

离子液体的组成及溶剂性质与木瓜蛋白酶催化特性的关系

姜文勇, 宗敏华

(华南理工大学轻工与食品学院应用生物催化研究室, 广州 510640)

摘要 离子液体的组成及溶剂性质对木瓜蛋白酶催化 *D,L*-对羟基苯甘氨酸甲酯不对称水解反应有重要的影响. 木瓜蛋白酶在含 $C_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$ ($n = 2 \sim 6$) 介质中表现出较高的活性、对映体选择性及稳定性, 而在含有 $C_4\text{MIm} \cdot \text{HSO}_4$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{Cl}$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{NO}_3$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{CH}_3\text{COO}$ 的介质中表现较低的对映体. 在含有 $C_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$ ($n = 2 \sim 6$) 的介质中, 酶活性随离子液体的极性增大而提高, 但在含有 $C_4\text{MIm} \cdot \text{HSO}_4$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{Cl}$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{NO}_3$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{CH}_3\text{COO}$ 的介质中随离子液体的极性增大反而降低. 木瓜蛋白酶的对映体选择性和稳定性均随着离子液体的疏水性增大而提高. 荧光分析结果表明, 离子液体对酶分子构象具有显著的影响. 在 $C_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$ ($n = 2 \sim 6$) 的介质中, 木瓜蛋白酶的最大荧光发射波长 (λ_{max}) 均蓝移, 而在含有 $C_4\text{MIm} \cdot \text{HSO}_4$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{Cl}$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{NO}_3$ 或 $C_4\text{MIm} \cdot \text{CH}_3\text{COO}$ 的介质中, λ_{max} 均红移. 与 $C_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$ ($n = 2 \sim 6$) 相比, 在 $C_4\text{MIm} \cdot \text{HSO}_4$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{Cl}$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{NO}_3$ 或 $C_4\text{MIm} \cdot \text{CH}_3\text{COO}$ 中, 酶分子构象的变化较大, 暴露的疏水区域较多.

关键词 木瓜蛋白酶; 离子液体; *D,L*-对羟基苯甘氨酸甲酯; 催化特性; 荧光光谱分析

中图分类号 O625; O641; O643 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2007)07-1283-05

“溶剂工程”可调节酶的活性、选择性和稳定性等. 据文献[1]报道, 木瓜蛋白酶在不同的反应介质中呈现出不同的催化特性, 并且适量的离子液体 $C_4\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$ 可明显提高酶的活性、对映体选择性及稳定性. 然而, 离子液体对酶催化特性的影响因各相关因素的不同具有较大的差异^[2-4]. 与有机溶剂相比, 来源于 *Pseudomonas cepacia* 的脂肪酶在 $C_4\text{MIm} \cdot \text{PF}_6$ 中具有较高的转酯活性, 但在 $C_4\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$ 中转酯活性很低^[5]. 来源于 *Candida antarctica* B 的脂肪酶在 $C_4\text{MIm} \cdot \text{lactate}$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{EtSO}_4$ 或 $\text{EtNH}_3 \cdot \text{NO}_3$ 中没有活性^[6], 而在 $C_4\text{MIm} \cdot \text{PF}_6$ 中呈现较高的活性^[7]. 这主要是由于不同组成的离子液体具有不同的性质. 因此, 研究离子液体的性质对各种酶催化特性的影响规律, 对于离子液体的分子设计和合成具有重要的指导意义. 一些常见的离子液体的溶剂参数如极性、疏水性及溶解性等已有报道^[8,9], 但鲜见离子液体的溶剂参数与酶催化特性关系的研究.

由于木瓜蛋白酶促 *D,L*-对羟基苯甘氨酸甲酯 (*D,L*-HPGME) 不对称水解反应在制备抗生素药物的重要侧链对羟基苯甘氨酸中已展示出较大的应用潜力^[10]. 因此, 本文以此为反应模型, 系统地探讨离子液体的组成及溶剂性质与酶的催化活性、选择性及稳定性之间的关系, 并且用荧光光谱法分析含不同离子液体介质中木瓜蛋白酶分子构象的变化.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

木瓜蛋白酶 (1.2 U/mg), 来源于 Papaya latex, 购自 Sigma 公司; *D*-对羟基苯甘氨酸甲酯 (*D*-HPGM)、*L*-对羟基苯甘氨酸甲酯 (*L*-HPGM)、*D*-对羟基苯甘氨酸 (*D*-HPG)、*L*-对羟基苯甘氨酸 (*L*-HPG)、8-苯氨基-1-萘磺酸盐 (ANS), 纯度均为 97% 以上, 购自 Aldrich 公司; *D,L*-对羟基苯甘氨酸

收稿日期: 2006-09-25.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 20406006, 20602013, 20676043) 资助.

