PBS,  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 6.5$ 。间歇操作, 冷却液温度为  $-5^\circ\text{C}$ 。

## 2 实验结果及数据分析

### 2.1 破碎停留时间对 XR 的影响

按照 1.2.5 节的条件破碎细胞, 总停留时间  $4.5 \text{ min}$ 。在破碎过程的时间点( $\text{min}$ )  $1.5, 3.0$  和  $4.5$  上取样, 样品在  $18000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下离心分离得上清液, 测酶活和蛋白浓度, 结果如图 1 所示。由图可见, 总蛋白浓度  $C_d$  随着破碎停留时间( $t$ ) 的延长而提高, 体积酶活  $A_v$  在破碎进行到约  $3.0 \text{ min}$  时达到最大值, 然后以较快的速度下降。这说明细胞在  $3.0 \text{ min}$  左右已经破碎得比较彻底, 并且失活较少。单位酶活  $A_g$  曲线正反映了这一点。因此, 取  $2.5 \sim 3.0 \text{ min}$  为最佳破碎时间, 这和文 [9] 的建议(一般细胞破碎在  $1.5 \sim 3.0 \text{ min}$  内完成较好)是一致的。

### 2.2 离心速度对 XR 的影响

在间歇操作破碎时间  $4.5 \text{ min}$  内取 3 个样品。分别在转速( $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 为  $12000, 20000$  和  $30000$  下离心  $30 \text{ min}$ , 测上清液蛋白浓度和酶活, 如图 2 所示。由图可见, 随着离心转速( $n$ ) 的增大, 上清液中的蛋白浓度和 XR 体积酶活  $A_{\text{XR}}$  在  $12000 \sim 20000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  内急剧减小, 而在  $20000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  以上则变化微小。虽然蛋白浓度的减少快于体积酶活的减少, 使得单位酶活呈

增大的趋势,但由于酶损失过大,所以仍取  $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  为合理离心转速.

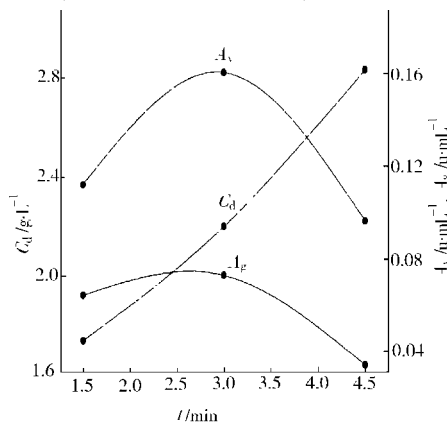


图1 破碎停留时间对XR酶活的影响

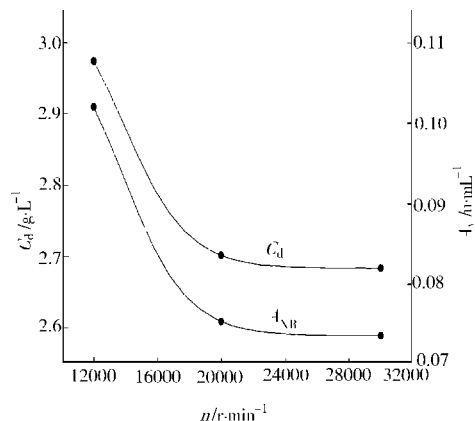


图2 离心速度对XR酶活的影响

## 2.3 $\text{K}^+$ 和 $\text{Mg}^{2+}$ 离子浓度对XR活性的影响

$\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  是常见的,对很多酶有着重要作用的离子,又是缓冲液中的常见离子.它们的离子浓度( $C$ )对细胞粗提液中的XR的影响,如图3,4所示.图3,4中,  $\text{NADH}$ ,  $\text{Xyl}$  (木糖)的浓度均为  $0.08\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.02\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .从图3可以看到,当  $\text{K}^+$  离子浓度低于  $0.10\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,增大离子浓度能在一定程度上提高XR的酶活;而当离子浓度继续增加,XR酶活迅速降低.其原因可能在于盐析作用,这和文[2]叙述的纯酶溶液中  $\text{KCl}$  最适浓度 ( $0.16\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 相近.图4则显示  $\text{Mg}^{2+}$  表现为XR的抑制剂,这和通常的报道有较大的不同.

