

• 研究简报 •

直链醇对反胶束体系中木素过氧化物酶催化活性的影响

张文娟^a 王丹^a 黄锡荣^{*,a,b} 曲音波^b 高培基^b

(^a 山东大学胶体与界面化学教育部重点实验室 ^b 微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要 根据研究发现,在有醇作助表面活性剂的 CTAB 反胶束中木素过氧化物酶(LiP)不能表现活力,而在水介质中 CTAB 对 LiP 的催化活性影响又不是很大.为了揭示其中醇的影响,本工作就不同碳链长度的醇对 LiP 酶催化性能的影响进行了研究.由于 CTAB 反胶束体系中醇浓度较高,且碳原子数大于 4 的直链醇在水中的溶解度又很小,为此采用了 LiP 可在其中显示催化活性的 CTAB 正胶束、AOT 反胶束和 Brij30 反胶束作介质,通过研究这些介质中不同链长的醇对 LiP 催化活力的影响,来探讨 CTAB 反胶束中木素过氧化物酶(LiP)不能表现活力的原因.结果表明,不管表面活性剂聚集体的结构、电性质及反胶束大小如何,只要醇的浓度超过 500 mmol·L⁻¹ (丁醇 ≥ 1200 mmol·L⁻¹),LiP 在上述原本可显示活力的介质中均无催化活性.据此推测 CTAB 反胶束中木素过氧化物酶(LiP)不能表现活力的原因主要是由助表面活性剂醇造成的.

关键词 木素过氧化物酶(LiP); 直链醇; 反胶束; 催化活性

Effects of Normal Alcohols on the Catalytic Activity of Lignin Peroxidase in Reversed Micelles

ZHANG, Wen-Juan^a WANG, Dan^a HUANG, Xi-Rong^{*,a,b}

QU, Yin-Bo^b GAO, Pei-Ji^b

(^a Key Laboratory of Colloid and Interface Chemistry of the Ministry of Education of China, ^b State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract Previous studies indicated that lignin peroxidase (LiP) hosted at CTAB/*n*-alcohol/isooctane/water reversed micelle did not show any catalytic activity, but in normal micellar solution of CTAB, LiP could express its catalytic activity. To reveal the role of normal alcohol, the effects of the alcohol with different carbon chain length on the catalytic activity of LiP were investigated. Because the content of the alcohol in the CTAB reversed micellar medium was high and the normal alcohols with the number of carbon atoms higher than 4 were slightly soluble in water, three media in which LiP could express its catalytic activity, *i.e.*, a CTAB normal micellar medium, an AOT reversed micellar medium, and a Brij 30 reversed micellar medium, were used to study the effect of normal alcohols on the catalytic activity of LiP. Results indicated that as long as the concentration of the alcohol exceeded 500 mmol·L⁻¹ (≥ 1200 mmol·L⁻¹ for butanol), LiP lost its activity completely in the three media above regardless of the structure, the electrical property and the size of the surfactant aggregates. Consequently it was deduced that the phenomenon that LiP hosted at CTAB reversed micelles could not express its activity was mainly due to the alcohol co-surfactant.

Keywords lignin peroxidase; normal alcohol; reversed micelle; catalytic activity

* E-mail: xrhuang@sdu.edu.cn

Received January 27, 2005; revised May 7, 2005; accepted July 7, 2005.

国家自然科学基金(No. 30470048)、山东省自然科学基金、山东省优秀中青年科学家奖励基金和山东大学跨学科基金资助项目。

胶束酶学是 20 世纪 80 年代兴起的跨学科交叉研究领域, 主要研究酶在反胶束中的催化性能并探讨其潜在应用^[1-4]. 木素过氧化物酶(LiP)是 1983 年从某些白腐菌(如 *Phanerochaete chrysosporium*)中发现的一种含有血红素的过氧化物酶^[5,6], 在天然高聚物木素和小分子环境污染物的生物降解过程中起着关键性作用^[7-14]. 因此, LiP 的催化性能及机制研究对于充分利用自然资源、保护生态环境、进行水体与土壤的生物修复、实现可持续发展等具有十分重要的意义. 以往对 LiP 的研究多集中于传统的水介质中^[15-17]. 近来, 人们开始研究 LiP 在反胶束介质中的催化性能并探讨其在疏水性芳香污染物降解中的应用潜力^[18]. 我们在研究中发现^[19], 在有醇作助表面活性剂的溴化十六烷基三甲铵(CTAB)反胶束中 LiP 不能表现活力, 而在水介质中高浓度的 CTAB 对 LiP 的催化活性影响又不太大. 为了揭示其中醇的作用, 本文就不同碳链长度的醇对 LiP 酶催化性能的影响进行了研究.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

岛津 UV 240 型紫外可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司)及其恒温附件; HZS-H 型恒温水浴振荡器(哈尔滨东联电子技术开发有限公司).

