

醇类有机溶剂对木瓜蛋白酶催化活性的影响机理

初志战^{1,3}, 陈纪鹏², 刘小林^{*2}, 黄卓烈^{1,3}, 黄磊⁴

(1. 华南农业大学 生命科学院, 广东 广州 510642; 2. 宜春学院, 江西 宜春 336000; 3. 广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室, 广东 广州 510642; 4. 宜春中学, 江西 宜春 336000)

摘要: 为了探索木瓜蛋白酶在有机溶剂中的催化机理和活力变化, 为其工业应用打下基础, 研究了在 4 种不同有机溶剂极性系数的醇类单相共溶体系中, 木瓜蛋白酶水解酪蛋白的催化活性及木瓜蛋白酶构象的变化。结果表明: 木瓜蛋白酶在体积分数 15% 丙二醇和体积分数 8% 正丙醇的溶液中水解酪蛋白的活性分别上升 20.1% 和 17.8%, 在乙二醇和丙三醇体系中则酶活力显著下降。动力学测定表明, 木瓜蛋白酶在 4 种有机介质中水解酪蛋白的米氏常数 K_m 与 V_{max} 均明显下降。差示光谱和荧光发射光谱表明, 体积分数 40% 丙三醇可使木瓜蛋白酶含有 Trp 残基区域的空间结构趋向更紧密, 而在体积分数 15% 丙二醇和体积分数 10% 乙二醇体系中, 无规则卷曲或者 β -折叠增加的区域很少包含 Trp 残基。

关键词: 木瓜蛋白酶; 有机溶剂; 酶活力; 动力学; 构象

中图分类号: Q 556 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)10—1112—04

Effect on Catalytic Activity and Conformation of Papain with Four Kinds of Organic Solvent

CHU Zhizhan^{1,3}, CHEN Jipeng², LIU Xiaolin^{*2}, HUANG Zhuolie^{1,3}, HUANG Lei⁴

(1. College of Life Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China; 2. Yichun University, Yichun 336000, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms, Guangzhou 510642, China; 4. Yichun Middle School, Yichun 336000, China)

Abstract: The alterations of papain activity and conformation were studied in four kinds of organic solvent, which are propanediol, glycerol, propanol and ethanediol. The result showed that the papain activity increased 20.1% in 15% propanediol, increased 17.8% in 8% propanol and decreased obviously in glycerol and ethanediol. The value of K_m and V_{max} was declined when treated with four kinds of organic solvent. Ultraviolet difference spectra and Fluorescence emission spectra showed that the secondary structure of papain altered in four kinds of organic solvent. The papain structure containing Trp residue was in a stronger non-polar environment in 40% glycerol, while the papain structure where coil and sheet increase contains little Trp residue in 15% propanediol and 10% ethanediol.

Keywords: papain, organic solvent, enzyme activity, kinetics, conformation

收稿日期: 2014-03-05

作者简介: 初志战(1977—), 男, 广东广州人, 理学博士, 讲师, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: chubenz@scau.edu.cn

* 通信作者: 刘小林(1966—), 男, 江西高安人, 理学博士, 教授, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: 13507058860@163.com

由于绝大多数酶为水溶性生物大分子,因此,一般认为酶只能在水溶液中发挥其催化功能,有机介质会使酶活性下降甚至丧失。有机介质中水的含量不仅影响酶的空间构象、酶的催化活性、酶的稳定性、酶的催化反应速度,还与酶催化作用的底物和反应产物的溶解度有关。对于许多在水介质中难溶或不溶的有机化合物来说,水并不是一种适宜的溶剂,因此水溶液也可能不是最佳的反应体系。1984年 Zaks A 和 Klibanov A.M 首次发表了关于非水相介质中脂肪酶的催化行为及热稳定性的研究报道,指出酶可以在水与有机溶剂的互溶体系中进行催化反应^[1]。近年来的研究发现^[2-3],许多酶不仅可以在有机介质中发生催化反应,而且相对比水溶液中有很多优点,如:①不易溶于水的底物在有机介质中可能会有良好的溶解性,因此可以取得高效催化;②在有机介质中底物发生的副反应及产物抑制会大大减少;③酶的热稳定性增强等。

