

# 金属离子对青霉葡萄糖氧化酶的效应研究

张茜<sup>1</sup>, 闫冰<sup>2</sup>, 康劲翮<sup>1</sup>, 王勤<sup>1</sup>, 石艳<sup>1</sup>, 陈清西<sup>1\*</sup>

(1. 厦门大学 生命科学学院, 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 厦门大学附属第一医院, 福建 厦门 361004)

**摘要:** 研究了多种金属离子对青霉 (*Penicillium amagasakiense*) 葡萄糖氧化酶 (简称 GOD, EC. 1. 1. 3. 4) 活力的影响。金属离子对酶活力的影响表明:  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  等对酶活力基本没有影响;  $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  对酶有一定的激活作用;  $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  等对该酶活力有不同程度的抑制作用。其中  $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  对酶的抑制作用较强, 随着抑制剂浓度增大, 酶活力呈指数下降, 导致酶活力下降 50% 的抑制浓度为 0.08、10.0 和 31.25  $\mu\text{mol/L}$ 。进一步研究了  $\text{Ag}^+$  的抑制动力学, 结果显示:  $\text{Ag}^+$  对酶的抑制作用为竞争性可逆抑制, 抑制常数 ( $K_i$ ) 为 0.065  $\mu\text{mol/L}$ 。该研究对青霉葡萄糖氧化酶的应用具有一定的参考价值。

**关键词:** 葡萄糖氧化酶; 青霉; 金属离子; 抑制机理

**中图分类号:** TQ 925.4

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0438-0479(2010)03-0396-04

葡萄糖氧化酶 (简称 GOD, EC. 1. 1. 3. 4) 能够在有氧气的条件下专一性催化  $D$ -葡萄糖生成葡萄糖酸和过氧化氢<sup>[1]</sup>。它广泛地分布于动物、植物和微生物体内, 但由于微生物具有生长繁殖速度快, 来源广等特点使之成为葡萄糖氧化酶的主要来源, 微生物中的主要生产菌株为黑曲霉和青霉。GOD 由于其天然无毒、无副作用, 自 20 世纪初被发现以来, 已广泛应用于食品医药、临床化学、分析化学等许多领域<sup>[2]</sup>。在食品工业中, 用于食品脱氧, 改善食品和饮料的品质; 同时还用于面粉的改良工艺等方面<sup>[3]</sup>。在医药工业中, 用于血糖的测定及尿糖、尿酮体的检测, 可制成糖尿试纸或试剂盒用于临床诊断; 还可防止口腔疾病和牙病的发生<sup>[4]</sup>, 有文献报道, 葡萄糖氧化酶抑制法可以用于检测食品中镉、锡、铅的残留量<sup>[5]</sup>。在生物方面, 可制成传感器用于发酵过程中葡萄糖浓度的在线检测, 是生物传感器最主要的工具酶。本文报道了金属离子对青霉葡萄糖氧化酶活性的影响, 为该酶的应用开发提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

青霉菌 (*Penicillium amagasakiense* ATCC

28686) 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心; GOD 是由本实验室从青霉菌重制备而获得的电泳纯酶制剂; 葡萄糖为上海生化试剂厂产品; 辣根过氧化物酶为厦门普京生物技术有限公司产品; 4-氨基安替吡啉为 Bio Basic Inc 产品; 其余化学试剂均为国产分析纯; 其它生化试剂均为国药集团化学试剂有限公司生产。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 酶蛋白浓度的测定

酶浓度测定采用 Folin-酚法<sup>[6]</sup>。

#### 1.2.2 酶活力的测定

葡萄糖氧化酶活力的测定: 参考文献[7]方法, 在 3 mL 的反应体系中, 包含 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0), 16 mmol/L 苯酚及 4 mmol/L Triton X-100, 7.5 mmol/L 的 4-氨基安替吡啉, 0.55 mol/L 葡萄糖溶液及 0.1 mg/mL 辣根过氧化物酶, 震荡混匀, 加入 0.1 mL 葡萄糖氧化酶溶液, 用 Beckman DU-650 型分光光度计, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、 $\lambda = 500 \text{ nm}$  自动记录随时间变化的吸光度值。酶活力单位的定义为: 在上述条件下, 每毫升每分钟催化葡萄糖水解产生 1  $\mu\text{mol}$  产物的酶量。比活力的定义为: 每毫克酶蛋白所具有的酶活力单位数。

