

顺式环氧琥珀酸水解酶酶活的快速测定方法

彭亮亮^{1,2}, 王自强², 王云山², 张利平¹, 苏志国²

(1. 河北大学生命科学学院, 河北 保定 071002;

2. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要:在对产顺式环氧琥珀酸水解酶(ESH)的细胞超声破碎的基础上,通过正交实验对细胞中ESH生物转化生产L(+)-酒石酸过程中的底物浓度、酶浓度、转化时间进行了分析,建立了一种快速测定ESH酶活的方法,即1g湿细胞,30mL 0.2 mol/L的顺式环氧琥珀酸二钠(ES),置于37℃保温转化10min后,利用HPLC测定酒石酸含量。此方法具有快速、准确和细胞用量少的特点,可用于菌种选育、发酵过程检测、发酵条件优化及工业生产。

关键词:顺式环氧琥珀酸水解酶;超声破碎;L-酒石酸;生物转化

doi:10.3969/j.issn.1008-0864.2010.01.23

中图分类号:Q556 文献标识码:A 文章编号:1008-0864(2010)01-0135-04

Method for Rapid Measuring *Cis*-epoxysuccinate Hydrolase Activity

PENG Liang-liang^{1,2}, WANG Zi-qiang², WANG Yun-shan²,
ZHANG Li-ping¹, SU Zhi-guo²

(1. College of Life Science, Hebei University, Hebei Baoding 071002; 2. National Key Laboratory of

Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: On the basis of *cis*-epoxysuccinate hydrolase (ESH) producing cell ultrasonication, orthogonal experiments were conducted to analyze the effect of substrate concentration, the enzyme concentration and the time of biotransformation on the activity of ESH in the process of L(+)-tartaric acid production with *cis*-epoxysuccinate as the substrate for fermentation. An extraordinarily faster method for measuring ESH activity was constructed, which was to put 1 g wet cells into 30 mL 0.2 mol/L ES aqueous solution under the condition of 37℃ for 10 min to biotransform and then to measure the concentration of L(+)-tartaric acid with HPLC. This method possesses the advantages of fast speed, high accuracy and small quantities of cells which were suitable for strain selection, inspection of fermentation parameter, optimization of fermentation conditions and industrial production.

Key words: *cis*-epoxysuccinate hydrolase; ultrasonication; L(+)-tartaric acid; biotransformation

L(+)-酒石酸是一种天然的有机酸,广泛地分布在自然界中。它可以作为酸味剂、拆分剂、稳定剂、照相显影剂等,具有广泛的工业用途。酶法合成L(+)-酒石酸的工业化应用价值最高,其原理是利用细胞中诱导产生的顺式环氧琥珀酸水解酶(*cis*-epoxysuccinate hydrolase, ESH)立体选择性地在水分子加到顺式环氧琥珀酸上生成L(+)-酒石酸。

ESH是一种环氧化合物水解酶(epoxide hydrolases, EHs, EC3.3.2.3),属于胞内酶^[1]。

为了评价微生物产酶的最佳工艺条件,ESH活性测定至关重要。郑璞等^[2]直接将0.5g湿细胞和5mL 0.2 mol/L顺式环氧琥珀酸二钠于37℃反应1h来测定其酶活力。在此基础上通过改变湿细胞和顺式环氧琥珀酸二钠的浓度、细胞通透性及反应时间也可以测定ESH的酶活力^[3~5]。Willaert等^[6]则使用干细胞来测定ESH酶活力。但是这些方法测得细胞中ESH的酶活大多是其表观活性,且转化时间较长、转化率偏低,另外其受各种因素的影响较大,不能客观反应细胞的真实酶活,无法

收稿日期:2009-12-30;修回日期:2010-01-11

作者简介:彭亮亮,硕士研究生,研究方向为微生物学。E-mail:loasersking@163.com。通讯作者:王云山,副研究员,主要从事微生物发酵工程和生化分离工程。E-mail:yswang@home.ipe.ac.cn

满足发酵生产和菌种筛选等需要及时、准确测定酶活的要求。

本文拟建立的新的酶活测定方法具有以下特点:①转化时间短。能够及时测定发酵过程中ESH的酶活力,为发酵终点的判断提供参考;②细胞用量少。可以满足摇瓶等小容量发酵实验的ESH酶活测定要求;③准确性高。避免细胞通透性以及表面活性剂等因素对ESH酶活力测定的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种和发酵

