

模拟酶轴向配体激活过氧化氢酶的研究 ——提高天然酶活性的新方法*

刘建忠¹⁾ 杨惠英¹⁾ 赵继伦²⁾ 翁丽萍¹⁾ 计亮年¹⁾

(1) 中山大学生物工程研究中心, 广州 510275; 2) 华南理工大学生物工程系)

摘要 曾报道了以铁卟啉作为细胞色素 P450模拟酶的活性中心, 轴向配体例如巯基苯甲酸、半胱氨酸作为激活剂, 提高模拟酶体系催化活性的研究. 而过氧化氢酶的活性中心也为铁卟啉. 进一步报道模拟酶的轴向配体提高过氧化氢酶的活性, 并提出了一种提高天然酶活性的新方法. 硫代硫酸钠、维生素 C、巯基乙酸和 L-半胱氨酸可作为过氧化氢酶的轴向配体, 而激活过氧化氢酶.

关键词 过氧化氢酶, 轴向配体, 酶激活

分类号 Q 558

过氧化氢酶 (CAT) 是一种含铁卟啉的酶, 其活性中心是铁 (III) 卟啉, 轴向第 5 个配体是酪氨酸 (Tyr357), 第 6 个配体为水; 在催化过程 CAT 经历了 3 个氧化中间体: 化合物 I、II、III. 其中化合物 I 是含 $Fe^{IV} = O$ 的卟啉中间体, 具有催化活性; 而化合物 II、III 是没有催化活性的^[1-3]. 曾报道利用黑曲霉产生的葡萄糖氧化酶氧化葡萄糖产生 D-葡萄糖酸- δ -内酯过程中会同时产生 H_2O_2 , 又利用黑曲霉产生的 CAT 进一步分解 H_2O_2 以防止其对葡萄糖氧化酶的抑制失活作用^[4]. Kleppe^[5] 研究发现 H_2O_2 会抑制葡萄糖氧化酶活性, 认为其主要原因是将葡萄糖氧化酶活性中心的甲硫氨酸氧化成甲硫氨酸亚砷. 为了提高葡萄糖氧化成葡萄糖酸的产率, 将 CAT 和葡萄糖氧化酶共同固定在载体上的方法已有一些报道^[6]. 但是利用微生物直接氧化葡萄糖的过程, 添加过氧化氢酶无论在经济上还是在实际操作上都是不现实的. 为此, 本文提出一种用模拟酶轴向配体成功地激活 CAT 活性的新方法, 迄今还未见有类似报道. 199 年我们^[7] 报道了以金属卟啉为细胞色素 P450 单加氧酶的活性中心, 在常温常压下将环己烷氧化为环己酮和环己醇, 特别指出加入含巯基轴向配体, 如巯基乙酸、半胱氨酸及邻巯基苯甲酸等, 可以激活活性中心, 特别是加入巯基乙酸-吡啶类含氮、硫配体作为轴向配体, 增加了中心离子的电荷密度和改变了其氧化还原电位, 使催化活性大大提高. 这个规律已被 Lyons 等^[8] 所引用. 在此基础上, 本文根据 CAT 的活性中心的特征, 提出利用轴向配体来改变 CAT 的构象, 使其更适合底物 (H_2O_2) 的结合, 从而提高 CAT 活性, 最终达到提高葡萄糖酸发酵转化率的目的.

* 广东省自然科学基金 (970840) 资助项目

收稿日期: 1998-02-20 刘建忠, 男, 32岁, 讲师

1 材料与方 法

1.1 CAT 的制备 采用本室保存的黑曲霉菌种 ZBY-7, 按文献 [9] 报道方法进行 CAT 制备.

1.2 CAT 活力的测定 CAT 活力采用紫外分光光度法^[10]进行测定. 在 1 cm 的石英比色杯中添加 3 mL 反应底物和 CAT 酶液, 底物为含 30 mmol/L H_2O_2 磷酸盐缓冲液 (0.05 mmol/L, pH 7.0), 在 30°C、240 nm 下测定其吸光度的变化.

1.3 实验仪器 Shimadzu MPS-2000 紫外可见分光光度计.

2 结果与讨论

在 CAT 测活底物中, 添加不同浓度的各种配体, 测定 CAT 活力, 结果见表 1.

表 1 轴向配体对过氧化氢酶活性的影响

Tab. 1 Effect of axial ligands on catalase activity

轴向配体	$c^1)$	相对酶活 /%	轴向配体	c	相对酶活 /%
无		100.00	Cys	0.6	140.71
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	0.6	155.41	Met	0.2	101.30
Vc	0.4	150.26	His	0.2	108.72
reduced glutathion	0.4	94.09	Arg	0.2	100.00
SHCH_2COOH	0.6	153.49	Try	0.2	90.32
$\text{SHCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	0.2	107.29	Lys	0.2	74.00
SHCHOH	0.4	83.33	Tyr	0.2	100.40

