

植物乳酸杆菌产 L-阿拉伯糖异构酶 分子活性部位的研究

张 华^{1,3}, 江 波^{1,*}, 潘蓓蕾²

(1. 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2. 中国食品科学技术学会, 北京 100833 3. 郑州三全食品股份有限公司博士后工作站, 河南 郑州 450044)

摘 要: 应用 NBS、DEPC、PMSF、EDC、TNBS、2-mercaptoethanol 和 PCMB 等对植物乳酸杆菌 L-阿拉伯糖异构酶进行化学修饰。结果表明, NBS、PMSF 和 DEPC 显著降低了 L-阿拉伯糖异构酶活性, 而其他几种修饰剂无明显作用。底物半乳糖对 PMSF、DEPC 修饰有抑制作用, 4mg/ml 半乳糖可以完全阻止 PMSF、NBS 对 L-阿拉伯糖异构酶的修饰作用, 但是半乳糖不能阻止 DEPC 对 L-阿拉伯糖异构酶的失活作用。实验结果表明, 色氨酸残基、丝氨酸残基和组氨酸残基位于酶的活性中心, 且丝氨酸残基和色氨酸残基位于酶的底物结合中心, 而组氨酸残基可能位于酶的催化中心。

关键词: 植物乳酸杆菌; L-阿拉伯糖异构酶; 化学修饰; 活性中心

Study on Active Site of L-arabinose Isomerase from *Lactobacillus plantarum*

ZHANG Hua^{1,3}, JIANG Bo^{1,*}, PAN Bei-lei²

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2. Chinese Institute of Food Science and Technology, Beijing 100833, China

3. Post-doctor Working station of Zhengzhou Sanquan Food Co. Ltd., Zhengzhou 450044, China)

Abstract: The modification chemicals of NBS, PMSF, DEPC, EDC, TNBS, 2-mercaptoethanol and PCMB were used to react

收稿日期 2006-10-17

*通讯作者

基金项目: 国家“863”计划项目(2006AA1Z334)

作者简介: 张华(1975-), 男, 博士, 研究方向为生物技术在食品中的应用。

- [2] HSIAO H, WEI T. Enzymatic synthesis of L-cysteine[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1987, 30(12): 875-881.
- [3] RYU O H, SHIN C S. Analysis of the reaction steps in the bioconversion of DL-ATC to L-cysteine[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 1991, 1(1): 50-53.
- [4] LIU Z, YANG W B, BAI G. Microbial enzyme conversion of L-cysteine and L-cystine[J]. Microbiology, 2003, 30(6): 16-21.
- [5] KOU G H, HUAI L H, BAI G, et al. Optimization of fermentation conditions of microbial enzymatic synthesis of L-cysteine[J]. Journal of Tianjin University of Science and Technology, 2006, 21(4): 21-24.
- [6] ZHOU C P, KOU G H, XU Q Y, et al. Study on synthesis of L-cysteine by microbial transformation[J]. Modern Chemical Industry, 2006, 26(2): 275-278.
- [7] SEN R. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin[J]. J Chem Technol Biotechnol, 1997, 68: 263-270.
- [8] THOMPSON D D. Response surface experimentation[J]. J Food Processing and Preservation, 1982, 6(3): 155-188.
- [9] SEN R, SWAMINATHAN T S. Application of response surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin[J]. Appl Microbiol Biotech, 1997, 47: 358-363.
- [10] KWAK J S. Application of Taguchi and response surface methodologies for geometric error in surface grinding process[J]. International Journal of Machine Tools and Manufacture, 2005, 45: 327-334.
- [11] FISHER L J, BUNTING S L, ROSENBERG L E. A Modified ninhydrin colorimetric method for the determination of plasma alpha-amino nitrogen[J]. Clinical Chemistry, 1963(9): 573-581.
- [12] ROBERT C, DEVILLERS T, WATHELET B, et al. Use of a Plackett-Burman experimental design to examine the impact of extraction parameters on yields and compositions of pectins extracted from chicory roots (*Chicorium intybus* L.) [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2006, 54(19): 7167-7174.
- [13] DENG L Y, TANG B. Design selection and classification of Hadamard matrices using generalized minimum aberration criteria[J]. Technometrics, 2002, 44(2): 173-184.
- [14] AHUJA S K, FERREIRA G M, MOREIRA A R. Application of Plackett-Burman design and response surface methodology to achieve exponential growth for aggregated shipworm bacterium[J]. Biotechnol Bioeng, 2004, 85(6): 666-675.

with L-arabinose isomerase from *Lactobacillus plantarum*. The L-arabinose isomerase could be inactivated with NBS, PMSF and DEPC. The tryptophan residues, serine residues and histidine residues might be involved in the active site of the enzyme. 4mg/ml galactose could completely inhibit the inactivation of L-arabinose isomerase with NBS and PMSF, but the substrate showed no effect on the modification by DEPC. The results revealed that serine and tryptophan are positioned in the substrate binding site while histidine in the catalytic site.

