

巯基乙酸对过氧化氢酶的激活及其机制研究^{*}

刘建忠¹, 刘 杰², 翁丽萍², 计亮年²

(1. 中山大学基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510075;

2. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 研究了巯基乙酸对黑曲霉过氧化氢酶的激活作用, 并从动力学和谱学角度研究了其激活原因. 过氧化氢酶被巯基乙酸激活后, 其 k_m 值减小、 k_{cat}/k_m 增大, 即巯基乙酸能够提高过氧化氢酶对底物的亲和力及底物专一性. 巯基乙酸同样能够引起过氧化氢酶的可见光谱的蓝移及酶分子的色氨酸残基的荧光强度减小, 从而使过氧化氢酶活性中心铁卟啉周围环境发生变化, 以达到提高酶活力之目的.

关键词: 过氧化氢酶; 激活; 光谱

中图分类号: Q550.2 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2001) 06-0039-03

过氧化氢酶 (CAT, EC 1.11.1.6) 是铁卟啉酶. 每个过氧化氢酶分子含有 4 个亚基, 每个亚基含有 1 个铁卟啉. 它的主要来源是动物肝脏和黑曲霉. 黑曲霉过氧化氢酶的铁卟啉的轴向第 5 个配体为酪氨酸. 过氧化氢酶既能有效地催化过氧化氢的分解又能在 H_2O_2 作用下氧化醇类、烷基过氧化物和甲酸等化合物^[1]. 因 H_2O_2 有毒性不允许在食物中残留, 在葡萄糖酸及其盐制备过程中, 过氧化氢酶及时分解葡萄糖氧化酶氧化葡萄糖时产生的 H_2O_2 ; 利用 H_2O_2 作为杀菌剂杀菌后也必须将 H_2O_2 充分分解. 因此, 过氧化氢酶广泛应用于食品和化学工业. 在催化过程中, 过氧化氢酶依次经历了 3 个氧化中间体: 化合物 I, II 和 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 和 III 没有催化活性^[2].

作者以前报道了巯基化合物能够提高葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶发酵液中粗制品过氧化氢酶的活性^[3]. 为了探讨其激活原因, 我们利用商品黑曲霉过氧化氢酶进行了动力学和光谱学研究.

1 实验部分

过氧化氢酶为 Sigma 公司产品, 巯基化合物购自 Fluka 公司, 其它试剂为国产分析纯试剂.

紫外-可见光谱在 Shimadzu MPS2000 型紫外-

可见分光光度计上测定. 荧光光谱在 Hitachi F-4500 荧光仪上测定.

过氧化氢酶活力采用紫外分光光度法^[4]. 在比色杯中加入 3 mL 30 mmol/L H_2O_2 (50 mmol/L 磷酸钠缓冲液配制, pH 7.0) 和 10 μ L 酶液, 摇匀后测定 240 nm 下的吸光度变化值.

过氧化氢酶浓度测定, 是在 406 nm 波长测量其吸光度, 再根据 $\epsilon_{406}=3.6\times 10^6$ 计算而得.

动力学常数根据米氏方程计算.

2 结果与讨论

图 1 为添加不同浓度的 $SHCH_2COOH$ 对过氧化氢酶活性的影响. 在 $SHCH_2COOH$ 浓度低于 0.6 mmol/L 时, 过氧化氢酶活性随 $SHCH_2COOH$ 浓度的增加而增大; 当 $SHCH_2COOH$ 浓度大于 0.6 mmol 时, 过氧化氢酶活性却降低. 这结果与前文^[3]报道的粗制品过氧化氢酶的结果一致.

表 1 为 $SHCH_2COOH$ 对过氧化氢酶动力学参数的影响. 添加 0.2 mmol/L $SHCH_2COOH$ 后, k_m 减小, 说明过氧化氢酶对 H_2O_2 的亲和力增大; 转换系数 k_{cat} 减小, $k_{cat}\cdot k_m^{-1}$ 增大, 说明 $SHCH_2COOH$ 能够提高过氧化氢酶的底物专一性. 因此, 从动力学上来看, $SHCH_2COOH$ 激活过氧化氢酶的原因是 $SHCH_2COOH$ 能够提高酶对底物亲和力及底物专一性.

^{*} 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (970840, 001278); 高等学校重点实验室访问学者基金资助项目

收稿日期: 2001-03-21; 作者简介: 刘建忠 (1966—), 男, 博士, 副研究员; 通讯联系人: 计亮年.

