

文章编号:1673-1689(2010)06-0901-04

酵母蔗糖酶的纯化及其化学修饰

赵蕾, 任明

(山东师范大学 生命科学学院, 山东 济南 250014)

摘要: 采用细胞破碎, 热变性除杂蛋白, 有机溶剂沉淀, DEAE-Sephrose Fast Flow 柱层析等方法从酵母中纯化酵母蔗糖酶, 用 5 种化学修饰剂 PMSF、SUAN、NBS、DTT、EDTA 及几种金属离子对其进行化学修饰。结果表明: 酶分子中的丝氨酸残基和金属离子与酶活力无关, 赖氨酸残基和半胱氨酸残基对酶活力有一定贡献, 但不位于酶的活性中心; 而色氨酸残基是酶活性中心的必需基团。

关键词: 酵母蔗糖酶; 纯化; 化学修饰

中图分类号: Q 946.5

文献标识码: A

Purification and Chemical Modification of Yeast Invertase

ZHAO Lei, REN Ming

(College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract: In this study, yeast invertase (β -fructofuranoside hydrolase) was extracted and purified by cell disruption, heat denaturation, organic solvent precipitation and DEAE-Sephrose Fast Flow chromatography. Five chemical modification agents (PMSF, DTT, SUAN, NBS, EDTA) and several other metal ions were used to determine the amino acid residues involved in the active site of yeast invertase. The result indicated that serine residues and metal ions were inessential to the invertase activity while the lysine and cysteine residues were linked to the enzyme activity, which were not in the active site of the enzyme. That the indolyl ring of tryptophan residues could be modified by N-bromosuccinimide and these groups could be protected by sucrose revealed that the tryptophan residues were present at the invertase active site.

Key words: yeast invertase, purification, chemical modification

酶蛋白是极其复杂的生物大分子, 执行着许多重要的生物学功能, 而蛋白质的化学修饰是研究蛋白质结构与功能的重要方法, 通过对蛋白质侧链基团进行化学修饰, 可进一步探明酶活性部位的结构与功能的关系, 从而扩大酶的应用范围, 提高酶的

使用价值。

蔗糖酶 (Sucrase, EC 3.2.1.26) 又称转化酶 (Invertase), 可作用于 β -1,2 糖苷键, 并将蔗糖水解为 D-葡萄糖和 D-果糖。蔗糖酶广泛存在于动植物和微生物中, 而目前国内外仅对动植物来源的蔗

收稿日期: 2009-11-25

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (ZR2009DM042); 山东师范大学实验教学改革项目; 山东师范大学精品课程建设项目。

作者简介: 赵蕾 (1963—), 女, 江苏镇江人, 农学博士, 副教授, 主要从事酶学与农业微生物的开发与应用研究。

Email: zhaolei@sdu.edu.cn

糖酶如小肠蔗糖酶^[1]、薄荷蔗糖酶^[2]以及烟草蔗糖酶^[3]等进行了研究,而对酵母蔗糖酶功能基团的化学修饰未见报道。本实验从酵母中分离纯化出酵母蔗糖酶,选择 5 种化学修饰剂和部分金属离子对其进行修饰,以期探明酵母蔗糖酶侧链基团与酶活力之间的关系,为酵母蔗糖酶活性功能基团的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 高活性干酵母(发酵面食食品型)由安琪酵母股份有限公司生产。

1.1.2 试剂 DEAE-Sepharose Fast Flow 购自 sigma 公司;苯甲基磺酰氟(PMSF)、二巯基苏糖醇(DTT)购自上海生物工程有限公司;N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)、琥珀酸酐(SUAN)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、3,5-二硝基水杨酸(DNS)为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 酵母蔗糖酶的提取与纯化 取活性干酵母 15 g,利用反复冻融并结合机械研磨法破碎酵母细胞,离心(12 000 r/min,15 min)取上清液。调节 pH 值至 5.0,于 50 ℃水浴保温 30 min,离心(12 000 r/min,15 min)取上清液。加入等体积的体积分数 95%乙醇(预冷),于冰浴中温和搅拌 20 min,离心(12 000 r/min,25 min)弃上清液,沉淀沥干。将沉淀溶解在 6 mL 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 值 7.3)中,离心(12 000 r/min,25 min),上清

