

右旋糖苷修饰酵母蔗糖酶条件的筛选及 修饰酶性质的研究

伍志权^{1,2}, 黎春怡³, 麦小珊², 郭诗静², 黄卓烈²

(1 佛山市中南农业科技有限公司检测中心, 广东 佛山 528000; 2 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642; 3 茂名职业技术学院, 广东 茂名 525000)

摘要:以低分子右旋糖苷(Dextran)为修饰剂, 选用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验方案, 研究了不同修饰条件对酵母蔗糖酶(Yeast invertase)化学修饰效果的影响以及修饰前后酶的性质变化. 结果表明, pH 5.0、20℃、反应8 h为最佳的修饰条件. 与天然酶相比, 修饰酶的酶比活力、糖含量、酶活力回收率分别提高56.7%、35.05%和14.61%, 蛋白含量下降22.66%, 氨基修饰率为39.55%. 酶学性质研究表明, 修饰后酶的最适pH在4.0~5.0范围内, 最适温度55~60℃, 在pH 3.5缓冲液中稳定性上升, 在pH 6.5缓冲液中稳定性下降, 在60℃缓冲液中稳定性下降. 动力学研究表明, 修饰后酶的 K_m 和 v_{max} 均上升, 光谱分析表明, 修饰后酶的构型构象均发生变化.

关键词:酵母蔗糖酶; 右旋糖苷; 化学修饰

中图分类号: Q936

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)04-0048-05

Yeast Invertase Chemically Modified by Dextran and Its Enzyme Properties

WU Zhi-quan^{1,2}, LI Chun-yi³, MAI Xiao-shan², GUO Shi-jing², HUANG Zhuo-lie²

(1 Test Center, Foshan Zhongnan Agricultural Technology Limited Company, Foshan 528000, China;

2 College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

3 Maoming Vocational and Technological College, Maoming 525000, China)

Abstract: Dextran was used as the modifying reagent for the chemical modification of yeast invertase. In order to find an optimum way for chemical modification, the effects of different modification condition were studied through orthogonal comparison. The orthogonal analysis showed that the optimum condition for chemical modification was to do the experiment in the solution of pH 5.0 at the temperature of 20℃ for 8 h. The specific enzyme activity, polyhydrate content of the modified-enzyme and the activity reserval ratio were increased by 56.7%, 35.05% and 14.61%, respectively. However, the protein content of modified-enzyme was decreased by 22.66%, and the ratio of amino modification was 39.55%. The study of zymological properties showed that the optimal pH was at the range of 4.0–5.0, the optimal temperature range was 50–60℃. The stability of modified-enzyme at pH 3.5 was increased, but the stability at pH 6.5 was decreased. The thermo stability at 60℃ was also decreased compared with that of yeast invertase. Kinetics analysis showed that K_m and v_{max} of modified-enzyme was increased. The spectral analysis showed that the configuration and conformation of modified-enzyme were quite different from that of yeast invertase.

Key words: yeast invertase; dextran; chemical modification

收稿日期: 2008-07-17

作者简介: 伍志权(1982—)男, 硕士; 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)

酶化学修饰可以提高酶的稳定性和抵抗蛋白质变性剂的能力,为酶在工业上的应用提供更加广阔的前景.同时,化学修饰改善蛋白质(酶)和多肽药物在临床应用过程中的一些不良性质,弥补了天然酶的一些不足,并赋予了一些优良性质,从而显示药用蛋白酶化学修饰的良好应用前景.然而,目前国内外对酶化学修饰的研究主要偏向于医药用酶,如木瓜蛋白酶^[1]、天门冬酰胺酶^[2]等化学修饰的研究,对于工业用酶化学修饰的研究不多.近年来国内外对酵母蔗糖酶化学修饰的研究极少.为此,本文以低分子的右旋糖苷为修饰剂,选用了 $L_{16}(4^5)$ 正交试验方案,探索不同修饰条件对酶化学修饰效果的影响以及修饰前后酶的性质变化,为酵母蔗糖酶的进一步研究利用提供理论依据.

1 材料与方 法

1.1 试验材料

酵母蔗糖酶(Yeast invertase, EC 3.2.1.26)纯酶、2,4,6-三硝基苯磺酸水溶液(Trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS),购于美国Sigma公司.右旋糖苷(Dextran,平均相对分子质量为5 000)购于深圳汉邦多糖生物科技有限公司.考马斯亮蓝G-250购于美国Fluka公司,其他试剂为国产分析纯试剂.

1.2 修饰条件的筛选

本试验选用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验方案对修饰条件进行优化,正交试验因素条件设计如表1所示.