月桂醇聚氧乙烯醚(Brij 30)、琥珀酸二辛酯磺酸钠(AOT)购自 Sigma 公司; 藜芦醇(VA)购自 Fluka 公司, 溴化十六烷基三甲铵(CTAB)、 H_2O_2 、异辛烷、环己烷、柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸氢二钠、丁醇、戊醇、己醇、辛醇、正十二醇等均为国产分析纯试剂, 水为三蒸水.

1.2 反胶束的配制

在小锥形瓶中加入一定体积的异辛烷或环己烷, 按所需表面活性剂浓度称取一定质量的某表面活性剂于锥形瓶中, 再加入一定体积某 pH 缓冲液(缓冲液的体积等于按给定水与表面活性剂摩尔比(ω_0)计算所得的总水体积减去酶液和用于引发酶促反应所需的 H_2O_2 水溶液体积), CTAB 体系还需要加入一定量的短碳链醇作助表面活性剂, 振荡片刻, 即形成澄清、透明的反胶束体系.

1.3 木素过氧化物酶(LiP)的制备

产木素过氧化物酶的菌种、培养条件及其酶的分离纯化同文献[20].

1.4 实验过程

直接称取一定量的底物藜芦醇(VA)溶于上述反胶束体系中, 再依据所需浓度加入一定量的直链醇(文中物质浓度都是基于反胶束总体积的值), 摇匀后, 取一

定体积于石英比色皿中, 加入一定体积 LiP 酶液并摇匀, 在某温度下预热 2 min 后, 以 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 溶液引发, 在分光光度计上记录 310 nm 处吸光度(A)随时间(t)变化的曲线.

2 结果与讨论

藜芦醇是木素过氧化物酶的最适底物, 文中所示 LiP 的催化活力均为其在过氧化氢存在下对 VA 的氧化初速率. VA 的氧化产物为藜芦醛, 它在 310 nm 处有较强的光吸收.

以往研究中, 我们对常见的不同类型的表面活性剂形成的胶束和反胶束中木素过氧化物酶(LiP)的催化性能进行了较为深入系统的研究, 发现 LiP 的催化活力不仅与表面活性剂的类型有关, 还与表面活性剂聚集体结构有关(另文报道). 在水介质中 CTAB 对 LiP 的催化活性影响不是很大, 然而在 CTAB/醇/异辛烷/水反胶束中 LiP 却表现不出活力. 我们曾尝试改变体系的 ω_0 , 水相 pH, CTAB 浓度和醇的种类($n=4, 5, 6, 8, 12, n$ 为直链醇的链长), 结果均未发现 LiP 在其中有明显活力.

为了揭示其中醇的影响(CTAB 必须在有助表面活性剂的条件下才能形成反胶束, 短碳链的醇是常用的一类助表面活性剂), 本文就不同碳链长度的醇对 LiP 酶催化性能的影响进行了研究. 由于 CTAB 反胶束体系中醇浓度较高, 且碳原子数大于 4 的直链醇在水中的溶解度又很小, 为此采用了 LiP 可在其中显示催化活力的 CTAB 正胶束、AOT 反胶束和 Brij30 反胶束作介质, 通过研究这些介质中不同链长的醇对 LiP 催化活力的影响, 来探讨 CTAB 反胶束中木素过氧化物酶(LiP)不能表现活力的原因.

表 1 和表 2 给出了在 CTAB 正胶束和 AOT 反胶束中不同链长和浓度醇存在下 LiP 的催化活力. 由表 1, 2 可见, 无论是在 CTAB 正胶束还是 AOT 反胶束中, 低浓度的醇对 LiP 都表现出一定的激活作用, 而高浓度的醇对 LiP 却都表现出一定的抑制作用. 在 CTAB 正胶束中由于醇溶解度的限制, 没有得到使 LiP 完全失活的醇浓度. 在 AOT 反胶束中除丁醇外(需超过 $1200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 其余醇都在 $500 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下便可使 LiP 酶完全丧失活力. 由于形成澄清、透明的 CTAB 反胶束所需助表面活性剂醇的浓度通常超过 $500 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 因此, 推测高浓度醇对 LiP 的失活作用是 LiP 在 CTAB 反胶束中不能体现活力的主要原因.