木瓜蛋白酶广泛应用于工业、农业、医药等多个行业。近年来,木瓜蛋白酶在有机介质中的研究主要集中在两相体系中的合成催化,例如在水和乙酸乙酯两相体系中合成二肽甜味剂 APM (Aspartame) 和 Leu-脑啡肽前体二肽 BOC-Phe-Leu-OMe^[4-5]。目前,反应介质对酶的影响机理和系统分析还处于摸索阶段,单相共溶体系对木瓜蛋白酶的研究偶有报道,但不够深入和系统。因此,为了探索木瓜蛋白酶在有机溶剂中的催化机理和活力变化,为其应用打下基础,作者研究了在 4 种不同有机溶剂极性系数的醇类单相共溶体系中,木瓜蛋白酶水解酪蛋白的催化活性及木瓜蛋白酶构象的变化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

木瓜蛋白酶(粗酶、结晶纯酶)、酪蛋白:购于美国 Sigma 公司;考马斯亮蓝 G250:购于 Fluka 公司;其余试剂为国产分析纯。

1.2 研究方法

蛋白质质量分数的测定采用考马斯亮蓝法进行^[6]。木瓜蛋白酶活性测定与动力学测定参考陶宙谔等^[7]的方法。

木瓜蛋白酶活力单位(U)定义:温度 37 ℃,pH 7.0 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 ℃。

动力学测定、紫外差示光谱、荧光发射光谱采用结晶纯酶;其余测定采用木瓜蛋白酶粗酶。

2 结果与分析

2.1 木瓜蛋白酶在 4 种溶剂中的活力变化

木瓜蛋白酶在 4 种溶剂中的活力变化趋势有所不同。在 1,2-丙二醇和正丙醇溶液中,随着有机介质浓度的提高,木瓜蛋白酶活力先升后降,在丙三醇中酶活力缓慢下降,在乙二醇中则下降剧烈。与水溶液相比,木瓜蛋白酶在体积分数 15% 丙二醇中活力可提高约 20.1%;在体积分数 8% 正丙醇中可提高约 17.8%;在体积分数 10% 的乙二醇中活力下降了 57.1%;在体积分数 40% 丙三醇中活力下降了 51.6%(图 1)。因此木瓜蛋白酶在 4 种介质中的动力学测定、差示光谱和荧光光谱测定所采用的体积分数为 8% 正丙醇,15% 丙二醇,10% 的乙二醇,40% 丙三醇。

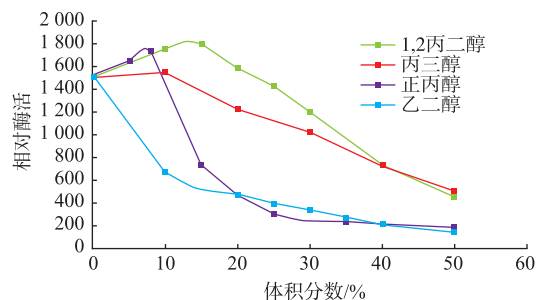


图 1 木瓜蛋白酶在 4 种溶剂中的酶活力变化

Fig. 1 Activity of papain in four kinds of organic solvent

2.2 木瓜蛋白酶在四种溶剂中的反应动力学测定

通过双倒数作图法可以得出木瓜蛋白酶在 4 种有机介质及水溶液中的 K_m 和 V_{max} (图 2),具体结果见表 1。通过动力学测定结果可以看出,与水溶液相比,木瓜蛋白酶在 4 种有机介质中的 K_m 与 V_{max} 均出现不同程度的下降。 K_m 的下降在一定意义上表明酶与底物的亲和力更高,而 V_{max} 的降低则表明在此种浓度的有机介质中,酶催化的最高活力是降低的。通过图 2 及表 1 还可发现体积分数 8% 的正丙醇与体积分数 40% 丙三醇对木瓜蛋白酶的影响类

