

# 对固定化大肠杆菌谷氨酸脱羧酶中辅酶再生的研究

李 永 丰

(上海化工学院工业生化教研组)

近十多年,酶的固定化技术及应用发展迅速。但含有辅酶的固定化酶,由于辅酶的漏失而导致酶活力迅速丧失,再加上多数辅酶价格昂贵,因而限制了这类固定化酶系的应用。当前国内外对辅酶保留和再生正在深入研究,在方法学上有很大发展,但从理论上和技术上臻于完备,以及从实验室过渡到商品化规模尚需努力<sup>[1-4]</sup>。本文报道我们对固定化大肠杆菌谷氨酸脱羧酶的辅酶漏失和再生进行的初步研究。

## 材 料 和 方 法

**1. 大肠杆菌的培养和收集** AS1.505 大肠杆菌 37℃ 通气培养 14 小时,培养基含蛋白胨 2%,玉米浆 1%,麸皮水解液 15%,NaCl 0.3%,MgSO<sub>4</sub> 0.02%,pH 6.4。离心收集菌体。

**2. 固定化细胞的制备** 1) 称取大肠杆菌湿菌体 10 克,缓慢加入 4% 海藻酸钠溶液 50 毫升,搅拌成悬浮液。

2) 将上述悬浮液注入 1000 毫升 0.05M CaCl<sub>2</sub> 溶液中,即成珠状颗粒。注入速度决定颗粒大小。放冰箱浸泡过夜,次日用蒸馏水洗涤抽干。

3) 将抽干的珠状颗粒加到 100 毫升用 0.05M CaCl<sub>2</sub> 溶液配制的 0.5% 戊二醛溶液中,室温搅拌 2 小时,用蒸馏水多次洗涤抽干,共得湿重的固定化细胞 50 克,酶的活力回收 45—50%。

**3. 固定化大肠杆菌谷氨酸脱羧酶的催化反应** 固定化细胞与浓度为 7—8% 的 Glu (L-谷氨酸),配制在 0.2M, pH 4 的 HAc-NaAc 缓冲液中,于 37℃ 搅拌反应 4 小时。Glu 用量按经

验公式:  $w = 1.5 \times 10^{-3} \mu \cdot g$  计算。

其中:  $w$  为底物 Glu 投料量(克)。

$\mu$  为固定化酶活力单位。

$g$  为固定化细胞湿重(克)。

$1.5 \times 10^{-3}$  为实验校正系数。

在上述条件下,底物 Glu 全部转化为  $\gamma$ -氨基丁酸。

**4. 谷氨酸脱羧酶活力测定** 酶活力单位采用每克菌体或固定化细胞,在 0.2M, pH 4 HAc-NaAc 缓冲液中,每分钟催化 Glu 裂解所放出的 CO<sub>2</sub> 微升数。释放 1 微升 CO<sub>2</sub> 定为一个酶单位。用  $\mu$  表示。

1) 自然细胞酶活力测定 在瓦氏呼吸测压仪的反应小瓶内加入 0.2M, pH 4 HAc-NaAc 缓冲液 1.20 毫升,0.05 M Glu 溶液 1.0 毫升,1.0% 菌液 0.3 毫升,37℃ 保温振荡反应 10 分钟。

酶活力计算公式:  $\mu = \frac{K(h_2 - h_1)}{g \cdot t}$

其中:  $K$ : 反应小瓶常数。

$h_1$ 、 $h_2$ : 分别为测压仪上反应前后的高度(毫米)

$g$ : 菌体湿重(克)

$t$ : 反应时间(分)

2) 固定化细胞酶活力测定 在瓦氏呼吸测压仪的反应小瓶内加入 pH 4, 0.2 M HAc-NaAc 缓冲液 2.0 毫升,0.1M Glu 溶液 0.5 毫升,固定化细胞湿重 200 毫克。测定及计算同自然细胞酶。

**5. 辅酶再生——微量辅酶-底物保温法** 用 pH 6, 0.05 M CaCl<sub>2</sub> 溶液配制含 0.05mM plp (辅酶磷酸吡哆醛)和 2.5m M Glu 的再生溶液。

每 10 克固定化细胞加入上述溶液 10 毫升, 37℃ 保温 2 小时。过滤固定化细胞并用蒸馏水反复洗涤抽干, 谷氨酸脱羧酶即获得辅酶 plp, 酶活力可恢复达 100%。滤出的再生溶液可反复回收使用多次。

再生效率以活力恢复率(%)计算。

$$\text{酶活力恢复率} = \left( \frac{\mu_i - \mu_c}{\mu_0 - \mu_c} \right) \times 100\%$$

