

海洋细菌 *Bacillus* sp. 2-羧基还原酶的纯化和性质*

李湘萍 罗 虹 庞宗文 黄时海 梁智群

(广西大学工业测试实验中心 南宁 530004)

摘 要:从一株海洋细菌 *Bacillus* sp. 中通过硫酸铵分级盐析、Q Sepharose FF 阴离子交换层析、Hydroxyapatite 柱层析和 Sephadex G-100 凝胶过滤, 分离纯化出一种 3-脱氧葡萄糖醛代谢酶, 定性为 2-羧基醛还原酶。以粗酶液作起始, 所获样品纯度提高 141.4 倍, 活力回收率 11.4%。2-羧基醛化合物对该酶是特异性很好的底物, 该酶对 3-脱氧葡萄糖醛酮的 K_m 为 2.5 mmol/L, 分子量约为 33 kD, 反应最适 pH 为 6.2, 在 pH 5.0 ~ 8.0, 温度 30℃ 以下酶活保持稳定。适量的 EDTA、巯基乙醇或二硫苏糖醇能提高酶的活性, 碘乙酸、N-乙基顺丁烯二酰亚胺均造成酶部分失活。

关键词: 美拉德反应, 3-脱氧葡萄糖醛酮, 2-羧基醛还原酶, 纯化

中图分类号: Q554.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 04-0463-06

蛋白质和糖类之间的美拉德反应会导致蛋白质发生复杂的化学变化, 如: 某些氨基酸残基的损失, 可消化性的降低, 溶解性的下降, 褐变, 荧光物质的生成和发生交联等, 在食品加工和贮藏中, 会导致食品营养下降; 在生物体内, 会对细胞和机体组织产生毒性, 从而引起老化病、糖尿病及其并发症等^[1,2]。3-脱氧葡萄糖醛酮 (3-Deoxyglucosone, 简称 3-DG) 是美拉德反应的主要中间产物, 是一种活性高的毒性 2-羧基醛化合物^[3,4]。许多研究表明: 在生理条件下, 由葡萄糖诱导的蛋白质聚合作用中, 3-DG 起着交联剂的作用^[5,6]。Monnier 等人发现 3-DG 可促使美拉德反应高级阶段的进行, 生成的糖基化终产物积累于长寿组织蛋白上, 从而促进人体老化和导致白内障、糖尿病、动脉硬化和心血管疾病等的发生^[7]。因此, 3-DG 代谢酶就有可能通过抑制 3-DG 而阻断美拉德反应的进行, 这对食品加工和防止老化病、糖尿病等方面均有积极意义。

目前, 已经从各种不同来源的动植物中分离出数种 3-DG 代谢酶。Jellum 首先报道了从鼠和羊肝脏中分离出 2-羧基醛脱氢酶, Hata 等人从鼠和人肝脏中分离出 2-羧基醛脱氢酶。Kato 等人从猪肝脏和欧芹中分离出 2-羧基醛还原酶, 并证实了该酶对美拉德反应的抑制作用^[8,9]。我们开展了从微生物角度对 3-DG 代谢酶的研究, 发现微生物体内普遍存在 3-DG 代谢酶。本文报道了从海洋细菌中分离纯化出一种 2-羧基醛还原酶及其生化性质研究。

* 国家自然科学基金资助项目 (29466012)

作者简介: 李湘萍 (1966-), 女, 湖南邵东县人, 广西大学副研究员, 硕士, 主要从事微生物学、生物化学和发酵工程的科研和教学工作。

收稿日期: 2000-06-16, **修回日期:** 2000-10-11

1 材料和方法

1.1 材料

海洋枯草杆菌(*Bacillus*. sp) Fs-4-C-3 由本课题组筛选出,菌种特性及培养条件参见文献[10];NADPH 和甲基乙二醛是 Sigma 公司产品,考马斯亮兰 R-250 是 Fluka 进口分装产品,Arc、Bis、SDS、过硫酸铵是华美生物工程公司产品,3-脱氧葡萄糖醛酮自制。

