

栗酒裂殖酵母来源黄素单加氧酶的性质及催化合成 S-甲基-L-半胱氨酸亚砜的应用

连蒙卡, 宋兆霖, 高文静, 朱刚, 董孟君, 李玉, 刘逸寒, 王凤华*, 路福平*

天津科技大学 生物工程学院 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457

连蒙卡, 宋兆霖, 高文静, 朱刚, 董孟君, 李玉, 刘逸寒, 王凤华, 路福平. 栗酒裂殖酵母来源黄素单加氧酶的性质及催化合成 S-甲基-L-半胱氨酸亚砜的应用[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 474-485.

LIAN Mengka, SONG Zhaolin, GAO Wenjing, ZHU Gang, DONG Mengjun, LI Yu, LIU Yihan, WANG Fenghua, LU Fuping. A flavin-containing monooxygenase from *Schizosaccharomyces pombe*: characterization and application in the synthesis of S-methyl-L-cysteine sulfoxide[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 474-485.

摘要: S-甲基-L-半胱氨酸亚砜(S-methyl-L-cysteine sulfoxide, SMCO)是一种具有多种功能特性的非蛋白质含硫氨基酸。目前关于催化 S-甲基-L-半胱氨酸(S-methyl-L-cysteine, SMC)生物合成 SMCO 的酶鲜有报道。本研究将栗酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)来源的黄素单加氧酶基因(*spfmo*)通过大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)进行异源表达, 并对其酶学性质进行了分析。重组 SpFMO 的最适催化条件为 30 °C、pH 8.0, 该条件下比酶活为 72.77 U/g; 此外, 适当的 Mg²⁺可以提高 SpFMO 的酶活; 经酶动力学分析, 该酶对底物 SMC 的酶促反应动力学参数 K_m 值为 23.89 μmol/L, 催化效率 k_{cat}/K_m 为 61.71 L/(min·mmol)。在最适条件下, SpFMO 催化 SMC 在 9 h 内生成 SMCO 的产率为 12.31%。本研究为酶法合成 SMCO 提供了一定参考。

关键词: 黄素单加氧酶; 酶学性质; S-甲基-L-半胱氨酸; S-甲基-L-半胱氨酸亚砜; 金属离子

资助项目: 国家自然科学基金(32101902); 天津市自然科学基金(22JCQNJC00560); 天津市合成生物技术创新能力提升行动项目(TSBICIP-KJGG-009)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32101902), the Natural Science Foundation of Tianjin (22JCQNJC00560), and the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-KJGG-009).

*Corresponding authors. E-mail: LU Fuping, lfp@tust.edu.cn; WANG Fenghua, wangfh@tust.edu.cn

Received: 2024-04-15; Accepted: 2024-08-30; Published online: 2024-09-02

A flavin-containing monooxygenase from *Schizosaccharomyces pombe*: characterization and application in the synthesis of *S*-methyl-*L*-cysteine sulfoxide

LIAN Mengka, SONG Zhaolin, GAO Wenjing, ZHU Gang, DONG Mengjun, LI Yu, LIU Yihan, WANG Fenghua*, LU Fuping*

Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Bioengineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: *S*-methyl-*L*-cysteine sulfoxide (SMCO) is a non-protein sulfur-containing amino acid with a variety of functions. There are few reports on the enzymes catalyzing the biosynthesis of SMCO from *S*-methyl-*L*-cysteine (SMC). In this study, the flavin-containing monooxygenase gene derived from *Schizosaccharomyces pombe* (*spfmo*) was heterologously expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) and the enzymatic properties of the expressed protein were analyzed. The optimum catalytic conditions of the recombinant SpFMO were 30 °C and pH 8.0, under which the enzyme activity reached 72.77 U/g. An appropriate amount of Mg²⁺ improved the enzyme activity. The enzyme kinetic analysis showed that the K_m and k_{cat}/K_m of SpFMO on the substrate SMC were 23.89 μmol/L and 61.71 L/(min·mmol), respectively. Under the optimal reaction conditions, the yield of SMCO synthesized from SMC catalyzed by SpFMO was 12.31% within 9 h. This study provides reference for the enzymatic synthesis of SMCO.

Keywords: flavin-containing monooxygenase; enzymatic properties; *S*-methyl-*L*-cysteine; *S*-methyl-*L*-cysteine sulfoxide; metal ions

S-甲基-*L*-半胱氨酸亚砷(*S*-methyl-*L*-cysteine sulfoxide, SMCO)是一种非蛋白质含硫氨基酸,属于 *S*-烷基(烯)基-*L*-半胱氨酸亚砷类^[1],广泛存在于葱属(*Allium*)^[2-4]和十字花科(Cruciferae)蔬菜中^[5-6],具有清除自由基^[7]、降血糖^[8]、降血脂^[9]、抗癌^[10]、抗肥胖^[11]等作用,对心血管健康和免疫系统具有显著益处。

目前,关于 SMCO 的研究主要集中在功能特性^[12]、检测方法^[13]以及在各种蔬菜中的含量分析^[14],而关于 SMCO 生物合成的研究相对较少,Joshii 等^[15]通过同位素标记法分析了菜豆中 *S*-甲基-*L*-半胱氨酸(*S*-methyl-*L*-cysteine, SMC)的生物合成途径,结果表明该化合物以丝氨酸为前体,通过 *O*-乙酰丝氨酸和甲硫醇缩合合成,

其中的甲硫醇可能来源于蛋氨酸的分解。对于催化 SMC 生成 SMCO 的反应,有文献报道人和小鼠来源的苯丙氨酸-4-单加氧酶可以催化硫醚药物 *S*-羧甲基-*L*-半胱氨酸(*S*-carboxymethyl-*L*-cysteine, SCMC)、其脱羧产物 SMC 以及它们对应的 *N*-乙酰化形式产物的 *S*-氧化作用^[16-17],然而有关该酶对 SMC 的催化活性尚未见详细报道。黄素单加氧酶(flavin-containing monooxygenase, FMO)是一类具备催化合成植物 *S*-烷基(烯)基半胱氨酸亚砷的酶^[18],如 Yoshimoto 等^[19]最近从大蒜中鉴定了催化 *S*-烯丙基-*L*-半胱氨酸生成 *S*-烯丙基-*L*-半胱氨酸亚砷的大蒜黄素单加氧酶。然而目前催化 SMC 生成 SMCO 酶的研究相对较少,且现有酶的酶活和稳定性无法满足实际应

