

## 假单胞杆菌 D-海因酶的纯化及酶学性质\*

石亚伟 李汉卿 袁静明\*\*

(山西大学生物工程中心 太原 030006)

齐延红 李晋川

(山西省生物研究所 太原 030006)

**摘要:** D-海因酶是工业上生产 D-型氨基酸的关键酶,用热变性,硫酸铵沉淀及 Sepharose Q fast flow, Phenyl-Sepharose fast flow, Superose 12 等柱层析步骤从 *Pseudomonas* 2262 菌体中分离纯化了该酶,纯化倍数约为 60,活力回收约为 16%。该酶为同源二聚体,分子量约为 109 kD,亚基分子量约为 53.7 kD,反应最适 pH 为 8.0,最适温度为 70℃,在 pH6.0~10.0 和温度 60℃ 以下稳定,该酶对巯基试剂敏感,大多数二价金属离子如镁、锰离子等能促使酶活提高,但高浓度锌离子能抑制酶活,以二氢尿嘧啶为底物的米氏常数  $K_m = 2.5 \times 10^{-2}$  mol/L。该酶的 N 末端 10 个氨基酸残基依次为 MDKLIKNGTI。

**关键词:** 假单胞杆菌 2262, 海因酶, 纯化, 性质

**中图分类号:** Q559 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 05-0605-06

海因酶 (Hydantoinase, EC3. 5. 2. 2) 是属于水解环酰胺键的一类酰胺水解酶 (Amidohydrolase), 依据其催化底物的光学活性, 分为 D-型, L-型和 DL-型三种, 它广泛存在于各类有机体中<sup>[1]</sup>。目前研究较多的主要是来源于微生物海因酶, 如假单胞杆菌属 (*Pseudomonas putida*)<sup>[2]</sup>, 芽孢杆菌属 (*Bacillus stearothermophilus*)<sup>[3]</sup> 和土壤农杆菌属 (*Agrobacterium radiobacter*)<sup>[4]</sup> 等。

D-海因酶催化 5'-单替代海因或二氢尿嘧啶的开环, 形成氨甲酰类氨基酸产物, 进而经化学或酶促降解产生 D-型氨基酸, 如 D-对羟基苯甘氨酸 (图 1)<sup>[5,6]</sup> D-型氨基酸及其衍生物作为医药及食品领域的重要原材料被广泛地用于半合成抗生素、多肽激素、拟除虫菊酯、杀虫剂和甜味剂等的中间物<sup>[7]</sup>。

$\beta$ -内酰胺类抗生素仍是目前被全世界广泛采用的药物之一, 其中半合成青霉素和半合成头孢霉素是该领域的主流, 由对羟基苯甘氨酸 (D-HPG) 和 6-氨基青霉素烷酸 (6-APA) 组成的半合成抗生素阿莫西林 (Amoxicillin) 可作为口服剂使用而倍受青睐。山西省生物研究所拥有一株能转化 5'-对羟基苯海因 (DL-HPH) 产生 D-HPG 的菌株 (暂定名为 *Pseudo-*

\* 山西省重点行业科技发展项目 (983225)

\*\* 通讯作者: 袁静明, 教授, 博士生导师。Tel: (0351) 7017084, Fax: (0351) 7018731, E-mail: jmyuan@sxu.edu.cn

