

研究报告

酪氨酸酶在有机介质中的酶活性

杨 隼* D. A. ROBB

(Department of Bioscience and Biotechnology University of Strathclyde, Glasgow G4 0NR, UK)

摘要 研究了蘑菇酪氨酸酶在有机溶剂中催化邻苯二酚向邻苯醌的转化反应。结果表明酪氨酸酶在有机介质中能保持较高的活性,其活性主要受体系中的水活度控制。在适当控制酶分子上结合水的条件下,酶活性随温度升高而增大。无机盐的水合物可用于控制这种低水有机介质中的水活度。

关键词 酶活性,有机介质,热力学水活度,酪氨酸酶

酶作为一种高效的生物催化剂,具有高度的区域选择性和立体专一性,有着化学催化剂所无可比拟的优越性。近 20 年的研究已经表明,酶在有机介质中照样能起催化作用,其活性有时甚至比在水溶液中获得的高。酶在有机环境中还表现出许多与在水中不同的性质,如酶的稳定性提高,底物专一性改变,和催化一些在水中不能进行的反应^[1-4]。

一般来说,酶在有机介质中的催化活性受体系中的水分和作为反应介质的有机溶剂的影响。水的作用至关重要。酶在完全干燥的溶剂里通常不显活性,但加入少量水却能使酶反应加速。水加入体系后部分进入溶剂,部分被酶分子吸附。酶活性只取决于被酶分子吸收的水分而与溶剂里的水含量无关^[5]。Halling^[6]建议用热力学水活度这一概念来比较酶分子上吸收的水分,因为体系中一定的水活度与酶分子上一定的结合水相对应,与溶剂种类无关。这里,水活度的定义是在一定的温度压力下,反应体系中的水蒸气压与纯水的蒸气压之比。采用向干燥的反应体系中加入无机盐水合物的方法可以有效地控制体系中的水活度^[7,8],因为盐的高水合物可向反应混合物释放出部分水分并部分转化成其低水合物。盐的这对水合物在一定温度压力下建立平衡,从而给出恒定的水活度。有

机溶剂也是对酶活性的一个重要影响因素。一般认为酶在非极性溶剂中活性较高,而在极性溶剂中活性较低^[9]。另外,酶活性还取决于底物和产物在水和溶剂两相中的分配系数,后者因溶剂而异^[10,11]。

酶在有机介质中的热力学稳定性普遍提高。干燥的脂肪酶不仅能忍受 100℃ 的高温(其半衰期长达 26h),而且它在 100℃ 时的活性甚至比在 20℃ 时还高^[12]。然而,虽然许多酶在有机溶剂中比在水里稳定,但其最佳反应温度并不见得都象脂肪酶一样比在水里高^[3,13]。如果真是这样,那么在有机介质中所提高的热力学稳定性在应用上就会大大受到限制。本文通过蘑菇酪氨酸酶对这个问题进行进一步的研究。

酪氨酸酶又叫多酚氧化酶(EC1, 14, 18, 1),它催化单苯酚→邻苯二酚→邻苯醌的氧化反应。该反应对有机化学很重要,因为苯环上邻位羟基化用化学方法不容易实现。酪氨酸酶在各种有机溶剂中的催化已经得到了较充分的研究^[5,11,13,14]。在 20℃ 用水饱和过的氯仿中,其半衰期为在水里的 10 倍,但其最佳反应温度却

* 现在地址: Center for Biotechnology and Bioengineering, University of Pittsburgh, 300 Technology Drive, Pittsburgh, PA 15219, USA.

收稿日期: 1994-03-01, 修回日期: 1994-05-31

只有 20℃, 比在水里的最佳反应温度 (45℃) 低^[13]. 本文通过研究水和温度对酪氨酸酶在有机溶剂中反应活性的影响, 就有机介质中的酶能否在较高温度下表现出较高活性这一问题进行初步的探讨.

1 实验方法

1.1 酶的制备

250g 新鲜蘑菇加入 500ml 磷酸缓冲溶液 (50mmol/L, pH 6.0), 用搅拌器打碎, 经薄纱布滤掉残渣后在 4℃ 下离心分离 30min (30 000g). 向滤液加入 (NH₄)₂SO₄ (以沉淀蛋白质) 和 K₂HPO₄ (以控制 pH 值), 使其最后浓度分别达到 75% 饱和程度和 50mmol/L, 在 4℃ 下磁力搅拌 30min 后离心过滤 (4℃, 30 000g 30min). 所得沉淀与 10g 硅藻土 (BDH, 事先用 HCl 洗掉杂质, 再用水洗至中性后干燥) 混合均匀后在真空炉中 (室温下) 干燥 1d. 所得的固定在硅藻土上的酪氨酸酶置于密闭瓶内在冰箱中贮存.

