

# 假单胞菌 L-半胱氨酸合成酶的纯化和性质研究

金永杰 杨文博\* 刘 忠 白 钢 余养盛

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

**摘要:** 假单胞菌 TS-1138 的细胞浆液通过硫酸沉淀、Sephadex G-75 凝胶过滤、DEAE-Cellulose 52 离子交换、Sephadex G-100 凝胶过滤等分离纯化手段分别将从 L-ATC 合成 L-半胱氨酸的两个酶——L-ATC 水解酶和 L-SCC 水解酶纯化了 83.9 和 90.3 倍。SDS-PAGE 鉴定均为单一条带, 两种酶的相对分子质量分别为 37.5 和 42.8 kD; 酶反应的最适温度均为 35℃, 最适 pH 分别为 7.0 和 8.0; 酶的米氏常数分别为 0.67 mmol/L 和 0.15 mmol/L, 最大反应速度分别为  $0.39 \times 10^{-3}$  mmol/L·min 和  $0.42 \times 10^{-3}$  mmol/L·min。

**关键词:** L-ATC 水解酶, L-SCC 水解酶, 酶纯化, 酶性质

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 06-0068-05

## Purification and Properties of L-Cysteine Synthetase from *Pseudomonas*

JIN Yong-Jie YANG Wen-Bo\* LIU Zhong BAI Gang YU Yang-Sheng

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071)

**Abstract:** The L-ATC hydrolase and L-SCC amidohydrolase which convert L-ATC to L-cysteine in *Pseudomonas* sp. TS-1138 are purified about 83.9 and 90.3 fold by salting-out method, Sephadex G-75 gel chromatography, DEAE-cellulose 52 ion exchange and Sephadex G-100 gel chromatography, etc. The purified enzymes are both demonstrated by SDS-PAGE to be a homogeneous protein. Their molecular weight are about 37.5kDa and 42.8kDa respectively. The optimum reaction temperature are both 35℃, and the optimum pH are 7.0 and 8.0 respectively. The  $K_m$  of the two enzymes are 0.67 mmol/L and 0.15 mmol/L, and the  $V_{max}$  are  $0.39 \times 10^{-3}$  mmol/L·min and  $0.42 \times 10^{-3}$  mmol/L·min respectively.

**Key words:** L-ATC hydrolase, L-SCC amidohydrolase, Purification of enzyme, Properties of enzyme

L-半胱氨酸和 L-胱氨酸是含硫的非必需氨基酸。广泛用于医药、食品、化妆品领域。目前我国生产 L-半胱氨酸和 L-胱氨酸仍沿袭陈旧的毛发水解工艺<sup>[1]</sup>。Sano<sup>[2]</sup>等于 1977 年发现的嗜硫氮杂环戊烯假单胞菌 (*Pseudomonas thiozolinophilum*) 能够把 DL-2-氨基- $\Delta^2$ -噻唑啉-4-羧酸 (DL-2-Amino- $\Delta^2$ -thiazoline-4-carboxylic Acid, 缩写为 DL-ATC) 转化为 L-半胱氨酸微生物酶法合成 L-Cys 具有低能耗、产物均一、易提取等优点。是今后制取 L-半胱氨酸的可行工艺。

本实验室从土壤中筛选到一株假单胞菌, 它可以将 DL-ATC 转化成 L-Cys<sup>[3]</sup>, 初步确定为以 S-氨甲酰-L-半胱氨酸 (L-SCC) 为中间产物的转化途径 (S 代途径)。本实验拟通过对与 L-Cys 合成相关酶的分离纯化的手段进一步验证该菌株的转化途径, 并检测这些酶的酶学性质, 为以后酶法合成 L-Cys 的工业化生产提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 假单胞菌 *Pseudomonas* sp. TS-1138 由本实验室筛选并保存。

\* 联系人 Tel: 022-23508371, E-mail: ywbme@eyou.com

收稿日期: 2004-02-19, 修回日期: 2004-04-02

**1.1.2 主要试剂:** DL-ATC, 天津试剂二厂; L-Cys, 华美生物工程公司; L-SCC, Aldrich 产品; DEAE cellulose-52, 天象人生物工程有限公司; Sephadex G-75, Sephadex G-100, Pharmacia 产品。

