

# 产 3-脱氧葡萄糖醛酮代谢酶微生物的研究\*

梁智群 罗虹 李湘萍 庞宗文 黄时海

(广西大学工业测试实验中心 南宁 530004)

**摘要:** 从海洋细菌中筛选到一株产 3-脱氧葡萄糖醛酮代谢酶活力较高的菌株 Fs-4-C-3, 并对其进行了最适产酶条件的研究。实验证明: 以鱼肉蛋白胨为氮源、蔗糖为碳源, 在培养基起始 pH 值为 7.8~8.0, 温度为 28℃, 盐度为 5% 的情况下, 培养 96h, 产酶最高。3-DG 可以诱导产酶。

**关键词:** 美拉德反应, 3-脱氧葡萄糖醛酮, 海洋细菌

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)05-0321-04

## STUDIES ON 3-DEOXYGLUCOSONE-METABOLIZING ENZYME OF MARINE MICROORGANISM

LIANG Zhi-Qun LUO Hong LI Xiang-Ping PANG Zong-Wen HUANG Shi-Hai

(The Industrial Experimental Centre of GuangXi University, Nanning 530004)

**Abstract:** A bacterial strain having 3-deoxyglucosone-metabolizing enzyme was selected from 31 marine bacterial strains. The conditions for enzyme production of the strain was examined. The optimal temperature, initial pH, and cultivate time for enzyme formation were 28℃, pH7.8~8.0, and 96 hours respectively. Composition of the suitable medium was as following (%): Fish peptone 1.0, Sucrose 0.3, Yeast extract 0.2, NaCl 5.0. 3-deoxyglucosone can induce formation of enzyme.

**Key words:** Maillard reaction, 3-deoxyglucosone, Marine bacterial

蛋白质和糖类之间的美拉德反应会导致蛋白质之间发生复杂的化学变化(如:某些氨基酸残基的损失,可消化性的降低,溶解性的下降,褐变,荧光物质的生成和发生交联等),在食品加工和贮藏中,会导致食品营养下降;在生物体内,会对细胞和肌体组织产生毒性,从而引起老化病、糖尿病及其并发症、肾病、神经病、白内障等<sup>[1]</sup>。3-脱氧葡萄糖醛酮(3-Deoxyglucosone,简称 3-DG)是美拉德反应的主要中间产物<sup>[2]</sup>。许多研究表明,生理条件下,在由葡萄糖诱导的蛋白质聚合作用中,3-DG 起着交联剂的作用,3-DG 是一种活性高的毒性化合物。因此,如能找到可以代谢 3-DG 的酶,将 3-DG 转化,阻断美

拉德反应的进行,这时食品加工和防治老化病、糖尿病等方面均具有积极意义。目前,国外已有报道,从猪肝、鸡肝和欧芹中分离获得了对于 3-DG 具有代谢活性的酶<sup>[3~5]</sup>。本课题组也开展了微生物酶系对美拉德反应代谢调控研究,实验发现微生物中较普遍存在 3-DG 代谢酶,并曾对其中活性较高的一株酵母和细菌进行了产酶条件研究以及酶的分离纯化工作<sup>[6~7]</sup>。

有关海洋微生物酶的研究已非常广泛<sup>[8]</sup>,而在 3-DG 代谢酶方面,国内外尚未见报道。我

\* 国家自然科学基金资助项目(No.29466012)

收稿日期:1999-06-28,修回日期:1999-10-08

们以海洋微生物为材料,筛选到一株细菌,该菌以 NADPH 为辅酶时,代谢 3-DG 活性较高。并对其最适产酶条件进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

