

水溶性有机溶剂对鸡肝酯酶酶活力的影响

赵洁, 徐斐*, 曹慧, 于劲松
(上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093)

摘要: 从新鲜鸡肝中提取出鸡肝酯酶, 并研究水溶性有机溶剂对鸡肝酯酶酶活力的影响。结果表明: 甲醇、乙醇、正丙醇、乙二醇-甲醚、乙二醇-乙醚在低体积分数时对鸡肝酯酶酶活力有激活作用, 高体积分数使其失活。乙二醇-甲醚能够较好的保持鸡肝酯酶活力, 当体积分数达到 50% 时, 相对酶活力仍保持 93%。丙酮和 1,4-二氧六环对鸡肝酯酶主要表现为失活作用, 当体积分数达到 10% 时, 相对酶活力低于 80%。

关键词: 鸡肝酯酶; 酶活力; 水溶性有机溶剂

Effects of Water-Soluble Organic Solvents on Activity of Chicken Liver Esterase

ZHAO Jie, XU Fei*, CAO Hui, YU Jin-song
(School of Medical Instrumentation and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: Chicken liver esterase, isolated from fresh chicken liver, is available for detecting pesticides. The effects of water-soluble organic solvents on the activity of chicken liver esterase were investigated. The results indicated that methanol, alcohol, propanol, ethylene glycol monomethyl ether (EGME) and glycol ether at low concentration could activate chicken liver esterase; in contrast, these organic solvents at high concentration could inactivate chicken liver esterase. Ethylene glycol monomethyl ether was the best organic solvent to maintain the activity of chicken liver esterase. When EGME concentration was 50%, the relative activity of chicken liver esterase remained 93%. Acetone and dioxane had negative effect on enzymatic activity. Acetone and dioxane at a concentration of 10% could result in 20% loss for relative activity of chicken liver esterase.

Key words: chicken liver esterase; enzymatic activity; organic solvents

中图分类号: TS201.6; TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)15-0216-04

鸡肝酯酶是一种由上海理工大学食品质量与安全研究所从鸡肝中提取的动物酯酶, 是用于农药残留快速检测仪中的检测工具酶, 目前已有关于鸡肝酯酶用于多种有机磷、氨基甲酸酯、拟除虫菊酯类农药检测的报道^[1-3]。在农药速测过程中, 利用有机溶剂提取农药是关键步骤之一, 而有机溶剂的存在会对酶活力产生影响, 进而影响检测效果, 因此研究有机溶剂对鸡肝酯酶酶活力的影响尤为重要^[4]。本实验以鸡肝酯酶液酶为研究对象, 研究几种常用的水溶性有机溶剂对鸡肝酯酶酶活力的影响, 以期今后选取农药提取剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜鸡肝 上海沔青食品厂; 固兰 B(fast blue-salt)

美国 Sigma 公司; α -乙酸萘酯(色谱纯)、柠檬酸、柠檬酸三钠、十二烷基硫酸钠、丙酮、甲醇、无水乙醇、正丙醇、乙二醇甲醚、乙二醇乙醚、1,4-二氧六环均为分析纯 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

DS-1 型组织捣碎机 上海标本模型厂; 超高速冷冻离心机 美国 Beckman 公司; 722S 型分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; 水浴摇床 江苏太仓市实验设备厂; 超声波清洗器 上海科导超声波仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 鸡肝酯酶的分离提取

将 30.0g 新鲜鸡肝和 90.0g 的柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液(0.025mol/L 的缓冲溶液, pH6.4)以 1:3 的比例混合,

收稿日期: 2011-07-12

基金项目: 上海市科委生物医药专项(10391901500); 上海市农委科技兴农重点攻关项目(2006 第 7-4 号)

作者简介: 赵洁(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全快速检测技术。E-mail: foxriver.fox@hotmail.com

*通信作者: 徐斐(1972—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品安全快速检测技术。E-mail: xufei.first@263.net

用组织捣碎机将上述混合物打成匀浆, 为避免捣碎过程中温度过高失去酶活力, 先加入 1/3 的缓冲液进行捣碎, 待鸡肝全部粉碎后, 再加入剩余 2/3 缓冲液, 每旋转 10s, 停 20s。重复 5 次。所得匀浆在冷冻离心机上以 4℃、4000r/min 的转速离心 10min 后, 上清液即为鸡肝酯酶, 用脱脂棉过滤后, 立即于 -18℃ 冻藏备用。