**1.1.3 培养基:** 种子培养基: 葡萄糖 20 g, ATC 3 g, 玉米浆 5 g, 尿素 3 g, NaCl 1.5 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g, 定容至 1 L, pH 7.5; 产酶培养基: 葡萄糖 30 g, ATC 4 g, 玉米浆 1 g, 尿素 3 g, NaCl 1.5 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g, 定容至 1 L, pH 7.5。

## 1.2 方法

**1.2.1 培养方法:** 从斜面上挑取一环菌接入 25 mL 种子培养基中, 28℃ 120 r/min 培养 16 h 后, 吸取 5 mL 种子液接入 50 mL 产酶培养基, 28℃ 120 r/min 培养 16 h。

**1.2.2 粗酶液的制备:** 菌悬液经超声波 (35 kHz, 120 W) 破壁 5 min, 加入终浓度 0.2% 的硫酸链霉素去除核酸, 最后经  $12,000 \times g$  离心 20 min 收集上清即为粗酶液。

**1.2.3 酶的检测方法:** (1) L-ATC 水解酶的检测方法: 采用十八磷钨酸法<sup>[4]</sup>。该酶分解 L-ATC 生成 L-SCC, L-SCC 可以还原磷钨酸中的钨原子生成蓝色物质, 在 570 nm 下有最大吸收, 其颜色深浅与 L-SCC 的量成正比。(2) L-SCC 水解酶的检测方法: 采用酸性茚三酮法<sup>[5]</sup>。该酶分解 L-SCC 生成 L-Cys, L-Cys 在煮沸的条件下与酸性茚三酮试剂生成红色物质, 在 560 nm 下有最大吸收, 其颜色深浅与 L-Cys 的量成正比。这里需要指出的是, 中间产物 L-SCC 在溶液中不稳定, 在有较高离子强度或碱性环境中有一部分 L-SCC 自身会发生分解, 生成 L-Cys, 干扰 L-SCC 水解酶酶活的测定; 通过反复实验发现, 在反应液中加入终浓度 10% 的葡萄糖可以有效地抑制 L-SCC 的自身分解, 抑制率在 95% 以上, 而且葡萄糖的存在基本上不会影响两个要纯化酶的活性, 因此在本实验中所有的催化反应均在反应液中添加 10% 的葡萄糖作为 L-SCC 的保护剂。

**1.2.4 蛋白质含量测定方法:** Folin-酚法<sup>[6]</sup>; 紫外吸收法。

**1.2.5 酶纯度检验:** SDS-PAGE<sup>[6]</sup>, 浓缩胶 4%, 分离胶 10%。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶的分离纯化

**2.1.1 L-ATC 水解酶的分离纯化:** (1) 硫酸盐析: 取 8 mL 粗酶液, 加入饱和硫酸至终浓度 60%, 4℃ (以下无特殊说明酶纯化均在 4℃ 下进行) 放置 4 h,  $12,000 \times g$  离心 20 min, 沉淀中加入 4 mL 0.05 mol/L, pH 8.0 的甘氨酸-NaOH 缓冲液 (以下酶的分离纯化所用缓冲液均为该缓冲液) 重新溶解蛋白; (2) Sephadex G-75 凝胶过滤: 将盐析样品进行 Sephadex G-75 凝胶过滤层析 (50 cm × 2 cm 柱, 已平衡), 匀速洗脱, Sephadex G-75 柱层析只出现一个蛋白峰, 酶活峰出现在蛋白峰下坡处蛋白含量相对较低的地方, 说明该酶分子量相对较小, 通过此步可除去绝大部分的杂蛋白; (3) DEAE-cellulose 52 离子交换层析: 将上一步样品进行 DEAE-cellulose 52 离子交换层析 (8 cm × 1.5 cm 柱, 已平衡), 采用含 NaCl 0 ~ 1 mol/L 的缓冲液进行线性梯度洗脱, 合并有酶活各管, 用聚乙二醇 20,000 透析浓缩; (4) Sephadex G-100 凝胶过滤: 将上一步样品进行 Sephadex G-100 凝胶过滤层析 (图 1), 酶活峰与蛋白峰峰形基本重合, 说明该酶已经被基本纯化。图 2 为 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳情况, 第 7 泳道为纯化后的样品, 该酶的分子量为 37.5 kD。

