

从本实验来看,还可使 SOD 转变成疏水型,后者可被蛋白水解酶特异地识别并降解.新近研究发现哺乳类动物细胞内存在一种蛋白酶,它专门识别活性氧化修饰后蛋白质并将其降解^[10].因此,我们推测活性氧对 SOD 氧化修饰在调节 SOD 代谢过程中具有重要意义,有关疏水形式 SOD 可被蛋白水解酶识别的进一步机理仍在研究中.

参 考 文 献

- 1 Hodgson E K, Fridovich I. *Biochemistry*, 1975; **14**: 24
- 2 李培峰, 方允中. *生物化学杂志*, 1993; **9**: 411
- 3 Li P F, Fang Y Z, Lu X. *Biochem Mole Biol Intern*, 1993; **29**: 929
- 4 Li P F, Fang Y Z, Li Y Z. *Med Sci Res*, 1993; **21**: 521
- 5 李培峰, 方允中, 陈吉中等. *生物化学杂志*, 1993; **9**: 417
- 6 Reiss R. *Biological and clinical aspects of superoxide and superoxide dismutase*. New York: Elsevier Press, 1980: 286
- 7 Salo D C, Lin S W, Pacifici R E *et al.* *Free Radical Biol Med*, 1988; **5**: 335
- 8 Boheln P, Stein S, Dairman W *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1973; **155**: 213
- 9 李益新, 方允中. *生物化学与生物物理进展*, 1983; (2): 59

10 Davis K J A. *Free Radical Biol Med*, 1986; **2**: 155

The Hydrophobicity Changes of Superoxide Dismutase Caused by Reactive Oxygen Species .

Li Peifeng, Fang Yunzhong (*Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract To study the mechanism of the susceptibility changes of cupro-zinc superoxide dismutase (SOD) to proteases induced by reactive oxygen species is the aim of this work. By hydrophobic chromatography, hydrophilic and hydrophobic form of SOD was isolated from SOD modified by hydrogen peroxide or ascorbate-Fe (Ⅲ) system. The hydrophobic form of SOD demonstrated a high proteolytic susceptibility to trypsin and pepsin than both the native and hydrophilic form of SOD. The results suggested that the increased hydrophobicity of SOD might be responsible for its high susceptibility to proteases.

Key words cupro-zinc superoxide dismutase, reactive oxygen species, hydrophobic chromatography

W/O 微乳液中糖化酶的研究*

李干佐 任学贞 刘 燕

(山东大学化学院, 济南 250100)

汪复宁 郑红英

(山东大学生物系, 济南 250100)

摘要 在十六烷基三甲基溴化铵/正戊醇/异辛烷/水体系中, 选取 W/O 型微乳液作为糖化酶的微环境, 研究了其催化活性. 并与其在水溶液中进行比较. 结果表明, 在微乳液中, 糖化酶催化淀粉水解反应的最佳反应温度和 pH 比在水溶液中低. 反应的最大速度 V_m 和米氏常数 K_m 比其在水溶液中分别提高了近 6 倍和 3 倍.

关键词 微乳液, 糖化酶, 酶催化, 十六烷基三甲基溴化铵

表面活性剂 (助表面活性剂) /油/水形成的反胶束, 微乳液等微环境与生物膜相似, 通常作为生物膜的模拟物^[1]. 因此, 微环境中的酶学研究比自由酶 (即从生物体中分离出来的

“纯”酶) 在水 (缓冲液) 中的研究, 更接近酶

* 国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1994-01-18, 修回日期: 1994-03-17

在生物体中的实际情况^[2]. 自 70 年代末, Luisi 等人^[3]发现在表面活性剂/油/水体系中 α -胰凝乳蛋白酶能够保持其活性和专一性后, 微环境中的酶学研究引起了广泛地关注. 文献报道, 有些酶如二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase)^[4], 过氧化氢酶(peroxidase)^[5]等在微环境中具有超活性(superactivity), 即酶在微环境中的活性显著高于其在水溶液中的活性.

目前, 微环境中的酶学研究主要集中于二(2-乙基己基)琥珀酸磺酸钠(AOT)反胶束中酶的研究, 而对其它微环境中的酶研究相对较少. 对微环境中糖化酶的研究尚未见报道. 本文研究了糖化酶在十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)/正戊醇/异辛烷/水微乳液体系中的催化行为, 并与其在水溶液中的情况进行了比较.

