

环糊精糖基转移酶(CGTase)的化学修饰

曹新志, 金征宇
(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 不同蛋白质修饰剂对环糊精葡萄糖基转移酶进行修饰。在一定条件下, 分别用丁二酮(DIC)、苯甲酰磺酰氟(PMSF)、二硫苏糖醇(DTT)和氯氨-T(Ch-T)处理后, 酶活不受影响, 说明精氨酸残基、羟基、二硫键和蛋氨酸残基与酶的活力无关。用焦碳酸二乙酯(DEPC)、N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)和碳化二亚胺(EDC)修饰后, 酶活力大幅度下降, 说明组氨酸、色氨酸和羧基氨基酸为酶活力所必需。

关键词: 嗜碱芽孢杆菌; 环糊精葡萄糖基转移酶; 化学修饰

Study on Effects of Protein Modification Reagents on CGTase

CAO Xin-zhi, JIN Zheng-yu
(College of Food, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The effects of some protein modification reagents on the activity of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) have been studied. That the enzyme was not affected by DIC, PMSF, DTT and Ch-T modification, suggested that guanido, hydroxyl, disulfide bond and methionine residues were insignificant to enzyme activity. The enzyme activity was remarkably decreased after

收稿日期: 2003-09-10

作者简介: 曹新志(1965-), 男, 副教授, 研究方向为食品工程。

理功能, 这些甙元可以被机体肠道有效地吸收, 因此食用发酵后的豆制品对糖尿病和动脉粥样硬化的早期预防更有利, 这为今后开发 AGEs 抑制剂提供了新思路。该研究使我们从一个新的角度去分析和评价大豆对糖尿病和心血管系统保护作用的意义与前景。我国大豆产量高、品种多、品质好, 如果能充分利用大豆中的异黄酮, 必将产生巨大的经济和社会效益。

参考文献:

- [1] Ann Vincent, M D. Soy Isoflavones: Are They Useful in Menopause[J]. Mayo Clin Proc, 2000, 75: 1174-1184.
- [2] 葛喜珍, 孔德娟, 李恩. 大豆异黄酮对去卵巢大鼠主动脉晚期糖化终末产物及脂质过氧化的影响[J]. 中药材, 2003, (1): 26-28.
- [3] Coward-L. Chemical modification of isoflavones in soy foods during cooking and processing[J]. Am-J-Clin-Nutr, 1998, 68(6 Suppl): 1486S-1491S.
- [4] Browlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low density lipoprotein[J]. Diabetes, 1985, 34(9): 938-940.
- [5] Edelstein D, Brownlee M. Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine[J]. Diabetes, 1992, 41(1): 26-29.
- [6] 葛勇, 张家庆, 周云平. 水飞蓟素及槲皮素对体外白蛋白非酶糖化的抑制作用[J]. 第二军医大学学报, 1995, 16(4): 333-336.
- [7] Kiuchi K, Nejima J, Takano T, Ohta M, et al. Increased serum concentrations of advanced glycation end products: a marker of coronary artery disease activity in type 2 diabetic patients[J]. Heart, 2001, 85(1): 87-91.
- [8] Hadley J, Malik N, Meek K. Collagen as a model system to investigate the use of aspirin as an inhibitor of protein glycation and crosslinking[J]. Micron, 2001, 32(3): 307-15.
- [9] Dai Li, Sridevi Devaraj, Cindy Fuller, et al. Effect of α -tocopherol on LDL oxidation and glycation in vitro and in vivo studies[J]. J Lipid Res, 1996, 37(9): 1978-1985.
- [10] 沈黎明. 不同光照条件下大豆体内异黄酮的含量与分布[J]. 中国粮油作物学报, 1999, 20(2): 38-39.
- [11] 葛喜珍, 王建华, 等. 中药大豆中异黄酮的制备及开发利用进展[J]. 河北中医药学报, 2001, 16(2): 44-47.

DEPC, NBS, EDC modification. The results indicated that carboxyl group, imidazolyl group and indolyl group seemed to be significant to the catalytic activity of cyclodextrin glucan transferase.

