

几种海藻中溴过氧化物酶的筛选及酶学性质

靳艳¹, 张锦友^{1,2}, 吴佩春¹, 张卫¹, 赵兴文²

(1. 中国科学院 大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023; 2. 大连水产学院, 辽宁 大连 116023)

摘要:溴过氧化物酶(BrPOD)是具有特殊功能的过氧化物酶,海藻是其主要来源。对几种中国海域的红藻如角叉菜(*Chondrus ocellatus*)、龙须菜(*Gracilaria sjoestedtii*)、珊瑚藻(*Corallina officinalis*)进行了溴过氧化物酶的藻种筛选,并对酶活较高的珊瑚藻进行溴过氧化物酶分离纯化及性质的研究。通过硫酸铵沉淀、DEAE-cellulose 52 离子交换层析、Sephadex G-100 凝胶层析等方法,从珊瑚藻中分离得到溴过氧化物酶。对该酶性质研究表明,该酶分子量较大,表观分子量为 64 kD;溴化单氯甲酮的最适 pH 值为 6.0;pH 在 5.0~9.0 时酶活性稳定;在 30~70 °C 温度范围内酶活性稳定;Ca²⁺、Co²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺、NaF 和 EDTA 等化合物使溴过氧化物酶活性下降,钒酸盐能提高酶活性。反应动力学实验表明,该酶对 Br⁻、H₂O₂ 的 K_m 分别为 7.40 mmol/L 和 96.09 μmol/L。[中国水产科学,2007,14(3):482-487]

关键词:海藻;溴过氧化物酶;分离纯化;性质

中图分类号:S986

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2007)03-0482-06

海洋天然产物中很多是含卤素的有机化合物,这些物质具有抗菌、抗肿瘤等特殊的生理活性^[1]。卤素过氧化物酶是至今惟一公认的与有机卤化物生物合成相关的酶^[2]。卤素过氧化物酶是一种特殊的过氧化物酶,不仅可使很多有机物卤化形成具有生理活性的卤素有机物,而且还具有催化硫氧化、环氧化、吲哚氧化及其他反应的作用,因其在药物合成和高附加值化合物合成方面起重要作用而引起人们越来越多的重视^[1-2]。

卤素过氧化物酶按照所利用的卤素离子分为 3 种:氯过氧化物酶(ClPOD),溴过氧化物酶(BrPOD)和碘过氧化物酶(IPOD)。氯过氧化物酶主要来源于陆地生物,溴和碘过氧化物酶主要来源于海洋生物,其中海藻是溴过氧化物酶的主要来源^[3]。海洋绿藻、红藻和褐藻都曾检测到溴过氧化物酶,季节、海域的差异会使溴过氧化物酶的性质有所改变。国外对海藻中溴过氧化物酶的研究报道较多^[4-8],但还未见有关中国海域的海藻中溴过氧化物酶的研究报道。本研究对中国黄海海域的红藻角叉菜(*Chondrus ocellatus*)、龙须菜(*Gracilaria sjoestedtii*)、珊瑚藻(*Corallina officinalis*)进行了溴过氧化物酶的筛选,并对酶活较高的珊瑚藻的溴过氧

化物酶进行分离纯化及性质的研究。旨在研究中国海藻中溴过氧化物酶的分布及活性,并且为溴过氧化物酶的开发、应用提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

角叉菜、龙须菜、珊瑚藻等于 2005 年 9~10 月采自大连黄海海域。收集的藻去除杂质后洗净,置于一70 °C 冰箱中保存备用。

1.2 试剂

DEAE-cellulose 52 (Whatman);单氯双甲酮(Monochlorodimedone, Sigma);Sephadex G-100 (Amersham Pharmacia Biotech AB);标准蛋白质分子量(上海生物工程公司);牛血清白蛋白(BSA),十二烷基磺酸钠(SDS),丙烯酰胺(ACR)、甲叉双丙烯酰胺(BIS)、双甲基乙胺(TEMED)、过硫酸铵、α 巯基乙醇、DTT、考马斯亮蓝 R250,均为国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 粗提液的制备 取 200 g 藻类(湿质量),用 1 100 mL 含 25 mmol/L H₂O₂ 的磷酸钾缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.0)在冰水浴下研磨提取。提取液在 4 °C, 6 500 r/min 离心 20 min,取上清液即为

收稿日期:2006-08-28; 修订日期:2006-12-25.

