

## 三角酵母菌 D-氨基酸氧化酶的纯化和一些基本性质的研究

任克勤\* 彭惠林 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

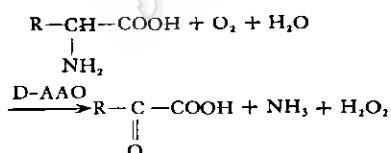
1. 比较了 17 株霉菌和 36 株酵母菌的 D-氨基酸氧化酶活力, 其中以三角酵母的酶活力最高, 比较适宜作为研究 D-氨基酸氧化酶的材料。

2. 用硫酸铵、聚乙二醇 (PEG 6000) 分部沉淀, Sephadex G-200、羟基磷灰石柱层析分离纯化了三角酵母 D-氨基酸氧化酶, 聚丙烯酰胺凝胶电泳为单一组份。以聚丙烯酰胺凝胶梯度浓度电泳测得 D-氨基酸氧化酶的分子量为 170,000, SDS 凝胶电泳测得其亚基分子量为 42,000, 表明三角酵母 D-氨基酸氧化酶由四个相同亚基组成。

3. 三角酵母 D-氨基酸氧化酶在以 D-丙氨酸为底物时, 最适 pH 为 8.3, 米氏常数 ( $K_m$ ) 为 3.3 mM。三角酵母 D-氨基酸氧化酶具有较宽的底物专一性, 多种 D 或 DL 型氨基酸都可以做它的底物。

**关键词** D-氨基酸氧化酶; 三角酵母; 纯化

D-氨基酸氧化酶 (D-amino acid oxidase, E. C. 1.4.3.3, 以下简称 D-AAO) 广泛存在于动物内脏和许多种属的微生物中, 它催化 D-氨基酸氧化脱氨, 生成酮酸的反应<sup>[1]</sup>:



Massey<sup>[2]</sup>、Yagi<sup>[3]</sup> 等以猪肾脏为材料纯化 D-AAO, 得到了酶的结晶; 随后, Ronchi<sup>[4-6]</sup> 等又进行了深入研究。但是到目前为止, 尚少见到以微生物做材料纯化 D-AAO 的报道。

在二步法制备头孢菌素的母核——7-氨基头孢羧酸 (7-ACA) 的研究中, D-AAO 用以催化第一步反应, 即氧化头孢菌素 C, 产生戊二酰基-7-氨基头孢羧酸 (GL-7ACA)<sup>[7-8]</sup>, 而用固定化微生物细胞转化头孢菌素 C, 将更适用于工业生产。为了

了解微生物 D-AAO 的性质, 我们以 D-AAO 活力较高的三角酵母 (*Trigonopsis variabilis*) 为材料, 进行了 D-AAO 的纯化和一些基本性质的研究。

## 材料和方法

### (一) 菌种和培养条件

1. 菌种: 见表 1。
2. 培养条件: 霉菌培养基为: 每升培养基中含:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{NaNO}_3$  3g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g,  $\text{KCl}$  0.5g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1g 蔗糖 30g, DL-甲硫氨酸 2.67g (分开灭菌)。28℃ 震荡培养 48 小时, 收集菌体。酵母菌的培养条件见前文<sup>[9]</sup>。

### (二) 分析方法

1. 蛋白质测定: 按 Lowry<sup>[10]</sup> 等方法, 以牛血清白蛋白为标准。
2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 按 Davis<sup>[11]</sup> 方法。
3. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 按 Shapiro<sup>[12]</sup>

本文于 1985 年 6 月 24 日收到。

\* 现在通讯地址: 安徽省合肥市安徽教育学院生物系。

方法。

4.聚丙烯酰胺梯度浓度凝胶电泳：按 Rodbold<sup>[13]</sup> 方法。

5.电泳蛋白带的染色：按李成文等<sup>[14]</sup> 方法。

(三) 酶活力测定

1.DAS 法：按 Malmstadt<sup>[15]</sup> 方法,作适当改进,反应在 0.1M pH8.3 焦磷酸缓冲液中进行。反应系统含：90μmol D-丙氨酸,0.06μmol FAD,0.2mg 过氧化物酶,0.02% 邻联茴香胺和 0.5ml 酶溶液,总体积为 3.0ml,反应温度 37℃,在波长为 420nm 下测每分钟吸光度的变化。在上述条件下,每分钟吸光度变化 0.1 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