表1 正交试验因素

Tab.1 Factor of orthogonal comparison test

水平	$\theta/^\circ\text{C}$	$t_{\text{修饰}}/\text{h}$	pH
1	4	4	4.0
2	20	8	5.0
3	30	16	6.0
4	45	24	7.0

1.3 右旋糖苷的活化

称取500 mg右旋糖苷和125 mg高碘酸钠溶于10 mL蒸馏水中,4 $^\circ\text{C}$ 避光搅拌反应18 h,用800 μL 乙二醇中止反应,4 $^\circ\text{C}$ 下静置2 h^[3].取8 mL上述混合液,用Sephadex-G15凝胶层析柱(2 cm \times 20 cm)脱盐,4 $^\circ\text{C}$ 避光进行,用蒸馏水洗脱,流速为0.8 mL \cdot min⁻¹,每5 min在部分收集器上收集1管,每管4 mL,用Fehling试剂检测含糖管,用 $w=2\%$ 的 AgNO_3 检查脱盐效果,用硫酸-苯酚法测定活化的右旋糖苷含量^[4].

1.4 酶活力测定

酶活力测定参照Huang等^[5]的方法进行改进,酶促反应体系pH 4.5,反应温度55 $^\circ\text{C}$,反应时间10 min,反应总体积为2.1 mL.用DNS法^[6]测定生成的还原糖量.在上述反应条件下,将酶每分钟催化水解蔗糖产生1 mg还原糖所需要的酶量定义为1个酶活力单位(U).蛋白质含量的测定参照Bradford^[7]的方法,以牛血清白蛋白为标准.糖含量测定参照杨晓华等^[8]的方法,以葡萄糖为标准.氨基残留率的测定采用TNBS法^[9],相同蛋白质浓度的酶液在修饰前后 $D_{335\text{ nm}}$ 之比即为氨基残留率.根据公式:氨基修饰率=1-氨基残留率,计算氨基修饰率.

1.5 酶的最适pH、最适温度、pH稳定性和热稳定性的测定

酶的最适pH、最适温度、pH稳定性和热稳定性的测定参照Gómez等^[10]的方法.酶的动力学测定参照余冰宾^[11]研究酵母蔗糖酶动力学和动力学参数的方法,蔗糖的浓度设置为10、15、20、25、30、35和40 mmol \cdot mL⁻¹,每处理设2个重复,每重复设3个平行样.

1.6 紫外吸收光谱测定

酶液的蛋白质质量浓度为0.25 mg \cdot mL⁻¹,以pH4.5缓冲液为对照,测定其紫外吸收光谱,波长190~400 nm.荧光发射光谱测定:酶液的蛋白质质量浓度为0.25 mg \cdot mL⁻¹,在激发波长280 nm条件下,测定其荧光发射光谱.

数据统计和方差分析用SPSS 13.0软件进行.方差分析中, $F < 9.280$ 表示差异不显著, $9.280 < F < 29.500$ 表示差异显著, $F > 29.500$ 表示差异极显著.

2 结果与分析

2.1 右旋糖苷修饰酵母蔗糖酶条件的筛选

本试验综合考虑了反应体系中温度、反应时间、pH、温度与反应时间的交互作用的影响,试验结果见表2.极差分析结果表明,不同因素对修饰效果的影响为:修饰时间>温度>pH>温度 \times 反应时间.

方差分析结果(表3)表明,反应时间对修饰效果影响差异极显著,温度和pH对修饰效果影响差异显著,而温度与反应时间的交互作用对修饰效果影响差异不显著.

通过正交试验(表2)可以得到右旋糖苷修饰酵母蔗糖酶的最佳试验方案:即反应体系的pH为5.0,反应温度为20 $^\circ\text{C}$,反应时间为8 h.以此方案进行实验,加入活化的右旋糖苷和蔗糖酶各25 mg,同时,反应中添加0.855 g蔗糖作为酶保护剂.

表2 右旋糖苷对酵母蔗糖酶化学修饰的正交试验

Tab.2 Orthogonal comparison test of yeast invertase modified with dextran

编号	$\theta/^\circ\text{C}$	$t_{\text{修饰}}/\text{h}$	pH	$\theta \times t_{\text{修饰}}$	酶比活力/($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)
1	4	4	4.0	4 × 4	260.77
2	4	8	5.0	4 × 8	416.33
3	4	16	6.0	4 × 16	387.69
4	4	24	7.0	4 × 24	352.67
5	20	4	5.0	20 × 4	295.81
6	20	8	4.0	20 × 8	426.61
7	20	16	7.0	20 × 16	402.25
8	20	24	6.0	20 × 24	392.45
9	30	4	6.0	30 × 4	345.29
10	30	8	7.0	30 × 8	380.62
11	30	16	4.0	30 × 16	340.51
12	30	24	5.0	30 × 24	414.43
13	45	4	7.0	45 × 4	74.51
14	45	8	6.0	45 × 8	382.56
15	45	16	5.0	45 × 16	372.31
16	45	24	4.0	45 × 24	297.04
K_1	1 417.460	976.368	1 334.928	1 500.000	
K_2	1 527.120	1 608.108	1 538.880	1 223.800	
K_3	1 520.840	1 502.760	1 507.972	1 361.160	
K_4	1 126.412	1 496.588	1 210.048	1 506.868	
$K_{1\text{平均}}$	354.365	244.092	333.732	375.000	
$K_{2\text{平均}}$	381.780	402.027	384.720	305.950	
$K_{3\text{平均}}$	380.210	375.690	376.993	340.290	
$K_{4\text{平均}}$	281.603	374.147	302.512	376.717	
R	100.177	159.935	82.208	70.767	

