

超声波对海芋过氧化物酶催化活性影响的机理

许可, 黄卓烈, 邱桂英, 巫光宏, 詹福建, 何平

(华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:从海芋叶中分离和纯化过氧化物酶(POD),研究了不同参数超声波对其活性作用效果.结果表明,经不同频率、功率超声波处理不同时间后,酶活性均比未经超声波处理的活性低.将粗酶经硫酸铵分级沉淀、透析、DEAE-纤维素离子交换柱层析,在聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱上显示出1条蛋白带.对纯酶进行动力学分析,结果表明,超声波处理后,POD的 K_m 值变大,而 v_{max} 值变化不大,说明超声波处理使酶与底物的亲和力降低.紫外吸收光谱、紫外差示光谱和荧光发射光谱的研究进一步表明,超声波处理使酶分子的构象发生变化,从而导致酶活性的改变.

关键词:超声波; 过氧化物酶(POD); 动力学; 光谱

中图分类号:Q55

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2007)04-0060-05

Effect of Ultrasound on the Activity of Peroxidase from *Alocosia macrorrhiza* Leaves and the Mechanism

XU Ke, HUANG Zhuo-lie, QIU Gui-ying, WU Guang-hong, ZHAN Fu-jian, HE Ping

(College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to investigate the effects and action mechanism of ultrasound on activity of peroxidase (POD), the enzyme was isolated from the leaves of *Alocosia macrorrhiza* and purified. The effects of ultrasound on the activity of the extracted enzyme were investigated with a variety of parameters of ultrasound. The results showed that when POD was disposed in ultrasound with different treatment, the activity of enzyme were lower than that of the enzyme not disposed in ultrasound. Further purified by ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography on DEAE-cellulose, the single enzyme strap could be seen on the polyacrylamide gel electrophoresis diagram. The kinetics analysis showed that K_m increased while v_{max} changed slightly after ultrasonic treatment. It indicated that the affinity of POD to its substrate decreased after being disposed in ultrasound. Analysis of ultraviolet absorption spectrum, ultraviolet differential spectrum and fluorescence emission spectrum of the enzyme indicated that the conformation of enzyme molecules had been altered after the treatment of ultrasound.

Key words: ultrasound; peroxidase(POD); kinetics; spectra

超声波是物质介质中的一种弹性机械波.功率超声作为一种物理能量的形式,在生物工程领域的应用日益受到重视,近年来已开始应用于酶的研究.有文献阐述了超声波对酶的影响,并探讨了可能的机理^[1-3].超声波在传播过程中,对介质产生的作用主要有3个方面,即温度效应、机械作用及空化作用^[2].超声波的化学促进作用,并非是声场与反应

物分子的直接作用结果,而是源于超声空化现象^[4].超声波能引起水中单气泡的剧烈振动,由于气泡被周期性的挤压,产生了一系列的相互摩擦^[5].研究已证实,空化过程可以把声场能量集中起来,伴随空化泡崩溃瞬间,在液体中的极小空间内将其高度集中的能量释放出来,形成异乎寻常的高温(> 5 000 K)、高压(> 5×10^7 Pa)、强冲击波、射流等极

收稿日期:2006-06-13

作者简介:许可(1982—),女,学士;通讯作者:黄卓烈(1950—),男,教授,硕士,E-mail:zhuolieh@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(10074016)

端物理条件^[6]. 研究表明,超声波对酶在水相、有机相以及固定化酶的催化活性都有不同程度的影响^[1-3,6-7]. 在一定条件下超声波可使酶激活^[8-9],也可使酶钝化^[9-11]. 但其影响的机理还未明确. 过氧化物酶(peroxidase, POD, EC 1.11.1.7)是一类以血红素为辅基的酶类,在生物界中广泛存在. 该酶具有多种不同的生物功能,主要催化 H₂O₂ 和过氧化物对多种有机物和无机物的氧化作用^[12]. 有关超声波对 POD 的影响前人研究不多,本试验探讨了超声波对海芋 *Alocasia macrorrhiza* 叶 POD 活性的影响机理,为超声波在生物催化中的应用提供理论参考.

