

乙醇对聚半乳糖醛酸酶的活力及荧光光谱、CD 光谱的影响

张应玖 李 爽 吴柏南 刘兰英

(吉林大学分子生物学系 长春 130023)

摘要 乙醇对 PG 短时间(不超过 36h)的作用可使 PG 激活,最佳的作用时间是 24h,否则乙醇导致 PG 失活。同时测得乙醇的浓度直接影响 PG 的活力。在作用时间为 24h 时,在 20%乙醇浓度下,酶的活力最高。乙醇的作用时间及其浓度均影响 PG 的荧光光谱和 CD 光谱。这些光谱的变化与酶的活力变化显示了一致性。

关键词 乙醇,聚半乳糖醛酸酶,活力,光谱

分类号 Q93.31

乙醇作为一种有机溶剂一般为蛋白质的变性剂,但最近的酶工程研究进展表明^[1],有的酶在有机相中的催化反应反而优于在水溶液中的催化反应。这种在极端条件下的酶促反应已成为目前国内外研究的热门课题^[2~4]。

聚半乳糖醛酸酶是黑曲霉 As3.3883 经发酵后得到的胞外酶。该酶在果汁、果酒的加工中有广泛的应用价值,在食品工业中用量位居第四位,仅次于糖化酶、淀粉酶及异构酶。研究乙醇对该酶活性的影响,不仅有利于其在果酒加工工业中的应用,而且为研究酶在有机溶剂中的催化反应提供新的信息。此外,本文利用荧光光谱和圆二(CD)谱测定了该酶在乙醇溶液中的构象变化,并同步跟踪酶活力的变化,以确定酶的构象与其功能的关系。

1 材料与方法

1.1 PG 纯品的制备^[5~6]

将 PG 粗品(干粉) 1g 溶于 30ml 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.0)中,于 0~4℃ 放置 24h。离心、将上清酶液经 DEAE-Sephadex A-50、Sephadex G-100 柱层析分离,收集活力峰。聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定一条带。冻干即得 PG 纯品。

1.2 PG 的活力测定

将果胶溶液(1%)与适量的 PG 混合,按 Nelson-Somogyi^[7]法则定酶的活力。酶活力定

义: 50℃ 每分钟催化果胶分解生成 1μmol 游离半乳糖醛酸的酶量为 1 个活力单位(U)。

1.3 PG 的光谱测定

用 SPEX 1920Fluorolog(美国)测定酶的荧光光谱、激发光波长为 284nm,扫描范围为 340~380nm,酶浓度为 25μg/ml。用 J-500c Spectropolarimeter(日本)测定酶的圆二光谱,测定范围 200~280nm,酶浓度为 25μg/ml。

2 结果与讨论

2.1 乙醇作用时间对 PG 活力的影响

酶在乙醇溶液(15%)中放置不同时间后分别测定其活力,结果如图 1 所示。

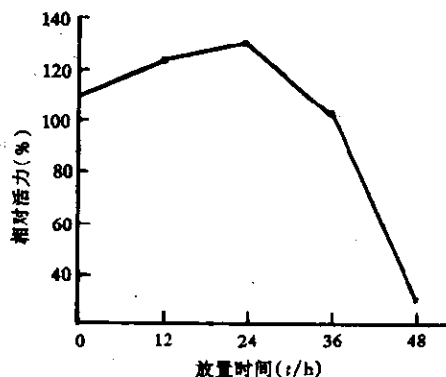


图1 乙醇作用时间对酶活力的影响

由图1可见,乙醇对酶活力的影响随时间而发生变化。在乙醇溶液中放置不超过36h时,乙醇对酶表现出不同程度的激活作用,在24h时激活作用最大(酶活力约为自然酶活力的130%)。超过36h,乙醇对酶不但无激活作用,反而表现出失活作用,使酶的活力低于自然酶,而且放置时间越长,酶活力越低。

2.2 不同浓度的乙醇对PG活力的影响

将0.1ml酶(250 μ g/ml)与不同浓度(v/v)乙醇溶液混和,放置24h后测定酶的活力,结果如图2所示。

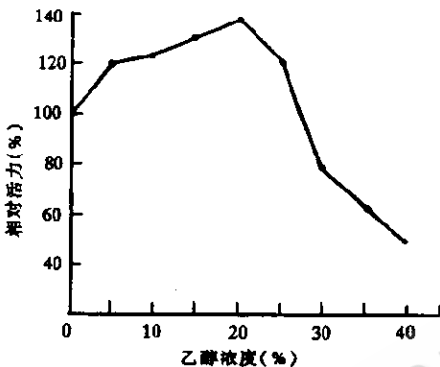


图2 不同浓度的乙醇对酶活力的影响(以自然酶的活力为100%)
酶浓度: 25 μ g/ml

由图2可见,低浓度乙醇对酶有不同程度的激活作用。当乙醇浓度为20%时,激活作用最大,约为自然酶活力的136%。高浓度的乙醇(>27%)对酶主要起失活作用,使酶活力比自然酶还低,而且乙醇浓度越大,酶的活力越低。