用的需求。挖掘具备催化 SMC 生成 SMCO 能力的新酶对于 SMCO 的生物合成至关重要。

本研究克隆了粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 来源的黄素单加氧酶(命名为 SpFMO)的基因, SpFMO 的晶体结构和作用机制已有报道^[20], 其与大蒜黄素单加氧酶的结构相似度较高, 但尚未见该酶在天然化合物生物合成中应用的报道, 因此, 本研究分析了 SpFMO 的酶学特性并利用 SpFMO 成功催化 SMC 生成 SMCO (图 1), 为 SMCO 的生物合成提供了依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

本研究所用的 pET-28a(+)质粒以及用于蛋白表达的菌株大肠杆菌 BL21(DE3)均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂与培养基

三(羟甲基)氨基甲烷(tromethamine, Tris)购自石家庄市鑫盛化工有限公司; 黄素腺嘌呤二

核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)购自麦克林生物有限公司; 还原型辅酶II (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)和二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)购自北京索莱宝科技有限公司; S-甲基-L-半胱氨酸(SMC)、S-甲基-L-半胱氨酸亚砷 (SMCO) 和邻苯二甲醛 (ortho-phthalaldehyde, OPA)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 蛋白抽提剂购自上海碧云天生物技术股份有限公司。其余常见试剂纯度均为分析纯。

Luria-Bertani (LB)液体培养基: 酵母粉 5 g/L, 胰蛋白胨 10 g/L, 氯化钠(sodium chloride, NaCl) 10 g/L; 固体培养基需要额外添加 15 g/L 的琼脂粉。

邻苯二甲醛衍生试剂: 54 mg 邻苯二甲醛溶于 1 mL 无水乙醇中, 加入 200 μ L β -巯基乙醇, 用 pH 9.5 的硼酸溶液定容至 10 mL。

1.1.3 仪器与设备

本研究所用仪器主要包括回旋式恒温调速摇床(杭州德为仪器科技有限公司)、恒温水浴锅(南京焯创科技有限公司)、恒温培养箱(上海航

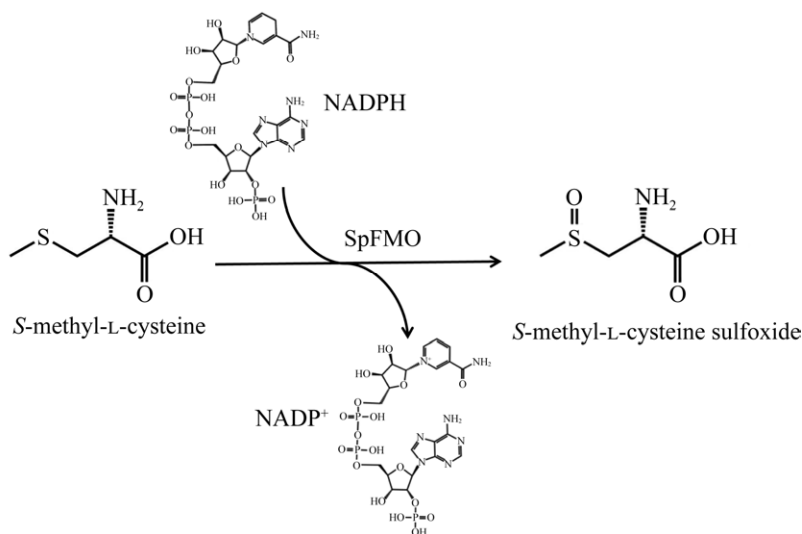


图 1 SpFMO 催化反应示意图

Figure 1 Schematic diagram of SpFMO catalyzed reaction.

佩仪器有限公司)、PCR 仪和多功能酶标仪(北京中兴百汇科技有限公司)、LB-263 凝胶成像仪(北京六一生物科技有限公司)、PHS-3C 型 pH 计(青岛明博环保科技有限公司)、高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建

栗酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)来源的黄素单加氧酶 SpFMO (NCBI 登录号: NP_595782.1)基因序列由苏州金唯智生物科技有限公司进行大肠杆菌密码子优化后合成,并克隆至 pET-28a(+)载体上,目的基因上下游分别引入 2 个限制性核酸内切酶酶切位点 *Bam*HI 和 *Xho* I,将获得的重组质粒命名为 pET-28a(+)-*spfmo*。

1.2.2 重组蛋白表达条件的优化

将重组质粒 pET-28a(+)-*spfmo* 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)菌株中,挑取单菌落接种于含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床中培养过夜;按照 2%的接种量转接至含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡那霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8 时进行诱导表达。为了探究 SpFMO 蛋白的最适表达条件,首先在 16 $^{\circ}\text{C}$ 下用不同浓度(0.05、0.10、0.50 和 1.00 mmol/L)的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)进行诱导以确定 IPTG 的最适浓度;然后在 16 $^{\circ}\text{C}$ (4、6、8、10、12、14、16、20 h)、30 $^{\circ}\text{C}$ (1、2、4、6、8、10 h)和 37 $^{\circ}\text{C}$ (1、2、4、6、8、10 h)下分别诱导表达不同时间以确定最佳诱导温度和时间。目的蛋白表达量通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳后用 Image J 软件计算目的蛋白条带灰度进行评价,具体步骤如下:取 5 mL 菌液,5 000 r/min 离心 10 min 后弃上清,用 120 μL

pH 8.0 的 Tris-HCl 重悬后加入 10 μL 蛋白抽提剂,室温裂解 30 min 后 5 000 r/min 离心 10 min 所得上清液即为粗酶液,取粗酶液进行 SDS-PAGE 电泳鉴定,并用 Image J 软件计算诱导后重组蛋白的含量。

1.2.3 重组蛋白的纯化

在最优表达条件下进行诱导表达得到大量菌液,随后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用适量 Lysis Buffer (50 mmol/L 磷酸钠缓冲液和 300 mmol/L NaCl, pH 7.8)重悬细胞,超声破碎菌体后的菌液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min,上清液与用 Lysis Buffer 平衡过的镍亲和层析树脂于 4 $^{\circ}\text{C}$ 结合 2 h,用 Wash Buffer (50 mmol/L 磷酸钠缓冲液, 300 mmol/L NaCl 和 10 mmol/L 咪唑, pH 7.8)去除杂蛋白, Elution Buffer (50 mmol/L 磷酸钠缓冲液, 300 mmol/L NaCl 和 200 mmol/L 咪唑, pH 7.8)洗脱目的蛋白,用 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.4)通过超滤离心管(30 kDa)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下进行置换浓缩以除去其中咪唑对蛋白的影响,浓缩后的酶液加入终浓度为 20%的甘油后于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存并进行后续实验。同时使用 SDS-PAGE 检测目的蛋白的分子量大小与纯度。

