

功率超声对酶促反应的影响 *

朱国辉

黄卓烈

丘泰球

刘石生

(华南农业大学生物技术学院 广州 510642) (华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510641)

2001 年 1 月 19 日收到

摘要 本文评述了功率超声在水溶液和有机溶剂中对酶促反应的影响,对固定化酶的影响。同时探讨了功率超声影响酶促反应的可能机理,并评价功率超声作为一种工业生物化学反应促进手段的可能性。

关键词 功率超声, 酶活性

Effects of power ultrasound on the reactions catalyzed by enzymes

Zhu Guohui Huang Zhuolie

(Biotechnique Institute, South China Agricultural university, Guangzhou 510642)

Qiu Taiqiu Liu Shisheng

(Food & Biological Engineering Institute, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

Abstract The energy of ultrasound is a kind of physical wave and can be used to improve the biochemical reaction. This paper review the effects of ultrasound on the catalyzed by enzymes in water, in organic solvents, and in immobilized carriers, The action mechanism of ultrasound on enzyme catalysis is discussed.

Key words Ultrasound, Enzyme activities

1 引言

超声波是弹性介质中的一种机械波,功率超声作为一种能量形式,可用于、影响或改变媒质的性质,这是超声波的一种主动应用^[1]。在超声波传播过程中,对介质产生的作用主要有三个方面,即温度升高、机械作用及空化作用。人们利用功率超声的这些特点,目前已广泛应用于工业、农业、医药卫生及生物工程等

领域。近年来,人们把超声技术与生物技术结合起来进行研究,利用超声波的物理能量作用于从生物细胞中产生的酶分子,使酶分子的构象改变,从而影响其催化活性。这在一定程度上反映了声学技术向生物技术领域的积极渗透,使两个研究领域交叉融合,从而对这个边缘学科的发展造就了强大的生命力。实际上,有关超声对酶促反应的影响的研究还处于萌芽阶段,所积累的资料不多。本文试就此方面的研究进

* 国家自然科学基金(10074016)和广东省教育厅资助项目

展作一简要评述。

2 功率超声对酶促反应的影响

水溶液是酶促反应的基本介质,绝大多数酶促反应都在水溶液中进行。但是,水溶液不是酶促反应的唯一环境,有些酶促反应还可以在有机溶剂的环境中进行。部分研究表明,无论在水溶液中还是在有机溶剂中,适当的超声辐射都可以增强酶活力,使酶促反应速率提高。同时功率超声还能激活固定化酶的活力。

2.1 水溶液中功率超声对酶促反应的影响

有关超声在水溶液中可增强酶活力、促进酶催化反应的研究已有一些报道。Barton 等人在研究蔗糖酶水解蔗糖、 α -淀粉酶水解淀粉和糖原及葡糖淀粉酶水解淀粉时发现,当底物处在一个较低浓度水平时,如果在水解过程中加以超声作用,能显著提高这三种酶的活力,使水解反应更加彻底^[3]。其后其他人的研究也证实了这个结论。Marinchenko et al^[4]用 22kHz 和 44kHz 的超声波处理麦芽的乳状液时,发现液体的淀粉酶活力大大提高。Ateqad 等^[5]利用 2MHz、5.2W/cm² 的超声波处理木瓜蛋白酶的催化系统,发现酶活性有较大幅度的提高。Sakakibara 等人在研究蔗糖酶对蔗糖的水解时^[6],分别使用三种不同声强(声强 I 分别为 2.7×10^3 、 5.4×10^3 、 $8.5 \times 10^3 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$)的超声波来处理,结果表明反应过程中加超声处理后,酶活力有所增加,约为不加超声时的 130%。动力学研究表明,蔗糖酶的米氏常数 K_m 减小。当 $I=8.5 \times 10^3 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 时, K_m 约为不加超声时的一半,反应的最大速度保持不变。当底物浓度较高时,蔗糖酶的活力将会受到抑制(可能是其终产物的竞争性及非竞争性抑制),但超声处理将会减小这种抑制作用,使酶活力增加。研究同时还表明,随着声强的增加,超声处理的效果越明显。

超声波对酶的激活作用在食品工业中也有报道,生产低乳糖含量的酸牛奶时,如在牛奶

发酵过程中加以超声作用,会促进牛奶乳酸菌中 β -半乳糖苷酶的产生。在超声的持续作用下, β -半乳糖苷酶活力明显提高,分解乳糖的能力加强。实验表明,加超声时乳糖浓度减小 71-74%,而不加时仅减小 39-51%^[7]。

也有一些研究表明,用高强度的超声处理水溶液中的酶,会导致酶活力的降低甚至失活。其原因可能有 3 个:

(1) 超声热效应使液体介质温度升高导致酶活力下降或失活;

(2) 超声空化产生的自由基攻击酶分子而使酶活力下降或失活;