参加本工作的还有山西大学生物工程中心褚西宁, 山西生物研究所齐长兴, 连惠勇, 丁玉华。

**作者简介:** 石亚伟 (1973 - ), 男, 山西左权人, 1998 年于山西大学获理学硕士, 1999 年曾赴德国 Kaiserslautern 大学合作研究, 主要从事蛋白质工程研究。

**收稿日期:** 2000-11-27, **修回日期:** 2001-01-12

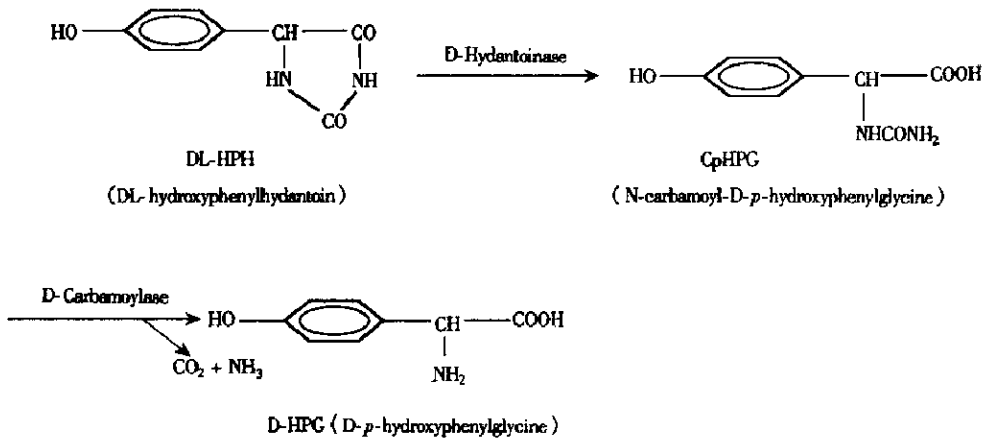


图 1 5'-单替代海因经酶催化产生 D-氨基酸的反应过程

Fig. 1 Reaction scheme of enzymatic hydrolysis of 5'-monosubstituted hydantoin to D-amino acid monas 2262), 说明该菌同时具有 D-海因酶及 N-氨甲酰氨基水解酶双重活性, 因而具有重要应用价值, 目前已达中试生产规模, 为我国自行生产阿莫西林的侧链 D-HPG 开辟了一条途径。诚然, 在试生产过程中, 有一些难题有待解决, 为此, 我们首先纯化了 D-海因酶, 并对其理化性质进行了研究, 可望为扩大生产提供有价值的参考数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种和培养

假单胞杆菌 (*Pseudomonas*) 2262 由山西省生物研究所保存, 培养基组成: 葡萄糖 20 g, 玉米浆 20 g, NaCl 3 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3 g,  $\text{MgSO}_4$  1 g,  $\text{CoCl}_2$  0.1 g, 诱导剂 25 g, 定容至 1 L。500 mL 三角瓶装上述培养基 100 mL, 灭菌后接种, 37°C, 220 r/min 振荡培养 48 h 后, 收集菌体。

### 1.2 试剂和设备

对羟基苯海因(山西省生物所提供), 二氢尿嘧啶和 DL-N-氨甲酰丙氨酸(Sigma 公司产品), 蛋白质分子量标准(NEB 产品); Q-Sepharose Fast flow, Phenyl-Sepharose Fast flow, Superose-12(10/30)均为 Pharmacia 产品, 其他试剂均为国产分析纯。柱层析在 AKTA purifier 或 LKB 层析系统进行操作。

### 1.3 酶活性测定

酶活测定采用比色法, 在试管中加入 0.9 mL 的酶作用液(含 50 mmol/L 二氢尿嘧啶, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 缓冲液)和 0.1 mL 酶液, 37°C 反应 30 min, 然后加入 0.25 mL 10% 三氯乙酸终止反应, 再加入 0.25 mL 的 10% 对二甲氨基苯甲醛(溶于 6 mol/L HCl)混匀, 最后加入 1.5 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , 离心后取上清, 用分光光度计于 430 nm 下测吸光值的变化值。酶活力定义为在上述反应条件下, 1 min 内生成 1  $\mu\text{mol}$  氨甲酰丙氨酸所需酶量称为一个酶活单位(U), 比活力为 1 mg 蛋白质的酶活力(U/mg)。

