

低功率微波耦合溶剂相酶促酯化反应及其荧光光谱的变化

闵瑞¹, 方云¹, 夏咏梅^{1,2*}

1 江南大学化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122

2 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

摘要 以溶剂相脂肪酶 LRI 催化辛酸和丁醇的酯化反应体系为对象, 将反应体系中各组分别分别在低功率微波辐射和常规加热下对 LRI 作用后, 用荧光发射光谱分级逐步研究 LRI 在有机溶剂和水环境中的荧光光谱变化。微波辐射和常规加热在所有实验条件下均增强 LRI 的荧光强度而没有导致最大发射波长位移。在微波辐射能够提高反应初速度的范围内, 当 LRI 与有机分子共热后, 微波辐射更有利于 LRI 蛋白质分子在水中的裸露。不同 $\log P$ 溶剂的反应体系对酶构象的影响主要表现为溶剂对其的影响。反应初速度对 $\log P$ 的变化规律与水相 LRI 蛋白质的荧光强度对 $\log P$ 的变化接近, 而与溶剂相 LRI 蛋白质的荧光强度对 $\log P$ 的变化规律之间基本无共同之处。

关键词 脂肪酶; 构象; 微波; 荧光; 非热效应; 溶剂

中图分类号: Q586 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)02-0428-04

引言

微波辐射可以用来消解蛋白质, 也可以用来加速酶催化反应, 而后者自然是在不损伤酶的一级结构的低功率辐射下进行的。在酶催化反应中, 抑制剂^[1]、溶剂^[2-6]、电磁场^[7-9]或者金属离子及配合物^[10]对酶的构象都会产生影响, 从而影响酶的催化活性。研究微波辐射对于酶构象的影响, 将有助于研究微波在微波耦合酶促反应中的非热效应。但是微波辐射过程中酶的光谱变化以及微波对于酶构象的影响均少见报道。我们的前期工作表明^[11], 脂肪酶 Lipozyme RM IM (固定化(*Rhizomucor miehei*) Lipase, LRI) 在溶剂相中 20~65 °C 下催化酯化辛酸和丁醇时, 微波辐射可以提高反应的初速度; 进一步研究表明, 辛酸对酶有一定的抑制作用, 而且微波辐射可以增强醇与酶的亲和力, 但是对微波辐射下 LRI 的构象变化不甚明了。

众所周知, 酶的活性部位与底物的诱导契合是酶催化的先决条件。由于不同底物、溶剂的物理性质不同, 受物理场的影响也不同, 对酶的作用程度可能也不相同。由于微波对物质极性的敏感性, 酶蛋白构象在不同环境下(例如不同功率微波、不同溶剂、不同底物)受到微波辐射的影响也一定不同。酶蛋白分子的内源荧光强度与发射峰位置的变化一定

程度上可揭示酶分子肽链的伸展及构象变化, 特别是揭示酶蛋白分子裸露程度的变化; 而酶蛋白分子的适度裸露对酶与底物的契合是很重要的, 适度的酶蛋白分子裸露有利于酶蛋白分子更好地与底物结合, 从而加快反应速度; 过度的裸露使酶的结构过于松散, 可能会破坏酶特有的疏水袋结构, 有利于竞争性副反应的发生。

此外, 脂肪酶的催化反应是发生在油水界面上的, 所以很有可能脂肪酶的蛋白质分子伸展也同时涉及溶剂相和水相; 尤其是对共价固定化脂肪酶而言, 其蛋白质分子伸展还受到该共价键合的制约。另一方面, 蛋白质分子在 330 和 350 nm 处的荧光强度变化分别可以用来考察酶蛋白中色氨酸残基在溶剂以及水相中的裸露程度, 而蛋白质水溶液在 310 nm 处的荧光强度变化可以用来考察酶蛋白中疏水部分色氨酸残基的裸露程度变化。因而这些荧光强度变化也可以用于判别酶蛋白的裸露程度变化, 在一定程度上反映酶蛋白的构象是否发生变化。因此荧光光谱在一定程度上可以反映不同底物、溶剂对酶构象的影响。

本文在微波辐射能够提高反应的初速度的范围内, 用荧光发射光谱分级逐步地研究了脂肪酶 LRI 溶剂相催化酯化辛酸和丁醇时, 常规加热和低功率微波辐射下反应体系中 LRI 荧光光谱变化, 以及光谱变化与微波加速反应间的关联。

收稿日期: 2007-11-02, 修订日期: 2008-02-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(20476038), 国家“863”项目(2006AA10Z310), 江苏省自然科学基金项目(BK2006021)和教育部分新世纪优秀人才支持计划项目(2005)资助

