

两种环糊精对 α -淀粉酶活性稳定作用的研究*

高春光^{**} 双少敏 赵永祥 任列香

(山西大学化学化工学院 太原 030006)

摘要 研究了 β -环糊精(β -CD)、羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)对 α -淀粉酶活性的影响,结果表明 β -CD能明显稳定 α -淀粉酶活性,延长其储存时间(4℃)。而HP- β -CD能明显增加酶的荧光,说明其能更好地与芳香类氨基酸结合,但对酶的储存活性无明显延长作用。

关键词 α -淀粉酶 β -环糊精 羟丙基- β -环糊精

环状糊精及其衍生物是超分子化学中重要的主体化合物,具有独特的外亲水内疏水的笼状结构,其母体化合物 α 、 β 、 γ -环糊精及各种官能团取代的环糊精衍生物(修饰环糊精)已广泛应用于生物制药、食品、香料、生物技术、化妆、疾病诊断和废水净化等行业和领域^[1,2]。

近年来,有许多报道研究环糊精特别是环糊精衍生物与酶和蛋白质的相互作用,探索环糊精类化合物在生物化学、生物工程领域的应用潜力。研究表明,环糊精及其衍生物在稳定生物酶的活性、提高蛋白质抗变性环境的能力、防止蛋白质不可逆地变性、帮助蛋白质复性(正确重折叠)等方面有积极作用,起到了与生物体内分子伴侣(molecular chaperon)相似的作用,被人们喻为人工分子伴侣^[3~5]。

本文研究了 β -环糊精(β -CD)及其衍生物羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)^[6]对 α -淀粉酶活性的稳定作用,并测定了加入环糊精后 α -淀粉酶荧光的变化。中性的羟丙基($-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_3$)基团的引入,可以增加环糊精的水溶性、扩大疏水结合空腔。 α -淀粉酶是在生物化工中应用最广的工业化的生物催化剂之一,它催化淀粉水解形成糖的反应,已有的有关 α -淀粉酶与环糊精的作用是研究环糊精作为淀粉酶的底物^[2,7],本文研究环糊精化合物作为 α -淀粉酶修饰剂的潜力。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

日立F-4500型荧光分光光度计(日本日立);UV-220型紫外分光光度计(日本日立)。 β -环糊精:(β -CD, 广东省郁南县环糊精厂),经二次蒸馏水两次结晶,配成 $1 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 的水溶液; β -羟丙基环糊精:(HP- β -CD, Sigma, DS = 7.0),配成 $1 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 的水溶液。

α -淀粉酶(生化试剂,由芽胞杆菌深层发酵提取而成,北京双旋微生物培养基制品厂),取一定量的酶溶于 0.01 mol/L 的Tris-HCl($\text{pH} = 7.58$)缓冲液,离心后取上层液,用缓冲液适当稀释后,置冰箱 4°C 保存备用。酶的浓度: $\text{mg/ml} = 1.5 \times A_{280} \sim 0.75 \times A_{280}$ (A_{280} :吸光度值)^[8];0.04%可溶性淀粉(北京红星化工厂)为底物,溶于苯甲酸- Na_2HPO_4 缓冲液($\text{pH} = 7.0 \pm 0.1$); 0.01 N ($1 \text{ N} \triangleq (1 \text{ mol/L}) \times \text{离子价数}$)的碘溶液,由KI和 KIO_3 及稀盐酸按比例配制而成。

除另有说明外,所用试剂均为分析纯,水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 α -淀粉酶活性的测定 淀粉酶的活性根据淀粉碘^[9]的方法测定,一个活性单位规定为:水解 1.0 mg 淀粉(5 min , 20°C)。水解淀粉的量根据淀粉标准曲线计算得到(淀粉碘的吸收峰在 600 nm)。条件实验表明,两种环糊精的加入对碘与淀粉显色反应无影响(数据未列出)。

1.2.2 α -淀粉酶荧光的测定 配制一系列配比的 α -淀粉酶/ β -CD和 α -淀粉酶/HP- β -CD溶液,定容到 10 mL ,摇匀静置 $1 \sim 3 \text{ h}$,置于F-4500型荧光仪上测