联系人简介: 姜文勇 (1975 年出生), 男, 博士, 讲师, 主要从事生物合成与生物转化及酶化工研究. E-mail: wylou@scut.edu.cn

甲酯, 纯度 96% 以上, 由河北辛集泰达石化有限公司赠送; 高氯酸, 色谱纯, 购自天津市科密欧化学试剂开发中心; 离子液体 1-烷基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐 ($C_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$, $n = 2 \sim 6$)、1-丁基-3-甲基咪唑酸式硫酸盐 ($C_4\text{MIm} \cdot \text{HSO}_4$)、1-丁基-3-甲基咪唑盐酸盐 ($C_4\text{MIm} \cdot \text{Cl}$)、1-丁基-3-甲基咪唑硝酸盐 ($C_4\text{MIm} \cdot \text{NO}_3$) 和 1-丁基-3-甲基咪唑醋酸盐 ($C_4\text{MIm} \cdot \text{CH}_3\text{COO}$) 纯度均为 96% 以上, 由华南理工大学化工与能源学院李雪辉副教授赠送. 其它化学试剂均为市售分析纯.

Waters 600 型高效液相色谱 (HPLC) 和 996 PAD 检测器 (美国 Waters 公司), Crownpak CR(+) 手性柱 (4 mm \times 150 mm, 日本 Daicel 公司), 检测波长为 228 nm, 流动相为高氯酸溶液 (11 mmol/L, pH = 2.0), 流速为 0.8 mL/min, 进样量为 20 μL ; F-4500 FL 型荧光分光光度计 (日本 Hitachi 公司), 激发波长为 285 nm (木瓜蛋白酶的内源荧光) 或 380 nm (ANS-木瓜蛋白酶复合物的荧光), 发射波长的范围为 290 ~ 600 nm 或 400 ~ 600 nm, 发射和激发波长的裂缝带宽均为 5 nm, 扫描速度为 1200 nm/min, 电压 700 V.

1.2 含不同离子液体介质中木瓜蛋白酶催化 *D,L*-HPGME 不对称水解反应

在 10 mL 具塞三角瓶中分别加入 4 mL 由离子液体与磷酸缓冲液 (50 mmol/L, pH = 7.0) 组成的混合溶剂和 0.6 mmol *D,L*-HPGME, 在 45 $^{\circ}\text{C}$ 下预热 5 min. 混合均匀后, 加入 600 U 木瓜蛋白酶, 置于水浴恒温振荡器内反应 (45 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min), 0.5 h 后取样 50 μL , 加入 950 μL 体积分数为 0.2% 的甲酸溶液终止反应, 并稀释样品 20 倍, 离心 (12000 r/min) 10 min 后, 取 20 μL 上清液供 HPLC 分析. *D*-HPG, *D*-HPGM, *L*-HPG 及 *L*-HPGM 的保留时间分别为 2.78, 5.23, 9.32 和 25.54 min. 采用外标法, 其重现性好, 平均误差不超过 0.4%.

在不同底物浓度 (10 ~ 75 mmol/L) 或温度 (30 ~ 50 $^{\circ}\text{C}$) 下, 用 HPLC 分别测定木瓜蛋白酶促 *D,L*-HPGME 水解反应的初速度. 根据 Eadie-Hofstee 动力学方程 $v = -K_m \cdot v/c_s + v_{\text{max}}$ 作图 ($v \sim v/c_s$, v 为反应初速度, c_s 为底物浓度), 得到直线的斜率和截距分别为该反应的动力学参数 K_m (米氏常数) 和 v_{max} (最大反应速度); 根据 Arrhenius 方程 $k = k_0 e^{-E_a/(RT)}$ 或 $\ln k = -E_a/(RT) + \ln k_0$ [由于 $k/k_0 = v_0/v_m$, 故 $\lg v_0 = -E_a/(2.303RT) + c$; 式中 k 为反应速度常数; E_a 为活化能 (kJ/mol); R 为气体摩尔常数 (8.314 J \cdot mol $^{-1}$ \cdot K $^{-1}$); T 为绝对温度 (K)], 分别以 $\lg v_0$ 与 $1/T$ 作图, 根据直线的斜率可求出该反应的表现活化能 E_a .