1 材料与方法

1.1 粗酶的提取

将新鲜的海芋叶洗净擦干,称取 5.0 g,剪碎,加入适量 0.2 mol/L 的磷酸缓冲溶液(PBS, pH7.0),研磨成匀浆,冷冻离心 15 min (10 000 r/min, 4 ℃),取上清液,用 PBS 定容至 25 mL^[12],作为粗酶液,用于 POD 活性和蛋白质含量的测定.

1.2 POD 活性测定

以愈创木酚为底物测定酶活性. 取 $\varphi = 0.2\%$ 愈创木酚 0.95 mL, $\varphi = 0.3\%$ H₂O₂ 2 mL, 0.2 mol/L pH7.0 的 PBS 1 mL,最后加入 0.05 mL 的酶液启动反应,检测 470 nm 波长处光密度的变化. 空白管用 0.05 mL 的 PBS 代替酶液^[13]. 以每分钟每毫克蛋白质在 470 nm 波长下引起光密度上升 0.001 的酶量定义为一个酶的比活性单位(U · mg⁻¹ · min⁻¹).

1.3 蛋白质含量测定

采用考马斯亮蓝 G250 染色法^[14]测定蛋白质含量,以牛血清白蛋白为标准蛋白质.

1.4 超声波处理

1.4.1 不同频率的超声波对 POD 活性影响的测定 先选择功率为 50 W,用不同频率的超声波处理粗酶液 5 min,然后测定其酶活性,并与未经超声波处理的反应酶(CK)活性进行比较.

1.4.2 不同功率的超声波对 POD 活性影响的测定 使用以上筛选出的频率,用不同功率的超声波处理粗酶液 5 min,然后测定其酶活性,以未经超声波处理的粗酶液作对照(CK).

1.4.3 超声波处理不同时间对 POD 活性影响的测定 使用筛选出的适宜频率和适宜功率的超声波处理粗酶液不同时间后测定酶活性.

1.5 海芋叶 POD 的分离纯化

POD 分离纯化参考文献[15-17]的方法进行. 将新鲜的海芋叶洗净擦干,称取 40 g,剪碎,加入适

量的 pH7.0、0.2 mol/L 的 PBS 研磨成匀浆,于 4 ℃、10 000 r/min 离心 15 min,取上清液. 缓慢地向上清液中加固体硫酸铵至饱和度为 45%,4 ℃ 盐析 3 h 后,于 4 ℃、7 000 r/min 离心 10 min. 收集上清液,再补加硫酸铵至饱和度为 65%,4 ℃ 盐析,静置 10 h,于 4 ℃、7 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀. 每次离心后分别测定上清液和沉淀(用 PBS 使沉淀刚好溶解)的体积、酶活性以及蛋白质含量. 65% 饱和度的沉淀对 0.02 mol/L 的 PBS (pH7.0) 透析 10 h,中间换 PBS 3~4 次,得部分纯化的酶液.

部分纯化的酶液经 DEAE-纤维素离子交换柱层析,NaCl 离子强度线性梯度洗脱,收集各分部液检测蛋白质含量和酶活性,作 POD 的洗脱图谱. 将酶活性峰分部液浓缩后,用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)鉴定酶的纯度. 浓缩胶 $\varphi = 2.5\%$,分离胶 $\varphi = 7\%$. 凝胶配方参考文献[13].

1.6 海芋叶 POD 动力学研究

对电泳得到 1 条带的纯酶进行动力学研究. 以 0.125、0.250、0.500、1.000、2.500、5.000、10.000 mmol/L 的 H₂O₂ 在 4 mL 反应体系中反应,测定不同底物浓度下的酶促反应速度. 用 PBS 调零. 以底物浓度的倒数为横坐标,反应速度的倒数为纵坐标,作 POD 的 Lineweaver-Burk 图,求米氏常数(K_m)和最大反应速度(v_{max})值. 另外,用一定参数的超声波处理纯酶的酶液后,用同样的方法测定和作图,求经超声波处理后纯酶的 K_m 和 v_{max}.

1.7 海芋叶 POD 的光谱学研究

把达到电泳纯的酶液和经一定参数的超声波处理的酶液在 DU530 DNA/protein analyzer 上分别扫描出 190~380 nm 波长的吸收光谱. 并用该仪器测定超声波处理的纯酶液的紫外差示光谱. 在 960MC 荧光分光光度计上测定纯酶液和经超声波处理的纯酶液的荧光发射光谱,激发波长为 365 nm.