作者简介: 闵瑞, 1982年生, 江南大学化学与材料工程学院硕士研究生 * 通讯联系人, e-mail: ymxia@126.com

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Lipozyme RM 1M (*Rhizomucor miehei* Lipase), Novozyme 公司赠送; 乙苯、辛酸 (CP, 上海化学试剂公司)、丁醇、庚烷、辛烷、壬烷、苯、甲苯 (AR, 上海化学试剂公司), 使用前均用 0.4 nm 分子筛干燥; RF-5301PC 荧光分光光度计 (日本岛津公司); 连续微波反应器^[11] (自制)。实验用水为二次去离子水。

1.2 实验方法

1.2.1 脂肪酶 LRI 溶剂相催化酯化辛酸和 醇的反应

(1) 常规加热模式 (CH)

将 5 mmol 辛酸、5 mmol 丁醇、40 mmol 溶剂与蒸馏水 (总反应物的 1% 质量分数) 置于 $\varnothing 20 \text{ mm} \times 60 \text{ mm}$ 的筒形玻璃反应器中, 磁力搅拌使之混合均匀, 水浴加热使体系维持在设定温度后, 向反应体系加入 0.02 g 脂肪酶 RM 1M, 反应自加酶后计时。结束反应时, 停止加热, 同时迅速用冰浴冷却体系。将体系中的固定化酶取出, 用冷乙醚 (4 °C) 洗去酶粒上残留的试剂, 挥发除去乙醚。

(2) 微波辐射模式 (MI)

将 5 mmol 辛酸、5 mmol 丁醇、40 mmol 溶剂与蒸馏水 (总反应物的 1% 质量分数) 置于 $\varnothing 20 \text{ mm} \times 60 \text{ mm}$ 的筒形微波反应器中, 用磁力搅拌使之混合均匀。待反应体系温度升至设定值时加酶并启动微波辐射, 开始计时, 辐射频率为 2450 MHz, 恒定功率为 200 W。其余操作与 CH 模式类似。

(3) 反应初速度的测定

取反应物样品 0.1~0.2 g 于 100 mL 三角瓶中, 加 15 mL 95% 乙醇溶解并终止反应。以酚酞为指示剂, 用标准 NaOH 溶液滴定反应体系中辛酸的量。

酯化反应的初速度定义为反应初期 (此时辛酸浓度正比于反应时间) 单位时间内、单位质量反应体系中辛酸的减少量 ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)。

1.2.2 荧光光谱测定

以辛酸、丁醇为底物, 分别以苯、甲苯、乙苯、己烷、庚烷、辛烷、壬烷为溶剂, 在常规加热和微波辐射两种模式下, 模拟实际反应条件, 分别考察常规加热和微波辐射下, 底物、溶剂对 LRI 荧光光谱的影响, 以及反应前后酶荧光光谱的变化。

(1) 底物对 LRI 荧光光谱的影响

将 5 mL 辛酸或丁醇置于 $\varnothing 20 \text{ mm} \times 60 \text{ mm}$ 的筒形玻璃反应器中, 磁力搅拌使之混合均匀, 加热体系 (分别用常规加热、200 W 微波辐射) 至 50 °C 时, 加 0.02 g 酶并开始计时, 加热一定时间后, 停止加热, 用冰浴迅速冷却体系。将体系中的固定化酶取出, 用冷乙醚 (4 °C) 洗去酶粒上残留的试剂, 挥发除去乙醚后, 缓慢将固定化酶研磨成粉状, 备用。

(2) 溶剂对 LRI 荧光光谱的影响

将 5 mL 上述溶剂分别置于 $\varnothing 20 \text{ mm} \times 60 \text{ mm}$ 的筒形玻璃反应器中, 磁力搅拌使之混合均匀, 随后的酶样制备程序与上述完全一致。

(3) 反应前后酶荧光光谱的变化

将 5 mmol 辛酸、5 mmol 丁醇与 40 mmol 上述溶剂及占总反应物质量分数 1% 的蒸馏水置于 $\varnothing 20 \text{ mm} \times 60 \text{ mm}$ 的筒形玻璃反应器中, 磁力搅拌使之混合均匀, 随后的酶样制备程序同上。

1.2.3 荧光发射光谱测定

称取上述处理过的酶粉 0.0100 g, 分别用相应的溶剂及 pH 6.86 的磷酸盐缓冲液充分溶解, 定容至 5 mL。用 RF-5301PC 荧光分光光度计测定酶液的荧光发射光谱。荧光测定激发波长 285 nm, 激发与发射光狭缝宽度分别为 5 和 10 nm, 测定温度 30 °C, 扫描范围为 300~400 nm。所有实验均重复 3 次以上。

