

声场对蛋白酶催化活力及分子构象的影响

丘泰球¹, 黄卓烈², 刘石生¹, 朱国辉², 麦芸¹, 范晓丹¹

(1. 华南理工大学食品与生物工程学院, 广州 510640; 2. 华南农业大学生物技术学院, 广州 510641)

摘要: 本文综述了声场对蛋白酶催化活力及分子构象的影响。有关研究发现, 适宜的超声辐照可以增强蛋白酶的活性; 激活固定化蛋白酶, 促进酶的固定化过程; 提高二肽的酶合成产率; 加速在蛋白酶催化下发生的酰化反应。有关研究也发现, 声场作用会引起蛋白酶分子构象发生一定程度的变化。

关键词: 声场; 蛋白酶; 催化活力; 酶分子构象

中图分类号: 0429 文献标识码: A

Effect of sound field on the catalysis activity and the molecular conformation of protease

QIU Tai-qiu¹, HUANG Zhuo-lie², LIU Shi-sheng¹,
ZHU Guo-hui², MAI Yun¹, FAN Xiao-dan¹

(1. Food & Biological Engineering Institute, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;
2. Biotechnology Institute, South China Agricultural University, Guangzhou 510641, China)

Abstract: The effect of sound field on the catalysis activity and the molecular conformation of protease was discussed. Studies showed that proper sound radiation could enhance the activity of protease, activate immobilized protease, promote the immobilizing process, enhance the synthesis productivity of poly-peptide, accelerate the acylation catalyzed by protease. Also the conformation of protease molecule was effected to some extent by sound field.

Key words: sound field; protease; catalysis activity; conformation of enzyme molecule

1 引言

酶是一种特殊的催化剂, 在适宜的条件下, 酶催化反应的速度不是一般的化学催化剂可以比拟的, 它还具有以下独特的优点: 可在常温、常压和温和的酸碱条件下进行催化反应, 有利于简化设备, 改善劳动条件和降低成本。酶的来源广泛, 一些支植物和微生物都可以作为某些酶的原料, 例如, 从动物的胰脏中提取胰蛋白酶; 从动物胃中提取胃蛋白酶; 从木瓜中提取木瓜蛋白酶; 从菠萝中提取菠萝蛋白酶; 从枯草杆菌培养液中提取枯草杆菌蛋白酶。

蛋白酶是催化蛋白质分子的肽键水解的一群酶类。在蛋白酶的催化作用下, 蛋白质分子迅速水解成肽、月示、肽类, 最后成为蛋白质构成单位 氨基

酸。蛋白酶制剂在工业上有各种各样的用途, 可广泛应用于皮革、毛纺、丝绸、日用化工、食品、医药等许多行业中^[1]。例如: 皮革脱毛与软化。原料皮脱毛, 传统的方法是采用石灰硫酸钠法, 工序繁、周期长、环境卫生和劳动条件差, 并且造成严重污染。利用蛋白酶脱毛, 具有简化工序、缩短周期、改善劳动条件和卫生条件、变污水为家肥等优点。经蛋白酶处理的皮革, 柔软、舒适, 能用于制造高级皮具。

然而, 蛋白酶是来自细胞的。在细胞内, 蛋白酶分子处于天然的结构状态, 在适宜的条件下能发挥其最大的催化活力。但当将这些酶从细胞提取出来应用到各项工业生产时, 其催化活力明显地低于细胞内的催化活力, 其动力学参数明显改变, 致使其在工业上应用不尽人意, 究其原因, 主要是: 酶在提取与纯化过程中分子结构的改变。构象起了变化, 活力或其功能也随之变化, 影响了蛋白酶在工业应用上的催化效率。

为了使蛋白酶能发挥其最大的催化活力, 提高蛋白酶在工业应用上的催化效率, 人们深入地探讨

收稿日期: 2000-05-09; 修订日期: 2000-07-07

国家自然科学基金(批准号: 10074016)和为广东省教育厅资助项目

作者简介: 丘泰球(1941-), 男, 广东梅县人, 教授, 博士生导师, 研究方向: 声化学

酶促反应动力学及影响酶促反应的因素, 本文综述了声场对蛋白酶催化活力及分子构象的影响。

2 声场对蛋白酶催化活力的影响

声场在生物化学中的最初应用是用来粉碎细胞壁, 释放其内容物, 随后的研究发现低强度声场能对酶的活性产生正面的影响。

1991年 Vulfson 等报道了超声对有机溶剂中枯草杆菌蛋白酶催化 N-乙酰-苯丙氨酸乙酯 (APAE) 的转酯反应的影响^[2]。研究结果表明, 在几种不同的醇溶液 (正丁醇、正己醇、正辛醇) 中, 超声对枯草杆菌蛋白酶催化的转酯反应的反应速率均有不同程度的提高 (见图 1), 在长链醇中反应速率的提高更加显著, 在丁醇中速率大约可提高 50%, 而在辛醇中速率可提高 6-8 倍。研究还表明, 声场的影响程度取决于声场强度、声场作用方式、反应介质中水的含量及介质的疏水性。