2.DNP 法：见前文<sup>[9]</sup>。

结 果

(一) 不同菌种 D-AAO 活力的比较

将霉菌在同一培养基中培养,酵母菌在另一相同培养基中培养,菌体都制成丙酮粉,按 DNP 法分别测酶活力,结果见表 1。三角酵母 (*Trigonopsis variabilis*) 的 D-AAO 活力最高,因此以三角酵母为材料比较适合。

表 1 不同菌种 D-氨基酸氧化酶活力的比较

Table 1 Comparison of D-AAO activity from various species

株号 Strain No.	种 名 Species	相对活力 (%) Relative activity
NS-1	<i>Neurospora</i> sp.	11
AS 3.2758	<i>Aspergillus flavus</i>	61
AS 3.2823	<i>A. flavus</i>	69
AS 3.762	<i>A. oryzae</i>	56
AS 3.801	<i>A. oryzae</i>	83
AS 3.224	<i>Penicillium roqueforti</i>	55
AS 3.910	<i>Cunninghamella blakesleana</i>	2
AS 3.3589	<i>Curvularia lunata</i>	2
AS 3.3657	<i>Gliocladium roseum</i>	0
AS 3.901	<i>Rhizopus nigricans</i>	8
84-3	<i>Fusarium</i> sp.	13
72-3-1	<i>Fusarium</i> sp.	18.5
B-32	<i>Fusarium</i> sp.	14.5

表 1(续)

株号 Strain No.	种 名 Species	相对活力 (%) Relative activity
62-3	<i>Fusarium</i> sp.	24
62-2	<i>Fusarium</i> sp.	1
64-3	<i>Fusarium</i> sp.	7
57-14	<i>Fusarium</i> sp.	1
Y-7560	<i>Hansenula polymorpha</i>	24
1AM-4668	<i>H. anomola</i>	4
2-592	<i>H. anomola</i>	0.5
B-53	<i>H. anomola</i>	2.5
B-50	<i>H. anomola</i>	1
B-46	<i>H. rhodanensis</i>	2
B-58	<i>H. subpelliculosa</i>	1.5
B-47	<i>H. schneegii</i>	0
B-48	<i>H. saturnus</i>	0
C-230	<i>Candida</i> sp.	6
C-2087	<i>Candida</i> sp.	5
U-5	<i>C. lipolytica</i>	5
2-590	<i>C. parapsilosis</i>	10
2-1182	<i>C. lambica</i>	16
C-422	<i>C. maltosa</i>	6
YB-421	<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	0
YB-423-12	<i>S. lipolytica</i>	0
J-1	<i>S. lipolytica</i>	9
K-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0
B-81	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	3
Y-81	<i>Williopsis saturnus</i>	2
Y-76	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2
SY-2	<i>S. pombe</i>	1
SY-1	<i>S. pombe</i>	34
Y-74	<i>Schizosaccharomyces</i> sp.	0
Y-71	<i>Schizosaccharomyces</i> sp.	4
Y-75	<i>Schizosaccharomyces</i> sp.	7
D-3	<i>Pichia petrophilum</i>	5.5
2-87	<i>P. farinosa</i>	1.5
Y-53	<i>Zygosaccharomyces soja</i>	2.5
B-80	<i>Rhodotorula rubra</i>	29
B-72	<i>R. mucilaginosa</i>	48
2-1388	<i>Lipomyces starkeyi</i>	2
Y-2460	<i>Pachysolen tannophilus</i>	27.5
2-619	<i>Sporobolomyces roseus</i>	0
TV-1	<i>Trigonopsis variabilis</i>	100

(二) 三角酵母的生长与 D-AAO 活力的关系

在三角酵母的生长过程中,不同时间

取样两份,一份烘干至恒重,另一份制成丙酮粉,以 DNP 法测酶活力,结果见图 1。三角酵母在培养 48 小时即达平稳期,生长 40 小时 D-AAO 活力最高。

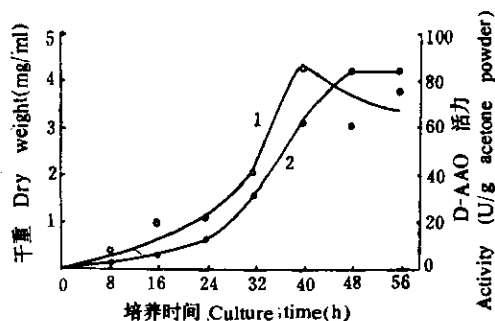


图 1 三角酵母的生长与 D-AAO 活力的关系

Fig. 1 Typical fermentation profile of *Trigonopsis variabilis*

1. D-AAO 活力 D-AAO activity
2. 干重 Dry weight

### (三) D-氨基酸氧化酶的纯化

分离纯化的所有步骤均在 4℃ 以下完成,酶活力测定均以 DAS 法。

1. 酶的粗提: 90g 湿菌体,加 0.1M pH 8.3 焦磷酸缓冲液 30ml,以干冰冷冻,用细胞破碎器“X-PRESS”以 10—15 吨压力挤压两遍。挤压后的混合物加入适量以上缓冲液,24,000g 离心 45 分钟,弃去沉淀,上清液即为粗酶提取液。