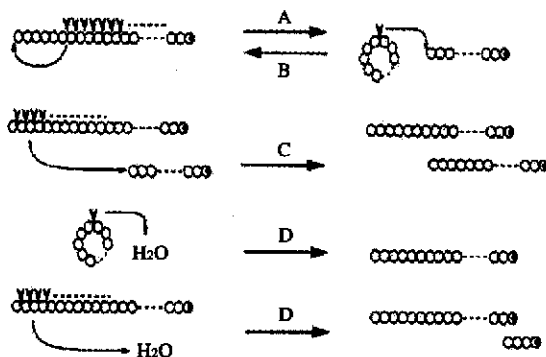
Key words: alkalophilic *Bacillus* sp. 7-12 cyclodextrin glucan transferase chemical modification

中图分类号: Q556

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)12-0064-05

环糊精葡萄糖基转移酶(cyclodextrin glycosyl transferase, 简称为CGTase, E.C.2.4.1.19)从淀粉和其它 α -1,4-葡聚糖合成非还原性的麦芽低聚糖即环糊精(CDs)。CDs有三种主要的类型,它们分别是由6,7和8个 α -(1 \rightarrow 4)糖苷键连接的 α -CD, β -CD和 γ -CD。环糊精是一种具有内疏水外亲水的筒形结构。因此,它们能与许多疏水客体化合物或功能基团形成包合物^[1]。从而改变其物理或化学性质。环糊精这种独特的性质使其在食品、医药、农业、化妆品、化学、环保等领域有广泛的应用^[2~6]。环糊精葡萄糖基转移酶除了作用于淀粉生成环糊精外,还有偶联、歧化和水解作用^[7],如图1所示。因此环糊精葡萄糖基转移酶还可用于一些物质的改性,如黄酮类化合物的改性等^[8,9]。本文对一株经过诱变的嗜碱芽孢杆菌所产的环糊精糖基转移酶进行了化学修饰,旨在揭示哪些氨基酸基团为环糊精葡萄糖基转移酶活性的必需基团。



○葡萄糖残基; ●有还原末端的葡萄糖开基; ▼ CGTase对 α -1,4糖苷键的作用

A. 环化作用; B. 偶联作用; C. 歧化作用; D. 水解作用

图1 环糊精葡萄糖基转移酶对底物的作用方式

1 材料与方法

1.1 材料

凝胶电泳均一的环糊精葡萄糖基转移酶(自制), N-溴代琥珀酰亚胺(NBS) 北京化工厂; 巯基乙醇(α -mercaptoethanol) 上海试剂厂; 二硫苏糖醇(DTT) 上海试剂二厂; 氯氨-T(Ch-T)、碳二亚胺(EDC)等其余化学修饰试剂均购于Sigma公司。

1.2 主要仪器

UV-2000型分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司

司 超级电热恒温水浴锅 上海实验仪器厂; 烘箱 上海实验仪器厂; TDL-40B 台式离心机 上海安亭科学仪器厂; V16 垂直电泳槽 上海有机玻璃制品仪器厂; EPS-300A 数显双稳电泳仪 上海天能科技有限公司; 721分光光度计 上海精密科学有限公司。HTACHI 650-60 荧光扫描仪。

1.3 方法

1.3.1 酶活力的测定

取10 μ l 适当稀释的酶液, 加入0.2mol/L 甘氨酸-NaOH-NaCl 缓冲液(pH8.55)0.2ml, 再加入马铃薯淀粉液0.2ml, 振荡, 于40 $^{\circ}$ C水浴10min, 立即加入0.5ml/L 醋酸0.5 终止反应, 然后加入0.005% 碘液显色, 同时以蒸馏水为空白, 不加酶液为对照, 在700nm 波长下测定吸光度(OD), 一个酶活单位定义为使吸光度下降10%的酶量。按以下公式计算:

$$\text{一个酶活单位(U/ml)} = \frac{a-b}{a} \times 1000 \times \text{酶液稀释倍数}$$

式中: a 为对照组的吸光度, b 为样品的吸光度。

1.3.2 化学修饰

分别用组氨酸(His)专一性试剂焦碳酸二乙酯盐(DEPC), 色氨酸(Trp)专一性试剂N-溴代琥珀酰亚胺(NBS); 羧基专一性试剂1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC); 二硫苏糖醇(DTT)、丁二酮(DIC)、苯甲酰磺酰氯(PMSF)、氯氨-T(Ch-T)进行化学修饰。