供筛选的菌种均是海洋细菌,由广西大学食品发酵工程研究所庞宗文老师提供。

### 1.2 培养基

斜面培养基:牛肉蛋白胨 0.5g,牛肉浸膏 0.2g,酵母浸膏 0.2g,葡萄糖 2g,琼脂 2g,NaCl 5g,定容 1L,pH7.6。

产酶培养基:牛肉蛋白胨 0.5g,牛肉浸膏 0.2g,酵母浸膏 0.2g,NaCl 5g,定容 1L,pH 7.6。

培养基灭菌条件:压力 0.1MPa 下稳定 20min。

### 1.3 酶反应底物的制备

3-脱氧葡萄糖醛酮的制备参照 Kato H 等人的方法<sup>[4]</sup>。

### 1.4 仪器及试剂

超声波破碎仪(德国贝朗公司),J2-21 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司),756MC 型紫外-可见光分光光度计(上海第三分析仪器厂)。NAD(上海浦江应用生物化学研究所),NADP 和 NADH(上海丽珠东风生物技术有限公司),NADPH(Sigma 公司),牛肉浸膏和酵母浸膏(上海长阳生化制药厂),牛肉蛋白胨(北京市海淀区微生物培养基制品厂)。其它试剂均为分析纯试剂。

### 1.5 粗酶液的制备

摇床培养 48h,冷冻离心(6000 × g, 20min, 4℃),收集菌体,加入湿菌重 5 倍体积的磷酸钠缓冲液(含 10mmol/L 巯基乙醇,pH7.0),放置超低温冰箱(-68℃)过夜。次日,在冰浴条件下,用超声波破碎仪处理 8min(功率 50W,每工作 1min,间歇 1min),冷冻离心(29200 × g, 8min, 4℃),取上清液,得粗酶液。

### 1.6 3-DG 代谢酶活力的测定

在 756MC 型紫外-可见光分光光度计上测

定。分析系统包含 4mmol/L 3-DG、0.5mmol/L NAD 或 0.5mmol/L NADP 或 0.3mmol/L NADH 或 0.3mmol/L NADPH、100mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.4)。取 0.9mL 分析液与 0.1mL 粗酶液在光径为 0.5cm 的比色皿中反应。记录最初 2min 内 340nm 处光吸收的变化值,每隔 30s 测一次。上述条件下,每分钟内增加或减少 1μmol 辅酶所需要的酶量为 1 个酶活力单位。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌种筛选

选择 31 株海洋细菌,制得粗酶液,分别以 NAD、NADH、NADP、NADPH 为辅酶,测定代谢 3-DG 的活性。3-DG 氧化酶活性较低或检测不出,3-DG 还原酶则均在以 NADPH 为辅酶时活性较高。从中选出酶活力在 1u/g 湿细胞以上的 6 株进行复筛(以 NADPH 为辅酶),结果以菌号 Fs-4-c-3 酶活力为最高。

### 2.2 海洋细菌 Fs-4-c-3 产酶条件研究

2.2.1 盐度对产酶的影响:配制不同盐度的培养基,28℃ 培养 48h。结果表明:盐度低 1% 和高于 10% 时,生长受抑制。盐度为 5% 时,生长和产酶最佳。

2.2.2 培养温度对产酶的影响:将种子液按 5% 接种量接入产酶培养基,在 20℃ ~ 30℃ 之间五个不同温度培养 48h,测定其酶活。图 1 表明,产酶的最适温度为 28℃。