#### 1.2.3 金属离子对酶活力作用的测定

采用 1.2.2 酶活力测定方法, 在测活体系中, 加入不同浓度的金属离子, 对照组中不加入金属离子, 测定酶的相对活力, 分析它们对酶活力的影响。实验均重复 3 次, 每次 3 组平行实验。

收稿日期: 2009-11-10

基金项目: 国家科技支撑计划课题 (2007BA107A24)

\* 通讯作者: chenqx@xmu.edu.cn

1.2.4 金属离子对酶活力的抑制动力学测定

采用 1.2.2 酶活力测定方法,固定底物浓度为 0.55 mol/L,在含不同浓度金属离子的测活体系中,研究酶量与酶活力的关系,分析它们对酶的抑制机理.抑制类型的判断是根据改变底物浓度,在含不同浓度金属离子的测活体系中,测定酶活力,通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图法,比较酶催化反应的动力学参数,包括米氏常数 ( $K_m$ ) 和最大反应速度的变化.

2 结 果

2.1 金属离子对酶活力的影响

参考文献[8-9],在测活体系中,加入不同浓度的金属离子,观察各种金属离子对酶活力的影响.结果表明, $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Li^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  等对酶活力基本没有影响, $Al^{3+}$ 、 $Zn^{2+}$  对酶有一定的激活作用(表 1).当浓度分别为 0.6、1.0 mmol/L 时酶活力提高为原来的 115.4% 和 116.9%.  $Cd^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ag^+$ 、 $Hg^{2+}$  等对该酶活力有不同程度的抑制作用,其中, $Cu^{2+}$ 、 $Ag^+$ 、 $Hg^{2+}$  对酶活力有较大的抑制作用.

2.2 金属离子对酶活力的浓度效应

以  $Ag^+$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$  为效应物,研究它们对酶活力的影响,结果(图 1)表明:随着效应物浓度的提高,酶活力逐渐下降,呈现浓度效应.测定导致酶活力下降 50% 的  $Ag^+$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$  效应物浓度 ( $IC_{50}$ ) 分为 0.08、10.0、和 31.25  $\mu\text{mol/L}$ .  $Ag^+$  对该酶的抑制能力明显高于  $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$  的抑制能力.

表 1 金属离子对青霉 GOD 活力的影响

Tab.1 Effects of metal ions on the GOD activity

| 化合 物 (mmol · L <sup>-1</sup> ) | 浓度/ 相对活 力/ %    | 化合 物 (mmol · L <sup>-1</sup> ) | 浓度/ 相对活 力/ %      |
|--------------------------------|-----------------|--------------------------------|-------------------|
| 对照                             | 100.0           | 对照                             | 100.0             |
| AlCl <sub>3</sub>              | 0.3 109.4 ±2.2  | CoCl <sub>2</sub>              | 10.0 80.3 ±2.3    |
|                                | 0.6 115.4 ±2.5  | CuCl <sub>2</sub>              | 0.01 51.0 ±2.4    |
| ZnCl <sub>2</sub>              | 0.5 107.4 ±1.6  |                                | 0.05 5.9 ±1.6     |
|                                | 1.0 116.9 ±2.5  |                                | 0.10 4.8 ±2.3     |
| CdCl <sub>2</sub>              | 1.0 89.1 ±1.3   | AgCl                           | 0.00003 78.3 ±2.1 |
|                                | 2.0 74.8 ±1.6   |                                | 0.00010 36.2 ±1.7 |
| BaCl <sub>2</sub>              | 5.0 85.4 ±2.3   |                                | 0.00030 16.9 ±1.5 |
|                                | 10.0 80.3 ±1.8  | HgCl <sub>2</sub>              | 0.00625 80.0 ±1.4 |
| MgCl <sub>2</sub>              | 50.0 72.8 ±1.6  |                                | 0.02500 56.8 ±1.6 |
|                                | 100.0 59.3 ±1.7 |                                | 0.06875 32.5 ±2.4 |