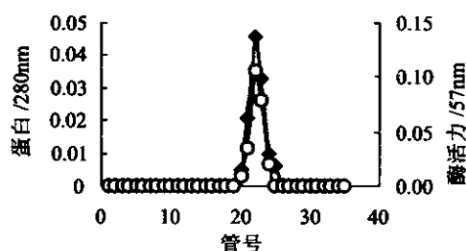


图1 Sephadex G-100 凝胶过滤

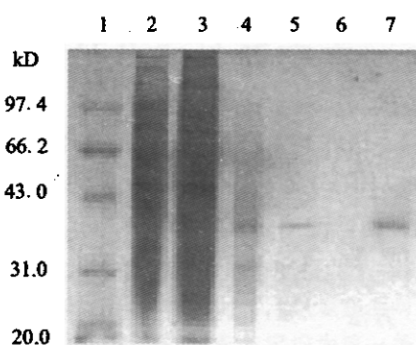


图2 L-ATC 水解酶电泳图谱

1 标准蛋白, 2 粗酶, 3 盐析蛋白, 4 Sephadex G-75, 5 DEAE-cellulose 52, 6 空, 7 纯化后样品

**2.1.2 L-SCC 水解酶的分离纯化:** (1) DEAE-cellulose 52 阶段洗脱: 8 mL 粗酶液用 DEAE-cellulose 52 离子交换层析柱 (8 cm × 1.5 cm) 吸附, 依次用含 NaCl 0、0.025、1 mol/L 的缓冲液洗脱, L-SCC 水解酶在 0 ~ 0.025 mol/L NaCl 浓度下被洗脱下来, 且此处的蛋白量很少, 通过这一步可以除去绝大多数的杂蛋白, 将酶活部分透析除盐; (2) DEAE-cellulose 52 线性洗脱: 将透析后的样品重新用 DEAE-cellulose 52 柱 (5 cm × 1 cm) 吸附,

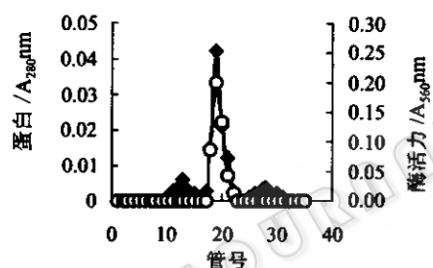


图3 Sephadex G-100 凝胶过滤

然后用含 NaCl 0 ~ 0.04 mol/L 的缓冲液进行线性洗脱, 收集酶活部分, 用聚乙二醇 20,000 透析浓缩; (3) Sephadex G-100 凝胶过滤: 将上一步样品进行 Sephadex G-100 凝胶过滤层析, 由图 3 可看出酶活峰与主蛋白峰峰形基本重合, 说明该酶已经被基本纯化。SDS-PAGE 结果见图 4。图中第 4 泳道为纯化后的样品, 该酶的相对分子量为 42.8 kD。

## 2.2 酶促反应产物验证

将纯化后的 L-ATC 水解酶和 L-SCC 水解酶透析, 以去除对薄层层析显色的干扰物质甘氨酸, 然后分别催化相应的底物 L-ATC 和 L-SCC, 反应液经三氯乙酸去除蛋白后进行薄层层析 (展层液配比为: 正丁醇: 甲酸: 水 = 4:2:1), 与标准品 (ATC 不能在薄层上显色, 故未点样) 进行对照, 结果见图 5。从图中可以看出, 第 3 泳道酶催化 L-ATC 后的产物为 L-SCC, 证明该酶为 L-ATC 水解酶; 这里需要指出的是, 图中第 3 泳道中还有微量的 L-Cys 存在, 由于该酶已经在 SDS-PAGE 中呈现单一条带, 且离子交换层析表明 L-SCC 水解酶在含 NaCl 0.025 mol/L 的缓冲液的离子强度下被洗脱下来, 而 L-ATC 水解酶在含 NaCl 约 0.32 mol/L 的缓冲液的离子强度下才能被洗脱下来, 所纯化的 L-ATC 水解酶样品中不可能存在有 L-SCC 水解酶, 所以微量 L-Cys 的存在不应该是酶不纯造成的, 而是由于微量 L-SCC 发生分解所致; 再加之葡萄糖的加入不能 100% 的抑制 L-SCC 的分解, 因此微量 L-Cys 的存在是不易控制的。第 4 泳道酶催化 L-SCC 后的产物为 L-Cys (图中所示有少量未反应的底物 L-SCC), 证明该酶为 L-SCC 水解酶。第 5 泳道为在 ATC 中同时加入这两种纯化酶的样品, 两种酶协同作用完成了从 L-ATC 到 L-Cys 的转化, 进一步说明了纯化酶的正确性, 并有力地验证了假单胞菌 TS-1138 转化 DL-ATC 合