表 1 SHCH₂COOH 对过氧化氢酶的动力学参数的影响¹⁾
Tab. 1 Kinetic parameters of catalase in the presence of SHCH₂COOH

酶	$\frac{V_m}{(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})}$	$\frac{k_m}{(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})}$	$\frac{k_{cat}}{\text{min}^{-1}}$	$\frac{(k_{cat}\cdot k_m^{-1})}{(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})}$
过氧化氢酶	1.7×10^4	2.6×10^5	1.8×10^7	69.6
过氧化氢酶+SHCH ₂ COOH	7.2×10^3	8.4×10^4	7.8×10^5	93.1

1) 条件: $9.27\times 10^{-4}\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢酶; 0.2 mmol/L SHCH₂COOH; 20 ℃

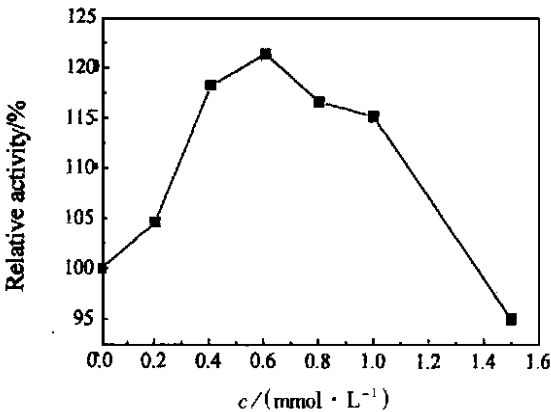


图 1 SHCH₂COOH 对过氧化氢酶活性的影响

Fig. 1 Effects of SHCH₂COOH on catalase activity
 $c(\text{catalase})=9.27\times 10^{-4}\text{mol/L}$

从图 2 发现, 添加 SHCH₂COOH 后, 过氧化氢酶的可见光光谱发生蓝移(408→404 nm), 而且最大吸收光强度也将下降. 文献中曾报道在细胞色素 C^[5]、辣根过氧化物酶^[6] 和细胞色素 P450^[7] 中也观察到相同结果; 聚乙二醇 (PEG) 修饰细胞色素能够改变活性中心铁卟啉的周围环境, 从而提高酶的亲和力, 扩大底物范围^[5]; 辣根过氧化物酶的 8-甲酰血红素衍生物显示与天然酶不同的催化能力^[6]; 细胞色素 P450 的铁卟啉被铁原卟啉二甲酯取代后, 能够提高底物的专一性^[7]; 因此, SHCH₂COOH 能激活过氧化氢酶主要原因可能是铁卟啉周围环境的改变引起其底物亲和力和专一性的提高. 另外, 前文^[8] 报道了含巯基轴向配体 (巯基乙酸、半胱氨酸和邻巯基苯甲酸等) 能够增加细胞色素 P450 单加氧酶活性中心铁离子的电荷密度, 改变其氧化还原电位, 从而提高细胞色素 P450 单加氧酶催化环己烷的氧化能力. 因此, 我们认为 SHCH₂COOH 可能同样能够提高过氧化氢酶的中心铁离子的电荷密度, 进而有利于将电子给予 H₂O₂ 中氧的反键轨道, 促进 O—O 键断裂, 容易生成含 Fe^{IV}=O

的中间体化合物 I, 最终达到提高过氧化氢酶活力之目的.

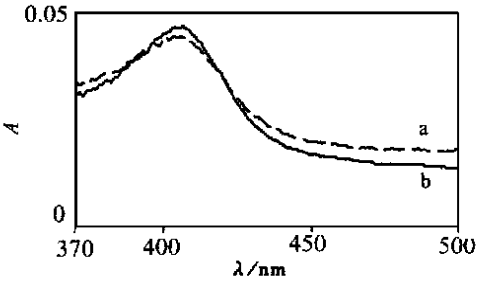


图 2 SHCH₂COOH 激活过氧化氢酶前后的吸收光谱

Fig. 2 Absorbance spectra of catalase in absence and presence of SHCH₂COOH
a 激活前; b 激活后;
 $c(\text{SHCH}_2\text{COOH})=0.2\text{mmol/L}$;
 $c(\text{过氧化氢酶})=0.28\mu\text{mol/L}$

添加 SHCH₂COOH 后, 过氧化氢酶在 330 nm 的内源荧光光谱 (激发波长为 230 nm) 也将逐渐淬灭 (图 3). 由于 330 nm 荧光发射峰主要是色氨酸残基所贡献, 因此, SHCH₂COOH 同时也能使色氨酸残基侧链的吲哚基性质发生改变. 另外, 测定了 SHCH₂COOH 的添加对色氨酸荧光光谱的变化. 结果, 色氨酸的荧光光谱不会发生变化, 这可能是由于色氨酸无法接受 SHCH₂COOH 所提供的电子之故. 由此可看出, SHCH₂COOH 只与过氧化氢酶の色氨酸残基发生作用, 电子经过酶分子蛋白链传递给活性中心铁离子, 促进含 Fe^{IV}=O 的中间体化合物 I 的形成, 最终达到提高过氧化氢酶活力之目的.