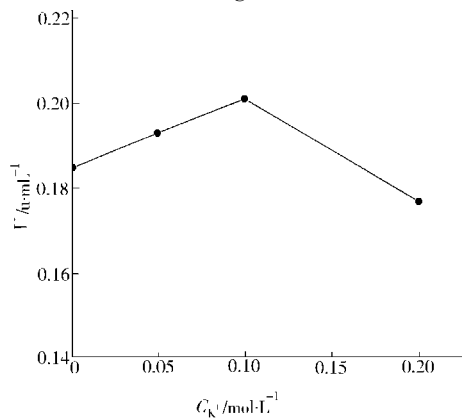


图3  $C_{\text{K}^+}$  对XR活性的影响

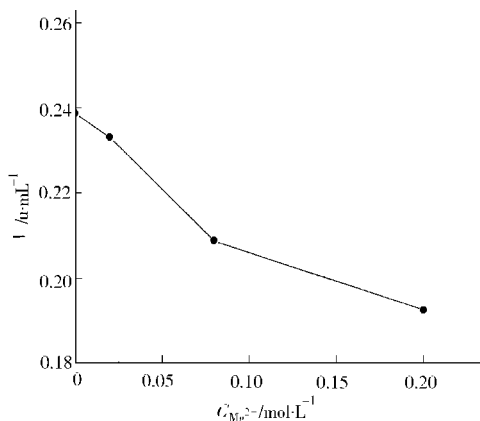


图4  $C_{\text{Mg}^{2+}}$  对XR活性的影响

## 2.4 催化动力学

2.4.1 动力学模型及实验 根据 Nidetaký 等人<sup>[6]</sup>的研究,由XR催化的木糖还原反应符合 BiBi 机制和 Michaelis-Menten 方程,可建立以木糖、 $\text{NADH}$  为底物的双底物酶催化动力学模型.本文由于体系的复杂性,使得对种种抑制作用的定量考察比较困难.因此,在所得的动力学模型中暂不考虑抑制作用.

$$V_{\text{XR}} = \frac{V_{\text{max}} C_{\text{Xyl}} \cdot C_{\text{NADH}}}{(K_{\text{mXyl}} + C_{\text{Xyl}})(K_{\text{mNADH}} + C_{\text{NADH}})} \quad (1)$$

其中  $V_{XR}$  为木糖还原酶的催化反应速率,  $V_{max}$  为最大反应速率,  $C_{Xyl}$  为木糖浓度,  $K_m$  为米氏常数. 分别固定其中一种底物, 变化另一种, 测 XR 酶活. 所作实验都在 25℃, pH 6.5 下进行, 并保证被固定底物过量约 10 倍. 所得数据如图 5, 6 所示. 图 5 中,  $C_{NADH}$ ,  $V_{max}$  和  $K_m$  分别为  $0.16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $0.479 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $0.220 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 而图 6 的  $C_{NADH}$ ,  $V_{max}$  和  $K_m$  则分别为  $0.10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $0.477 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $0.004 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

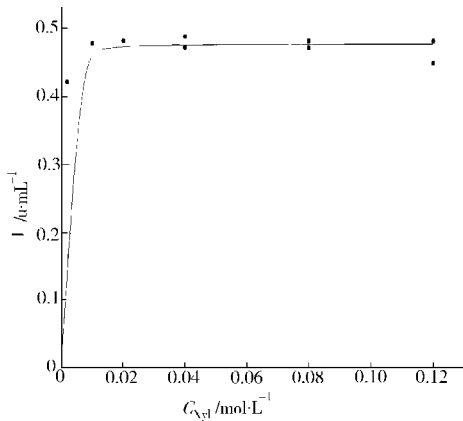


图 5 木糖的 XR 催化速度曲线

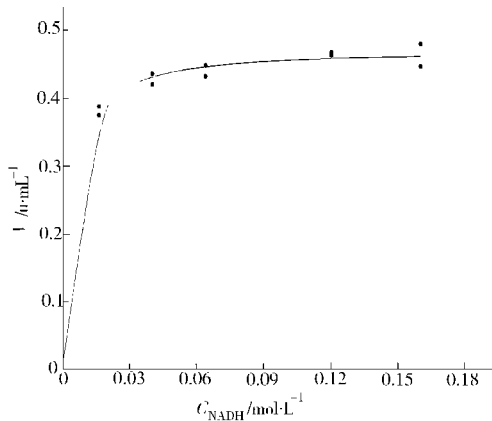


图 6 NADH 的 XR 催化速度曲线

2.4.2 参数回归 利用 Origin 5.0 软件, 进行模型的参数回归. 将数据代入方程(1), 可回归得到各参数:  $V_{max} = 0.478 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $K_m \cdot Xyl = 0.0041 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $K_m \cdot NADH = 0.22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . 这与 Nidetaký<sup>6)</sup> ( $K_m \cdot Xyl = 0.091 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $K_m \cdot NADH = 0.024 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和 Kulbe<sup>2)</sup> ( $K_m \cdot Xyl = 0.0023 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $K_m \cdot NADH = 0.078 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 等得到的数据有较大的差距. 这说明在细胞粗提液中, 酶的性质与纯酶有较大的不同.

## 2.5 稳定性及微滤作用

2.5.1 弱稳定性 对 XR 活性的监测表明, 在 4℃ 下保存, 其半衰期只有 50 h. 这与 Kulbe 等<sup>2)</sup>报道的结果(纯 XR 溶液在 4℃ 时的半衰期可达到 50 d, 23℃ 下 23 d)和 Nidetaký 等<sup>6)</sup>的数据(提纯后的 XR 在 pH=7.0 的缓冲液中半衰期为约 200 h)有很大的差距. 这可能是由于细胞粗提液中存在很多不同的杂质(如杂蛋白等), 而造成其中 XR 的稳定性比较差. 究竟有哪些因素影响及如何影响, 还有待进一步考察.