2. 硫酸铵沉淀: 上清液用 2N 醋酸调 pH 至 5.4,加硫酸铵至 20% 饱和度,24,000g 离心 30 分钟,弃去沉淀。上清液中再加硫酸铵至 35% 饱和度,24,000g 离心 30 分钟,弃去上清液。

3. 聚乙二醇 (PEG 6000) 沉淀: 以上沉淀溶于 100ml 同样缓冲液中,加 30% 聚乙二醇,使其终浓度为 8.5%,12,000g 离心 15 分钟,弃去沉淀;上清液中再加入 30% 聚乙二醇,使其终浓度为 17%,12,000g 离心 15 分钟,弃去上清液。沉淀溶于 3ml 0.05M, pH 8.3 Tris-HCl 缓冲液

中。

4. Sephadex G-200 柱层析: Sephadex G-200 柱 (2.5 × 100cm) 先以 0.05M, pH 8.3 Tris-HCl 缓冲液平衡好。将以上酶溶液施于柱顶,以同样缓冲液洗脱,流速为 15ml/h,分部收集,得 105ml 酶溶液。

5. 羟基磷灰石柱层析: 羟基磷灰石柱 (2.0 × 12cm) 先以 0.01M, pH 8.0 磷酸缓冲液平衡。将以上酶液在同样缓冲液中透析过夜,然后把酶液施于柱顶,酶蛋白即吸附于柱上。先以同样缓冲液充分洗脱,以除去未吸附的蛋白;然后再以 pH 8.0 的磷酸缓冲液用 0.01M—0.4M 的线性浓度梯度洗脱,流速为 30ml/小时,分部收集,层析图谱见图 2。以上各步骤总结于表 2。

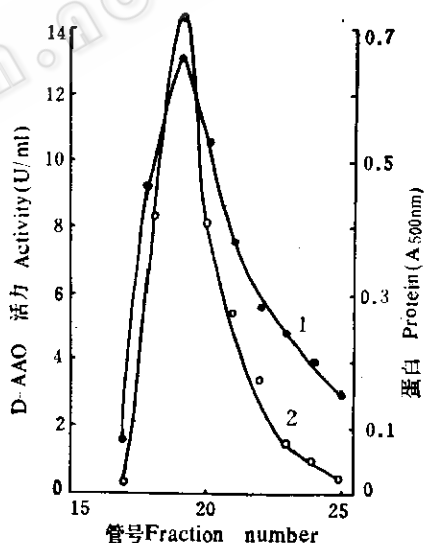


图 2 D-AAO 在羟基磷灰石柱上的层析

Fig. 2 Chromatography of D-AAO on hydroxylapatite column

1. 蛋白 Protein 2. D-AAO 活力 D-AAO activity

### (四) D-AAO 的一些基本性质

在研究酶的基本性质时,酶活力测定均以 DAS 法进行。

1. 均一性: 经过以上五步纯化,酶蛋白在聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱上呈现一条

表 2 三角酵母 D-氨基酸氧化酶的纯化

Table 2 Purification of D-AAO of *T. variabilis*

步 骤 Step	总蛋白 (mg) Total protein	总活力(单位) Total activity (unit)	比活 (单位/mg) Specific activity (unit/mg)	得率(%) Yield	纯化倍数 Purification (fold)
1.粗提 Crude extract	2088	1400	0.7	100	1
2.硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate fractionation	520	880	1.7	61	2.4
3.聚乙二醇沉淀 Polyethylene glycol 6000 fractionation	66.5	315	4.7	22	6.7
4. Sephadex G-200 柱层析 Sephadex G-200 column	10.5	273	26.0	19	37.1
5.羟基磷灰石柱层析 Hydroxylapatite column			29.9		42.7

