

# 苛求芽孢杆菌尿囊酸酰胺水解酶性质的研究

徐志伟

(福建省亚热带植物研究所, 厦门 361006)

Chris van der Drift

(荷兰奈梅根大学微生物学与进化生物学系)

**摘要** 研究了苛求芽孢杆菌尿囊酸酰胺水解酶的基本性质、稳定性及调节。粗酶作用于尿囊酸的  $K_m$  为  $7.1 \text{ m mol/L}$ ,  $V_{max}$  为  $50 \mu \text{ mol/L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  蛋白质。  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  可部分代替  $\text{Mn}^{2+}$  作为金属辅因子, 活力分别为对照的 17%、14% 和 11%。  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  分别抑制酶活力(%) : 16、40 和 100。  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  存在时, 酶活力被抑制(%) : 58、28 和 59。酶贮于  $-20^\circ\text{C}$  6 个月未失活。研究了酶的热稳定性和 pH 稳定性。该酶对乙醇相当敏感。测试了近 60 种化合物对酶反应的效应, 其中乙二酰脲、羟基脲、草酸、延胡索酸、柠檬酸、苹果酸、草酰乙酸、丙酮酸、乙酰氧脲酸(全为  $10 \text{ m mol/L}$ )、3-磷酸甘油酸、氨基氧乙酸(全为  $5 \text{ m mol/L}$ ) 分别抑制酶活力(%) : 10、70、10、10、10、20、50、40、95、23 和 44。

**关键词** 苛求芽孢杆菌, 酰脲, 尿囊酸酰胺水解酶, 性质

作为嘌呤降解的一部分, 尿囊酸可由尿囊酸咪基水解酶[EC 3.5.3.4]或尿囊酸酰胺水解酶[EC 3.5.3.9]降解<sup>[1,2]</sup>。最近, 尿囊酸酰胺水解酶研究受到特别重视, 它在大豆固氮输出产物酰脲分解代谢中占有重要地位<sup>[3]</sup>, 但活力极低并易失活而难以研究<sup>[4]</sup>。已研究过的微生物尿囊酸酰胺水解酶均是以半失活状态存在, 但可被 pH6 及 EDTA 或低 pH (<5) 激活<sup>[2,5]</sup>。

苛求芽孢杆菌是一种土壤微生物, 仅能生长在尿酸、尿囊素作为氮源的培养基上, 降解尿囊酸的酶为尿囊酸酰胺水解酶<sup>[6]</sup>, 因而该菌是研究尿囊酸酰胺水解酶的极好材料。用磷酸缓冲液提取, 该酶活力很低, 但可被酸激活<sup>[6]</sup>。我们研究过该酶的激活与失活<sup>[7]</sup>。至今, 有关尿囊酸酰胺水解酶的报道极少, 仅研究过 *Streptococcus allantoicus* 等的尿囊酸酰胺水解酶的一些性质<sup>[1,5,8,9]</sup>。本文报道苛求芽孢杆菌尿囊酸酰胺水解酶的一些基本性质、稳定性及调节作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种及培养基

苛求芽孢杆菌 (*Bacillus fastidiosus* DSM83) 在  $37^\circ\text{C}$  振荡 ( $200 \text{ r/min}$ ) 培养, 培养基按文献<sup>[10]</sup>, 补加  $30 \text{ m mol/L}$  尿囊素作为唯一碳源和氮源, 灭菌后的 pH 为 7.2。

### 1.2 酶液的制备

细菌培养 24h, 离心 ( $10000 \times g$ , 30min) 收集细胞, 用含  $0.17 \text{ m mol/L}$  EDTA 的  $50 \text{ m mol/L}$  Tris-HCl (pH7.5) 缓冲液洗涤两次, 离心后, 沉淀悬浮于同一缓冲液中, 高压破碎 ( $138 \text{ MPa}$ )。离心 ( $43000 \times g$ , 30min,  $4^\circ\text{C}$ ) 后, 上清液作为酶源。

### 1.3 尿囊酸酰胺水解酶活力测定

除非另外说明, 每 ml 反应液含:  $50 \mu \text{ mol/L}$  尿囊酸钠,  $0.15 \mu \text{ mol/L}$   $\text{MnSO}_4$ ,  $1.06 \mu \text{ mol/L}$  还原型谷胱甘肽,  $150 \mu \text{ mol/L}$  二乙醇胺-HCl 缓冲液 (pH8.8), 以及适量的酶 ( $5 \sim 15 \mu \text{g}$  粗蛋白);  $37^\circ\text{C}$  下反应 30min。缺酶作为对照。根据乙醛酸衍生物差级分析