1.1.1 菌种 *Nocardia tartaricans* NZ 12~15, 怀来长城生物化学工程有限公司提供。

1.1.2 培养基 种子培养基(g/L): K_2HPO_4 1, KH_2PO_4 0.5, 葡萄糖 10, 玉米浆 10, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, $(NH_4)_2SO_4$ 2, 酵母膏 5, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, pH 7.0。

发酵培养基(g/L): K_2HPO_4 2, KH_2PO_4 1, 环氧琥珀酸钠 12, 玉米浆 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, $(NH_4)_2SO_4$ 5, 酵母膏 0.2, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, 葡萄糖 12, pH 7.0。

1.1.3 培养方法 种子培养:500 mL 摇瓶中的50 mL 种子培养基接种斜面种子一环后,于30℃, 280 r/min 振荡培养20~24 h。

发酵培养:按4%(V/V)的接种量接入2 L 摇瓶中的200 mL 发酵培养基中,于30℃, 280 r/min 振荡培养18~20 h后,流加顺式环氧琥珀酸二钠诱导产酶,继续培养12~20 h。待发酵结束后,于4℃, 8 000 r/min 离心10 min,收集菌体。

1.2 仪器与试剂

Waters 2695 型高效液相色谱仪(Waters 2996 二级管阵列检测器);Hypersil GOLD C18(5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm);Sigma 3 K30 型高速离心机;Beckman J6-MC 大型大容量离心机;TGL-16C 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);Sonics VC 600-2 超声破碎仪;乙腈(色谱纯试剂);溶菌酶(Amresco)。

1.3 细胞破碎

1.3.1 超声破碎 3 g 湿细胞悬浮于15 mL 含有0.30 mL 0.1 mol/L EDTA 的0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中,在冰浴中超声破碎,功率400 W,工作3 s,间歇7 s,循环90次^[7,8]。

1.3.2 生物酶降解 1 g 湿细胞,加入4.5 mL Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0),0.30 mL 0.1 mol/L EDTA,0.5 mL 0.9%(W/V)生理盐水,25 mg 溶菌酶,摇匀,37℃水浴过夜^[9]。

1.4 生物转化

1.4.1 细胞转化 在1 mL 50%(W/V)的诺卡式菌悬液中加入3.0 mL 磷酸缓冲液(pH 8.0),1 mL 1 mol/L 的环氧琥珀酸二钠,混匀,于37℃振荡反应1 h^[2]。

1.4.2 细胞破碎液转化 15 mL 超声破碎液加入15 mL 0.4 mol/L 的环氧琥珀酸二钠,混匀,于37℃振荡反应1 h。

5 mL 酶解液加入5 mL 0.4 mol/L 的环氧琥珀酸二钠,混匀,于37℃振荡反应1 h。

1.5 L(+)-酒石酸的检测

L(+)-酒石酸的测定采用高效液相色谱法,色谱条件为:Hypersil GOLD C18 柱(5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm),流动相 A 为乙腈,流动相 B 为0.02 mol/L K_2HPO_4 缓冲液(磷酸调节 pH 为 2.1~2.5), $V_A:V_B=5:95$;柱温30℃;检测波长为210 nm;流速1 mL/min;进样量10 μ L。

1.6 酶活力的定义及转化率计算方法

在一定条件下,1 h 水解顺式环氧琥珀酸二钠生成1 μ mol/L(+)-酒石酸的活性定义为一个酶活力单位(U)^[10]。单位菌体(湿细胞)所含ESH活性为比酶活(U/g)。

$$\text{转化率}(\%) = \frac{\text{酒石酸含量}(\text{g/L})}{150 \times \text{底物浓度}(\text{mol/L})}$$

1.7 酶活测定最佳条件的确立原则

对比ESH酶活测定方法^[2~6]以及生产实践经验,最佳测定条件的选择主要从反应时间、细胞用量和转化率三个方面来考虑。

①在易于实验操作的前提下,应该尽量缩短转化时间,达到快速测定的目的。

②较少的细胞用量特别适合菌种选育和发酵优化等摇瓶实验的样品测定。但细胞用量不能太少,因为太少的细胞用量在操作过程中的偶然误差较大。

③理论上讲测定过程中转化率过高或过低均对酶活的准确定量不利,转化率控制在50%~80%。

因此,最佳测定条件的确立应该以快速、细胞用量少和准确为原则。

2 结果及分析

2.1 不同处理方法对细胞 ESH 酶活的影响

在细胞浓度、底物浓度、转化时间一致的条件 下,本实验考察了几种不同的细胞处理方法。结 果显示,细胞经处理后其转化率和 ESH 的比酶活 均有很大提高(见表 1),其中超声破碎和生物酶 降解的细胞可以在 1 h 内将底物完全转化。由于 溶菌酶价格较贵,且降解后溶液的粘度较大,不易 处理,所以本文选择超声破碎作为进一步优化转 化条件的基础。