1.2 蛋白质和酶活力的测定

用 280nm 下的吸光值跟踪柱层析的蛋白质峰,蛋白质的浓度按 Lowry 改良法测定,酶活力参照文献[8]通过常温下酶反应液在 340nm 下吸光值的减少来测定。总体积 1mL 的酶反应测定液包含:100mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.6),0.3 mmol/L NADPH,4 mmol/L 3-脱氧葡萄糖醛酮和 0.1mL 酶液。酶活力单位(u)定义为此测定条件下每减少 1 μ mol NADPH 所需的酶量^[11]。

1.3 酶的提取和纯化

以下操作均在 4℃ 进行。发酵液经离心,收集菌体,然后用超声波破碎仪破碎细胞,离心取上清液,即得粗酶液,边搅拌边缓慢加入硫酸铵粉末至 45% 饱和度,静置 1h,离心收集上清液,继续加硫酸铵至 80% 饱和度,收集 45% ~ 80% 饱和度的沉淀,溶于少量缓冲液 A(10mmol/L 磷酸钠缓冲液,pH7.0,含 10mmol/L β -巯基乙醇)中,并用相同的缓冲液透析,用聚乙二醇(分子量,20,000)浓缩。将浓缩液上 Q Sepharose FF(Pharmacia 原装)柱,先以缓冲液 A 洗涤,再用 0 ~ 550mmol/L NaCl 溶液(用缓冲液 A 配制)通过岛津 LC-10AT 中压层析系统线性梯度洗脱,活力部分经缓冲液 A 透析后用聚乙二醇浓缩,上 Hydroxyapatite (Bio-Rad 产品)柱,用缓冲液 A 洗涤至基线平稳,再用 250 ~ 550mmol/L 磷酸钾溶液(用缓冲液 A 配制)线性梯度洗脱,合并活力部分经缓冲液 A 透析后用聚乙二醇浓缩,上 Sephadex G-100 凝胶(Pharmacia 产品)柱,用 10mmol/L NaCl 溶液(用缓冲液 A 配制)洗脱,合并活性部分,透析后用聚乙二醇浓缩,再上一次 Sephadex G-100 柱,收集有酶活力的部分,透析浓缩后置于 4℃ 冰箱保存。

2 结果

2.1 酶的纯化

纯化酶在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上显示单一区带(图 1),每毫克蛋白活力达 77.60 酶单位,纯度提高了 141.4 倍,回收率为 11.4% (表 1)。用分子筛层析(Macrophere GPC 柱,洗脱液为 0.05mol/L KH_2PO_4 ,0.15mol/L Na_2SO_4)测得纯化酶分子量为 33kD;SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测得酶分子量大约为 31kD(图 1),表明该酶是一种单体。

2.2 酶的生化性质

2.2.1 底物特异性:以数种醛基化合物作底物,检测纯化酶的活性。结果表明(表 2),2-羰基醛化合物例如 3-脱氧葡萄糖醛酮、甲基乙二醛对该酶是很好的底物,戊二醛、苯甲醛和二羟丙酮也能被该酶催化还原,该酶对葡萄糖、果糖、低级脂肪醛、酮以及酯类没有活性,且特异性地需要辅酶 NADPH 参与反应,以 NADH 取代 NADPH 后,酶活力降为零,对 3-脱氧葡萄糖醛酮的表观米氏常数 K_m 为 2.5mmol/L。

表 1 海洋细菌 Fs-4-C-3 3-DG 代谢酶的纯化

Table 1 Purification of the enzyme from the marine bacteria Fs-4-C-3

Purification step	Total protein /mg	Total activity /u	Specific activity u/mg	Recovery of activity / %	Purification fold
Crude extract	155.52	85.2	0.55	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ ppt	77.03	67.6	0.88	79.4	1.6
Q Sepharose FF	5.208	20.4	3.92	23.9	7.1
Hydroxyapatite	1.125	10.6	9.42	12.4	17.1
Sephadex G-100	0.231	10.2	44.16	11.9	80.3
Sephadex G-100	0.125	9.7	77.60	11.4	141.1