1.3.2 鸡肝酯酶活力的测定

根据 van Asperen^[5]所述方法改进, 参考徐斐等^[2]对鸡肝酯酶液酶活力的检测方法, 具体方法如下: 将酶液用 pH6.4 的柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液适当稀释。在 2.5mL 稀释酶液中加入 50 μL 底物(16mmol/L α-乙酸萘酯的丙酮溶液)混合均匀, 在 30℃ 恒温水浴中保温反应 5min, 然后与 0.5mL 显色剂(0.4% 固兰 B 的 1.8% SDS 溶液)混合均匀, 再于 30℃ 条件下保温 5min。以不加酶液的反应液作空白, 记录 595nm 波长处的吸光度, 根据下式计算鸡肝酯酶液的活力。

$$E_L/(U/mL) = D \times \frac{K \times A}{5} \times 10^{-3}$$

式中: E_L 为酶液的鸡肝酯酶活力/(U/mL); D 为酶液的稀释倍数; K 为 α-萘酚标准曲线的斜率(10^{-6} mol/L); A 为反应液的吸光度。

1.3.3 有机溶剂对鸡肝酯酶活力的影响

选择甲醇、乙醇、正丙醇、丙酮、1,4-二氧六环、乙二醇-甲醚、乙二醇-乙醚等水溶性有机溶剂为效应物, 在 3mL 的测定体系中, 加入不同体积分数的效应物, 测定酶活力。以原来测得的酶活力记为 E_0 , 加入有机溶剂后测得的酶活力记为 E_1 , 用相对酶活力 E_1/E_0 分析研究效应物对鸡肝酯酶活力的影响。

同时, 以不含羟基的乙醚为效应物, 测定相对酶活力, 以此作为对照实验, 分析醇类、含羟基醚类有机溶剂在低体积分数条件下激活鸡肝酯酶活力的原因。

2 结果与分析

2.1 一元醇对鸡肝酯酶活力的影响

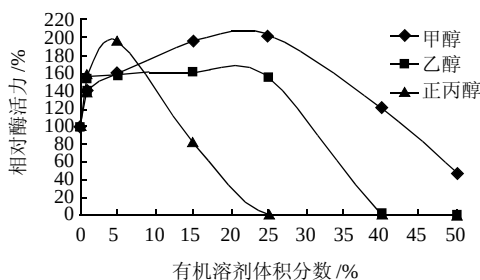


图1 3种一元醇对鸡肝酯酶活力的影响

Fig.1 Effects of methanol, alcohol and propanol on the activity of chicken liver esterase

由图1可知, 3种水溶性一元醇对鸡肝酯酶的效应均表现为先激活后抑制作用, 其中以正丙醇对鸡肝酯酶活力影响最为明显, 当体积分数为 5% 时对酶活力的激活作用达到最大, 随后迅速下降, 25% 时酶活力完全丧失。乙醇低于 25% 时对酶活力有激活作用, 且该作用相对较平缓, 随乙醇体积分数升高变化不大; 以 25% 为分界, 高于 25% 鸡肝酯酶活力迅速下降, 当乙醇到达 40% 时, 酶活力完全丧失。甲醇为 40% 时仍然能够保持原酶活力的 120%。从 3 种醇类对酶活力的影响推断该影响可能与碳链长短有关。

2.2 2种含羟基醚对鸡肝酯酶活力的影响

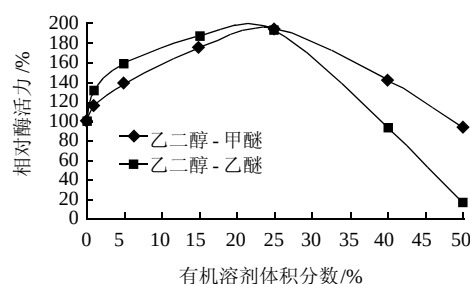


图2 2种含羟基醚对鸡肝酯酶活力的影响

Fig.2 Effects of EGME and glycol ether on the activity of chicken liver esterase

由图2可知, 乙二醇-乙醚和乙二醇-甲醚对鸡肝酯酶活力都表现为先激活后抑制作用, 且体积分数在 20%~25% 区间激活作用达到最高值, 在 40% 内都能较好的保持酶活力。不同的是, 乙二醇-乙醚大于 40% 后开始对酶活力产生抑制作用, 到体积分数为 50% 时酶活力仅剩 20%; 而乙二醇-甲醚在体积分数为 50% 时仍保持较好的酶活力, 相对酶活力约为 100%。