收稿日期:2003-02-27 修回日期:2003-06-16

* 山西省留学基金(2003)、山西省青年科技基金(20031014)资助项目

** 电子信箱:cgao@sxu.edu.cn

定荧光信号(激发、发射狭缝均为 5nm, 激发波长 280nm, 发射波长 340nm)。

2 结果与讨论

2.1 β-CD、HP-β-CD 对 α-淀粉酶活性的影响

取 9 支比色管, 各加 α-淀粉酶溶液(0. 4mg/ml) 0. 3ml, 1 号为空白(无环糊精), 2~ 5 号管中分别加 β-CD 溶液 1. 0ml(由条件实验选定), 用水定容至 2. 5ml, 于 6~ 9 号管中分别加 HP-β-CD 溶液 1. 0ml, 用水定容至 2. 5ml, 摇匀, 20℃ 分别静置 1、2、3、4h 后按实验方法 1 测定各体系酶的活性, 并与空白对比得出相对活性, 结果见图 1。

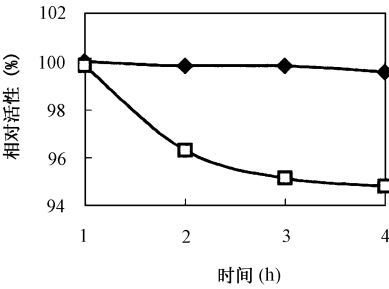


图 1 α-淀粉酶中加入后, 活性的变化 (◆:HP-β-CD; □:β-CD)

结果表明, β-CD 对 α-淀粉酶的活性略有抑制作用, 并随时间增强, 4h 达到平衡;HP-β-CD 无抑制作用。这可能是由于 β-CD 占据了淀粉酶与淀粉结合的活性位置而抑制了其活性, 而 HP-β-CD 却没有占据其活性位置, 这与荧光测定的结果一致。

2.2 β-CD、HP-β-CD 对 α-淀粉酶储存(4℃) 活性影响

按照上述方法, 本文研究了储存条件(4℃) 下两种环糊精对酶活性的影响(测定活性条件同上, 20℃, 5min), 结果见图 2。

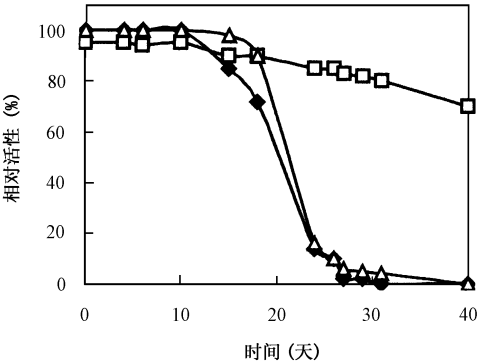


图 2 环糊精对酶的储存活性(4℃) 的影响

◆:α-amyase; □:α-amyase+β-CD; △:α-amyase+HP-β-CD)

结果显示, β-CD 可以明显稳定酶的活性, 在本实验条件下 60 天内仍有 50% 的活性, 无 β-CD 时, 30 天内酶完全失活。而 HP-β-CD 则无明显的稳定作用。

2.3 β-CD、HP-β-CD 对 α-淀粉酶荧光的影响

α-淀粉酶是一种能发荧光的酶, 它的激发、发射谱如图 3 所示。取 α-淀粉酶(0. 4mg/ml) 1. 2ml, 依次加入 β-CD (0. 01mol/L) 0. 0ml、0. 2ml、0. 8ml、2. 0ml、3. 2ml、4. 0ml, 稀释到 10ml, 摇匀后, 室温静置 3h, 于荧光仪上测荧光信号(340nm) 强度; 按同样方法测加入 HP-β-CD 后的荧光强度值, 结果如图 4。