表 2 酶催化作用的底物特异性

Table 2 Substrate specificity of the purified enzyme

Substrate	Relative activity / %
3-Deoxyglucosone	100
Glutaraldehyde	14.3
Benzaldehyde	34.7
Acealdehyde	0
Formaldehyde	0
1,3-Dihydroxyacetone	32.7
Acetone	0
Glucose	0
Fructose	0
Gluconolactone	0
Glucuronolactone	0
Methylglyoxal	87.7

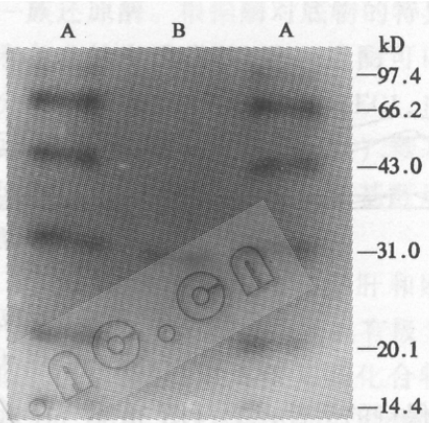


图 1 SDS-PAGE 测定酶分子量
Fig.1 Molecular weight of the enzyme by SDS-PAGE

A. Protein makers: Rabbit phosphorylas b(97.0kD), Bovine serum albumin (66.2kD), Rabbit actin (43.0kD), Bovine carbonic anhydrase (31.0kD), Trypsin inhibi-tor (20.1kD), Hen egg white lysozyme (14.4kD);
B. Purified enzyme.

2.2.2 酶促还原产物鉴定:底物类似物甲基乙

二醛与纯化酶在常规条件下反应,同时,以不加

纯化酶的酶反应液作对照,利用气相色谱-质谱联用仪选择离子方式(GC-MS/SIM)进行测定。对照和反应样品的总离子流图及质量碎片图(见图 2)。甲基乙二醛还原产物有三种可能:丙酮醇、乳醛和 1,2-丙二醇。图 2c 表明,生成的还原产物有 m/z 为 74 和 43 的峰,且以 m/z 为 43 的峰丰度最大,这一结果与丙酮醇的质谱图较吻合;同时,图 2b 排除了产物为乳醛和丙二醇的可能:乳醛有 m/z 为 45 的基峰及 m/z 为 29 的碎片峰,丙二醇有 m/z 为 45 的基峰、m/z 为 76 的分子离子峰和 m/z 为 61 的碎片峰,图中未出现这些质量碎片峰。基于上述分析,可以确定还原产物为丙酮醇。根据结构类似化合物官能团反应的相似性,推测 3-DG 的还原产物为 3-脱氧果糖。

2.2.3 酶促反应最适 pH 和 pH 稳定性:在一系列 pH 值不同的磷酸钠缓冲液中,测定酶催化 3-DG 反应的活力,结果在 pH 4.0~9.0 之间酶促反应均可进行,最适反应 pH 值为 6.6(图 3a);将纯化酶液置于 pH 值不同的磷酸钠缓冲溶液中,室温下处理 30min,然后测