2.3 丙酮、1,4-二氧六环对鸡肝酯酶活力的影响

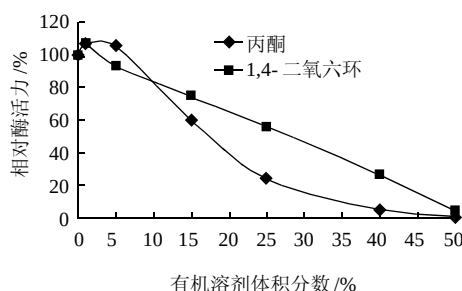


图3 丙酮、1,4-二氧六环对鸡肝酯酶活力的影响

Fig.3 Effects of acetone and 1,4-dioxane on the activity of chicken liver esterase

由图3可知, 丙酮和 1,4-二氧六环对鸡肝酯酶活力的影响类似, 多数情况下表现为抑制作用。丙酮体积分数小于 5% 时表现出轻微激活作用, 随后随着体积

分数升高, 酶活力迅速下降。1,4- 二氧六环体积分数小于 5% 时能够保持酶活力在 90% 以上, 但是高于 5% 后酶活力随 1,4- 二氧六环体积分数升高而迅速下降。

2.4 不含羟基醚(乙醚)溶剂对鸡肝酯酶酶活力的影响

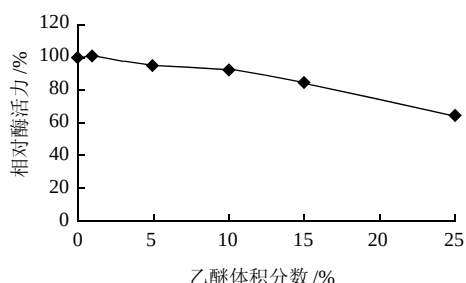


图 4 乙醚对鸡肝酯酶酶活力的影响

Fig.4 Effect of glycol ether on the activity of chicken liver esterase

由图 4 可知, 乙醚在体积分数低于 25% 时对鸡肝酯酶酶活力表现为抑制作用, 随着体积分数升高, 酶活力逐渐降低。低体积分数条件下, 乙醚呈油状小颗粒形态均匀分布在体系中, 对鸡肝酯酶酶活力并无激活作用, 与含羟基醚类相比较作用完全不同, 推断可能与分子结构中的羟基有关。

3 讨论

本实验表明, 正丙醇、乙醇、甲醇、乙二醇 - 乙醚、乙二醇 - 甲醚、丙酮、1,4- 二氧六环有机溶剂对鸡肝酯酶酶活力具有低体积分数激活、高体积分数抑制的作用。鸡肝酯酶与多数酶一样, 在有机溶剂 - 水体系中可以发挥作用, 而且在不同的有机溶剂中会表现出不同的催化活性; 同一种溶剂中不同体积分数对鸡肝酯酶酶活力的影响不同^[6-10]。在以上实验基础上, 对鸡肝酯酶酶活力在有机溶剂 - 水体系中的变化及可能的原因做初步探讨。

3.1 有机溶剂种类对鸡肝酯酶酶活力的影响

醇类、含羟基醚类对鸡肝酯酶酶活力的作用表现为先激活后抑制作用, 而丙酮、1,4- 二氧六环对酶活力的作用则以抑制为主、仅在体积分数极低的情况下表现出轻微的激活; 而不含羟基的醚溶剂乙醚对酶活力不具有激活作用, 主要表现为抑制作用。从分子结构上看, 推测醇和醚中所含的羟基可能对激活鸡肝酯酶的酶活力起主要作用。化合物中所含的羟基结构不仅能够通过氢键与酶蛋白表面分子相连, 又能够通过氢键与体系中的水相连, 使酶的蛋白结构稳定, 酶活性得到保护, 不致于受到溶剂夺取酶分子所含的结合水而失活^[11-13]。而丙酮、1,4- 二氧六环分子结构中无羟基结构, 对鸡肝酯酶酶活力作用表现为抑制作用, 可能与溶剂本身结构有关。