2 结果与分析

2.1 超声波对海芋叶 POD 催化活性的影响

2.1.1 不同频率超声波处理对海芋叶 POD 活性的影响 海芋叶 POD 经 50 W、不同频率超声波处理 5 min,酶的比活性测定结果见图 1a. 图 1a 表明,经超声波处理的酶的比活性为原酶比活性的 46.6%~52.8%,其中 13.5 kHz 超声波处理使酶的比活性降低最少. 可见,不同频率的超声波处理都使 POD 的比活性显著降低.

2.1.2 不同功率超声波处理对海芋叶 POD 活性的影响 选择使酶的比活性下降最少的超声波频率

13.5 kHz,用不同功率超声波处理5 min,酶的比活性测定结果见图1b,图1b表明,经超声波处理的酶的比活性为原酶的51.9%~57.2%,其中,25 W的功率使酶的比活性下降最少.可见,不同功率的超声波处理也使海芋叶POD的比活性显著降低.

2.1.3 超声波处理不同时间对海芋叶POD活性的影响 选择影响最为不显著的超声波功率25 W和频率13.5 kHz,以不同的时间对海芋叶POD进行处理,结果见图1c.处理时间为10 min时,影响最为显著,其比活性为原酶的44.0%;下降最少的是用超声波处理4 min,其比活性为原酶比活性的63.8%.从图1c中分析可知,超声波处理不同时间同样使海芋叶POD的比活性显著下降.

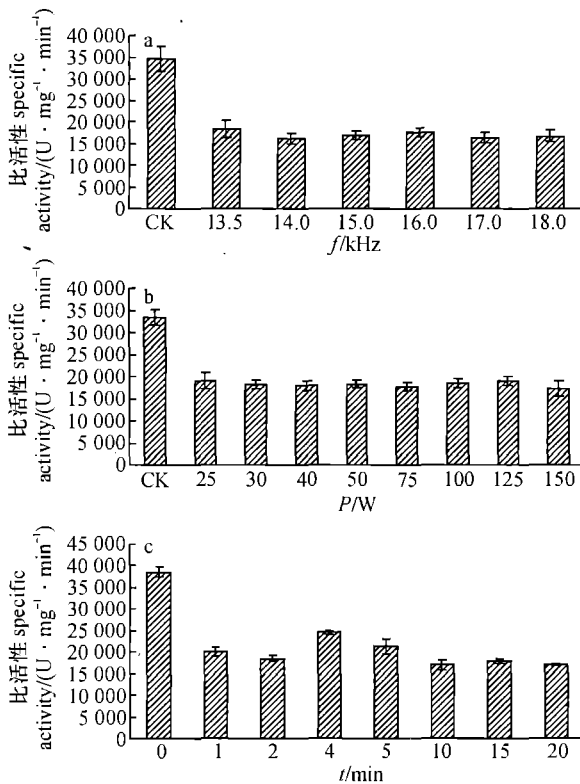


图1 超声波处理对过氧化物酶比活性的影响

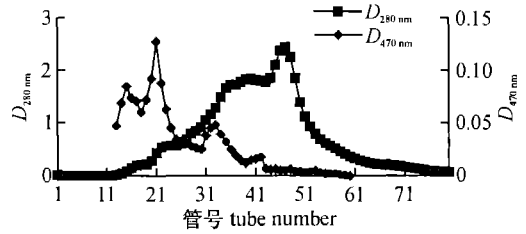
Fig.1 Effect of ultrasound on specific activity of peroxidase

2.2 海芋叶POD的纯化和纯度鉴定

酶液经硫酸铵分级沉淀、透析和DEAE-纤维素离子交换柱层析(图2),洗脱液出现4个蛋白峰,其中第4峰为酶活性峰.取第4蛋白峰酶液浓缩,经聚丙烯酰胺凝胶电泳,显示出1条蛋白带(图3),表明此峰的POD已经达到电泳纯,用此峰纯酶可以进行动力学和光谱学研究.