在上述研究中虽考虑了表面活性剂聚集体结构的影响, 但没有考虑表面活性剂电荷及反胶束大小的影响, 为进一步认识直链醇对反胶束体系中木素过氧化物

表 1 CTAB 正胶束中醇对 LiP 催化活力的影响**Table 1** Effects of alcohols on the catalytic activity of LiP in CTAB normal micellar medium

醇浓度/ (mmol·L ⁻¹)	$v_0/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$				
	丁醇	戊醇	己醇	辛醇	十二醇
0	98.62	98.62	98.62	98.62	98.62
0.1	115.6	125.4	107.8	104.2	101.9
1	104.4	114.5	106.1	100.0	—
10	102.5	104.7	94.65	91.96	—
100	79.08	80.09	— ^a	—	—
500	14.30	—	—	—	—

实验条件: [CTAB]=1 mmol·L⁻¹; [VA]=5 mmol·L⁻¹; [H₂O₂]=0.4 mmol·L⁻¹; LiP 10 μL; pH=3.4; T=30 °C. ^a体系混浊无法测定.

表 2 AOT 反胶束中醇对 LiP 催化活力的影响**Table 2** Effects of alcohols on the catalytic activity of LiP in AOT reversed micellar medium

醇浓度/ (mmol·L ⁻¹)	$v_0/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$				
	丁醇	戊醇	己醇	辛醇	十二醇
0	3.706	3.706	3.706	3.706	3.706
0.1	4.552	4.444	4.552	4.247	3.814
1	4.373	4.322	4.158	3.996	3.297
10	4.301	3.835	3.942	3.871	3.548
100	4.068	3.283	3.082	2.849	2.115
200		2.580	2.903	1.183	0
300		1.828	0	0	
400		1.559			
500	2.079	0			
1000	1.900				
1200	0				

实验条件: 异辛烷 2.8 mL; [AOT]=200 mmol·L⁻¹; $\omega_0=11.2$; pH=3.8; [VA]=10 mmol·L⁻¹; LiP 20 μL; 10 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 20 μL; T=30 °C.

酶催化活性的影响, 以戊醇为代表, 本文还研究了由 Brij30 构成的不同大小的非离子反胶束($\omega_0=3, 4$ 和 10) 中, 不同浓度的戊醇对 LiP 酶活力的影响, 结果见表 3.

由表 3 可见, 在 $\omega_0=10$ 的 Brij30 反胶束中, 500 mmol·L⁻¹ 的戊醇便可使 LiP 酶活力完全丧失; 即高浓度直链醇对木素过氧化物酶有失活作用. 这一结果进一步支持了前述关于“高浓度直链醇对木素过氧化物酶的失活作用是 LiP 在 CTAB 反胶束中不能体现活力的主要原因”的推论. 从表 3 还可以看出, 不同含水量下 LiP 催化活力随戊醇含量变化的趋势都表现为先下降后上升再下降. 这一点与在 CTAB 正胶束和 AOT 反胶束中观测到的现象有所不同. 由表 1 和表 2 可见, 不同链长的醇对 LiP 的影响都表现为先升后降; 低浓度的醇对 LiP 有一定的激活作用, 且醇的激活作用随碳链长度的增加逐渐减小. 这很可能与表面活性剂电性质、头基大小及醇在聚集体结构中的定位有关.

表 3 戊醇对 Brij30 反胶束中 LiP 催化活力的影响**Table 3** Effects of pentanol on the catalytic activity of LiP in Brij30 reversed micellar medium

戊醇浓度/ (mmol·L ⁻¹)	$v_0/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$		
	$\omega_0=3$	$\omega_0=4$	$\omega_0=10$
0	0	0.520	1.487
0.1	0	0.376	1.362
1	0	0.466	1.434
10	0	0.520	1.613
100	0	0.538	1.935
200	—	— ^a	1.523
500			0

实验条件: 环己烷 2.8 mL; [Brij30]=600 mmol·L⁻¹; pH=2.2; [VA]=10 mmol·L⁻¹; LiP 20 μL; 10 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 20 μL; T=20 °C. ^a体系混浊无法测定.