1.3 含不同离子液体介质中木瓜蛋白酶的稳定性

在 10 mL 具塞的三角瓶中分别加入 4 mL 由不同离子液体与磷酸缓冲液组成的混合溶剂和 600 U 木瓜蛋白酶, 于不同温度 (45 和 65 $^{\circ}\text{C}$) 下保温一段时间, 然后用 HPLC 检测木瓜蛋白酶促 *D,L*-HPGME 水解反应的初始速度, 分析木瓜蛋白酶的残留活性, 并用其相对活性 (相对于酶在未保温前的活性) 来表征.

1.4 荧光光谱法分析含不同离子液体介质中木瓜蛋白酶分子构象的变化

在 5 mL 具塞三角瓶中分别装入 2 mL 磷酸缓冲液 (50 mmol/L, pH = 7.0) 或由离子液体与磷酸缓冲液组成的混合溶剂和 2.2 U 木瓜蛋白酶, 混合均匀后, 用荧光分光光度计检测木瓜蛋白酶的内源荧光. 在相同条件下, 检测离子液体的荧光光谱 (空白实验), 扣除含离子液体混合溶剂的荧光可得木瓜蛋白酶的内源荧光.

在 5 mL 具塞三角瓶中分别装入 2 mL 磷酸缓冲液 (50 mmol/L, pH = 7.0) 或由离子液体与磷酸缓冲液组成的混合溶剂、荧光探针剂 ANS 和 0.66 U 木瓜蛋白酶 (ANS 与酶的摩尔比为 100:1), 置于黑暗处, 混合均匀后, 检测 ANS-木瓜蛋白酶的外源荧光. 在相同条件下, 检测离子液体和 ANS 的荧光光谱 (空白实验), 扣除含离子液体混合溶剂和 ANS 的荧光即可得到 ANS-木瓜蛋白酶复合物的荧光.

2 结果与讨论

2.1 离子液体的组成及溶剂性质与木瓜蛋白酶催化活性的关系

离子液体通过与酶、底物及产物的相互作用来影响酶的性质和酶的反应速度, 而这种相互作用与离子液体的阴、阳离子组成及其溶剂性质如极性、疏水性、介电常数及离子强度等密切相关^[11]. 由于

离子液体呈现一定的酸性, 将其加入到缓冲液中可能改变反应体系的 pH 值, 从而影响酶反应。

研究表明, 当 $C_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$ ($n=2 \sim 6$) 体积分数大于 30% 时, 混合溶剂的 pH 值随离子液体浓度的增大而明显降低; 当其体积分数小于 20% 时, pH 值随离子液体浓度增大而变化甚微, 这与文献 [1,10] 报道的结果相符. 当 $C_4\text{MIm} \cdot \text{HSO}_4$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{Cl}$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{NO}_3$ 或 $C_4\text{MIm} \cdot \text{CH}_3\text{COO}$ 体积分数 $\leq 15\%$ 时, 这 4 种离子液体对混合体系的 pH 值影响甚微. 因此, 采用体积分数为 15% 的离子液体/磷酸缓冲液混合溶剂为反应介质, 探讨离子液体的组成及溶剂性质与木瓜蛋白酶催化 D,L -HPGME 水解反应活性的关系(表 1).

