

乙醇溶液对木瓜蛋白酶催化活性的影响

初志战¹, 黄卓烈^{1*}, 巫光宏¹, 何平¹, 詹福建¹, 丘泰球²

(1. 华南农业大学生命科学学院, 广州 510642; 2. 华南理工大学食品生物工程学院, 广州 510642)

摘要:研究了乙醇溶液对木瓜蛋白酶水解酪蛋白的催化活性及构象的影响。结果表明, 木瓜蛋白酶在一定浓度乙醇溶液中水解酪蛋白的活性有显著上升。动力学测定表明木瓜蛋白酶在乙醇溶液中米氏常数(K_m)下降。差示光谱显示, 在乙醇溶液中木瓜蛋白酶的二级结构发生了变化。荧光发射光谱表明, 木瓜蛋白酶在乙醇溶液中发射峰位几乎没移动, 但发射强度明显增高。

关键词:木瓜蛋白酶; 乙醇; 酶活性; 动力学; 构象

中图分类号: Q556

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)04-0329-04

Effect of Ethanol on Catalytic Activity of Papain

CHU Zhi-zhan¹, HUANG Zhuo-lie^{1*}, WU Guang-hong¹,

HE Ping¹, ZHAN Fu-jian¹, QIU Tai-qiu²

(1. College of Life Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China;

2. College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The alterations of papain activity and conformation were studied in condition of pretreatment with ethanol solutions at different concentrations, different pretreatment times, and in condition of various reaction concentrations. The result showed that the papain activity was obviously increased and the K_m value was declined when treated with ethanol. Ultraviolet difference spectra showed that the secondary structure of papain altered in ethanol solutions. Fluorescence emission spectra showed that the peak of fluorescence emission was not shifted but the fluorescence intensity in papain increased in ethanol solutions.

Key words: Papain; Ethanol solutions; Enzyme activity; Kinetics; Conformation

生物酶作为高效的生物催化剂在工业、农业中有广泛的应用, 在二十世纪九十年代初用量就达到 650 t a⁻¹。随着自然资源的日益缺乏, 如何提高酶的活性就成为酶工程的一个重要的发展方向。传统意义上的酶催化是在水溶液中进行, 但在二十世纪六十年代就有人发现酶在有机溶剂中仍具有活性, 直到八十年代这一方面的研究才逐渐受到人们关注^[1]。经过二十多年的发展, 酶学领域也有了一个全新的分支—非水酶学。有关木瓜蛋白酶在乙醇溶液中的催化活性, 曾有过少量研究, 但主要集中在动力学方面^[2-4], 有关构象的变化方面未有进一步研究。本试验结合前人研究, 对乙醇影响木瓜蛋白酶催化水解

酪蛋白的反应条件(预处理时间、预处理浓度、反应浓度)、动力学参数及构象的变化进行了探讨, 以期找到适宜的反应条件和引起酶活性改变的原因, 为木瓜蛋白酶在生产中的应用提供科学依据。

1 材料和方法

实验采用的木瓜蛋白酶粗酶(部分纯化)、木瓜蛋白酶纯酶(结晶)、酪蛋白购于美国 Sigma 公司; 考马斯亮蓝 G250 购于 Fluka 公司; L-cys、乙醇是国产分析纯试剂。蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝法进行。木瓜蛋白酶活性测定参考陶宙镛等^[5]的方

收稿日期: 2004-10-09 接受日期: 2005-03-21

基金项目: 国家自然科学基金(10074016)资助

* 通讯作者 Corresponding author

法。木瓜蛋白酶水解酪蛋白的动力学测定参考赵武玲等^[9]的方法。一个木瓜蛋白酶活力单位(U)为在温度 37℃, pH7.0 条件下, 每分钟分解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸的酶量。酶的紫外吸收光谱和紫外差示光谱用 UV-2401pc 紫外光谱仪测定。扫描波长范围为 190–300 nm, 测定温度为 37℃。荧光发射光谱用 F-4500 荧光光谱仪测定, 天然酶荧光激发波长为 280 nm, 测定温度为 37℃。