3.2 鸡肝酯酶对一元醇的耐受性

研究一元醇对鸡肝酯酶酶活力的影响时, 发现鸡肝酯酶处于低体积分数的甲醇、乙醇溶剂中酶活力增加。只有当这两种有机溶剂的体积分数升高到一定程度时, 酶活力才逐渐受到抑制。这与国内学者黄小红等^[8-9]研究甲醇、乙醇对其他酶活力的影响结果一致。不同的是, 黄小红等研究的甲醇、乙醇对棉铃虫 *N*- 乙酰氨基葡萄糖苷酶和 Bt 几丁质酶活力影响结果显示, 两种酶酶活力下降 50% 时甲醇、乙醇的体积分数为 25%, 而本实验中引起鸡肝酯酶酶活力损失 50% 的甲醇、乙醇体积分数分别为 50%、35%, 均比前者高。这说明鸡肝酯酶与其他酶相比, 对甲醇、乙醇的耐受性较高。

3 种一元醇对鸡肝酯酶酶活力的失活作用以正丙醇最明显, 乙醇次之, 甲醇第三, 出现这种情况可能与碳链长短有关。碳链越长, 溶剂中羟基的相对含量较少, 所引起介质中的介电常数相对较低, 对酶活力保护作用较弱, 酶也越容易失活, 因此, 3 种醇中正丙醇对鸡肝酯酶酶活力的影响最大^[14]。

3.3 有机溶剂体积分数对鸡肝酯酶酶活力的影响

鸡肝酯酶酶活力在较高浓度有机溶剂中受到抑制作用, 这是由于有机溶剂存在时鸡肝酯酶的分子构象发生变化造成的^[15]。酶分子中的疏水键对维持鸡肝酯酶的三维结构起着极其重要的作用, 酶在水中以氢键、静电力和疏水键等维持自身稳定的三维构象, 并在酶分子表面形成一个极性水化层。当引入有机溶剂后, 高浓度的有机溶剂可能通过破坏水化层, 使鸡肝酯酶酶分子中维系构象的次级键被破坏, 从而改变该酶的构象, 引起酶活力的下降。Griebenow 等^[16]用 FTR 定量地研究蛋白质在有机溶剂 - 水混合体系中的二级结构, 测定溶菌酶和枯草杆菌蛋白酶在 3 种不同体积分数的水溶性有机溶剂(乙腈、四氢呋喃、正丙醇)中的二级结构, 发现随着体积分数上升, 在 60% 的混合溶液中两种酶的 α 折叠含量明显减少。这说明随着溶液中有机溶剂体积分数的增加, 蛋白质结构受到越严重的破坏, 酶失活的趋势增加, 这也可能是有机溶剂影响鸡肝酯酶酶活力的方式。

3.4 溶液极性对鸡肝酯酶酶活力的影响

有研究表明, 有机溶液浓度越高, 溶液极性越小, 酶活力随之减小^[17]。溶液极性对鸡肝酯酶酶活力的影响可能为: 酶的带电基团与极性基团一般分布在酶的表面上, 非极性疏水基团包埋于酶内部, 在极性较强的水溶液中, 其处于热力学稳定状态(即能量最低状态)。由于热运动, 鸡肝酯酶在水溶液中的构象存在着涨落与呼吸, 可使酶内部的非极性疏水基团翻到表面^[18-19]。翻出作用是一种热力学非自发过程, 需要很高的活化能, 因此鸡肝酯酶处于动态平衡中, 内部的非极性疏水基团

翻出机率很小。当水溶液中加入有机溶剂使溶液极性降低时, 酶的稳定性降低, 鸡肝酯酶内部的非极性疏水基团翻出到表面上所需的活化能减小, 翻出机率增大, 从而使酶的活力降低^[20]。