表3 正交试验方差分析表

Tab.3 The orthogonal analysis

差异源	平方和	自由度	均方	$F^{1)}$	P
θ	26 475.363	3	8 825.121	15.741*	$0.01 < P < 0.05$
$t_{\text{修饰}}$	61 509.617	3	20 503.210	36.572**	$P < 0.01$
pH	17 810.899	3	5 936.966	10.590*	$0.01 < P < 0.05$
$\theta \times t_{\text{修饰}}$	13 489.874	3	4 496.625	8.021	$P > 0.05$
误差	1 681.604	3	560.535		
总计	120 967.357	15	40 322.457		

1) **表示差异达到极显著,*表示差异达到显著

2.2 修饰前后酶的性质比较

通过上述方案进行酵母蔗糖酶的化学修饰,修饰前后酶活性、糖含量、氨基修饰率、酶活力回收率和蛋白回收率的比较见表4。由表4可知,修饰后,酶比活力提高56.7%,糖含量提高35.05%,氨基修饰率为39.55%,酶活力回收率为114.61%,蛋白含量下降22.66%。

表4 修饰前后酶的性质比较

Tab.4 Comparison of enzyme properties between modified-enzyme and natural-enzyme

	酶比活力/ ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	$w(\text{糖})^{1)}/$ ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$)	氨基修 饰率/%	酶活力回 收率/%	蛋白回 收率/%
天然酶	271.21	4.08	0	100	100
修饰酶	429.41	5.51	39.55	114.61	77.34

1)指1 mg 蛋白中糖的质量

2.3 修饰前后酶学性质的比较

2.3.1 修饰前后酶的最适 pH、最适温度比较 由图1a可知,天然酶的最适 pH 为4.5,修饰酶的最适 pH 在4.0~5.0范围内。由图1b可知,天然酶的最适温度为55~60℃,修饰酶的最适温度为50~55℃。

2.3.2 修饰前后酶的 pH 稳定性、热稳定性比较 由图2a可知,修饰酶和天然酶在 pH3.5 缓冲液中的半衰期分别为14.34和10.67 min,表明修饰酶在 pH 3.5

缓冲液中的稳定性较天然酶有所上升,由图 2b、c 可知,修饰酶和天然酶在 pH6.5 缓冲液中半衰期分别为 1.45 和 1.24 min,在 60℃ 缓冲液中半衰期分别为 13.81 和 15.24 min,表明修饰酶在 pH6.5 缓冲液中的稳定性及其在 60℃ 缓冲液中稳定性较天然酶有所下降。