2.2 正交实验设计及结果

为了找出 ESH 转化底物的最佳条件,选取底 物浓度(A),细胞浓度(B)和转化时间(C)3 个因 素,每个因素设 5 个水平,采用 $L_{25}(5^3)$,分别以转

表 1 不同处理方法对细胞的转化率和比酶活的影响

Table 1 The effects of different methods on the transformation ratio and activity of ESH.

处理方法 Methods	转化率(%) Transformation ratio(%)	比酶活(U/g) Activity (U/g)
新鲜细胞 Fresh cells	6.8	81.6
反复冻融 Repeated freeze-thawing	91	1 095.2
超声破碎 Ultrasonication	100	1 203.8
生物酶降解 Enzyme hydrolysis	100	1 191.2

化率和酶活力为指标进行分析,结果见表 2。

极差分析显示:以转化率为指标,各因素的影 响强弱为: $B > A > C$,以 $A_1B_5C_4$ 为最佳组合。比酶 活为指标,各因素影响强弱为: $C > B > A$,以 $A_1B_1C_1$

表 2 正交试验设计及结果

Table 2 The design and result of the orthogonal experiment.

	因素 Factors			转化率(%) Transformation ratio(%)	酶活力 ($\mu\text{mol}/\text{h}\cdot\text{g}$) Activity ($\mu\text{mol}/\text{h}\cdot\text{g}$)
	A 底物浓度(mol/L) A Substrate concentration(mol/L)	B 细胞浓度(g/30 mL) B Cell concentration (g/30 mL)	C 转化时间(min) C Transformation time(min)		
1	1(0.2)	1(0.2)	1(10)	24.85	44 726.71
2	1	2(0.4)	2(20)	27.80	12 512.13
3	1	3(0.7)	3(30)	69.86	11 976.03
4	1	4(1.0)	4(40)	100.00	13 271.94
5	1	5(3.0)	5(50)	100.00	3 622.36
6	2(0.4)	1	2	12.15	21 865.66
7	2	2	3	18.90	11 339.75
8	2	3	4	27.44	7 056.13
9	2	4	5	70.39	10 136.02
10	2	5	1	50.88	12 210.91
11	3(0.6)	1	3	9.98	17 965.57
12	3	2	4	15.97	10 782.47
13	3	3	5	22.16	6 838.15
14	3	4	1	15.33	16 553.18
15	3	5	2	54.31	9 775.93
16	4(0.8)	1	4	5.99	10 781.44
17	4	2	5	9.21	6 629.29
18	4	3	1	11.68	24 035.02
19	4	4	2	14.82	10 671.88
20	4	5	3	54.11	8 658.21
21	5(1.0)	1	5	9.61	17 302.03
22	5	2	1	5.84	26 291.25
23	5	3	2	10.76	13 831.83
24	5	4	3	13.83	8 298.56
25	5	5	4	67.07	10 061.05

为最佳组合,但转化率较低,只有 24.85%。

综合表 2、表 3 和最佳条件的确立原则,以转化率和酶活双指标作为衡量标准,底物浓度选取 A₁XX 组合;考虑到细胞用量要少,选取 A₁B₁X 组合,但由于细胞用量对转化率的影响很显著,所以用量不能太低,折中两种要求,结合正交结果,选

取 A₁B₄X。由于转化时间对转化率的影响较小,所以选取较短的转化时间 C₁。最后的结果是选取 A₁B₄C₁ 作为最佳的组合,即 30 mL 0.2 mol/L 底物,1 g 湿细胞,转化 10 min。以此组合做 3 个平行实验,结果显示平均转化率为 56.61%,平均酶活为 20 381 ± 210 U/g,重复性较好。

表 3 正交试验结果分析

Table 3 The analysis of the result of the orthogonal experiment.

