

有机溶剂微扰葡萄糖淀粉酶时的紫外、荧光和红外光谱

袁 静 明

翟 国 堂

(山西大学分子科学研究所、太原 030006)

(河南大学生物学系, 开封 475001)

提 要

本文结果表明: (1)酶体系中随有机溶剂含量增加, 紫外吸收亦随之增加, 表明芳香氨基酸更充分地暴露, 分子更趋于伸展; (2)酶的荧光发射随有机溶剂量增加而稍有变化, 但当溶剂量达到一定值时[对乙二醇为 35% (V/V)], 荧光发射强度显著增加, 表明酶分子构象受溶剂影响有一个极限值; (3)酶的傅立叶红外光谱表明, 有机溶剂侧链的疏水性愈强, 微扰后 $C=O$, $C-N$, $O-H$ 等共价键的吸收峰变得愈宽, 愈强, 肽链愈伸展。

关键词 葡萄糖淀粉酶, 有机溶剂, 微扰作用, 光谱

一、前 言

近年来, 在蛋白质分子溶液构象的研究中, 紫外光谱, 荧光光谱和 CD 谱等方法发挥了极其重要的作用^[1,2], 傅立叶变换红外光谱可在溶液状态下测定样品的光谱变化, 为蛋白质溶液构象研究又提供了一种新的手段^[3]。本文试图用这些技术探讨根霉葡萄糖淀粉酶在有机溶剂微扰下的光谱变化, 为该酶的结构与功能一致性提供依据。

二、材料与方法

1. 葡萄糖淀粉酶 由本实验室自行培养, 分离、纯化至电泳纯, $A_{280nm}^{1\%} = 14.7^{[4]}$ 。

2. 紫外光谱 按表(1)配比, 使样品与其相应的参比具有相同浓度的缓冲液, pH 值, 离子强度和有机溶剂浓度, 然后将对应的两个比色杯于岛津 UV-365 紫外-可见-近红外分光光度计上进行连续波长扫描。

3. 荧光光谱 用表 1 反应液配比, 于日立-850 型荧光光谱仪上进行波长扫描。

4. 傅立叶变换红外光谱 (FTIR) 该光谱

仪可以测定溶液状态下酶样品。由于不同有机溶剂对酶分子构象影响不同, 从光谱上可以看出有机溶剂侧链 R 基团对酶分子的某些影响。本实验所用有机溶剂有甲醇、丙醇、乙二醇和苯甲醇, 反应体积为 1 ml, 其中, 有机溶剂 0.25 ml, 酶溶液 ($2.05 \mu\text{mol/L}$) 0.75 ml。取少许样

表 1 有机溶剂微扰实验的紫外光谱样品配比
Table 1 The components of reaction mixture for UV spectra with solvent-perturbation

管号 试剂 加量 (ml)	1	2 ¹⁾	3	4	5	6
酶 Enzyme $2.05 \mu\text{mol/L}$	1.0	0	1.0	1.0	1.0	1.0
HAc-NaAc 0.2mol/L , pH 4.6	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
H ₂ O	2.0	2.5-1.0	1.5	1.0	0.5	0
有机溶剂 Organic solvent	0	0.5-2.0	0.5	1.0	1.5	2.0

1) 每个溶剂空白对应于样品 3—6、管号 2 代表了四种情况下的空白溶液。

Each blank corresponds to sample 3—6. No. 2 represents four different blanks.

品放于抛光的 KCl 压片上, 在 Perkin-Elmer 红外光谱仪上进行扫描。

三、实验结果

1. 有机溶剂微扰时酶的紫外光谱

按方法(2)测定有机溶剂乙二醇微扰时葡萄糖淀粉酶的紫外光谱, 从图 1 明显看出, 体系中随着微扰剂乙二醇浓度的不断增加, 酶的紫外吸收值(A)也不断增大。用其它有机溶剂, 如甲醇、丙醇、二氧六环、丙酮等微扰剂时均有类似结果。

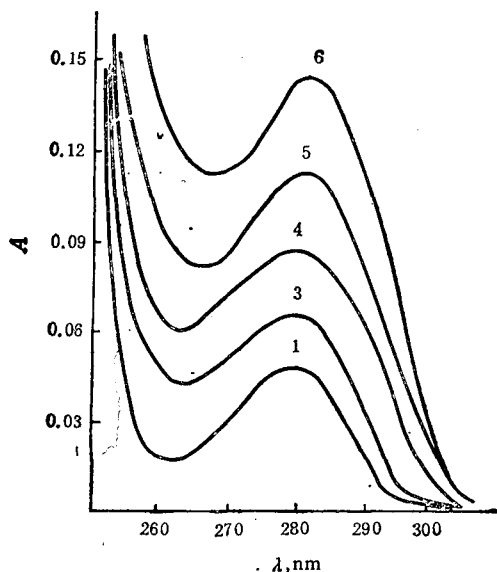


图 1 用乙二醇微扰时葡萄糖淀粉酶紫外差光谱的变化
Fig. 1 The differential UV spectra of glucoamylase perturbed by ethylene glycol