即为粗酶液。将粗酶液上 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析柱,再用 0~0.5 mol/L NaCl 溶液(含 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液)线性梯度洗脱,获酵母蔗糖酶纯品,供化学修饰研究。

1.2.2 酵母蔗糖酶活性功能基团的化学修饰及酶活力测定 先将各种浓度的修饰剂与酵母蔗糖酶在 37 ℃水浴中反应 30 min^[3]。取修饰后的酶液 0.2 mL,加入 1 mol/L 蔗糖溶液 0.1 mL、磷酸-柠檬酸缓冲液 0.575 mL,于 37 ℃水浴中反应 30 min,立即加入 2 mol/L NaOH 溶液 0.125 mL 终止反应,用 DNS 法测定还原糖的生成量^[4],以还原糖的生成量表示酶活力的大小,将 540 nm 处光密度增加 0.001 个光吸收值定义为 1 个酶活力单位。

相对活力(%)=剩余酶活力/未加修饰剂的酶活力×100%

以修饰剂浓度为横坐标,相对活力的百分比为纵坐标作图,研究各种修饰剂对酵母蔗糖酶活力的影响。

2 结果与分析

2.1 酵母蔗糖酶的纯化

活性干酵母经细胞破碎、选择热变性沉淀法除杂蛋白、有机溶剂沉淀法以及 DEAE-Sepharose F. F 柱层析得到酵母蔗糖酶。测定各步的总体积、蛋白浓度、酶活力并据此计算比活力、回收率和提纯倍数,结果见表 1。

表 1 酵母蔗糖酶的纯化结果
Tab. 1 Purification of yeast invertase

步骤	总体积/ mL	蛋白质量浓度/ (mg/mL)	酶活力/ (U/mL)	总蛋白/ (mg)	总酶活/ (U)	比活力/ (U/mg)	回收率/ %	提纯 倍数
细胞破碎	8.8	6.44	3311	56.6	29136.8	514.1	100	1.0
热变性除杂蛋白	8	4.16	3220	33.3	25760	774	88.4	1.5
乙醇沉淀	8	2.18	3215	17.4	25720	1474	88.2	2.87
DEAE-Sepharose F. F	7.2	0.32	3193	2.3	22989.6	9978.1	78.9	19.4

2.2 酶侧链基团的化学修饰

2.2.1 苯甲基磺酰氟(PMSF)对丝氨酸残基的修饰 丝氨酸残基在酶活性中心出现的频率较高,在酶的化学修饰中常作为一个不可缺少的研究对象^[5]。由图 1 和表 2 可知:不同浓度的丝氨酸特异性修饰剂 PMSF 对酶活力均没有影响,说明丝氨酸不是酶活性的必需基团。

2.2.2 琥珀酸酐(SUAN)对赖氨酸残基的修饰 琥珀酸酐(SUAN)能与赖氨酸残基的 ε-氨基发生特异性的修饰反应^[6]。由图 2 和表 2 可知:SUAN 对

酵母蔗糖酶的活性虽有影响,但不明显,表明氨基被修饰后对蔗糖酶的活力影响不大。由此推测 ε-氨基是位于活性中心以外的对酶活力有一定贡献的基团。

2.2.3 N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)对色氨酸残基的修饰 NBS 除了可以修饰色氨酸残基的吲哚基团外,还可以与酪氨酸、半胱氨酸反应,但只有在酸性条件下,NBS 才能特异地修饰蛋白质分子中的色氨酸残基^[7-8]。由图 3 和表 2 可知:随 NBS 浓度的增加,酶活力逐渐丧失,表明酵母蔗糖酶中的色氨

