

Morganella morganii J-8 羰基不对称还原酶的分离纯化及性质研究 Purification and Characterization of Carbonyl Enantioselective Reductase from *Morganella morganii* J-8

张鹏华¹ 张 梁¹ 卢 燕¹ 石贵阳^{1,2*}

ZHANG Peng-Hua¹ ZHANG Liang¹ LU Yan¹ and SHI Gui-Yang^{1,2*}

1 江南大学生物工程学院生物资源研究室 无锡 214036

2 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036

1 Laboratory of Biomass Resources, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education and School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

摘 要 由本实验室筛选得到的摩尔摩根氏菌 J-8 菌株可将底物 1-苯基-2-甲氨基丙酮专一性地转化为 *d*-伪麻黄碱。以 *M. morganii* J-8 为出发菌株,菌体超声破碎后,经硫酸铵沉淀、Phenyl Superose 疏水柱层析、DEAD 阴离子柱层析和非变性凝胶电泳四步纯化获得电泳纯羰基不对称还原酶。亚基分子质量为 42.5 kD,高效液相色谱分析酶的分子质量约为 84.1 kD,初步认为该酶为二聚体蛋白。对所得到的部分纯化酶的酶学性质做了初步研究,纯酶进行基质辅助激光解析电离-飞行质谱分析,对比结果显示为与亮氨酸脱氢酶蛋白有很高相似性。

关键词 *d*-伪麻黄碱,羰基不对称还原酶,分离纯化,特性

中图分类号 Q 814.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0268-05

Abstract The purification and the characteristics of an enzyme from *Morganella morganii* J-8, which could produce *d*-pseudoephedrine from 1-phenyl-2-methylamine-acetone, were performed in this study. In this research, first, cells were disrupted by ultrasonic treatment at 4°C. The carbonyl enantioselective reductase was purified with a combination of ammonium precipitation, Phenyl Superose hydrophobic chromatography, DEAE anion exchange, and native polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular mass of the purified enzyme subunit was estimated to be 42.5kD on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE). The native molecular mass of the enzyme that was analyzed by high-performance liquid chromatography was found out to be 84.1kD, which indicated that the enzyme was a dimer. The purified enzyme was analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, and the result showed that the purified enzyme had high homology with leucine dehydrogenase.

Key words *d*-pseudoephedrine, enantioselective reductase, purification, properties

麻黄碱(Ephedrine),化学名为 1-苯基-2-甲氨基丙醇,是一种从麻黄中分离而得到的芳香族氨基醇衍生物,其立体异构体 1-麻黄碱和 *d*-伪麻黄碱,由于具有

较大的药理作用,广泛应用于临床医疗中^[1,2]。

目前,麻黄碱主要来源于植物直接提取和化学合成,但直接提取法由于原料来源和高生产成本问

Received: September 25, 2006; Accepted: October 25, 2006.

This work was supported by the grants from the Natural Science Foundation, Jiangsu Province(No. BK2005013) and Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education(No. 20040295002).

* Corresponding author. Tel: + 86-510-85864675; E-mail: gyshi@sytu.edu.cn

江苏省自然科学基金(No. BK2005013)和高等学校博士学科点专项科研基金(No. 20040295002)资助。http://journals.im.ac.cn

题,化学合成法则因为异构体分离困难和环境污染而限制了其发展^[3]。生物技术是目前解决麻黄碱大规模生产的理想途径之一,主要包括植物细胞组织培养、生物转化和基因工程微生物发酵。其中生物转化法因反应条件温和、速度快、转化率高、产品光学纯度高优点而具有巨大发展潜力^[4,5]。

前期利用一株 *M. morganii* J-8 细菌全细胞生物转化 1-苯基-2-甲氨基丙酮(MAK)为 *d*-伪麻黄碱的过程中^[6],发现 *d*-伪麻黄碱作为一种手性羟基化合物,其生物转化为一种羧基还原酶所调控。然而,国内外对微生物 *M. morganii* 的研究很少,其基因组序列、产物组分、纯培养条件等信息几乎为空白,未见其产羧基还原酶的报道。本文研究了源于 *M. morganii* J-8 菌株羧基不对称还原酶分离纯化条件,并在此基础上研究了该酶的部分酶学性质。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌株 *M. morganii* J-8 为本研究室筛选并保藏。伪麻黄碱化学对照品为赤峰艾克制药科技有限公司产品,底物 1-苯基-2-甲氨基丙酮(MAK)为本研究室化学合成。ÄKTÄ explorer 100 层析系统为 Amersham Pharmacia Biotech 产品,丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、考马斯亮蓝 R-250 购自 Fluka 公司,牛血清白蛋白 BSA 为中国医药集团产品,电泳所用试剂及标准相对分子质量蛋白质为 BBI 原装产品,其它试剂为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 *M. morganii* J-8 菌体的收集: *M. morganii* J-8 细胞经 200 L 发酵罐培养 36 h,细胞经 8000r/min、4℃离心分离后,用 0.9%生理盐水洗涤 2 次,冷冻干燥得干菌体,冷藏备用。