1.2 有机溶剂中的酶反应

底物为 4-甲基邻苯二酚 (Fluka). 溶剂使用前先用水洗, 再经分子筛 (4A) 干燥. 在一个 100ml 的加塞圆底烧瓶中装有 50ml 20mmol/L 的底物溶液 (氯仿或甲苯为溶剂), 置于水浴中以控制反应温度 (20—40℃), 顶部搅拌器搅拌 (100r/min). 0.1g 酶加入反应器后开始反应. 产物 4-甲基邻苯醌的生成用分光光度计跟踪 (产物在 390nm 的摩尔吸光系数为 1.55 L · mmol⁻¹ · cm⁻¹), 每 10 分钟取出 2ml 溶液用微型离心机离心 1min 后读上清液在 390nm 处的吸光度, 然后将上清液连同离心得到的沉淀一起迅速转移回反应器中. 初始反应速度由 10min 后生成的产物来计算得到.

2 结果与讨论

当氯仿在 20℃ 用水饱和后, 酪氨酸酶的活性在 40℃ 时比在 20℃ 时大大降低^[13]. 但这并不意味着酶因为温度升高由于变性而失活. 图 1 和图 2 清楚地表明当反应温度从 40℃ 回降到

20℃ 时, 酶显示出和在 20℃ 时一样的活性. 这说明酶在高温下的失活现象实际上是可逆的,

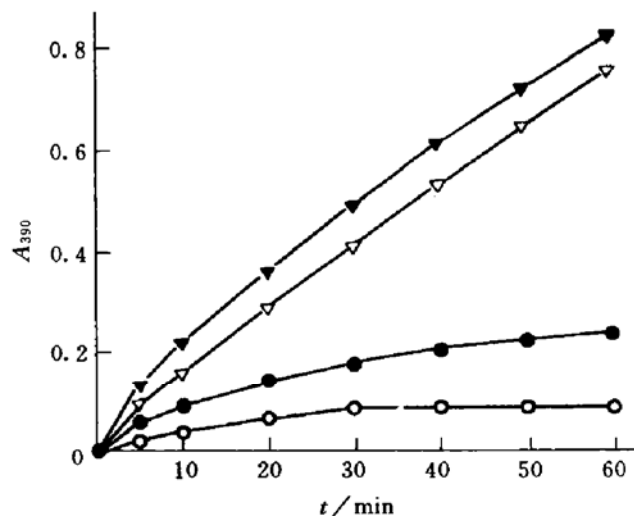


图 1 酪氨酸酶在 20℃ 时用水饱和过的氯仿中的反应活性

○—○: 0.5g 酶在 40℃ 的氯仿 (100ml) 中放置 1h 后加入 0.248g 底物 (20mmol/L), 反应在 40℃ 下进行; ●—●: 0.5g 酶加入 100ml 20mmol/L 底物的氯仿溶液中, 反应在 40℃ 下进行; △—△: 0.5g 酶在 40℃ 的氯仿 (100ml) 中放置 1h 后, 温度迅速回降到 20℃, 再加入 0.248g 底物 (20mmol/L), 反应在 20℃ 下进行; ▲—▲: 0.5g 酶加入 100ml 20mmol/L 的氯仿溶液中, 反应在 20℃ 下进行.

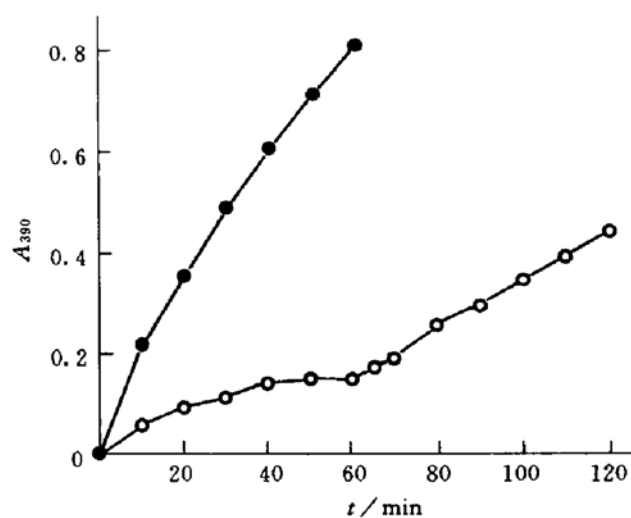


图 2 酪氨酸酶在氯仿中的反应活性

氯仿先在 20℃ 时用水饱和过. ●—●: 0.5g 酶加入 100ml 20mmol/L 底物的氯仿溶液中, 反应在 20℃ 下进行; ○—○: 同上, 反应在 40℃ 下进行 1h 后温度迅速回降至 20℃.

