

微生物乳糖酶的研究

李 强 军

1989.10

微生物乳糖酶的研究

博士研究生 李强军

专 业 食品科学与工程

导 师	汤 逢	教授	沈学源	教授
指导小组	向瑞春	教授	全文海	副教授
	李东庆	教授	诸葛健	副教授
			韦光果	副教授

无 锡 轻 工 业 学 院

一九八九年十月

致 谢

本课题是在导师和指导小组各位老师的精心指导下和热情鼓励下完成的。全文海副教授对论文进行了具体的指导。在此向全体导师们致以崇高的敬意和衷心的感谢。对敬爱的导师沈学源教授表示深切的怀念。

在研究过程中，曾得到山东大学王祖农教授、上海工业微生物研究所胡学智高级工程师、中国科学院北京微生物研究所徐家立研究员、中国科学院上海生物化学研究所施建平研究员、中国科学院北京微生物研究所曾宇成博士、日本协和发酵株式会社森川康博士、美籍专家 S.G. Gilbert 教授等的关心和指导，还得到伦世仪教授、章克昌教授和邬显章教授的指导和帮助，在此向他们表示真诚的谢意。

院长丁霄霖教授在百忙中还十分关心本课题的进展情况并给予热情的指导，在此表示内心的感谢。

此外，还得到发酵系王武副教授、陶文沂副教授、莫开国博士、华子安老师等和食工系王璋副教授、杨方琪副教授、林金资副教授、肖荣博士等有关老师的指导和帮助以及科研处、研究生科、设备处、测试中心等有关部门的大力支持，在此一并表示感谢！

肖振金副编审审阅了论文的详细摘要，并提出宝贵的意见，在此表示感谢。

最后，对几年来一直支持我进行研究工作的父母、爱人及其他亲人们表示感谢。

微生物乳糖酶的研究

摘要

本文对微生物乳糖酶的微生物学、生物化学及其应用等几个方面进行了研究。首先对有关文献中所报道的几种乳糖酶产生菌的筛选方法进行了分析,然后在此基础上设计了一种新的筛选方法,并对这种方法进行了理论分析,又运用这一方法从土样和水样中筛得了二株乳糖酶产生菌:芽孢杆菌B18-30和黑曲霉CWL88271。B18-30菌株乳糖酶的ONPG/Lac约为74.5(pH6.5,60℃),这表明该酶对ONPG的水解能力较强,对乳糖的水解能力较弱。CWL88271菌株乳糖酶ONPG/Lac约为1.2(pH4.0,55℃),这说明该酶对乳糖水解能力较强,对ONPG水解能力相对较弱。经对CWL88271乳糖酶的诱导合成进行研究后,发现果胶对酶有很强的诱导作用,由此对果胶的诱导作用进行了解析,结果表明果胶的诱导作用是果胶的水解产物半乳糖醛酸引起的。然后对CWL88271进行诱变育种,筛选对柠檬酸钠、 α -甲基葡萄糖苷及抗菌素抗性的高产突变株,获得了CWL₂NU-3菌株,又对CWL₂NU-3菌株的发酵工艺条件进行了优化,使产量提高约11倍,达12.01/ml。

对CWL₂NU-3菌株乳糖酶的基本性质、底物特异性以及酶水解键位置等进行了研究,在此基础上提出了可能的催化机制。从理论上分析了底物特异性。运用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、凝胶过滤色谱、离子交换色谱等方法,从CWL₂NU-3菌株发酵液中分离纯化获得了盘状凝胶电泳均一的三种分子形式的乳糖酶F₁、F₂、F₃,然后对它们的物理化学性质、酶学性质、动力学性质等进行了研究,又运用了紫外光谱和荧光光谱法对F₁、F₂、F₃三者溶液中的构象进行了探测。最后探索了CWL₂NU-3菌株乳糖酶在乳清中应用的工艺条件及乳糖水解动力学。

关键词: 微生物乳糖酶、乳糖酶、 β -半乳糖苷酶、乳糖的水解

Dissertation For Ph. D. Degree

Studies on Microbial Lactases

Graduated Student Li Qiangjun

Directors Tong Feng Shen Xueyuan

Asistant Directors Xiang Ruichun Quan Wenhai

Li Dengqin Zhu Gejian

Wei Guangguo

Wu Xi Institute of Light Industry

1 9 8 9 . 1 0

Studies on Microbial Lactases

(Abstract)