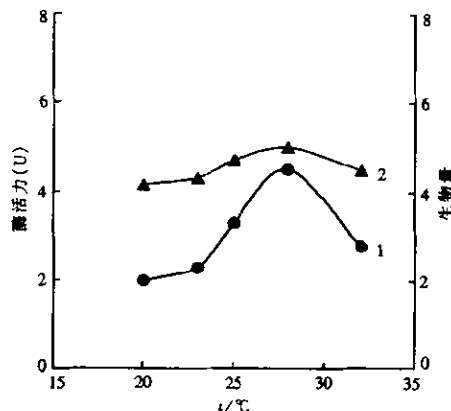


图1 培养温度对产酶的影响

1 酶活力, 2 生物量

### 2.2.3 培养基起始 pH 值对产酶的影响: 用

HCl溶液和NaOH溶液调节培养基的起始pH值,28℃培养48h后测定其酶活。实验结果,培养基的最适起始pH为8.0,在pH7.8~8.0之间产酶基本稳定。

**2.2.4 培养时间对产酶的影响:**将种子液按5%接种量接入产酶培养基(起始pH为8.0),28℃分别培养38h、48h、60h、70h、86h、96h、120h,测定其酶活。图2表明,该菌在生长后期大量产酶,最适培养时间为96h。

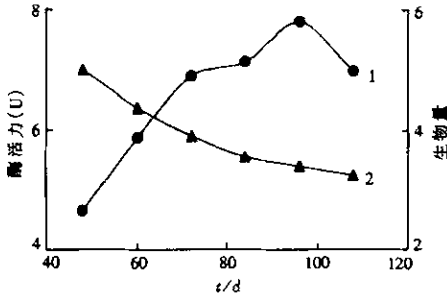


图2 培养时间对产酶的影响  
1 酶活力, 2 生物量

**2.2.5 不同氮源对产酶的影响:**分别用浓度为0.5%的牛肉浸膏、牛肉蛋白胨、鱼肉蛋白胨、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 作产酶培养基中的氮源(起始pH为8.0,28℃培养96h)。结果表明(表1),该菌既能利用有机氮源,又能利用无机氮源,其中以鱼肉蛋白胨对生长和产酶最有利。

表1 各种氮源对产酶和菌生长的影响

氮源	酶活力(U/g)	生物量(mg/mL)
牛肉浸膏	2.613	3.20
牛肉蛋白胨	6.51	2.00
鱼肉蛋白胨	8.41	4.25
$\text{NH}_4\text{Cl}$	4.77	2.90
$\text{NaNO}_3$	3.24	2.80
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	5.03	2.15

**2.2.6 不同碳源对产酶的影响:**分别用浓度为0.2%的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、酵母浸出汁、丙三醇、正丁醇、丙酮作产酶培养基中的碳源(起始pH为8.0,28℃培养96h)。结果表明(表2),正丁醇和丙酮对生长有抑制作用,蔗糖为产酶的最佳碳源。

**2.2.7 诱导物对产酶的影响:**在以鱼肉蛋白胨

为氮源、蔗糖为碳源,添加5%NaCl的培养基中(起始pH为8.0),分别加入0.25mmol/L、0.50mmol/L、0.75mmol/L、1.0mmol/L的3-DG,28℃培养96h。结果表明,3-DG对产酶和生长均有促进作用,浓度为0.75mmol/L时,效果最佳,生物量和酶活分别比对照提高了42.9%和80.4%。

表2 各种碳源对产酶和菌生长的影响

碳源	酶活力(U/g)	生物量(mg/mL)
葡萄糖	6.58	6.50
蔗糖	6.69	8.25
麦芽糖	5.48	7.15
酵母浸膏	4.51	3.00
甘油	3.55	3.25
正丁醇	2.68	2.50
丙酮	2.70	2.20
可溶性淀粉	4.84	6.45

综上所述,我们所选育的海洋细菌Fs-4-C-3的最适产酶条件为:培养温度28℃,培养时间96h,培养基起始pH7.8~8.0,盐度5%,氮源、碳源分别是鱼肉蛋白胨和蔗糖。与本课题组曾选育的酵母和细菌相比,具有较好的耐盐、耐碱性、酶活力更高。

一般报道从动、植物体内分离提取3-DG代谢酶,而我们从微生物出发寻找代谢3-DG的菌株。由于微生物具有取材容易、生长繁殖快、培养条件容易满足等优越性,使研究方法更加简单。

## 参 考 文 献

- [1] Shinoda T, Hayase F, Kato H, *et al.* Biosci Biotech Biochem, 1994, 58:2215~2219.
- [2] Kato H, Fayase F, Shin D B, *et al.* "The Maillard reaction in aging, diabetes and nutrition" ed. By Baynes J W, Monnier V M, Progr in Clin Biol Res, 1989, 304:69~84.
- [3] Liang Z Q, Hayase F, Kato H, *et al.* Biosci Biotech Biochem, 1992, 56:1074~1078.
- [4] Liang Z Q, Hayase F, Kato H, *et al.* Agri Biol Chem, 1990, 54:319~328.
- [5] Shin H S, Hayase F, Kato H, *et al.* Agri Biol Chem, 1991, 55:957~966.

[6] 邱秀宝, 李彤, 戴宏等. 微生物学通报, 1991, 18(3): 138~141.

25(2): 71~74.

[7] 李湘萍, 莫柏立, 庞宗文等. 微生物学通报, 1998,

[8] 梁智群, 栗桂娇, 梁静娟等. 微生物学通报, 1998, 25(6): 332~335.