2 结果与讨论

2.1 不同赋能模式对 LRI 荧光光谱影响

将未经任何处理的酶的磷酸盐缓冲液溶液分别用常规加热和微波辐射加热到 50 °C, 然后分别测定其荧光光谱。

图 1 表明, 经加热或辐射后, 发射峰波长没有位移, 而 LRI 缓冲液溶液在 350 nm 处的荧光强度均比处理前增加, 说明微波辐射或者常规加热导致其表面的发色基团更加裸露, 即酶蛋白分子裸露程度变大; 而且常规加热下的荧光强度高于微波辐射下的, 提示在水环境中, LRI 不与其他有机物共存时, 常规加热更有助于其酶蛋白分子在水环境中的伸展。而 330 nm 处的荧光强度变化则提示单纯的微波辐射没有提高酶蛋白分子的色氨酸残基在疏水部分的伸展。

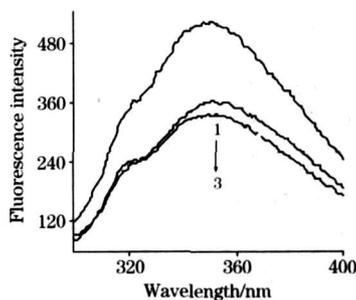


Fig 1 Fluorescence spectra of LRI in buffer

1: CH 10 min; 2: MI 10 min; 3: No heating

2.2 底物对 LRI 荧光光谱的影响

图 2 为 LRI 在微波辐射和常规加热下分别经辛酸、丁醇处理后在水环境和相应底物中的荧光光谱。

由图 2 所示, LRI 分别与辛酸、丁醇在模拟反应条件下共热后, 常规加热和微波辐射均使其在底物和磷酸盐缓冲液中的荧光强度 (330 nm 处) 增强。LRI 在辛酸中的荧光强度 (330 nm 处) 比在丁醇中的弱 [图 2(a), (b)]。常规加热比微波辐射更能增强 LRI 在底物中的荧光强度 (330 nm 处), 而微波辐射比常规加热更能增强 LRI 在水中的荧光强度 (350 nm 处), 加之 LRI 疏水部分色氨酸残基的进一步裸露 [图 2(c), (d), 310 nm 处], 暗示了 LRI 与辛酸或丁醇共热后, 微波辐射更有利于蛋白质分子在水中的裸露, 特别是有利于丁醇中 LRI 表面色氨酸残基的裸露 [图 2(c), (d) 曲线 1], 这与

我们通过米氏动力学研究发现的微波辐射更多地增强了醇对酶的亲合力的结论相符合^[11]；对照图 1 结果, 说明 LRI 经过有机物的处理后, 其构象对微波的敏感度有所增强。

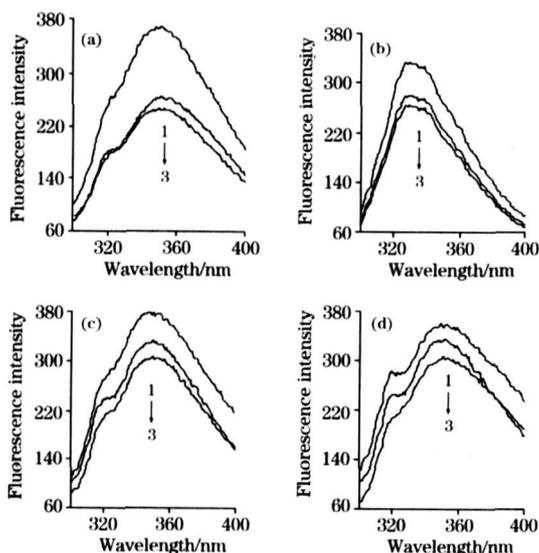


Fig 2 Fluorescence spectra of LRI recorded after incubating in butanol or caprylic acid

(a): Incubated LRI and recorded spectra in butanol: 1: CH 10 min; 2: MI 10 min; 3: No heating; (b): Incubated LRI and recorded spectra in caprylic acid: 1: CH 10 min; 2: MI 10 min; 3: No heating (c): Incubated in butanol, spectra recorded in phosphate buffer: 1: MI 10 min; 2: CH 10 min; 3: No heating; (d): Incubated in caprylic acid, spectra recorded in phosphate buffer: 1: MI 10 min; 2: CH 10 min; 3: No heating