其中:  $\mu_0$ : 固定化细胞初始酶活力。

$\mu_c$ : 经催化反应后的酶活力。

$\mu_i$ : 再生后的酶活力。

### 结 果

**1. 辅酶漏失的分析** 制得的固定化细胞, 经每次酶促反应后, 酶活力明显下降, 为探讨其原因, 作三组实验: 1) 同一反应系统中以反应 10 分钟为一次(见材料与方法 4), 连续测定酶活力四次(图 1-OA); 2) 每反应 10 分钟后, 将固定化细胞取出, 移至另一新鲜反应系统中按同法测定酶活力, 依次连续四次(图 1-OB); 3) 把第二组反应后的固定化细胞(按材料与方法 5) 再生, 并测定酶活力(图 1-C 点、D 点), 从第一组实验结果看, 连续在同一系统中反应, 辅酶和酶蛋白在一定条件下具有生物亲和力, 两者的解离和结合保持着一个动态平衡, 只是当底物

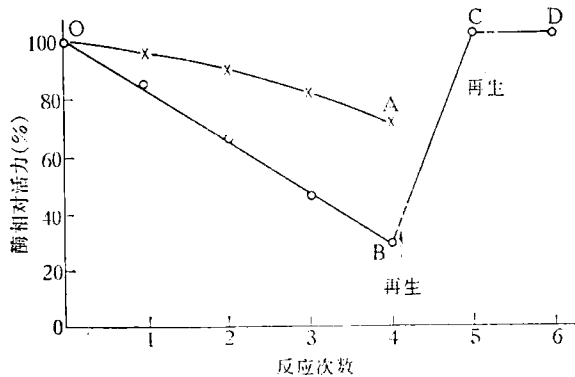


图 1 谷氨酸脱羧酶辅酶 plp 漏失的分析

×—×—× (OA), 在同一反应系统中, 反应 10 分钟为一次, 连续测定酶活力  
○—○—○ (OB), 每反应 10 分钟, 将固定化细胞移至新鲜反应系统后测定酶活力  
↑ 将固定化细胞取出, 进行辅酶再生, 然后测定酶活力

逐渐消耗, 活力才下降。第二组实验, 固定化细胞从原反应系统被取出, 移入新鲜反应系统时, 因脱落的部分辅酶漏失在原反应系统中, 致使酶活力明显下降。第三组实验, 当辅酶被再生后, 酶活力即可恢复到 100%。

**2. 再生的最适条件** 取等量催化反应后的固定化细胞, 在不同条件下进行辅酶再生, 依材料与 方法 5 计算酶活力恢复率(见图 2—6)。

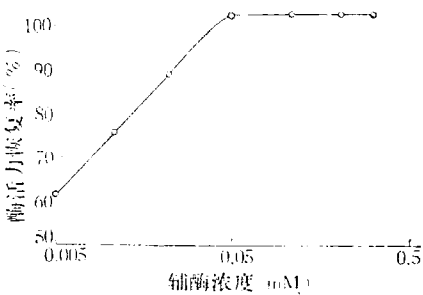


图 2 谷氨酸脱羧酶辅酶再生效率与辅酶 plp 浓度关系

反应系统: 固定化细胞与 pH6, 2.5mM Glu-0.05M CaCl<sub>2</sub> 水溶液及不同浓度 plp, 37℃ 保温 2 小时

**3. 固定化细胞在催化反应及辅酶再生中的稳定性** 25 克固定化细胞, 每经催化 10 克 Glu 后进行辅酶再生, 连续 12 次酶活力维持不变。在经受 50℃ 水浴保温 15 分钟, 酶活力下降 7%, 而后又连续进行催化反应及辅酶再生 8 次, 酶活力保持同一水平。因此只要载体机械强度能承受反复处理, 则催化反应后的固定化细胞通过辅酶的再生可长期使用。

**4. 底物谷氨酸为辅酶再生的必要条件** 图 3 所示当其他再生条件固定, 辅酶再生的效率与底物 Glu 含量关系密切。表 1 表明, 唯有底物 Glu 和辅酶 plp 协同作用, 酶活力才可能获 100% 恢复。自然酶再生的情况与固定化酶相同。若将固定化细胞在无底物条件下, 先与 0.05mM plp 37℃ 保温 2 小时, 酶活力仅恢复 12—20%, 当加入微量 Glu 之后酶活力迅速上升(图 6—曲线 b), 活力恢复速度与正常再生(图 6—曲线 a) 一致, 进一步表明必需同时加入 plp 和 Glu 才能使辅酶再生。

