

# 细菌 3-脱氧葡萄糖松还原酶产生菌及产酶条件

梁智群 栗桂娇 梁静娟 李湘萍 杨胜远

(广西大学工业测试实验中心 南宁 530004)

**摘 要** 从12株细菌菌株中筛选到一株产3-脱氧葡萄糖松还原酶的高产菌 *Bacillus* sp.2, 并研究了该菌株的产酶条件。在所试验的细菌中, 3-脱氧葡萄糖松氧化酶活性较低甚至检测不出, 而还原酶活性普遍较高。该菌株最佳产酶条件为: 培养基组成(%): 牛肉膏 0.3, 牛肉蛋白胨 1.0, 氯化钠 0.5, 0.5m mol/L 3-脱氧葡萄糖松。培养基起始 pH6.6, 30℃ 振荡培养 48h, 产酶量最高, 酶活力可达 36.4u/g。3-脱氧葡萄糖松对产酶有诱导作用, 而甲基乙二醛对产酶有抑制作用。

**关键词** 细菌, 3-脱氧葡萄糖松, 还原酶, 美拉德反应

**分类号** Q93-936

美拉德反应是食品在贮藏加工过程中发生的主要化学反应之一, 能导致蛋白质的重合、不可溶性、不可吸收和褐变, 使食品的营养价值下降, 品质劣化, 造成蛋白质资源很大损失<sup>[1,2]</sup>。生物体内也存在美拉德反应, 该反应与人体老化、成人病如动脉硬化、糖尿病、白内障等有密切的关系<sup>[3,4]</sup>。3-脱氧葡萄糖松(3-deoxyglucosone)是美拉德反应重要的中间产物<sup>[5]</sup>, 其存在于生物体内, 反应性很强, 对生物体表现毒性。经研究表明, 通过对3-脱氧葡萄糖松的氧化或还原作用, 可使其反应性下降而阻止美拉德反应的进行<sup>[5]</sup>。因此, 通过对3-脱氧葡萄糖松的制御来对美拉德反应进行有效的调控, 无论是蛋白质资源的利用和食品品质的保持, 还是对人体老化及成人病的治疗都是非常有意义的。

目前国外已有学者报道从动植物体内分离到代谢3-脱氧葡萄糖松的酶<sup>[5-7]</sup>, 作者从猪肝、西洋芹等动植物中分离出数种3-脱氧葡萄糖松的代谢酶<sup>[8,9]</sup>。有关微生物3-脱氧葡萄糖松代谢酶的研究未见国内外其他学者报道。本课题组开展了微生物3-脱氧葡萄糖松代谢酶的研究, 发现3-脱氧葡萄糖松代谢酶在微生物中比较普遍存在, 真菌中以氧化酶为主<sup>[10]</sup>, 细菌中以还原酶为主。本文报道了以3-脱氧葡萄糖松为底物, 从细菌中筛选对该底物有氧化或还原酶活性的菌

株, 筛选到一株对该底物有强还原活性的菌株, 并对该菌株的产酶条件进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 已知细菌菌株 8 株, 其中芽孢杆菌 5 株, 棒杆菌 1 株, 节杆菌 1 株, 大肠杆菌 1 株, 以及本课题组从土壤筛选并初步鉴定的 4 株芽孢杆菌。

**1.1.2 培养基:** 筛选培养基(%): 牛肉膏 0.3, 牛肉蛋白胨 1.0, 氯化钠 0.5, pH7.0; 产酶培养基(%): 牛肉膏 0.3, 牛肉蛋白胨 1.0, 氯化钠 0.5, 0.5m mol/L 3-脱氧葡萄糖松, pH6.6。

**1.1.3 主要试剂:** NAD 为上海浦江应用生物化学研究所产品, NADP 和 NADH 为上海丽珠东风生物技术有限公司产品, NADPH 为 Sigma 公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 底物制备:** 3-脱氧葡萄糖松按日本加藤等人的方法制备<sup>[5]</sup>。3-脱氧葡萄糖松溶液浓度的定量分析参考文献[8]进行。