酶活性并没有被体系中的底物, 水或溶剂所抑制. 最可能的解释就是在 40℃ 时, 水在氯仿中溶解度比在 20℃ 时大大提高, 温度升高使溶剂从原来 20℃ 时的水饱和状态变为缺水状态, 因此原本属于酶分子的水分就会被溶剂夺取, 使酶分子上的水含量大大减少, 从而造成酶活性下降. 温度回降使酶分子重新获得水分而使酶活性恢复.

图 3 和图 4 证实了上面的解释. 只要给体系中补充足够的水分 (直接加水或盐水合物), 酶在 40℃ 时照样可以显示出较高的活性, 而且加入的水分越多, 酶活性越大. 当然必须指出, 加入的水太多会造成酶分子和载体的结块, 从而使酶、底物和产物之间的质量传递受到限制, 由此引起酶活性下降. 加入体系中的最佳水分与酶、溶剂和载体的种类, 酶和底物的量, 反应混合物的体积及反应温度等有关. 比如在 20℃ 时, 在含 0.1g 酪氨酸酶/硅藻土的 50ml 20mmol/L 底物 (4-甲基邻苯二酚) 溶液中加入水的最佳量对氯仿是 0.225ml, 而对甲苯则是 0.036ml, 这是因为氯仿的极性比甲苯大, 所以吸水能力更强. 由于它只因酶而异, 与其它因

素无关, 而且很容易用湿度计来测定^[6]. 因此用热力学水活度来表示比较恰当, 对于酪氨酸酶, 酶活性以水活度为 0.96 时为最佳.

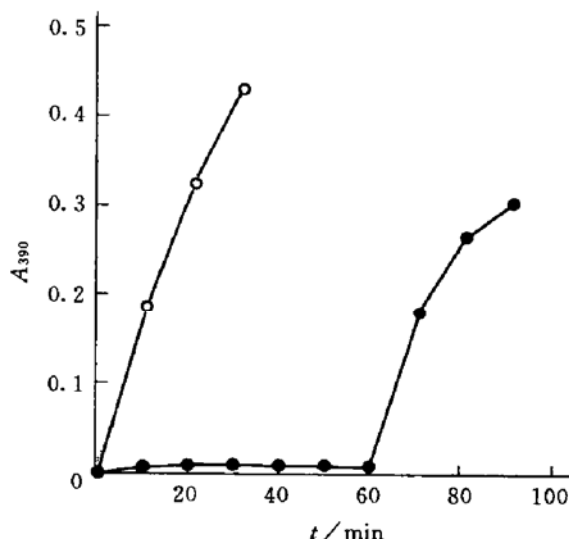


图 4 酪氨酸酶在 40℃ 下的干燥氯仿中

0.1g 酶加入 50ml 20mmol/L 底物的氯仿溶液中. ○—○: 10g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 加入使反应马上进行; ●—●: 1h 后加入 10g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 使反应进行.

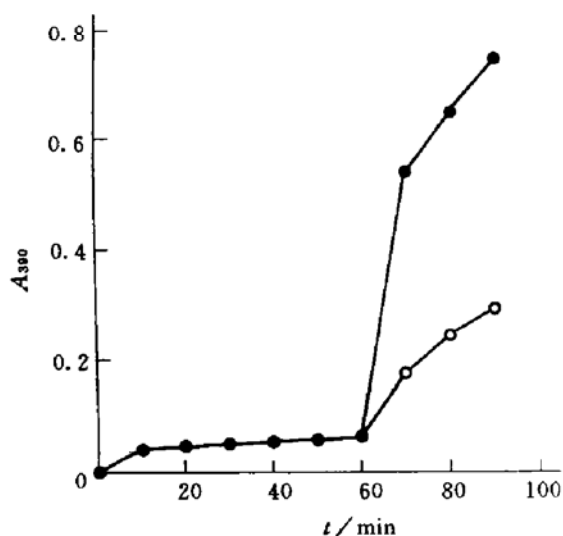


图 3 酪氨酸酶在氯仿中的反应活性

0.1g 酶加入 50ml 20mmol/L 底物的氯仿 (先在 20℃ 下水饱和过) 溶液中, 反应在 40℃ 下进行 1h 后, 加入 50μl (○—○) 或 100μl (●—●) 水使反应继续进行.