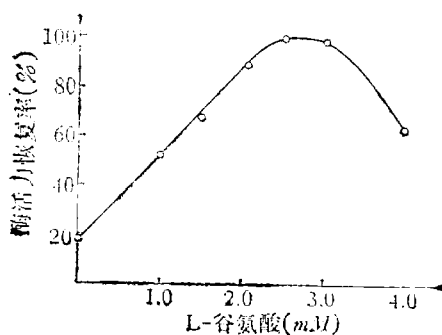


图3 谷氨酸脱羧辅酶再生效率与底物 Glu 浓度关系

反应系统: 固定化细胞与 pH6, 0.05m M plp-0.05 M  $\text{CaCl}_2$  水溶液及不同浓度 Glu, 37°C 保温 2 小时

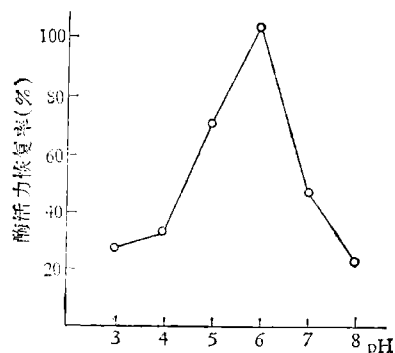


图5 谷氨酸脱羧辅酶再生效率与 pH 的关系

反应系统: 固定化细胞与不同 pH, 0.05m M plp-2.5m M Glu, 0.05M  $\text{CaCl}_2$  水溶液, 37°C 保温 2 小时

表1 plp, Glu 对固定化的及自然的谷氨酸脱羧辅酶再生效率的影响\*

| 再生溶液                   | 酶活力恢复率(%) |       |
|------------------------|-----------|-------|
|                        | 固定化酶      | 自然细胞酶 |
| 2.5m M Glu             | -50       |       |
| 0.05m M plp            | 16±4      | 31    |
| 0.05m M plp-2.5m M Glu | 106±4     | 104   |

\* 固定化的及自然的谷氨酸脱羧酶, 经对 Glu 催化反应后, 各取等量的酶, 分别用 Glu, plp 及 plp-Glu 进行再生处理。

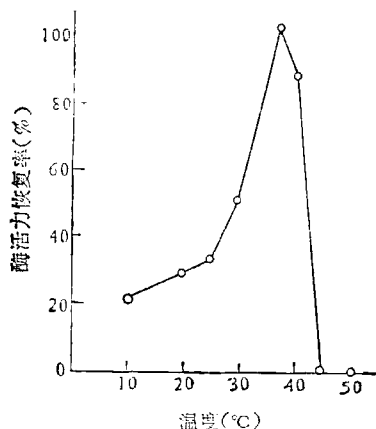


图4 谷氨酸脱羧辅酶再生效率与温度的关系

反应系统: 固定化细胞与 pH6, 0.05m M plp-2.5m M Glu, 0.05 M  $\text{CaCl}_2$  的水溶液, 在不同温度中保温 2 小时

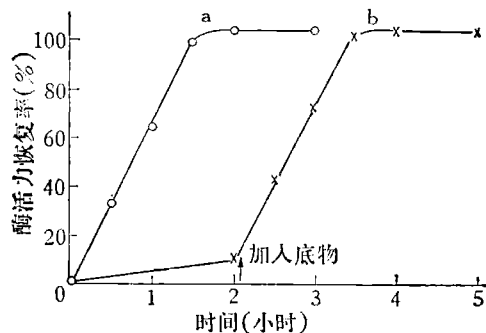


图6 谷氨酸脱羧辅酶再生速率

○—○—○ (曲线 a) 固定化细胞与 pH6, 0.05 m M plp-2.5m M Glu, 0.05 M  $\text{CaCl}_2$  水溶液, 于 37°C 保温不同时间后测定酶活力。

×—×—× (曲线 b) 固定化细胞与 pH6, 0.05m M plp, 0.05 M  $\text{CaCl}_2$  水溶液, 于 37°C 保温 2 小时测定酶活力, 然后在上述系统加入 2.5m M Glu, 继续于 37°C 保温不同时间并测定酶活力

## 5. 底物谷氨酸与辅酶磷酸吡哆醛的结合

辅酶 plp 与 Glu 混合后预先 37°C 保温, 然后再与固定化细胞保温 15 分钟, 酶活力恢复率明显高于对照组 (表 2)。经光谱测定 (图 7), 发现 plp 和 Glu 混合时, plp 特征光谱迅速消失, 两者混合 1 分钟及 15 分钟都在 295 毫微米处出现新的吸收高峰, 符合 Schiff 碱形成的特征光谱<sup>[5,6]</sup>。当 plp 和 Glu 配制在不含  $\text{Ca}^{++}$  的双蒸水溶液中获得相同的光谱变化。

表 2 plp 与 Glu 预先保温对谷氨酸脱羧酶再生效率的影响

| 再生时间<br>(分) | 酶活力恢复率(%)                    |                        |       |
|-------------|------------------------------|------------------------|-------|
|             | plp 及 Glu 分别于 37°C 保温 15 分钟* | plp 及 Glu 起于 37°C 保温** |       |
|             |                              | 15 分钟                  | 30 分钟 |
| 15          | 12.5                         | 47                     | 47    |
| 30          | 41                           | 74                     | —     |