基金项目:国家 973 基础研究项目(2003CB716001).

作者简介:靳艳(1968-),女,博士,副研究员,主要从事海洋微生物、天然产物和生物催化的研究. Tel: 86-411-84379316; Fax: 86-411-84379069; E-mail: yanjin@dicp. ac. cn

粗提液。所得上清液加 80% 硫酸铵沉淀, 10 000 g 离心 10 min, 收集沉淀。沉淀用最少量的含 25 mmol/L H_2O_2 的磷酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH 6.0) 溶解, 三蒸水透析 2 h, 再用 Tris-HCl 缓冲液 (0.05 mol/L, pH 8.3) 透析过夜。取少量粗提液和透析后的酶液测定蛋白含量和酶活性。

1.3.2 DEAE-cellulose 52 离子交换层析 将透析后的酶液样品上 DEAE-cellulose 52 (3×20 cm), 用 NaCl 浓度梯度为 0.2~0.5 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (0.05 mol/L, pH 8.3) 线性梯度洗脱, 每分钟约 0.6 mL, 每管收集时间为 8 min。测定每管收集液的酶活及 280 nm 处的吸光值。将有酶活性的组分合并。

1.3.3 Sephadex G-100 凝胶柱层析 将离子交换层析所得酶液样品冷冻干燥浓缩后上 Sephadex G-100 (2×75 cm) 凝胶柱, 用 Tris-HCl (0.05 mol/L, pH 8.3) 缓冲液洗脱, 每分钟约 0.65 mL, 每管收集时间为 4 min。测定每管收集液的酶活性及 280 nm 处的吸光值, 合并有酶活性的组分。

1.3.4 溴过氧化物酶活性的测定 参照文献[8], 底物单氯双甲酮、KBr 和 H_2O_2 的浓度分别为 50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 mmol/L 和 2 mmol/L, 反应体系体积为 3 mL, pH 为 6.0, 在室温下于 290 nm 处测定吸光值的变化, 以每分钟消耗 1 μmol 单氯双甲酮所需的酶量定义为一个溴过氧化物酶活力单位。采用 Lowry 法^[9]测定样品中蛋白含量。计算酶的比活力。

1.3.5 溴过氧化物酶分子量的确定 采用不连续 SDS-PAGE^[10], 浓缩胶的浓度为 5%, 分离胶的浓度为 12%, 考马斯亮蓝 R250 染色。标准蛋白为低分子量的 Marker。

2 结果与分析

2.1 含溴过氧化物酶藻种的筛选

按照 1.3 的方法提取藻粗酶液, 测定粗酶液的溴过氧化物酶活性, 结果如表 1 所示。所测的 3 种红藻都有溴过氧化物酶活性, 其中珊瑚藻的溴过氧化物酶活性最高, 选取比活力较高的珊瑚藻的溴过氧化物酶进行分离纯化。

表 1 黄海海藻的溴过氧化物酶活性、蛋白含量和比活力

Tab. 1 BrPOD activity, protein concentration and specific activity of marine macro-alga from the Yellow Sea

项目 Item	珊瑚藻 <i>Corallina officinalis</i>	角叉菜 <i>Chondrus ocellatus</i>	龙须菜 <i>Gracilaria sjostedtii</i>
酶活性/(U·mL ⁻¹) Enzyme activity	0.037	0.015	0.014
蛋白含量/(mg·mL ⁻¹) Protein concentration	0.99	0.60	1.30
比活力/(U·mg ⁻¹) Specific activity	0.37	0.024	0.011

2.2 溴过氧化物酶的分离纯化

将珊瑚藻粗酶液依次经过 80% 硫酸铵沉淀、DEAE-cellulose 52 离子交换层析、Sephadex G-100 凝胶柱层析等步骤进行分离纯化, 各组分分别用 280 nm 吸光度法和 MCD 法检测蛋白含量和溴过氧化物酶活性。图 1 是粗酶液经 DEAE-cellulose 52 离子交换柱层析后的色谱图, 经柱分离后, 出现 2

