

快原子轰击质谱技术结合酶学方法鉴定黑曲霉 1,6-缩水-β-D-吡喃葡萄糖激酶的诱导合成

庄绪亮 张洪勋*

(中国科学院生态环境研究中心 北京 100085)

摘要 1,6-缩水-β-D-吡喃葡萄糖是纤维素类物质热解的主要产物,黑曲霉突变株 CBX-209 能较好地利用该糖作为唯一的碳源和能源生长并产生有用的代谢产物柠檬酸,其效率与利用葡萄糖大致相当。利用葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶复合系统测定证明该菌株不存在 1,6-缩水-β-D-吡喃葡萄糖水解酶。采用快原子轰击质谱技术结合 6-磷酸葡萄糖脱氢酶系统进行测定,结果表明经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀或阴离子交换层析处理后的无细胞提取液在加入 ATP 和 Mg^{2+} 的条件下能直接催化 1,6-缩水-β-D-吡喃葡萄糖合成 6-磷酸葡萄糖,证明黑曲霉突变株中存在一个新酶,即 1,6-缩水-β-D-吡喃葡萄糖激酶。该酶为诱导酶。

关键词 1,6-缩水-β-D-吡喃葡萄糖, 1,6-缩水-β-D-吡喃葡萄糖激酶, 快原子轰击质谱, 葡萄糖-6-磷酸, 黑曲霉
中图分类号 Q81 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)05-0583-05

1,6-缩水-β-D-吡喃葡萄糖(1,6-anhydro-β-D-glucopyranose, 即 levoglucosan, 以下简称 LG)作为纤维素类物质热解的主要产物^[1,2,3]在化学工业中是生产塑料、增塑剂、表面活性剂、树脂^[4]及合成寡聚糖、除草剂、植物生长调节剂等^[5]化工产品的重要原料。由于潜在的粮食危机及能源危机的存在,近年来利用 LG 代替粮食作为微生物发酵碳源的研究越来越受到重视^[6]。虽然在自然界中, LG 极为稀少,但已发现有多种微生物能利用 LG 作为发酵的碳源和能源^[7,8]。

前期工作^[11]通过对出发菌进行 γ-射线诱变,筛选到了一株能高效利用 LG 产柠檬酸的黑曲霉(*A. niger*) CBX-209,其转化率为 87.5%,大致与利用葡萄糖的效率相当。在微生物代谢过程中,底物利用的第一步酶反应往往是限速步骤,因此鉴定该突变株作用于 LG 第一个酶的特性,是进一步提高 LG 转化效率的重要工作。

确定酶促反应后的产物是酶鉴定中的关键步骤,现代质谱技术则为物质鉴定提供了重要的分析测定手段。在生物学领域中,质谱技术同生物化学或分子生物学方法相结合已对许多生命过程的阐明

提供了重要证据:如 Kiselar 等^[12]结合免疫学方法和质谱技术直接对蛋白质的抗原决定簇进行了鉴定,而不需抗体的固定及抗原抗体复合物分离等繁琐过程;Kaneko 等^[13]结合遗传学方法和质谱技术鉴定了血红蛋白中 β 链第 43 位的 Glu→Gln 的单一位点突变;Komer 等^[14]结合酶学方法及基质辅助激光解吸质谱技术对高分子聚合物果胶的酶解产物进行了鉴定。在质谱技术中,快原子轰击质谱(FAB/MS)法是 80 年代初期发展起来的一种软电离技术^[9,10],适用于测定热不稳定、强极性和难挥发性化合物。由于推测 LG 在酶作用后的产物有可能是难挥发的磷酸葡萄糖,适于用该法进行测定。本文结合快原子轰击质谱技术灵敏度高及酶作用于底物选择性强的特点,对黑曲霉代谢 LG 产柠檬酸的第一个酶—LG 激酶进行鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及培养基 黑曲霉 CBX-209^[11]由出发菌株进行 γ-射线诱变得。斜面培养基(g/L):LG 20;蛋白胨,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5;琼脂,20。发酵培养