Table 1 Effect of various ILs on papain's catalytic activity

Ionic liquid or buffer	Polarity ^[8,9,12]	$v_0/$ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$K_m/$ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$v_{\max}/$ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$E_a/$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
$C_2\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$	0.71	21.2	16 ± 0.1	23.3 ± 0.3	22 ± 0.3
$C_3\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$	0.69	20.1	17 ± 0.1	21.9 ± 0.2	24 ± 0.4
$C_4\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$	0.67	18.8	18 ± 0.1	20.6 ± 0.1	25 ± 0.2
$C_5\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$	0.65	15.4	23 ± 0.2	17.4 ± 0.2	35 ± 0.3
$C_6\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$	0.64	11.9	36 ± 0.3	14.4 ± 0.1	47 ± 0.5
$C_4\text{MIm} \cdot \text{HSO}_4$	0.70	1.1	18 ± 0.1	2.3 ± 0.1	39 ± 0.3
$C_4\text{MIm} \cdot \text{Cl}$	0.68	3.9	19 ± 0.1	5.6 ± 0.1	37 ± 0.2
$C_4\text{MIm} \cdot \text{NO}_3$	0.65	5.1	20 ± 0.2	7.1 ± 0.1	35 ± 0.2
$C_4\text{MIm} \cdot \text{CH}_3\text{COO}$	0.57	8.3	23 ± 0.2	10.5 ± 0.2	34 ± 0.1
Aqueous phosphate buffer		11.4	35 ± 0.4	13.7 ± 0.2	49 ± 0.6

在含有 $C_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$ ($n=2 \sim 6$) 的介质中, 酶反应初速度较快, 且与离子液体的极性密切相关. 随着咪唑基阳离子上的取代烷基碳链长度的减小 (n 值减小), 离子液体的极性越强^[8,9,12], 酶的催化活性越高, 反应速度越快. 这可能是因为底物 D,L -HPGME 的极性相对于产物 L -HPG 略弱, 其在离子液体中的相对溶解度较小, 并且随着离子液体极性的增大而减小. 因此, 底物在极性较高的 $C_2\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$ 中解溶剂化比在极性较低的 $C_6\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$ 中更容易, 有利于底物与酶结合, 提高反应初速度.

与磷酸缓冲液相比, 酶在含 $C_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$ ($n=2 \sim 6$) 的介质中具有明显较高的催化活性. 但是, 在由 $C_4\text{MIm}^+$ 与 HSO_4^- , Cl^- , NO_3^- , CH_3COO^- 组成的离子液体中, 酶催化活性普遍偏低, 且随离子液体的极性增大而降低, 与上述 5 种离子液体对酶催化活性的影响规律恰恰相反. 这可能是因为 $C_4\text{MIm} \cdot \text{HSO}_4$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{Cl}$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{NO}_3$ 或 $C_4\text{MIm} \cdot \text{CH}_3\text{COO}$ 的极性对底物与酶结合的影响并不是引起木瓜蛋白酶催化活性变化的主要原因. 由于这 4 种离子液体中的阴离子均具有很强的氢键碱度和亲核性, 很容易与酶蛋白形成氢键, 破坏酶分子活性构象, 导致酶的活性降低, 并且阴离子的氢键碱度和亲核性越强 ($\text{HSO}_4^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{CH}_3\text{COO}^-$), 越容易与酶形成氢键, 导致酶的活性越低^[9,13].

综上所述, 酶催化活性的变化主要归因于以上 4 种离子液体中阴离子本身的特性. 由于 BF_4^- 的亲核能力和氢键碱度比以上 4 种阴离子弱得多, 故酶在含 $C_4\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$ 的介质中的活性明显较高.

为了更深入地了解离子液体对酶催化活性的影响, 测定了木瓜蛋白酶催化 D,L -HPGME 水解反应的动力学参数 (K_m , v_{\max}) 和活化能 (E_a), 结果列于表 1. 对 $C_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$ ($n=2 \sim 6$) 而言, 随着离子液体的极性增加 (n 值减小), K_m 和 E_a 减小, v_{\max} 增大. 这可能是因为离子液体的极性越大, 底物越容易与酶结合, 表明底物与酶的亲和力 ($1/K_m$ 值) 越大, 即 K_m 越小, 反应的表现活化能 E_a 越低, 酶的催化活性越高. 但是, 随着 $C_4\text{MIm} \cdot \text{HSO}_4$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{Cl}$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{NO}_3$ 和 $C_4\text{MIm} \cdot \text{CH}_3\text{COO}$ 的极性增加, K_m 和 v_{\max} 减小, E_a 增大, 表明以上 4 种离子液体极性的增加同样能促进酶与底物的结合, 但由于受到阴离子的影响, 酶的催化活性降低.