似反竞争性抑制, K_m 与 V_{max} 均下降相同倍数。

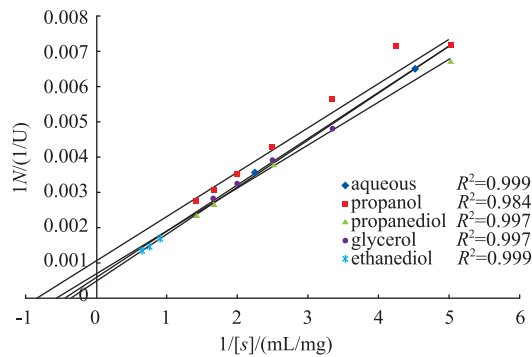


图 2 木瓜蛋白酶在 4 种有机介质及水溶液中动力学测定
Fig. 2 Kinetics of Papain with four kinds of organic solvent and aqueous solution

表 1 木瓜蛋白酶在 4 种有机介质及水溶液中的动力学参数
Table 1 Kinetics parameters of Papain with four kinds of organic solvent and aqueous solution

反应介质	K_m /(mg/mL)	V_{max} /U
水溶液	2.6	2 000
体积分数 8% 正丙醇	1.3	1 000
体积分数 15% 丙二醇	1.71	1 428.57
体积分数 10% 乙二醇	1.0	909.09
体积分数 40% 丙三醇	2.167	1 666.67

2.3 木瓜蛋白酶在 4 种溶剂中的紫外差示光谱

从图 3 可以看出,木瓜蛋白酶在体积分数 15% 丙二醇和体积分数 10% 乙二醇的体系中,在 208 nm 处均有一个较高的正峰;在体积分数 8% 正丙醇体系中则没有明显正峰与负峰;在体积分数 40% 丙三醇体系中,在 210 nm 处有一尖锐的负峰,在 240 nm 处,也有一个较平缓负峰。

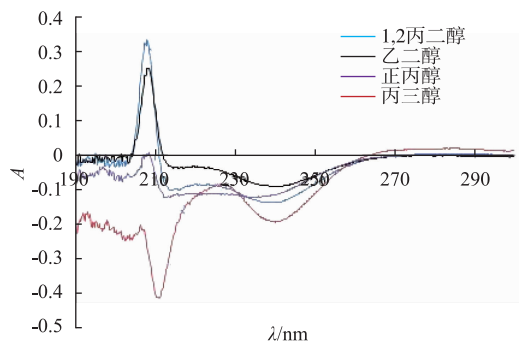


图 3 木瓜蛋白酶在 4 种有机介质中的紫外差示光谱
Fig. 3 Difference ultraviolet spectra of papain with four kinds of organic solvent

2.4 木瓜蛋白酶在 4 种溶剂中的荧光发射光谱

从图 4 可以看出,木瓜蛋白酶在缓冲溶液和四种有机介质中的荧光发射光谱峰图比较相似,峰值也比较接近。除了丙三醇体系,木瓜蛋白酶在体积分数 8% 正丙醇、体积分数 15% 丙二醇体系和体积分数 10% 乙二醇体系中的荧光发射强度均比在缓冲溶液中有所增加;木瓜蛋白酶在 4 种介质中的发射峰位均发生小幅蓝移。

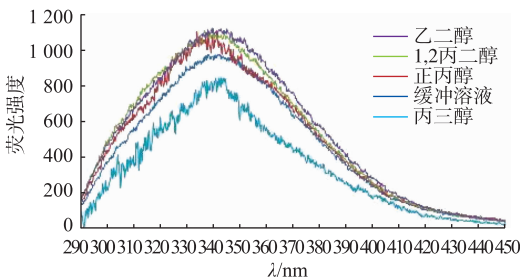


图 4 木瓜蛋白酶在 4 种有机介质及缓冲溶液中的荧光发射光谱

Fig. 4 Fluorescence emission spectra of papain with four kinds of organic solvent

表 2 木瓜蛋白酶在 4 种有机介质中的荧光发射光谱参数
Table 2 Fluorescence parameters of papain with four kinds of organic solvent and aqueous solution

溶液体系	发射峰位/nm	荧光强度
水溶液	342.4	975.44
体积分数 8% 正丙醇	338.2	1 100.2
体积分数 15% 丙二醇	336.6	1 109.72
体积分数 10% 乙二醇	339.4	1 121.58
体积分数 40% 丙三醇	340.6	846

