

米曲霉外切 β -D-氨基葡萄糖苷酶 活性部位研究

李冬霞¹, 夏文水^{2,*}

(1. 苏州农业职业技术学院食品系, 江苏苏州 215008;

2. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要:为了解米曲霉外切 β -D-氨基葡萄糖苷酶(GlcNase)的结构特点,采用焦碳酸二乙酯(DEPC)和N-溴代琥珀酰亚胺(NBS),分别对GlcNase分子中的组氨酸(His)残基和色氨酸(Trp)残基进行化学修饰。DEPC修饰结果表明,有1分子His残基位于GlcNase的活性部位;NBS修饰结果表明,Trp残基处于GlcNase的活性部位,且至少有1分子Trp残基位于GlcNase活性部位的底物结合部位。

关键词: β -D-氨基葡萄糖苷酶,化学修饰,活性部位

Study on active site of exo- β -D-glucosaminidase from *Aspergillus Oryzae*

LI Dong-xia¹, XIA Wen-shui^{2,*}

(1. Food Department, Suzhou Polytechnic Institute of Agriculture, Suzhou 215008, China;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract:To obtain structure information about exo- β -D-glucosaminidase (GlcNase) from *Aspergillus Oryzae*, chemical modification was performed by DEPC and NBS to its histidine residues and tryptophan residues, respectively. Modification of the enzyme by DEPC showed that 1 mole of histidine residue existed in the active site of the enzyme. Modification by NBS showed that tryptophan residues existed in the active site and there was at least 1 mole of tryptophan residue in the substrate binding site.

Key words: exo- β -D-glucosaminidase; chemical modification; active site

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)10-0200-03

β -D-氨基葡萄糖苷酶(GlcNase)属外切壳聚糖酶,它以外切的形式作用于壳聚糖分子,依次切断壳聚糖或甲壳低聚糖分子中的 β -1,4-糖苷键,并将底物最终水解为氨基葡萄糖^[1-2]。截至目前,国内外关于GlcNase的研究报道较少。李冬霞等^[3]从来源于*Aspergillus Oryzae*的商品脂肪酶中分离纯化得到一种具有壳聚糖水解能力的酶组分,根据其作用模式特点,鉴定其为GlcNase。酶的活性部位是指酶分子中能直接结合底物,并催化底物发生化学反应的区域。研究酶活性部位结构中化学基团的种类、数目以及它们在多肽链一级结构和空间结构中的位置,对于阐明酶的催化机理具有重要的意义^[4]。为进一步了解*Aspergillus O.* GlcNase的结构特点,本工作采用焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)和N-溴代

琥珀酰亚胺(N-bromosuccinimide, NBS),分别对GlcNase分子中的组氨酸残基和色氨酸残基进行了化学修饰,通过化学修饰前后酶活力的变化情况判断酶活性部位的氨基酸组成。

1 材料与方法

1.1 实验材料

壳聚糖 脱乙酰度82%,水分含量为10.1%,灰分0.71%,实验室自制;GlcNase 从来源于*Aspergillus O.*的脂肪酶中分离纯化得到的经过冷冻干燥的纯化酶;DEPC、NBS、牛血清蛋白 Sigma公司;氨基葡萄糖盐酸盐、氨基酸标样、缓冲液用盐 上海国药集团。

1.2 实验方法

1.2.1 组氨酸残基的修饰 在酶液中加入不同浓度的DEPC乙醇溶液,在30℃恒温水浴中保温不同时间,加入过量的His除去未反应的DEPC后,测定酶液的残余活力,即修饰后的酶活占未修饰酶活的百分比。同时测定在30℃水浴中保温的加入乙醇的酶液的酶活力,以此活力为100%。

收稿日期:2010-04-12 *通讯联系人

作者简介:李冬霞(1980-),女,博士,讲师,研究方向:生物活性物质及功能性食品。

基金项目:国家自然科学基金项目(20576104)。

羟胺对修饰酶活力的恢复作用:在经 DEPC 修饰后的酶中加入适量羟胺溶液(以 HCl 校正其 pH 至 7),使羟胺浓度达到 0.2mol/L,在 30℃ 下作用不同时间后测定酶的活力。空白为未经 DEPC 修饰的样品,其他处理都与样品相同。计算各作用时间下酶的残余活力。