1.2.2 粗酶液制备:冷冻保藏的菌体以冰水浴解冻,以 1/3(g/mL)的比例,用冰预冷的 20mmol/L (pH7.5)磷酸缓冲液(下同)稀释解冻后菌体成菌悬液,超声波破碎 10min(工作 1s,间歇 3s),保持菌液始终处于低温(0~4℃)。破碎后经 18000r/min 4℃下离心 30min,得上清液为粗酶液。

1.2.3 蛋白质测定方法:蛋白质的浓度由 Bradford^[7]检测法确定,以牛血清白蛋白为标准蛋白,于 595nm 处测定吸收度值,做工作曲线,得蛋白质浓度与吸光度之间的关系,样品蛋白质浓度对照标准曲线获得。

1.2.4 酶活测定方法:采用高效液相色谱法, HPLC

检测条件见文献 [8]。

酶反应体系: 50 μ mol MAK, 1 μ mol NADH, 300 μ mol 葡萄糖, 15u 的葡萄糖脱氢酶(用于辅酶 NADH 再生)和适量酶液共 1mL, 30℃转化 10h, 10000r/min 离心 10min, 取上清用 HPLC 检测。一个酶单位相当于在规定条件(温度 30℃)下每小时还原 1mg MAK 所需酶量。

1.2.5 酶的分离纯化:粗酶液进行 (NH₄)₂SO₄ 分级沉淀, 将 70%~100% 饱和度的沉淀溶于少量缓冲液 A (2mmol/L 磷酸盐缓冲液 + 1mol/L 硫酸铵, pH7.5) 中, 经透析和浓缩后上 Phenyl Superose 疏水柱层析, 先以 A 液平衡, 再以不同比例的洗脱缓冲液 B (2mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.5) 洗脱, 流速 4mL/min 将活性部分收集, 透析后超滤浓缩。超滤浓缩后上 DEAE Sepharose 阴离子交换柱, 先用 A 液平衡, 再用洗脱液 B (2mmol/L 磷酸缓冲液 + 1 mol/L NaCl, pH7.5) 按 20%~40% 的比例洗脱 2 个柱体积, 流速 2mL/min, 收集活性部分, 透析后冻干浓缩贮存, 检测酶纯度, 用于酶学性质研究。

1.2.6 非变性电泳分离:非变性电泳参考蛋白质手册^[7], 目的酶切胶分离参考文献 [9, 10]。

1.2.7 酶蛋白分子量的确定:采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法和液相方法两种方法测定该羧基还原酶分子量, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法参考文献 [7] 进行, HPLC 方法通过作 T_R-lgM 标准曲线, 从标准曲线上求得酶分子质量。

1.2.8 纯酶的质谱分析:酶的纯化方法及全酶质谱分析见文献 [11]。

2 结果与讨论

2.1 酶的纯化

细胞破碎后, 细胞中大量不同种类的蛋白质、各种酶蛋白、核酸等杂质也混杂在酶粗提液中, 是分离纯化的干扰成分。粗酶经硫酸铵沉淀、Phenyl Superose 疏水柱层析、DEAE 阴离子柱层析和非变性凝胶电泳四步纯化, 酶活提高 24 倍, 电泳得到单一条带。各步纯化的结果如表 1 所示。

2.2 酶的纯度检测

样品经 DEAE 层析分离后, SDS-PAGE 仍然有 4 条带, 经 DEAE 层析后的酶量较小, 无法满足进一步的层析分离, 且多次的柱层析对酶活的影响很大。基于此, 采用非变性凝胶电泳分离这四条带, 分别对它们进行检测, 得到单一条带有酶活, 为纯化酶。结果见图 1。

表 1 *M. morganii* J-8 中羰基不对称还原酶的纯化Table 1 Purification of carbonyl enantioselective reductase from *M. morganii* J-8

Step	Total protein/mg	Total activity/u	Specific activity(u/mg protein)	Yield/%
Crude enzyme extract	1248	9485	7.6	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ saturation fraction	359	7683	21.4	81.0
Phenyl Superose	23	1638	71.2	17.3
DEAE	7.5	641	85.4	6.8
PAGE electrophoresis	0.1	18.32	183.2	0.77