2 结果

2.1 预处理时间的选择

酶在参与有机溶剂催化反应前一般先预处理一段时间, 使酶的分子构象发生改变, 然后再加入到反应体系, 预处理时间从几分钟到几小时不等。考虑到木瓜蛋白酶的特性以及反应的控制, 本试验的预处理时间分为 10、20、30、40 min 4 种, 酶活力的变化见图 1 (预处理、反应过程都在相同浓度乙醇的条件下)。

由图 1 可见, 在乙醇中预处理 10 min 后, 酶活力最高可上升 14.5%; 预处理 20 min 后, 10% 的乙醇溶液中反应时活力上升最高, 约为 10%; 预处理 30 min 后, 在 5% 乙醇溶液中反应活力上升最高可达 9.2%; 而预处理 40 min 后, 在 10% 的乙醇溶液中

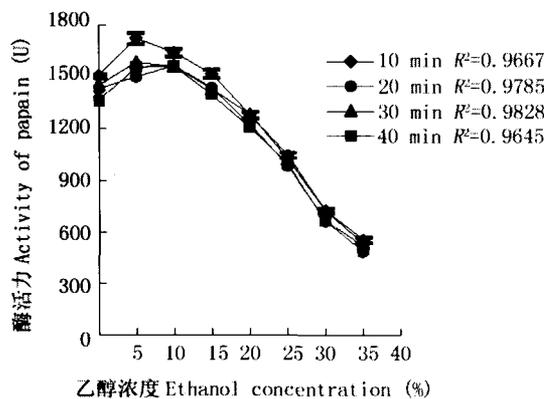


图 1 乙醇预处理不同时间对木瓜蛋白酶活性的影响

Fig. 1 Activity of papain at different time of ethanol pretreatment

反应活力可上升约 15%。当乙醇浓度大于 15% 时, 酶的活性开始低于在缓冲溶液(0%乙醇)中。当乙醇浓度升高到 30% 时, 酶活力大约只有在缓冲液中的 50%。在图 1 中, 几种预处理时间的决定系数 R^2 均超过 0.95, 方差分析结果(表 1)表明预处理时间和乙醇浓度分别对酶活影响显著, 但二者交互对酶活影响不显著。分别对上述两个因素的影响做多重比较, 结果表明: 不同预处理时间和不同反应浓度均差异显著(表略)。由于木瓜蛋白酶活性随预处理时间延长有明显下降(图 1), 因此本试验预处理时间选择 10 min。

2.2 预处理、反应过程中适宜乙醇浓度的筛选

将木瓜蛋白酶分别在 0% (缓冲液)、15%、20%、25% 的乙醇中预处理 10 min, 然后分别参与不同浓度的乙醇反应体系中反应, 以找出适当的预处理浓度。从图 2 可以看出, 在 4 种情况下进行预处理, 木瓜蛋白酶均在 10% 乙醇的反应体系中具有最高活性。但在缓冲溶液中预处理, 酶活力上升 16%, 在 15%、20%、25% 的乙醇中预处理, 酶活都提高了大约 21%。20% 乙醇预处理, 10% 乙醇反应这一体系的决定系数 $R^2=0.9593$ 。可见, 在 20% 乙醇中预处理是合适的。方差分析见表 2, 对预处理浓度和反应浓度的多重比较表明二者均差异显著(表略)。

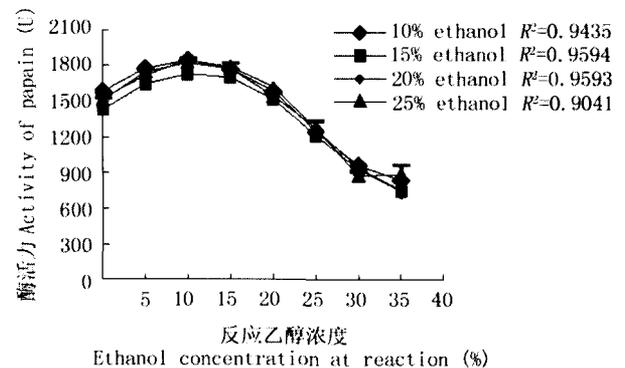


图 2 木瓜蛋白酶在不同乙醇浓度中预处理 10 min 后酶活性变化

Fig. 2 Changes in activity of papain pretreated for 10 min with ethanol at a series of concentrations