(3) 瞬态空化产生的冲击波或高速射流破坏了酶的分子结构导致酶活力下降或失活。例如, Kuznetsov et al^[8]用 2640kHz、强度为 3W/cm² 的超声波处理丙酮酸脱羧酶,酶活性下降,但对其 K_m 值无影响。

Khelemskii et al^[9]发现,若用超声处理蔗糖酶 2min,酶活性下降到原来活性的 23.3%。Barsegyan et al^[10]用超声处理碱性磷酸酶,处理后酶活性下降了 10%,而连续处理 24h 酶活性还保持原活性的 70%。然而也有报道在温和的超声条件下作用某些酶,会导致酶活力的降低,如过氧化物酶,用 20kHz 的超声波处理此酶,3 小时后酶活力下降了 90%^[11]。Kashkooli 等人^[12]用 20kHz 的超声波处理过氧化氢酶和苹果酸脱氢酶,在各种处理中,过氧化氢酶活性不被钝化,而苹果酸脱氢酶则被钝化,而且酶浓度越大,被钝化的程度越高。据此认为,此种钝化不是由于空化作用或温度作用所引起。其作用机理有待进一步研究。

2.2 有机溶剂中功率超声对酶促反应的影响

在非水溶液中进行酶的催化反应是生物技术的最新成果,许多在水溶液中不能进行的酶促反应却能在有机溶剂中进行。同时一些实验表明,如果再在其上加以超声作用,反应速率明显增加。Vulfson 等人报道了超声对有机溶剂中枯草杆菌蛋白酶催化 N-苯丙氨酸乙酯(APAEE)的转酯反应的影响^[13]。实验表明,

在几种不同的醇溶液(丁醇、己醇、辛醇)中,超声处理对转酯反应的速率都有大幅度的提高,而且有机溶剂碳链越长,处理效果越显著。如在丁醇中反应速率约提高50%,而在辛醇中反应速率可提高6-8倍。超声处理能提高有机溶剂中酶活力,其原因可能有:(1)超声作用使酶的有效表面积增加;(2)持续的超声作用会导致有机溶剂中少量水分子的重新分布,阻止了酶分子周围水膜的形成。水溶液中高强度的超声可能导致酶的失活,然而在双相溶剂中,酶的抗失活能力将大大增强^[13,14]。用声功率为150W的超声处理枯草杆菌蛋白酶,2小时后,在磷酸缓冲液中酶活力下降了50%,而在含该缓冲液1%的戊醇溶液中的酶活力几乎没有损失。实验还证实,随着有机溶剂中水含量的增加,酶越容易失活。这个结果作者解释为大功率超声导致了水的动能及温度的提高,而这两个方面均能引起酶构象的变化。而当只有少量水处于有机溶剂(如苯、戊醇)中时,这些水分子被牢牢固定在酶分子周围,不易移走,起到保护酶的作用,因此酶在有机溶剂中更具有抵抗温度导致失活的能力。

然而也有实验表明超声在有机溶剂中并没有加速酶促反应的作用。Bracey在重复枯草杆菌蛋白酶在己醇中催化N-苯丙氨酸乙酯(APAEE)转酯反应的过程中,发现超声作用并没有提高酶促反应速率,而且酶活力稍有下降^[15]。作者认为,这可能是由于酶的干燥情况不同,使溶液中酶的水合程度不一,从而导致了超声作用效果的差异。这些实验表明了超声波对酶促反应作用的复杂性,因为它不仅与实验中超声的作用方式有关,还与酶分子本身状态有极大的联系。

2.3 超声对固定化酶的影响

超声能激活固定化酶的反应在许多文献中也有报道。例如把葡糖淀粉酶固定在多孔聚苯丙烯颗粒上,当底物(淀粉、麦芽糖)流经柱子时加以7.6 MHz的超声辐照,结果表明,催化反应的速率大为增加。作者分析了导致速率增

加的种种可能性后,认为最可能的机理是超声诱导了固定化酶活力的提高^[16]。Ishimori et al^[17]发现,利用超声处理固定化的葡萄糖氧化酶时,活性表现,而当停止超声处理时,酶活性消失。在超声强度为3W以下时,酶的表现活性逐渐上升,而超声强度超过4W时,酶活性则下降。用20kHz的超声辐照固定在琼脂胶上的 α -胰凝乳蛋白酶时,其分解酪蛋白的速率明显增加,酶活力提高了一倍^[18]。适当的超声条件能提高固定化酶的反应速率,其可能的机理是,由于超声波的空化作用和机械振动作用,反应液中的底物和产物分子在超声波的驱动下,也以较高的频率振动,固定化酶与底物及反应物的接触次数大为增加,同时产物的释放也加快,从而使固定化酶的表现米氏常数减小,反应速率增加。