成 L-Cys 的途径为 S 代途径。

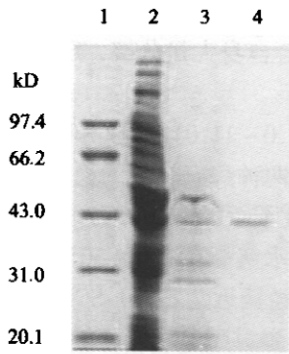


图 4 SDS-PAGE

1 标准蛋白, 2 粗酶, 3 DEAE 阶段洗脱, 4 纯化后样品

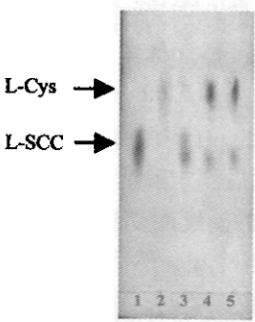


图 5 薄层层析图谱

1 L-SCC, 2 L-Cys, 3 L-ATC 水解酶催化 L-ATC 后的样品, 4 L-SCC 水解酶催化 L-SCC 的样品, 5 用两种纯化酶共同催化 ATC 后的样品

2.3 酶的纯化结果

假单胞菌 TS-1138 L-ATC 水解酶和 L-SCC 水解酶的纯化结果见表 1 和表 2。

表 1 L-ATC 水解酶的纯化结果

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总酶活 (u)	比活力 ( $u \cdot mg^{-1}$ )	得率 (%)		纯化倍数
				酶活力	蛋白质	
粗酶液	247.62	444	1.80	100	100	1.0
盐析	82.68	315	3.81	70.9	33.40	2.1
Sephadex G-75	4.82	203	42.12	45.7	1.95	23.4
DEAE-cellulose 52	0.93	135146	30.40	0.4	81.00	
Sephadex G-100	0.74	111	151.02	25.0	0.30	83.9

表 2 L-SCC 水解酶的纯化结果

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总酶活 (u)	比活力 ( $u \cdot mg^{-1}$ )	得率 (%)		纯化倍数
				酶活力	蛋白质	
粗酶液	247.62	358	1.5	100	100	1.0
DEAE 阶段洗脱	5.32	212	39.9	59.3	2.1	27.5
DEAE 线性洗脱	1.21	135	112.2	37.9	0.5	77.4
Sephadex G-100	0.72	95	131.0	26.5	0.3	90.3

2.4 纯化后的酶的酶学性质

2.4.1 酶的最适温度：在不同温度下测定纯化后两种酶的活力，结果见图 6，两种酶的最适作用温度均为 35℃。

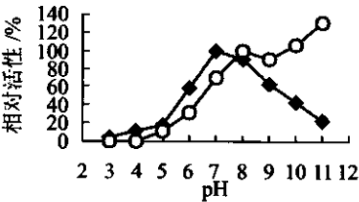


图 6 温度对酶活力的影响

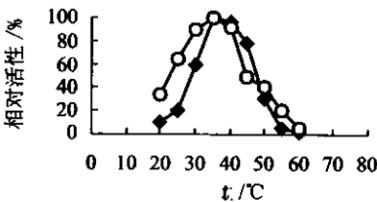


图 7 pH 对酶活力的影响

**2.4.2 酶的最适 pH:** 配制广泛缓冲液 (pH3.0 ~ 10.0)<sup>[7]</sup> 分别测定酶活力, 两种酶的最适作用 pH 值分别为 7.0 和 8.0 (图 7)。这里需要指出的是, 当测定 L-SCC 水解酶的最适 pH 值时, 反应体系中的 pH 值超过 9.0 以后, L-SCC 自身大量分解, 已经失去测定意义。