本文完成于荷兰奈梅根大学微生物学与进化生物学系, Marie Curie 创新基金资助。

1995-11-02 收稿

法<sup>[11]</sup>测定酶反应产物脲基乙醇酸。在所用的分析条件下,每 min 催化  $1\mu\text{mol/L}$  产物形成作为一个酶活力单位。

#### 1.4 蛋白质测定

以牛血清蛋白作为标准,采用 Bio-Rad 蛋白质分析试剂,按考马斯亮蓝染色法<sup>[12]</sup>测定。

所有数值为三个重复的平均值。

#### 1.5 试剂

尿囊酸钠根据尿囊素碱解制备<sup>[13]</sup>;其它试剂至少为分析级试剂。

## 2 结果和讨论

### 2.1 反应进程

粗酶比活力为  $24.5\mu\text{mol}$  脲基乙醇酸  $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  蛋白质。

在每 ml 反应液含  $12.75\mu\text{g}$  蛋白质条件下,至少 60min 内,反应产物量随反应时间线性增加。

### 2.2 酶量及底物浓度对反应的影响

在每 ml 反应液含  $25\mu\text{g}$  蛋白质的范围内,反应速度与蛋白质浓度线性相关。

在选定的最适条件下,测定了底物尿囊酸浓度对反应的影响,在反应之前,先根据方法<sup>[11]</sup>校正尿囊酸试剂浓度。根据 Lineweaver-Burk 法作图,苛求芽孢杆菌尿囊酸酰胺水解酶粗酶反应的  $K_m$  为  $7.1\text{mol/L}$  尿囊酸钠,  $V_{\text{max}} = 50\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  蛋白质。

### 2.3 金属离子对反应的影响

$\text{Mn}^{2+}$  是苛求芽孢杆菌尿囊酸酰胺水解酶的金属辅因子<sup>[7]</sup>,但  $\text{Mn}^{2+}$  可被部分二价金属离子取代。 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  ( $0.3\text{mol/L}$ ) 不能替代  $\text{Mn}^{2+}$  的作用,但  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  ( $0.3\text{mol/L}$ ) 可部分代替  $\text{Mn}^{2+}$  作为金属辅因子,活力分别为  $\text{Mn}^{2+}$  作为辅因子时的 17%、14% 和 11%。

在反应液含有  $0.15\text{mol/L}$   $\text{Mn}^{2+}$  条件下,测试了二价离子 ( $0.3\text{mol/L}$ ) 对酶反应的影响。 $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  无效应,  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  分别抑制 16%、40% 和 100%。而可部分

替代  $\text{Mn}^{2+}$  作为辅因子的  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  存在时,对酶反应也产生不良影响,它们分别抑制 58%、28% 和 59%。这表明,金属离子之间相互影响。

在金属离子特异性方面,大豆尿囊酸酰胺水解酶有所不同,  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  和  $\text{Ni}^{2+}$  都不能代替  $\text{Mn}^{2+}$  作为辅因子<sup>[3]</sup>。

### 2.4 稳定性

**2.4.1 贮存:** 苛求芽孢杆菌尿囊酸酰胺水解酶在提取缓冲液中,于  $-20^\circ\text{C}$  低温冰箱内贮存 6 个月未失活。

**2.4.2 热稳定性:** 在含  $0.17\text{mol/L}$  EDTA 的  $50\text{mol/L}$  Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 中,  $30^\circ\text{C}$  以上该酶不稳定。  $44.5^\circ\text{C}$  处理 5min, 酶活力失去 50%。在  $55^\circ\text{C}$  和  $70^\circ\text{C}$  处理 5min, 活力失去 75% 和 100%。

**2.4.3 不同缓冲液中的稳定性:** 酶在不同 pH 缓冲液中,分别在  $55^\circ\text{C}$  ( $0\sim 30\text{min}$ )、 $30^\circ\text{C}$  ( $0\sim 40\text{min}$ ) 和  $4^\circ\text{C}$  ( $0\sim 20\text{min}$ ) 下处理。