2.3  $Ag^+$  对酶抑制作用机理的判断

分别在含不同浓度  $Ag^+$  的测活体系中,固定底物浓度为 0.55 mmol/L,改变酶的加入量,测定不同浓度  $Ag^+$  对青霉 GOD 催化葡萄糖的催化活力影响.以效应物作用后的剩余酶活力对加入酶量作图,得到一组通过原点的直线(图 2),随着效应物浓度的增大,直线的斜率降低.此结果说明  $Ag^+$  对酶的抑制作用属于可逆过程,增加  $Ag^+$  导致酶活力下降是由于酶活力受到抑制,催化效率降低,而不是通过减少有效的酶量引

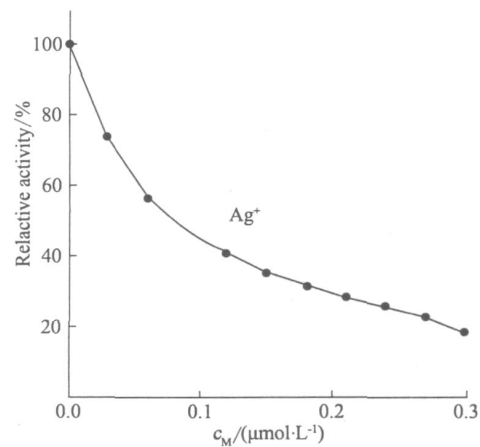
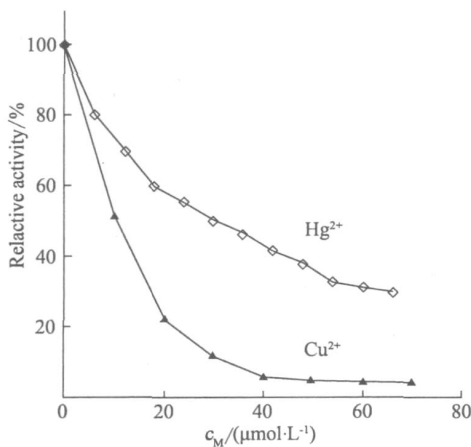


图 1  $Ag^+$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  对青霉 GOD 催化活力的影响

Fig.1 Effects of  $Ag^+$ 、 $Hg^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  on the activity of GOD

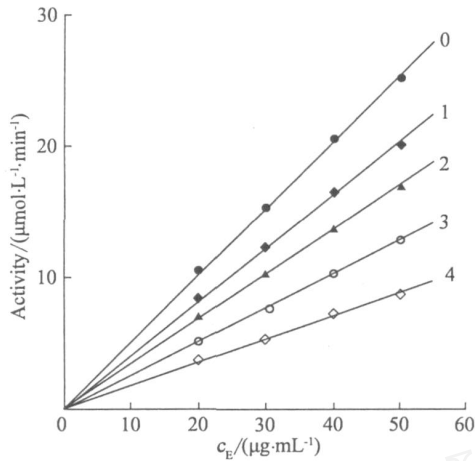


图2 在不同  $Ag^+$  浓度下酶活力和酶量的关系  
曲线 0~4 分别代表  $Ag^+$  的浓度为 0、0.03、0.06、  
0.09、0.12  $\mu\text{mol/L}$

Fig.2 Effects of GOD concentration on its activity for the hydrolysis of glucose at different concentrations of  $Ag^+$

起酶活力的下降。

### 2.4 $Ag^+$ 对酶的抑制作用类型及抑制常数的测定

在测活体系中,固定加入的酶量,改变底物浓度,测定不同浓度  $Ag^+$  对酶活力的影响,以 Lineweaver-Burk 双倒数作图,判断  $Ag^+$  的抑制类型,结果见图 3。由图可见, Lineweaver-Burk 双倒数作图得到一组相交于纵轴的直线(图 3A),说明  $Ag^+$  对酶的抑制作用属竞争性类型。 $Ag^+$  和底物(S)竞争游离酶(E)的结合