1 材料与方法

1.1 试剂

十六烷基三甲基溴化铵(AR), 山东济宁化工研究所生产. 在丙酮和乙醇(2:1)混合溶剂中重结晶两次, 干燥后使用.

糖化酶, 无锡酶制剂厂产品.

可溶性淀粉, 化学纯, 浙江菱湖化工试剂厂生产. 其它试剂均为分析纯试剂.

1.2 微乳液的配制

按文献[6]方法, 确定CTAB-异辛烷

(80%)/正戊醇-异辛烷(80%)/NaAc-HAc 缓冲液(0.1mol/L, pH=4.0)的拟三元相图(图1). 由相图看出, 该体系可划分为 W/O 微乳液区, 溶致液晶区和乳状液区三个部分; W/O 微乳液区不是很大. 考虑到加入淀粉后, W/O 微乳液区还可能会缩小, 选用图1中A点作为实验点. 该点既考虑到CTAB浓度较低, 又能保证加入淀粉后, 该体系也能落在 W/O 微乳液区域. A点的组成如表1.

表1 微乳液的组成比

	(%)			
名称	CTAB	正戊醇	异辛烷	缓冲液
质量比	6.96	10.44	69.60	13.00

1.3 酶活力的测定方法

以单位时间内, 酶促每毫升淀粉溶液水解成的葡萄糖的含量, 作为测定酶活力的指标. 将反应体系在反应温度下恒温 10min 后, 加入酶溶液; 摇匀(约 3s)后, 立即计时, 在一定反应时间后取出混合液 1.0ml, 煮沸 10min 将酶灭活, 终止反应. 同时把已灭活的等量酶液加到反应体系中做平行试验, 并以此作为空白, 利用分光光度法^[7]测定葡萄糖的生成量.

2 结果与讨论

2.1 pH 对酶活力的影响

分别配制 pH 为 3.6, 4.0, 4.4, 4.6, 5.0 的淀粉和酶液. 按表1中比例配制微乳液. 在 45℃ 恒温 10min 后, 加入酶液, 摇匀后立即计时. 取 10min 后的混合物进行测定. 结果如图2. 从图2看出, 微乳液中糖化酶的最适 pH 为 4.0, 比水溶液中的最适 pH (4.5) 稍有降低. 需要指出, 图2中 pH 为配制底物和酶液的 pH, 并不一定代表微乳液液滴中水池的实际 pH.

2.2 温度的影响

在微乳液体系中, 在不同温度下反应 10min 后, 进行测定. 图3为微乳液中葡萄糖的生成量随温度的变化曲线. 由图3可见, 微乳液中糖化酶在 50℃ 时活力最大, 比水溶液条

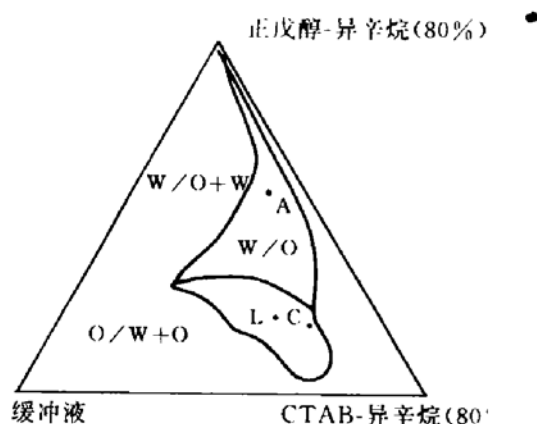


图1 CTAB/正戊醇/异辛烷/缓冲液的拟三元相图

W/O: 微乳液区, L·C·: 溶致液晶区, W/O+
W, O/W+O: 乳状液区.