曲线 1, 天然酶; 其他曲线相应于表 1 所列编号
Curve 1, Natural enzyme. Other curves corresponding to the numbers mentioned as table 1

2. 有机溶剂微扰时酶的荧光发射光谱

乙二醇微扰时, 酶的荧光发射光谱如图 2。由于实验中采用 295nm 为激发波长, 所以从荧光发射光谱上得到的信息仅反映糖化酶分子中色氨酸残基受有机溶剂微扰后的情况。从图 2 看出, 该酶最大荧光发射峰在 345nm 处, 随着乙二醇浓度增加, 酶的荧光发射强度亦随之增

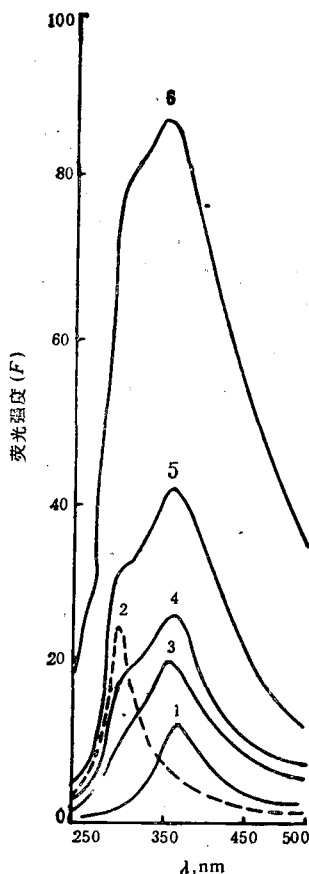


图 2 乙二醇微扰时葡萄糖淀粉酶的荧光发射光谱
Fig. 2 Fluorescence emission spectra of glucoamylase perturbed by ethylene glycol

曲线 1, 天然酶; 曲线 2, 乙二醇对照; 曲线 3—6, 不同量乙二醇微扰曲线

Curve 1, nature enzyme; Curve 2, blank for ethylene glycol; Curve 3—6, amounts of ethylene glycol as Fig. 1

加(最大荧光发射波长紫移是因溶剂影响)。其它有机溶剂如甲醇、二氧六环等亦有类似结果, 只是随微扰剂侧链基团疏水性增加, 介电常数的减小, 葡萄糖淀粉酶的荧光强度不断增加, 最大发射波长发生紫移的程度更加显著。

3. 有机溶剂微扰时酶的傅立叶变换红外光谱

按表 2 反应液配比, 测定酶在 4000cm^{-1} — 450cm^{-1} 的红外光谱。结果如图 3, 图 4 为丙醇微扰时的红外差光谱。

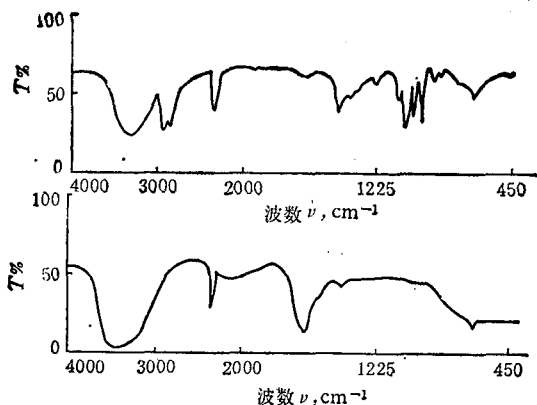


图3 丙醇(上图)和丙醇微扰酶(下图)的 FTIR 图谱

Fig. 3 FTIR spectra of propanol (upper) and perturbed glucoamylase (down)

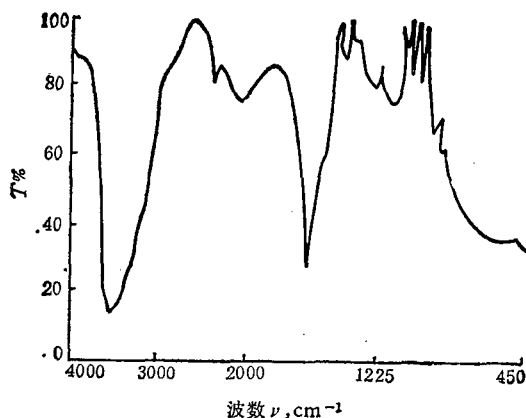


图4 丙醇微扰之后酶的 FTIR 差光谱

Fig. 4 FTIR differential spectra of glucoamylase perturbed by propanol

四、讨 论

从紫外光谱和荧光光谱综合来看,有机溶剂对酶分子构象的影响是比较明显的,特别是当有机溶剂的介电常数比较小时,对酶表面基团的影响尤为显著。图2表明,随着微扰剂递增,在较低乙二醇浓度时,酶的荧光发射强度(F)递增较慢,也就是酶的构象变化不明显;但当乙二醇量增至35%时,酶的荧光强度骤然增加,说明此时酶分子构象有一个骤发性改变。用同步追踪酶活力(表2)可以看出,在体系中有有机溶剂达37.5%之前,酶活力丧失速度大于构象变化速度,此结果与葡萄糖淀粉酶在盐酸胍变性时活力丧失速度快于构象变化速度是完全