This dissertation includes the researches on microbiology, biochemistry and application of microbial lactases. Firstly, several methods reported before for screening strains producing lactase were analysed, and then a new screening method was designed. Moreover the theory on this method was discussed. From soil and sewage samples, more than 900 strains which showed lactase activity were isolated with the method, among them two strains, *Bacillus* 18-30 and *Aspergillus niger* CWL88271 were the best. The ratio of ONPG/ Lac for the enzymes from B18-30 and CWL88271 is about 74.5 (pH 6.5, 60°C) and 1.2 (pH 4.0, 55°C) respectively. It means that the enzyme from B18-30 shows strong hydrolytic power on ONPG, and weak power on lactose, with the enzyme from CWL88271, this result is reversed. The studies on induction of CWL88271 lactase shows that pectin induces lactase effectively. According to the experimental results, the induction of pectin on lactase is derived from the hydrolytic product of pectin—galacturonic acid. By selecting the resistant mutants for citrate, α -methylglucoside and antimicroorganism medicine after mutation, a high yield mutant, CWL2NU-3, was obtained. The fermentation conditions for the mutant were optimized. Thereby the productivity of CWL2NU-3 was increased to 12.0u/ml, about 11 times compared with the starting strain CWL88271.

The catalytic properties, substrate specificity of the enzyme and the bond hydrolysed were studied, on the base of these results, a catalytic scheme was postulated. The substrate specificity for ONPG and PNP6 was also discussed. Using $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractional preparation, gel permeate chromatography, ion exchange chromatography and hydrophobic chromatography etc., the enzyme lactase produced by CWL2NU-3 was purified and resolved into three multiple forms F1, F2, F3, which were shown to be homogenous on disc-PAGE. The physicochemical properties, enzymatic properties and kinetics of F1, F2 and F3 were studied. The conformation of all three enzyme forms in solution were searched by UV spectrophotometry and fluorescence spectrophotometry.

Finally, the technology of enzyme application for lactose hydrolysis and the kinetics of lactose hydrolysis in whey were studied.

Subject Words: Microbial lactases, Lactase, β —galactosidase, Lactose hydrolysis.

目 录

	致谢	
	中文摘要	
	英文摘要	
第一章	绪论	····· (1)
1.1	引言	····· (1)
1.2	乳糖酶研究史	····· (2)
1.2.1	乳糖酶的酶学研究	····· (2)
1.2.2	乳糖酶产生菌的检索	····· (7)
1.2.3	乳糖酶的应用	····· (8)
1.3	立题背景及目标	····· (11)
第二章	乳糖酶产生菌新的筛选方法	····· (18)
2.1	步骤	····· (18)
2.2	理论分析	····· (22)
2.3	试验	····· (23)
2.4	讨论	····· (24)
第三章	乳糖酶产生菌细菌的筛选	····· (27)
3.1	材料与方法	····· (27)
3.2	结果	····· (29)
3.2.1	乳糖酶产生菌的分离	····· (29)
3.2.2	B18—30菌株菌落、细胞形态特征及部分 生理生化特性	····· (32)
3.2.3	影响B18—30菌株产酶条件的试验	····· (34)
3.2.4	乳糖的水解试验及ONPG/Lac的测定	····· (39)
3.3	讨论	····· (40)
第四章	乳糖酶产生菌霉菌的筛选及初步鉴定	····· (43)
4.1	材料与方法	····· (43)
4.2	结果	····· (45)

4.2.1	乳糖酶产生菌霉菌的筛选	… … … (45)
4.2.2	pH及温度对ONPG/Lac的影响	… … … (45)
4.2.3	F ₂ -71菌株的初步鉴定	… … … (47)
4.3	讨论	… … … (50)
第五章	乳糖酶产生菌CWL88271的改良及发酵工	
	艺条件的优化	… … … (54)
5.1	材料与方法	… … … (54)
5.2	结果	… … … (56)
5.2.1	CWL88271菌株乳糖酶合成的控制因素	… … … (56)
5.2.2	CWL88271菌株的诱变育种	… … … (57)
5.2.3	CWL2N1-3菌株发酵工艺条件的优化	… … … (59)
5.3	讨论	… … … (75)
第六章	CWL88271菌乳糖酶合成的诱导及高分子诱导	
	物的解析	… … … (79)
6.1	材料与方法	… … … (79)
6.2	试验结果	… … … (81)
6.2.1	预培养试验	… … … (81)
6.2.2	在不同糖上的生长	… … … (82)
6.2.3	不同糖对酶的诱导作用	… … … (82)
6.2.4	在含果胶培养基上酶的合成	… … … (83)
6.2.5	发酵过程中添加果胶的影响及发酵液中果胶	
	水解物的层析	… … … (84)
6.2.6	果胶的水解及其水解物的分离和定性	… … … (86)
6.2.7	果胶水解物A和B的诱导效应	… … … (87)
6.3	讨论	… … … (89)
第七章	乳糖酶的应用性质	… … … (93)
7.1	材料与方法	… … … (93)
7.2	结果	… … … (96)