对离子型表面活性剂形成的胶束, 少量醇的加入(主要增溶在表面活性剂膜相中), 不但降低了表面活性剂头基间的相互作用, 也降低了头基与酶蛋白表面的相互作用. 水介质中表面活性剂对 LiP 催化活力影响研究表明^[19], CTAB 和 AOT 都是 LiP 的抑制剂, 尤其是 AOT, 水介质中很少量的 AOT 便可使 LiP 酶完全丧失活力. 因此, 头基与酶蛋白表面作用的减弱导致 LiP 活力有所回升(LiP 是一类较为特殊的过氧化物酶, 结合位点与催化位点在其蛋白的表面^[18]). 由于长链醇的羟基更接近于表面活性剂膜相的内界面^[21], 故相同醇浓度下, 随着醇碳链的增加, 醇与 LiP 的相互作用(失活)加大, 从而表现出低浓度下长碳链醇的表现激活作用要小一点. 水介质中, 非离子表面活性剂对 LiP 酶活力的影响总体来说不大(少量的 Brij30 对 LiP 还有点激活作用). 对 Brij30 反胶束, 在给定水含量下, 少量戊醇的加入降低了 Brij30 与 LiP 间的氢键(稳定)作用, 从而表现出 LiP 活力有所降低. 由于戊醇羟基主要落在 Brij30 分子的亲水部分与疏水部分连接区域, 继续少量增加戊醇导致了 Brij30 反胶束界面曲率增大, 从而降低了醇与酶蛋白接触机会, 故酶活力又有所回升. 上述理由也可以用来解释不同含水量下戊醇对 LiP 活力的影响. 相同戊醇浓度下, ω_0 越大, 界面曲率越小, 戊醇头基越容易与酶蛋白接触使酶失活.

3 结论

不同表面活性剂聚集体结构中不同链长浓度的醇对 LiP 酶催化活力的影响研究表明, 不管表面活性剂聚集体的结构、电性质及反胶束大小如何, 只要醇的浓度超过 500 mmol·L⁻¹ (丁醇 ≥ 1200 mmol·L⁻¹), LiP 在上述原本可显示活力的介质中均无催化活性. 据此推测

CTAB 反胶束中 LiP 不能表现活力的原因主要是由助表面活性剂醇造成的。

References

- 1 Martinek, K.; Levashov, A. V.; Khmelnsky, Y. L.; Klyachko, N. L.; Berezin, I. V. *Science* **1982**, *218*(4575), 889.
- 2 Martinek, K.; Klyachko, N. L.; Kabanov, A. V.; Khmelnsky, Y. L.; Levashov, A. V. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *981*(2), 161.
- 3 Luisi, P. L. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*(6), 439.
- 4 Luisi, P. L.; Giomini, M.; Pileni, M. P.; Robinson, B. H. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *947*(1), 209.
- 5 Tien, M.; Kirk, T. K. *Science* **1983**, *221*, 661.
- 6 Glenn, J. K.; Morgan, M. A.; Mayfield, M. B.; Kuwahara, M.; Gold, M. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *114*, 1077.
- 7 ten Have, R.; Teunissen, P. J. M. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3397.
- 8 Bumpus, J. A.; Tien, M.; Wright, D.; Aust, S. D. *Science* **1985**, *228*, 1434.
- 9 Barr, D. P.; Aust, S. D. *Environ. Sci. Technol.* **1994**, *28*(2), 78A.
- 10 Wesenberg, D.; Kyriakides, I.; Agathos, S. N. *Biotechnol. Adv.* **2003**, *22*, 161.
- 11 Joshi, D. K.; Gold, M. H. *Biochemistry* **1994**, *33*(36), 10969.
- 12 Vijay, G.; Reddy, B.; Gold, M. H. *Microbiology* **2000**, *146*, 405.
- 13 Ruttimann-Johnson, C.; Lamar, R. T. *Microbiology* **1996**, *62*(10), 3890.
- 14 Valli, K.; Wariishi, H.; Gold, M. H. *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 2131.
- 15 Tien, M.; Kirk, T. K.; Bull, C.; Fee, J. A. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*(4), 1687.
- 16 Khindaria, A.; Grover, T. A.; Aust, S. D. *Biochemistry* **1995**, *34*(18), 6020.
- 17 Huang, X.; Wang, D.; Liu, C.; Hu, M.; Qu, Y.; Gao, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *311*, 491.
- 18 Kimura, M.; Michizoe, J.; Oakazaki, S.; Furusaki, S.; Goto, M.; Tanaka, H.; Wariishi, H. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *88*(4), 495.
- 19 Wang, D. *M.S. Thesis*, Shandong University, Ji'nan, **2004** (in Chinese).
(王丹, 硕士论文, 山东大学, 济南, **2004**.)
- 20 Huang, X.-R.; Lu, X.-M.; Song, S.-F.; Sun, D.-J.; Qu, Y.-B.; Gao, P.-J. *Acta Chim. Sinica* **2001**, *59*, 1583 (in Chinese).
(黄锡荣, 卢雪梅, 宋少芳, 孙德军, 曲音波, 高培基, 化学学报, **2001**, *59*, 1583.)
- 21 Nazario, L. M. M.; Alan Hatton, T.; Crespo, J. P. S. G. *Langmuir* **1996**, *12*, 6326.

(A0501276 SHEN, H.; DONG, H. Z.)