1) 对 CAT 激活、抑制效果最大的配体浓度, mmol/L

从表 1 可看出, 0.6 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、0.4 mmol/L Vc、0.6 mmol/L SHCH_2COOH 、0.6 mmol/L Cys 对 CAT 有激活作用, 0.2 mmol/L Lys、0.4 mmol/L SHCHOH 、0.2 mmol/L Try 对 CAT 有抑制作用, 其它配体对 CAT 影响不大. 其中 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、Vc 和还原性谷胱甘肽都是具有还原性的物质, 由于 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 分子体积小, 能够穿过 CAT 的通道, 进入铁卟啉轴向第 6 配位位置, 提供电子给 CAT, 导致含 $\text{Fe}^{\text{IV}} = \text{O}$ 中心的中间体化合物 I 容易形成, 促使底物 H_2O_2 更容易取代第 6 位的水而形成 CAT- H_2O 配合物, 最终提高 CAT 活性; 还原性谷胱甘肽因体积较大, 不能穿过 CAT 通道进入卟啉第 5 轴向位置而没有起这种作用.

对含巯基配体而言, 它们能够穿过 CAT 通道进入铁卟啉轴向第 6 配位位置, 由于巯基硫原子具有给电子性质与 Fe 形成的配位键具有双键性质 ($d-\pi$ 键), 而 Fe 的轴向第 5 个配体 Tyr35 形成的 Fe-O 键是单键, 键能较弱; 因此这些含巯基配体能够取代 Tyr35 成为 Fe 的轴向第 5 个配位配体, 这些含巯基配体分子的另一端与 Tyr35 相连. 由于推电子作用提高了 Fe 的电子密度, 进而将电子给予 H_2O 的氧的反键轨道, 促进 O-O 键断裂, 生成含 $\text{Fe}^{\text{IV}} = \text{O}$ 中心的中间体化合物 I, 从而提高 CAT 酶活. SHCH_2COOH 激活能力比 $\text{SHCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 大, 是由于前者体积比后者小, 容易穿过 CAT 蛋白环境而占据铁的轴向第 5 配位位置, 且它们的羧基和周围氨基酸存在较强的氢键而稳定; SHCHOH 由于醇的氢键较弱, 故起抑制作用. 这也表明轴向配体激活能力和周围氨基酸的分子识别有关.

表 1 中所有氨基酸唯有含巯基的 Cys 具有显著的激活能力, 这也与我们在模拟酶体系中早期报道所得结论相一致.

曾报道了 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、Vc 及 Cys 都能够激活葡萄糖氧化酶的活性^[9], 其真实原因应是它

们作为 CAT 的轴向配体激活了与葡萄糖氧化酶共存的 CAT 活力, 使葡萄糖氧化酶氧化葡萄糖过程所产生的 H_2O_2 能及时分解。

参 考 文 献

- 1 Lardinois O M, Mestdagh M M, Rouxhet P G. Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, 1295: 222~ 238
- 2 Fita I, Rossmann M G. The active center of catalase. *J Mol Biol*, 1985, 185: 21~ 37
- 3 计亮年, 莫庭焕, 曾添贤, 等. 生物无机化学导论. 广州: 中山大学出版社, 1992. 15~ 152
- 4 杨惠英, 计亮年, 陈特强, 等. 发酵生产葡萄糖酸钙的控制. *工业微生物*, 1988, 18 (6): 9~ 14
- 5 Kleppe K. The effect of hydrogen peroxide on glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry*, 1966, 5 (1): 139~ 143
- 6 李丽霞, 鲁格, 俞耀庭. 过氧化氢酶对固定化葡萄糖氧化酶稳定性的影响. *生物工程学报*, 1987, 3 (1): 46~ 52
- 7 Ji L N, Liu M, Hsieh A K. Metalloporphyrin-catalyzed hydroxylation of cyclohexane with molecular oxygen. *J of Molecular Catalysis*, 1991, 70: 247~ 257
- 8 Lyons J E, Ellis P E, Mayers H K. Halogenated metalloporphyrin complexes as catalysts for selective reactions of acyclic alkanes with molecular oxygen. *J Catalysis*, 1995, 155: 59~ 73
- 9 刘建忠, 杨惠英, 赵继伦, 等. 葡萄糖氧化酶及过氧化氢酶的生物合成. *中山大学学报 (自然科学版)*, 1998, 37 (1): 68~ 72
- 10 Petruccioli M, Fenice M, Piccioni P. Distribution and typology of glucose oxidase activity in the genus *Penicillium*. *Letters in Applied Microbiology*, 1993, 17: 285~ 288

A Study on Axial Ligands of Model Enzyme to Activize Catalase A New Method of Enhancement Natural Enzyme Activity

Liu Jianzhong* Yang Huiying Zhao Jilun Weng Liping Ji Liangnian

Abstract Ironic porphyrin as an active center of model enzyme of cytochrome P450 and axial ligands which were thiosalicylic acid, L-cystein, etc. and can enhance catalytic activity of model system was reported. The active center of catalase is also ironic porphyrin. This paper reports further that axial ligands of model enzyme can enhance similarly activity of catalase and put forward a new method of enhancement natural enzyme activity. Sodium thiosulfate, vitamin C, thioglycolic acid, and L-cystein can activize catalase as an axial ligand of its iron porphyrin, respectively.

Keywords catalase, axial ligands, enzyme activation

* Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China