1.2.4 SpFMO 酶活及动力学测定

SpFMO 的酶活通过测定 30 $^{\circ}\text{C}$ 下 NADPH 的消耗量来完成,反应在 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中进行,反应体系为 100 μL ,包含 20 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0) 35 μL 、10 μL 10 mmol/L 的 SMC (终浓度为 1 mmol/L)、10 μL 20 mmol/L 的 DTT (终浓度为 2 mmol/L)、10 μL 1 mmol/L 的 FAD (终浓度为 0.1 mmol/L)、10 μL 1 mmol/L 的 NADPH (终浓度为 0.1 mmol/L) 和 25 μL 8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的酶液(终浓度为 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 即 0.10 g/L)。其中,反应各个组分的配置及酶液稀释过程均使用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液

(pH 8.0), 反应时间为 10 min。通过多功能酶标仪在 340 nm 下检测 NADPH 的变化来评价酶活^[21]。用缓冲液代替酶液作为空白对照, 每个试验重复 3 次。每 min 消耗 1 μmol NADPH 所需要的酶量定义为 1 个酶活单位(U)。酶活计算公式如下:

$$U = \frac{\Delta c \times V_1}{\Delta T} \quad (1)$$

式中, Δc (mmol/L)为反应前后 NADPH 的浓度变化量, V_1 (100 μL)为反应总体积, Δt (min)为反应时间。比酶活(U/g)代表单位质量所具有的酶活力单位数。

酶促反应动力学测定与上述酶活测定原理和方法类似, 反应温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, 反应缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 反应体系为 100 μL , 包含 8 $\mu\text{mol/L}$ SpFMO、1 mmol/L SMC、2 mmol/L DTT 和 0.1 mmol/L FAD, 反应测定不同 NADPH 浓度(0.02–0.20 mmol/L)下的反应初始速率, 通过软件 GraphPad Prism 8.0 中 Michaelis-Menten 方程对 SpFMO 的动力学参数进行拟合, 计算得到 V_{\max} 值与 K_m 值, 并根据公式 $V_{\max} = k_{\text{cat}}[E]$ 计算出 k_{cat} 值, 每个实验重复 3 次。

1.2.5 NADPH 标准曲线的测定

使用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)配置浓度分别为 0.02 mmol/L、0.04 mmol/L、0.06 mmol/L、0.10 mmol/L、0.14 mmol/L、0.16 mmol/L、0.18 mmol/L、0.20 mmol/L 的 NADPH 标准溶液; 通过酶标仪检测 340 nm 处的吸光值, Tris-HCl 缓冲液为空白对照, 每个实验重复 3 次; 以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标拟合标准曲线, 所得标准曲线为: $y = 1.719 5x - 0.002 8$, $R^2 = 0.999 1$ 。

1.2.6 最适 pH 及 pH 稳定性测定

测定 SpFMO 在浓度为 20 mmol/L 的不同 pH 反应缓冲液[Hepes (pH 6.5–7.0)、Tris-HCl

(pH 7.0–9.0)和甘氨酸-NaOH (pH 9.0–10.0)]中的酶活以确定最适 pH。以最适 pH 时的酶活为 100%, 计算其他 pH 反应条件下的相对酶活。

SpFMO 的 pH 稳定性通过在不同 pH 值(pH 7.5、8.0、8.5 和 9.0)的缓冲液中在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育不同时间(0、1、3、6、9、11 h)后的残余酶活来评价。将初始酶活设为 100%, 计算其他条件下的相对酶活并绘制 pH 值与相对酶活曲线。

1.2.7 最适温度及温度稳定性测定

SpFMO 的最适催化温度根据在不同反应温度(10、20、30、40、50 $^{\circ}\text{C}$)下反应 10 min 后的酶活确定, 每个实验重复 3 次。将其中最适温度下的酶活设为 100%, 计算其他温度反应条件下的相对酶活。

SpFMO 的温度稳定性通过在不同温度(20、30、40 $^{\circ}\text{C}$)的水浴锅中保温不同时间(20、40、80、100、120 min)后的残余酶活进行评价, 将初始酶活设为 100%, 计算其他条件下的相对酶活并绘制温度与相对酶活曲线。

1.2.8 金属离子对 SpFMO 活性的影响

参考 Liu 等^[22]的方法, 通过测定 SpFMO 在 5 mmol/L 不同金属离子(Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Mn^{2+})存在下的酶活, 分析金属离子对 SpFMO 的影响。不加金属离子时的酶活设为 100%, 计算各金属离子存在条件下的相对酶活。

1.2.9 SpFMO 催化 SMC 制备 SMCO

通过对酶蛋白浓度(40 和 90 $\mu\text{mol/L}$)、NADPH 浓度(0.05、0.10、0.20、0.40 mmol/L)和反应时间(3、6、9、10 h)进行优化, 最终 SpFMO 催化 SMC 生成 SMCO 的反应体系为 100 μL , 向反应体系中依次加入 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)、0.1 mmol/L 的 SMC、2 mmol/L 的 DTT、0.1 mmol/L 的 FAD、0.1 mmol/L 的 NADPH 和 90 $\mu\text{mol/L}$ SpFMO, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、

330 r/min 下反应 10 h。反应液通过超滤管(30 kDa)于 4 °C、5 000 r/min 离心去除酶蛋白, 取去除蛋白后的样品 100 μ L 与 500 μ L 邻苯二甲醛衍生试剂混匀后加 400 μ L pH 9.5 的硼酸盐缓冲液, 过 0.22 μ m 滤膜后通过高效液相色谱-荧光检测法(high performance liquid chromatography-fluorescence detection, HPLC-FLD)检测 SMCO 的生成。

高效液相色谱-荧光检测(HPLC-FLD)条件^[23]: 色谱柱: Venusil AA (4.6 mm \times 250 mm \times 5 μ m, Angela technologies), 流动相 A: 含 6%乙腈的乙酸钠溶液(85 mmol/L, pH 4.5), 流动相 B: 60%的乙腈水溶液, 流速: 1.0 mL/min, 进样量: 10 μ L, 激发波长: 340 nm, 发射波长: 455 nm, 柱温: 30 °C, 洗脱梯度如表 1 所示。