酸对酶活力有重要贡献。如果在加入 NBS 之前先加入底物蔗糖,则 37 ℃ 修饰 30 min 后酶活力不发生变化(结果未列出)。

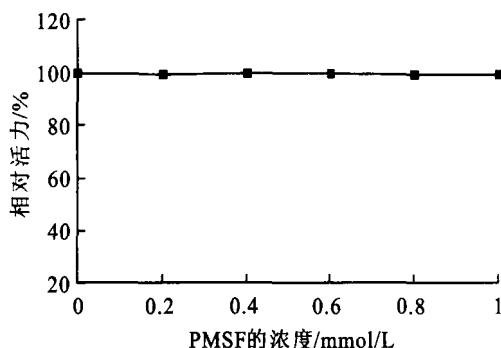


图 1 PMSF 对酵母蔗糖酶活力的影响

Fig. 1 Effect of PMSF on activity yeast invertase activity

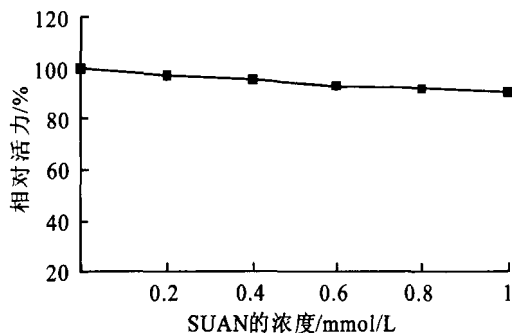


图 2 SUAN 对酵母蔗糖酶活力的影响

Fig. 2 Effect of SUAN on yeast invertase activity

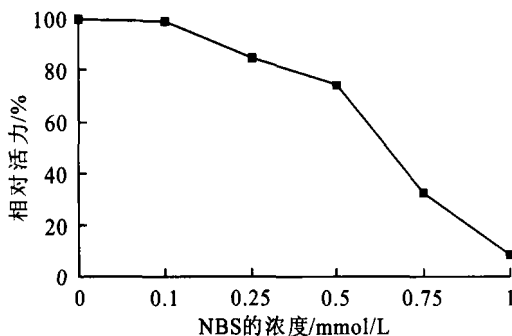


图 3 NBS 对酵母蔗糖酶活力的影响

Fig. 3 Effect of NBS on yeast invertase activity

2.2.4 二巯基苏糖醇(DTT)对二硫键的修饰 二巯基苏糖醇(DTT)有很强的还原性,能专一地将蛋白质分子中半胱氨酸残基中的二硫键解聚为亚基单体,从而改变蛋白质的空间结构。若酶的活性中心存在二硫键,则在 DTT 的作用下酶活力将明显降低^[9]。由图 4 和表 2 可知,随 DTT 浓度的上升酶活力仅有轻微下降,说明二硫键可能位于酶的活性中心之外,仅在稳定酶的构象中起到一定作用。

2.2.5 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)对金属离子的修饰 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)是一种金属离子螯和剂,如果金属离子是酶的活性中心所必需,则 EDTA 与之结合后酶活力将受到影响。由图 5 和表 2 可知,不同浓度的 EDTA 与酶作用后,酶活力

