

氯离子和溶氧对苯丙氨酸解氨酶的失活作用*

李清彪** 由英才 陶雪 何炳林***

(南开大学高分子化学研究所, 天津 300071)

关键词 苯丙氨酸解氨酶、失活、苯丙氨酸、氯离子、溶氧

由肉桂酸和氨酶法合成 L-苯丙氨酸(L-Phe)的反应是热力学上不利的。因为当苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL)被用在具有高 pH, 高氨和相对高的肉桂酸浓度的环境中被认为引起 PAL 的快速失活^[1]。通过转化反应实验, 证明氯离子和溶氧的存在是 PAL 真正失活的因素。

1 实验材料与方法

菌种: 所用的菌株为 NCO6, 是粘红酵母属(*R. glutinis*), 它是在南开大学生物系的粘红酵母 1001-20-6R 的基础上经紫外诱变所得到的^[1], 其细胞中含有诱导产生的 PAL, 最适反应条件为 1% 肉桂酸, 4mol/LNH₃, pH10, 30°C。

反应液的配制: 一定量的肉桂酸, 一定量的氨, 由盐酸或硫酸调整溶液的 pH 值。

细胞中酶反应性能的测定方法: 取 0.5g 左右的湿细胞, 加入 5ml 反应液, 迅速搅匀, 并放入水浴振荡器中, 在一定速度下振荡反应 4h 后, 取出反应管, 在冰浴中冷却后, 3000 r/min 离心 15min, 收集上清液, 剩下的细胞加入 pH6—7 的缓冲液洗涤、离心后, 再加入反应液进行下一次的反应, 如此下去。测上清液的组成, 计算出酶的活力可比较含 PAL 细胞的活力稳定性。酶活力定义为每小时每克湿细胞重所能转化的肉桂酸的毫克数。用于比较的实验都使用同一批培养出的细胞。酶活力的测定都是在最适反应条件下进行的。

溶氧的排除: 把酶加入反应液后, 把整个溶液保持在冰水浴中并通入 N₂ 约 20min, 密封反应体系使之与空气隔离后, 放入水浴中进行反应。

分析方法: 肉桂酸浓度通过测定紫外波长 278nm 处的吸光度而得到^[2]。

2 实验结果与讨论

2.1 反应液中无 Cl⁻ 存在时, PAL 的失活情况

配制反应液时, 常用 HCl 来调 pH 值。溶液中 Cl⁻ 对于 SPA10 酵母中的 PAL 有失活作用^[2], 那么对于 NCO6 细胞中的 PAL 呢? 为此我们测定了分别用 HCl 和 H₂SO₄ 调 pH 值的反应

1993-05-03 收稿, 1994-02-08 收修改稿。

* 天津市自然科学基金资助项目。

** 现在厦门大学化工系, 厦门 361885。

*** 通讯联系人。

1) 邢文革, 含苯丙氨酸解氨酶酵母细胞菌种的筛选与诱变, 南开大学, 硕士论文, 1991。

溶液中酶反应的失活情况。表 1 给出的结果表明了反应溶液中的 Cl^- 是 NCO6 细胞中 PAL 的一个明显的失活因素。因此在细胞的培养、保存和使用过程中应避免有 Cl^- 的参与。

表 1 反应液中有无 Cl^- 和有无溶氧时,酶的反应情况(4h/批)

反应批数	酶活(mg 肉桂酸/h · g 湿细胞)			
	有 Cl^-	无 Cl^- (有 SO_4^{2-})	不排 O_2	排 O_2 (通 N_2)
1	10.12	9.85	14.12	12.04
2	6.71	12.11	18.54	24.36
3	3.80	12.26	7.50	20.77
4	1.77	11.42	3.89	22.56
5	0.42	9.84	2.83	20.79
6		9.66		18.30
7		8.64		12.61
8		7.70		13.87
		6.96		9.62
		6.40		8.20
		5.95		7.10
		5.22		7.91
		4.14		2.43
		2.69		2.02