基(g/L):LG 80;麸皮 20,灭菌前 pH 调至 6.5。

1.1.2 仪器及试剂: KYKY-ZHP-5 型高分辨双聚焦磁质谱(中科院科学仪器厂),FAB 源为 Ar 原子枪,离子加透电压 6kV,基质选用二聚及三聚甘油;发酵及酶诱导所用 LG 由纤维素热解液分离纯化得到^[3];LG 标准品购买自 SIGMA 公司。732-1 型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂为上海化学试剂采购供应站分装产品,葡萄糖氧化酶及辣根过氧化物酶购自日本 TOYOBO 公司;葡萄糖-6-磷酸脱氢酶为 SIGAMA 公司产品;NADP 及 ATP 为上海生工(SANGON)进口分装产品;其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 黑曲霉无细胞提取液的制备及处理: 离心收集培养在 LG 发酵培养基 36 h 的黑曲霉 CBX-209 菌丝体,用 50mmol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液(pH8.0)洗涤 3 次,按照每克湿菌体 3mL 缓冲液的比例加入上述缓冲液,在冰浴条件下超声波破碎细胞,18 000 × g 离心 15min 后收集上清液。上清液中加入固体硫酸铵至 40% 饱和度后缓慢搅拌 1h,离心去沉淀,上清液继续加入固体硫酸铵至 60% 饱和度并静置 1h,离心收集沉淀并用少量缓冲液溶解。所得到的溶液用 10mmol/L Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液透析(4℃)4 次后再次离心,上清液(以下称粗酶液)用 DEAE-纤维素层析柱进行离子交换层析,洗脱液为 10mmol/L 缓冲液,NaCl 浓度梯度为 0~0.25mol/L。收集的活性组分用 10mmol/L 缓冲液透析去盐备用(以下称部分纯化的酶液)。

1.2.2 LG 水解酶的测定: 利用葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶复合系统^[15],通过测定葡萄糖的生成量来测定粗酶液中是否存在 LG 水解酶:1mL 粗酶液或发酵上清液与 100mmol/L LG 混合,在不同 pH 的缓冲溶液中进行反应,反应温度 30℃。各缓冲液分别为:100mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH 分别为 2.0 和 5.0),50mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.1),50mmol/L Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液(pH8.0)和 50mmol/L CHES 缓冲液(pH9.3)。反应完毕后沸水浴处理 5min 并测定葡萄糖含量。

1.2.3 6-磷酸葡萄糖的测定:

(1)质谱测定:采用负离子-快原子轰击质谱(N-FABMS)测定磷酸葡萄糖的准分子离子峰。具体操作方法:10mL 反应混合液(50 mmol/L LG,5mmol/L ATP,10 mmol/L MgCl₂,1mL 粗酶液)30℃ 保温 30min,使反应完全后沸水浴处理 5min 以终止酶反

应。混合液冷却至室温后加入 732-1 型阳离子交换树脂 1g,充分混匀后静置约 1h,离心取上清液,该步骤再进行一次以除去大部分金属阳离子。处理完毕后按仪器操作步骤进行质谱测定。

(2)酶法测定:通过 6-磷酸葡萄糖脱氢酶系统测定葡萄糖-6-磷酸的生成^[16]。反应混合液中各种底物的浓度分别为:LG,50mmol/L;ATP,2mmol/L;NADP 2mmol/L;MgCl₂ 10mmol/L。上述反应液分别加入适量部分分离纯化的酶液(或粗酶液)及 1 个单位葡萄糖-6-磷酸脱氢酶后通过连续测定在 340 nm 处紫外吸收值的升高来间接证明葡萄糖-6-磷酸的合成。该方法同时也可以作为酶活性的定量方法,1 个单位的酶活性表示为 30℃ 每分钟还原 1μmol NADP 的酶量。在另外的实验中,为证明该酶为激酶,分别去掉反应混合液中的 ATP、MgCl₂ 或两者都去掉并检测 LG 激酶活性。

1.2.4 磷酸葡萄糖变位酶活性的测定: 参照文献[17]

1.2.5 LG 激酶诱导特性的测定: 离心并收集在葡萄糖培养基上生长至对数期的菌丝体,用去离子无菌水洗涤 2 次后重悬于诱导培养液中,培养液组成为(g/L):LG,10;KH₂PO₄,2;MgSO₄·7H₂O,1。34℃ 摇床培养并定时取样,细胞破碎后分别测定无细胞提取液中 LG 激酶和己糖激酶的比活性。