以上实验表明, 酶在温度升高时活性的下降是由于酶分子的失水造成的. 把反应温度降回到 20℃ 或者在 40℃ 时直接向体系中加入适量的水或盐水合物, 都可以达到向酶分子补充水分的作用, 从而使酶活性恢复. 那么, 如果保证酶分子上的水分恒定, 酶能否在较高的温度下表现出较高的活性呢?

有两种方法可以保证酶分子上的水分恒定, 即体系中的水活度恒定. 一种方法是把溶剂在各反应温度下事先用水饱和. 另一种方法是直接向干燥的反应混合物中加入一种无机盐的水合物 (文献 [7] 列出了一系列盐水合物在各温度下给出的水活度). 从表 1 左边可以看出, 当氯仿或甲苯在各反应温度下事先用水饱和后, 酶反应的速度确实随着反应温度升高而增大. 表 1 的右边则是用盐水合物法证实了这一结果. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 在 20℃ 和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 在 40℃ 给出相同的水活度 (分别为 0.74 和 0.73^[7]). 很显然, 不论是在氯仿还是在

甲苯中, 酶活性在 40℃ 时都比在 20℃ 时高. 应该指出, 在表 1 的各个反应温度下, 酶在氯仿中的活性均比在甲苯中大, 是因为底物分配系数(溶剂/水)不同(对氯仿和甲苯分别为 0.67 和 0.31^[10]), 造成酶活性中心附近底物浓度不一样, 从而影响反应速度^[10,11].

表 1 酪氨酸酶在各反应温度下初始反应速度的比较

反应温度	$\mu\text{mol/L} \cdot \text{min}$				
	水饱和法		盐合物法		
	氯仿	甲苯	氯仿	甲苯	所用盐
20℃	11.2	2.8	7.9	5.0	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
30℃	12.3	10.1			
40℃	29.0	26.0	12.2	8.0	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

注: 反应条件: 水饱和法: 0.1g 酶加入 50ml 20mmol/L 的 4-甲基邻苯二酚溶液中. 溶剂事先在各反应温度下水饱和. 盐合物法: 0.1g 酶和 10g 盐合物加入 50ml 20mmol/L 的底物溶液中. 溶剂事先用分子筛干燥过.

表 2 则列出了用三种盐的水合物来控制水活度, 在三种温度下酶反应的初始速度. 可以看到, 对每一种盐的水合物, 温度每升高 10℃, 酶反应速度都提高一至二倍; 而在同一温度下, 具有较高水活度的盐能使酶表现出较高的活性. 总的来说, 酶活性基本上随水活度增大而增大. 当把反应速度对水活度作图时, 得到的

表 2 加入盐合物在各温度下对酶反应初始速度的影响

反应温度	$\text{mmol/L} \cdot \text{min}$		
	$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
20℃	0.15 (0.76)	0.12 (0.74)	0.01 (0.57)
30℃	0.31 (0.83)	0.32 (0.85)	0.05 (0.65)
40℃	—	—	0.16 (0.73)

注: 反应条件: 0.1g 酶和 1g 盐合物加入 6ml 10mmol/L 4-甲基邻苯二酚的干燥氯仿溶液中. 括号内为盐合物在各温度下给出的水活度^[7].

曲线(图 5)与在 20℃ 时通过直接加水测得的速度-水活度曲线^[15]极为相似, 从而证明酶活性归根结底是由体系中的水活度决定的. 这个实验也再次表明, 有机溶剂中的酶不会在高温下失活, 只要有足够的水分, 酶活性随温度升高而增大.

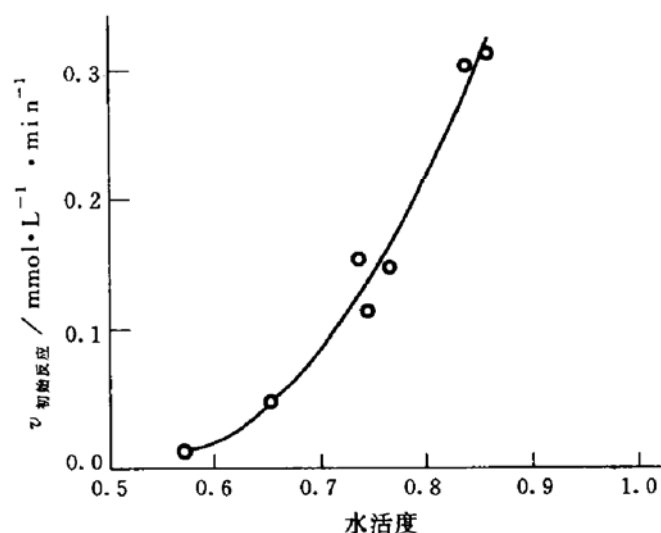


图 5 酶活性随水活度的变化
数据取自表 2.