2.3 POD的动力学性质

纯酶液的Lineweaver-Burk图以及经适宜参数的超声处理的POD的动力学曲线见图4,由此计算出的 K_m 和 v_{max} 列于表1中.从表1可看出,酶经超声



洗脱液 elution buffer:0~1.0 mol/L NaCl (PBS pH7.0);每管流速 velocity:0.57 mL·min⁻¹

图2 DEAE-纤维素柱层析图谱

Fig.2 DEAE-cellulose chromatography

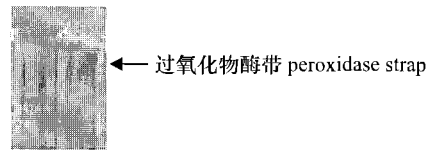
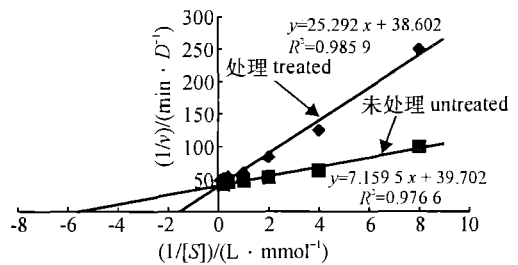


图3 过氧化物酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳谱带

Fig.3 PAGE pattern of peroxidase

波处理后, K_m 值变大,说明酶与底物的亲和力变小;而 v_{max} 变化不大,说明酶被底物饱和时的最大反应速率是差不多的.由此得知,超声波对POD活性的影响是通过改变酶与底物的亲和力实现的.超声波处理后酶活性的降低主要是酶与底物的亲和力降低而引起的.



酶活力 enzyme activity: 812 800 U; ρ (蛋白质 protein) = 0.736 mg·mL⁻¹;比活性 specific activity:1 104 348 U·mg⁻¹·min⁻¹

图4 过氧化物酶Lineweaver-Burk曲线

Fig.4 Lineweaver-Burk curve of peroxidase

表1 超声波处理前后过氧化物酶动力学参数比较

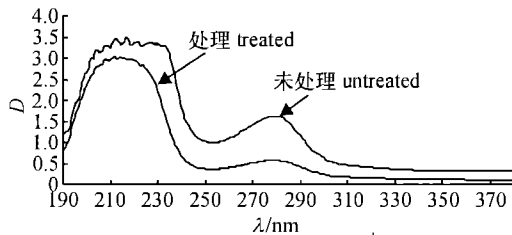
Tab.1 The comparison of kinetics parameter of peroxidase

处理 treatment	$v_{max}/(D \cdot \min^{-1})$	$K_m/(mmol \cdot L^{-1})$
经超声波处理的酶 treated by ultrasound	0.025 9	0.655
未经超声波处理的酶液 untreated	0.025 2	0.180
差值 minus	0.000 7	0.475

2.4 POD的光谱学变化研究

2.4.1 紫外吸收光谱 比较纯酶和经超声波处理的POD的紫外吸收光谱(图5)可知,经超声波处理后,吸收峰的波长没有多大变化,处理前后2个吸收

峰都分别在 215 nm 和 279 nm 附近,只是峰形稍有变化. 一般来说,230 nm 波长以下的紫外吸收光谱的变化反映酶蛋白主链构型的变化,240 ~ 300 nm 波长范围内的紫外吸收光谱的变化主要是色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr)、苯丙氨酸 (Phe) 的作用. 从本试验超声波处理前后的结果比较可知,超声波的处理使酶分子的构型基本没有发生变化.

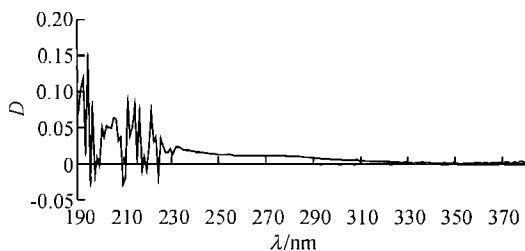


酶活力 enzyme activity: 812 800 U; ρ (蛋白质 protein) = 0.736 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 比活性 specific activity: 1 104 348 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

图5 过氧化物酶的紫外吸收光谱

Fig. 5 Ultraviolet absorption spectrum of peroxidase

2.4.2 紫外差示光谱 超声波处理后,酶的差示光谱见图6,在190 ~ 233 nm 波长范围内有大量的正峰和少量的负峰出现,且差示吸收值较大. Trp、Tyr 的微环境改变而出现差示吸收峰;190 ~ 233 nm 波长范围的大量正峰,说明经超声波处理后,酶分子的构象发生了非常明显的变化.