SMCO 标准曲线的制作: 用超纯水配制浓度分别为 0.004、0.006、0.008、0.010、0.015、0.020、0.025、0.040、0.060 mmol/L 的 SMCO 标准液, 参照上述方法进行分析, 以峰面积为纵坐标, SMCO 的浓度为横坐标绘制标准曲线, 所得标准曲线为: $y=6\ 157.485\ 2x-5.161\ 1$, $R^2=0.998\ 2$ 。SMCO 的产率定义为实际生成 SMCO 的量除以理论生成 SMCO 的量。

液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)检测使用的色谱柱为 ZORBAX-18 柱(4.6 mm \times 250 mm \times 5 μ m), 流速为 0.4 mL/min, 进样量为 1 μ L, 柱温为 25 °C, 以甲醇为流动相, 对产物进行分析鉴定。

表 1 HPLC-FLD 洗脱梯度

Table 1 Elution gradient of HPLC-FLD

Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0.0	75	25
8.0	30	70
8.1	75	25
13.0	75	25

2 结果与分析

2.1 SpFMO 的异源表达条件优化与鉴定

通过蛋白质参数在线分析工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)得到 SpFMO 蛋白分子的理论分子量为 50.71 kDa。为了探究 SpFMO 蛋白表达的最适条件, 对 IPTG 浓度以及诱导温度和时间进行了优化。由图 2A 可知, 在 IPTG 摩尔浓度为 0.50 mmol/L 时, 表达量达到最高, 经过 Image J 软件测定得到的灰度值为 28 949.5, 继续增加 IPTG 浓度, 表达量不再提高; 由图 2B-2D 可知, 在 16 °C 下进行诱导表达时, 18 h 后产物蛋白表达量最高, 灰度值为 29 651.2, 在 30 °C 下, 4 h 后产物蛋白表达量最高, 灰度值为 41 902.2, 在 37 °C 下, 4 h 后产物蛋白表达量最高, 灰度值为 35 109.3。综上所述, 加入 0.50 mmol/L IPTG, 在 30 °C 下诱导表达 4 h, 为 SpFMO 重组蛋白表达的最适表达条件。

2.2 重组蛋白的纯化

表达纯化后的蛋白通过 SDS-PAGE 电泳进行验证(图 3), SpFMO 蛋白分子的理论分子量为 50.71 kDa, 由图 3 可见, 在约 50 kDa 处有明显条带, 与理论分子量大小一致。

2.3 SpFMO 的酶学性质分析

2.3.1 重组 SpFMO 的最适 pH 及 pH 稳定性分析

为了确定 SpFMO 催化的最适反应条件, 首先确定了其最适 pH 值为 8.0, 此时比酶活最高(图 4A), 当 pH 在 6.5-8.0 之间时, SpFMO 的酶活随 pH 升高逐渐提高, 且当 pH 在 6.5-7.0 之间时, 酶活仅为最适 pH 下酶活的 40%-60%; 当 pH 更高时, 酶活迅速下降至 30%左右, 说明该酶受 pH 影响较大。