在 pH8.8 ( $300\text{mol/L}$  二乙醇胺-HCl,  $0.1\text{mol/L}$   $\text{Mn}^{2+}$ ), pH7.5 ( $50\text{mol/L}$  Tris-HCl,  $0.17\text{mol/L}$  EDTA) 和 pH6.0 ( $60\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $0.17\text{mol/L}$  EDTA),  $55^\circ\text{C}$  处理 (图 1a) 后,活力迅速下降;在处理 5min 时,残存活力分别为 70%、25% 和 10%。结果表明在  $55^\circ\text{C}$  处理时, pH8.8 并含有  $\text{Mn}^{2+}$  的条件下,该酶较稳定。该酶反应的最适 pH 为 8.8,且需要  $\text{Mn}^{2+}$  作为辅因子<sup>[7]</sup>。

在  $30^\circ\text{C}$  和  $4^\circ\text{C}$  处理 (图 1b, 1c) 该酶在 pH7.5 ( $50\text{mol/L}$  Tris-HCl,  $0.17\text{mol/L}$  EDTA) 缓冲液中比在 pH6.0 ( $60\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $0.174\text{mol/L}$  EDTA) 缓冲液中较为稳定。其中 pH6.0 ( $60\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $0.174\text{mol/L}$  EDTA) 能在短时间内显示激活作用。酶在 pH7.5 ( $50\text{mol/L}$  Tris-HCl,  $0.17\text{mol/L}$  EDTA),  $4^\circ\text{C}$  下 20min 内未失去任何活力。

### 2.4.4 在乙醇中的稳定性

在 66% 乙醇 ( $4^\circ\text{C}$ ) 存在下, 1min 内该酶完

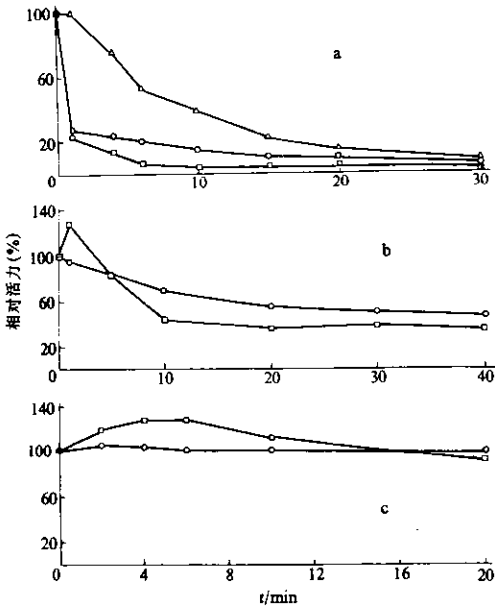


图1 温度及 pH 对酶稳定性的影响  
a. 55℃, b. 30℃, c. 4℃

△. pH8.8, ○. pH7.5, □. pH6.0

全失活,而且稀释 200 倍后无法恢复活力。在 6.7%乙醇(4℃)存在下,1min 内,该酶失活 10%,以后随处理时间逐渐失活,25min 时,该酶失活 17%。在 6.7%乙醇处理情况下,测定酶活力时,经乙醇处理的酶液稀释 20 倍,在最后酶反应液中仍含有 0.33%乙醇。

尿囊酸酰胺水解酶对乙醇较敏感的性质,与尿囊酸脒基水解酶(尿囊酸酶)或尿囊素酶有明显的区别。后两者对乙醇较不敏感,可用乙醇或丙酮分部提取。

2.5 底物类似物以及其它化合物的影响

在酶反应的最适条件下,分别测试了近 60 种化合物对酶反应的影响。仅 11 种化合物部分抑制尿囊酸酰胺水解酶(表 1)。而次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟嘌呤、腺嘌呤、腺嘌呤核苷、尿嘧啶核苷(均为 5m mol/L)以及二氢尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、5-氨基尿嘧啶、尿囊素、5-甲基尿囊素、乙内酰脲、脲基乙酸、6-氨基嘌呤、2'脱氧腺苷(均为 2m mol/L),四氧嘧啶、甘油酸、乙酰脲、戊二酸、乙醇酸、脲基乙酮酸、磷酸甘油、甘氨酸、丝氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、γ-氨基丁

酸、α-酮戊二酸、丙氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、精氨酸、瓜氨酸、琥珀酸、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KNO<sub>3</sub>、KCl、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(以上均为 10m mol/L),N-乙酰-L-天冬酰胺、N-乙酰-L-天冬氨酸、N-乙酰-谷氨酰胺、果糖、乙酸钠、乙酰磷酸、1,6-二磷酸果糖(均为 5m mol/L),KCN、NaN<sub>3</sub>(1m mol/L),尿素(1~20m mol/L),十二烷基磺酸钠(0.5~2m mol/L)对酶反应均无影响。