7.2.1	pH及温度对乳糖酶活性的影响	... (96)
7.2.2	pH与温度对乳糖酶稳定性的影响	... (97)
7.2.3	碳水化合物对乳糖酶活性的影响	... (98)
7.2.4	乳糖酶的底物特异性	... (100)
7.2.5	乳糖酶水解键位置的测定	... (100)
7.2.6	乳糖的酶促水解	... (102)
7.3	讨论	... (103)
第八章	乳糖酶的分离纯化及性质	... (111)
8.1	材料与方法	... (113)
8.2	结果与讨论	... (119)
8.2.1	乳糖酶的纯化	... (119)
8.2.2	纯度的测定	... (125)
8.2.3	乳糖酶的蛋白质化学性质	... (126)
8.2.4	乳糖酶的酶学性质	... (130)
8.2.5	酶的动力学性质	... (136)
8.3	小结	... (142)
第九章	乳糖酶的光谱学性质(溶液中酶的构象的研究)	... (145)
9.1	材料与方法	... (145)
9.2	结论与讨论	... (147)
9.2.1	乙二醇对F ₁ 、F ₂ 、F ₃ 紫外线光谱及紫外差光谱的影响	... (147)
9.2.2	F ₁ 、F ₂ 、F ₃ 的荧光光谱	... (150)
9.3	结论	... (164)
第十章	乳清中乳糖的酶法水解工艺研究	... (166)
10.1	材料与方法	... (167)
10.2	结果	... (169)
10.2.1	pH对乳清中乳糖水解速度的影响	... (169)
10.2.2	温度对乳清中乳糖水解速度的影响	... (169)

10.2.3	底物浓度的影响	 (170)
10.2.4	酶浓度的影响	 (170)
10.2.5	金属离子的影响	 (170)
10.2.6	反应过程曲线	 (172)
10.2.7	工艺条件正交试验	 (173)
10.2.8	乳清水解液成份分析	 (175)
10.3	讨论	 (176)
第十一章	乳清中乳糖水解动力学研究	 (178)
11.1	材料与方法	 (178)
11.2	水解速度方程式的推导	 (179)
11.3	结果与讨论	 (181)
11.3.1	水解速度方程式中参数的估计	 (181)
11.3.2	乳清中乳糖水解度关系式	 (185)
11.4	结论	 (186)
第十二章	总结	 (188)

第一章 绪 论

1.1 引言

按照国际生化联合会酶学委员会的命名法,乳糖酶(Lactase)称为 β -D-半乳糖苷半乳糖水解酶(β -D-galactoside galactohydrolase, EC.3.2.1.23),或简称 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase),它是一类催化特殊类型的糖苷键— β -半乳糖苷类化合物中 β -半乳糖苷键发生水解断裂的酶(1)。早在本世纪初,人们先后在自然界中的动物(2,3)、植物(4—7)以及微生物材料(8—10)中发现有乳糖酶的活性。自四、五十年代以来,在生物化学、分子生物学等研究中,一般都是以大肠杆菌乳糖酶作为研究材料的,这是因为大肠杆菌乳糖酶具有分子量大、易于分离纯化和测定等特点,所以它成了生物化学、分子生物学等研究用的良好材料。许多理论都是在大肠杆菌乳糖酶研究中提出的,可以说乳糖酶曾为生物科学的发展作出过巨大贡献。