带(图3)。

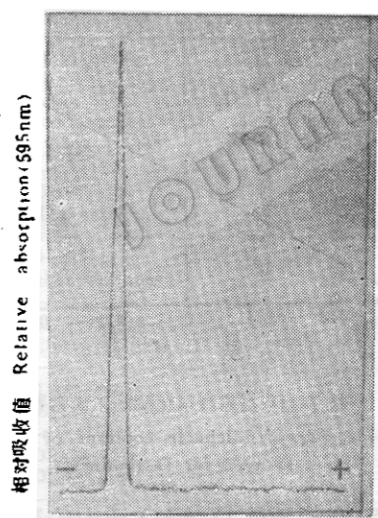


图 3 D-AAO 的聚丙烯酰胺凝胶电泳及扫描图谱

Fig. 3 Scanning of polyacrylamide gel of D-AAO

2. 分子量、亚基和亚基分子量: D-AAO 的分子量以聚丙烯酰胺梯度浓度凝胶电泳测出。D-AAO 样品在电泳凝胶上呈现一条带。以分子量的对数对各标准蛋

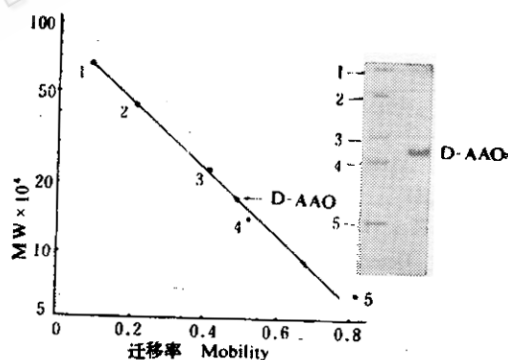


图 4 D-氨基酸氧化酶的分子量

Fig. 4 Determination of molecular weight of D-AAO by polyacrylamide gradient gel electrophoresis

1. 甲状腺球蛋白 Thyroglobulin (669,000)
2. 铁蛋白 Ferritin (440,000)
3. 过氧化氢酶 Catalase (232,000)
4. 乳酸脱氢酶 Lactate dehydrogenase (140,000)
5. 血清蛋白 Albumin (67,000)

白的迁移率作图, 从标准曲线上查出 D-

AAO 的分子量为 170,000 道尔顿(图 4)。

D-AAO 样品与标准蛋白进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, D-AAO 亚基在电泳图谱上为一条带。以蛋白分子量的对数对各标准蛋白的迁移率作图, 从标准曲线上查出 D-AAO 亚基分子量为 42,000 道尔顿(图 5)。

由 D-AAO 的分子量和亚基分子量可以推算出 D-AAO 由四个相同的亚基组成。

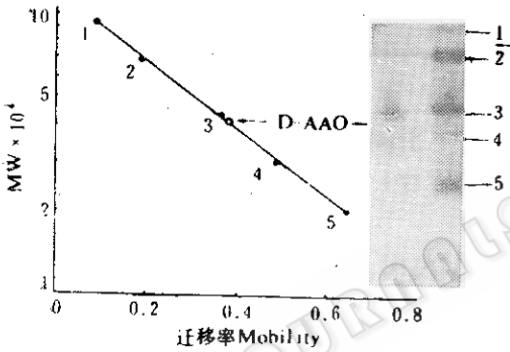


图 5 D-氨基酸氧化酶的亚基分子量

Fig. 5 Determination of molecular weight of D-AAO subunit by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

1. 磷酸化酶 b Phosphorylase b (94,000)
2. 血清蛋白 Albumin (67,000)
3. 卵白蛋白 Ovalbumin (43,000)
4. 碳酸酐酶 Carbonic anhydrase (30,000)
5. 胰蛋白酶抑制因子 Trypsin inhibitor (20,100)

3. D-AAO 的最适 pH: 以 D-丙氨酸为底物, 在不同 pH 下测酶活, 结果见图 6。从图中可以看出 D-AAO 的最适 pH 为 8.3。与从哺乳动物内脏中纯化的 D-AAO 测得的结果一致<sup>[1]</sup>。

4. D-AAO 的米氏常数: 以 D-丙氨酸为底物, 按 Lineweaver-Burk 作图法, 求

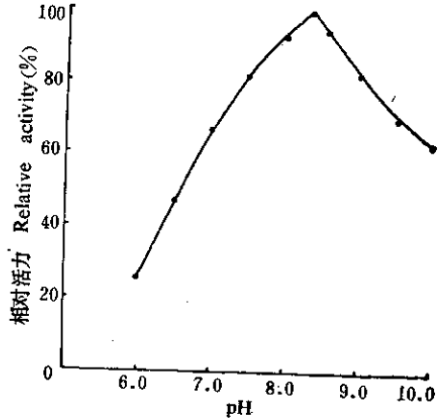


图 6 D-氨基酸氧化酶的最适 pH

Fig. 6 Effect of pH on the activity of purified D-AAO

得 D-AAO 的米氏常数  $K_m$  值为 3.3 mM (图 7)。从动物内脏中纯化的 D-AAO, 在以 D-丙氨酸为底物时,  $K_m$  值为 2.3 mM<sup>[16]</sup>。