个蛋白峰。经测定, 只有第 2 个蛋白峰具有酶活性。表 2 是经各纯化步骤后溴过氧化物酶活性的变化。由表 2 可见经过 DEAE-cellulose 52 离子交换层析柱纯化后, 酶的比活力显著提高, 将该组分再经 Sephadex G-100 凝胶柱纯化, 比活力提高了 30 倍, 得到活性较高的溴过氧化物酶, 以该组分为对象进行溴过氧化物酶性质的研究。

表 2 珊瑚藻中溴过氧化物酶纯化

Tab. 2 Purification of BrPOD from *Corallina officinalis*

纯化步骤 Purification step	总蛋白/mg Total protein	总活性/U Total activity	比活力/(U·mg ⁻¹) Specific activity	回收率/% Recovery	纯化倍数 Purification fold
粗提液 Crude extraction	1 788.8	1 736.8	1.0	100	1.0
硫酸铵沉淀 (NH ₄) ₂ SO ₄ sedimentation	1 056.6	1 147.9	1.1	66.0	1.1
DEAE-cellulose 52 离子交换层析	37.5	620.5	16.5	35.7	17.0
Sephadex G-100 凝胶柱层析	0.6	18.5	29.1	1.1	30.0

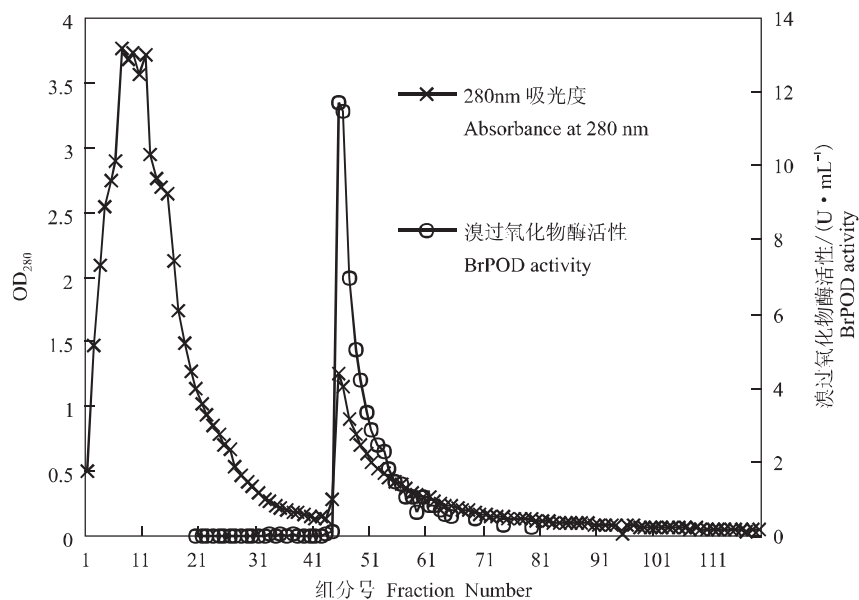


图 1 珊瑚藻粗酶液经 DE-52 层析洗脱图

Fig. 1 Chromatography of crude BrPOD extract from *C. officinalis* by DEAE-cellulose 52

2.3 溴过氧化物酶性质

2.3.1 溴过氧化物酶分子量 将纯化后的溴过氧化物酶进行聚丙烯酰胺电泳,以确定其分子量。在非变性 PAGE 电泳中溴过氧化物酶条带几乎不移动,说明该酶的分子量较大。经 SDS-PAGE 变性丙烯酰胺电泳的图谱见图 2,用标准蛋白质 Marker 与迁移率作标准曲线,可得溴过氧化物酶的表现分子量为 64 kD。文献报道溴过氧化物酶是由 12 个分子量为 64 kD 的亚基组成,其分子量约为 790 kD^[12],从分子量的数据来看,本研究提取得到的酶与文献[12]中的溴过氧化物酶分子量相吻合。

2.3.2 酶反应动力学性质 利用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法计算溴化钾和 H_2O_2 的米氏常数 K_m ,溴离子的 $K_m=7.40 \text{ mmol/L}$; H_2O_2 的 $K_m=96.09 \text{ } \mu\text{mol/L}$ (图 3)。