\* plp 及 Glu 分别保温后,同时加到经过对 L-Glu 催化反应后的固定化酶中,37°C 保温 15 或 30 分钟,测定酶活力恢复率。

\*\* plp 与 Glu 一起保温 15 或 30 分钟,然后同\*处理。

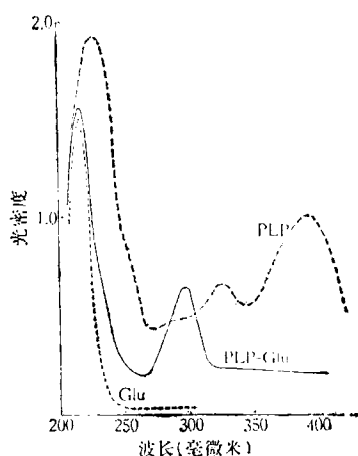


图 7 plp, Glu 及 plp-Glu 混合溶液光谱

--- 0.05 M plp    ..... 2.5 M Glu  
— 0.05 M plp-2.5 M Glu 光谱测定是在 plp 和 Glu 混合后的第 1 分钟和第 15 分钟

## 讨 论

本文介绍的辅酶再生方法,具有辅酶耗量少,酶活力恢复率高,产物污染少及操作简便等优点,也可能适用于其他反应前后辅酶本身无变化的固定化酶系。与其他方法如辅酶直接添加法<sup>[2]</sup>相比较,其 plp 用量为本法的 14 倍以上,并且污染了产物。若以药用 B<sub>6</sub> (盐酸吡哆辛) 替代 plp,可获得同样再生效果。这更有可能把本法推广于工业生产。估计这将比我们曾应用的液体酶法生产  $\gamma$ -氨基丁酸的成本降低 50%。

微量底物参与是辅酶再生的必要条件。当有适量底物 Glu 存在时,才能有效获得辅酶再

生。光谱分析说明 plp 与 Glu 能迅速结合,有 Schiff 碱形成。由此可推测,辅酶和酶蛋白结合成全酶大致可分二步,plp 与 Glu 结合形成复合物是快速的第一步,plp-Glu 复合物与酶蛋白的结合并通过转双键作用<sup>[7]</sup> plp 与酶蛋白组成全酶是慢速的第二步。已知 plp 的醛基与氨基酸上的  $\alpha$ -氨基能形成 Schiff 碱,并认为 Schiff 碱形成涉及 plp 参与酶反应的机理<sup>[6,7]</sup>。本实验说明 plp 和 Glu 形成 Schiff 碱,可能也是辅酶与酶蛋白结合成全酶的前驱反应。

plp 是极性很强的磷酸化物,不易透过生物膜,需由膜上运送蛋白帮助输送。在无底物时进行辅酶再生,液体酶和固定化酶活力恢复率都很低,表明可能只有少量辅酶从胞外进入。当有底物时,再生效率迅速提高,活力恢复率可达 100% 以上。据此我们推测 plp 与 Glu 结合除形成 Schiff 碱外,还以某种形式改善了 plp 在膜上的通透性,因而较易进入胞内,再与酶蛋白相结合。

用海藻酸钠固定的大肠杆菌谷氨酸脱羧酶,具有理想的机械强度,Ca<sup>++</sup> 能使载体颗粒紧密,恢复机械强度,经受长期使用。含辅酶的固定化酶系,在同一催化反应系统中,辅酶与酶蛋白保持一定的解离、结合的动态平衡,因此该类固定化酶如用于生产,采用分批反应法较过柱反应远为有利。

承上海生物化学研究所王庆诚、袁中一、刘树煌、吉鑫松等同志在固定化技术方面给予帮助,谨致谢意。

## 参 考 文 献

- [1] Lowe, C. R.: *Trends in Biochem. Sci.*, **3**, 134, 1978.
- [2] 池田精一郎、福井三郎: 化学增刊 65, 现代の酵素化学。(今堀和友等编,化学同人出版) p181, 1975 年。
- [3] 山崎幸直等: 发酵与工业, **35**, 270, 1977.
- [4] 千畑一郎等: 固定化酵素, (千畑一郎等编, 讲谈社出版), p80, 1974.
- [5] Blakley, R. L.: *Biochem. J.*, **61**, 315, 1955.
- [6] Mandeles, S.: *J. B. C.*, **209**, 327, 1954.
- [7] Bocker, E. A. et al.: *The Enzyme* (Ed. Boyer, P. D.), Acad. Press. p217, 1972.

[本文 1979 年 10 月 8 日收到]