Key words *Lactobacillus plantarum*; L-arabinose isomerase; chemical modification; active site

中图分类号: Q946.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0340-05

L-阿拉伯糖异构酶(EC 5.3.1.4. L-arabinose isomerase, 简称 AI) 主要催化 L-阿拉伯糖生成 L-核酮糖, 也能催化半乳糖生成塔格糖^[1]。D-塔格糖是一种己酮糖, 甜味类似于蔗糖, 而热量值只有 1.5kCal/g, 被称为低能量甜味剂, 同时 D-塔格糖还具有良好的功能特性, 如正常人食用后不增加体内血糖水平, 糖尿病人食用后可以抑制和减缓血糖的升高, 不会引起龋齿^[2]。近年来许多研究利用 AI 转化半乳糖生产塔格糖, AI 主要来源一些能利用 L-阿拉伯糖的细菌, 以及通过基因克隆技术使 AI 基因在耐热菌种中表达, 获得耐热的 AI^[3-5]。Oh^[6]等人通过对 *Geobacillus thermodenitrificans* AI 基因定点突变, 发现位于基因序列 164 的色氨酸残基和 475 的天冬氨酸残基对维持酶的活力具有重要作用; Babu^[7]等人纯化结晶了来源于 *E. coli* 的 AI, 通过 X-衍射推测出酶活性中心氨基酸残基有两个谷氨酸残基、两个组氨酸残基的组成。本实验室筛选到一株高产 AI 的植物乳酸杆菌 (*Lactobacillus plantarum*), 获得的 AI 酶分子量在 60kD 左右, 有着良好的热稳定性, 该酶的表现最适反应温度为 50℃, 在 60℃ 条件下保存 2h 酶活仍保持在 60% 以上^[8]。本实验在对其分离纯化及性质研究的基础上, 进一步探讨了氨基酸残基的修饰与酶活性的关系, 并结合荧光对该酶的结构和功能方面进行了初步的研究, 旨在为研究 AI 的分子结构与其功能域的关系提供实验依据, 并为改造酶蛋白, 提高其对半乳糖的专一性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与设备

植物乳酸杆菌 L-阿拉伯糖异构酶由本实验室制备, 所得酶比活力为 253U/mg; 化学修饰剂三硝基苯磺酸(2, 4, 6-trinitrophenesulphonic acid, TNBS) 对氯汞苯甲酸(p-chloromercuribenzoic acid, PCMB)、2-巯基乙醇 Sigma 公司; 苯甲基磺酰氟(phenyl-methylsulfonyl fluoride, PMSF) Merck 公司; N-溴代琥珀酰亚胺(N-bromosuccinimide, NBS)、焦碳酸二乙酯(Diethyl pyrocarbonate, DEPC)、乙基替-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(ethyl-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride, EDC) 中国医药集团上海化学试剂有限

公司; 超级电热恒温水浴锅 上海沪西实验仪器厂; TDL-40B 台式离心机 上海安亭科学仪器厂; 722 分光光度计 上海精密科学有限公司; 多功能光谱测量系统 (SP2558) 美国 Roper Science Inc 公司。

1.2 方法

1.2.1 L-阿拉伯糖异构酶活力测定

参照半胱氨酸-吡唑法^[9]: 将 0.1ml 适当稀释的酶液加入 0.9ml 半乳糖底物溶液(用 200mmol/L、pH7.0 的磷酸盐缓冲液配制, 底物浓度 0.5mol/L)。在 50℃ 反应 1h, 加入 0.1mol/L 盐酸终止反应。用半胱氨酸-吡唑法测定塔格糖含量, 同时以塔格糖标样建立标准曲线, L-阿拉伯糖异构酶活力单位定义为: 上述条件下, 每分钟生成 1μg 塔格糖所需的酶的物质量为 1U。