2.5.2 微滤作用 由于酶的连续催化过程需要在无菌条件下进行, 而一般灭菌方法都会对酶产生破坏. 因此, 采用微滤(表 1)的方法去除微生物细胞. 微滤膜孔径  $0.22 \mu\text{m}$ , 滤器直径 25 mm. 如表 1 所示的结果表明, 微滤后, 蛋白浓度和体积酶活都有损失; 但仍保留了如前言中所述的  $0.15 \sim 0.2 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$  的催化能力.

表 1 微滤对 ADH 及 XR 酶活的影响

浓度或酶活	微滤前	微滤后
$\text{Ca}^{2+} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1.88	1.20
$A_{410} / \text{u} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.233	0.161
$U / \text{u} \cdot \text{mg}^{-1}$	0.124	0.134

## 3 结果与讨论

当破碎停留时间为 3 min、离心转速为  $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  时, 提取液中 XR 的酶活保留较好. 适当的 K<sup>+</sup> ( $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  左右) 能够提高酶活, 而 Mg<sup>2+</sup> 对 XR 有抑制作用. 所得粗提液中

的双底物反应模型参数为  $K_{m \cdot \text{Xyl}} = 0.004 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $K_{m \cdot \text{NADH}} = 0.22 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . 实验结果表明, 由细胞粗提液可以提供如文献 [6] 所述的木糖醇转化体系的催化能力, 但酶的稳定性较差, 还不足以进行较长时间的连续催化. 因此, 以较低的代价提高酶液的稳定性是实现连续催化的关键.

## 参 考 文 献

- 1 Nidetak B, Haltrich B, Kulbe K D. Carry out coenzyme conversions economically [J]. *Chemtechnology*, 1996, 26: 31 ~ 36
- 2 Kulbe K D, Schmidt H, Schmidt K, et al. Continuous synthesis of xylitol by NAD(P)H-linked Aldose reductase in a charged ultrafiltration membrane-enzyme reactor [A]. In: Visser J, et al., eds. *Xylans and Xylanases* [C]. B.V.: Elsevier Science Publishers, 1992. 565 ~ 572
- 3 Jose M O, Arturo M, Jose L I. Retention and regeneration of native NAD(H) in noncharged ultrafiltration membrane reactors: Application to *L*-lactate and gluconate production [J]. *Biotech. & Bioeng.*, 1998, 57: 510 ~ 517
- 4 Neuhauser W, Monika S, Dietmar H, et al. A pH-controlled fed-batch process can overcome inhibition by formate in NADH-dependant enzymatic reductions using formate dehydrogenase-catalyzed coenzyme regeneration [J]. *Biotech. & Bioeng.*, 1998, 60: 277 ~ 282
- 5 Rizzi M, Erlemann P. Xylose fermentation by yeasts —— (4) Purification and kinetic studies of xylose reductase from *pichia stipitis* [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1988, 29: 148 ~ 154
- 6 Nidetak B, Wilfried N, Dietmar H, et al. Continuous enzymatic production of Xylitol with simultaneous coenzyme regeneration in a charged membrane reactor [J]. *Biotech. & Bioeng.*, 1996, 52: 387 ~ 396
- 7 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the qualification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248 ~ 256
- 8 陈宏文, 方柏山, 胡宗定. 利用假丝酵母由木糖发酵法生产木糖醇的研究[J]. *华侨大学学报(自然科学版)*, 1998, 19 (4): 416 ~ 419
- 9 修志龙, 苏志国. 水平式珠磨机破碎微生物细胞动力学[J]. *化工学报*, 1994, 45(2): 51 ~ 57

## Property and Influencing Factors of Catalysis Induced by Xylose Reductase in Crude Extract of *Candida Mogii* Cells

Wan Ning<sup>①</sup> Li Weicheng<sup>②</sup> Fang Baishan<sup>①</sup> Su Zhiguo<sup>②</sup>

(<sup>①</sup> College of Mater. Sci. & Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou;

<sup>②</sup> Inst. of Chem. Metallurgy, Chinese Academy of Sciences, 100080, Beijing)

**Abstract** *Candida Mogii* cells are taken as object, from which xylose reductase(XR) is extracted. A study is made on experimental condition of extraction and catalytic kinetics of XR. As indicated by the study: (1) XR in crude extract keeps a fairly good enzyme activity under a crush retaining for 3 min. and a centrifugal speed up to  $1\,200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ; (2) enzyme activity of XR can be enhanced by  $\text{K}^+$  in suitable concentration, but it will be inhibited by  $\text{Mg}^{2+}$ ; (3) XR in crude extract has fixed catalytic force for satisfying the demand of practical use; and (4) XR in crude extract shows a half-life about 50 hrs, its stability is inadequate for realizing long time continuous catalytic production.

**Key words** xylose reductase, coenzyme, cell-free extracts, xylitol