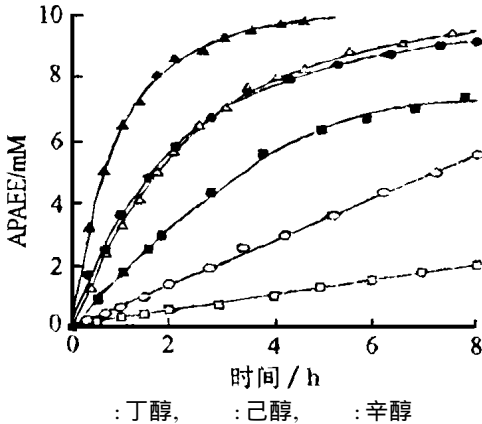


图 1 在三种溶液中超声波对枯草杆菌蛋白酶催化 APAEE 转酯反应的影响

另一个富有成果的研究领域是声场激活固定化蛋白酶。超声能够加强基质向酶的传递, 如以酪胺作底物, 用 20kHz 的声场处理固定于琼脂胶上的胰乳蛋白酶, 可使其活性提高 2 倍^[3]。

此外, 声场能促进蛋白酶合成多肽, 例如, 在用木瓜蛋白酶合成甘-苯丙二肽时, 与机械搅拌相比, 超声辐照可使二肽的产量提高^[4]。表 1 中给出了频率为 38kHz 的超声波在 37℃ 下辐照 12h 的实验数据 (合成条件: 75% 水, 25% 有机溶剂, 37℃, 12h)。

表 1 二肽的合成产率

有机相	机械搅拌的产率	超声辐照下的产率
二乙醚	71	89
石油醚	12	62

表 1 实验数据表明, 在石油醚有机溶剂中, 超声辐照可使二肽合成产率比机械搅拌下的产率提高 5 倍以上。

1994 年 David H Bremner 报道了超声波促进腺苷与苯基丙氨酸在枯草杆菌蛋白酶催化下发生酰化反应^[5]。在 40℃, 机械搅拌 120h 得到三种产物, 比率为 42:2:24, 总产率为 60%; 而在超声波作用下, 0、0.5h, 产率达 38%, 且只有主产物生成。

黄卓烈等近年来针对声场对菠萝蛋白酶催化活性的影响作了初步的研究。试验发现当用超声辐射处理菠萝蛋白酶的反应系统时, 在一定的声场强度和频率范围内, 被处理的菠萝蛋白酶催化酪蛋白水解的速度有明显升高。动力学研究表明, 酶最大反应速度 V_{max} 升高, 而酶的米氏常数 K_m 值明显下降。

3 声场对蛋白酶分子构象的影响

酶是生物细胞所产生的一种有机催化剂, 其化学本质是蛋白质, 是由氨基酸组成的生物大分子化合物, 具有一、二、三、四级结构^[6], 也具有两性电解质的性质, 会受到某些物理因素 (加热、声场辐照、紫外线照射等) 及化学因素 (酸、碱、有机溶剂等) 的作用提高活性或变性失活。人们为了探讨声场改变蛋白酶分子催化活性的机理, 正在研究声场对蛋白酶分子构象的影响

首先, Atequad 等研究了超声空化对木瓜蛋白酶的影响^[7]。发现了超声空化对木瓜蛋白酶构象、紫外光谱以及催化活性都有不同程度的影响。

薛雄志等人研究了次声对几种酶结构的影响^[8]。将木瓜蛋白酶、淀粉酶、精氨酸酶、脂肪酶、溶菌酶和碱性磷酸酶六种酶溶液置于次声中, 次声系统的频率为 8Hz 和 12Hz, 强度为 130dB, 酶溶液在次声作用前后用紫外线光谱分析。结果表明, 次声对酶的构象有所影响, 这些影响的作用机理可能不同于化学试剂的影响机理。研究还表明, 在次声处理后对于淀粉酶和碱性磷酸酶, 构象变化并不影响酶的活性。