1.2.2 酶的化学修饰

取 0.2ml 酶液加入系列浓度的化学修试剂和缓冲液, 在 30℃ 保温 30min 后, 取 0.1ml 按酶活力测定方法测定残余酶活, 以用缓冲液代替修试剂且在 30℃ 保温 30min 的酶液作为对照, 其相对酶活为 100%; 此外, NBS 溶于 HAc-NaAc (pH4.6); PMSF 溶于异丙醇, 缓冲体系为 pH7.0 PBS; EDC、PCMB、2-巯基乙醇和 DEPC 溶于 PBS 缓冲液 (pH6.0); TNBS 溶于缓冲体系为 pH7.5 PBS; 所有缓冲液的浓度均为 0.05mol/L。

1.2.3 NBS、DEPC 和 PMSF 对 L-阿拉伯糖异构酶的修饰作用

30℃ 下, 用终浓度为 20、40、60、80μmol/L 的 NBS 分别与酶液作用 10、20、30、40、60min 后, 用色氨酸终止反应, 测定残余酶活性; 用终浓度为 1、2、3、4mmol/L 的 DEPC 和 10、20、30、50mmol/L 的 PMSF 分别与酶液作用 10、20、30、40、60min 后, 分别用组氨酸、丝氨酸终止反应, 测定残余酶活; 以不加修饰剂的酶液作为对照, 计算相对酶活性。由相对酶活的对数对反应时间作图得到的直线斜率即为一级反应常数, 由一级反应常数的对数对修饰剂浓度的对数作图, 得到的直线斜率即为二级反应常数^[10]。

1.2.4 底物对化学修饰的抑制作用

酶液与不同浓度的半乳糖溶液于 25℃ 作用 10min 后, 分别加入 NBS、DEPC 和 PMSF, 在 30℃ 作用 30min

后终止反应,测定残余酶活,同时以不加修饰剂的酶液作为对照,计算相对酶活。

1.2.5 NBS 修饰作用与底物对酶荧光的影响

30℃下,终浓度为50 $\mu\text{mol/L}$ 的NBS与酶液作用30min后测定其荧光,同时以不添加NBS的酶液作为对照。将酶液与3mg/ml的半乳糖在室温下作用30min后,测定与底物结合后的酶液的荧光光谱,同时以不添加半乳糖的酶液作为对照。荧光测定使用多功能光谱测量系统,激发光和发射光光谱宽均为2nm,激发波长290nm,发射波长290~400nm。

2 结果与分析

2.1 AI 的氨基酸修饰

2.1.1 NBS、DEPC 和 PMSF 对 AI 活力的影响

NBS、DEPC 在酸性条件下能选择性地修饰蛋白质中的色氨酸残基和组氨酸残基,PMSF 在中性条件下选择性地修饰蛋白质中的丝氨酸^[10]。由图1(a)、(b)可知,NBS、DEPC 的修饰对酶活力的抑制作用明显,随着修饰剂浓度增高,AI 的酶活急剧下降,很低浓度的NBS、DEPC 就可以使AI 酶活完全丧失。由此可见,AI 中的色氨酸残基和组氨酸残基对酶活性有重要影响,极有可能位于或接近AI 的活性部位。Oh 等人采用基因定点突变的方式,证明来自*Geobacillus thermodenitrificans* AI