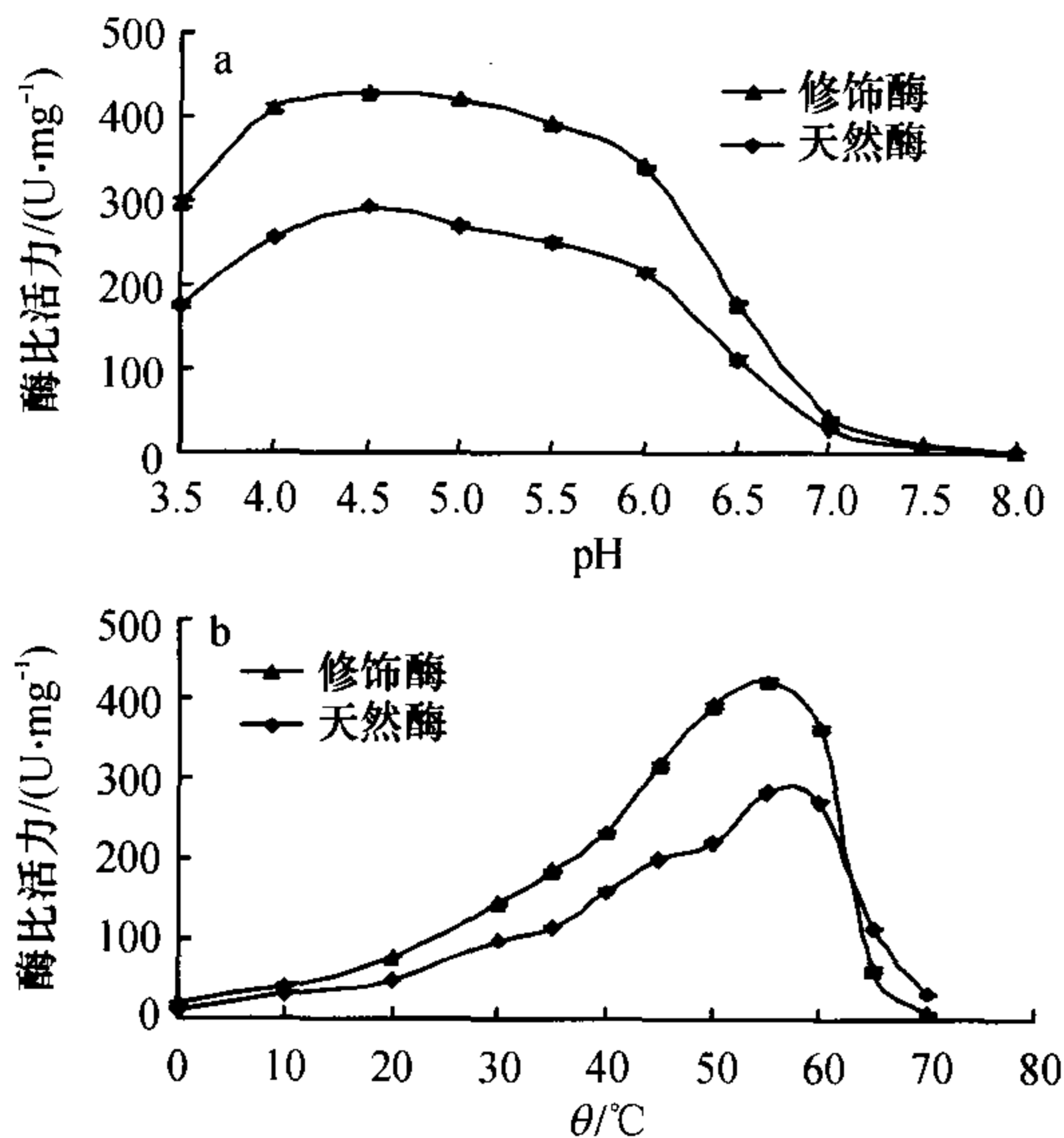


图 1 天然酶与修饰酶的最适 pH 和最适温度 ($\bar{x} \pm SE$)
Fig. 1 The optimal pH and optimal temperature of natural-enzyme and modified-enzyme