1.2.2 色氨酸残基的修饰 参照 Spande 和 Witkop 的方法^[5]进行实验。以 0.02mol/L pH5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液为对照,在样品皿中加入溶于相同缓冲液(0.02mol/L, pH5.0)的酶液(1.1μmol/L),间隔一定时间,同时向两种溶液中分别连续滴加 10μL 的 NBS 溶液(溶于 0.02mol/L, pH5.0 的磷酸盐缓冲液),混匀,放置一段时间,分别测定两样品的酶活力和在 280nm 处的吸光度,计算被氧化修饰的 Trp 残基数。

底物保护作用:先将适量的壳聚糖溶液与酶结合,在 30℃ 水浴中作用不同时间后,再加入 NBS 溶液,使 NBS 浓度为 0.5mmol/L,在 30℃ 水浴中对酶进行修饰 30min 后,测定剩余酶活,以不加 NBS 的酶液活力为参照。

1.2.3 壳聚糖酶活测定 吸取壳聚糖溶液于具塞试管中,在 60℃ 下保温 5min 后加入酶液,立即摇匀。反应 30min 后加入碱性铁氰化钾试剂并在沸水中煮 10min 以中止反应,离心除去不溶物,在 420nm 下测定吸光度,以氨基葡萄糖为标准物质计算还原糖的生成量^[6]。壳聚糖酶活力单位定义为:在 60℃、pH5.0 下酶与底物反应,每分钟形成 1μmol 氨基葡萄糖所需要的酶量。

1.2.4 蛋白质含量测定 采用 Bradford 法测定^[7],以牛血清蛋白作为标准物质作标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 组氨酸的化学修饰

DEPC 是应用最广泛且灵敏度较高的 His 残基修饰剂,它在近中性的条件下能使组氨酸咪唑基团的一个氮原子羧乙基化^[8]。用不同浓度 DEPC 修饰 GlcNase,在 30℃ 恒温水浴中保温 40min 的修饰结果见图 1。由图 1 可以看出,DEPC 能导致 GlcNase 产生显著的失活效应,而且随着 DEPC 浓度的增大,Glcnase 的失活作用也愈加明显。在 DEPC 的浓度达到 41.6mmol/L 时,与 GlcNase 作用 40min 能抑制 90.5% 的酶活。

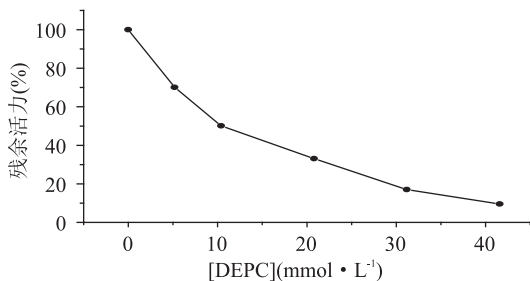


图1 DEPC 引起的 GlcNase 失活反应

由图 2 可以看出,DEPC 引起的 GlcNase 失活反应遵守假一级反应规律。当 DEPC 浓度大于 GlcNase 浓度时,即 $[DEPC] > [GlcNase]$,则表观速率常数 k_{obs} 与 $[DEPC]$ 有以下关系:

$$\log k_{obs} = n \log [DEPC] + \log k$$

式中, n 表示与 GlcNase 的 His 残基反应使其失活所需 DEPC 的摩尔数^[9]。

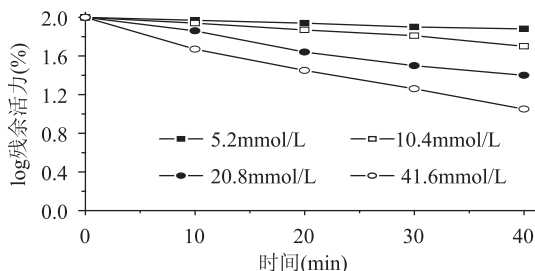


图2 DEPC 引起 GlcNase 的失活反应的动力学

对表观反应速度常数 k_{obs} 的对数与 $[DEPC]$ 的对数作图,结果见图 3。由图 3 可以看出,表观反应速度常数 k_{obs} 的对数与 DEPC 浓度的对数呈线性关系,其斜率为 0.9848,表明 DEPC 修饰了 1 个 His 残基,即 GlcNase 分子中有 1 个 His 残基位于其活性部位。