黄卓烈等人近期的初步研究发现, 当用荧光仪监测声场作用下菠萝蛋白酶时, 发现荧光强度减弱, 其发射峰由 338nm 下移到 321nm。用紫外差示光谱仪监测声场作用下的菠萝蛋白酶时, 发现其差示光谱在 251nm 处出现一个负峰; 在 264nm、279nm 和 294nm 处的三个小负峰比对照 (无声场处理) 的减弱。除此之外, 还研究了其它有关指标。初步结果显示, 在声场作用下, 菠萝蛋白酶分子的螺旋结构发生了变化, 而且分子的 Phe、Tyr 和 Trp 三种氨基酸所处的微环境也发生了变化。

4 结 语

研究表明, 适当的超声辐照可以增强蛋白酶的活性; 激活固定化蛋白酶, 促进酶的固定化过程; 提高多肽的两相酶合成产率及加速在蛋白酶催化下发生的酰化反应。

研究也表明, 声场作用会给蛋白酶的构象带来一定程度的变化。适宜的声场强度和频率会使蛋白酶分子构象发生变化, 使其折叠得更合理, 更容易与底物结合成中间产物, 从而提高其催化活力。

声场对酶催化过程新的变革将对酶化工领域产生积极的影响, 其结果有可能找出一种简单而价廉、靠外力场促进酶催化过程的新的方法, 使酶法生产工业带来新的飞跃。

参考文献:

- [1] 李再资. 生化工程与酶催化[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1995.
- [2] Evgeni N Vulfson, Dotglas B Sareg and Barry A Law. Enhancement of subtilisin-catalyzed inter-

esterification in organic solvents by ultrasound irradiation[J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 1991, 13(2): 123-126.

- [3] Ishimori Y, Karube I, Suzuki S. Acceleration of immobilized α -chymotrypsin activity with ultrasonic irradiation[J]. *J. Mol. Catal.*, 1981, 12(2): 253-259.
- [4] Tadasa K, Yamamoto Y, Shimoda I, Kayahara H. The influence of mixing conditions of reaction medium on proteinase-catalyzed peptide synthesis; The use of sonication [J]. *Shinshu Daigakubu Kiyo*, 1990, 26(1/2): 21-26.
- [5] David H Bremner, Recent advances in organic synthesis utilizing ultrasound [J]. *Ultrasonics sonochemistry*, 1994, 1(2): s119-s124.
- [6] 陈陶声. 酶制剂生产技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 1994: 24
- [7] Atequad N, Iqbal J. Effect of ultrasound on papain [J]. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 1985, 22(3): 190-192.
- [8] 薛雄志等. 次声对几种生物酶的生物效应初探[J]. *厦门大学学报(自然科学学报)*, 1995, 34(3): 421-425.

(上接第 225 页)

敷瓦前目标强度实验值与预报值见图 4-2, 敷瓦后目标强度实验值与预报值见图 4-3。

结果表明, 频率高于 5kHz 时三种结果基本一致, 说明此计算方法是有效的。

5 结 论

敷瓦消声效果预报的关键是对消声瓦的数学建模。本文采用等效多层均匀介质模型, 通过匹配方法获得等效参数。在此基础上用传递矩阵法和物理声学方法计算出水下目标敷瓦后的隐身效果预报值, 构成了一个完整的处理框架。通过对一个模拟球的计算, 说明了方法的正确性。对低频的预报方法需做进一步的研究。

参考文献:

- [1] 航天隐身技术预研文集[R]: 第七册. 航空航天工业部科学技术司, 1991.
- [2] 尚尔昌. 渐变吸收层反射率的近似式[J]. *声学学报*, 1965, 3(4).
- [3] C. Audoly. Prediction of the efficiency of a decoupling coating partially covering a cylindrical hull using the SEA method[J]. *UDT*, 1997; 293-297.
- [4] 王仁乾等. 带空腔尖劈吸声器吸声性能的研究[J]. *声学技术*, 1999, 18(4): 146-148.
- [5] 何作镛, 王曼. 水下非均匀复合层结构吸声的理论研究[J]. *应用声学*, 1996, 15(5): 12-19.
- [6] 布列霍夫斯基赫. 杨训仁译. 分层介质中的波[M]. 北京: 科学出版社, 1960: 43-57.