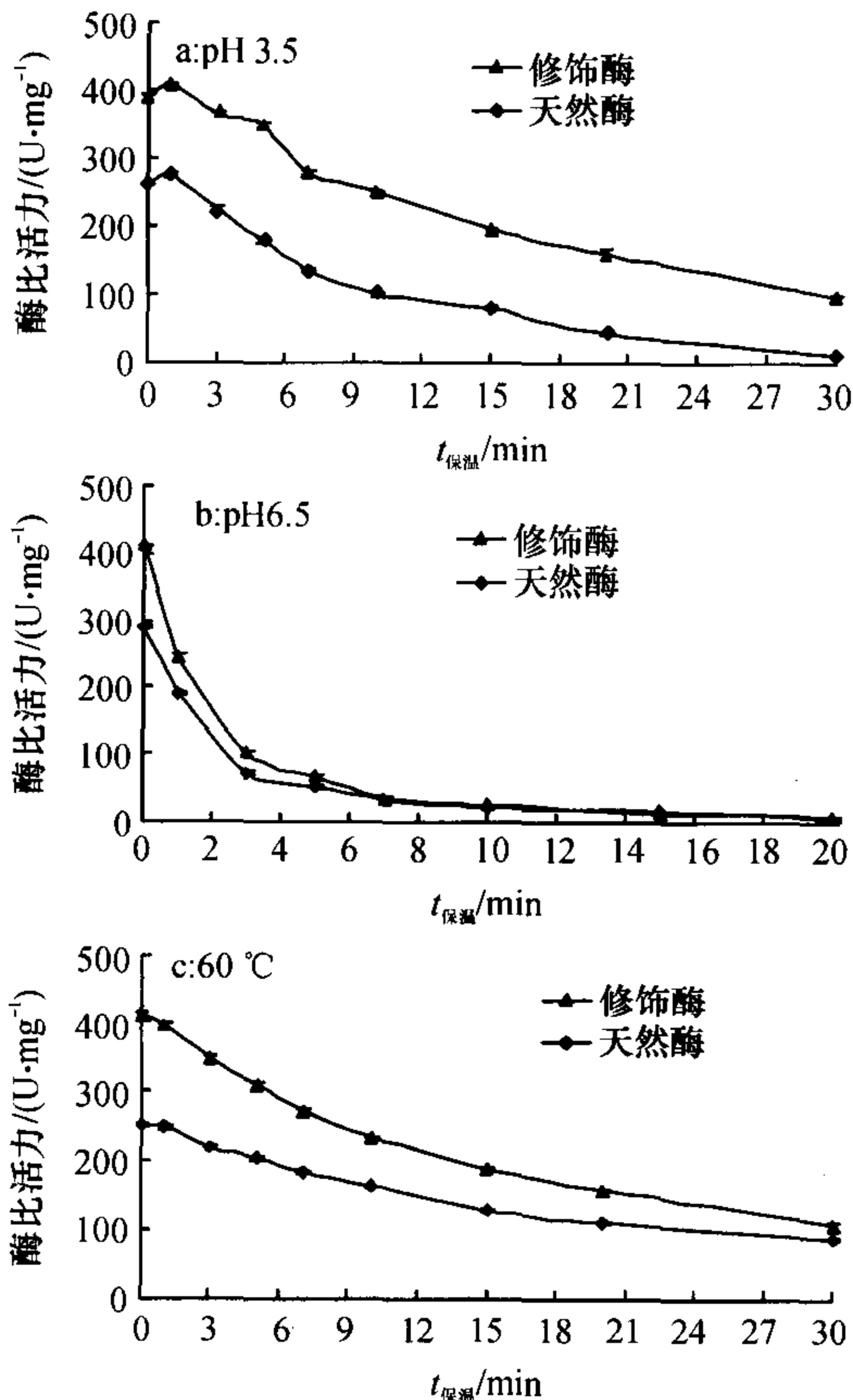


图 2 天然酶与修饰酶在不同 pH 及 60℃ 缓冲液中热稳定性曲线 ($\bar{x} \pm SE$)
Fig. 2 Thermo stability of natural-enzyme and modified-enzyme at different pH and 60℃

2.4 pH 4.5 缓冲液中天然酶与修饰酶的动力学参数

由图 3 的动力学曲线可知,天然酶的 $K_m = 145.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $v_{\max} = 714.29 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$; 修饰酶的 $K_m = 208.51 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $v_{\max} = 1428.51 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. 可见,修饰后,酶的 K_m 值上升, v_{\max} 则大幅度升高,表明修饰酶最大反应速率升高,而对底物的亲和力则有所下降. 由此可以推断,修饰后酶活力提高主要是通过最大反应速率提高而实现的。

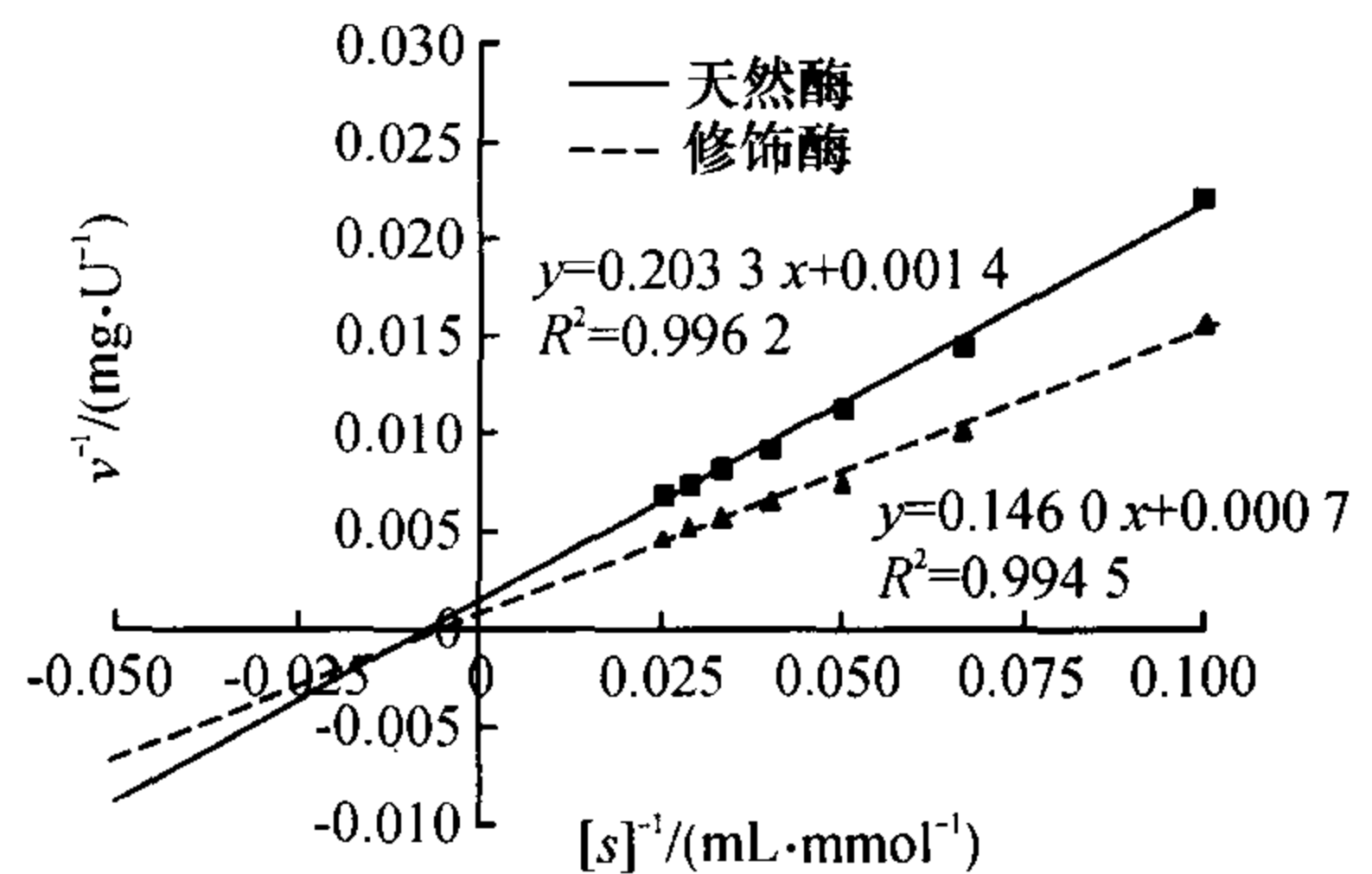


图 3 天然酶与修饰酶的 Lineweaver-Burk 曲线
Fig. 3 The Lineweaver-Burk curve of natural-enzyme and modified-enzyme

