

6- α -葡糖基- β -环糊精对辣根过氧化物酶性能的影响

刘 赞 陈舜雷 言 浩

(浙江工业大学生物与环境工程学院 杭州 310014)

关键词 辣根过氧化物酶(HRP) 6- α -葡糖基- β -环糊精(G- β -CD) 热稳定性 催化性能

中图分类号 Q814 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0747-03

辣根过氧化物酶(HRP, EC1.11.1.17)催化酚类及芳香胺类物质进行羟基化、氧化或聚合。这些反应在精细化学品、食品添加剂、功能性材料制备以及有机废水治理中具有重要的应用价值^[1]。但是由于在某些条件下酶的稳定性及催化活性较低,限制了其在工业中的应用范围。

酶的稳定性可以通过对酶分子所处微环境性质的调节而加以改善。实现这种作用的一种有效方法是利用一些特殊成分,如糖苷类、多元醇类,或有机溶剂与酶之间的修饰作用^[2]。有关研究显示,这些成分能够起到调节酶分子的亲水性/疏水性及空间构象,改善其催化性能及对环境稳定性的作用^[3]。

环糊精是一类环状葡聚糖化合物,分子构象呈截中空圆锥状。极性羟基和非极性糖苷氧的分布使得分子外表面具亲水性,而内部空腔呈较强的疏水性^[4]。因而,环糊精能够以非共价键结合及包络其它几何尺度、疏水性适宜的分子或其侧链基团,形成包络复合物,改变其局部构象或其表面性质^[5]。

利用这种方式对酶的构象及极性产生修饰作用,改变酶蛋白的物理、化学或生物学特性,有可能成为酶性能调节的一种具有实用价值的方法^[6]。以 β -环糊精为母体的系列物被认为更适合于酶的修饰。

有关6- α -葡糖基- β -环糊精对辣根过氧化物酶性能的影响未见研究报道。本研究以6- α -葡糖基- β -环糊精对辣根过氧化物酶进行处理,初步探讨了对酶的热稳定性及催化性能的影响,对相关因素进行了分析。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

HRP 上海丽珠东风生物技术有限公司产品, RZ~3, 比活力 ≥ 250 u/mg, MW40 kD。G- β -CD Ensuiko Sugar Refining 公司产品, MW 1.85 kD。所用试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 G- β -CD 对 HRP 的处理——饱和溶液法:将在 30 $^{\circ}$ C 下饱和的 G- β -CD 溶液按不同摩尔比加入含 HRP 浓度为 7.0 mg/mL 的 0.1 mol/L, pH7.5 的磷酸盐缓冲液中,在

20 $^{\circ}$ C 下混合 0.5 h。然后继续在 10 $^{\circ}$ C 下混合 2 h。使用前以缓冲液调整酶浓度为 3.5 mg/mL。

1.2.2 HRP 活力测定^[7]:反应体系含有 0.1 mL 30 mmol/L 愈创木酚, 0.1 mL 3.5 mg/mL HRP。以缓冲液补充至 2.9 mL。加入 0.1 mL 0.01 mol/L H₂O₂ 引发反应。反应温度为 25 $^{\circ}$ C, 反应时间为 3 min。取样,在 93 $^{\circ}$ C 水浴中经 1 min 灭酶,迅速冷却至 25 $^{\circ}$ C。8 000 g 条件下离心 10 min,取上清液。分别测定原溶液和上清液的 A₄₇₀ 值,计算两者间差值 ΔA_{470} 。酶活力 A 定义为每毫克酶每分钟内产生的 ΔA_{470} 值,天然酶的活力为 A₀。以 A/A₀ 表示相对活力值。

1.2.3 HRP 热稳定性测定:取 3.5 mg/mL, pH7.5 的 HRP 溶液 1 mL 放入薄壁试管中,75 $^{\circ}$ C 条件下保温。于预定时间取样,迅速降温至 25 $^{\circ}$ C。测定酶活力 A,不经处理的酶的活力做为对照值 A'₀。以 A'/A'₀ 表示相对活力值。

1.2.4 pH 对 HRP 影响的测定:以磷酸盐或乙酸盐缓冲液调节体系的 pH, pH 变化范围为 4.0~9.0。25 $^{\circ}$ C 下放置 90 min,测定酶活力 A'',天然酶在 pH7.0 条件下的活力做为对照值 A''₀。以 A''/A''₀ 表示相对活力值。