2.3.3 溴过氧化物酶最适反应 pH 值 在 pH 3.0~9.0 的范围内进行溴过氧化物酶催化单氯双甲酮反应,考察溴过氧化物酶溴化单氯双甲酮反应的最适 pH 范围。pH 系统为: pH 3.0~5.0, NaAc-HAc; pH 6.0~7.0, $KH_2PO_4-K_2HPO_4$; pH 8.0~9.0, Tris-HCl, 其他条件不变。以酶活最高值作为 100% 相对酶活,不同 pH 下溴过氧化物酶的活性如图 4 所示。由图 4 可见,在 pH 为 6.0 条件下具有最高的相对酶活, pH 值在 5.0~7.0 的范围内溴过氧化物酶的相对

酶活均可达到 50% 以上,低于或高于该范围酶活急剧下降。

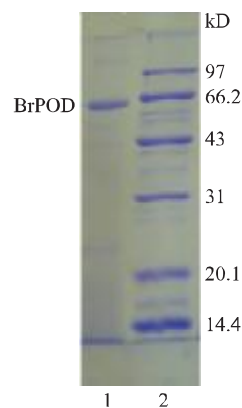


图 2 溴过氧化物酶 SDS-PAGE 电泳图

1: 纯化的溴过氧化物酶; 2: 低分子量蛋白质 Marker

Fig. 2 SDS-PAGE of purified bromoperoxidase from *C. officinalis*

1: Purified BrPOD; 2: Lower molecular weight standard protein

2.3.4 溴过氧化物酶在不同 pH 下的稳定性 为考察本研所得到的溴过氧化物酶在不同 pH 下的稳定性,将纯化的酶液与 pH 3.0~9.0 的缓冲体系相混合(缓冲体系同上), 4 °C 放置 24 h 后,取适量酶液在最佳反应条件 pH 6.0 时测定酶活。以酶活最

高值为100%,结果见图5。该酶在pH5.0~9.0的范围内能较好地保持其酶活,pH低于5.0时酶活急剧下降。由此可见该溴过氧化物酶在较宽的范围

内均可保持较高的活性,这一特性将非常有利于其在有机合成等方面的应用。

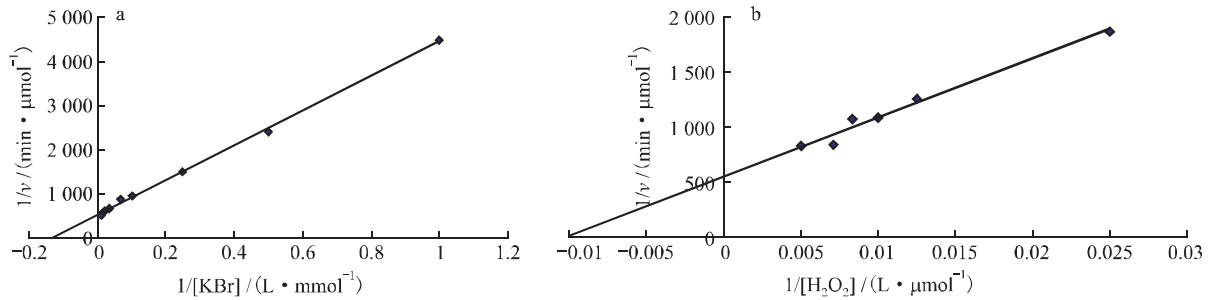


图3 溴过氧化物酶催化单氯二甲酮的 Lineweaver-Burk 双倒数图

a: 溴化钾; b: 过氧化氢

Fig. 3 Lineweaver-burk plot for the bromination of monochlorodimedone catalyzed by BrPOD

a: KBr; b: H_2O_2

2.3.5 溴过氧化物酶热稳定性 为考察温度对溴过氧化物酶活性的影响,将酶液在30~90℃温度下分别保温10 min、30 min、60 min后,测定其活性。以30℃的酶活力作为100%相对酶活,不同温度条件下酶的相对活性见图6。在30~60℃范围内溴过氧化物酶活性非常稳定,在60℃以内,保温60 min,酶活力没有下降;温度70℃时维持30 min酶活力基本不变,而60 min后酶活明显下降为原酶活的80%;80℃维持10 min酶活保持在80%,而30 min以后酶活降低到原来的40%以下;温度达90℃时,酶完全失活。