3 小结

超声波是一种物理波,在其传播过程中,超声波具有的能量逐渐释放并作用于其传播介质中的物理质点,从而使这些质点发生相应的物理变化和化学变化。酶是生物大分子,具有较为稳定的构象,酶分子生物活性的表现完全取决于其合理构象的存在。当酶分子分散在介质中时,每个酶分子也就相当于一个质点,条件适合时,其所有的生物学功能就在其周围发生。当用超声波作用于分散在介质中的酶分子时,超声波所释放的能量就会促使酶分子的构象发生改变,而酶分子构象一旦发生改变,就意味着其生物学功能的改变。这种改变有两方面的效果,其中一种是正向的,也就是在超声波作用下其生物学功能得到加强,若发生这种效果,说明超声波的作用使酶分子的构象更加合理,对酶分子本身行使生物学功能有促进,外观上就是其活性升高。另一种效果是负向的,也就是在超声波的作用下使酶分子的构象趋向不合理,从而导致对酶分子本身行使生物学功能有阻碍,外观上表现出其活性下降甚至失活。

实际上, 还应该第三种作用效果, 就是在一定范围参数的超声波作用下, 酶分子的构象不受影响, 外观上表现就是用超声波未能改变酶分子的活性。这也许就是超声波作用于酶促反应的总的效果。

不同的酶分子有不同的立体构象, 相同的酶分子在不同的环境条件下也会有不同的立体构象。因此, 不同酶分子或处于不同环境条件下的相同酶分子对超声波能量的作用就有不同的敏感性。所以用超声波处理相同的酶促反应, 在不同条件下结果会有很大的不同, 甚至完全相反。在相同参数超声波作用下, 不同的酶分子也会有不同的表现。这取决于超声能量参数的大小及不同酶的适应能力以及酶分子所处的环境。当然其详细的机理还有待进一步研究。一般说来, 无论在水溶液还是有机溶剂中, 温和的超声作用能提高酶的活力; 而过分剧烈的超声波能量就会降低酶分子的活力。

目前, 酶制剂在工业、农业和生物医药中的使用越来越普遍。而酶本来是在生物细胞内合成并在细胞内行使功能的, 一旦酶被提取出来用于细胞外的环境时, 再也没有细胞内部的那种适宜环境让其发挥功能, 因此, 离开生物体的酶(离体酶)的活性一般比较低。究其原因就是离体酶分子构象与细胞内部酶分子构象不完全相同。所以, 将生物酶制剂应用于工农业和医药各领域时, 就要设法提高酶制剂的催化活性, 使之具有较高的催化效率。而在各种提高酶制剂活性的尝试中, 利用超声波处理的方法不失为一种好方法。因为超声波是一种物理波, 具有高效、廉价、无污染等特点, 特别适合现代工业、农业和生物医药中应用。而这方面的研究主要是掌握各种被应用酶的超声波作

用参数(包括超声频率和强度等), 使该种酶在适宜参数的超声波作用下产生正效果, 而尽量避免其负效果的出现。

参 考 文 献

- 1 冯若, 李化茂编著. 声化学及其应用 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1992. 39.
- 2 冯若, 赵逸云, 陈兆华. 声学技术, 1994, 13(2): 56-58.
- 3 Barton S, Bullock C, Weir D. *Enzyme Microb. Technol.* 1996, 18(3): 190-194.
- 4 Kislaya L V, Isaeuho V N, et al. *Fermentation Spirt Prom-st*, 1987, (5): 28-30.
- 5 Ateqad N, Iqbal J. *Indian J Biochem Biophys*, 1985, 22(3): 190-192.
- 6 Sakakibara M, Wang D, Akahashi R T. *Enzyme Microb. Technol.* 1996, 18: 444-448.
- 7 Toba T, Hayasaka I, Taguchi S. *J. Sci. Food Agric.*, 1990, 52: 403-407.
- 8 Kuznetsov B K, Ostrovskiy Y M. *Vestsi Akad Navuk USSR*, 1975, (3): 37-42.
- 9 Khelemskii MZ, Pel'ts M L, Burya A K. *Inst Sakh Prom-sti*, 1978, 25: 61-68.
- 10 Barsegyan VO, Sarkisyan L V, Adunts G T. *Biol. Zh. Arm.*, 1978, 31(11): 1125-1131.
- 11 Mason T J, Paniwny L, Lorimer J P. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1996, (3): s253-s260.
- 12 Kashkooli H A, Rooney J A, Roxby R. *J. Acoust. Soc. Am.*, 1980, 67(5): 1798-1801.
- 13 Evgeni N. Vulfson D, Sarney B, et al. *Enzyme Microb. Technol.*, 1991, 13: 123-126.
- 14 Sinisterra J V. *Ultrasonics*, 1992, 30(3): 180-185.
- 15 Bracey E, Robert A, Stenning B, et al. *Enzyme Microb. Technol.*, 1998, 22: 147-151.
- 16 Schmidt P, Rosenfeld E, Millner R. *Ultrasonics*, 1987, 25(5): 295-299.
- 17 Ishimori Y, Karube I, Suzuki S. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1981, 13(4): 197-201.
- 18 Ishimori Y, Karube I, Suzuki S. *J. Mol. Catal.*, 1981, 12(2): 253-259.