有机溶剂水溶液中当浓度较低时, 鸡肝酯酶酶活力受到激活, 对于这种现象可能是由于鸡肝酯酶在极性有微弱降低的体系中, 内部的非极性疏水基翻到表面上的机率适当增大, 酶柔性增加所致。而鸡肝酯酶柔性增加, 活力提高, 酶的活力有所激活^[21]。

有机溶剂对酶活力的影响是酶工程研究的一个重要领域。研究鸡肝酯酶在有机溶剂-水体系中的活力变化, 对建立新的鸡肝酯酶检测农药体系, 选择最佳有机溶剂作为农药提取剂与反应介质等, 都具有重要的科研价值。

参考文献:

- [1] 吴燕雯, 吴瑛, 徐斐, 等. 提高鸡肝酯酶稳定性的保护剂选择[J]. 食品工业科技, 2005, 26(6): 84-85.
- [2] 徐斐, 许学勤, 张慧君, 等. 鸡肝酯酶在有机磷和氨基甲酸酯类农药检测中的应用研究[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 237-240.
- [3] 李思超, 徐斐, 赵洁, 等. 鸡肝酯酶快速检测氰戊菊酯农药的试验研究[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(2): 10-15.
- [4] 张慧君. 酶法快速检测果蔬中农药残留的实验研究[D]. 上海: 上海理工大学, 2004.
- [5] van ASPEREN K. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method[J]. J Ins Physiol, 1962, 8(4): 401-414.
- [6] FAULDS C B, PEREZ-BOADA M, MARTINEZ Á T. Influence of organic co-solvents on the activity and substrate specificity of feruloyl esterases[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(8): 3732-3736.
- [7] TORRES S, MARTINEZ M A, CASTRO P A, et al. An organic-solvent-tolerant esterase from thermophilic *Bacillus licheniformis* S-86 [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(2): 896-902.
- [8] 黄小红, 陈清西, 王君, 等. 有机溶剂对棉铃虫 *N*-乙酰氨基葡萄糖酶活力的影响[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2005, 34(1): 78-81.
- [9] 黄小红, 陈清西, 王君, 等. 有机溶剂对苏云金芽孢杆菌几丁质酶的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(1): 71-73.
- [10] CASTRO G R. Enzymatic activities of proteases dissolved in organic solvents[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 25(8/9): 689-694.
- [11] SOLA M, MEYER J R. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars[J]. Arch Biochem Biophys, 1998, 60(1): 10-14.
- [12] 区炳庆, 卢卫红. 几种糖与氨基酸对鸭血红细胞 SOD 的保护作用[J]. 佛山科学技术学院学报: 自然科学版, 2009, 27(1): 20-23.
- [13] 杨学山, 杨孝朴, 付文力. 糖类对羊血超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(7): 100-103.
- [14] 谢进金, 陈朝阳, 史雄略. 罗非鱼过氧化氢酶活性的初步研究[J]. 水利渔业, 2006, 26(6): 16-18.
- [15] 黄卓烈, 苏婷, 巫光宏, 等. 甲醇对酵母过氧化氢酶活性的影响机理研究[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(12): 103-106.
- [16] GRIEBENOW K, KLIBANOV A M. On protein denaturation in aqueous-organic mixtures but not in pure organic solvents[J]. J Am Chem Soc, 1996, 118(47): 11695-11700.
- [17] 林建城, 王志鹏, 杨文杰, 等. 几种效应物对黑曲霉果胶酶活力的影响[J]. 云南师范大学学报, 2006, 26(6): 48-51.
- [18] 彭立凤. 有机溶剂对酶催化活性和选择性的影响[J]. 化学进展, 2000, 12(3): 296-304.
- [19] 张济龙, 张光先, 任红勤. 溶液极性对 H_2O_2 酶活力的影响研究[J]. 西南农业大学学报, 1999, 21(2): 186-189.
- [20] 谢晓兰, 潘小芳, 龚丽芬, 等. 有机溶剂对猪红细胞 SOD 的活力与构象影响[J]. 泉州师范学院学报: 自然科学版, 2010, 28(4): 47-50.
- [21] 李学刚. 表面活性剂物理化学及其在农业方面的应用[M]. 重庆: 西南师范大学出版社, 1997: 159-160.