**1.2.2 粗酶液的制备:** 将培养液离心(6000 ×

国家自然科学基金(批号29466012)和广西科学基金资助项目

1997-12-08收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

g, 10min), 沉淀用生理盐水洗涤两次, 收集菌体, 称菌重, 以每 ml 培养液中含菌体毫克数表示生物量。按湿菌体 5 倍量加入预冷的 10m mol / L 磷酸钠缓冲液 (含 10m mol / L 巯基乙醇, pH7.0), 混匀, 置于  $-68^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱内过夜, 取出解冻, 用超声波破碎细胞 (功率 40W, 工作时间 1min / 次, 共 5 次, 间歇时间 1min / 次)。然后在  $4^{\circ}\text{C}$  下离心 ( $29200 \times g$ , 15min), 取上清液, 则得粗酶液。

**1.2.3 酶活力测定<sup>[9]</sup>:** 在光径为 0.5cm 的 2ml 比色皿中加入 0.9ml 酶反应混合液, 其包含 pH7.0 的 100m mol / L 磷酸钠缓冲液, 0.30m mol / L NADH 或 NADPH (0.50m mol / L NAD 或 NADP) 和 10m mol / L 的 3-脱氧葡萄糖松。然后加入 0.1ml 粗酶液, 迅速混匀, 室温下测定 340nm 下的吸光值。每隔 1min 记录一次, 每个样测 5min。酶活力定义: 在上述条件下, 每分钟增加或减少  $1\mu\text{mol}$  NADH (或 NADPH) 所需的酶量定义为 1 个酶活力单位 (u)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 3-脱氧葡萄糖松代谢酶产生菌的筛选

12 株细菌菌株用筛选培养基在  $30^{\circ}\text{C}$  培养 48h, 然后制成粗酶液, 以 3-脱氧葡萄糖松作为底物, 测定它们对 3-脱氧葡萄糖松的氧化还原活性。结果表明, 细菌中普遍存在有 3-脱氧葡萄糖松的代谢酶。在被测的菌株中, 3-脱氧葡萄糖松的氧化酶活性较低或检测不出, 酶活力在  $0.5\text{u} / \text{g}$  以下。地衣形芽孢杆菌 AS1.807 的 3-脱氧葡萄糖松氧化酶活性略高于还原酶活性, 其余菌株的还原酶活性普遍较高, 大多数在  $1.0\text{u} / \text{g}$  以上, 且高于氧化酶活性。菌株 *Bacillus* sp.2 以 NADPH 为辅酶的还原酶活性最高, 达到  $17.9\text{u} / \text{g}$ 。

### 2.2 菌株 *Bacillus* sp.2 产酶条件的研究

*Bacillus* sp.2 菌株的粗酶液在 NADPH 辅酶下测得的还原酶活性最高, 因此我们选择 *Bacillus* sp.2 作为实验菌株, 进一步研究了碳源、氮源、培养温度、培养基起始 pH 值、培养时间和底物及底物类似物对产酶的影响。

**2.2.1 碳源对产酶的影响:** 在筛选培养基中加

入 0.3% 的各种碳源, 试验葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乙醇和丙三醇等对产酶和生物量的影响, 以不添加碳源作对照。结果表明, 糖类虽然利于菌体的生长, 但不利于产 3-脱氧葡萄糖松还原酶, 酶活为  $8.0\text{u} / \text{g}$  左右。醇类的添加对生物量和产酶都没有显著的促进作用, 酶活与对照接近, 为  $20.0\text{u} / \text{g}$  左右。由此可见, 该酶的生成并不需要丰富的碳源, 在基本培养基中牛肉膏等天然材料所含有的一些碳水化合物已足以满足该酶的生成。过多的碳源反而对产酶不利。