表 1 预处理时间及乙醇浓度对木瓜蛋白酶活性影响的方差分析

Table 1 Variance analysis of papain activity with different pretreatment times and different ethanol concentrations

变异源 Variation source	自由度 Freedom degree	平方和 Sum of square	均方 Mean square	F	Pr>F
乙醇浓度 Ethanol concentration	7	13983473.25	1997639.036	553.31**	0.0001
预处理时间 Pretreatment time	3	125869	41956.33333	11.62**	0.0001
浓度×时间 Concentration × time	21	58013.23	2762.534762	0.77	0.7486
误差 Error	64	231060.78	3610.324688		
总变异 Total variation	95	14398416.27			

表2 乙醇预处理浓度与反应浓度对酶活性影响的方差分析

Table 2 Variance analysis of papain activity at pretreatment and reaction with different ethanol concentrations

变异源 Variation source	自由度 Freedom degree	平方和 Sum of square	均方 Mean square	F	Pr>F
反应浓度 Ethanol concentration in reaction	7	20585208.5	2940744	506.84**	0.0001
预处理浓度 Ethanol concentration in pretreatment	3	173411.25	57803.75	9.96**	0.0001
预处理×反应 Pretreatment × Reaction	21	138585.89	6599.328	1.14	0.3189
误差 Error	128	742676.31	5802.159		
总变异 Total variation	159	21639881.9			

2.3 木瓜蛋白酶结晶纯酶在乙醇体系中的反应动力学测定

由图3可以看出,根据双倒数作图法求出缓冲体系中木瓜蛋白酶结晶纯酶的米氏常数 $K_m=2.6 \text{ mg ml}^{-1}$,最大反应速度 $V=2000 \text{ U}$ 。乙醇体系中米氏常数 $K_m=0.909 \text{ mg ml}^{-1}$,最大反应速度 $V=909.09 \text{ U}$ 。决定系数 R^2 分别为是 0.9998 和 0.9942,说明二直线有极大的可靠性。

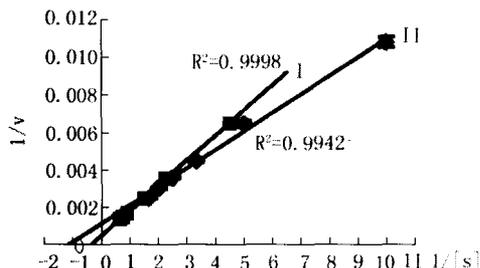


图3 木瓜蛋白酶在磷酸缓冲溶液(I)与乙醇体系(II)中动力学测定
Fig.3 Kinetics of papain in phosphate buffer solution (I) and ethanol solution (II)

2.4 木瓜蛋白酶在乙醇体系中的紫外差示光谱

图4是木瓜蛋白酶纯酶在乙醇溶液中的紫外差示光谱。在208 nm附近有一强烈正吸收峰,在210-260 nm处呈现强烈负吸收,在215 nm和236 nm处有两个负吸收峰,说明在乙醇存在时木瓜蛋白酶分子的构象会发生改变。