部位,但不能和结合酶(ES)结合。以不同  $Ag^+$  浓度下的表观米氏常数 ( $K_{mapp}$ ) 对  $Ag^+$  浓度作图为直线(图 3B),从横轴的截距可求出其抑制常数 ( $K_i$ ) 为 0.065  $\mu\text{mol/L}$ 。

### 3 讨论

不同金属离子对酶活力的影响不同,它们对酶的结构和功能所起的作用也不相同。酶和金属离子的关系有 3 种情况:1)金属离子与酶蛋白紧密结合,在酶的分离合过程中不相分离,作为酶的组成部分;2)金属离子与酶蛋白松散结合,纯化的酶中往往不含这类金属离子,但当加入这些离子后酶活力大大提高,这一类称为酶的金属离子激活剂;3)金属离子可抑制酶的活力,称为酶的金属离子抑制剂<sup>[10]</sup>。

本实验较为系统地研究了常见金属离子对尼崎青霉 GOD 活力的影响及其抑制机理,结果表明: $Li^+$ 、 $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  对酶活力没有影响; $Al^{3+}$  和  $Zn^{2+}$  对该酶有轻微的激活作用; $Ba^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  对酶有轻微抑制作用,而  $Cu^{2+}$ 、 $Ag^+$ 、 $Hg^{2+}$  对酶均具有强烈的抑制作用,其  $IC_{50}$  分别为:10、0.08 和 31.25  $\mu\text{mol/L}$ 。抑制动力学研究结果表明, $Ag^+$  对该酶的抑制机理表现为可逆竞争性抑制,说明  $Ag^+$  不影响最大反应速度( $V_m$ ),只影响米氏常数 ( $K_m$ )。它与底物(S)竞争游离酶(E)的结合部位,但不能和结合酶(ES)结合。故可以通过增加底物浓度而克服  $Ag^+$  对酶的竞争

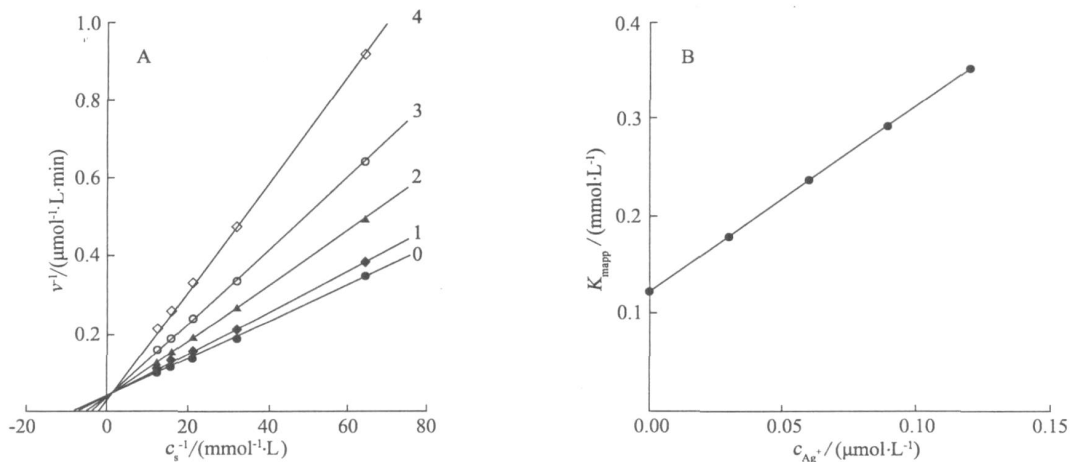


图3  $Ag^+$  对青霉 GOD 的抑制类型  
曲线 0~4 分别代表  $Ag^+$  的浓度为 0、0.03、0.06、0.09、0.12  $\mu\text{mol/L}$

Fig.3 Lineweaver-Burk plots for the hydrolysis of glucose by the enzyme in different concentrations of  $Ag^+$