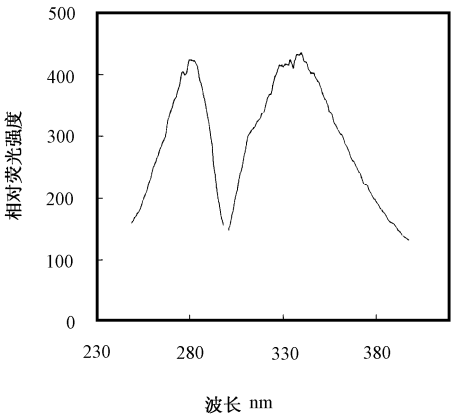


图 3 α-淀粉酶的荧光光谱

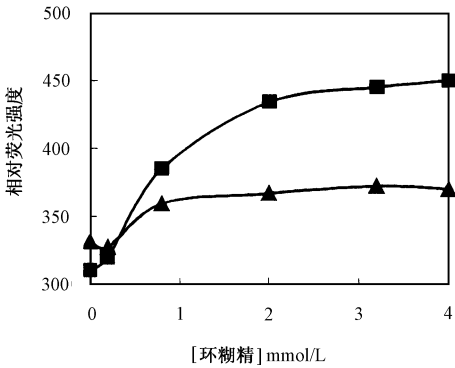


图 4 加入环糊精后 α-淀粉酶荧光的增强 (■:HP-β-CD; ▲:β-CD)

结果表明, β-CD、HP-β-CD 加入后, 酶的荧光信号都有增强, 特别是 HP-β-CD 加入后, 酶的荧光信号随着环糊精浓度的增大而显著增加。荧光信号的变化, 说明 HP-β-CD 比 β-CD 更多地与芳香族氨基酸(苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸) 侧链基团相结合。联系图 2 结果, 可看出, 这种结合优先对酶活性的保持并没有优势, 而 β-CD 与淀粉酶的结合部位对

酶的活性的保持更具意义。

3 结 论

两种环糊精的加入对 α 淀粉酶的活性无损害; β -CD 能明显延长酶的储存活性, 而 HP- β -CD 无明显的作用, 虽然它与芳香族氨基酸残基侧链基团有更多的结合; 实验表明, 刚加入环糊精时 (1~4h), β -CD 对淀粉酶的活性有微小的抑制作用, 而 HP- β -CD 却没有抑制作用, 这可能是由于 β -CD 占据了酶的活性部位, 而影响了酶与底物淀粉的结合, 但是这种与活性部位的结合却有利于延长酶的储存活性。

参考文献

- [1] Jicsinszky L, Fenyvesi E, Hashimoto H, et al. Comprehensive Supramolecular Chemistry. New York: Elsevier, 1996.3: 57
- [2] 童林荟. 环糊精化学——基础与应用. 北京: 科学出版社, 2001. 330
- [3] Shama L, Shama A. Influence of cyclodextrin ring substituents on

folding related aggregation of bovine carbonic anhydrase. Eur J Biochem, 2001, 268: 2456~ 2463

- [4] Karupiah N, Shama A. Cyclodextrins as protein folding aids. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 211: 60~ 66
- [5] Bar J, Golbik R, Hubner G, et al. Denaturation of phosphofructokinase 1 from saccharomyces cerevisiae by guanidinium chloride and reconstitution of the unfolded subunits to their catalytically active form. Biochemistry, 2000, 39(23): 6960 ~ 6968
- [6] Shuang SM, Pan JH, Guo SY. Fluorescence study on the inclusion complexes of rutin with β -cyclodextrin, hydroxypropyl β -cyclodextrin, and γ -cyclodextrin. Anal Lett, 1997, 30(12): 2261 ~ 2270
- [7] Móra S, Simon I, Eödi P. Studies on the active center of pancreatic amylase 1. Binding of β -cyclodextrin. Molecular & Cellular Biochemistry, 1974, 4(3): 205~ 209
- [8] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000. 40
- [9] Tümtürk H, Aksoy S, Hasırcı N. Covalent immobilization of α amylase onto poly (methylmethacrylate 2 hydroxyethyl methacrylate) microspheres and the effect of Ca^{2+} ions on the enzyme activity. Starch/Stärke, 1999, 51: 211~ 217

Investigation of Two Cyclodextrins in Stabilizing α -Amylase Activity

Gao Chunguang Shuang Shaomin Zhao Yongxiang Ren Liexiang
(Chemistry and Chemical Engineering School Shanxi University Taiyuan 030006)

Abstract The effect of β -Cyclodextrin (β -CD), hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) on α amylase activity were studied. The β -CD is a more effective stabilizer of α amylase activity than HP- β -CD during storage at 4 °C, while the HP- β -CD can enhance the enzyme fluorescence intensity greatly.

Key words α amylase β -Cyclodextrin Hydroxypropyl β -cyclodextrin