1.2.6 蛋白质含量的测定: 采用考马斯亮蓝法^[18]。

2 结果与讨论

2.1 黑曲霉 CBX-209 柠檬酸发酵过程中不存在 LG 水解酶

由于 LG 在体外可以水解成葡萄糖,在酸性条件下反应更易进行,而黑曲霉柠檬酸发酵过程中 pH 值一般维持在 2 左右,因此最初推测黑曲霉可能存在一种特殊的 LG 水解酶,将 LG 转化为葡萄糖后再进行磷酸化进入糖酵解途径。实验结果否定了这种推测。如图 1 所示,在 pH 为 7.1 的缓冲溶液中,分别加入无细胞提取液或发酵上清液,用葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶系统均没有测到明显的葡萄糖的生成。在其它各种 pH 的缓冲液中进行测定,结果也大致相同(结果未列)。在 pH 为 2 的发酵上清液系统中(图 1),随着反应时间的延长或反应温度的提高,葡萄糖浓度有所提高,但并不能证明存在 LG 水解酶。这是因为如果图中所看到的葡萄糖浓度的微小变化(在 12h 内从 0.62mmol/L 提高到 0.8mmol/L)是由于 LG 水解酶引起的,那么计算出的

粗酶液中该酶的比活性只有 0.2×10^{-3} IU/mL,而同时测到的粗酶液中己糖激酶活性为 0.4IU/mL 左右(图 6)。由于前期实验发现黑曲霉 CBX-209 能以与葡萄糖相似的转化效率将 LG 转化为柠檬酸^[11],依靠活性如此之低的 LG 水解酶完成这一目标是难以想象的。进一步的证据从图 2 中可以看出,随着温度从 20℃ 提高到 100℃,葡萄糖浓度仅单边上升。事实上,如果存在这种酶,酶活性的温度曲线应该有一个峰值出现。从图 2 中的对照实验还可以看出, LG 在柠檬酸缓冲液(pH 2)中随温度升高转变为葡萄糖的速率和水平与 pH 为 2 的发酵上清液中的情况相当,这进一步证明了随着反应温度的提高而引起的葡萄糖浓度的上升是由于酸水解所引起的,而不是酶作用的结果。由于黑曲霉的无细胞提取液中其它的葡萄糖苷酶如麦芽糖酶都能被测到,因此能高效率转化 LG 的黑曲霉中如果存在 LG 水解酶,该酶一定具有较高的活性并能通过这种方法被测定出来。

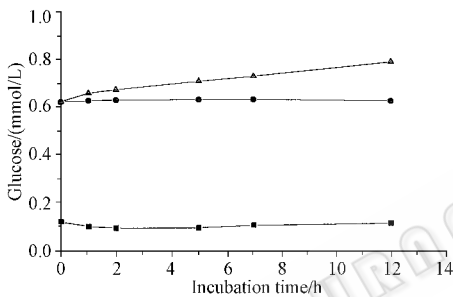


图 1 无细胞提取液和发酵上清反应液中葡萄糖浓度的检测(培养温度 30℃,初始 LG 浓度 100mmol/L)

Fig.1 Detection of the formation of glucose from LG in cell extracts and culture fluids at 30℃ and an initial LG concentration of 100 mmol/L.

■ Cell extracts (pH 7.1); ● Culture fluid (pH 7.1);
▲ Culture fluid (pH 2.0)

2.2 LG 激酶的鉴定

如上所述,由于已证明黑曲霉中不存在 LG 水解酶,因此无细胞提取液在合适的条件下同 LG 反应若能直接检测到磷酸基团转移到 LG 上,即可推断该菌株存在一种特殊的激酶。磷酸基团的转移又分为两种情况:一种是不打破 LG 1,6 位碳原子之间缩水所形成的内醚键,形成 LG-磷酸;另一种是在转移磷酸基团的同时打断内醚键,形成 1-磷酸或 6-磷酸葡萄糖。从快原子轰击质谱图(图 3)可以看出, m/z 为 259 的准分子离子峰所代表的一定是反应系统中生成的磷酸葡萄糖,而不是磷酸 LG,这是因为如果 LG 1,6 位之间的键如果不被打断,其准分子离子峰的 m/z 值一定小于 259,但通过该图并不能确