件下的最适温度降低了近 10°C 。看来微乳液水池中糖化酶在 $50\text{--}60^{\circ}\text{C}$ 间的活力下降不能归于酶蛋白的高温变性。在较稳定的微乳液液滴水池中的酶, 被水和活性剂膜所包围, 保证了其不为有机溶剂失活。在较高温度下, 微乳液稳定性降低, 使水核中的酶与有机溶剂的接触机会增加, 可能是导致酶活力下降的主要原因。

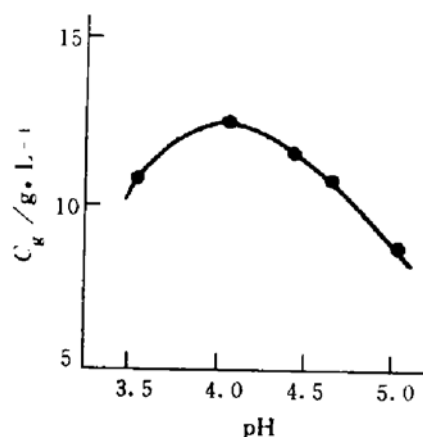


图2 微乳液水核 pH 对酶活力的影响

水池中 $C_E = 0.92\text{g/L}$; $C_S = 10.0\text{g/L}$. C_E , C_S , C_g 分别表示酶、淀粉和葡萄糖的浓度。

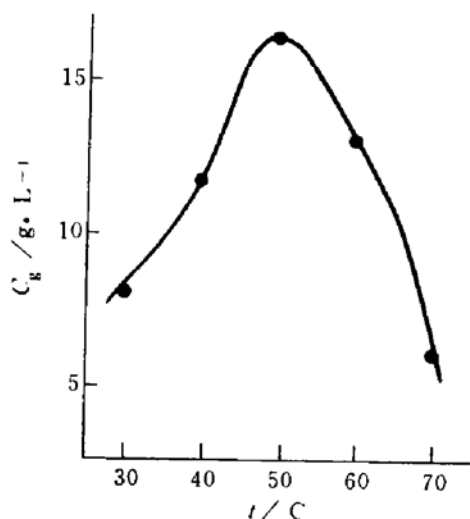


图3 温度对微乳液中酶活力的影响

水池中 $C_E = 0.92\text{g/L}$; $C_S = 10.0\text{g/L}$, $\text{pH} = 4.0$. C_E , C_S , C_g 分别表示酶、淀粉和葡萄糖的浓度。

2.3 底物浓度的影响

配制一系列不同浓度的淀粉溶液, 分别在

微乳液及水溶液的最适 pH 和温度下反应一定时间后, 取出样品, 终止反应。然后测定葡萄糖的生成量。绘制反应进程曲线, 求出反应的初速率。图 4, 图 5 分别为在微乳液和水溶液中反应初速度随底物浓度的变化曲线。由双倒数法做图(图6, 图7), 可求出在微乳液中糖化酶催化淀粉水解反应的米氏常数 $K_m = 25\text{g/L}$, $V_m = 16.7\text{g/L} \cdot \text{min}$, 水溶液中 $K_m = 6.5\text{g/L}$, $V_m = 2.4\text{g/L} \cdot \text{min}$ 。微乳液中的 K_m 比水溶液中增加了近 3 倍, V_m 增加了 6 倍。

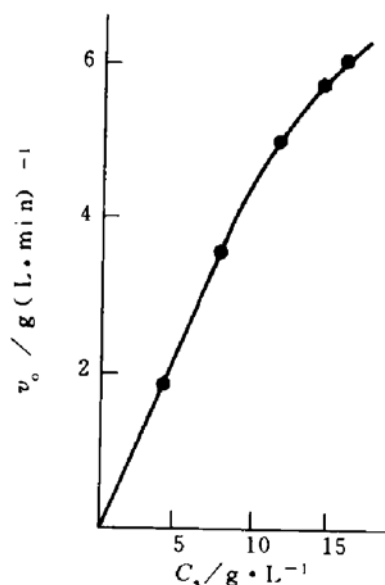


图4 微乳液中初速度与底物浓度的关系曲线

$t = 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4.0$, $C_E = 0.92\text{g/L}$.

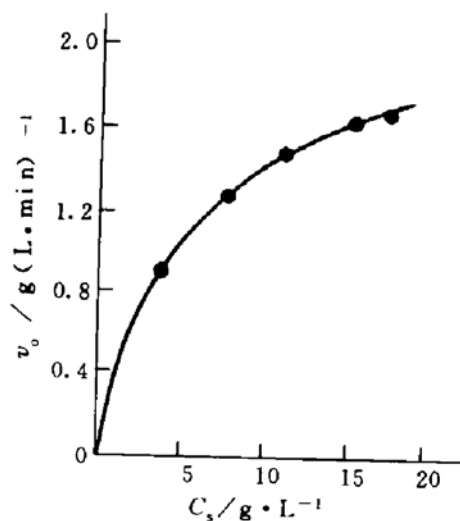


图5 水溶液中初速度与底物浓度的关系曲线

$t = 60^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4.5$, $C_E = 0.92\text{g/L}$.