自本世纪60年代以来,科学家们相继发现人体中普遍缺乏乳糖酶(表1—1)(11—14)。而含有4—5%乳糖的牛乳曾被推崇为天然完全食品,但是缺乏乳糖酶的人是不能消化吸收乳糖的,摄入的乳糖直接进入肠道,其结果是:<1>由于渗透效应,引起细胞失水,粪便变稀;<2>在肠道内,大肠菌群利用乳糖发酵产酸产气,刺激肠壁引起腹鸣、腹胀、腹痛、腹泻;<3>由于低酸性,引起钙的吸收不良(15)。在医学上,由乳糖引起的上述症状称为“乳糖不适应症”。这一发现受到全世界许多酶学家、微生物学家、医学家以及食品科学家的重视。从此有关乳糖酶的研究进入了一个崭新的时代。

1.2 乳糖酶的研究史

表1—1 成人中乳糖酶缺乏分布

乳糖酶的研究史可以从酶学性质、乳糖酶产生菌的检索及生产和酶的应用这几个方面来叙述。

1.2.1 乳糖酶的酶学研究

乳糖酶的酶学研究包括酶的基本性质、催化特性及酶的底物特异性、酶的结构与功能及其反应机制等几个方面。

乳糖酶的基本性质，如最适pH、最适温度、稳定性、分子量、金属离子的影响等，随着酶的来源不同差别很大。一般情况下，来源于细菌和酵母的乳糖酶的最

种 族	缺乏乳糖比例(%)
北 欧	1—5
中欧(英国、苏联)	10—20
中东(希腊、犹太人)	60—90
非洲及美洲黑人	70—100
美国本土人	80—100
东方人(尤指中国、日本人)	80—100
美籍墨西哥人	50—80

最适pH位于中性范围，而来源于霉菌的乳糖酶的最适pH偏酸性，生长于常温下的细菌和酵母菌的乳糖酶的最适温度较低，酶的稳定性较差，而来源于霉菌和高温细菌的乳糖酶的最适温度较高，稳定性也较好。乳糖酶的分子量较大，一般为10万至数十万。有的酶有亚基，有的酶无亚基，如大肠杆菌乳糖酶由四个亚基组成(16)，而脆壁酵母乳糖酶由9至10个亚基组成(17)。金属离子对某些来源的酶是必需的，而对另一些来源的酶则是无关紧要的，表1—2为不同来源乳糖酶的性质。

Wallenfels et al(24)以超离心均一的结晶大肠杆菌乳糖酶进行试验，结果表明该酶既能催化水解反应，也能催化转移反应(即构成

底物的糖苷配糖基转移到水或其他受体上,如醇、糖等形成新的糖苷键)。在乳糖的同分异构体中,酶催化的水解反应速度和转移反应速度成正比,并按下列顺序进行, $1\rightarrow6 > 1\rightarrow4 > 1\rightarrow3$ (25)。而牛肠道乳糖酶的催化反应速度与此顺序相反(1)。由于转移反应,结果形成了一系列的低聚糖。到目前为止,所试验的酶包括黑曲菌乳糖酶(26)、乳酸酵母乳糖酶(27)、各种乳酸杆菌乳糖酶(28)、脆壁酵母乳糖酶(29)、环状芽孢杆菌乳糖酶(30)等都能催化转移反应,在乳糖水解过程中形成低聚糖。Burvall(27)对乳糖水解中低聚糖形成的研究表明,低聚糖的形成与乳糖浓度成正比,所形成的低聚糖人体不能吸收,但是在5%的乳糖浓度时,所形成的低聚糖不会引起消化障碍。Aap et al.(31)对Burvall研究中发现的低聚糖进行了测定,结果表明,6种低聚糖都为二至四聚糖,所有的低聚糖都为线形结构,分子中含有一至2个半乳糖基以 $\beta-(1\rightarrow6)$ 与葡萄糖、半乳糖或乳糖连接。