2.5 光谱分析

2.5.1 紫外吸收光谱分析 由图 4 可知,缓冲液中天然酶和修饰酶的紫外吸收光谱中有 2 个明显的吸收峰. 与天然酶相比,修饰酶 200~235 nm 处吸收峰的吸收波长向长波长方向偏移 3.0 nm, 而 270~280 nm 处吸收峰的吸收波长基本没有发生改变,说明修饰酶的构型构象发生了变化. 此外,修饰酶 200~235 nm 处吸收峰和 270~280 nm 处吸收峰的峰值变大,进一步说明修饰酶的构型构象发生了变化。

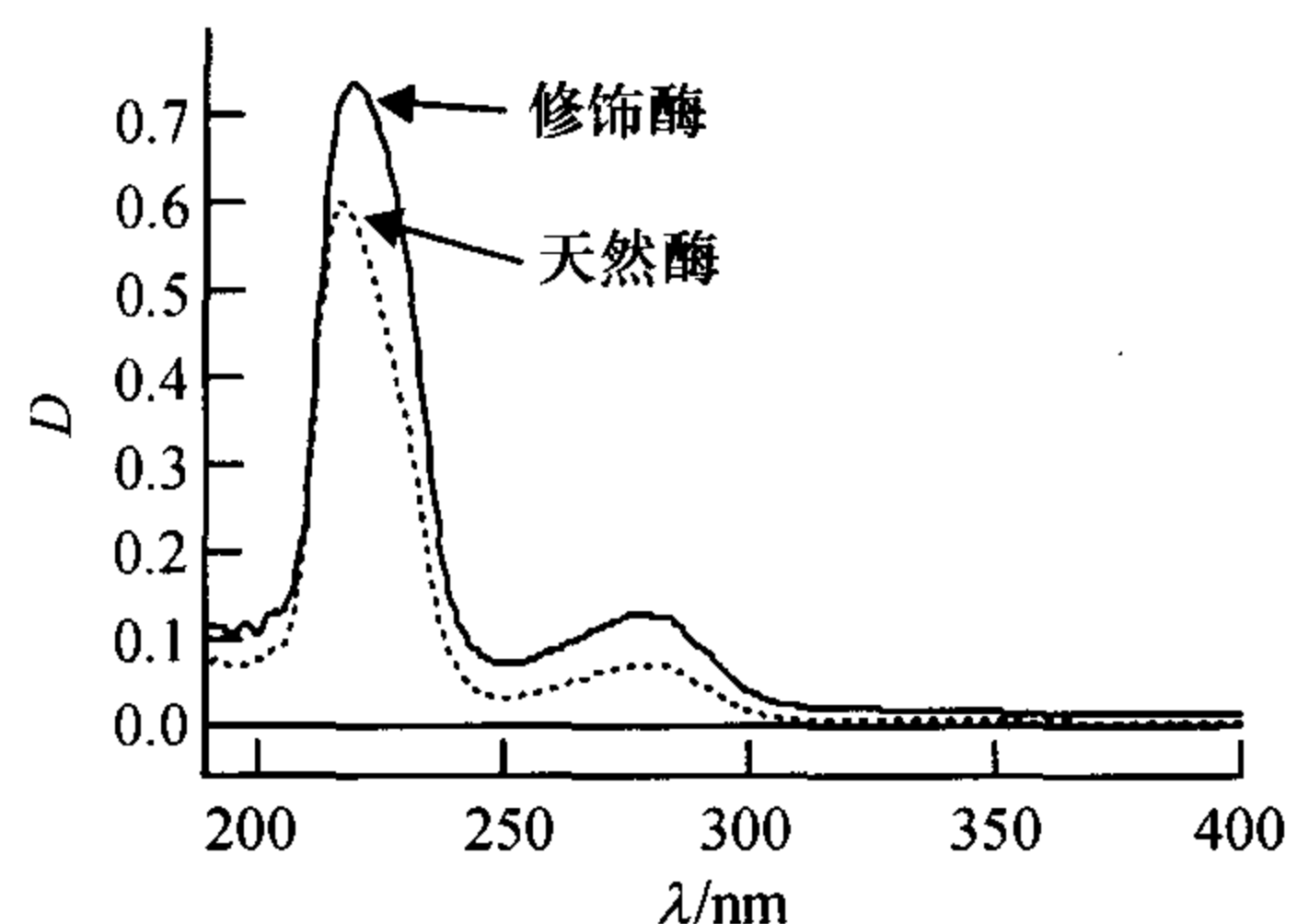


图 4 缓冲液中天然酶和修饰酶的紫外吸收光谱
Fig. 4 Ultraviolet absorption spectral of natural-enzyme and modified-enzyme