为进一步探索 pH 对 SpFMO 酶活的影响, 分析了其 pH 稳定性。SpFMO 在 pH 为 8.0 时稳

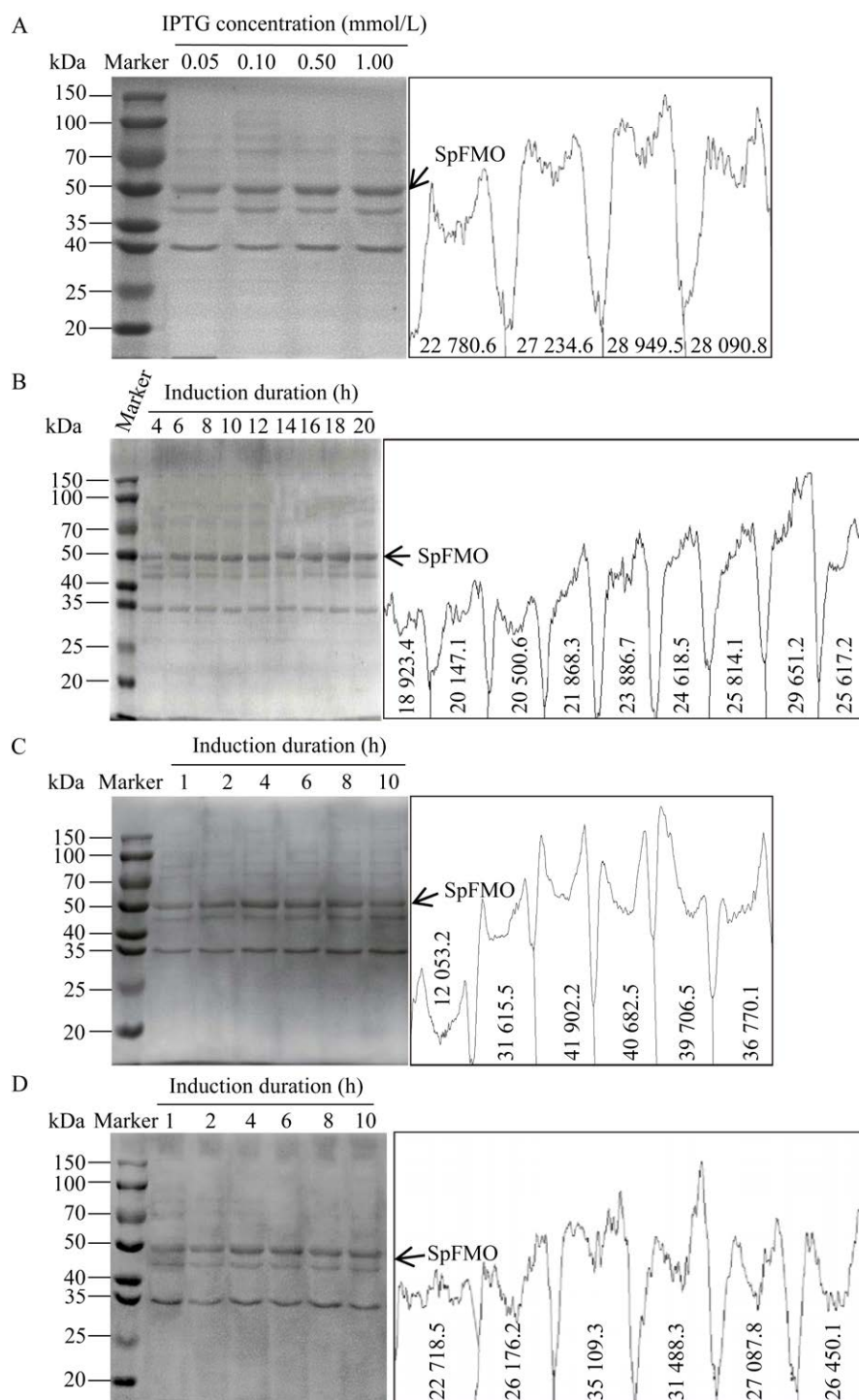


图 2 蛋白表达条件优化电泳图和蛋白表达量的灰度值计算 A: IPTG 浓度优化; B: 16 °C 诱导优化; C: 30 °C 诱导优化; D: 37 °C 诱导优化。

Figure 2 SDS-PAGE analysis of optimized protein expression conditions and grey values of the recombinant protein expression. Optimization of IPTG concentration (A) and induction duration at 16 °C (B), 30 °C (C) and 37 °C (D).

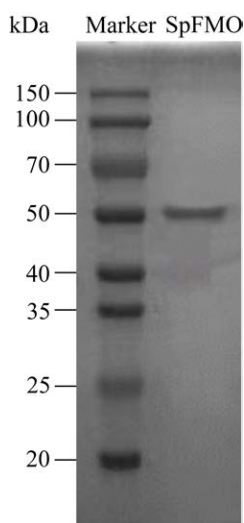


图3 黄素单加氧酶 SpFMO 的 SDS-PAGE 分析
Figure 3 SDS-PAGE analysis of the flavin-containing monooxygenase SpFMO.

定性最好, 孵育 6 h 后其相对酶活在 90% 以上, 随着孵育时间延长至 11 h, 其相对酶活仍保持在 85% 以上(图 4B)。此外, 在弱碱性条件下(pH 7.5–9.0)处理 11 h 后 SpFMO 仍保持 75% 以上的相对酶活, 说明该酶具有较好的 pH 稳定性。

2.3.2 重组 SpFMO 最适温度及温度稳定性分析

在最适 pH 条件下进一步探索了 SpFMO 的

最适温度(图 5A), 在温度为 10–50 °C 范围内, 随着温度的升高, SpFMO 的酶活呈先升高后下降的趋势, 40 °C 时酶活最高(79.54 U/g), 温度为 30 °C 和 40 °C 时, 相对酶活变化不大, 但当温度为 10 °C 或 50 °C 时, 酶活迅速下降至最适温度下酶活的 60% 以下, 这表明 SpFMO 的酶活受温度影响较大。

SpFMO 在不同温度下的稳定性结果如图 5B 所示, SpFMO 在 20 °C 和 30 °C 下孵育 120 min 仍保持 75% 以上的相对酶活, 其中 20 °C 时 SpFMO 的稳定性表现最好, 孵育 120 min 后, 其相对酶活仍在 90% 以上; 而当温度升高到 40 °C 时, 稳定性迅速下降, 40 °C 仅孵育 20 min 后, 相对酶活便下降至 60% 以下; 综合 SpFMO 的最适温度和温度稳定性的结果, 30 °C 时 SpFMO 的酶活(72.77 U/g)和稳定性(78.16%)较好。因此, 后续实验在 30 °C 下进行。

2.3.3 不同金属离子对 SpFMO 的影响分析

金属离子可以通过与酶结合从而改变酶的构象或破坏催化活性中心的结构来影响酶的活性^[24]。而在酶实际应用时, 反应液中通常会含有各种金属离子, 因此, 分析了几种常见的金属离子对 SpFMO 酶活性的影响。结果如图 6

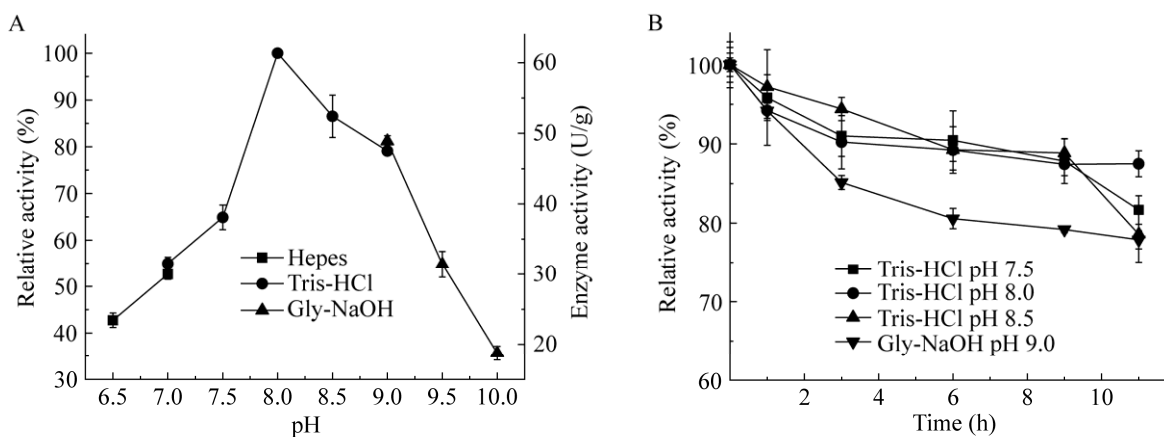


图4 pH 对 SpFMO 酶活的影响 A: 最适 pH; B: pH 稳定性。

Figure 4 Effect of pH on activity of SpFMO. The optimal pH (A) and pH stability (B) of SpFMO.