2.3 溶剂对 LRI 荧光光谱的影响

图 2 表明了低功率微波辐射对 LRI 在有机介质中的内源性荧光猝灭会因介质而异, 这就促使我们有必要考察微波辐射下溶剂对 LRI 荧光光谱的影响, 因为溶剂是影响酶的催化活性与构象的重要因素之一, 而且各种溶剂对于微波的吸收不同。Laane 归纳了一部分有机溶剂对酶催化反应的影响规律, 认为酶在 $\log P < 2$ 的溶剂中催化活性较低, 在 $2 < \log P < 4$ 的溶剂和 $\log P > 4$ 的溶剂中均有较高的活性^[12]。通过荧光光谱考察了不同极性的溶剂(直链烷烃和芳烃)处理后的 LRI 分别在相应烷烃溶剂和水环境中的荧光强度的变化, 其结果总结在图 3 中。其中, 芳烃溶剂(苯、甲苯、乙苯)的 $\log P$ 分别为: 2.0, 2.5, 3.1; 直链烷烃(己烷、庚烷、辛烷、壬烷)的 $\log P$ 分别为 3.5, 4.0, 4.5, 5.1。

由图 3, LRI 分别与芳烃($\log P = 2 \sim 3.1$)以及不同直链同系烷烃溶剂($\log P = 3.5 \sim 5.1$)在模拟反应条件下共热后, 其荧光强度均比未加热者大幅增强。在溶剂中常规加热者比微波辐射的荧光强度高, 而在磷酸盐缓冲液中则相反, 这一点与图 2 结论相符合, 又一次表现出微波辐射更有利于蛋白质分子在水中的裸露。在低 $\log P$ 区间, 常规加热对荧光强度的增强比微波辐射大, 而在高 $\log P$ 区间两者的差别缩小。

2.4 LRI 在溶剂相酶促酯化反应后的荧光光谱变化

以上我们逐步分项考察了 LRI 在模拟酯化反应条件的

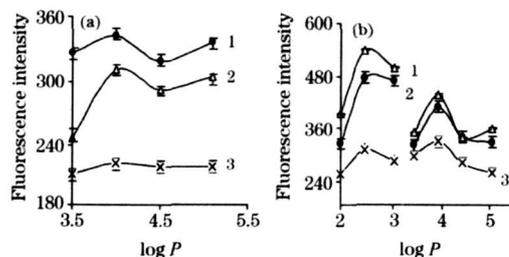


Fig 3 Effect of solvents on the fluorescence intensity of LRI

(a): Spectra recorded in alkanes, 330 nm, 1: CH; 2: MI; 3: No heating; (b): Spectra recorded in phosphate buffer at 350 nm, 1: MI; 2: CH; 3: No heating

各项单因子变化中的荧光光谱变化, 而在溶剂相酶促酯化反应中, 酶催化活性高低会受综合因素的影响。因此在以上实验的基础上, 我们进一步考察了在实际反应后 LRI 的荧光光谱变化。

图 4 为在不同赋能模式下, LRI 催化溶剂相辛酸与丁醇酯化反应 10 min 后反应初速度的变化, 以及 LRI 分别在相应溶剂以及磷酸盐缓冲液中的荧光强度变化。

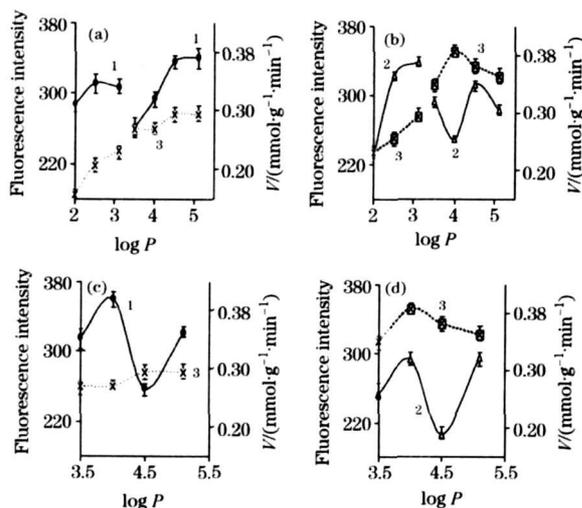


Fig 4 Fluorescence intensity and the initial reaction rate versus $\log P$

(a) and (b): recorded in buffer,

(c) and (d): recorded in alkanes;