2 结果与讨论

2.1 [G- β -CD]/[HRP] 对 HRP 活性的影响

不同 [G- β -CD]/[HRP] 处理的酶活性测定结果见图 1。

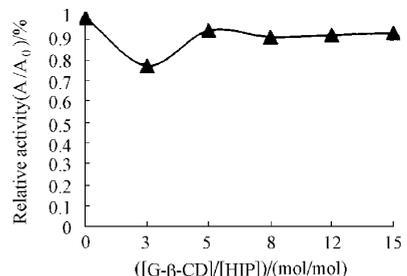


图 1 [G- β -CD]/[HRP] 对 HRP 活性的影响

处理后的 HRP 的活性有所降低,这一效应在 [G- β -CD]/[HRP] 摩尔比为 3 左右时较为显著。然后,酶活性随这一浓度比增加而恢复,这一比值为 5 时得到较好的综合效果。除另有说明外,以下实验均选择这一条件。

随 $[G-\beta-CD] / [HRP]$ 的增加,对酶活性的影响逐渐趋于平衡。这是由于酶蛋白分子表面可与 $G-\beta-CD$ 作用的基团是有限的,并且酶蛋白分子的构象只在某种状态下才对应着较高的活力^[8]。

2.2 经处理 HRP 的热稳定性

在 $T = 75^\circ C$ $pH 7.5$ 条件下 HRP 的活性随时间 t 的实验结果如图 2。

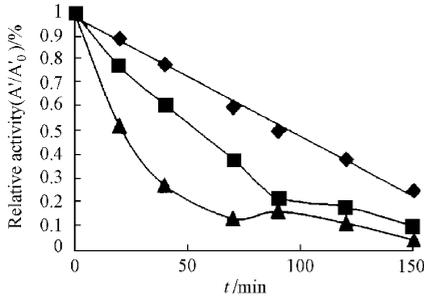


图 2 $[HRP]$ 的热失活曲线

$[G-\beta-CD] / [HRP]$ (▲) Native HRP (■) (◆)

与 HRP 发生作用的 $G-\beta-CD$ 通过对酶分子疏水性侧链基团的包络作用稳定酶分子构象。因此,降低了因体系条件改变而产生的酚分子变性失活的程度。

利用 $t_{1/2} = \ln 2 / k$ 求出不同 $[G-\beta-CD] / [HRP]$ 条件下酶的表观热失活常数 k ,如表 1。

表 1 表观热失活常数 k 的计算值 (min^{-1})

$k \times 100$	$[G-\beta-CD] / [HRP]$ (mol/mol)						
	Native HRP	3	5	8	12	15	20
	1.03	0.79	0.69	0.61	0.59	0.58	0.57

由此可知,当 $[G-\beta-CD] / [HRP]$ 为 5 时, k 出现较大程度降低,而进一步增加对 k 影响的程度逐渐减小。

2.3 pH 对经处理 HRP 活性的影响

在 $25^\circ C$,天然酶及经处理酶在不同 pH 相对于天然酶在 $pH 7.0$ 条件下的活性变化如图 3。

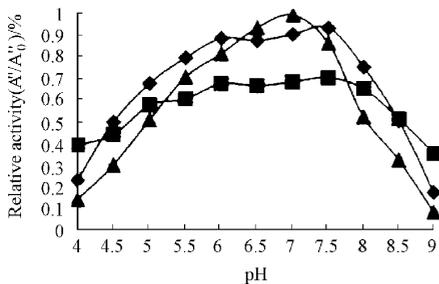


图 3 pH 对 HRP 活性的影响

$[G-\beta-CD] / [HRP]$ (▲) Native HRP (■) (◆)

经处理酶的最适 pH 为 7.5,与天然酶相比,向碱性方向移动 0.5 个 pH 单位,并且 pH 对酶活性的影响降低。其中在 $pH 5.6$,即 HRP 的等电点处酶活性的变化较小。

$G-\beta-CD$ 的作用使得酶对 pH 变化的稳定范围变宽,最适 pH 向碱性移动。虽然处理作用使酶的活力略有降低,但在偏

离最适 pH 处有较大幅度的改善,加大了相应的 pH 调节范围。

2.4 $G-\beta-CD$ 对 HRP 反应动力学特性的影响

在不同愈创木酚浓度条件下测定反应初速度,做 $[S] / [V] - [S]$ 曲线,如图 4。

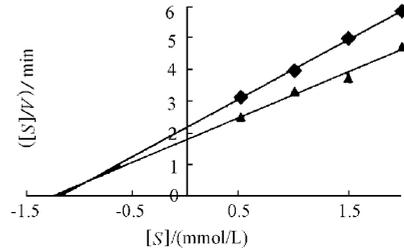


图 4 $[S] / [V] - [S]$ 曲线

(▲) Native HRP (◆) Modified HRP

反应体系中 H_2O_2 浓度远大于愈创木酚浓度,反应过程对愈创木酚满足单底物不可逆酶促反应。由于 $G-\beta-CD$ 与 HRP 的摩尔浓度比远大于 1,酶分子主要以包络复合物的形式存在。包络复合物的形成影响酶活性中心的性质,催化动力学特性出现相应改变。