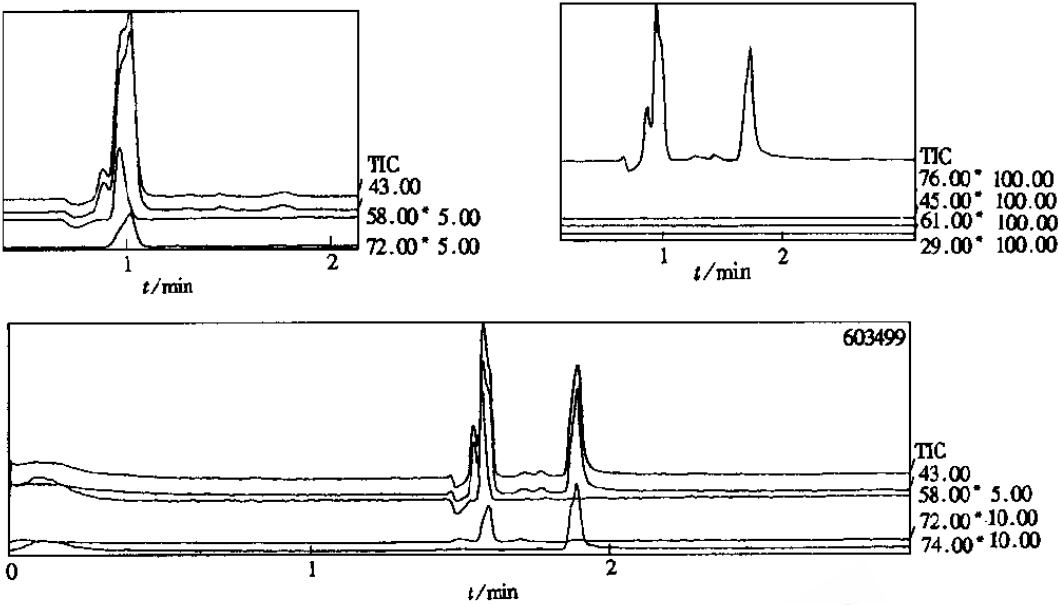


图2 对照和反应样品的总离子流图和质量碎片图
Fig.2 TIC and SIM of the control (a) and reaction sample (b,c)

定酶保持的活性,结果(图 3b)在 pH 5.0 ~ 8.0 范围内保持 60% 以上的活性,pH 为 6.2 时最稳定,pH4.0 时残留活力不到 50%,pH 大于 8.0 酶活力迅速下降。

2.2.4 热稳定性:取少量酶液,于不同温度(25℃、30℃、35℃、40℃、50℃)下处理 30min 后,立即用冰水冷至室温,测定酶保持的活性,结果该酶在 30℃ 以下稳定,35℃ 以上活性明显下降(图 4)。

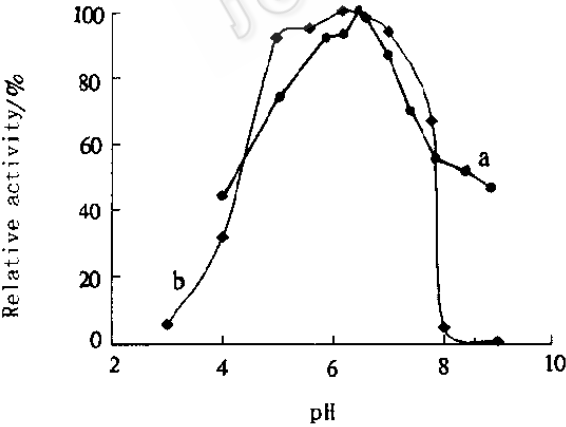


图3 酶反应最适 pH(a)和 pH 稳定性(b)
Fig.3 (a)Effect of pH on enzyme activity and
(b) pH stability of the enzyme

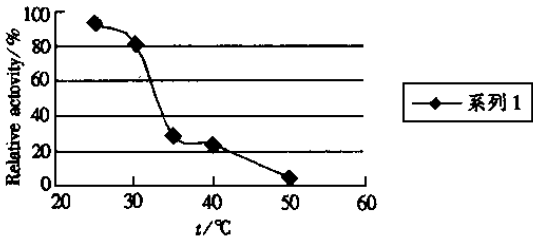


图4 酶热稳定性
Fig.4 Temperature stability of the enzyme

2.2.5 -SH 基团及金属离子对酶活性的影响:金属离子整合剂 EDTA 不抑制酶的活性,说明该酶的活性不需要金属离子的参与,而添加 EDTA 能明显提高酶的活性,这是由于 EDTA 螯和了一些存在于试剂中的抑制酶活性的痕量金属离子。添加低于 10mmol/L 巯基