2.3 乙醇对PG荧光光谱的影响

2.3.1 乙醇浓度对PG荧光光谱的影响:将PG置于不同浓度(0~25%)乙醇溶液中24h后测定其荧光光谱,发现酶的荧光强度随乙醇浓度的增加而增加,而且最大发射波长略移。乙醇影响酶的荧光光谱一般有两个因素。一个因素是色氨酸残基所处的微环境发生了改变,当酶液中存在乙醇时,由于乙醇的介电常数比水小得多(乙醇的介电常数为29,水的介电常数为80),使得酶分子中色氨酸残基所处的微环境的极性变小,而且乙醇浓度越大,其极性越小,这

导致酶的发射波长逐渐移^[8]。另一个因素是酶分子在乙醇溶液中,其构象发生了变化,使得某些色氨酸残基由内埋状态变为位于酶分子表面了,从而导致其荧光发射光谱的强度加大,对图2可知,当乙醇浓度达20%时,酶的活性最高,说明此时酶的构象最利于其生物功能的发挥。

2.3.2 乙醇作用时间对酶荧光光谱的影响:将酶于20%乙醇溶液中放置不同时间后测定其荧光光谱,发现酶在乙醇溶液(20%)中放置0、12、24h时,酶的荧光强度随放置时间的延长而逐渐增加,当达24h时,其荧光强度最强。同步跟踪酶活力的变化(图1),发现也呈同样的规律,到24h时,酶的活力也最高。当放置达36h时,酶的荧光强度明显下降,但仍高于自然酶的荧光强度,图1显示此时酶的活力也发生了下降,但仍高于自然酶。继续放置达48h时,酶的荧光强度骤然增加。这是由于乙醇与酶分子接触时间较长(达48h)后,引起酶的构象发生了爆发性改变,使许多色氨酸残基暴露于分子表面,从而导致酶的荧光强度显著增加,同时也导致酶的活力丧失(图1)。由此可见,荧光光谱反映出的构象变化与酶的活力变化(图1)是相一致的。

2.4 乙醇的作用时间对酶CD谱的影响

将酶置于20%乙醇溶液中放置不同时间后测定其CD谱,发现自然酶的CD谱有一个负峰,在218nm处,这说明 β -折叠为此分子的主要构象。当酶在乙醇溶液(20%)中放置0、12h时,酶的CD谱也只有一个负峰,在212nm处,而且最大负值随着时间的延长而升高。对图1,这时酶的活力比自然酶高。继续放置达24h时,CD谱也只有一个负峰,但峰值在215nm处,而且最大负值又进一步明显升高,图1表明此时酶的活力最高。当放置达36h时,单负峰又返回到212nm处,最大负值发生了下降,酶的活力相应地也下降了,但仍比自然酶高(图1)。以上结果说明 β -折叠结构是酶分子的主要构象,也是其发挥催化功能的结构基础,而且放置24h时的构象对酶分子功能的发挥最有利。当

放置达 48h 时,酶的 CD 谱发生了较大的变化,出现了二个负峰,分别在 208nm 和 220nm 处,而且最大负值也明显升高。这说明酶的构象发生了较大的变化, β -折叠结构已不再是酶的主要构象了,图 1 表明此时酶的活力已非常低(低于自然酶)。由此可见酶的 CD 谱与酶的荧光光谱反映出的酶的构象变化是一致的,而且都与酶的活力变化(图 1)相一致。

以上结果说明,乙醇作为酶的变性剂在低浓度时对酶不产生失活作用,反而起激活作用。酶的荧光光谱和 CD 谱的变化表明,乙醇能引起酶构象改变。这可以认为是由于乙醇的介电常数较小,导致维持蛋白质分子构象及活性中心构象的一些次级键(如:氢键、疏水作用等)发生了变化,这些变化可能使酶活性中心的柔性增强,这更利于酶功能的发挥。当酶在 20% 乙醇溶液中放置 24h 时,酶的这种柔性构象最适

于酶的催化作用。这也说明酶的天然构象并不一定是酶发挥生物功能的最佳构象。

参 考 文 献

- [1] Dordick J S. *Enzyme Microb. Technol.* 1989, 11: 194~201.
- [2] 罗贵民. 生物化学与生物物理进展, 1988, 15(5): 335~337.
- [3] Chattopadhyay S, Mamdapur V R. *Biotechnol lett.* 1993, 15(3): 245~250.
- [4] Kazandjian R Z, Klivanov Alexander M. *J. Am. Chem Soc.* 1985, 107(19): 5448~5450.
- [5] 张应玖,郭慧云,王红梅等. 吉林大学自然科学学报, 1993, 2: 94~98.
- [6] 刘兰英,张应玖,郭慧云等. 吉林大学自然科学学报, 1993, 3: 106~110.
- [7] Nelson N J. *Biol Chem.* 1944, 153: 375~380.
- [8] 袁静明,翟国堂. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(1): 47~50.