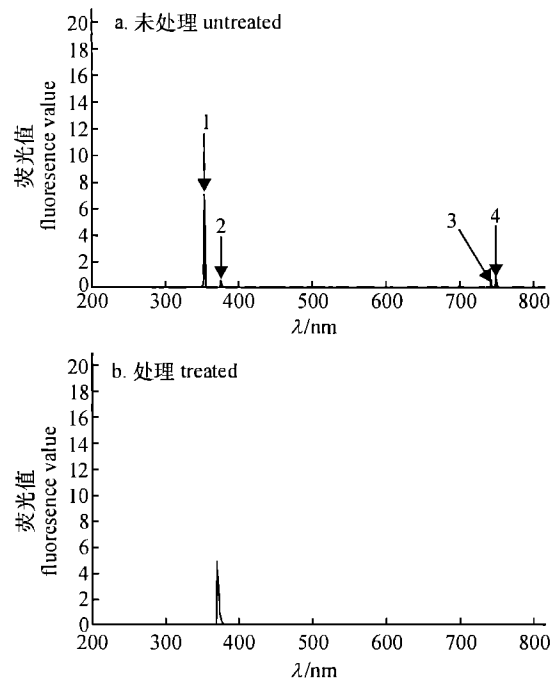
酶活力 enzyme activity: 812 800 U; ρ (蛋白质 protein) = 0.736 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 比活性 specific activity: 1 104 348 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

图6 经超声波处理的过氧化物酶的紫外差示光谱

Fig. 6 Ultraviolet differential spectrum of peroxidase disposed in ultrasound

2.4.3 荧光发射光谱 天然的海芋叶 POD 的荧光发射光谱(图7a)有4个荧光发射峰,分别位于354、376、727、733 nm 处,其荧光值分别为7.2、0.8、0.3、0.7,可见其荧光值都很低. 经过适宜超声波处理的 POD 的荧光发射光谱(图7b)只剩下1个发射峰,在376 nm 处,其荧光值为4.6. 与天然酶相比,在376 nm 下的荧光值变大,而其他3处的荧光发射峰淬灭. 蛋白质中 Trp、Tyr 残基是主要的荧光基团,其荧光峰位置分别为348和303 nm. 据认为,应用荧光技术,可探索 Trp、Tyr 的微环境以及蛋白质构象的变化^[18]. 海芋叶 POD 的荧光发射峰主要在354和

376 nm,因此,该酶的荧光主要来自于 Trp. 比较超声波处理前后荧光峰的变化,峰位发生红移,可能是处在酶分子内部疏水环境的 Trp 残基暴露到分子表面的结果. 超声波处理酶中有3个荧光峰的淬灭,可能是超声波的处理使海芋叶 POD 的分子构象发生了变化的结果.



酶活力 enzyme activity: 812 800 U; ρ (蛋白质 protein) = 0.736 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 比活性 specific activity: 1 104 348 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

图7 过氧化物酶的荧光发射光谱

Fig. 7 Fluorescence emission spectrum of peroxidase

3 讨论与结论

酶是生物大分子,其催化功能决定于其分子构象. 一般来说,酶分子的构象改变会导致其催化活性的改变. 本试验的结果表明,利用不同频率、不同功率的超声波处理海芋叶的 POD,其比活性明显下降. 为了探讨出现这种现象的机理,本试验分别从动力学变化和酶分子的构型与构象变化等方面来寻找证据.

首先,经过超声波处理的 POD 的 K_m 值比未处理酶的明显升高,而其 v_{max} 却几乎没有变化,说明经超声波处理后,酶分子对底物的亲和力大大下降. 超声波处理后酶活性下降是由于其对底物亲和力下降而引起的. 这种机理类似于竞争性抑制. 这与刘稳等^[19]所测得豆壳 POD 的作用机理遵循乒乓反应机制有所不同. 从动力学上看,酶所处的体系不同,作用机理也有所不同.

其次,超声波处理后,酶分子的紫外吸收光谱波峰与对照比较基本没有改变,只是波形稍有变化而

已. 此结果说明, 超声波处理后酶分子的构型基本没有改变, 其各种共价键和化学基团基本没有改变.