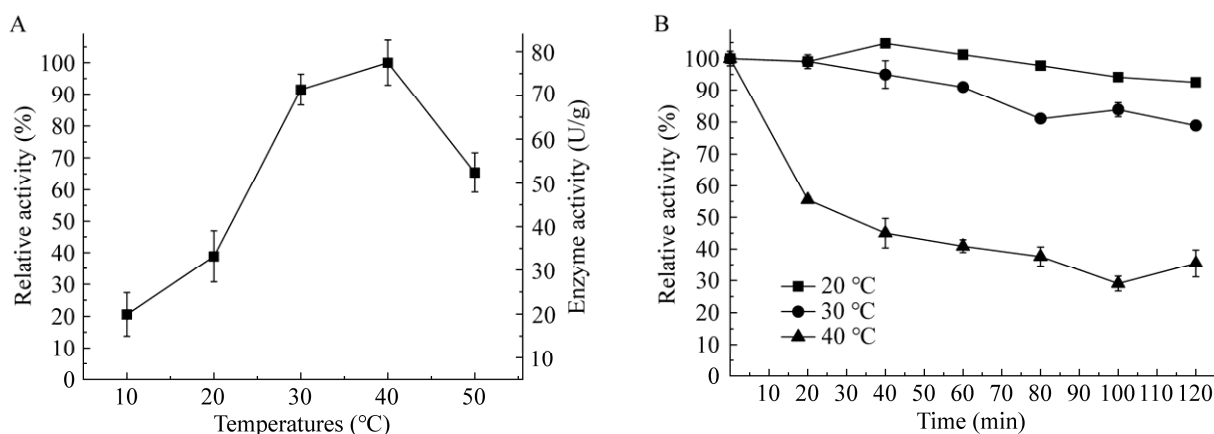


图5 温度对 SpFMO 酶活的影响 A: 最适温度; B: 温度稳定性。

Figure 5 Effect of temperature on activity of SpFMO. The optimal temperature (A) and thermostability (B) of SpFMO.

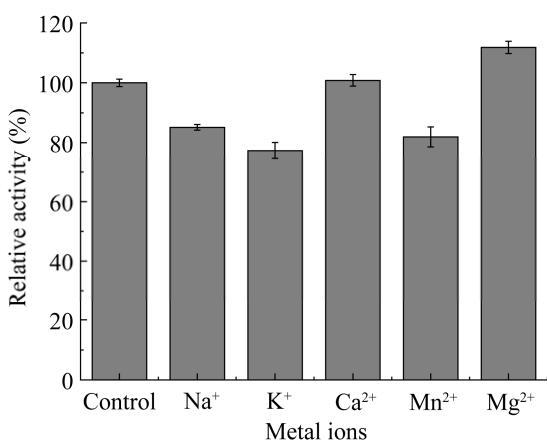


图6 金属离子对 SpFMO 酶活的影响

Figure 6 Effect of metal ions on activity of SpFMO.

所示,发现 Mg^{2+} 对 SpFMO 的活性有促进作用,添加 Mg^{2+} 后相对活性提高至 111.81%;添加 Ca^{2+} 对 SpFMO 的活性无显著性影响;而添加 K^+ 、 Na^+ 和 Mn^{2+} 对 SpFMO 有一定的抑制作用,其中 K^+ 导致酶的相对活性下降至 77.36%。此外,添加 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 后产生沉淀,导致酶失活。因此后续可以考虑在催化体系中加入 Mg^{2+} 以提高 SMCO 的产量。

2.4 酶促反应动力学

以 SMC 为底物,测定不同 NADPH 浓度

(0.02–0.20 mmol/L) 下的反应速率,并对 SpFMO 的动力学参数进行拟合。结果如表 2 所示,在无 Mg^{2+} 的条件下,该酶 K_m 值为 23.89 $\mu\text{mol/L}$,而在有 Mg^{2+} 的条件下,该酶 K_m 值下降至 15.37 $\mu\text{mol/L}$,表明加入 Mg^{2+} 后使得酶对底物的亲和力增强;此外,SpFMO 的 k_{cat} 值 $[(1.47 \pm 0.01) \text{ min}^{-1}]$ 在 Mg^{2+} 存在时 $[(1.58 \pm 0.02) \text{ min}^{-1}]$ 也略有提高;因此,添加 Mg^{2+} 使得催化效率 k_{cat}/K_m 由 $(61.71 \pm 2.74) \text{ L}/(\text{min} \cdot \text{mmol})$ 提升至 $(103.01 \pm 4.92) \text{ L}/(\text{min} \cdot \text{mmol})$,提高了 1.67 倍。

2.5 SpFMO 催化合成 SMCO 的反应体系优化及产率测定

在测定了 SpFMO 的酶学性质后,尝试将 SpFMO 初步应用于酶法催化合成 SMCO。为确定反应的最适酶蛋白浓度和 NADPH 浓度,在反应体系中加入不同浓度的 SpFMO (40、90 $\mu\text{mol/L}$)

表2 SpFMO 的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of SpFMO

Names	k_{cat} (min^{-1})	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	k_{cat}/K_m ($\text{L}/(\text{min} \cdot \text{mmol})$)
SpFMO	1.47 ± 0.01	23.89 ± 1.13	61.71 ± 2.74
SpFMO (Mg^{2+})	1.58 ± 0.02	15.37 ± 0.52	103.01 ± 4.92

和 NADPH (0.05、0.10、0.20、0.40 mmol/L) 反应 6 h, 检测 SMCO 的产率, 结果如表 3 所示, 在酶蛋白浓度不同的情况下, SMCO 的产率均随着 NADPH 浓度的升高呈现先上升后下降的趋势, 其中在酶蛋白浓度为 90 $\mu\text{mol/L}$, NADPH 浓度为 0.10 mmol/L 的条件下, 反应产生的 SMCO 含量最高, 产率为 4.02%。

随后在酶蛋白浓度为 90 $\mu\text{mol/L}$, NADPH 浓度为 0.10 mmol/L 的条件下, 分别在 3、6、9、10 h 取样, 对 SMCO 进行产率测定, 结果如表 4 所示, SMCO 产率随时间的增加而上升, 当转化时间达到 9 h 后产率不再增加, 最高达到 12.31%, HPLC-FLD 检测结果如图 7 所示。为进一步确定反应最终产物为 SMCO, 对催化产物进行了 LC-MS 分析, 结果如图 8 所示。SMCO 分子量为 151.18, 使用阳离子质谱检测催化产物的分子量为 152.037 4, 与标准品一致, 证明了目标产物 SMCO 的生成。

3 讨论与结论

本研究成功将 *spfmo* 基因在 *E. coli* BL21(DE3) 中进行异源表达, 经酶学性质分析发现该酶在

30 $^{\circ}\text{C}$, pH 8.0 的条件下催化效率和稳定性最好, 比酶活为 72.77 U/g。此外, Mg^{2+} 的添加对 SpFMO 酶活具有促进作用, 动力学参数分析发现, 添加 Mg^{2+} 显著提高了 SpFMO 的底物亲和力和底物转