乙醇或 1mmol/L 二硫苏糖醇能提高酶的活性,过量的巯基保护剂亦会对酶产生毒害作用。10mmol/L 的碘乙酸可使酶大量失活(表 3)。

表 3 巯基基团及金属离子螯合剂等对酶活性的影响

Table 3 Effect of SH-group and metal ions on the activity of the purified enzyme

Reagent	Relative activity/%
Control	100
β-Mercaptoethanol (1 mmol/L)	126
β-Mercaptoethanol (10 mmol/L)	105
β-Mercaptoethanol (20 mmol/L)	83
Dithiothreitol (0.05 mmol/L)	114
Dithiothreitol (0.10 mmol/L)	115
Dithiothreitol (1.0 mmol/L)	117
Dithiothreitol (5.0 mmol/L)	109
EDTA (5 mmol/L)	122
EDTA (10 mmol/L)	130
EDTA (20 mmol/L)	128
Iodoacetic acid (10 mmol/L)	25
N-Ethylmaleimide (0.1 mmol/L)	90

3 讨论

本文首次报道了从海洋细菌中分离获得 3-脱氧葡萄糖醛酮还原酶。醛酮还原酶是在 NADPH 共同参与下催化大量的脂肪族和芳香族醛、酮还原的一族还原酶。根据酶对底物的特异性和各自的米氏常数,这一族酶可以划分为不同类别:醛还原酶(EC1.1.1.2)、醛糖还原酶(EC1.1.1.21)、羰基还原酶(EC1.1.1.184)和 2-羰基醛还原酶^[12]。

该 3-DG 代谢酶与从猪肝和欧芹中分离的 2-羰基醛还原酶具有极为相似的酶学特性:对 2-羰基醛化合物甲基乙二醛和 3-DG 有很好的催化特异性,催化甲基乙二醛还原为丙酮醇,而对低级脂肪醛或酮的活性很低甚至没有,

因此,我们将该酶命名为 2-羰基醛还原酶。所不同的是:(a)三种酶在 Hydroxyapatite 上色谱行为不一样,猪肝酶从柱上流出而欧芹酶和该酶吸附在柱上,欧芹酶在约 280mmol/L 磷酸钾缓冲液下被洗脱,该酶在约 440 mmol/L 浓度下方可被洗脱;(b)猪肝酶是分子量为 38kD 的单体,欧芹酶是分子量为 67kD 的二聚体,该酶是分子量为 33kD 的单体。

此外,从已筛选的陆地和海洋微生物中发现该海洋细菌的酶学性质与先前从细菌 *Bacillus* sp.2 中纯化的 3-脱氧葡萄糖醛酮代谢酶性质非常相似,只是分子量和米氏常数略有不同^[13];两者与从酵母 *S. cerevisiae* Y_{Br-M} 中分离纯化的同一种代谢酶相比,分子量相差较大^[14,15]。已纯化的三种酶均要求以 NADPH 辅酶为底物,即它们都是以还原型辅酶为底物,而对 NADH 的酶活很低。

2-羰基醛化合物甲基乙二醛和 3-脱氧葡萄糖醛酮通过干预细胞分化而对细胞广泛具有极高毒性^[16]。Szwergold 等从患有糖尿病的老鼠体内分离到 3-DG^[17]。Niwa 等人曾报道发生肾病变的糖尿病人血清中 3-DG 的浓度高达 1235ng/mL,一般糖尿病人为 513mg/mL,健康人仅为 314mg/mL^[18]。患有糖尿病的老鼠体内也发现有 3-DG 的存在。临床学上证明,通过调节 3-DG 在体内的含量可控制老化和糖尿病的加剧^[16]。Kato 等证实了猪肝和欧芹中的 2-羰基醛还原酶能有效地抑制美拉德反应高级阶段的进行^[8,9]。因此,该酶亦有可能通过抑制 3-DG 而阻断美拉德反应的进行,在细胞代谢中起解毒作用,进而对老化、糖尿病、动脉硬化和白内障等的治疗起积极作用。