### 1.4 蛋白质浓度测定

按 Bradford 法<sup>[8]</sup>, 以牛血清白蛋白绘制标准曲线。

## 1.5 电泳分析

PAGE 及 SDS-PAGE 电泳按文献进行<sup>[9]</sup>。

## 1.6 酶的分离纯化

将已培养好的菌液,6000 r/min 离心 20 min,收集菌体并用 50 mmol/L Tris-Cl pH8.0 缓冲液洗涤 2 次,加入菌体湿重 3~4 倍体积的含 50 mmol/L Tris-Cl pH 8.0 的缓冲液悬浮菌体,于冰浴中用超声波细胞破碎仪间歇处理 9 min(400W),14000 r/min 离心 30 min,上清液约 92 mL,55℃热变性 15 min,冰浴冷却,14000 r/min 离心 30 min,上清液约 86 mL,加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 40%饱和度,放置 2 h 后,10000 r/min 离心 20 min,弃沉淀,上清液继续加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 70%饱和度,搅拌 30 min,于 4℃放置数小时后,10000 r/min 离心 20 min,收集沉淀,用 20 mmol/L Tris-Cl pH 8.0 的缓冲液悬浮,于相同缓冲液中透析平衡 24 h。透析后的酶液上样于 Q-Sepharose Fast flow 柱(3.12×5 cm),用 20 mmol/L Tris-Cl pH 8.0 的缓冲液洗涤除去未交换的杂蛋白,再分别用 0.2 mol/L、0.25 mol/L、0.5 mol/L、1 mol/L NaCl 阶段梯度洗脱,收集 0.25 mol/L 部分酶活性高的洗脱峰。加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至终浓度 0.5 mol/L,分批上样 Phenyl-Sepharose Fast flow(16/10),用含 0.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 20 mmol/L Tris-Cl pH 8.0 的缓冲液洗涤,然后再用含 0.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ~0 的上述缓冲液进行线性梯度洗脱。收集主要活性峰。用 PM10 膜超滤浓缩样品后,再上 Superose-12 凝胶柱,收集活性峰。

## 1.7 酶的分子量测定

用预装柱 Superose-12(30/10)于 AKTA 纯化系统进行测定,标准分子量为 Cytochrome C(12.4 kD), $\beta$ -Lactoglobulin(35 kD),Ovalbumin(45 kD),Bovine Serum Albumin(68 kD),Alcohol Dehydrogenase(80 kD),Lactate Dehydrogenase(140 kD),经用  $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$  公式计算不同蛋白质的  $K_{av}$ ,然后  $K_{av} \sim \log MW$  作图,经比较求得该酶的分子量。

# 2 结果

## 2.1 酶的分离纯化

按材料和方法所述进行分离纯化(见表 1),该酶被提纯了约 60 倍,活力回收约 16%,SDS-PAGE 和天然 PAGE 检查结果均为单一泳带(见图 2)。

表 1 海因酶的纯化总表

Table 1 A summary of hydantoinase purification

Steps	Total protein /mg	Activity /U	Activity recovery/%	Specific activity/(U/mg)	Purification factor
Crude extract	2912.48	902.87	100	0.31	1
Thermal treatment	556.22	812.16	90.0	1.46	4.71
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation	169.02	409.03	45.30	2.42	7.81
Q-Sepharose fast flow	47.90	265.37	29.39	5.54	17.87
Phenyl-Sepharose(16/10)	15.80	200.82	22.24	12.71	41.00
Superose 12(30/10)	7.67	140.90	15.61	18.37	59.26

### 2.2 酶的部分理化性质

**2.2.1 酶的分子量:**用 SDS-PAGE 方法测得酶单亚基的分子量为 53.7 kD,而天然 PAGE 中该酶的分子量近似于 BSA 的二聚体(图 2),由于天然状态下,不同蛋白质分子之间的构象及表面电荷等十分不同,在天然 PAGE 中不易获得蛋白质分子量的正确结果,因此,我们用 Superose 12(30/10)预装柱在 AKTA Purifier 上用分子量已知的蛋白为标准,测定该酶的正确分子量,结果表明海因酶  $K_{av} = 0.165$ ,经  $K_{av} \sim \log MW$  作标准图,得天然海因酶的分子量为 109 kD,由此说明该酶为一个同源二聚体蛋白。

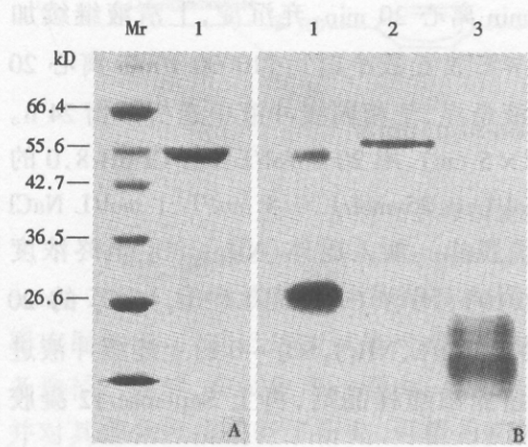


图 2 纯酶的电泳图谱

Fig.1 The electrophoretic patterns of the purified D-hydantoinase

(A)10% SDS-PAGE;  
 (B)Native PAGE:1. Bovine serum albumin;  
 2. Purified hydantoinase;3. Ovalbumin.