**2.4.3 酶的 pH 耐受性:** 用不同 pH 值的缓冲液 (pH3.0 ~ 11.0) 稀释两种酶, 37℃ 保温 30 min, 然后测定酶活力, 结果表明, 在 pH6.0 ~ 9.0 两种酶有较好的稳定性。

**2.4.4 酶的温度耐受性:** 将两种酶分别在不同的温度下 (0℃ ~ 60℃) 保温 30 min 后, 迅速用冰浴冷却, 然后测定酶活力。结果表明 L-ATC 水解酶在 0℃ ~ 50℃ 下较稳定, 但当温度超过 50℃ 时, 酶活迅速下降, 60℃ 时酶活力已经接近为零; L-SCC 水解酶情况与之类似, 在温度超过 45℃ 时酶活迅速下降, 表明两种酶对高温敏感, 均为嗜中温型酶。

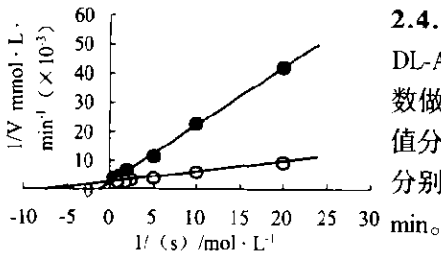


图 8 双倒数法测定酶的  $K_m$  值

**2.4.5 酶的  $K_m$  值:** 将两种酶分别与不同浓度的底物 DL-ATC 和 L-SCC 保温 2 h, 然后测定酶活力, 以双倒数做图法<sup>[8]</sup> (图 8) 测得两种酶的表现米氏常数  $K_m$  值分别为 0.67 mmol/L 和 0.15 mmol/L, 最大反应速度分别为  $0.39 \times 10^3$  mmol/L·min 和  $0.42 \times 10^3$  mmol/L·min。

### 3 讨论

Shiba<sup>[9]</sup> 推测 DL-ATC 酶法转化为 L-Cys 可通过以下两条途径: 一条为以 S-氨甲酰-L-半胱氨酸 (L-SCC) 为中间产物途径 (称为 S 代途径), 另一条为以 N-氨甲酰-L-半胱氨酸 (L-NCC) 为中间产物途径 (称为 N 代途径), 并且分别在不同的菌株检测到了这两种中间产物。本实验通过对 L-ATC 水解酶和 L-SCC 水解酶的分离纯化研究及酶促反应产物的确认, 可基本确定该菌株将 DL-ATC 转化成 L-Cys 所经过的途径为 S 代途径, 而日本对 L-Cys 合成酶 (系) 基因克隆<sup>[9,10]</sup> 所采用的菌株均为 N 代途径, 本实验进一步表明酶法转化 DL-ATC 合成 L-Cys 在不同种的假单胞菌中可存在两条途径, 反映了微生物对同种化学中间体 (ATC) 转化合成 L-Cys 酶系统的多样性。另外, 通过对两种酶最适催化反应条件的研究, 为以后酶法合成 L-半胱氨酸的工业化生产提供了重要的理论支持。

### 参考文献

- [1] 杨金奎, 何耀梅. 国外医药抗生素分册, 2001, 22 (4): 179 ~ 183.
- [2] Sano K, Yokozeki K, Tamura F, et al. Appl Environ Microbiol, 1977, 34 (6): 806 ~ 810.
- [3] 刘 忠, 杨文博, 白 刚, 等. 微生物学通报, 2003, 30 (6): 16 ~ 21.
- [4] Beatrice K, Erwin B. J Biol Chem, 1938, 125: 115 ~ 129.
- [5] Gaitonde M K. Biochem J, 1967, 104: 627 ~ 633.
- [6] 汪家政, 范 明主编. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2002.
- [7] Masalo I, Shinichi N, Kawagishi H. Biosci Biotech Biochem, 1992, 56 (3): 448 ~ 453.
- [8] 张龙翔, 张庭芳. 生化实验方法与技术 (第二版). 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [9] Shiba T, Takeda K, Yajima M, et al. Appl Envir Microbiol, 2002, 68: 2179 ~ 2187.
- [10] Tetsuo O, Mizuka N, Maki K, et al. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 2002, 66 (5): 1097 ~ 1104.