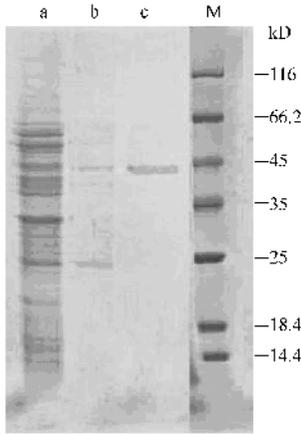


图 1 PAGE 电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoretic pattern

a: crude enzyme; b: active fraction after DEAE ion-exchange; c: purified enzyme.

2.3 酶的相对分子量

纯化后的样品经 SDS-PAGE 检测纯度为单条带,达到电泳纯(图 1)。分子量标准以对数值作图,计算该酶亚基分子质量为 42.5kD。采用高效液相色谱法进一步确定该酶的分子量,液相方法来测定。以标准蛋白的分子量和保留时间作图,得到的标准曲线为: $y = -0.2043x + 6.2711$ 。纯酶在同样条件下进样后的保留时间为 6.589 min,由标准曲线求得其分子质量为 84.1kD。初步认为该酶为二聚体蛋白。

2.4 酶的生化性质

以 DEAE Sepharose 阴离子交换柱层析后的酶为研究对象。

2.4.1 辅酶依赖性: 分别以 NADH 和 NADPH 为辅酶考察该酶对辅酶的依赖性,结果如表 2 所示。该酶以 NADH 为辅酶酶活力较高,而以 NADPH 为辅酶时,酶活仅为前者的 37.6%,表明该酶对辅酶没有专一的依赖性。

表 2 辅酶对酶反应的影响

Table 2 Effect of coenzyme on the enzyme activity

Coenzyme	Specific activity(u/mg)
Blank	0
NADH	85.4
NADPH	32.1

2.4.2 酶促反应最适 pH、温度: 不同 pH 值(4~8)下酶活性的变化如图 2 所示,实验过程中以最高酶活力为 100%,图 2 表明,该羰基还原酶在催化反应中的 pH 为 6.5 时维持最大的催化效率, pH 在 6.0~7.0 之间可以保持 80% 的酶活力。在最适 pH 条件下,酶反应体系温度(20~60℃)对酶活性的影响如图 3 所示。图 3 表明,该酶的最适反应温度在 37℃。在 30~40℃ 范围内该酶维持较高的活性。继续增加反应体系的温度,酶活力呈逐渐下降趋势。通常,来源于微生物的催化羰基不对称还原反应的脱氢酶的最适温度基本维持在 36~40℃ 范围内,也即微生物的最适生长温度。催化反应的最适 pH 一般在 6.0~7.0 之间,会因微生物来源不同稍有差异^[9]。

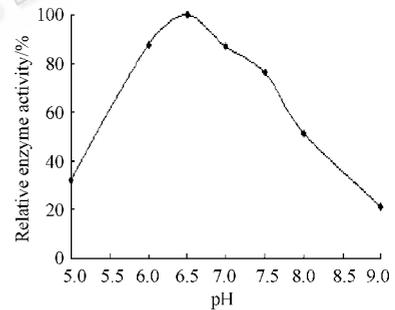


图 2 酶促反应的最适 pH

Fig. 2 Effect of pH on the enzyme activity

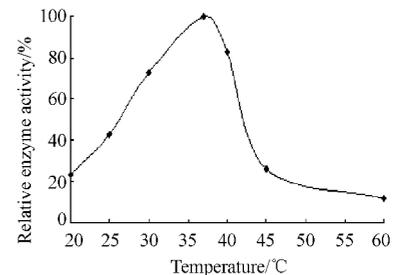


图 3 酶促反应的最适温度

Fig. 3 Effect of temperature on the enzyme activity

2.4.3 不同 pH 条件下酶稳定性与热稳定性的研究 纯化酶在不同 pH 值的 100mmol/L 磷酸钠缓冲液中 4℃ 处理 30min,然后测定该酶保持的活性,未调整 pH 前储存酶活力比较,以未储存的酶活力为 100% 结果如图 4 所示。在 pH6~8 的缓冲液中都比较为稳定,可以保存原有酶活力的 80% 以上。但是

当 pH 大于 8 或小于 6 时 酶活力下降显著。

在不同温度下保温一定时间后测定酶活力 ,与最适条件下酶活力(100%)比较 ,如图 5 所示 ,在 35℃ 以下 酶活力相对比较稳定 ,能保持 70% 以上 ,40℃ 以上酶活损失较大。