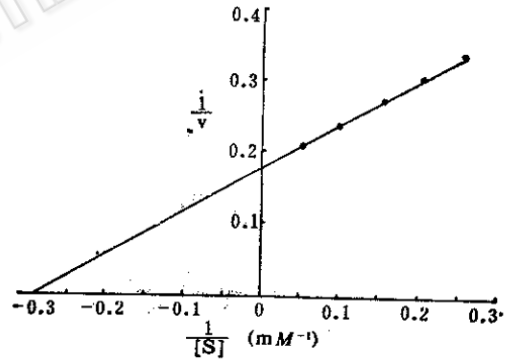


图 7 D-氨基酸氧化酶的米氏常数

Fig. 7 Michaelis constant of D-AAO for D-alanine

5. 抑制剂对 D-AAO 活力的影响: 在反应系统中加入一定浓度的抑制剂, 然后测酶活, 结果见表 3。苯甲酸是 D-AAO 的底物竞争性抑制剂<sup>[17]</sup>, 对氯汞苯甲酸是巯基试剂, 同时还可能竞争性抑制 FAD 和酶蛋白的结合<sup>[18]</sup>。迭氮化钠对 D-AAO 无抑制作用。

6. 底物专一性: 反应系统中, 各底物

表 3 抑制剂对 D-氨基酸氧化酶活力的影响

Table 3 Effect of various inhibitors on D-AAO activity

抑 制 剂 Inhibitor	浓 度 (mM) Concentration	相对活力(%) Relative activity
苯 甲 酸 Benzoic acid	10	48
$\alpha$ -酮丁酸 $\alpha$ -ketobutyric acid	10	76
迭氮化钠 Sodium azide	10	100
对氯汞苯甲酸 p-chloromercuribenzoic acid	0.4	0
对照(无抑制剂) Control (without inhibitor)		100

表 4 三角酵母 D-氨基酸氧化酶对各种氨基酸的相对活力

Table 4 Relative activity of D-AAO of *T. variabilis* towards various amino acids

底 物 Substrate	相对活力(%) Relative activity	底 物 Substrate	相对活力(%) Relative activity
D-丙氨酸 D-alanine	100	DL-苏氨酸 DL-threonine	10
DL-甲硫氨酸 DL-methionine	140	D-丝氨酸 D-serine	28
D-甲硫氨酸 D-methionine	130	DL-丝氨酸 DL-serine	32
D-缬氨酸 D-valine	110	D-色氨酸 D-tryptophan	40
DL-缬氨酸 DL-valine	88	DL-色氨酸 DL-tryptophan	38
D-苯丙氨酸 D-phenylalanine	70	D-精氨酸 D-arginine	40
DL-苯丙氨酸 DL-phenylalanine	64	DL-赖氨酸 DL-lysine	8
D-亮氨酸 D-leucine	76	头孢菌素 C Cephalosporin C	60
DL-亮氨酸 DL-leucine	66	甘氨酸 Glycine	0
D-苏氨酸 D-threonine	24		

的浓度为 150mM, 分别测酶活力, 结果见表 4。D-AAO 具有较宽的底物专一性, 能以多种 D 或 DL 型氨基酸为底物。

## 讨 论

### 1. 三角酵母 D-AAO 经过五步纯化,

酶的比活由 0.7U/mg 蛋白, 提高到 29.9U/mg 蛋白, 纯化 42.7 倍。在五步纯化中, 以 Sephadex G-200 柱层析效果最好。硫酸铵分部沉淀是纯化蛋白简单而有效的方法, 可以除去大量杂蛋白。聚乙二醇是一种温和的蛋白沉淀剂, 其原理还不太清楚<sup>[19]</sup>。

我们在纯化过程中,发现酶蛋白的沉淀与聚乙二醇的浓度有关,因此与硫酸铵分部沉淀一样,也可以用聚乙二醇的不同浓度分部沉淀酶蛋白,我们用此方法纯化 D-AAO,收到了较好的结果。