定磷酸基团在第几位碳原子上。由于粗酶液中存在的磷酸葡萄糖变位酶能将其其它的磷酸葡萄糖转变为 6-磷酸葡萄糖,为消除该酶的影响,粗酶液用离子交换层析处理,得到的部分纯化酶液证明无磷酸葡萄糖变位酶活性(另文发表),然后在 6-磷酸葡萄糖脱氢酶系统中于不同温度下反应,可得典型的酶比活性曲线(图 4),并在 30℃ 出现最大值。由于葡萄糖-6-磷酸脱氢酶作用于底物具有专一性的特点,结合质谱图所得到的直接证据,可以断定作用于 LG 的酶能直接将 LG 转化为 6-磷酸葡萄糖。在另外的实验中,为证明该酶为激酶,分别去掉酶反应混合液中的 ATP、 $MgCl_2$ 或两者都去掉,发现在缺少 ATP 或 $MgCl_2$ 的情况下都检测不到 LG 激酶活性。由于该酶在反应中需要 ATP 和 Mg^{2+} 的参与的特性,因此该酶为 LG 激酶。

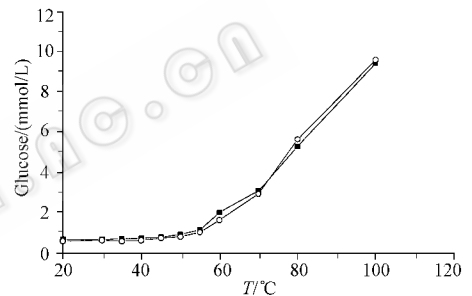


图 2 发酵上清反应液中(pH 2)葡萄糖浓度的检测(初始 LG 浓度 100mmol/L)

Fig.2 Detection of glucose from LG in culture fluids of pH 2 at an initial LG concentration 100 mmol/L.

■ Culture fluid; ○ Citric acid buffer at pH2.0

综上所述,黑曲霉 CBX-209 柠檬酸发酵过程中底物利用的第一步酶催化反应(图 5)同己糖激酶相似,也是在消耗 1 个 ATP 的情况下将底物转化为 6-磷酸葡萄糖再加以利用,而无需多消耗一个 ATP 将 LG 转变为葡萄糖后再消耗能量将葡萄糖带入糖酵解途径。LG 激酶的鉴定及其作用方式的阐明例证了微生物在生命过程中总是尽量选择一种最经济的方式利用底物生长并产生代谢产物。

2.3 LG 激酶的诱导酶特性

从图 6 可以看出,随着培养时间的延长,己糖激酶的活性几乎没有变化,而 LG 激酶的活性开始为 0,随时间延长,其活性不断增大,充分表明 LG 激酶为诱导酶。进一步通过诱变提高该酶的活性或通过基因工程手段将该酶由诱导型改造为组成型将提高菌体对 LG 的转化效率。

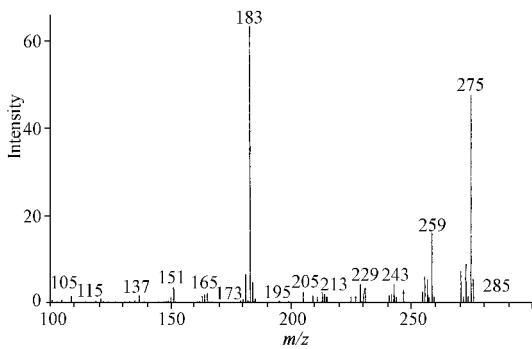


图3 6-磷酸葡萄糖的快原子轰击质谱检测

Fig.3 Detection of the formation of glucose 6-phosphate from levoglucosan by FAB-MS

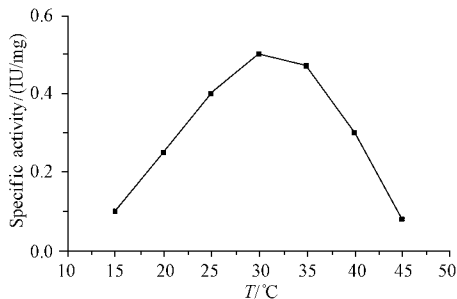


图4 LG 磷酸化酶比活性的变化(葡萄糖-6-磷酸脱氢酶测定法)