再次, 超声波处理后紫外差示光谱出现了明显的正峰和负峰, 说明酶分子的构象有较大的改变; 另外, 从荧光发射光谱可以看出, 超声波处理后, 酶分子的荧光发射峰比对照减少, 变化较大, 这也充分证明超声波处理后酶分子的构象起了较大的变化. 这些光谱学上的变化, 与 Atequad 等^[20] 在研究超声对木瓜蛋白酶的影响中的发现类似. 丘泰球等^[21] 阐述了声场对蛋白酶的催化活力及分子构象的影响情况, 这在本文研究 POD 中也有所证实.

因此, 从本试验结果可以得出结论: 一定参数的超声波处理海芋叶 POD 后, 超声波的物理能量可以使酶分子的构象改变, 使酶分子对底物的亲和力下降, 从而导致酶的催化活性降低. 这可能就是超声波影响海芋叶 POD 活性的基本机理.

参考文献:

- [1] 林勤保, 高大维. 超声波对酶反应的影响[J]. 声学技术, 1997, 16(1): 26-28.
- [2] 朱国辉, 黄卓烈, 丘泰球, 等. 功率超声对酶促反应的影响[J]. 应用声学, 2001, 20(4): 45-48.
- [3] 陈小丽, 黄卓烈, 丘泰球. 超声波对固定化酶活性的影响[J]. 应用声学, 2002, 21(2): 46-49.
- [4] 于凤文, 计建炳, 刘化章. 超声波在催化过程中的应用[J]. 应用声学, 2002, 21(2): 40-45.
- [5] YURI T D, WILLIAM B M, KENNETH S S. Molecular emission from single-bubble sonoluminescence [J]. Nature, 2000, 407: 877-879.
- [6] 冯若, 李化茂. 超声空化与超声医学[J]. 应用声学, 2000, 19(1): 35-38.
- [7] 林影, 高大维, 李国基, 等. 超声波对菊糖催化作用的影响[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 1997, 25(9): 142-144.
- [8] XIAO Yong-mei, WU Qi, CAI Ying, et al. Ultrasound-accelerated enzymatic synthesis of sugar esters in nonaqueous solvents [J]. Carbohydrate Research, 2005, 340: 2097-2103.
- [9] SONG Jian, TAO Wen-yi, CHEN Wu-yong. Ultrasound-accelerated enzymatic hydrolysis of solid leather waste[J]. Journal of Cleaner Production, 2007, 20: 1-7.
- [10] RUI M S, MARGARIDA C, CRISTINA L M. Effect of heat and thermosonication treatments on peroxidase inactivation kinetics in watercress (*Nasturtium officinale*) [J]. Journal of Food Engineering, 2006, 72: 8-15.
- [11] MANAS P, MUNOZ B, SANZ D, et al. Inactivation of lysozyme by ultrasonic waves under pressure at different temperatures [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39: 1177-1182.
- [12] LIU Wen, FANG Jing, ZHU Wen-miao, et al. Isolation, purification and properties of the peroxidase from the hull of *Glycine max* var. HH2 [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999, 79(5): 779-785.
- [13] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997: 93, 188-191.
- [14] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [15] NISSUN M, FEIS A, SMULEVICH G. Characterization of soybean seed coat peroxidase: resonance raman evidence for a structure-based classification of plant peroxidase [J]. Biospectroscopy, 1998, 4(6): 355-364.
- [16] GONG Qin-qin, TIAN Shi-ping. Partial characterization of soluble peroxidase in pericarp of litchi fruit [J]. Prog Biochem Biophys, 2002, 29(6): 891-897.
- [17] 刘稳, 李扬, 段新源, 等. 改良的大豆种皮过氧化物酶纯化方法及酶的底物氧化特性研究[J]. 山东大学学报, 2001, 36(1): 78-83.
- [18] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 198-199.
- [19] 刘稳, 方靖, 高培基. 豆壳过氧化物酶的分离纯化及其性质研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1998, 14(5): 577-582.
- [20] ATEQUAD N, IQBAL J. Effect of ultrasound on papain [J]. Indian J Biochem Biophys, 1985, 22(3): 190-192.
- [21] 丘泰球, 黄卓烈, 刘石生, 等. 声场对蛋白酶催化活力及分子构象的影响[J]. 声学技术, 2000, 19(4): 233-235.

【责任编辑 李晓卉】