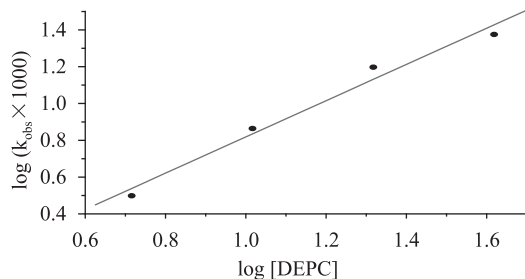


图3 由 DEPC 引起的 GlcNase 失活反应的表现速率常数与 DEPC 浓度的关系

羟胺是将受到修饰的 His 和酪氨酸中乙氧基甲酰基团移除的有效试剂,但更稳定的乙氧基甲酰基-半胱氨酸和乙氧基甲酰基-赖氨酸则不能被羟胺恢复^[10]。图 4 显示了盐酸羟胺对 DEPC 修饰的 GlcNase 活性的恢复作用。在酶活为初始酶活的 33% 时加入盐酸羟胺,随着羟胺加入后时间的延长,酶的活性逐渐恢复,最终趋于稳定,活力恢复到空白酶活的 91.2%。羟胺对酶活的恢复作用证实了 DEPC 使酶活下降的原因在于修饰了其中的 His 残基。

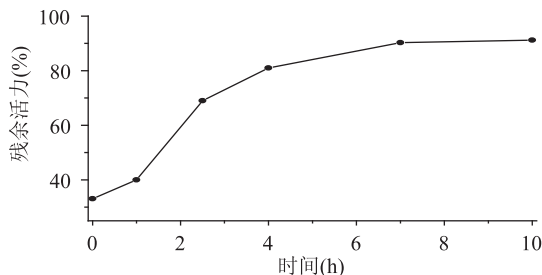


图4 羟胺对 DEPC 修饰的 GlcNase 酶活的恢复作用

2.2 色氨酸残基的化学修饰

Trp 残基一般位于酶分子内部,而且比巯基和氨基等一些亲核基团的反应性差,因此 Trp 残基一般不与常用的一些试剂反应。NBS 可以将 Trp 残基中的吲哚基转变成羟吲哚衍生物,该反应迅速且不可逆,并可通过 280nm 处光吸收的减少来跟踪反应^[11]。在酶液中不断加入 NBS 溶液,分别在 30℃ 下测定酶的残余活力和 280nm 下的吸光度,并计算被修饰的 Trp 残基数目,结果见图 5。随着 NBS 的不断加入,酶的

残余活力逐渐降低,而被修饰的 Trp 残基数也逐渐增加。当 NBS 与酶的摩尔比为 45.5 时,酶的活力完全丧失,此时被修饰的 Trp 残基数为 7.3 个。当 NBS 与酶的摩尔比增大至 54.6 时,酶分子中被修饰的 Trp 残基数达到最大,即每摩尔酶分子中有 7.8 个氨基酸残基被修饰。此后继续加入 NBS,酶液在 280nm 下的吸光度不再发生变化,表明 GlcNase 分子中能被修饰的 Trp 已全部被修饰。

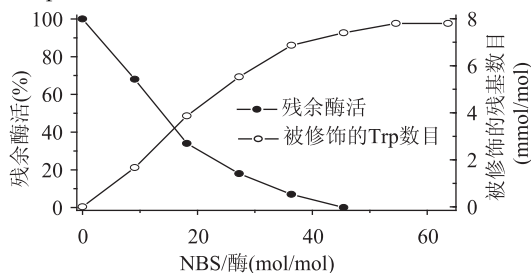


图5 NBS对酶活和被修饰Trp数目的影响

在对 GlcNase 进行 NBS 修饰之前,先将酶液与壳聚糖溶液混合并作用一段时间,再对酶进行 NBS 修饰,以此考察底物对酶的保护作用,图 6 显示了壳聚糖底物对 GlcNase 的保护作用。可以看出,在不存在壳聚糖的情况下,酶的残余活力仅为 16.8%;相反,在存在壳聚糖的情况下,酶的残余活力随着酶与壳聚糖作用时间的延长而逐渐提高,当两者作用时间达到 30min 时,其残余酶活可提高到 93%,这表明底物壳聚糖的存在能够保护酶分子免受 NBS 的修饰,因此至少有 1 分子的 Trp 残基位于 GlcNase 活性部位的底物结合部位。