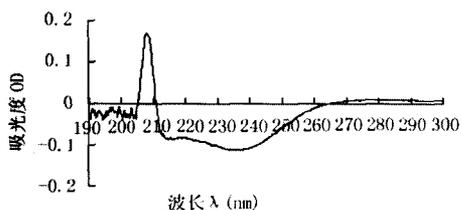


图4 木瓜蛋白酶在乙醇体系的紫外差示光谱
Fig.4 Ultraviolet difference spectra of papain with ethanol

2.5 木瓜蛋白酶在乙醇体系中的荧光发射光谱

在乙醇体系中木瓜蛋白酶的荧光发射光谱见图5。在乙醇溶液中木瓜蛋白酶的特征发射峰还是

在340 nm附近,与缓冲溶液中发射波长相比几乎没有改变,只是发射强度有所增强。

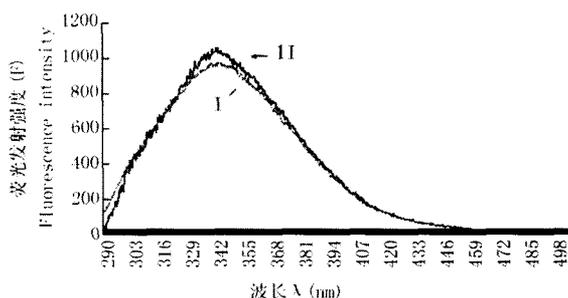


图5 木瓜蛋白酶在磷酸缓冲溶液(I)和乙醇溶液(II)中的荧光发射光谱

Fig.5 Fluorescence emission spectra of papain in phosphate buffer solution (I) and ethanol solution (II)

3 讨论

3.1 木瓜蛋白酶催化酪蛋白水解反应在乙醇中适宜条件的选择

与预处理20、30、40 min相比,木瓜蛋白酶预处理10 min后的酶活相对较高,并且在预处理和反应过程中乙醇浓度相同的条件下其最高可上升14.5% (以不经乙醇处理的酶液为对照)。当用不同浓度乙醇预处理木瓜蛋白酶时发现在一定范围内酶活性随乙醇浓度升高而增加。当乙醇浓度超过一定值后,酶活性则随之降低。这可能是由于适当高浓度的乙醇更容易改变酶的构象,使之处于一种活化的状态,内部被氧化的Cys残基能更多地接触到激活剂,然后在较低浓度的乙醇溶液中酶分子则可以更好地调整构象,使之更有利于底物接触进行催化反应。当预处理乙醇浓度超过最佳值时,它对酶构象的改变超出了酶的承受能力,虽然更有利于酶的激活但有一定的破坏作用。因此虽然也表现出一定的激活作用但活力上升幅度有所下降。当预处理的乙醇浓度过大时,它对酶所起的破坏甚至致死作用就占了主角并且很难恢复,直接表现为酶活下降甚至失活。实验发现在20%乙醇中预处理10 min,10%

乙醇中反应时的酶活可上升 21.48%。

3.2 构象分析

我们用 280 nm 波长的激发光所得到的 340 nm 左右的荧光发射光谱主要与 Trp 残基和 Tyr 残基有关。根据蛋白质 Trp 残基不连续态模型,位于疏水内核的 Trp 残基峰在 310 nm 附近,位于表面的 Trp 残基峰在 350 nm 附近, Tyr 残基峰在 300 nm 附近^[9]。每一条发射光谱都是由这几种状态的氨基酸残基共同作用的结果。从图 5 中可以看出木瓜蛋白酶在乙醇溶液中的发射峰位与在缓冲溶液中差别不大,只是发射强度有所增加,这表明,木瓜蛋白酶在乙醇溶液中构象变化有可能引起了 Trp 残基环境变化,使之处于非极性更强的环境中。由于木瓜蛋白酶中含有很多 Tyr 残基,因此也可能是由于乙醇的介入改变了酶分子环境的介电常数,引起肽链伸展,从而改变了 Tyr、Trp 残基的微环境,使得原先 Tyr 形成的氢键遭到破坏,致使处于淬灭状态的 Tyr 荧光得以恢复,并使其量子产率增加。

荧光发射光谱的变化除了考虑生色基团的微环境、空间配置关系所引起的能量转移以及其解离状态还要考虑溶剂和介质的变化等多方面因素。袁静明^[10]等在研究甲醇微扰葡萄糖淀粉酶的红外光谱中发现甲醇分子“钻进”了酶分子的内部,所以酶荧光强度的增大也可能是由于醇类对 Trp 残基荧光的直接增强效应。当然荧光强度增大也可能是由于 Trp 与 Tyr 之间的能量转移量的降低。