表 3 SpFMO 的反应体系优化

Enzyme concentration ($\mu\text{mol/L}$)	NADPH concentration (mmol/L)	Yield of SMCO (%)
40	0.05	0.94
	0.10	1.87
	0.20	1.64
	0.40	0.56
90	0.05	1.33
	0.10	4.02
	0.20	2.49
	0.40	2.22

表 4 SpFMO (90 $\mu\text{mol/L}$) 的反应时间优化

Reaction time (h)	Yield of SMCO (%)
3	1.33
6	4.02
9	12.31
10	11.92

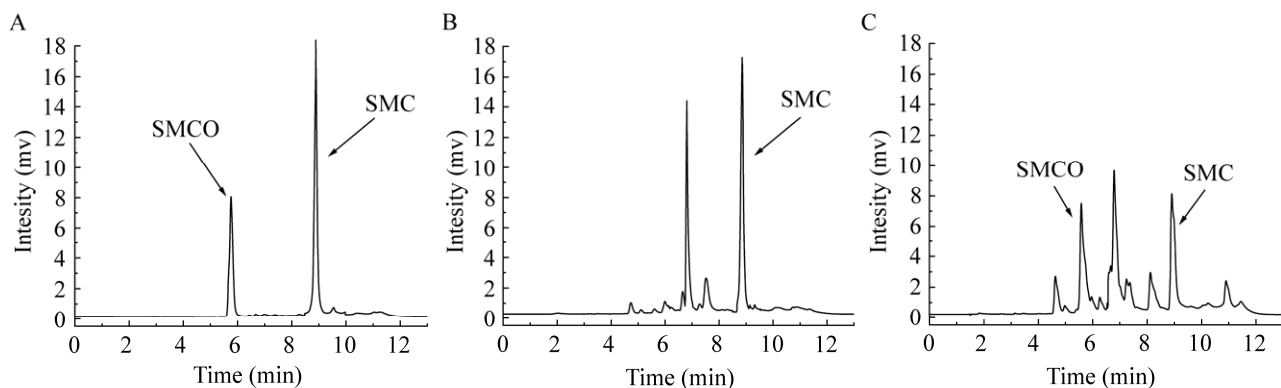


图 7 SpFMO 催化生成 SMCO 的 HPLC-FLD 分析 A: SMC、SMCO 标准品液相图; B: 空白对照 (无 SpFMO 反应) 液相图; C: SpFMO 反应液相图。

Figure 7 HPLC-FLD analysis of SpFMO catalyzes production of SMCO. The HPLC profile of mixed standard sample of SMC and SMCO (A), blank control (B) and SMCO catalyzed by SpFMO (C).

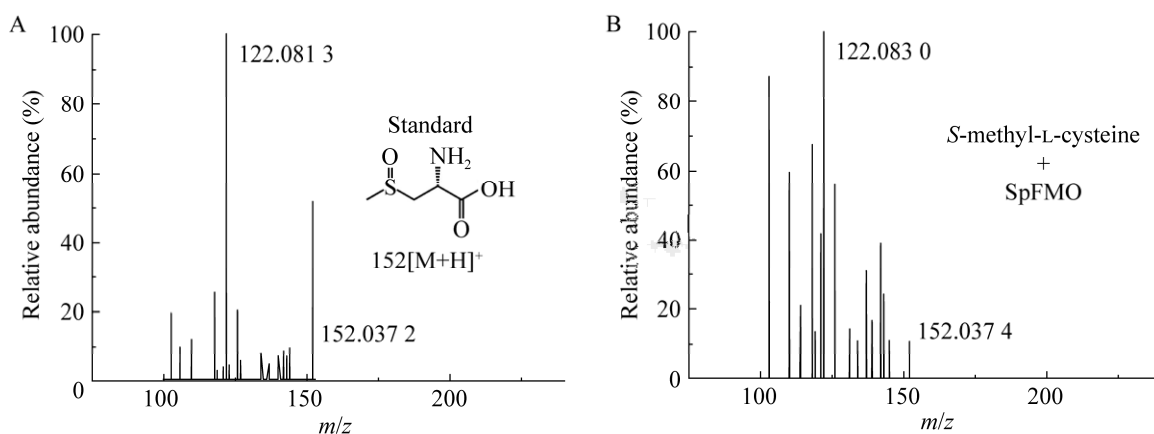


图 8 产物 SMCO 的 LC-MS 分析 A: SMCO 标准品液质图; B: SpFMO 反应液质图。

Figure 8 Analysis of the products with LC-MS. The LC-MS profile of standard sample of SMCO (A) and SMCO catalyzed by SpFMO (B).

化速率, 从而使得催化效率提高了 1.67 倍。在优化后的反应条件下, SpFMO 在 9 h 内催化 SMC 生成 SMCO 的产率为 12.31%。然而, SpFMO 催化底物 SMC 合成 SMCO 的产率仍然相对较低, 可能是由于 SMC 是 SpFMO 的非天然底物, SMC 在酶中的结合模式处于不利构象, 从而影响酶与底物之间的相互作用, 使得 SpFMO 对于 SMC 表现出催化活力低、适配性差等问题, 因此后续可通过理性或半理性设计对 SpFMO 进行进一步改造, 优化底物在酶口袋中的结合构象, 强化酶与底物的适配性。且在实验中发现, 随着反应时间的延长, SMCO 产率略有降低, 可能因为 SMCO 分子结构中的亚砷基团在氧气等存在的条件下表现出不稳定性^[25], 后续检验其稳定性及影响其稳定性的因素对于 SMCO 产率具有重要作用。该研究为酶法合成 SMCO 提供了依据, 但该酶的催化效率及产率还有待提高, 后续可通过理性或半理性设计对该酶进行进一步改造, 以期达到更高的 SMCO 产率。