**2.2.2 酶的最适 pH 值和 pH 稳定性:**最适 pH 是在不同的 pH 缓冲液中以二氢尿嘧啶为底物测定酶活力,作 pH 的酶活性曲线,得该酶的最适 pH 为 8.0;酶的 pH 稳定性是将一定量的酶液分别置于一系列不同的 pH 的缓冲液,37℃ 放置 1 h,在 pH 8.0,37℃ 条件下测定酶活力,结果表明,酶在 pH 6.0 ~ 10.0 之间稳定,超过此范围酶活力下降较快。

**2.2.3 热稳定性:**将等量的酶液分别置于不同温度(25℃,37℃,50℃,60℃,70℃,80℃)下 30 min,取出后迅速冷却至室温,按常规方法测酶活性,结果表明,酶在 60℃ 以下稳定性最好,而超过 60℃ 时酶活损失较快,70℃ 保温 30 min,酶活只剩余 6.58%。酶的稳定性在工业化生产中是至关重要的。

**2.2.4 米氏常数  $K_m$ :**取适量酶液于不同浓度的二氢尿嘧啶中 37℃ 反应 30 min,测定酶的活

力,以 Lineweave-Burk 法作图,得到  $K_m = 2.5 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ ,  $V_m = 8.33 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 。

**2.2.5 金属离子对酶活性的影响:**将酶液在 20 mmol/L Tris-Cl 中透析 24 h 后选取不同金属离子,分别加入酶液,终浓度均为  $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ,37℃ 保温 30 min,然后测定酶活力,结果表明(表 2),除  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  外其它二价离子均引起酶活升高,尤以  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  为最。

表 2 一些金属离子对海因酶活性的影响

Table 2 The effect of some ions on hydantoinase activity

Ions	No	$\text{Ni}^{2+}$	$\text{Cu}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Co}^{2+}$	$\text{Mg}^{2+}$
Relative activity/%	100	132	88	67	219	203	173	207

\* After hydantoinase were incubated in 20 mmol/L Tris-Cl in the presence of 1 mmol/L of each metal(supplied as dichloride) at 37℃ for 30 min, the resultant enzyme activities were assayed under the standard conditions. The activity of hydantoinase in the absence of metal ion was taken as 100%.

**2.2.6 N-末端氨基酸序列测定:**由中国科学院上海生物化学研究所代为测定的 N-末端 10 个氨基酸序列依次为 MDKLIKNGTI,根据文献资料,有关菌株 N-端氨基酸序列与本结果

比较如表 3<sup>[3]</sup>。若以 N 端 10 个氨基酸残基相比,本菌株分别有 8 个残基与芽孢杆菌和土壤农杆菌相同,而只有 4~5 残基与假单胞杆菌相同,因此,有待确切的分类学和全基因序列最终确定其种属。

表 3 几种菌株中海因酶 N-端的同源性

Table 3 The homology of N-terminal sequence of D-hydantoinase in some strains

Species	a. a residues									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>P. putida</i> CCRC12857	M	S	L	L	I	R	G	A	T	V
<i>P. putida</i> DSM84	M	S	L	L	I	R	G	A	T	V
<i>B. thermoglucosidasius</i>	M	T	K	I	I	K	N	G	T	I
<i>A. radiobacter</i>	M	T	K	I	I	K	N	G	T	I
<i>B. Stearothermophilus</i> NS1122A	M	D	I	I	I	K	N	G	T	I
<i>P. 2262</i> (this strain)	M	D	K	L	I	K	N	G	T	I

### 3 讨论

随着半合成抗生素需求量增加,光学活性的 D-氨基酸如 D-对羟基苯甘氨酸和 D-苯甘氨酸将作为半合成头孢霉素和半合成青霉素首选前体,因而该系列氨基酸的生产愈来愈受到研究者的关注。微生物来源的 D-海因酶和 N-氨甲酰氨基酸氨基水解酶将是生物转化这类 D-氨基酸的主要成员,因而对其酶学性质研究无疑为有效的生物转化提供可靠数据<sup>[10]</sup>。为了提高与改进现有的生产工艺与菌株,我们成功地从 *Pseudomonas* 2262 菌中分离纯化了海因酶。从纯化总表可以看出,阴离子型交换剂 Q-Sepharose 和疏水型载体 Phenyl-Sepharose 是最关键的二步,比活有明显的提高。诚然,由于酶的热稳定性质,热变性这一步在整个纯化过程中作出了重要贡献。众所周知,目前纯化某一蛋白所采用的战略均大同小异,但本文的纯化路线及效率是比较满意的。