修饰方法: 修饰糖基转移酶中的精氨酸、蛋氨酸、组氨酸、色氨酸和羧基、羟基、二硫键的氨基酸残基。所选用的化学修饰剂及反应体系见表1。各种化学修饰剂配成所需浓度, 在30 $^{\circ}$ C下与CGTase反应, 分别于不同时间间隔取出部分反应液测定CGTase的活性, 以相同步骤不加修饰剂为对照, 并以该对照测得的酶活力为100%。

1.3.3 电泳分析^[10]

用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法对酶进行鉴定分析, 采用垂直板状电泳, 分离胶浓度为11%, 浓缩胶浓度为4%, 考马斯亮蓝R-250 染色。

2 结果与分析

2.1 精氨酸残基、羟基和蛋氨酸残基对酶活力的影响
DIC(丁二酮)为精氨酸的常用修饰剂; PMSF 是羟基

表1 化学修饰剂对酶活的影响

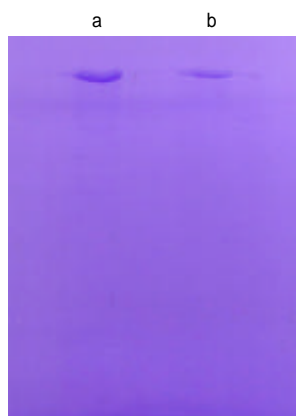
修饰剂	终浓度 (mmol/L)	缓冲液	相对酶活力 (%)
-	0.0		100.0
DTT	10	磷酸缓冲液, pH8.0	100
NBS	0.1	醋酸缓冲液, pH4.0	0
EDC	5	Tris-HCl 缓冲液, pH4.5	18.7
DEPC	25	磷酸缓冲液, pH7.0	36
DIC	10	硼酸缓冲液, pH7.4	100
Ch-T	10	磷酸缓冲液, pH7.0	96.3
PMSF	10	磷酸缓冲液, pH7.4	94.2

氨基酸的常用修饰剂; Ch-T 为蛋氨酸常用的修饰剂, 它们修饰 CGTase 后, 如表 1 所示, 酶的活力未见明显变化, 说明这三种氨基酸不是 CGTase 的必需基团。

2.2 色氨酸残基的化学修饰

用 NBS 对 Trp 残基进行修饰, 当 pH 为 4.0, NBS 的最终浓度达到 0.1mmol/L 时(结果见表 1), CGTase 完全失活, 说明 Trp 残基可能为环糊精糖基转移酶的活性中心之一。

为了试验 NBS 对酶的作用有无引起肽链的断裂, 用 100 倍于酶量(摩尔比)的 NBS 在 0.1mol/L pH4.0 乙酸缓冲液中与酶反应, 以不加 NBS 的酶液为对照, 30℃ 保温 30min, 然后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。结果被 NBS 修饰后的酶分子在凝胶上仍为均一色带(图 2), 与修饰前一样, 说明肽链没有断裂, 表明酶活力的丧失是由于色氨酸残基被 NBS 氧化的结果, 而不是肽链断裂的结果。