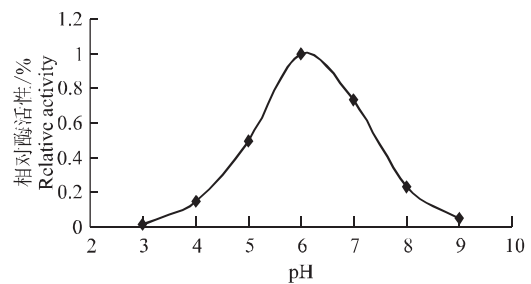


图4 pH对溴过氧化物酶活性的影响

Fig. 4 pH optimum of BrPOD from *C. officinalis*

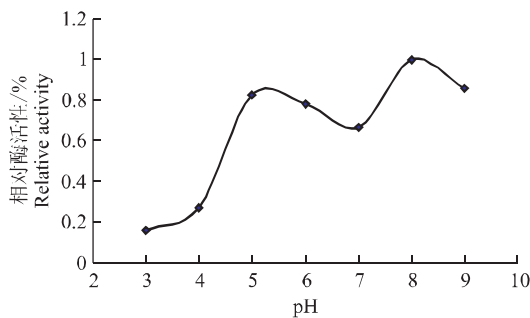


图5 不同pH值下溴过氧化物酶的稳定性

Fig. 5 Effect of pH on activity of BrPOD from *C. officinalis*

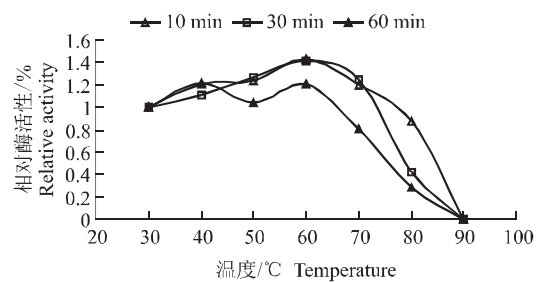


图6 溴过氧化物酶的热稳定性

Fig. 6 Effect of temperature on activity of BrPOD from *C. officinalis*

2.3.6 化合物对溴过氧化物酶活性的影响 酶反应过程中通常有其他化合物存在,为了考察各种

化合物对酶活的影响,以不加其他化合物时的酶活为100%,分别添加浓度为1 mmol/L的不同化合

物,考察各种化合物对溴过氧化物酶活性的影响,结果见表3。除钒酸盐可使溴过氧化物酶的活性提高外,其他化合物均使酶活略有下降。

表3 化合物对溴过氧化物酶活性的影响

Tab. 3 Effect of compounds on activity of BrPOD from *C. officinalis*

化合物 Compounds	溴过氧化物相对酶活性/% Relative activity of BrPOD
Na ₃ VO ₄	125
EDTA	69
MnSO ₄	85
CaCl ₂	91
Co(NO ₃) ₂	61
NaF	70
CuSO ₄	65

3 讨论

溴过氧化物酶普遍存在于海藻中,尤其以红藻居多^[7],但是酶的种类及含量也随地理位置及季节有所不同^[11]。本实验所研究的大连海域的3种红藻中均有溴过氧化物酶活性,其中珊瑚藻的溴过氧化物酶活最高。

有关珊瑚藻(*Corallina officinalis*)的溴过氧化物酶的研究已有报道^[12],本实验所得到的酶与文献报道的溴过氧化物酶在性质上基本相同:分子量较大,由多个分子量一致的亚基构成亚基分子量为64 kD,最佳pH为6.0,最佳反应温度为60℃,钒可以增强溴过氧化物酶活性,因此可以推断本研究所得到的酶即为钒-溴过氧化物酶。钒-溴过氧化物酶在有机合成中除了能够催化加卤反应外还具有催化氧化等反应的性能^[1-2,4],因此应用于有机合成的研究非常多。温度是影响化学反应速度的关键因素,钒-溴过氧化物酶在70℃仍能保持较高的活性,说明该酶具有很好的温度耐受性,具备成为工业催