1: CH; 2: MI; 3: initial reaction rate

同样, LRI 在不同溶剂酯化反应体系中反应后的荧光发射峰位置及峰形未变, 但荧光发射强度有所变化。而且不难看出, LRI 在不同溶剂中催化酯化反应后的荧光光谱变化与其经相应溶剂处理后的荧光光谱变化基本一致, 表明在低浓度反应体系中, 辛酸和丁醇对酶构象的影响被溶剂效应大大稀释了, 以至于反应体系对酶构象的影响主要表现为溶剂对其的影响。水相 LRI 蛋白质的荧光强度对 $\log P$ 的变化与反应初速度对 $\log P$ 的变化规律接近, 而溶剂相 LRI 蛋白质的荧光强度对 $\log P$ 的变化与反应初速度对 $\log P$ 的变化规律之间基本无共同之处。

3 结 论

微波辐射和常规加热在所有实验条件下均增强 LRI 的荧光光强度而不产生位移。在微波辐射能够提高反应初速度的范围内, 实验条件下没有发生荧光发射峰的位移, 但峰强度均增强。LRI 与有机分子共热后, 微波辐射更有利于 LRI 蛋白质分子在水中的裸露; 在低 $\log P$ 区间, 微波辐射增强

水相 LRI 蛋白质的荧光强度的幅度比高 $\log P$ 区间的大, 常规加热对 LRI 在水相荧光强度的增强比微波辐射大; 而在高 $\log P$ 区间两者的差别缩小。LRI 在具有不同 $\log P$ 溶剂的反应体系中经过常规加热和微波辐射后, 反应体系对酶构象的影响主要表现为溶剂对其的影响。水相 LRI 蛋白质的荧光强度对 $\log P$ 的变化与反应初速度对 $\log P$ 的变化规律接近, 而溶剂相 LRI 蛋白质的荧光强度对 $\log P$ 的变化与反应初速度对 $\log P$ 的变化规律之间基本无共同之处。

参 考 文 献

- [1] Vanita D Sood, David Baker. Journal of Molecular Biology, 2006, 357(3): 917.
- [2] Senthilkumar R, Sharma K Krishna. Journal of Protein Chemistry, 2002, 21(5): 324.
- [3] Yan S L, Liu Y L, Tian X J, et al. Journal of Protein Chemistry, 2003, 22(4): 371.
- [4] ZHANG Qiang, YU AN Jing-ming(张 强, 袁静明). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1998, 18(1): 30.
- [5] YANG Yu-hong, SHAO Zheng-zhong, CHEN Xin(杨宇红, 邵正中, 陈 新). Journal of the Chinese Chemical Society(化学学报), 2006, 64(16): 1730.
- [6] Zhong K, Wu JH, Wang Z F, et al. Food Chemistry, 2007, 100: 115.
- [7] DENG Yi-bing, YANG Ti-qiang(邓一兵, 杨体强). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(7): 1312.
- [8] Jocelyn A Laurence, Peter W French, Robyn A Lindner, et al. J. Theor. Biol, 2000, 206: 291.
- [9] DENG Hua, SONG Zhan-jun, WANG De-wen, et al(邓 桦, 宋占军, 王德文, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(8): 1437.
- [10] WU Gen-hua, WANG Chun-hua(吴根华, 汪春华). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(2): 246.
- [11] Huang W, Xia Y M, Gao H, et al. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2005, 35: 113.
- [12] Laane C, Boeren S, Vos K, et al. Biotechnology and Bioengineering, 1987, 30: 81.

Investigation on Low Power Microwave Irradiation-Assisted Enzymatic Esterification in Organic Solvent by Fluorescence Spectroscopy

MIN Rui¹, FANG Yun¹, XIA Yong-mei^{1,2*}

1. School of Chemical & Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract The authors studied the fluorescence change of immobilized lipase from *Rhizomucor miehei* in the microwave assisted enzymatic esterification of caprylic acid and butanol in organic medium by investigating the fluorescence spectra in solvent or aqueous buffer after incubating the lipase with the solvent, caprylic acid and butanol under microwave irradiation, respectively. A comparison was made with the conventional heated enzymatic esterification in the solvents. Both of the heating modes, the microwave irradiation and conventional heating, can enhance the fluorescence intensity without shifting the emission wavelength of the lipase. In the circumstance that the irradiation can accelerate the esterification, the irradiation can enhance the exposure of the lipase protein molecules in the aqueous environment after incubating the lipase with solvents or the substrates. The effect of the reaction mixture on the fluorescence intensity was dominated by the solvents. The trend of the plot of $\log P$ versus the initial reaction rate was similar to that of $\log P$ versus fluorescence intensity of lipase in aqueous buffer after esterification; but was different from that of $\log P$ versus fluorescence intensity of lipase in organic medium.

Keywords Lipase; Conformation; Microwave; Fluorescence emission spectra; Nonthermal effect; Solvent

(Received Nov. 2, 2007; accepted Feb. 6, 2008)

* Corresponding author