2.2 离子液体的组成及溶剂性质与木瓜蛋白酶对映体选择性的关系

在含有 $C_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$ ($n=2 \sim 6$) 的介质中, 木瓜蛋白酶催化 D,L -HPGME 水解反应的对映体选择性 (用产物 $e. e.$ 值表示) 远高于在缓冲液中的对应值, 且随着 n 值的增加而显著提高. 在含有 $C_4\text{MIm} \cdot \text{HSO}_4$ 的介质中, 木瓜蛋白酶几乎未呈现出对映体的选择性; 木瓜蛋白酶在含有 $C_4\text{MIm} \cdot \text{Cl}$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{NO}_3$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{CH}_3\text{COO}$ 的介质中表现出的对映体选择性远低于在缓冲液中的对应值. 这是因

为 HSO_4^- , Cl^- , NO_3^- , CH_3COO^- 阴离子均具非常强的亲核能力和氢键碱度, 导致酶变性, 使对映体选择性下降. 可见, 离子液体中的阴、阳离子对酶的对映体选择性均有重要的影响. 研究表明, 该反应的对映体选择性随离子液体的疏水性增大而提高, 呈现出良好的相关性.

2.3 离子液体的组成及溶剂性质与木瓜蛋白酶稳定性的关系

不同的离子液体与酶蛋白的作用方式及强弱有所差异, 其对酶稳定性的影响可能相差甚大. 与 $\text{C}_4\text{MIm} \cdot \text{HSO}_4^-$, $\text{C}_4\text{MIm} \cdot \text{Cl}^-$, $\text{C}_4\text{MIm} \cdot \text{NO}_3^-$ 或 $\text{C}_4\text{MIm} \cdot \text{CH}_3\text{COO}^-$ 相比, 木瓜蛋白酶在 $\text{C}_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4^-$ ($n = 2 \sim 6$) 中的稳定性明显提高, 且其稳定性随着 $\text{C}_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4^-$ ($n = 2 \sim 6$) 疏水性的增大而提高. 在 $\text{C}_4\text{MIm} \cdot \text{HSO}_4^-$, $\text{C}_4\text{MIm} \cdot \text{Cl}^-$, $\text{C}_4\text{MIm} \cdot \text{NO}_3^-$ 或 $\text{C}_4\text{MIm} \cdot \text{CH}_3\text{COO}^-$ 中, 木瓜蛋白酶于 65°C 保温 6 h 后, 其相对活性仅为 6% ~ 40%; 当保温时间延长至 18 h 时, 酶的活性极低, 甚至完全失活. 这可能是因为以上 4 种离子液体具有极强的亲水性, 易夺取酶分子表面上的水分子, 破坏酶分子结构的水化层, 导致酶变性失活. 另外, HSO_4^- , Cl^- , NO_3^- 和 CH_3COO^- 阴离子均具非常强的亲核性和氢键碱度, 易与酶蛋白形成氢键, 破坏酶的三维结构, 导致酶变性失活.

在 $\text{C}_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4^-$ ($n = 2 \sim 6$) 中, 酶于 65°C 保温 18 h 后, 其相对活性仍能保持 44% 以上. 这是因为离子液体中的 BF_4^- 阴离子的亲核性和氢键碱度很弱, 不易破坏酶蛋白的空间结构. 可见, 除了离子液体的溶剂性质之外, 离子液体的阴、阳离子, 尤其是阴离子对酶的稳定性具有显著的影响.