化剂的潜力。钒-溴过氧化物酶分离自生活在海洋中的红藻,高盐胁迫环境下的酶具有较强的有机溶剂耐受能力,较强的有机溶剂耐受能力可扩大其在有机合成中的应用范围^[1,4]。综上所述,钒-溴过氧化物酶的性质具备工业催化剂所必需的特性力,因此研究开发其工业应用价值具有重要的科学意义和实际应用价值。

参考文献:

- [1] Dembitsky V M. Oxidation, epoxidation and sulfoxidation reactions catalysed by haloperoxidases[J]. Tetrahedron, 2003, 59:4 701—4 720.
- [2] Andersson M, Willetts A, Allenmark S. Asymmetric sulfoxidation catalyzed by a vanadium-containing bromoperoxidase[J]. J Org Chem, 1997, 62:8 455—8 458.
- [3] Almeida M G, Humanes M, Melo R, et al. Purification and characterization of vanadium haloperoxidases from the brown alga *Pilayella canaliculata*[J]. Phytochemistry, 2000, 54:5—11.
- [4] Bulter A, Carter-Franlin J N. The role of vanadium bromoperoxidase in the biosynthesis of halogenated marine natural products[J]. Nat Products Reports, 2004, 21:180—188.
- [5] Bulter A. Vanadium haloperoxidases[J]. Curr Opin Chem Biol, 1998, 2:279—285.
- [6] Itoh N, Sasaki H, Ohsawa N, et al. Bromoperoxidase in coral-line pilulifera is regulated by its vandate content[J]. Phytochemistry, 1996, 42:277—281.
- [7] Moore C A, Okuda R K. Bromoperoxidase activity in 94 species of marine algae[J]. J Nat Toxins, 1996, 5:295—305.
- [8] Itoh N, Izumi Y, Yamada H. Characterization of Nonheme Type Bromoperoxidase in *Corallina pilulifera* [J]. J Biol Chem, 1986, 261:5 194—5 200.
- [9] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193:265—275.
- [10] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [11] Almeida M, Filipe S, Huamnes M, et al. Vanadium haloperoxidase from brown algae of the Liaminariaceae family[J]. Phytochemistry, 2001, 57:633—642.
- [12] Sheffield D J, Harry T, Smith A J, et al. Purification and characterization of the vanadium bromoperoxidase from the macroalga *Corallina officinalis*[J]. Phytochemistry, 1993, 32:21—26.

Bromoperoxidase activity in three species of marine algae and the characterization of vanadium bromoperoxidase from *Corallina officinalis*

JIN Yan, ZHANG Jin-you, WU Pei-chun, ZHANG Wei, ZHAO Xing-wen

(1. Dalian Institute of Chemical and Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 2. Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: Bromoperoxidase was a kind of peroxidase which was found particularly in marine red algae. In this study, bromoperoxidase activity was detected in extracts of three species of marine red macroalgae *Chondrus ocellatus*, *Gracilaria sjoestedtii* and *Corallina officinalis* collected in the Yellow Sea. *C. officinalis* presented the highest specific bromoperoxidase activity among the three species. Bromoperoxidase was purified from the crude extract of *C. officinalis* by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sedimentation, DEAE-cellulose 52 and Sephadex G-100 chromatography. Characterization of bromoperoxidase from *Corallina officinalis* was studied. The relative molecular mass was 64 kD as determined by denature gel electrophoresis. The optimal pH for bromination was 6.0 and bromoperoxidase activity was stable as stored at pH 5.0–9.0. The bromoperoxidase of *Corallina officinalis* showed remarkable thermostability, retaining appreciable activity at 30–70 °C. Of a range of compounds, only vanadium enhanced bromoperoxidase. Kinetic studies for the bromination of monochlorodimedone (MCD) gave the K_m of Br^- and H_2O_2 as 7.40 mmol/L and 96.09 $\mu\text{mol/L}$ respectively. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 482–487]

Key words: marine algae; bromoperoxidase; purification; characterization

Corresponding author: JIN Yan. E-mail: yanjin@dicp.ac.cn