木瓜蛋白酶在乙醇溶液中的紫外差示光谱则进一步解释了构象的变化。Glazer and Smith^[11]曾指出 236 nm 差示吸收的变化可能和蛋白质的 α -螺旋结构的变化直接相关,许根俊^[12]曾指出 260、285 和 292 nm 的吸收峰主要与 Phe、Tyr 和 Trp 有关。从图 4 中可以看出木瓜蛋白酶在乙醇体系中 210–260 nm 左右有明显负吸收,在 205–210 nm 左右有强烈正吸收,表明酶主链二级结构在乙醇作用下发生了变化,可能是肽链无规则卷曲减少而 α -螺旋增加的结果。这和荧光分析中酶分子部分基团非极性加强相吻合。由于 Trp 在 220 nm 左右有强吸收峰,因而酶在 210–220 nm 之间的差示吸收可能与 Trp 残基微环境的改变有关。而在 208 nm 左右的强烈正吸收峰,根据陶慰孙^[13]的观点,这表明酶分子趋向无规则卷曲或者 β -折叠增加。因此在乙醇溶液中酶分子构象部分趋向于无规则卷曲,部分则趋向 α -螺旋增加。不管酶分子构象是哪部分趋向伸展,这

些变化都使酶分子构象更有利于与底物接触进行催化反应。

邹承鲁^[14]教授认为酶活性部位的柔性增加可能导致酶活性的升高。本实验证明了木瓜蛋白酶构象一定程度的改变确实能提高酶活性,但酶构象改变过程中由于酶分子中 Cys 残基与激活剂的更充分接触,是否也起到部分作用还需进一步实验。

参考文献

- [1] Wu X R(吴显荣), Zhu L Q(朱利泉). Papain [J]. Acta Agri Univ Pekinensis(北京农业大学学报), 1988, 14(1):13–17. (in Chinese)
- [2] Zaks A, Klivanov A M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvent [J]. J Biol Chem, 1988, 263(7):3194–3201.
- [3] Sun Y K(孙玉琨), Zhou C L(邹承鲁). The research of papain [J]. Prog Biochem Biophys (生物化学与生物物理进展), 1961, 1(2): 115–122. (in Chinese)
- [4] Fernandez M M, Clack D S, Blanch H W. Papain kinetics in the presence of a water-miscible organic solvent [J]. Biotechn Bioeng, 1991, 37:967–972.
- [5] Henry A C, Kirch J F. Papain-catalyzed reactions of esters with alcohols [J]. Biochemistry, 1967, 6(11):3536–3544.
- [6] Lake A W, Lowe G. The kinetic of papain and ficin catalysed hydrolyses in the presence of alcohols [J]. Biochem J, 1966, 101: 402–410.
- [7] Tao Z R(陶宙谔), Tan Z M(谭知敏), Huang R F(黄荣芳). Method for determining bromelin activity [J]. Chin J Phar Anal (药物分析杂志), 1982, 2(2):102–103. (in Chinese)
- [8] Zhao W L(赵武玲), Wu W(吴玮), Li Z M(黎藏铭). Kinetic study of fruit bromelin [J]. J Chin Agri Univ (中国农业大学学报), 1999, 4(1):11–13. (in Chinese)
- [9] Cao S G(曹淑桂), Zeng C B(曾晨波), Ding Z T(丁忠田), et al. The conformational changes of aspartase in guanidine hydrochloride denaturation [J]. Chin Biochem J (生物化学杂志), 1990, 6(5): 432–436. (in Chinese)
- [10] Yuan J M(袁静明), Zai G T(翟国堂). The UV, FTIR and fluorescence spectra of glucoamylase with solvent-perturbation [J]. Prog Biochem Biophys (生物化学与生物物理进展), 1991, 18(1): 47–50. (in Chinese)
- [11] Glazer A N, Smith E L. Studies on the ultraviolet difference spectra of proteins and polypeptides [J]. J Biol Chem, 1961, 236: 2942–2947.
- [12] Xu G J(许根俊), Zhou C L(邹承鲁). Kinetics of inactivation reactivation of trypsin in urea solutions [J]. Acta Biochem Biophys Sin (生物化学与生物物理学报), 1963, 3:450–458. (in Chinese)
- [13] Tao W S(陶慰孙). Molecular Basis of Protein [M]. Beijing: People Education Publishing, 1987. 254–262. (in Chinese)
- [14] Zhou C L(邹承鲁), Zhou J M(周筠梅), Zhou H M(周海梦). Flexibility of Enzyme Active Sites [M]. Jinan: Shandong Science & Technology Press, 2004. 178–201. (in Chinese)