2.5.2 荧光发射光谱分析 由图 5 可知,在激发波长 280 nm 下,天然酶和修饰酶的荧光发射光谱峰形相似,但修饰酶的发射波长向长波长方向偏移 4 nm, 荧光强度明显增强. 进一步说明修饰酶的构型和构象都发生了变化。

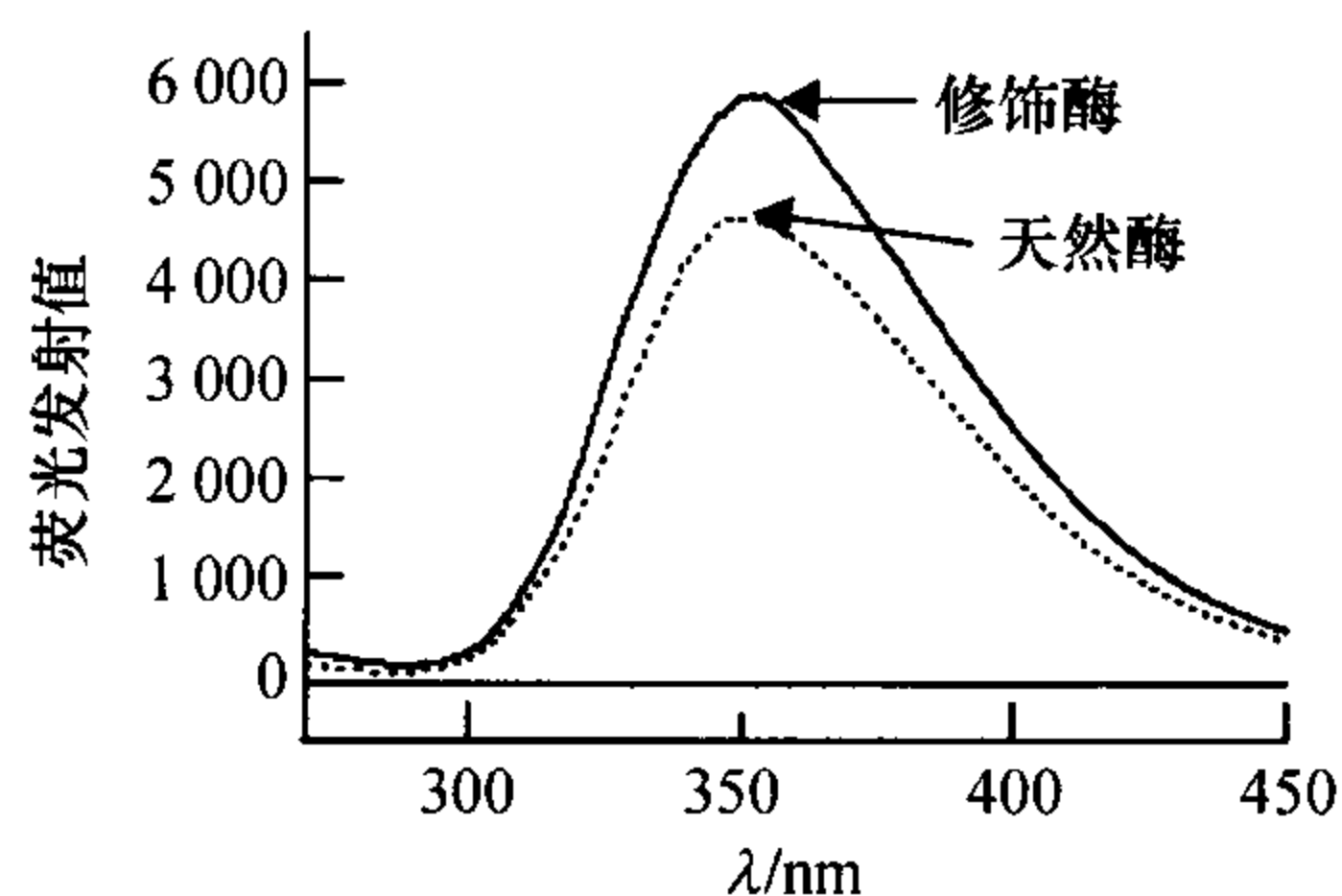


图5 缓冲液中天然酶和修饰酶的荧光发射光谱

Fig. 5 Fluorescence emission spectral of natural-enzyme and modified-enzyme

3 讨论与结论

正交试验结果表明,反应时间对修饰效果影响差异极显著,温度和 pH 对修饰效果影响差异显著.修饰时间影响修饰效果主要表现为:修饰时间过短,修饰剂与酶未能充分结合;修饰时间过长,修饰反应中间产物——吡氯苄氧胺不稳定分解.温度对修饰效果的影响主要通过影响蛋白质分子的伸展和酶与修饰剂分子间结合速率而实现,pH 对修饰效果的影响主要表现为 pH 能引起酶分子中可离解极性基团的离解状态和电荷改变,改变酶的构型和构象,从而影响修饰效果.