2.4 木瓜蛋白酶分子构象的变化

木瓜蛋白酶在不同组成及溶剂性质的离子液体中表现出完全不同的催化特性, 主要归因于酶分子构象的变化^[13]. 以木瓜蛋白酶在磷酸缓冲液 (50 mmol/L, pH = 7.0) 中的酶分子构象为参照, 用荧光光谱法分析含有不同离子液体介质中木瓜蛋白酶分子构象的变化. 研究表明, 在含离子液体的介质中, 木瓜蛋白酶的最大荧光发射波长 (λ_{max}) 和最大荧光强度 (I_{max}) 均发生明显变化. 在 $\text{C}_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4^-$ ($n = 2 \sim 6$) 中, λ_{max} 发生蓝移, λ_{max} 和 I_{max} 均随 n 值的增大而依次减小. 这可能是因为 $\text{C}_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4^-$ ($n = 2 \sim 6$) 改变木瓜蛋白酶分子表面的疏水区域的微环境, 使暴露在酶分子表面疏水区域附近的两个色氨酸残基 (Trp-33 和 Trp-42) 包埋或部分包埋于酶分子内部^[14]. 在 $\text{C}_4\text{MIm} \cdot \text{HSO}_4^-$, $\text{C}_4\text{MIm} \cdot \text{Cl}^-$, $\text{C}_4\text{MIm} \cdot \text{NO}_3^-$ 或 $\text{C}_4\text{MIm} \cdot \text{CH}_3\text{COO}^-$ 中, λ_{max} 均发生红移, 这可能是因为这些离子液体中的阴离子具有较强的亲核性, 易破坏酶蛋白分子内氢键或形成新的氢键, 使酶分子构象发生较大伸展, 导致酶变性失活, 这与酶在含以上 4 种离子液体中呈现较低的催化活性、选择性及稳定性相符 (表 1).

荧光探测剂 ANS 在极性溶剂中的荧光很弱, 但吸附在蛋白质疏水部位上时会产生很强的荧光. 因此, 通过探测与酶蛋白非共价结合的 ANS 的荧光, 可以了解酶蛋白疏水区域的暴露状态. 研究表明 (图 1), 与缓冲液相比, ANS-木瓜蛋白酶在含离子液体介质中的 λ_{max} 均发生蓝移, I_{max} 增大, 这表明离子液体能显著改变木瓜蛋白酶分子构象, 促进木瓜蛋白酶伸展, 使较多的疏水区域暴露在酶分子表面. 与 $\text{C}_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4^-$ ($n = 2 \sim 6$) 相比, ANS-木瓜蛋白酶在以上 4 种离子液体中的 λ_{max} 蓝移和 I_{max} 均较大. 这可能是因为 $\text{C}_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4^-$ ($n = 2 \sim 6$) 与酶的相互作用较弱, 使酶分子伸展的程度相对较小, 未破坏酶分子内氢键和二硫键, 暴露的疏水区域相应较少. 但是, 木瓜蛋白酶受到 HSO_4^- , Cl^- , NO_3^- , CH_3COO^- 的强亲核攻击时, 可能发生一些分子内键的断裂或形成新键, 其 L -区域的 α -螺旋甚至 R -区域的 β -折叠发生较大程度的伸展, 从而暴露在酶分子表面的疏水区域增多^[15].

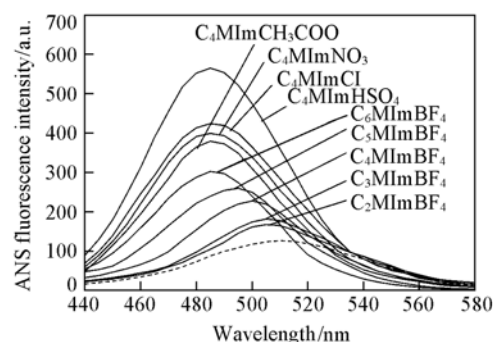


Fig. 1 Comparison of ANS fluorescence spectra of papain in systems involving different ILs and aqueous buffer control

参 考 文 献

[1] Lou W. Y., Zong M. H., Wu H. . Biocatal. Biotransform. [J], 2004, 22(3): 171—176