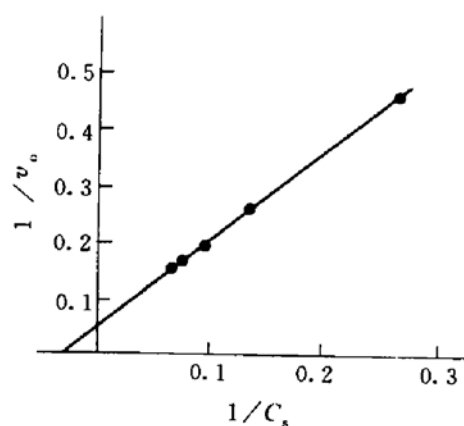


图6 微乳液中 $\frac{1}{v}$ 对 $\frac{1}{C_s}$ 双倒数曲线

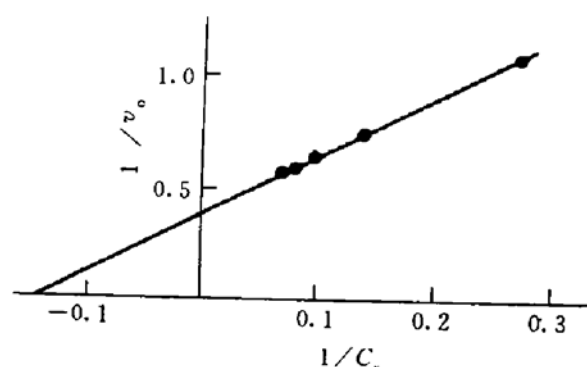


图7 水溶液中 $\frac{1}{v}$ 对 $\frac{1}{C_s}$ 双倒数曲线

参 考 文 献

- 1 Fendler J H. 程虎民等译. 膜模拟化学. 北京: 科学出版社, 1991: 200—208
- 2 Martinek K, Levashov A V, Klyachko N *et al.* Eur J Biochem, 1986; **155**: 453
- 3 Luisi P L, Henninger F, Joppich M *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1977; **74**: 1384

- 4 Ka ductase S S, Kumar Anil, Kumar Ajay. Biochem Int, 1989; **19**: 547
- 5 Klyachko N, Levashov A V, Martinek K. Mol Biol, 1984; **18**: 1019
- 6 Li Ganzuo, Friberg S E. J Dispersion Sci Technol, 1983; **4**: 19
- 7 蔡武城, 袁厚积. 生物物质常用化学分析法. 北京: 科学出版社, 1982: 8—10

Study of Glucoamylase in W/O Microemulsion. Li Ganzuo, Ren Xuezheng, Liu yan (School of Chemistry, Shandong University, Jinan 250100, China); Wang Funing, Zheng Hongying (Department of Biology, Shandong University, Jinan 250100, China).

Abstract The activity of glucoamylase has been investigated in W/O microemulsion of cetyltrimethyl ammonium bromide/n-pentanol/iso-octane/water system and compared with that in aqueous solution. It was observed that the optimum temperature and pH of the enzyme decreased, and the maximum hydrolysis rate of starch (V_m) and Michaelis constant (K_m) increased nearly 6 and 3 times, respectively in microemulsion compared with that in aqueous solution.

Key words microemulsion, glucoamylase, enzymic catalysis, cetyltrimethylammonium bromide

裂褶菌多糖的构象研究*

周义发 张丽萍 杨庆尧** 张翼伸

(东北师范大学生物系, 长春 130024)

摘要 从裂褶菌中提取一水溶性多糖 Sc1. 气相色谱, 高碘酸盐氧化, 甲基化分析等确定它为葡聚糖. 1-3 糖苷键构成其主链, 平均三分之一的主链残基在 6 位带有分枝. 红外光谱和三氧化铬氧化表明 Sc1 全部残基为 β 构型. 在不同的温度和不同的酸碱浓度状态下, 检查糖链与刚果红形成络合物的能力以