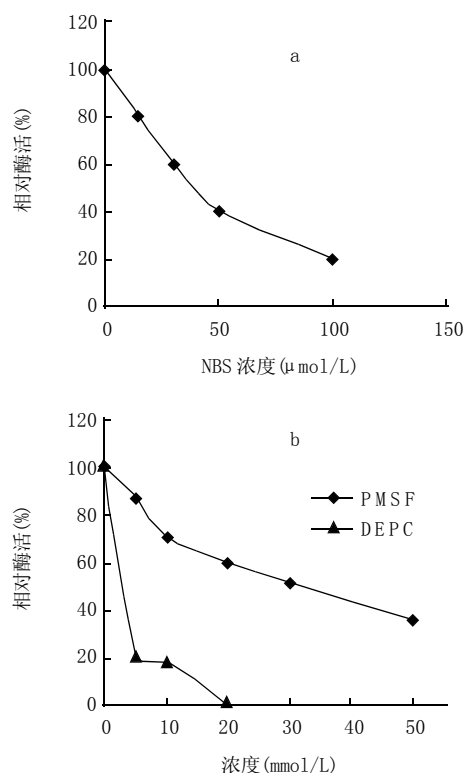


图1 NBS、DEPC 和 PMSF 对 AI 活性的影响
Fig.1 Effects of NBS, DEPC and PMSF on AI

中的色氨酸残基为其活性位点^[6]。由图1(b)可知,AI 酶活随PMSF 浓度增加成比例下降,表明AI 中的丝氨酸残基也有可能在酶的活性部位。

2.1.2 其它修饰剂AI 酶活力的影响

在PCMB、TNBS、2-巯基乙醇和EDC 对AI 的修饰测定中,由图2 可以看出,这些修饰剂的作用并没有明显改变AI 的活性,只是使得活性稍有变化,但并不是由于修饰剂作用于酶活中心,而可能是作用于酶活中心以外的其它氨基酸残基造成的,说明这些修饰剂所修饰的氨基酸,即巯基、赖氨酸、谷氨酸或天冬氨酸残基并不在AI 的活性部位,同时该酶的活性部位也不存在二硫键。

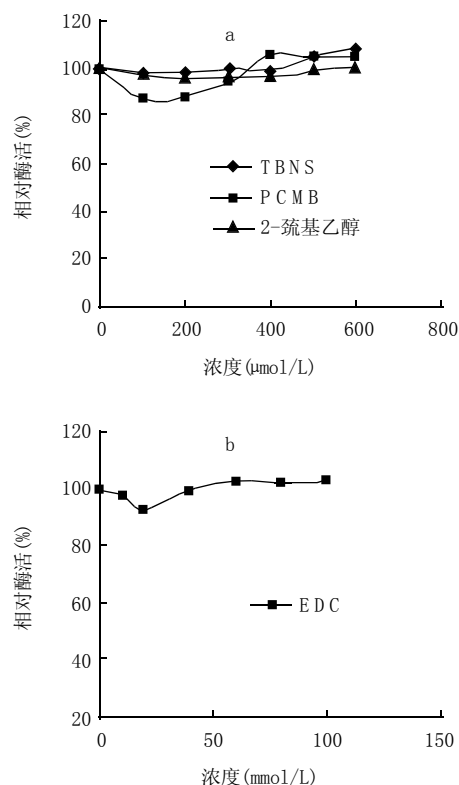
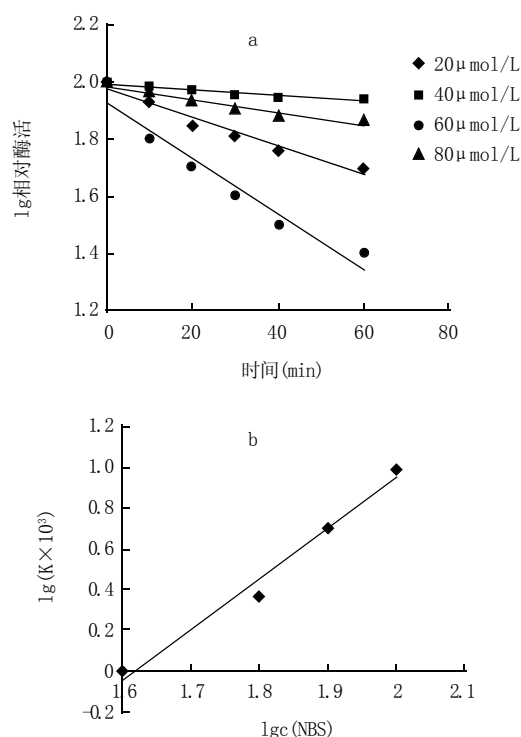


图2 TNBS、PCMB、EDC、2-巯基乙醇对 AI 活性的影响
Fig.2 Effects of TNBS, PCMB, EDC and 2-mercaptoethanol on AI

2.2 修饰剂对 AI 活性的作用

2.2.1 NBS 对 AI 活性的作用

NBS 通过氧化色氨酸残基的吲哚基,形成吲哚衍生物来完成蛋白质的修饰。图3 显示不同浓度NBS 对L-阿拉伯糖异构酶的失活作用。实验中修饰剂对于修饰的残基是过量的,故可以认为该失活反应是假一级反应,同时确保在本试验条件下,NBS 使酶失活是由于色氨酸残基被氧化,而不是肽链断裂所引起。结合Levy^[11]等人的方法,得到二级反应常数2.4 表明2 个色氨酸残基被



a. Enzyme incubated with NBS (from 20 to 80 $\mu\text{mol/L}$); b. Apparent order of reaction with respect to reagent concentration.