综上所述, SHCH₂COOH 激活过氧化氢酶的主要原因可能是 SHCH₂COOH 的添加, 引起了过氧化氢酶の色氨酸残基侧链的吲哚基性质发生改变, 使电子经过酶分子蛋白链传递给酶活性中心, 从而引起活性中心周围环境的改变, 使其底物亲和力和专一性得到提高, 促进含 Fe^{IV}=O

的中间体化合物 I 的形成, 最终达到提高过氧化氢酶活力之目的.

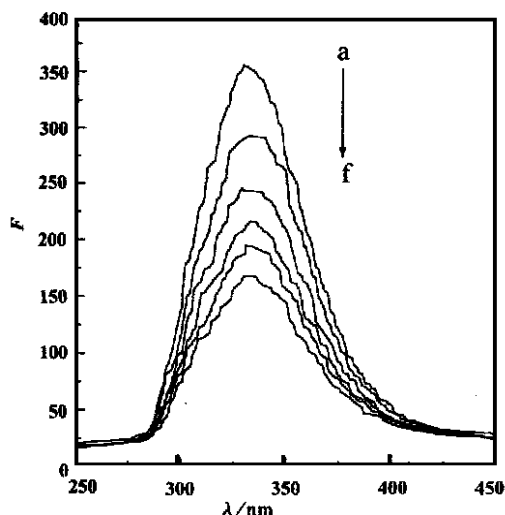


图 3 SHCH₂COOH 激活过氧化氢酶前后的荧光光谱

Fig 3 Fluorescence emission spectra of catalase treated by SHCH₂COOH in sodium phosphate buffer solution
 $c(\text{SHCH}_2\text{COOH})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$: a 0; b 0.4; c 0.8; d 1.2; e 1.6; f 2.0; $c(\text{过氧化氢酶}) = 0.139 \mu\text{mol/L}$;
 $c(\text{Na}_3(\text{PO}_4)_2) = 25 \text{ mmol/L}$; pH 7.0

参考文献:

[1] SHARMA K D, ANDERSSON L A, LOEHR T M. Comparative spectral analysis of mammalian, fungal and bacterial catalase [J]. J Biol Chem, 1989, 264: 12772—12779.

[2] LARDINOIS O M, MESTDAGH M M, ROUXHET P G. Reversible inhibition and irreversible inhibition of catalase in presence of hydrogen peroxide [J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1295: 222—238.

[3] 刘建忠, 杨惠英, 赵继伦, 等. 模拟酶轴向配体激活过氧化氢酶的研究 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 1998, 37(2): 125—127.

[4] LIU J Z, YANG H Y, WENG L P. Synthesis of glucose oxidase and catalase by *Aspergillus niger* in resting cell culture system [J]. Lett Appl Microbiol, 1999, 29: 337—341.

[5] TINOCO R, VAZQUEZ DUBALT R. Chemical modification of cytochrome C improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. Enzyme Microbiol Technol, 1998, 22: 8—12.

[6] HARRIS R Z, LIDDELL P A, SMITH K M, et al. Catalytic properties of horseradish peroxidase reconstituted with the 8 (hydroxymethyl) and 8 formylheme derivatives [J]. Biochemistry, 1993, 32: 3658—3663.

[7] MODI S, PRIMROSE W U, ROBERTS G C K. Effect of replacement of ferriprotoporphyrin IX, in the haem domain of cytochrome P-450 BM-3 on substrate binding and catalytic activity [J]. Biochem J, 1995, 310: 939—943.

[8] JI L N, LIU M, HSIEH A K, et al. Metalloporphyrin-catalyzed hydroxylation of cyclohexane with molecular oxygen [J]. Molecular Catalysis C, 1991, 70: 247—257.

Study of Activation and Spectrum of Catalase from *Aspergillus niger*

LIU Jian zhong, LIU Jie, WENG Li ping, JI Liang nian

(The Key Laboratory of Gene Engineering of Minister of Education,
 Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The activation of catalase from *Aspergillus niger* by thioglycolic acid was investigated. Thioglycolic acid showed positive effect on catalase activity and the optimal concentration of thioglycolic acid was 0.6 mmol/L. The reasons of the activation of thioglycolic acid were also investigated by the determination of kinetic constants, the absorbance and emission fluorescence. The kinetic parameters, indicated that the addition of thioglycolic acid enhanced the affinity and specificity of catalase. The heme environment (active site) and tryptophane residues of catalase were altered by thioglycolic acid.

Keywords: catalase; activation; spectrum