乳糖酶的底物特异性研究包括两个方面,一为糖苷配糖基的特异性,另一为糖苷配基的特异性。乳糖酶对糖苷配基有很宽的忍耐性,无论配基是糖残基,还是芳香烃基,或者是烷基形成的半乳糖苷都能被酶水解,但水解速度受配基影响。对大肠杆菌酶来说,芳香基半乳糖苷的水解速度比烷基半乳糖苷及乳糖快,而对于牛的肠道酶来说,乳糖是最佳底物(1)。与其它糖苷酶相似,乳糖酶对底物中糖苷配糖基的结构有严格的要求,<1>大肠杆菌酶只水解吡喃半乳糖苷,不水解呋喃半乳糖苷(32);<2>大肠杆菌乳糖酶只水解 β 型的半乳糖苷,不水解 α 型半乳糖苷(33);<3>糖苷氧被S取代后,导致酶完全失活(33),在糖苷配基中芳香环上引入吸电基团使酶的水解速度增加(34);<4>半乳糖残基上C-2, C-3, C-4, C-6上的-OH甲基化后,导致酶的活性丧失(33, 35-37), C-6被H(33)、甲基(38)、亚甲基(37)取代后,导致水解速度的下降;<5>糖苷氧被F或N取代后,仍被酶所作用(39, 40)。

Fowler et al.(41)使用胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、CNBr等将大肠杆菌乳糖酶进行切割,分离纯化得到104个肽段,运用羧肽酶、氨肽酶法及Edman-Dansyl法测定各个肽段的氨基酸顺序,最后拼出了该酶亚基的一级结构,结果表明酶的亚基由1021个氨基酸分子组成,分子量为116349。

表1—2 不同来源乳糖酶的性质(18)

来 源	最适pH	最适温度 (°C)	MW(KD)	激活 离子
<i>A. niger</i>	3.0-4.0	55-60	124	
<i>A. oryzae</i>	5.0	50-55	90	
<i>K. fragilis</i>	6.6	37	201	Mn ²⁺ , K ⁺
<i>K. laclis</i>	6.9-7.3	35	135	Mn ²⁺ , Na ⁺
<i>E. coli</i>	7.2	40	540	Na ⁺ , K ⁺
<i>L. thermophilus</i>	6.2-7.1	55-57	530	
<i>C. inaequalis</i>	3.4-4.3	30-55		
<i>B. circulans</i>	6.0	60-65		
<i>polypragmatus</i> (19)	6.8	45		Mg ²⁺ , DTT
<i>Fusarium</i> <i>moniliforme</i>	3.8-5.0	50-60		
<i>L. bulgaricus</i>	7.0	42-45		
<i>Leuconostoc</i> <i>citrovorum</i>	6.5	60		
<i>B. stearother-</i> <i>mophilus</i> (20)	6.0-6.4	65	215	
<i>Streptococcus</i> <i>- thermophilus</i>	6.5-7.5	55	500-600	
<i>Mucor pucillus</i>	4.5-6.0	60		
<i>Alternaria alternara</i>	4.5-5.5	50-70		
<i>Thermus aquaticus</i>	4.5-5.5	80	570	
<i>A. foetidus</i> (21)	4.0	65	126	
<i>Pycnopus cinnabarinus</i> (22)	2.4		110	
<i>Penicillium multicolor</i> (23)	4.5	55	1200	

注:除注明文献外,其余摘自文献(18)。

大肠杆菌乳糖酶受巯基试剂PCMB等的强烈抑制，因而很长时间一直认为该酶为巯基酶(1)。但Lootiens et al.(42)用该酶的亲和试剂O—汞酚基— β —D—半乳糖苷进行抑制试验时，结果是该试剂被完全水解，其水解产物汞酚则是酶的更强的抑制剂。这表明汞试剂在活性中心的结合并没有使重要的催化基团失活，因而排除了巯基的直接催化作用，巯基试剂引起的失活可能是维持活力构象必需的SH被修饰引起的。用N—溴乙酰— β —D—半乳糖胺(43)和对一硝基酚三氮烯— β —D—半乳糖胺(44)对大肠杆菌乳糖酶亲和标记，都可使该酶全部失活。经分析，被标记的氨基酸为Met500(44)。在变异株中，Met500被其它氨基酸取代后不影响酶的活性，由此看来，Met500不是活性中心基团，而与之相邻的Tyr501可能是该酶的催化基团(45)。Herrchen et al.(46)仿照葡萄糖苷酶的研究方法，设计了一种活性中心指示剂—杜康醇C(1,2—环氧—肌醇)，当一个大肠杆菌乳糖酶分子结合一个分子的杜康醇C时，酶完全失活，可逆竞争性抑制剂对酶活有保护作用。经分析，该试剂与酶分子中Glu461相结合。Yoncyama et al.(47)根据动力学研究结果表明，在大肠杆菌乳糖酶分子中，活性中心含有两个解离基团，它们的解离常数为7.2和7.8；黑曲霉乳糖酶活性中心也含有两个解离基团，它们的解离常数分别为2.7和5.3。解离动力学研究表明，黑曲霉乳糖酶活性中心的两个解离基团可能都是羧基，大