表 1 一些化合物对尿囊酸酰胺水解酶的影响

| 效应物<br>(m mol/L) | 抑制<br>(%) | 效应物<br>(m mol/L) | 抑制<br>(%) |
|------------------|-----------|------------------|-----------|
| 乙二酰脲,10          | 10        | 延胡索酸,10          | 10        |
| 羟基脲,10           | 70        | 柠檬酸,10           | 10        |
| 草酸,10            | 10        | 苹果酸,10           | 20        |
| 氨基氧乙酸,5          | 44        | 草酰乙酸,10          | 50        |
| 3-磷酸甘油酸,5        | 23        | 丙酮酸,10           | 40        |
| 乙酰氧脲酸,10         | 95        |                  |           |

本文首次较系统地研究了底物及其它一些化合物对尿囊酸酰胺水解酶的影响,以上化合物绝大部分是第一次作为效应物测试。至今,还未能找到该酶的特异抑制剂。微生物或植物尿囊酸酰胺水解酶的纯化、特征、调节与定位等都是空白点,均有待研究。

参 考 文 献

- [1] Vogels G D. Biochem Biophys Acta, 1966, 113: 277~291.
- [2] vogels G D, van der Drift C. Bacteriological Reviews, 1976, 40(2): 403~468.
- [3] Winkler R G, Polacco J C, Blevins D G, Randall D D. Plant Physiol, 1985, 79: 787~793.
- [4] Lukaszewski K M, Blevins D G, Randall D D. Plant Physiol, 1992, 99: 1670~1676.
- [5] Van der Drift C, Vogels G D. Enzymologia, 1969, 36: 269~277.
- [6] Bongaerts G P A, Vogels G D. J Bacteriol, 1976, 125: 689~697.
- [7] Xu Z W, De Windt F E, Van der Drift C. Arch Biochem Biophys, in press.
- [8] Van der Drift C, Vogels G D. Biochem Biophys Acta, 1967, 139: 162~168.
- [9] Van der Drift C, Vogels G D. Enzymologia, 1969, 36:

- 278~286.
- [10] Van der Drift C, Smits R A M M, Michiels G A M, *et al.* Arch Microbiol, 1986, 146: 292~294.
- [11] Vogels G D, Van der Drift C. Anal Biochem, 1970, 33: 143~157.
- [12] Bradford M M. Anal Biochem, 1976, 72: 248~254.
- [13] Hermanowicz W. Roczniki Chem, 1948, 22: 159~180.

## SOME PROPERTIES OF ALLANTOATE AMIDOHYDROLASE FROM *BACILLUS FASTIDIOSUS*

Xu Zhiwei

(Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen 361006)

Chris van der Drift

(Dept. of Microbiology and Evolutionary Biology, Univ. of Nijmegen, Netherlands)

**Abstract** Some properties including stability and regulation of allantoate amidohydrolase in the crude extract of *Bacillus fastidiosus* DSM83 were investigated. The  $K_m$  of the enzyme for allantoate was  $7.1 \text{ mmol/L}$ ,  $V_{max}$  was  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ .  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  could partially replace  $\text{Mn}^{2+}$  as a metal cofactor, the activities with these ions were 17%, 14% and 11% of the control with  $\text{Mn}^{2+}$ , respectively.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  inhibited 16%, 40% and 100%, respectively. However,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  also inhibited 58%, 28% and 59% respectively, which showed the interaction between  $\text{Mn}^{2+}$  and these ions. The enzyme could be stored at  $-20^\circ\text{C}$  for 6 months without losing its activity. The thermostability and the stabilities of the enzyme at pH 8.8, pH 7.5, pH 6.0 with different temperature ( $55^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$  and  $4^\circ\text{C}$ ) were tested. Especially, the enzyme was sensitive to alcohol treatment. And about 60 chemicals including substrate analogues and so on were examined for their effects on the enzymatic reaction. Parabanic acid, hydroxyurea, oxalate, fumarate, citrate, malate, oxaloacetate, pyruvate, acetoxyacetate (all  $10 \text{ mmol/L}$ ), glycerate-3-phosphate, (aminooxy) acetate (both  $5 \text{ mmol/L}$ ) inhibited 10%, 70%, 10%, 10%, 10%, 20%, 50%, 40%, 95%, 23% and 44%, respectively.

**Key words** *Bacillus fastidiosus*, Ureides, Allantoate amidohydrolase, Properties

\* Carried out in Dept. of Microbiology and Evolutionary Biology, Univ. of Nijmegen and supported by Marie Curie Initiative Fellowship