一致的。这一现象的可能解释是该酶活性中心处于一个空间易被有机溶剂破坏的微区。在活性部位中参与催化反应的各个基团间的完整的空间关系一旦发生变化,就会引起酶活性的丧失,此时,整个酶分子的空间构象可能尚未发生明显变化,而本文所采用的光谱变化主要反映整体酶分子构象改变的情况。

根据红外光谱学原理,酚羟基(O—H)在 3600cm^{-1} 附近有吸收峰, NH_3^+ 在 2000cm^{-1} 附近有吸收,肽键的羰基($\text{C}=\text{O}$)在 1700cm^{-1} 附近有吸收, $\text{C}-\text{N}$ 键在 1200cm^{-1} 有吸收,从红外光谱变化明显地看出,用甲醇和丙醇微扰酶分子时,它们完全“钻进”了酶分子的内部,这是

表2 酶活力随乙二醇浓度的变化关系

Table 2 The correlation between ethylene glycol concentration and remaining enzymatic activity

乙二醇量 ethylene glycol (ml)	0	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0
占体系的百分比 (V/V) % in reaction system	0	6.25	12.5	25.0	37.5	50.0
酶残余活力(%) remaining activity (%)	100	94	75	52	30	16

糖化酶浓度为 $3.82\text{ }\mu\text{mol/L}$;

酶活力测定按文献[4],反应总体积为4 ml.

The concentration of glucoamylase was $3.82\text{ }\mu\text{mol}$;

The determination of the enzyme activity was carried out as described by reference [4] and the total volume was 4ml.

因为甲醇在 2900cm^{-1} 和 1500cm^{-1} , 1000cm^{-1} 的吸收峰以及丙醇在 2900cm^{-1} , 1500cm^{-1} , 1000cm^{-1} 和以下的“指纹区”吸收峰均在加入酶之后消失。但用苯甲醇, 乙二醇作为酶的微扰剂时(图谱未给出), 情况与上述就有显著不同。苯甲醇、乙二醇在加入酶的前后的 FTIR 图谱上均显示它们的特征吸收峰, 这表明乙二醇和苯甲醇仅微扰酶分子表面, 可能是这两种溶剂分子比甲醇、丙醇大, 不易“钻进”酶分子内部。此外, 1700cm^{-1} 处的羰基(即肽键的羰基)在丙醇微扰之后要比甲醇微扰之后强度大, 峰形锐, 说明丙醇对酶分子的影响要比甲醇大, 这一点很容易理解, 因为丙醇的介电常数小于甲醇,

1700cm^{-1} 峰形的变锐意味着肽链的部分伸展。

参 考 文 献

- 1 Freifelder D. In: Freeman W H ed, *Physical biochemistry, Application to biochemistry and molecular biology*, New York: Academic press, 1967: 337
- 2 Jones D W. *Introduction to the spectroscopy of biological polymers*, New York: Academic press, 1976: 20
- 3 Holloway P W, Mantsch H H. *Biochemistry*, 1989; 28: 931
- 4 袁静明等. 山西大学学报(自然科学版), 1989; 12(2): 209

[本文于 1989 年 12 月 26 日收到,

1990 年 3 月 26 日修回]

THE UV, FTIR AND FLUORESCENCE SPECTRA OF GLUCOAMYLASE WITH SOLVENT-PERTURBATION

Yuan Jingming

(Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Zhai Guotang

(Biology Department, Henan University, Kaifeng)

ABSTRACT

The UV, FTIR and fluorescence spectra differences of glucoamylase in the presence and absence of organic solvent e. g. acetone, methanol, propanol, dioxane, ethylane glycol etc. show that the aromatic amino acid (Trp, Tyr, Phe) are exposed after solvent-perturbation and then the conformational change of glucoamylase may be occurred with fast inactivation of the enzyme.

Key words glucoamylase, organic solvent, perturbation, spectra

(上接第 31 页)

2141 号《花生加工及综合利用技术》资料费 26 元 2142 号《葵花子的加工及向日葵综合利用技术》资料费 22 元
2143 号《芝麻加工及综合利用技术》资料费 24 元 2144 号《蓖麻加工及综合利用技术》资料费 26 元 2452 号《稻谷加工与利用新技术》资料费 28 元 2453 号《小麦加工与利用新技术》资料费 40 元 2454 号《玉米加工与利用新技术》资料费 15 元 2613 号《植物油料加工及综合利用技术》资料费 20 元 2724 号《米糠制白酒技术》资料费 10 元 2872 号《豆渣与豆粕的利用新技术》资料费 10 元 5014 号《棉杆的利用与加工技术》资料费 17 元 5016 号《棉籽壳的综合利用技术》(共四册)资料费 45 元 5021 号《棉油皂脚中提取脂肪酸等加工工艺》资料费 30 元 5022 号《皂脚制肥皂、浮洗剂等加工工艺》资料费 15 元 5047 号《农作物副产品的综合利用技术》资料费 10 元 5089 号《稻糠的综合利用技术》资料费 10 元 5906 号《烂果土法生产酒精技术》资料费 15 元。

[北京 867 信箱 20816 组李群, 邮编: 100024, 电话: 5762194]