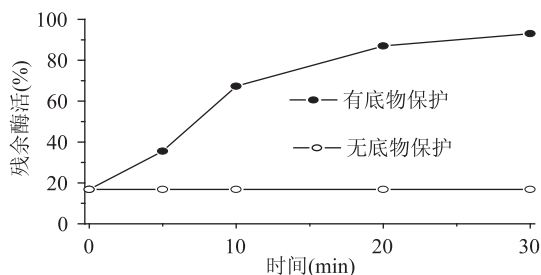


图6 底物对 Trp 残基的保护作用

上述实验结果表明,Trp 残基处于 GlcNase 的活性部位,且至少有一分子氨基酸残基位于酶活性部位的底物结合部位。

3 结论

3.1 随着浓度的增大,DEPC 对 GlcNase 酶活的抑制作用愈加明显;DEPC 引起的 GlcNase 失活反应遵守

假一级反应规律;表观反应速度常数 k_{obs} 的对数与 DEPC 浓度的对数呈线性关系,其斜率为 0.9848,表明 GlcNase 中有 1 个 His 残基位于活性部位。羟胺对 DEPC 修饰的酶具有明显的活力恢复作用,证实 DEPC 引起的酶失活是因为修饰了其中的 His。

3.2 当 NBS 与 GlcNase 的摩尔比为 45.5 时,酶的活力完全丧失。壳聚糖对酶具有明显的保护作用,表明 Trp 残基处于 GlcNase 的活性部位,且至少有 1 分子 Trp 残基位于酶活性部位的底物结合部位。

参考文献

- [1] Nanjo F, Katsumi R, Sakai K. Purification and characterization of an α -D-glucosaminidase, a novel type of enzyme, from *Nocardia orientalis* [J]. J Biol Chem, 1990, 265: 10088-10094.
- [2] Jung W J, Kuk J H, Kim K Y, et al. Purification and characterization of α -D-glucosaminidase from *Aspergillus fumigatus* S-26 [J]. Protein Express Purif, 2006, 45: 125-131.
- [3] 李冬霞, 夏文水. 脂肪酶中具有壳聚糖酶活力组分的作用模式及鉴定 [J]. 食品工业科技, 2008(8): 115-116, 120.
- [4] 姜涌明, 戴祝英, 陈俊明, 等. 分子酶学导论 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 75-84.
- [5] Spanda T F, Witkop B. Determination of the tryptophan content of protein with N-bromosuccinimide [J]. Methods in Enzymology, 1967(11): 496-506.
- [6] Imoto T, Yagishita K. A simple activity measurement of lysozyme [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1971, 35: 1154-1156.
- [7] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术 [M]. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 138-140.
- [8] Blanke S R, Hager L P. Chemical Modification of Chloroperoxidase with Diethylpyrocarbonate: evidence for the presence of an essential histidine residue [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(21): 12454-12461.
- [9] Levy H M, Leber P D, Ryan E M. Inactivation of myosin by 2,4-dinitrophenol and protection by adenosine triphosphate and other phosphate compounds [J]. J Biol Chem, 1963, 238(11): 3654-3659.
- [10] Miles E W. Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate [J]. Methods in Enzymology, 1977, 47: 431-442.
- [11] 陶慰孙. 蛋白质分子基础 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1995: 122-143.

(上接第 199 页)

al. Purification and characterization of a chitinase from *Amycolatopsis orientalis* with N-acetylglucosamine-repeating unit releasing activity [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 336(2): 514-520.

[6] 万云洋, 杜予民, 杨建红. 甲壳酶特性与应用研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(6): 572-574.

[7] 刘东, 陈月华, 蔡峻, 等. 苏云金芽胞杆菌几丁质酶 B 特性

及其杀虫抑真菌的作用 [J]. 微生物学报, 2009, 49(2): 180-185.

[8] 陈红漫, 刘剑利. 耐药性木霉几丁质酶的诱导及其酶学性质研究 [J]. 生命的化学, 2004, 24(4): 47-49.

[9] 肖湘, 周樱, 王凤平. 高效几丁质降解菌 CB101 的分离、鉴定及其几丁质酶系的研究 [J]. 海洋学报, 2003, 25(1): 138-140.