Fig.4 Variation of the specific activity of levoglucosan phosphorylation

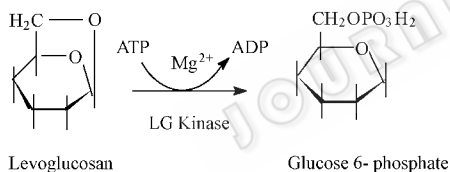


图5 黑曲霉 CBX-209 以 LG 为唯一发酵碳源的柠檬酸发酵过程中 LG 激酶对 LG 的磷酸化反应

Fig.5 Levoglucosan kinase catalyzes phosphorylation of LG in *Aspergillus niger* CBX-209 citric acid fermentation using LG as sole carbon source

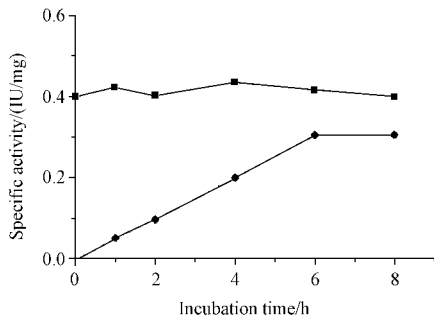


图6 黑曲霉中 LG 激酶的诱导

Fig.6 Induction of levoglucosan kinase in *Aspergillus niger*

■ Hexokinase ; ◆ LG Kinase

REFERENCES (参考文献)

- [1] Radlein D, Piskorz J, Scott D S. Fast pyrolysis of natural polysaccharides as a potential industrial process. *J Anal Appl Pyrol*, 1991, **19**: 41 ~ 63
- [2] Scott D S, Radlein D, Piskorz J. Potential of fast pyrolysis for production of chemicals, In: Hogan E, Grassi G, Bridgwater AV ed. Biomass Thermal Processing. Proceedings of the First Canada/European Community R&D Contractors Meeting. Newbury UK: CPL Press, 1992, p. 78
- [3] Moens L, Colo L. Isolation of levoglucosan from lignocellulosic pyrolysis oil derived from wood or waste newspaper. US Patent, No: 54 32276, 1995
- [4] Esterer A K, Wash L. Separating levoglucosan and carbohydrate acids from aqueous mixtures containing the same-by solvent extraction. US Patent, No: 33 09356, 1967
- [5] Gander M, Rapp K M, Schiweck H. Process for preparing 1,6-β-D-anhydroglucopyranose (levoglucosan) in high purity. US Patent, No: 50 23330, 1991
- [6] Piskorz J, Radlein D, Scott DS *et al.* Pretreatment of wood and cellulose for production of sugars by fast pyrolysis. *J Anal Appl Pyrol*, 1989, **16**: 127 ~ 136
- [7] Nakagawa M, Sakai Y, Yasui T. Itaconic acid fermentation of levoglucosan. *J Ferment Technol*, 1984, **62**: 201 ~ 203
- [8] Prosen E M, Radlein D, Piskorz J *et al.* Microbial utilization of levoglucosan in wood pyrolysate as a carbon and energy source. *Biotechnol Bioeng*, 1993, **42**: 538 ~ 541
- [9] Barbar M, Bordoli R S, Sedgwick R D *et al.* Fast atom bombardment mass spectrometry of bleomycin A2 and B2 and their metal complexes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981, **101**(2): 632 ~ 638
- [10] Williams D H, Bojesen G, Auffret A D *et al.* Study of 'difficult peptides' from *Paracoccus cytochrome c-550* and a dolphin cytochrome c. Fast atom bombardment: a new method for molecular weight and sequence determination of peptides. *FEBS Lett*, 1981, **128**(1): 37 ~ 39
- [11] Zhuang X L, Zhang H X, Yang J Z *et al.* Preparation of levoglucosan by pyrolysis of cellulose and its citric acid fermentation. *Biore-source Technol*, 2001, **79**: 63 ~ 66
- [12] Kiselar J G, Kevin K M. Direct identification of protein epitopes by mass spectrometry without immobilization of antibody and isolation of antibody-peptide complexes. *Anal Chem*, 1999, **71**(9): 1792 ~ 1801
- [13] Kaneko R, Wada Y, Hisada M *et al.* Establishment of a combined strategy of genetic and mass spectrometric analyses for characterizing hemoglobin mutations. An example of Hb Hoshida (β43Glu-Gln). *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 1999, **731**(1): 125 ~ 130
- [14] Korner R, Limberg G, Mikkelsen D. Characterization of enzymic pectin digests by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 1998, **33**(9): 836 ~ 842
- [15] Papadopoulos W M, Hess W C. Determination of neuraminic (sialic) acid, glucose and fructose in spinal fluid. *Arch Biochem Biophys*, 1960, **88**: 167 ~ 169