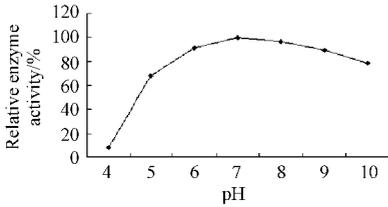


图 4 酶在不同 pH 值下的稳定性

Fig.4 Stability of enzyme activity in different pH

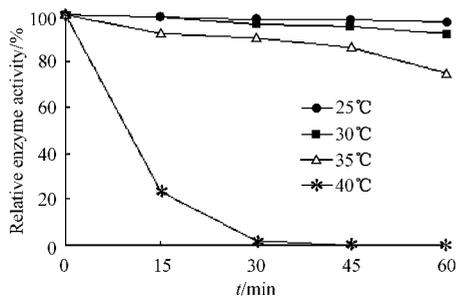


图 5 酶的热稳定性

Fig.5 Stability of enzyme activity in different temperatures

2.4.4 金属离子对酶活性的影响:金属离子及 EDTA 对酶活的影响如表 3 所示。添加金属螯合剂 EDTA 导致酶活性下降 ,表明该酶需要某些金属离子作为激活剂才能有较高的催化活力。添加 0.1mmol/L 的金属离子 , Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ag^+ 、 Hg^{2+} 等对酶活都有一定的影响。其中 ,添加 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 等离子能提高酶活 ,重金属离子 ,如 Ag^+ 、 Hg^{2+} 则导致酶完全失活。

2.5 纯酶的质谱分析

软电离技术 ESI(电喷雾电离)和 MALDI(基质

辅助激光解析附电离)是利用生物质谱技术快速、准确鉴定蛋白质组分的核心技术 ,是了解基因功能的最重要途径之一^[12]。在本研究中 ,利用 MADLI-TOF-MS 获得该羧基不对称还原酶的全酶肽指纹图谱 ,如图 6 利用 MASCOT 通过 Protein Prospector 蛋白数据库对目的蛋白进行鉴定 ,通过 MOWSE 评分方法 ,未能得到 100% 的匹配识别 ,这一结果表明 ,本研究所获得的纯酶为一种新型蛋白。

表 3 金属离子对酶活的影响

Table 3 Effects of various metal ions on enzyme activity

Metallic ion	Relative activity/%
Blank	100
Mn^{2+}	168.5
Mg^{2+}	154.8
Al^{3+}	103.6
Zn^{2+}	104.2
Ca^{2+}	94.3
EDTA(5mmol/L)	56.2
EDTA(10mmol/L)	56.8
Cu^{2+}	0
Ag^+	0
Hg^{2+}	0

通过 MOWSE 评分方法获得最主要的一个匹配为一芽孢杆菌中的亮氨酸脱氢酶 ,而 *M. morganii* J-8 菌株与芽孢杆菌属有较大同源性 ,且羧基不对称还原酶与亮氨酸脱氢酶都为氧化还原酶系 ,此匹配蛋白与目的酶有一定的同源性。该研究为分子生物学方法研究这种未知羧基还原酶提供了思路。

3 结论

本文首次报道了从 *M. morganii* 中分离获得一种羧基还原酶 ,该羧基还原酶能够在 NADPH/NADH 共同参与下 ,催化底物 1-苯基-2-氨基丙酮生成 *d*-伪麻黄碱。研究通过硫酸铵盐析沉淀疏水层析、离子交换层析和非变性电泳分离 ,得到电泳纯羧基不

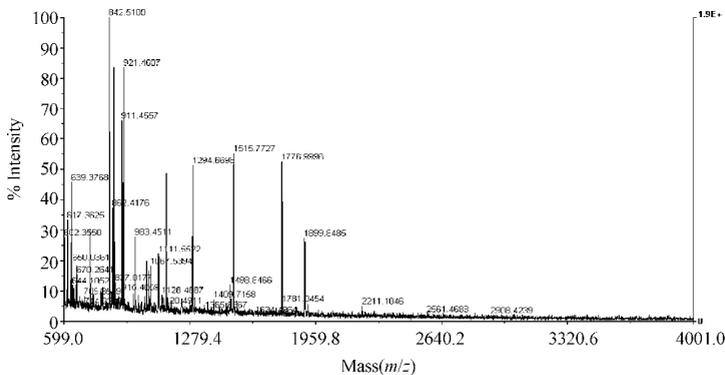


图 6 肽指纹图谱

Fig.6 Peptide mass fingerprint