		因素 Factors		
		A 底物浓度 (mol/L)	B 细胞浓度 (g/30 mL)	C 转化时间 (min)
		A Substrate concentration (mol/L)	B Cell concentration (g/30 mL)	C Transformation time (min)
转化率 (%) Transformation ratio (%)	K ₁	322.50	62.58	108.58
	K ₂	179.76	77.72	119.84
	K ₃	117.75	141.90	166.68
	K ₄	107.11	214.37	211.37
	K ₅	95.81	326.37	216.47
	R	226.69	263.79	107.89
酶活力 (μmol/h·g) Activity (μmol/h·g)	K ₁	8.6 × 10 ⁴	11.3 × 10 ⁴	12.4 × 10 ⁴
	K ₂	5.3 × 10 ⁴	6.8 × 10 ⁴	6.9 × 10 ⁴
	K ₃	6.2 × 10 ⁴	6.4 × 10 ⁴	5.8 × 10 ⁴
	K ₄	6.1 × 10 ⁴	5.0 × 10 ⁴	5.2 × 10 ⁴
	K ₅	7.6 × 10 ⁴	4.4 × 10 ⁴	3.5 × 10 ⁴
	R	3.3 × 10 ⁴	6.9 × 10 ⁴	8.9 × 10 ⁴

参 考 文 献

3 讨论

细胞通透性对细胞中 ESH 真实酶活的测定至关重要。ESH 是一种胞内酶,用细胞作为粗酶来转化环氧琥珀酸二钠时,由于受到通透性的限制,细胞在短时间内对底物的转化率以及由此而得到的 ESH 酶活都比较低,细胞中 ESH 的真实酶活得不到体现。本文将湿细胞超声破碎,解除了细胞通透性的影响,使水解酶与底物充分反应,通过正交实验优化了生物转化条件:30 mL 0.2 mol/L 底物,1 g 湿细胞,37℃ 转化 10 min。利用改进后的方法测得的细胞转化率为 56.61%,酶活为 20 381.35 U/g,而文献^[2]报道的方法测得的细胞转化率仅为 6.8%,酶活也仅为 81.6 U/g,另外转化时间也从 1 h 缩短至 10 min。新方法克服了细胞通透性的屏障,不仅提高了单位菌体的比酶活,而且提高了转化率,保证了结果的准确性,在短时间内较客观的反映了单位菌体的真实酶活,可以用于菌株筛选、发酵工艺优化研究和发酵生产过程的及时控制。

- [1] Miura T Y, Klyohiko Y K, Fujii T K. Microbiological process for preparing L-tartaric acid in presence of surfactants [P]. U S Patent:4017362, 1977.
- [2] 郑璞,孙志浩.用诺卡氏菌酶法转化顺式环氧琥珀酸生产 L-(+)酒石酸的研究[J].工业微生物,1994,4(3):12-17.
- [3] 张建国,钱亚娟.棒状杆菌固定化细胞生产 L-(+)-酒石酸[J].生物工程学报,2000,16(2):188-192.
- [4] 潘海峰,谢志鹏,鲍文娜,等.产顺式环氧琥珀酸水解酶的博德特氏菌 BK-52 的筛选、鉴定及其产酶条件的优化[J].微生物学报,2008,48(8):1075-1081.
- [5] 潘克侠,闵航,夏颖,等.产顺式环氧琥珀酸水解酶的红球菌 M1 菌株的分离鉴定及其产酶条件优化[J].微生物学报,2004,44(3):276-280.
- [6] Willaert R, De Vuyst L. Continuous production of L-(+)-tartaric acid from cis-epoxysuccinate using a membrane recycle reactor [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, 71:155-163.
- [7] 毛庆静,谭小钉,蔡水洪,等.诺卡氏菌催化环氧琥珀酸水解反应的影响因素[J].华东理工大学学报,2003,29(3):264-267.
- [8] Long Q Y, Huang L, Li Z M, et al.. Fed-batch culture of *Nocardia* sp. for epoxysuccinate hydrolase production [J]. Process Biochem., 2008,43:438-444.
- [9] 赵永芳.生物化学技术原理及应用(第三版)[M].北京:科学出版社,2002.
- [10] Rosenberg M, Mikova H, Kristofikova L. Production of L-tartaric acid by immobilized bacterial cells *Nocardia tartaricans* [J]. Biotechnol. Lett., 1999,21,491-495.