2.2 反应液中的溶氧存在时, PAL 的失活情况

许多酶容易被氧化而变性最终失活^[3]。在含 PAL 细胞的培养中, Evans 等^[3]发现, 早期的通 O_2 增加细胞的产量, 而当细胞增殖到一定程度时, O_2 的存在会引起酶量的减少及活力的下降, 因此后期的培养宜用 N_2 保护。NCO6 菌体也可能有这个问题, 由于条件的限制在细胞的培养中没有进行这方面的探索, 因此, 我们决定在 PAL 的使用中进行溶氧排除处理。表 1 中给出了反应液通 N_2 与不通 N_2 时 PAL 的反应情况。由表中的数据可看出, 通过 N_2 处理使得酶活稳定性得到了提高, 而且活力绝对值也增大了, 说明溶液中存在的 O_2 哪怕是自然的溶解量也导致了酶在使用过程中的快速失活。注意到表 1 中排 O_2 的活力下降较大的都是在加缓冲液过夜保存后发生的(一天连续做两批), 如果在整个反应过程中进行排 O_2 并在每批实验完成后的离心、洗涤、称量和加缓冲液过夜保存时都用 N_2 保护, 那么 PAL 的活力稳定性会更好。

2.3 细胞中的蛋白酶是否引起 PAL 的失活

用于反应的是含有 PAL 的酵母细胞, 细胞中的蛋白酶可能引起 PAL 的分解从而使细胞的酶活力下降, 为了研究这个问题我们设计了这样实验: 把含酶细胞放入 pH10 的硼砂 -NaOH 缓冲溶液中, 在与反应相同的温度和摇速下分别摇荡 4h 和 8h, 然后离心去除上清液, 再分别加入反应液测 PAL 的活力, 结果见表 2。由表中数据可知, 没有明显的证据表明有蛋白酶的失活作用, 因为如果主要是蛋白酶使 PAL 失活的话, 那么从蛋白酶作用的时间相同来考虑, 预摇荡 4h 后的细胞的第一批反应的酶活力应与没有预摇荡的细胞的第二批反应的酶活力相当, 而预摇荡 8h 后的细胞的第一批反应的酶活力应与没有预摇荡的细胞的第三批反应和预摇荡 4h 后的细胞的第二批反应酶活力相当, 但实验结果并非如此, 而是三组数据的前三行基本相当。预摇荡处理的两种情况中前两批反应的酶活力差别较大, 可能是预处理增加了细胞的

通透性,当加入反应液时,各种因素与 PAL 的接触更容易,初活性更高,失活也更快.或许 PAL 蛋白酶的作用要在体系中有 NH_3 和肉桂酸时才起作用.如果能用纯的 PAL 和含 PAL 细胞的反应特性进行比较,可能得到更有说服力的结论.

表 2 预振荡处理与否的 PAL 的反应批数(4h/批)

反应批数	酶活 (mg 肉桂酸/h · g 湿细胞)		
	没有振荡预处理	预振荡 4h	预振荡 8h
1	15.87	18.26	16.78
2	11.03	8.00	8.43
3	4.36	4.04	4.35
4	2.11		
5	0.81		

2.4 PAL 的活性损失是否由酶的泄漏而引起的

用不含肉桂酸的溶液(4mol/L NH_3 , pH10)处理含 PAL 细胞时, PAL 活力快速降低^[1]的原因是否会由于酶跑到上清液中呢? 如果是, 上清液中的酶量应能反应掉足够量的肉桂酸, 为此我们取出一定量的上清液按 1:1 的体积比加入 8mol/L NH_3 , 2% 肉桂酸的反应液, 在同前的反应条件下反应 4h 后, 测溶液中的肉桂酸浓度, 结果表明溶液中没有任何肉桂酸的转化, 说明了上清液中没有有活力的 PAL 存在, 因此 PAL 的失活不是由于酶从细胞中泄漏引起的. 事实上这从表 1 的数据也能够有一个说明.

3 结 论

- (1) 反应溶液中存在的 Cl^- 引起反应条件下 PAL 的快速失活.
- (2) 反应溶液中存在的溶氧引起反应条件下 PAL 的快速失活.
- (3) 没有明显的证据表明 PAL 的快速失活是由于细胞中的蛋白酶所引起的.
- (4) 反应过程中含 PAL 细胞活力的下降不是由于酶从细胞中的泄漏引起的.

参 考 文 献

- [1] 李清彪、陶 雪、由英才等, 中国博士后首届学术大会论文集(下册), 国防工业出版社, 北京, 1993, 1504.
- [2] Evans, C. T., Conrad, D., Hanna, K. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1987, 25: 399.
- [3] 金长振, 酶学的理论与实际, 北京科技出版社, 北京, 1989.