图3 NBS对AI活性的影响
Fig.3 Effects of NBS on activity of AI

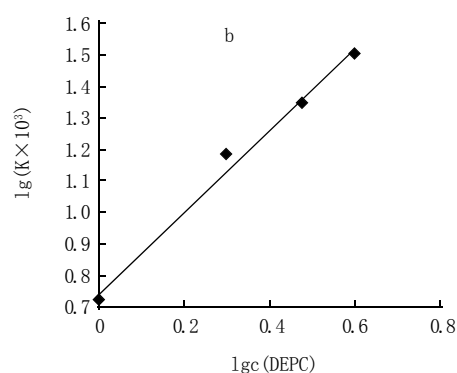
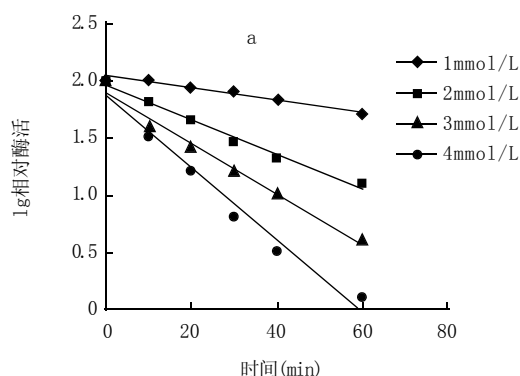
修饰而使酶失活, 所以整个酶分子中至少有两个色氨酸残基位于活性部位。

2.2.2 DEPC对AI活性的作用

由曲线可以看出, DEPC对AI的作用随时间变化, 其残余酶活的对数与时间变化成线性关系, 说明DEPC对AI的修饰也符合假一级动力学反应(图4a)。通过Levy^[11]等人的方法, 得到一级反应速度常数对DEPC浓度的双对数图(图4b), 其斜率为1.27, 表明在酶分子中至少有一个组氨酸残基处于酶的活性部位。

2.2.3 PMSF对AI活性的作用

从图5来看, 修饰反应过程分两个阶段: 第一阶段, 酶活下降较快, 原因可能是丝氨酸残基位于表面,



a. Enzyme incubated with DEPC (from 1 to 4 mmol/L); b. Apparent order of reaction with respect to reagent concentration.

图4 DEPC对AI活性的影响
Fig.4 Effects of DEPC on activity of AI

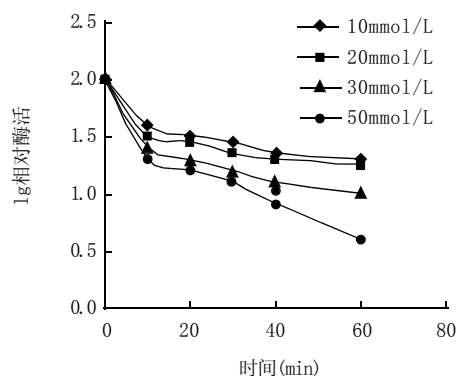


图5 PMSF对AI活性的影响
Fig.5 Effects of PMSF on activity of AI

首先被修饰, 引起酶活性位点微环境的变化; 而第二阶段修饰剂特异地与活性位点的丝氨酸残基结合, 表明至少有一个丝氨酸残基被修饰而导致了酶失活。

2.3 底物对修饰剂的抑制作用

底物保护作用是研究酶活性位点必需基团的常用方法^[10]。在用PMSF、NBS和DEPC对AI修饰之前, 先将酶与底物半乳糖溶液作用。PMSF、NBS和DEPC浓度为200 mmol/L、200 $\mu\text{mol/L}$ 和20 mmol/L。

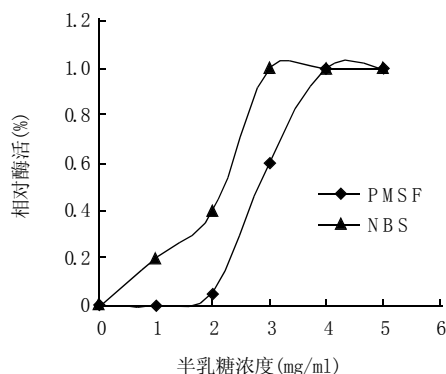


图6 底物对PMSF、NBS修饰的抑制作用
Fig.6 Substrate protection of AI against by PMSF, NBS

图6为经不同底物浓度半乳糖作用的酶化学修饰后残余酶活的变化情况。随着底物浓度增加, PMSF、NBS对酶的失活作用逐渐减小, 即底物对酶的保护作用增强; 当底物质量浓度增加到3mg/ml和4mg/ml时, 即可以阻止NBS、PMSF对酶的失活作用。由此可以推断, 底物与酶结合后, 与NBS、PMSF结合的位点被占据, 导致NBS、PMSF无法对酶进行修饰, 即色氨酸残基、丝氨酸残基处在与底物结合部位。研究还发现底物对DEPC的修饰起不到保护作用, 表明组氨酸不处在底物结合位点, 可能位于催化活性部位。