酶分子对环境中的 pH 敏感,影响酶的最适 pH 和 pH 稳定性的机理可能是右旋糖苷修饰了酶表面的碱性氨基酸残基的侧链氨基^[12],右旋糖苷的引入会影响酶分子的电荷分布,从而影响酶的最适 pH 和 pH 稳定性.

温度主要是通过增加底物分子的热能和提高酶分子热能来影响酶活性的.化学修饰影响酶的最适温度和热稳定性的机理可能是:化学修饰通过改变酶的构象而降低了酶催化反应过程中酶分子构象改变所需要的化学能^[13],因此表现为酶的最适温度有所下降,另一方面,修饰酶活性部位的疏水氨基酸残基外露,导致其对热敏感,将会降低其热稳定性.

动力学研究表明,修饰酶的 K_m 值有所上升, v_{max} 有较大幅度的上升,可见修饰后酶活性的提高,主要是由于酶的最大反应速率提高而引起的. v_{max} 大幅上升主要是由于修饰后酶分子结构趋于松散,降低了酶催化反应过程中酶分子构象改变所需要的化学能所引起^[13], K_m 值有所上升主要由于右旋糖苷与一 NH_3^+ 形成共价键,影响了整个活性中心的电荷分布,微扰了该部位的微环境,同时右旋糖苷的引入也形成空间位阻,因而不利于底物分子进入酶的活性中心,表现为 K_m 值有所上升,酶对底物的亲和力下降.

紫外吸收光谱研究表明,修饰酶 200 ~ 235 nm 处吸收峰的吸收波长向长波长方向偏移 3.0 nm,其机理可能是右旋糖苷的引入改变了酶分子的微环境,使分子内部的结构趋于松散, n 和 π^* 轨道间的能

量差减小,引起吸收峰向长波长移动^[14].同时 2 个吸收峰值均有提高,是由于松散的分子结构更有利于深埋的 Tyr 和 Trp 以及肽键外露,从而使 2 个紫外吸收分子均有提高.荧光发射光谱研究表明,天然酶和修饰酶的荧光发射光谱峰形相似,但修饰酶的发射波长向长波长方向偏移 4 nm,荧光强度明显增强.推断是由于修饰后导致分子内部的 Trp 和 Tyr 外露,Trp 和 Tyr 所处的环境极性增加所致.

参考文献:

- [1] SANGEETHA T, EMILIA A. Chemical modification of papain for use in alkaline medium [J]. *Journal of Molecular Catalysis*, 2006, 3(3): 171-177.
- [2] 黄蓓, 孙建中, 李伟. 聚丙烯酰胺-聚乙二醇对 L-天门冬酰胺酶的包埋研究 [J]. *高校化学工程学报*, 2003, 17(4): 431-437.
- [3] 罗瑶, 古志平. 右旋糖苷对超氧化物歧化酶的化学修饰及性质研究 [J]. *广州食品工业科技*, 1998, 14(1): 20-22.
- [4] PENG Yan-fei, ZHANG Li-na, ZENG Fan-bo, et al. Structure and antitumor activity of extracellular polysaccharides from mycelium [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2003, 54(297): 297-303.
- [5] HUANG Yu, XIONG Zhi-Ting, DAI Ling-Peng, et al. Effect of Cu stress on the invertase activity and root growth in two populations of *Rumex dentatus* L. with different Cu tolerance [J]. *Environmental toxicology*, 2008, 3(4): 443-450.
- [6] MOHAMMADIA H, AMINEA A, RHAZI M, et al. Use the amperometric determination of phenylmercury based on invertase enzyme inhibition [J]. *Talanta*, 2004, 62(5): 951-958.
- [7] BRADFORD R. Rapid and sensitive method for the quantity of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Annual Biochemistry*, 1976, 72(1): 248-254.
- [8] 杨晓华, 于广利, 赵峡. 灰树花糖蛋白中总糖含量的测定 [J]. *中国海洋大学学报*, 2006, 36(6): 929-931.
- [9] HABEED A. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzene sulfonic acid [J]. *Analytical Biochemistry*, 1966, 14(3): 328-336.
- [10] GÓMEZ L, VILLALONGA R. Functional stabilization of invertase by covalent modification with pectin [J]. *Biotechnology Letters*, 2000, 22: 1191-1195.
- [11] 余冰宾. 生物化学实验指导 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2004: 175, 187-190.
- [12] ELSHI H, 吴梧桐, 刘景晶, 等. 右旋糖苷对大肠杆菌 L-天门冬酰胺酶 II 的化学修饰 [J]. *药物生物技术*, 1997, 4(4): 208-211.
- [13] JENE Q, PERSON J, LOWE C. Surfactant modified enzymes: Solubility and activity of surfactant-modified catalase in organic solvents [J]. *Enzyme Microbial Technology*, 1997, 20(1): 69-74.
- [14] 高向阳. 新编仪器分析 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2004: 16-17.

【责任编辑 李晓卉】