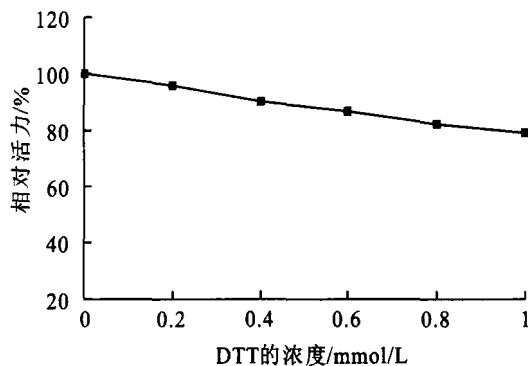


图 4 DTT 对酵母蔗糖酶活力的影响

Fig. 4 Effect of DTT on yeast invertase activity

基本不变,说明金属离子不是酶活力所必需的。

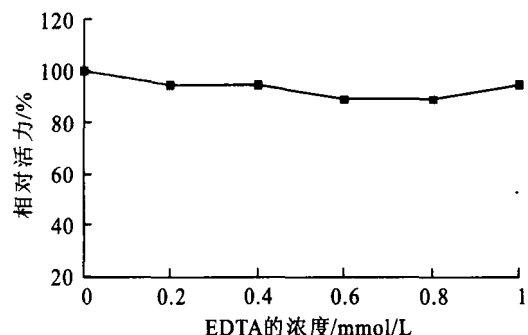


图 5 EDTA 对酵母蔗糖酶活力的影响

Fig. 5 Effect of EDTA on yeast invertase activity

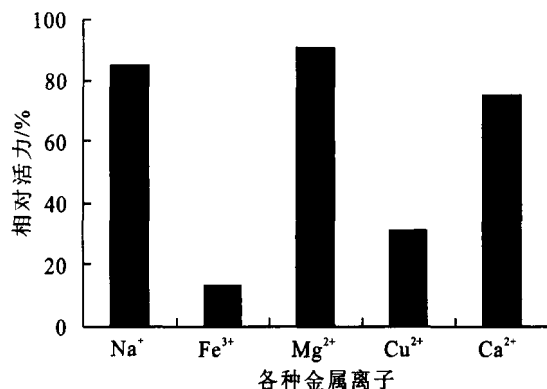


图 6 金属离子对酵母蔗糖酶活力的影响

Fig. 6 Effect of metal ions on yeast invertase activity

2.2.6 各种化学修饰剂对酵母蔗糖酶的修饰结果 酵母蔗糖酶被上述 5 种化学修饰剂(1mmol/L)修饰后的剩余酶活力见表 2。由表中可以看出,修饰剂 NBS 对酵母蔗糖酶的活力影响最大。

表 2 5 种化学修饰剂修饰后的相对酶活力

Tab. 2 Residual activities of the modified invertase with five chemical agents

修饰剂(1mmol/L)	相对酶活力(%)
PMSF	99.3
SUAN	90.6
NBS	8.4
DTT	79.1
EDTA	94.4

2.3 部分金属离子对酶活力的影响

已知的酶中大约有 1/3 需要金属离子作为酶促反应的辅因子^[10]。本实验选用实验室常见金属离子(Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+})对酵母蔗糖酶进行化学修饰。由图 6 可知: Mg^{2+} 对酶活力有激活作用; Na^+ 、 Ca^{2+} 对酶活力有轻微的抑制作用;过渡态金属离子 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 对酶活力有较强的抑制作用,尤其是被 Fe^{3+} 修饰后,酶活力不足原来的 20%。因此,在应用中应该防止 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 影响酵母蔗糖酶的活性。

3 讨论

本实验用 PMSF 修饰酵母蔗糖酶后,酶活力不变,这与其它来源的蔗糖酶经 PMSF 修饰后酶活力的变化有所不同:小肠蔗糖酶经 PMSF (0.1 mmol/L)处理 75 min 后酶活力下降了约 10%^[1];当用 0.5 mmol/L PMSF 作用于烟草蔗糖酶时,酶的剩余活力已不足 5 %^[3];而 PMSF 对薄荷蔗糖酶的抑制作用更为显著,当 PMSF 浓度为 16 $\mu\text{mol/L}$ 时,酶活力已接近于零^[2]。另外,本实验中 EDTA 未能使酵母蔗糖酶活力发生变化,表明金属离子不是酶活力

所必需的,而烟草蔗糖酶和薄荷蔗糖酶均为金属蛋白酶,经 EDTA 修饰后酶活力明显下降,可能的原因是,植物中的蔗糖酶主要参与蔗糖代谢、渗透调节、创伤愈合以及对病原体的入侵做出反应等,而在动物或微生物中,蔗糖酶是一种消化酶或水解酶,主要参与碳水化合物的消化吸收或分解的过程。