- [2] Lozano P. , de Diego T. , Guegan J. P. , *et al.* . *Biotechnol. Bioeng.* [J] , 2001 , **75**(5) : 563—569
- [3] Lou W. Y. , Zong M. H. , Xu R. . *Biotechnol. Lett.* [J] , 2005 , **27**(18) : 1387—1390
- [4] SHI Xian-Ai(石贤爱) , ZONG Min-Hua(宗敏华) , MENG Chun(孟春) , *et al.* . *Chin. J. Catal.* (催化学报) [J] , 2005 , **26**(11) : 982—986
- [5] Nara S. J. , Harjani J. R. , Salunkhe M. M. . *Tetrahedron Lett.* [J] , 2002 , **43**(16) : 2979—2982
- [6] Lau R. M. , Sorgedraeger M. J. , Carrea G. , *et al.* . *Green Chem.* [J] , 2004 , **6**(9) : 483—487
- [7] Kim K. W. , Song B. , Choi M. Y. , *et al.* . *Org. Lett.* [J] , 2001 , **3**(10) : 1507—1509
- [8] Park S. , Kazlauskas R. J. . *Curr. Opin. Biotechnol.* [J] , 2003 , **14**(4) : 432—437
- [9] Muldoon M. J. , Gordon C. M. , Dunkin I. R. . *J. Chem. Soc. , Perkin Trans.* [J] , 2001 , **2**(4) : 433—435
- [10] Lou W. Y. , Zong M. H. , Wu H. . *Biotechnol. Appl. Biochem.* [J] , 2005 , **41**(2) : 151—156
- [11] Park S. , Kazlauskas R. J. . *J. Org. Chem.* [J] , 2001 , **66**(25) : 8395—8401
- [12] Dzyuba S. V. , Bartsch R. A. . *Chem. Phys. Chem.* [J] , 2002 , **3**(2) : 161—166
- [13] Kaar J. L. , Jesionowski A. M. , Berberich J. A. , *et al.* . *J. Am. Chem. Soc.* [J] , 2003 , **125**(14) : 4125—4131
- [14] Lou W. Y. , Zong M. H. , Smith T. J. , *et al.* . *Green Chem.* [J] , 2006 , **8**(6) : 509—512
- [15] Naem A. , Khan K. A. , Khan R. H. . *Arch. Biochem. Biophys.* [J] , 2004 , **432**(1) : 79—87

Correlation Between Catalytic Characteristics of Papain and Components and Solvent Properties of Ionic Liquids

LOU Wen-Yong* , ZONG Min-Hua

(Laboratory of Applied Biocatalysis , South China University of Technology , Guangzhou 510640 , China)

Abstract The components and solvent properties of ionic liquids (ILs) show an important impact on papain-catalyzed asymmetric hydrolysis of *D,L*-*p*-hydroxyphenylglycine methyl ester (*D,L*-HPGME). The enzyme was more active, enantioselective and stable in the $C_n\text{MIm BF}_4$ ($n = 2—6$)-based systems, while it was less active, enantioselective and stable in the systems involving $C_4\text{MIm} \cdot \text{HSO}_4$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{Cl}$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{NO}_3$ or $C_4\text{MIm} \cdot \text{CH}_3\text{COO}$. Papain's activity increased with increasing the polarity of the ILs $C_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$ ($n = 2—6$) and, conversely, decreased with increasing the polarity of the ILs $C_4\text{MIm} \cdot \text{HSO}_4$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{Cl}$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{NO}_3$ or $C_4\text{MIm} \cdot \text{CH}_3\text{COO}$. Also, the more hydrophobic the IL was, the more enantioselective and stable the papain was. Fluorescence spectroscopic analysis demonstrates that ILs had an obvious effect on papain's conformation. In the $C_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$ ($n = 2—6$)-containing systems, a blue-shift of the maximal emission (λ_{max}) of papain occurred, while a red-shift of λ_{max} took place in the systems involving $C_4\text{MIm} \cdot \text{HSO}_4$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{Cl}$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{NO}_3$ or $C_4\text{MIm} \cdot \text{CH}_3\text{COO}$. Papain's conformation changed greatly when the enzyme was placed in $C_4\text{MIm} \cdot \text{HSO}_4$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{Cl}$, $C_4\text{MIm} \cdot \text{NO}_3$ or $C_4\text{MIm} \cdot \text{CH}_3\text{COO}$ -based systems compared to those with $C_n\text{MIm} \cdot \text{BF}_4$ ($n = 2—6$), resulting in more exposure of hydrophobic regions of the enzyme.

Keywords Papain; Ionic liquid; *D,L*-*p*-Hydroxyphenylglycine methyl ester; Catalytic characteristic; Fluorescence spectroscopic analysis

(Ed. : H, J, Z)