Chem, 1970, **245**: 2423 ~ 2431

[17] Harrison R A P. The detection of hexokinase, glucosephosphate isomerase and phosphoglucomutase activities in polyacrylamide gels after electrophoresis: a novel method using immobilized glucose 6-

phosphate dehydrogenase. *Anal Biochem*, 1974, **61**: 500 ~ 507

[18] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248 ~ 254

Characterization of Inductive Synthesis of Levoglucosan Kinase by a Combined Strategy of Enzymological and Fast Atom Bombardment Mass Spectrometric Analysis

ZHUANG Xu-Liang ZHANG Hong-Xun*

(*Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China*)

Abstract Levoglucosan is the main product derived from pyrolysis of cellulose. A mutant *Aspergillus niger* CBX-209 could grow on levoglucosan well fermenting it into citric acid with a yield comparable to that on glucose. Levoglucosan hydrolase was absent by measuring glucose formation with the glucose oxidase and peroxidase coupling system. Cell extracts were partly purified by ammonium sulfate fractionation and ion-exchange chromatograph. Direct formation of glucose 6-phosphate from levoglucosan in the presence of ATP and MgCl₂ was observed when it was reacted with partly purified enzyme by a combined strategy of enzymological and fast atom bombardment mass spectrometric analysis. These data showed that the mutant used a novel enzyme, levoglucosan kinase, to convert levoglucosan into glucose 6-phosphate. Levoglucosan kinase was an inductive enzyme.

Key words levoglucosan, levoglucosan kinase, fast atom bombardment mass spectrometry, glucose 6-phosphate, *Aspergillus niger*

Received: 04-16-2002

This work was supported by Grant from Chinese Academy of Sciences.

* Corresponding author. Tel: 86-10-62849155; Fax: 86-10-62923563; E-mail: hxzhang@mail.rcees.ac.cn

第二届中美 21 世纪医学论坛将于今秋在上海举行

中美医学界共同探索生命医学前景

1998 年诺贝尔医学奖获得者美国弗瑞德·缪伦德教授、中国科学院副院长陈竺教授、国际心脏外科权威杨克·考伦教授等数百位世界医学专家将在上海国际会议中心及上海瑞金医院共同探索本世纪人们关注的医学发展方向、战略及前沿问题。

第二届中美 21 世纪医学论坛将于 10 月 26 日 ~ 28 日在上海上海国际会议中心及上海瑞金医院举行。届时,1998 年诺贝尔医学奖获得者美国弗瑞德·缪伦德教授、中国科学院副院长陈竺教授、国际心脏外科权威杨克·考伦教授等数百位中美医学专家、院士将汇聚一堂,共同讨论本世纪最引人关注的信息医学、基因诊断和治疗、肿瘤治疗、心血管疾病、神经疾病、组织工程和器官移植、生物医药技术的产业化、医学教授和医疗体制的改革等主题。这次盛会是一年半前在美国德州医学中心举行的第一届中美 21 世纪医学论坛的继续,也是承办单位上海第二医科大学 50 周年校庆和其附属瑞金医院 95 周年院庆的系列活动之一。

信息科学、材料科学和生命科学是 21 世纪的三大前沿科学。其中,医学是生命科学的一个重要分支。本次讨论会所关注的正是与人类生命健康有直接关系的医学前沿问题,如一氧化氮和细胞生长的问题、人工心脏的研究与应用、肾移植的最新进展、血管梗塞心肌细胞的再生、过敏性疾病的新免疫治疗、肿瘤免疫治疗、帕金森疾病的临床和科研进展、21 世纪治疗神经变性疾病的发展战略等。与会者同时还将关注对医学科研有直接影响的医学和医疗发展战略问题,如 21 世纪中国生物技术发展所面临的机遇和挑战;中西方医学伦理观念的差异与比较;医疗界和医疗保险领域的新挑战等。

如欲了解更多大会信息,敬请浏览大会网站: www.simc2002.net。

(李培英 供稿)