2.4 AI的荧光光谱分析

从AI的蛋白质荧光光谱图(图7)可知, AI的荧光光谱表现的是色氨酸, 最大吸收峰在330nm, 当加入3mg/ml的半乳糖, 酶的发射光谱峰红移至345nm, 峰的强度降低。根据经验性规律可以推测, 色氨酸残基可能位于酶蛋白的表面, 且位于底物结合部位。而当加入50μmol/L的NBS时, 导致荧光淬灭, 且最大吸收峰红移至340nm, 同样说明色氨酸残基可能位于酶蛋白的表面, 而且NBS对色氨酸残基的修饰, 影响到酶的分子构象的变化。

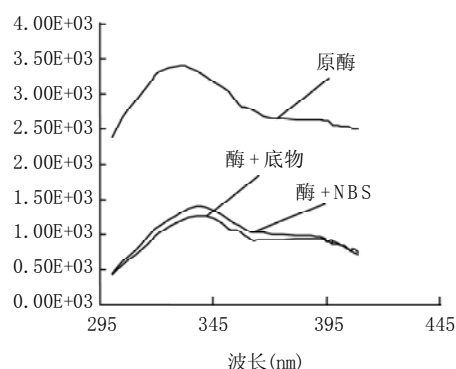


图7 NBS修饰和底物对AI荧光光谱影响

Fig.7 Effects of AI modified by NBS and substrate on fluorescence emission spectra

3 结论

通过几种蛋白质侧链修饰剂对植物乳酸杆菌L-阿拉伯糖异构酶进行化学修饰。在一定反应条件下, 该酶被EDC、TNBS、2-巯基乙醇和PCMB修饰后, 酶活

力不受影响, 说明巯基、赖氨酸残基、谷氨酸或天冬氨酸残基和巯基与酶活力无关。而该酶被NBS、DEPC和PMSF修饰后, 酶活力大幅度下降。表明有可能色氨酸残基、丝氨酸残基和组氨酸残基为酶活力的必需基团。通过修饰剂对酶活影响的分析及底物保护试验表明: 酶活性部位至少有两个色氨酸残基、一个丝氨酸和组氨酸残基, 而且组氨酸残基可能位于催化活性中心。荧光光谱分析表明色氨酸残基位于酶蛋白的表面。

参考文献:

- [1] LEVIN G V. Tagatose, the new GRAS sweetener and health product[J]. Journal of Medical Food, 2002(5): 23-36.
- [2] LU Y, LEVIN G V. Removal and prevention of dental plaque with D-tagatose[J]. International Journal of Cosmetic Science, 2002, 24: 225-234.
- [3] LEE D W, JANG H J, CHOE E A, et al. Characterization of a thermostable L-arabinose (D-galactose) isomerase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70: 1397-1404.
- [4] KIM B C, LEE Y H, LEE H S, et al. Cloning, expression and characterization of L-arabinose isomerase from *Thermotoga neapolitana*: bioconversion of D-galactose to D-tagatose using the enzyme[J]. FEMS Microbiology Letter, 2002, 212: 121-126.
- [5] JORGENSEN F, HANSEN O C, STOUGAARD P. Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: heterologous expression and characterisation of a thermostable L-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacter mathranii*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64: 816-822.
- [6] OH H J, KIM H J, OH D K. Increase in D-tagatose production rate by site-directed mutagenesis of L-arabinose isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*[J]. Biotechnology Letter, 2006, 28: 145-149.
- [7] BABU A M, MARK R C. Crystal structure of *Escherichia coli* L-Arabinose isomerase (EC4I), the putative target of biological tagatose production[J]. Journal of molecular Biology, 2006, 360: 297-309.
- [8] ZHANG H, JIANG B, PAN B L. Purification and characterization of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus plantarum* producing tagatose[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Online accession number: DOI 10.1007/s11274-006-9274-6.
- [9] DISCHE Z, BORENFREUND E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 192: 583-587.
- [10] 周海梦, 王洪睿. 蛋白质化学修饰[M]. 北京: 清华大学出版社, 1998.
- [11] LEVY H M, LEBER P D, RYAN E M. The action N-Bromosuccinimide[J]. Journal of Biological Chemistry, 1963, 238: 3654-3659.