N-溴代琥珀酰亚胺的氧化作用具有高度选择性,只能进攻与双键或苯环相连的 $\alpha\text{-H}$,在温和的条件下,色氨酸侧链吲哚基的 C—H 键可被 NBS 氧化,生成羟吲哚衍生物。在本实验中,随着 NBS 浓度增大,蔗糖酶活力逐渐下降,但这并不能确定 NBS 作用的是活性中心内的色氨酸基团,因为酶活性中心基团的鉴定标准有两点:一是酶的失活程度与抑制剂浓度成一定比例关系;二是底物或可逆抑制剂能够保护酶分子免受共价修饰剂的影响^[11]。本实验在加入修饰剂 NBS 之前先加入底物蔗糖,发现即使再加入 NBS 并在相同的修饰条件下反应,酶活力也不受影响,表明底物蔗糖与酶活性中心的结合对活性中心起到了保护作用,基于以上两点,可以确定色氨酸位于酵母蔗糖酶的活性中心,并参与了催化作用。

参考文献(References):

- [1] 刘晓雯,刘克武,江琰,等. 小肠蔗糖酶的化学修饰及对酶活力的影响[J]. 化学研究与应用,2003,15(6):783—785.
LIU Xiao-wen, LIU Ke-wu, J IANG Yan, et al. Chemical modification and functional groups of sucrase from small intestine[J]. **Chemical Research and Application**, 2003, 15(6): 783—785. (in Chinese)
- [2] 郭小路,邱慧,易波,等. 薄荷蔗糖酶的化学修饰[J]. 西南大学学报:自然科学版,2007,29(10):114—118.
GUO Xiao-lu, QIU Hui, YI Bo, et al. Chemical modification of invertase from *Mentha haplocalyx* Briq1[J]. **Journal of Southwest University: Natural Science Edition**, 2007, 29(10): 114—118. (in Chinese)
- [3] 武忠亮,郭亚利,唐云明. 烟草叶片蔗糖酶的化学修饰[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2006,31(4):148—152.
WU Zhong-liang, GUO Ya-li, TANG Yun-ming. Chemical modification of invertase from *nicotiana tabacum*[J]. **Journal of Southwest China Normal University (Natural Science)**, 2006, 31(4): 148—152. (in Chinese)
- [4] Milier G L. Use of dinitrosazicylic acid reagent invertase for determination of reducing sugar[J]. **Analysis Chemistry**, 1959, 31: 426.
- [5] Tavakoli H, Ghourchian H, Moosavi-Movahedi A A, et al. Histidine and serine roles in catalytic activity of choline oxidase from *Alcaligenes* species studied by chemical modifications[J]. **Process Biochemistry**, 2006, 41: 477—482.
- [6] Christian E, Sibylla G, Sebastian B, et al. Effect of chemical modification of lysine residues in trypsin[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2000, 8: 193—200.
- [7] TENG Li-rong, FAN Hao, ZHANG Yuan-yuan, et al. Chemical modification and fluorescence spectrum of tryptophan residues in pullulanase[J]. **CHEM RES CHINESE U**, 2006, 22(1): 61—64.
- [8] De Mata I, Obregon V, Ramon F, et al. Chemical modification of tryptophan of D-amino acid from *Rhodotorula gracilis* [J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2000, 9: 65—73.
- [9] Peter T, Marc C. Identification of a functionally important carboxyl group in cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*: a chemical modification study[J]. **FEBS Letters**, 1989, 243(2): 239—243.
- [10] Maria C R, Rosa R, Antonio R N. Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*[J]. **Phytochemistry**, 2002, 61: 605—609.
- [11] 施巧琴. 酶工程[M]. 北京:科学出版社,2005. 12—13.

(责任编辑:杨萌)