a. 纯化的 CGTase; b. NBS 修饰后的 CGTase

图2 环糊精葡萄糖基转移酶的 SDS-PAGE 电泳图

2.2.1 不同 pH 值条件下对酶与 NBS 反应的影响

为了确定色氨酸残基是否与酶的活性部位有关, 研究了不同的 pH 条件下酶被 NBS 氧化的情况和底物对酶的保护作用。

在 pH4.0 和 pH4.8 时酶与 NBS 反应, 分别以不加 NBS

的 pH4.0 和 pH4.8 的酶液为对照, 其酶活力为 100%, 结果见图 3。当 NBS 浓度为 70 $\mu\text{mol/L}$ 时 pH4.0, 酶活力全部丧失活力, 而当 NBS 为 90 $\mu\text{mol/L}$, pH4.8 时, 酶活力仍可保留 17%。由此看来, 酶被 NBS 修饰的程度和 pH 有关, 这可能是由于低 pH 值时, 酶在溶液中的构象发生了变化, 使得位于活性部位或附近的色氨酸残基暴露于分子表面而易于被 NBS 氧化的结果。

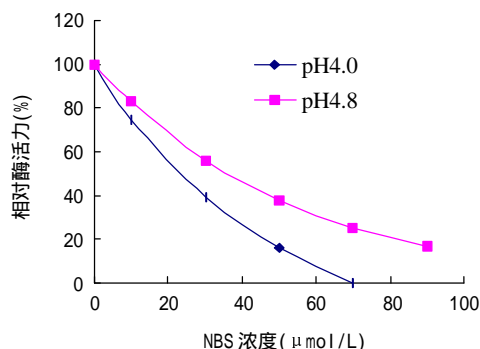


图3 NBS 在不同 pH 时对酶活力的影响

2.2.2 底物对酶的保护作用

将不同浓度的可溶性淀粉和酶在 20℃ 作用 5min, 然后与 0.01mmol/L 的 NBS 按常规方法反应, 并测定其活力。以不加底物及不与 NBS 反应的酶液为对照(相对酶活力 100%), 结果见图 4。底物对酶的保护作用随浓度增加而增加, 当淀粉浓度达到 2% 时相应酶活力接近 50%, 若不加淀粉, 相对酶活力仅为 10%。由此可认为, 色氨酸残基确实位于酶的活性部位。这是因为当底物和酶一接触, 立即形成中间复合物, 从而阻止了 NBS 对色氨酸残基的氧化, 表明底物对酶有保护作用。

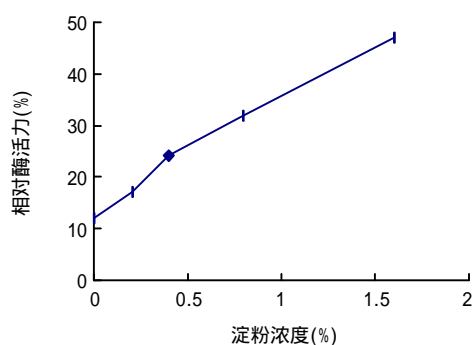


图4 底物浓度对 NBS 修饰酶的影响

2.3 组氨酸残基的化学修饰

用 DEPC 修饰 His 残基, 结果(图 5)表明随着 DEPC 浓度的增加酶活性呈下降趋势, 当浓度达到 50mmol/L 时, 相对酶活力降为 36%。说明 His 残基也有可能是环糊精糖基转移酶的必需基团。图 6 表示了 DEPC 修饰的紫外吸收光谱图, 242nm 处的光吸收变化反映了组氨酸残基被修饰的情况, 280nm 处光吸收并无变化, 表明酪

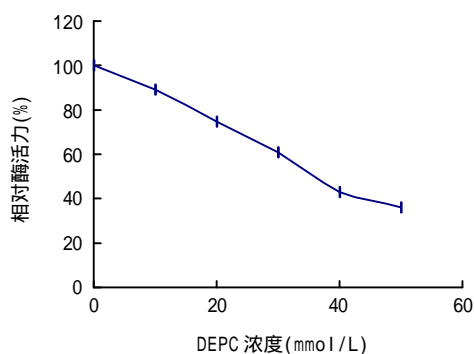
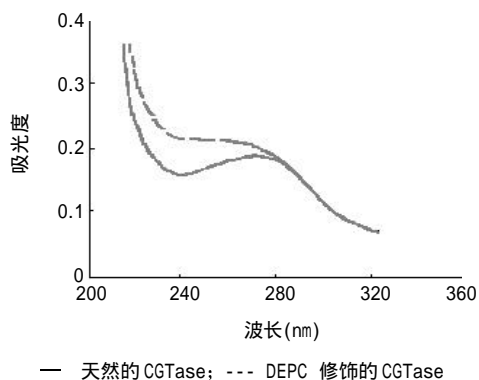