**2.2.2 氮源对产酶的影响:** 在成分为牛肉膏 0.3%, 氯化钠 0.5%, pH7.0 的培养基中加入 1.0% 各种氮源, 试验牛肉蛋白胨、鱼肉蛋白胨、酵母膏和各种铵盐对产酶和生物量的影响。结果表明, 牛肉蛋白胨对 *Bacillus* sp.2 产生 3-脱氧葡萄糖松还原酶最有利, 酶活为  $18.5\text{u} / \text{g}$ , 生物量也最高。其它有机氮源虽也有较高的生物量, 但不利于产酶, 酶活在  $5.0\text{u} / \text{g}$  以下。无机氮源不利于酶的生成, 酶活在  $3.0\text{u} / \text{g}$  以下。

**2.2.3 培养温度对产酶的影响:** 分别在  $25^{\circ}\text{C}$ 、 $28^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}$ 、 $32^{\circ}\text{C}$ 、 $34^{\circ}\text{C}$  和  $35^{\circ}\text{C}$  培养 48h, 测定酶活力和生物量。结果见图 1。图 1 表明,  $25^{\circ}\text{C}$  至  $30^{\circ}\text{C}$  之间, 生物量和酶活力随温度升高而上升, 超过  $30^{\circ}\text{C}$ , 生物量趋于稳定, 酶活力明显下降。产酶最适培养温度为  $30^{\circ}\text{C}$ 。

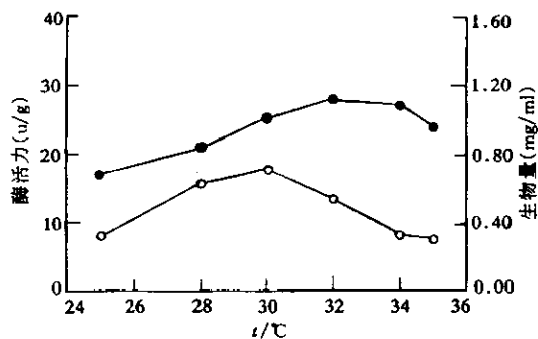


图1 培养温度对产酶的影响

○酶活力 ●生物量

**2.2.4 培养基初始 pH 值对产酶的影响:** 将培养基起始 pH 调至不同值,  $30^{\circ}\text{C}$  下摇床培养 48h, 测定酶活力和生物量。结果见图 2。图 2 表明, 该菌的生长有一个较宽的 pH 范围, 在 pH6.0~

8.0之间时,生物量稳定,酶活力则在起始 pH6.6 达到最高。

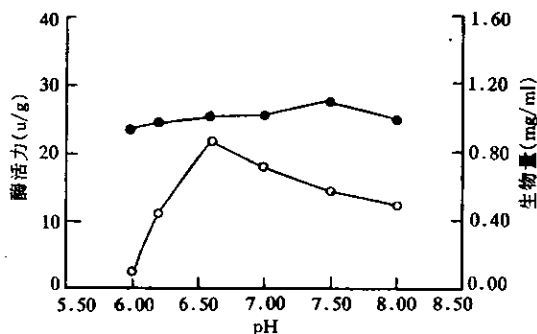


图2 初始pH值对产酶的影响

○酶活力 ●生物量

**2.2.5 培养时间对产酶的影响:** 将培养基起始 pH 调至 6.6, 30℃ 培养不同的时间, 结果见图 3。图 3 表明, 培养 36h 生物量达到最高, 但酶活力较低; 继续培养, 生物量下降, 酶活力上升, 且在培养 48~72h 之间酶活力稳定。最适培养时间为 48h。

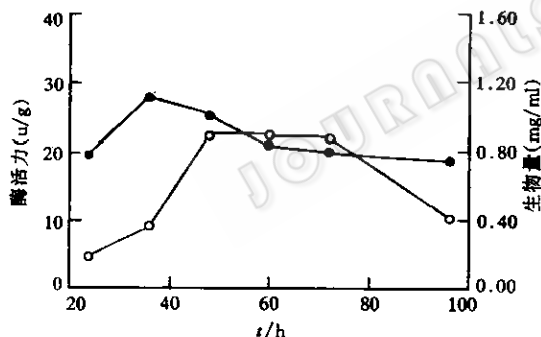


图3 培养时间对产酶的影响

○酶活力 ●生物量

**2.2.6 酶作用底物及底物类似物对产酶的影响:** 在培养基中分别添加 0.1、0.5、1.0、2.0m mol / L 的酶作用底物 3-脱氧葡萄糖松或底物类似物甲基乙二醛, 以不添加这些物质作空白, 试验对产酶的诱导作用。试验结果表明, 适量添加酶作用底物或底物类似物的量能促进生物量的提高, 但超过一定量, 反而对细胞生长不利。