3 结 语

木瓜蛋白酶是一个单亚基酶,其二级结构由 4 个 α -螺旋和一个 β -折叠构成。木瓜蛋白酶在体积分数 15% 丙二醇、体积分数 10% 乙二醇和体积分数 40% 丙三醇中的空间构象有较大改变,其中,在体积分数 15% 丙二醇和体积分数 10% 乙二醇体系中,208 nm 处的强烈正峰表明酶分子趋向无规则卷曲或者 β -折叠增加^[8];在体积分数 40% 丙三醇体系中,210 nm 处的强烈负峰则表明是无规则卷曲减少或者 α -螺旋增加的结果;而在体积分数 40% 丙三醇体系中,240 nm 处负峰进一步表明 α -螺旋结构的确有所增加^[9];体积分数 8% 正丙醇对酶的空间构想改变并不剧烈。

蛋白质对紫外光的有强烈光吸收,其中 Trp、Tyr 的吸收峰在 280 nm;Phe 的吸收峰在 257 nm。根据蛋白质 Trp 残基不连续态模型,位于疏水内核的 Trp 残基发射峰在 310 nm 附近,位于表面的 Trp 残基发射峰在 350 nm 附近。Tyr 的残基吸收峰在 300 nm 附近。木瓜蛋白酶由 212 个氨基酸残基组成,其中含有 19 个 Tyr 残基,5 个 Trp 残基。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 残基有关。木瓜蛋白酶在 4 种溶剂中的发射峰位均向低波长移动,这表明,木瓜蛋白酶在 4 种溶剂中的 Trp 残基处于非极性更强的环境中,也

就是说木瓜蛋白酶含有 Trp 残基区域的空间结构趋向更紧密,这与体积分数 40% 丙三醇差示光谱的分析结果一致;而在体积分数 15% 丙二醇和体积分数 10% 乙二醇体系中,综合差示结果可知,无规则卷曲或者 β -折叠增加的区域很少包含 Trp 残基。

通过酶活力试验和动力学参数测定实验说明,一定浓度的有机溶剂可以提高酶活力,增加酶与底物的亲和力,但是最高反应速度会降低。在正丙醇和丙二醇中,酶活性有所上升,而在丙三醇和乙二醇中酶活性下降迅速。

参考文献:

- [1] Zaks A, Klibanov A M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvent [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1984, 263(7): 3194-3201.
- [2] Diaz-Garcia M E, Valencia-Gonzalez. Enzyme catalysis in organic solvents; a promising field for optical biosensing[J]. **Talanta**, 1995(42): 1763-1773.
- [3] Bracey E, Stenning R A, Brooker B. Relating the microstructure of enzyme dispersions in organic solvents to their kinetic behavior[J]. **Enzyme Microb Technol**, 1998(22): 147-151.
- [4] 王旭, 张学忠, 陈松明, 等. 在有机介质中用固定化木瓜蛋白酶合成生物活性短肽的研究[J]. **生物化学杂志**, 1995, 11(5): 622-624.
WANG Xu, ZHANG Xuezhong, CHEN Songming, et al. Research on the synthesis of the bioactive peptide using immobilized papain in the organic medium[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1995, 11(5): 622-624. (in Chinese)
- [5] 姚文兵, 吴梧桐, 黄岩山, 等. 用木瓜蛋白酶在两相系统中合成二肽甜味剂 Aspartame[J]. **中国药科大学学报**, 1994, 25(6): 364-368.
YAO Wenbing, WU Wutong, HUANG Yanshan, et al. Synthesis of dipeptide sweetener Aspartame by papain in a two-phase system[J]. **Journal of China Pharmaceutical University**, 1994, 25(6): 364-368. (in Chinese)
- [6] 黄卓烈. 生物化学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009: 86-87.
- [7] 陶宙镨, 谭知敏, 黄荣芳. 菠萝蛋白酶活力测定方法的改进[J]. **药物分析杂志**, 1982, 2(2): 102-103.
TAO Zhouong, TAN Zhimin, HUANG Rongfang. Method for determining bromelain activity [J]. **Chin J Phar Anal**, 1982, 2(2): 102-103. (in Chinese)
- [8] 陶慰孙. 蛋白质分子基础[M]. 北京: 人民教育出版社, 1987: 254-262.
- [9] Glazer A N, Smith E L. Studies on the ultraviolet difference spectra of proteins and polypeptides[J]. **J Biol Chem**, 1961, (236): 2942-2947.