REFERENCES

- [1] FRIEDRICH K, WERMTER NS, ANDERNACH L, WITZEL K, HANSCHEN FS. Formation of volatile sulfur compounds and *S*-methyl-L-cysteine sulfoxide in *Brassica oleracea* vegetables[J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132544.
- [2] KEUSGEN M, SCHULZ H, GLODEK J, KREST I, KRÜGER H, HERCHERT N, KELLER J. Characterization of some *Allium* hybrids by aroma precursors, aroma profiles, and alliinase activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(10): 2884-2890.
- [3] KREST I, GLODEK J, KEUSGEN M. Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some *Allium* species[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(8): 3753-3760.
- [4] MONTAÑO A, BEATO VM, MANSILLA F, ORGAZ F. Effect of genetic characteristics and environmental factors on organosulfur compounds in garlic (*Allium sativum* L.) grown in Andalusia, Spain[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(4): 1301-1307.
- [5] COODE-BATE J, SIVAPALAN T, MELCHINI A, SAHA S, NEEDS PW, DAINY JR, MAICHA JB, BEASY G, TRAKA MH, MILLS RD, BALL RY, MITHEN RF. Accumulation of dietary *S*-methyl cysteine sulfoxide in human prostate tissue[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2019, 63(20): e1900461.
- [6] SHAFAEI A, HILL CR, HODGSON JM, BLEKKENHORST LC, BOYCE MC. Simultaneous extraction and quantitative analysis of *S*-methyl-L-cysteine sulfoxide, sulforaphane and glucosinolates in cruciferous vegetables by liquid chromatography mass spectrometry[J]. Food Chemistry: X, 2024, 21: 101065.
- [7] NI L, GUAN XL, CHEN FF, WU PF. *S*-methyl-L-cysteine protects against antimycin A-induced mitochondrial dysfunction in neural cells via mimicking endogenous methionine-centered redox cycle[J]. Current Medical Science, 2020, 40(3): 422-433.
- [8] LEMOS LIC, MEDEIROS MA, LIMA JPMS, TEIXEIRA TO, FIGUEIREDO CA, FARIAS NBS,

- SILVA FS, ABREU BJ, MEDEIROS KCP, PEDROSA LFC. *S*-methyl cysteine sulfoxide mitigates histopathological damage, alleviate oxidative stress and promotes immunomodulation in diabetic rats[J]. *Journal of Complementary & Integrative Medicine*, 2021, 18(4): 719-725.
- [9] KUMARI K, AUGUSTI KT. Lipid lowering effect of *S*-methyl cysteine sulfoxide from *Allium cepa* Linn in high cholesterol diet fed rats[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 109(3): 367-371.
- [10] ASEMANI Y, ZAMANI N, BAYAT M, AMIRGHOFAN Z. *Allium* vegetables for possible future of cancer treatment[J]. *Phytotherapy Research*, 2019, 33(12): 3019-3039.
- [11] YOSHINARI O, SHIOJIMA Y, IGARASHI K. Anti-obesity effects of onion extract in Zucker diabetic fatty rats[J]. *Nutrients*, 2012, 4(10): 1518-1526.
- [12] EDMANDS WMB, GOODERHAM NJ, HOLMES E, MITCHELL SC. *S*-methyl-*L*-cysteine sulphoxide: the *Cinderella* phytochemical?[J]. *Toxicology Research*, 2013, 2(1): 11-22.
- [13] SIVAPALAN T, MELCHINI A, COODE-BATE J, NEEDS PW, MITHEN RF, SAHA S. An LC-MS/MS method to measure *S*-methyl-*L*-cysteine and *S*-methyl-*L*-cysteine sulfoxide in human specimens using isotope labelled internal standards[J]. *Molecules*, 2019, 24(13): 2427.
- [14] ANDERNACH L, WITZEL K, HANSCHEN FS. Effect of long-term storage on glucosinolate and *S*-methyl-*L*-cysteine sulfoxide hydrolysis in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*)[J]. *Food Chemistry*, 2024, 430: 136969.
- [15] JOSHI J, RENAUD JB, SUMARAH MW, MARSOLAIS F. Deciphering *S*-methylcysteine biosynthesis in common bean by isotopic tracking with mass spectrometry[J]. *The Plant Journal*, 2019, 100(1): 176-186.
- [16] STEVENTON GB, MITCHELL SC. Phenylalanine 4-monooxygenase and the role of endobiotic metabolism enzymes in xenobiotic biotransformation[J]. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2009, 5(10): 1213-1221.
- [17] STEVENTON GB, MITCHELL SC. Mouse recombinant phenylalanine monooxygenase and the *S*-oxygenation of thioether substrates[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2009, 23(2): 119-124.
- [18] YOSHIMOTO N, SAITO K. *S*-alk(en)ylcysteine sulfoxides in the genus *Allium*: proposed biosynthesis, chemical conversion, and bioactivities[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(16): 4123-4137.
- [19] YOSHIMOTO N, ONUMA M, MIZUNO S, SUGINO Y, NAKABAYASHI R, IMAI S, TSUNEYOSHI T, SUMI SI, SAITO K. Identification of a flavin-containing *S*-oxygenating monooxygenase involved in alliin biosynthesis in garlic[J]. *The Plant Journal*, 2015, 83(6): 941-951.
- [20] ESWARAMOORTHY S, BONANNO JB, BURLEY SK, SWAMINATHAN S. Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(26): 9832-9837.
- [21] VEERAVALLI S, PHILLIPS IR, FREIRE RT, VARSHAVI D, EVERETT JR, SHEPHARD EA. Flavin-containing monooxygenase 1 catalyzes the production of taurine from hypotaurine[J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2020, 48(5): 378-385.
- [22] LIU YH, HUANG L, ZHENG D, XU ZH, LI YZ, SHAO SL, ZHANG YF, GE XQ, LU FP. Biochemical characterization of a novel GH43 family β -xylosidase from *Bacillus pumilus*[J]. *Food Chemistry*, 2019, 295: 653-661.
- [23] SOTO-OTERO R, MÉNDEZ-ALVAREZ E, GALÁN-VALIENTE J, AGUILAR-VEIGA E, SIERRA-MARCUÑO G. Quantitative analysis of neuroactive amino acids in brain tissue by liquid chromatography using fluorescent pre-column labelling with *o*-phthalaldehyde and *N*-acetyl-*L*-cysteine[J]. *Biomedical Chromatography*, 1994, 8(3): 114-118.
- [24] DEANE DT, COPE TA, SCHULZ AM, BENNETT ET, HUGHES RM. Design, heterologous expression, and application of an immobilized protein kinase[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2023, 34(1): 204-211.
- [25] 马亮英. 大蒜有效部位蒜氨酸原料药的稳定性及相关研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2009.
- MA LY. Study on the stability and correlation of alliin, an effective part of garlic[D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2009 (in Chinese).