由于 3-脱氧葡萄糖松和甲基乙二醛均为 2-羰基醛化合物, 有细胞毒害作用, 在添加低浓度时, 可能对细胞没有起毒害作用, 有利于细胞生长; 但浓度高时, 对细胞起了毒害作用, 引起细胞死亡, 生物量下降。当 3-脱氧葡萄糖松添加浓度为 0.5m mol / L 时, 酶活力达到最高, 可达 36.4u / g, 比空白高了将近一倍, 且生物量为空白值的 1.6 倍。此表明 3-脱氧葡萄糖松对产酶有诱导作用, 其最适添加量为 0.5m mol / L。甲基乙二醛的添加对产酶无诱导作用, 反而有抑制作用。

综上所述, 从细菌中筛选到的 *Bacillus* sp.2 产 3-脱氧葡萄糖松还原酶的佳产酶条件为: 培养基组成 (%): 牛肉膏 0.3, 牛肉蛋白胨 1.0, 氯化钠 0.5, 0.5m mol / L 3-脱氧葡萄糖松, 培养基起始 pH6.6, 30℃ 振荡培养 48h, 产酶量最高, 酶活力可达 36.4u / g。3-脱氧葡萄糖松对产酶有诱导作用, 而甲基乙二醛对产酶有抑制作用。

## 参 考 文 献

- [1] Smith G A, Friedman M. J Food Sci, 1984, 49: 817~820.
- [2] Monnier V M, cerami A. Clin. Endocrin Metabol, 1982, 11:431~452.
- [3] Cerami A J. Am Geriatr Soc, 1985, 33:626~634.
- [4] Monnier V M, kohn R R, cerami A. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81:583~587.
- [5] Kato H, Cho R K, Okitani A, Hayase F. Agric Biol Chem, 1987, 51:683~689.
- [6] Shin H S, Nishimura T, Hayase F, kato H. Agric Biol Chem, 1991, 55:957~966.
- [7] Kato H, Miyauchi Y, Nishimura T, Liang Z Q. Agric Biol Chem, 1988, 52:2641~2642.
- [8] Liang Z Q, Hayase F, Nishimura T, kato H. Agric Biol Chem, 1990, 54:319~328.
- [9] Liang Z Q, Hayase F, kato H. Eur J Biochem, 1991, 197:373~379.
- [10] 李湘萍, 莫柏立, 庞宗文等. 微生物学通报. 1998, 25(2): 71~74.

## STUDIES ON PRODUCTION CONDITIONS FOR NADPH-DEPENDENT 3-DEOXYGLUCOSONE REDUCTASE FROM *BACILLUS* SP.2

Liang Zhiquan Su Guijiao Liang Jingjuan Li Xiangping Yang Shengyuan

(The industrial experimental centre of Guangxi University, Nanning 530004)

**Abstract** *Bacillus* sp.2, a high-yielding strain for producing NADPH-dependent 3-deoxyglucosone reductase was screened from 12 bacterial strains which crude enzyme have low even little oxidation but rather high reduction for 3-deoxyglucosone. The condition for enzyme formation of the strain were examined. Composition of the suitable medium was as following(%): Beef extract 0.3, Beef peptone 1.0, NaCl 0.5, 0.5m mol / L 3-deoxyglucosone. The optimum temperature, initial pH and cultivate time for enzyme formation were 30℃, pH6.6 and 48h respectively. When the organism was cultured under the optimum condition, about 36.4u / g of enzyme activity was obtained. 3-deoxyglucosone have inductive effect for enzyme formation.

**Key words** Bacteria, 3-Deoxyglucosone, Reductase, Maillard Reaction

~~~~~