图5 DEPC 的浓度对酶活力的影响



— 天然的 CGTase; --- DEPC 修饰的 CGTase

图6 CGTase 的紫外光谱图

氨酸没有被修饰。

2.4 -COOH 基团(Glu/Asp)的修饰

用羧基专一性试剂 EDC 修饰的结果(图7)表明,随着修饰剂浓度的增加酶活性迅速下降,当浓度为 10mmol/L 时,相对酶活力降为 18.7%。说明羧基(Glu/Asp)可能是酶的活性中心之一。

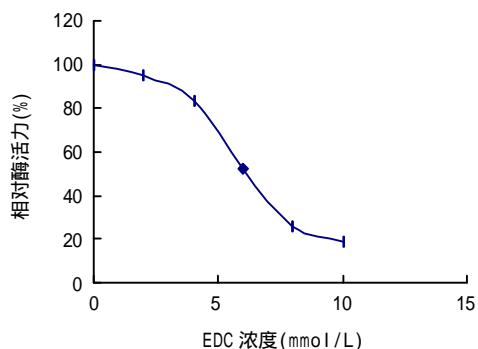
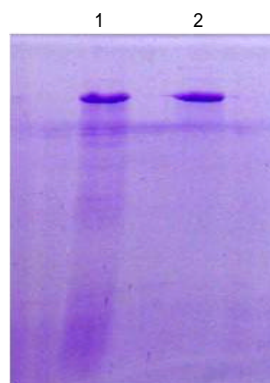


图7 EDC 浓度酶活力的影响

2.5 二硫苏糖醇对环糊精糖基转移酶的影响

用二硫苏糖醇修饰 CGTase。由表 1 的结果可知,二硫苏糖醇的修饰对酶活力没有影响,这表明二硫苏糖醇还原了酶的二硫键后,并没有破坏酶的高级结构,也没有影响酶的稳定性,同时说明该酶没有亚基,图 8 的电泳图也说明了这一点。



1 用巯基乙醇处理的 CGTase; 2 用沸水处理的 CGTase

图8 CGTase 的 SDS-PAGE 电泳图

3 结 论

用几种蛋白质侧链修饰剂对环糊精糖基转移酶进行修饰,在一定反应条件下,该酶被氯氨-T(Ch-T)、丁二酮(DIC)、苯甲磺酰氟(PMSF)、二硫苏糖醇(DTT)和巯基乙醇(α -mercaptoethanol)修饰后,酶活力不受影响,说明蛋氨酸、精氨酸、氨基酸的羟基和巯基与酶活力无关。而该酶被焦碳酸二乙酯(DEP)、N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)和羰二亚胺盐(EDC)修饰后,酶活力大幅度下降。表明有可能组氨酸残基、色氨酸残基和氨基酸的羧基为酶活力的必需基团。Bender 对环糊精糖基转移酶的研究也表明,色氨酸残基主要参与底物的结合,对催化反应的影响较小;组氨酸残基不仅与底物结合有关,而且可能对催化反应也很重要。Hofmann 的研究结果也表明,氨基酸的羧基端结构域参与活性中心的构成。

参考文献:

- [1] Bender H. Production, characterization and application of cyclodextrin[J]. *Adv Biotechnol Processes*, 1986, (6): 31-37.
- [2] Hedge AR. Cyclodextrin: Production, properties and application, *Starch hydrolysis products*[M]. New York: VCH Publishers, 1992. 319-333.
- [3] Szejtli J. Industrial application of cyclodextrin[J]. *Inclusion Compounds*, 1984, (3): 331-390.
- [4] Pramila Rao, C Suresh, D Narasimha Rao, et al. Digestion of residual β -cyclodextrin in treated egg using glucoamylase from a mutant strain of *Aspergillus niger*[J]. *Food Chemistry*, 1999, 65: 297-301.
- [5] Wang Xiaojing, Brussau M L. Solubilization of some low-polarity organic compounds by hydroxypropyl β -cyclodextrin[J]. *Environ Sci Technol*, 1993, 27: 281.
- [6] 双少敏, 郭远, 等. 相溶解法测定 β -环糊精-芦丁包合物的形成常数[J]. *分析化学*, 1998, 26(5): 564-567.
- [7] Bart A van der Veen, Joost C M Uitendhaag Dirk Penninga, et

TPA 质构分析及测试条件对苹果 TPA 质构分析的影响

姜 松, 王海鸥

(江苏大学生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘 要: 本文简要介绍了 TPA 质构分析方法, 具体阐述了 TPA 质构参数的含义, 并对苹果片进行 TPA 测试, 研究压缩速率和压缩程度对测试结果的影响。结果表明, 压缩程度对考察的四个质构参数有显著影响, 压缩速率无显著影响。

关键词: TPA; 质构; 压缩程度; 压缩速率

TPA and Effect of Experimental Conditions on TPA Test of Apple Slices

JIANG Song, WANG Hai-ou

(College of Biological and Environment Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: We briefly introduced the Texture Profile Analysis (TPA). And the textural parameters derived from TPA test were respectively explained in detail. We made TPA test on apple slices to investigate the influence of deformation rate and degree of compression on TPA test results. It concluded that deformation rate showed specific effect on the four textural parameters involved, but deformation degree had none.

Key words: TPA; texture; deformation rate; deformation degree

中图分类号 TS201.7

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2004)12-0068-04

食品质构的仪器测定一直是食品工作者的难点, 备受关注。力学性能是质构的客观反映, 仪器测定就是通过力学测试, 揭示质地本质, 准确地量化描述质构。近几十年来人们作了大量力学测试的开发, 尽量模仿食品质构的感官评价, 在这些工作中, TPA(Texture Profile Analysis)已经广泛应用于许多食品的品质测定, 给质构研究人员带来了极大的方便^[1]。

TPA 的起源是 Szczesniak 对食品质构的定义, 主要作用是作为食品质构的感官评价和仪器分析间的桥梁^[1]。

收稿日期: 2003-09-05

作者简介: 姜松(1963-), 男, 副教授, 副院长, 研究方向为农产品、食品流变特性及品质评价的研究以及农产(食)品贮藏保鲜技术的研究。

TPA 质构分析方法建立于 1967 年左右, 适用于通用的质构测定仪^[2], 英国 SMS 公司生产的质构分析仪系列和美国 Instron 公司的质构测定仪都可以对样品进行 TPA 测试。TPA 质构测试又被称为两次咀嚼测试(Two Bite Test)主要是通过模拟人口腔的咀嚼运动, 对样品进行两次压缩, 测试与微机连接, 通过界面输出质构测试曲线, 从中可以分析质构特性参数: 硬度、脆性、粘性、内聚性、弹性、胶粘性、耐咀嚼性、回复性^[3, 4]。

然而 TPA 质构分析者们通常不了解质构特性参数的正确含义, 且不能选择合适的实验条件。TPA 测试的质构参数和样品的外形尺寸、压缩探头与样品尺寸的比值、压缩程度、变形速率、压缩次数、两次压缩之间的停留间隔以及试验重复次数都有关系, 所以所有的 TPA 测试结果里都必须注明测试条件^[3]。在测试过程

al. Rational design of cyclodextrin glycosyl transferase from bacillus circulans strain 251 to increase α -Cyclodextrin production[J]. J Mol Biol, 2000, 296: 1027-1038.

[8] Eur. Pat. Appl. EP, 1990. 387: 042.

[9] Eur. Pat. Appl. EP, 1991. 387: 376.

[10] Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.