2. Massey 等<sup>[2]</sup>从猪肾脏中提纯的 D-AAO,用超离心测其分子量为 182,000 道尔顿,亚基分子量 45,700 道尔顿,亚基四个。我们的结果与 Massey 等的结果很相近。另外,三角酵母 D-AAO 的最适 pH,米氏常数,底物专一性以及抑制剂的影响等性质,与猪肾脏 D-AAO 也基本一致。

3. D-AAO 的辅酶是 FAD,猪肾脏 D-AAO 与 FAD 以非共价键连结,这种连结是可逆的<sup>[20]</sup>,多种方法可以使二者分离。Massey 等<sup>[21]</sup>将纯化的酶样品在高浓度的溴化钾溶液中透析,得到了 Apo-酶。Yagi 等<sup>[22]</sup>将酶样品分别经过 TEAE-纤维素、DEAE-纤维素、ECTEOLA-纤维素的柱层析,都可以使 FAD 脱离。我们用以上方法,试图得到 Apo-酶,但都没有得到预期结果。这表明三角酵母 D-AAO 与 FAD 的连结比较紧密,与猪肾脏 D-AAO 不完全一样。

### 参 考 文 献

[1] Krebs, H. A.: The Enzymes, (Sumner, J. B. and K. Myrback, eds) Vol. II, part I: 499—545, 1951.

[2] Massey, V. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 48: 1—9, 1961.  
[3] Yagi, K. et al.: *J. Biochem.*, 61: 680—597, 1967.  
[4] Massey, V. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 50: 17—22, 1961.  
[5] Swenson, R. P. et al.: *J. Biol. Chem.*, 257: 8817—8834, 1982.  
[6] Ronchi, S. et al.: *J. Biol. Chem.*, 257: 8824—8834, 1982.  
[7] Mazzero, P. and A. Romeo: *J. Chem. Soc., Perkin I*, 20: 2532—2533, 1972.  
[8] Gilbert, D. A. et al.: British Patent. 1272769, 1968.  
[9] 任克勤, 焦瑞身: 生物工程学报, 1: 51—58, 1985.  
[10] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265—275, 1951.  
[11] Davis, B. J. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404—408, 1964.  
[12] Shapiro, H. L. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 28: 815—820, 1967.  
[13] Redbord, D. et al.: *Anal. Biochem.*, 40: 135, 1971.  
[14] 李成文等: 生物化学与生物物理进展, 6: 71—72, 1983.  
[15] Malmstadt, H. V. and T. P. Hadjiioannou: *Anal. Chem.*, 35: 14—16, 1963.  
[16] Parkin, K. and H. O. Hultin: *Biotechnol. Bioeng.*, 21: 939—953, 1979.  
[17] Frisell, W. R. and L. Hellerman: *J. Biol. Chem.*, 225: 53, 1957.  
[18] Yagi, K. and T. Ozawa: *Biochem. Biophys. Acta*, 42: 381, 1960.  
[19] Robert, K. S.: Protein Purification, New York, p. 59, 1982.  
[20] Tu, S. C. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 159: 889, 1973.  
[21] Massey, V. and B. Curti: *J. Biol. Chem.*, 241: 3417, 1966.  
[22] Yagi, K. et al.: *J. Biochem.*, 61: 580—597, 1966.

## PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF D-AMINO ACID OXIDASE FROM *TRIGONOPSIS VARIABILIS*

Ren Keqin Pen Huilin Chiao Juishen

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academic Sinica, Shanghai)

1. Production of D-amino acid oxidase by molds and yeasts was examined. Of 17 strains of molds and 26 strains of yeasts tested, *Trigonopsis variabilis* was found to be the most suitable for D-amino acid oxidase production.

2. The D-amino acid oxidase of *Trigonopsis variabilis* was isolated and purified by ammonium sulphate, polyethylene glycol 6000 fractionation and chromatography on Sephadex G-200 and hydroxylapatite. The purified enzyme was found to be homogeneous as judged by polyacrylamide gel electrophoresis. It has an approximate molecular weight of 170,000 as estimated by gradient electrophoresis. On

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, the enzyme gave a single band with a molecular weight of 42,000. Based on these results it is concluded that D-amino acid oxidase of *T. variabilis* consists of four identical subunits.

3. The optimum pH for the enzyme activity was 8.3 and the Michaelis constant ( $K_m$ ) for D-alanine was 3.3 mM. The enzyme has a broad substrate specificity and shows relatively high activities towards most of D- or DL-amino acids.

### Key words

D-amino acid oxidase; *Trigonopsis variabilis*; Purification