参 考 文 献

- [1] Shinoda T, Hayase F, Kato H. *Biosci Biotech Biochem*, 1994, **58**: 2215 ~ 2219.
- [2] Norie A, Norio U, Bireswar C, et al. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 10211 ~ 10214.
- [3] Kato H, Hayase F, Shin D B, et al. *Prog Clin Biol Res*, 1989, **304**: 69 ~ 73.
- [4] Kato H, Cho R K, Okitani A, et al. *Agri Biol Chem*, 1987, **51**: 683 ~ 689.
- [5] Kato H, SHIN D B, Hayase F. *Agri Biol Chem*, 1987, **51**: 2009 ~ 2011.
- [6] Shin D B, Hayase F, Kato H. *Agri Biol Chem*, 1987, **52**: 1451 ~ 1455.
- [7] Monnier V M, Kohn R, Cerami A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **81**: 583 ~ 587.
- [8] Kato H, Liang Z Q, Nishimura T, et al. *Agri Bio Chem*, 1988, **52**: 2675 ~ 2679.
- [9] Liang Z Q, Hayase F, Kato H. *Eur J Biochem*, 1991, **197**: 373 ~ 379.
- [10] 梁智群, 罗虹, 李湘萍, 等, 微生物学通报, 2000, **27**(5), 321 ~ 324.
- [11] 李湘萍, 莫柏立, 庞宗文, 等, 微生物学通报, 1998, **25**: 71 ~ 73.
- [12] Liang Z Q, Hayase F, Kato H. *Biochem Biotech Biochem*, 1992, **56**: 1074 ~ 1079.
- [13] 梁智群, 粟桂娇, 李湘萍, 等, 生物化学与生物物理进展, 2000, **27**: 192 ~ 196.
- [14] 梁智群, 莫柏立, 李湘萍, 等, 中国生物化学与分子生物学报, 2000, **16**: 106 ~ 109.
- [15] 梁智群, 粟桂娇, 梁静娟, 等, 微生物学通报, 1998, **25**: 332 ~ 334.
- [16] Yamada H, Miyata S, Igaki N, et al. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 20275 ~ 20285.
- [17] Szwergld B S, Kappler F, Brown T R. *Science*, 1990, **247**: 451 ~ 456.
- [18] Niwa T, Takeda N, Yoshizumi H, et al. *Biochem Biophys Res Commun USA*, 1993, **196**: 837 ~ 843.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF 2-CARBONYL REDUCTASE FROM MARINE BACTERIA *BACILLUS* SP. *

Li Xiangping Luo Hong Pang Zongwen Huang Shihai Liang Zhiqun

(The Industrial Experimental Centre of GuangXi University, Nanning 530004, China)

Abstract: ANADPH-dependent 2-Oxoaldehyde reductase was isolated and purified from a marine bacteria *Bacillus* sp. The purification procedure involved ammonium sulfate fractionation and Q Sepharose FF, Hydroxyapatite, Sephadex G-100 column chromatographies. The specific activity of the purified enzyme was increased by 141.1 folds over crude extract and the recovery yield was 11.4%. 2-Oxoaldehyde compounds were found to be special good substrates. The optimum pH of the enzyme activity was 6.2 ~ 6.6. The K_m coefficient for 3-deoxyglucosone was 2.5 mmol/L. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 33 kD. The enzyme activity is stable below 30°C and pH 5.0 ~ 8.0. EDTA, β -mercaptoethanol and dithiothreitol enhanced the enzyme activity. On the other hand, the enzyme activity was partially lost by idoacetic acid or N-ethylmaleimide.

Key words: Maillard reaction, 3-Deoxyglucosone metabolizing enzyme, Purification

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(29466012)