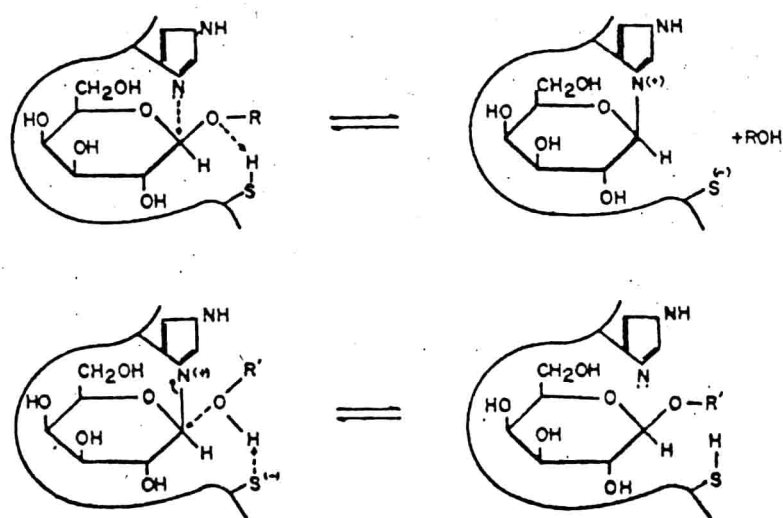


图1—1. Wallenfels et al.乳糖酶水解机制。

肠杆菌乳糖酶活性中心的解离基团一个可能是羧基，另一个可能是巯基或咪唑基。到目前为止，对乳糖酶活性中心基团的组成及其作用还很不清楚。

关于乳糖酶的水解机制现也还不太清楚，已有的研究主要以大肠杆菌乳糖酶作为对象。抑制试验与pH—酶活关系研究表明，大肠杆菌乳糖酶活性中心含有巯基或咪唑基，据此，Wallenfels和Malhotra(1)提出了图1—1所示的双取代反应机制。Lootiens et al(42)的研究结果否定了活性中心存在巯基这一观点，并对这一机制提出了疑问。后来，人们发现具有平面结构的半乳糖醛对该酶有强烈的抑制作用，由此推测酶的水解可能经过正碳离子阶段(48)。根据水解底物时的同位素效应及其动力学研究，Sinnot et al (49)认为大肠杆菌乳糖酶水解不涉及双取代反应，而是经过半乳糖阳离子中间体，据此提出了图1—2所示的反应机制。

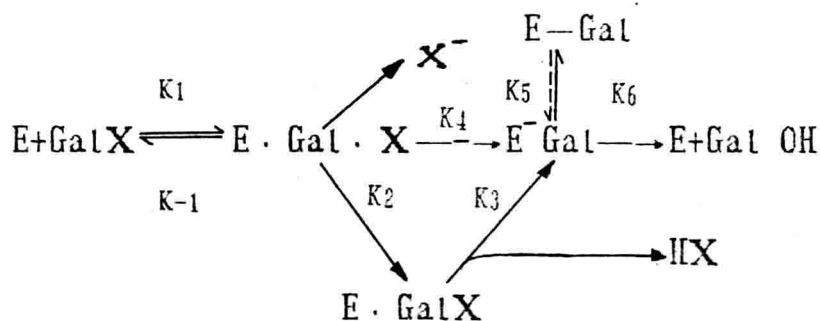


图1—2 Sinnot et al.乳糖酶水解机制

乳糖酶尤其是来源于大肠杆菌的酶是一个研究得较深入的酶种，这主要得益于其乳糖酶较稳定、分子量较大、较易分离纯化的特点(16)。现在人们可以用常规的方法(50)、亲和色谱法(51—54)以及疏水色谱法(55)等分离纯化乳糖酶。目前所报道的获得纯化乳糖酶的微生物有，黑曲霉(52, 53, 55)、米曲霉(56, 57)、嗜热链球菌(58)、脆壁酵母(59)、朱红密孔菌(60)、乳酸球菌(61)、Scopulariopsis sp.(62)、Sclerotium tuliparum and Macrophomina phaseoli(63)等。