3 结 论

本文通过实验证明酪氨酸酶在有机介质中的活性归根结底是由体系中的水活度, 即在酶分子上结合水的程度来决定的. 酶分子上的结合水可通过向反应体系中直接加水或加入一种盐的水合物来控制. 在对此进行适当控制的前提下, 有机介质中的酶完全可以在较高的温度下显示出较高的活性. 我们相信此结论同样适用于其它酶. 因此, 和在水溶液中相比, 当酶被置于有机溶剂中时, 它不仅能够拥有更高的热力学稳定性, 而且可能拥有更高的最佳反应温度. 这两方面对酶在有机合成和化工生产中的应用无疑都是重要的和有用的.

参 考 文 献

- 1 Klivanov A M. Trends Biochem Sci, 1989; 14: 141
- 2 Dordick J S. Enzyme Microb Technol, 1989; 11: 194
- 3 Gupta M N. Eur J Biochem, 1992; 203: 25
- 4 杨 缙, Robb D A, 计亮年. 生物化学与生物物理进展,

- 1994; 21: 98
- 5 Zaks A, Klibanov A M. J Biol Chem, 1988; 263: 8017
 - 6 Halling P J. Trends Biotechnol, 1989; 7: 500
 - 7 Halling P J. Biotechnol Tech, 1992; 6: 271
 - 8 Yang Z, Robb D A. Biotechnol Tech, 1993; 7: 37
 - 9 Laane C, Boeren S, Vos K *et al.* Biotechnol Bioeng, 1987; 30: 81
 - 10 Yang Z, Robb D A, Halling P J. In: Tramper J *et al.* eds. Biocatalysis in non-conventional media, Amsterdam: Elsevier, 1992; 585
 - 11 Yang Z, Robb D A. Biotechnol Bioeng, 1994; 43: 365
 - 12 Zaks A, Klibanov A M. Science, 1984; 224: 1249
 - 13 Yang Z, Robb D A. Enzyme Microb Technol, 1993; 15: 1030
 - 14 Kazandjian R Z, Klibanov A M. J Am Chem Soc, 1985; 107: 5448
 - 15 Yang Z, Robb D A. Biochem Soc Trans, 1991; 20: 13S

Tyrosinase Activity in Organic Media. Yang Zhen. D. A. ROBB (*Department of Bioscience and Biotechnology, University of Strathclyde,*

U. K.)

Abstract The activity of mushroom tyrosinase catalyzing the conversion of *o*-diphenols to *o*-quinones in organic solvents has been investigated with addition of different amounts of water and at various temperatures. The results have shown that tyrosinase possesses high activity in organic media, the enzyme activity is mainly controlled by the water activity in the reaction system, and it can increase with the increase of reaction temperature as long as the amount of water bound to the enzyme molecule is properly controlled. Salt hydrates are effective for such control in nearly non-aqueous conditions.

Key words enzyme activity, organic media, thermodynamic water activity, tyrosinase

不同有机磷酸酯磷酰化乙酰胆碱酯酶活性中心的构象差异

罗春元 李志秀 夏叔泉 孙曼霖 杨进生

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 通过观察 2 位肟化合物 HI-6 和 HGG-42 及它们的 4 位肟异构体对不同有机磷毒剂抑制的 AChE 的重活化作用发现塔崩、梭曼、沙林等有机磷毒剂磷酰化的 AChE 活性中心的构象可能存在着明显差异; 又从变构剂 C₁₀ 和丙吡啶对 TMB₁ 重活化这几种毒剂磷酰化 AChE 的影响中证实塔崩磷酰化 AChE 活性中心构象与沙林、梭曼和 VX 3 种毒剂磷酰化的 AChE 明显不同。

关键词 AChE, 构象, 有机磷毒剂, 重活化, 变构剂

有机磷毒剂对乙酰胆碱酯酶 (AChE) 不可逆性抑制是它们的主要中毒机理, 不同毒剂主要通过 AChE 活性中心的丝氨酸羟基发生磷酰化反应而使酶失去活力。重活化药物是含有亲核性进攻基团的化合物, 它们通过带负电性的亲核基团对磷酰化酶的毒剂残基磷原子的

亲核进攻而恢复酶活力。目前, 肟类药物 2-PAM、LüH6 和 HI-6 等都是高效重活化剂, 它们在有机磷毒剂及农药中毒的救治中具有十分重要的意义。但是, 人们发现: 不同药物对不