酶学性质研究表明,诸如分子量、亚基组成、最适 pH、最适温度、金属离子影响等等皆与其它来源的二氢尿嘧啶酶相似。值得一提的是从金属离子和 EDTA 对酶活的影响,可以推断该酶是一种需金属离子的酶,而不是金属酶,在  $1 \times 10^{-3}$  mol/L  $Mn^{2+}$  或  $Mg^{2+}$  可成倍地激活酶的活性,而 EDTA 高达 100 mmol/L 时对酶活几乎没有影响(结果未列出)。另外,  $Zn^{2+}$  对酶活具有双重作用,在  $1 \times 10^{-3}$  mol/L 时相对活性下降约 1/3,但低于  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 时又表现为激活作用(结果未列出),这一结果和动物来源的二氢尿嘧啶酶相似<sup>[5,11]</sup>。另外巯基试剂如 DTT 也有类似的抑制作用。可能的解释是在较高浓度  $Zn^{2+}$  作用下,酶分子构象发生改变,易形成  $CySH-Zn^{2+}$  结(knot)或  $His-Zn^{2+}$  结(knot),从而导致活性中心构象改变,酶活性下降,而低浓度时仅仅作为酶对金属离子的需求而呈现激活作用。N-端 10 个氨基酸残基的序列数据不但为克隆与确认该酶的基因奠定了基础,同时也为该菌株的最终定名提供了有价值的依据。

致谢 山西生物研究所的谢红所长及山西大学生物工程中心主任梁爱华教授对本工作给

予极大的支持,在此深表谢意。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Sylđatk C, May O, Altenbuchner J, et al. *Applied Microbiol biotechnol*, 1999, **51**:293 ~ 309.
- [ 2 ] Watabe K, Ishikawa T, Mukohara Y, et al. *J Bacteriol*, 1992, **174**:962 ~ 969.
- [ 3 ] Chien H R, Jih Y L, Yang W Y, et al. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, **1395**:68 ~ 77.
- [ 4 ] Kim G J, Park J H, Lee D C, et al. *Mol Gen Genet*, 1997, **255**:152 ~ 156.
- [ 5 ] Runser S M, Meyer P C. *Eur J Biochem*, 1993, **213**:1315 ~ 1324.
- [ 6 ] Sylđatk C, Laufer A, Muller R, et al. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1990, **41**:69 ~ 75.
- [ 7 ] Grifantini R, Galli G, Carpani G, et al. *Microbiology*, 1998, **144**:947 ~ 954.
- [ 8 ] Bradford M. *Anal Biochem*, 1976, **72**:248 ~ 254.
- [ 9 ] Laemmli U K. *Nature*, 1970, **227**:680 ~ 685.
- [ 10 ] Chao Y P, Fu H Y, Lo T, et al. *Biotechnol Prog*, 1999, **15**:1039 ~ 1045.
- [ 11 ] Kikugawa M, Kaneko M, Fujimoto S, et al. *Eur J Biochem*, 1994, **219**:293 ~ 399.

## PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF D-HYDANTOINASE PRODUCED BY *PSEUDOMONAS* 2262

Shi Yawei Li Hanqing Yuan Jingming

(Biotechnol Center of Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Qi Yanhong Li Jinchuan

(Shanxi Institute of Biology, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** A D-hydantoinase produced by *Pseudomonas* 2262 was purified to electrophoretic homogeneity by the steps of thermal treatment,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fractionation and column chromatography with Q-Sepharose fast flow, phenyl-Sepharose fast flow and Superose 12. Purification of about 60 fold was achieved with an overall yield of 16%. The relative molecular mass of the native enzyme is 109 kD and that of subunit is 53.7 kD by the analysis of Native and SDS-PAGE as well as gel filtration respectively. Some properties of the enzyme such as the sensitivity to thiol reagent and the effects of metal ions, for instance inhibited by  $\text{Zn}^{2+}$  and activated by  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  are identical to dihydropyrimidinase. The optimum temperature and pH for enzymatic catalysis are 70 °C and 8.0 respectively. The enzyme activity is stable under 60 °C and in the pH range of 6 ~ 10. The N-terminal sequence for 10 amino acid residues is MDKLIKNGTI.

**Key words:** *Pseudomonas*2262, Hydantoinase, Purification, Properties