性抑制效应.用透析等物理方法可以解除抑制,其抑制常数( $K_I$ )为  $0.065 \mu\text{mol/L}$ .  $\text{Hg}^{2+}$  对酶具有不可逆抑制作用,这可能是重金属离子引起 GOD 变性的原因,该作用不能用透析等物理方法解除.  $\text{Cu}^{2+}$  对来源不同的酶会表现出不同的效应,在本实验中表现为强烈抑制作用,其对 GOD 的抑制机理有待进一步的分析.翟彤宁<sup>[11]</sup>等报道了  $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  等离子对黑曲霉 GOD 催化反应的影响,发现  $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  对此反应体系有较强抑制作用, $\text{Al}^{3+}$  有轻度激活作用, $\text{Cu}^{2+}$  基本无影响.他的结论除  $\text{Cu}^{2+}$  对该酶的抑制作用相反之外,其余的与本实验结果基本相同.总之,不同金属离子对酶的影响不同,同种金属离子对于不同来源的同类酶也可能有不同的作用效果.

GOD 广泛地分布于动物、植物和微生物体内.它能够在有氧气的条件下专一性催化  $-D$ -葡萄糖生成葡萄糖酸和过氧化氢.本文研究了金属离子对 GOD 催化动力学的影响,对 GOD 的生产与测活方法、催化机理及功能研究具有重要的指导意义.

#### 参考文献:

- [1] 张树政. 酶制剂工业[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [2] Bankar S B, Bule M V, Singhal R S, et al. Glucose oxidase: an overview [J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27: 489-501.
- [3] 王树庆,刘秀华. 葡萄糖氧化酶及其在食品工业上的应用[J]. *食品科技*, 2001, 6(3): 30-31.
- [4] 张捷. 糖尿病的实验室检测项目及评价[J]. *齐鲁医学检验*, 2005, 16(2): 2-3.
- [5] 刘京萍,李金,葛兴. 葡萄糖氧化酶抑制法检测食品中镉、锡、铅的残留[J]. *北京农学院学报*, 2007, 22(4): 59-62.
- [6] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 265-275.
- [7] 张茜,傅婉辉,康劲翮,等. 葡萄糖氧化酶的分离纯化及性质研究[J]. *厦门大学学报:自然科学版*, 2009, 48(1): 99-102.
- [8] 杜娟,安刚,谢晓兰,等. 养殖常用抗菌药物对凡纳滨对虾外壳  $N$ -乙酰- $-D$ -氨基葡萄糖苷酶活力的影响[J]. *厦门大学学报:自然科学版*, 2008, 47(6): 883-886.
- [9] 林建城,王悦,谢晓兰,等. 金属离子对凡纳对虾  $N$ -乙酰- $-D$ -氨基葡萄糖苷酶活力的影响[J]. *台湾海峡*, 2005, 24(1): 78-82.
- [10] Suckling C J. *Enzyme chemistry: impact and application* [M]. London: Chapman and Hall Press, 1984.
- [11] 翟彤宁,胡长英,王洁,等. 金属离子对葡萄糖氧化酶活性测定的影响[J]. *河北省科学学报*, 1997, 17(4): 11-14.

## Effects of Metal Ions on the Activity of GOD from *Penicillium amagasakiense*

ZHANG Qian<sup>1</sup>, YAN Bing<sup>2</sup>, KANG Jing-he<sup>1</sup>, WANG Qin<sup>1</sup>,  
SHI Yan<sup>1</sup>, CHEN Qing-xi<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, China)

**Abstract:** Effects of metal ions on the activity of GOD from *Penicillium amagasakiense* were studied. The results showed that  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  effected lightly on the enzyme activity, while  $\text{Al}^{3+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  enhanced the enzyme activity lightly.  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  inhibited the enzyme activity.  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$  inhibited it obviously. They were potential potent inhibitor, and the inhibitor s concentration leading to 50 % of enzyme activity lost ( $IC_{50}$ ) for  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$  were estimated to be 0.08, 10.0 and 31.25  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. The inhibitory kinetics and mechanism of  $\text{Ag}^+$  on the enzyme were studied. It showed that the inhibition of  $\text{Ag}^+$  to GOD was reversible and competitive. The inhibition constant ( $K_I$ ) was determined to be 0.065  $\mu\text{mol/L}$ . The data from this study can be useful to the application of GOD.

**Key words:** glucose oxidase; *penicillium amagasakiense*; metal ion; inhibition