2.5 反应动力学参数的变化

对于不可逆酶促反应,有

$$\frac{[S]}{V} = \frac{[S]}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}}$$

由最小二乘法计算 K_m 及 V_{\max} 结果列于表 2。

表 2 反应动力学参数计算值

	K_m (mmol/L)	V_{\max} (mmol/min \cdot L $^{-1}$)
Native HRP	1.35	72.8
Modified HRP	1.37	59.7

$G-\beta-CD$ 的包络作用使得酶的 V_{\max} 降低,其值为天然酶的 82%,而对 K_m 没有明显影响。 $G-\beta-CD$ 的作用符合非竞争性、非专一性抑制^[9],即不影响酶与底物的结合及平衡。

2.6 反应过程热力学分析

测定不同温度下酶的反应速率常数 k 。在实验温度范围内 k 与温度之间符合 Arrhenius 方程

$$-\ln k = \frac{E_a}{RT} + C$$

图 5 给出利用实验数据做出的 $-\ln k \sim 1/T$ 变化曲线。

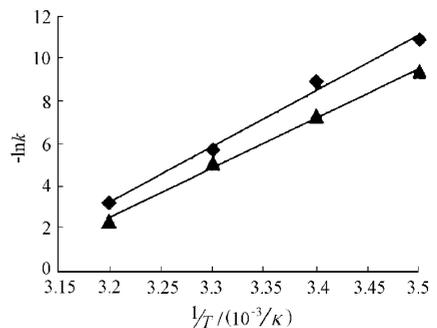


图 5 $-\ln k \sim 1/T$ 曲线

(▲) Native HRP (◆) Modified HRP

从曲线斜率计算得到处理酶和天然酶的反应活化能分别为 $E_a = 53.9 \text{ kJ/mol}$, $E_a = 48.5 \text{ kJ/mol}$ 。这一结果证明, G- β -CD 对 HRP 的影响是通过增加反应活化能,降低最大反应速度实现的。

参 考 文 献

- [1] Courteix A, Bergei A. *Enz Microb Technol*, 1995, **17**: 104~110
- [2] Combes D, Yoovidhya T, Girbal E. *Ann N Y Acad Sci*, 1987, **501**: 58~62
- [3] Takahashi K. *Biotechnol Lett*, 1984, **6**: 765~770
- [4] Anonymous. *Food Eng*, 1987, **July**: 36~37
- [5] Shiraishi T, Nakagawa T, Sakano Y. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 1992, **39**(2): 197~199
- [6] Hiroyuki I, Masayuki O, Masahiro O. *J Biochem*, 1993, **113**: 93~96
- [7] Durliat H, Courteix A, Comtat M. *J Mol Catal*, 1992, **75**: 357~369
- [8] Gianfreda L, Scarfi M R. *Mol Cell Biochem*, 1991, **100**: 97~128
- [9] Bailey J, Ollis D F. *Biochemical engineering fundamentals*(2nd ed.), New York, McGraw-Hill Book Co, 1986, pp124~129

The Effects of 6- α -glucosyl- β -cyclodextrin on the Characteristics of Horseradish Peroxidase

LIU Lin CHEN Shun-Lei YAN Hao

(College of Biological & Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014)

Abstract The effects of 6- α -glucosyl- β -cyclodextrin (G- β -CD) on the thermostability and catalytic characteristics of horseradish peroxidase (HRP) were studied using the residual activity method. The results indicated that the mole ratio of [G- β -CD] [HRP], pH and modification time were of the main factors. The optimum comprehensive results were achieved under the condition of [G- β -CD] [HRP] = 5, pH 7.5, stirred 0.5h under 20 $^{\circ}\text{C}$ and then 2h under 10 $^{\circ}\text{C}$ continuously, which corresponding to that enzyme gained 89% of the native activity. The apparent constant of heat inactivation k drop to 67% of the original value under 75 $^{\circ}\text{C}$. G- β -CD showed nonspecific noncompetitive inhibition effect. The kinetic parameters calculated using experiment data indicated that K_m was no change and V_{max} decreased to about 82% of the native enzyme. The apparent activation energy increased 11.15%. The pH range for higher activity got extended and optimum pH shifted toward alkaline range.

Key words Horseradish peroxidase (HRP) 6- α -Glucosyl- β -cyclodextrin (G- β -CD), thermostability, catalytic characteristics