文章编号：1001-3555(2008)04-0351-05

海洋芽孢杆菌酯酶 BSE-1 的催化动力学和热失活动力学研究

高　强[1,2]，郝建华[1]，王跃军[1]，于建生[2]，孙　谧[1*]
（1. 中国水产科学研究院　黄海水产研究所，山东 青岛 266071；
2. 青岛科技大学　化工学院，山东 青岛 266042）

摘　要：海洋芽孢杆菌发酵产生的酯酶 BSE-1 经分离纯化后，以对硝基苯磷酸酯(PNPP)为底物，对电泳纯 BSE-1 的催化性质、催化动力学和热失活动力学进行了研究. 催化动力学研究表明，金属离子对 BSE-1 的活性影响显著，其中 Ca^{2+} 的激活作用最强，为混合型激活作用；而 Ba^{2+} 的抑制作用最为明显，为非竞争性抑制作用. BSE-1 的酶促反应动力学符合米氏方程，其中 $K_m = 8.15$ mmol · L^{-1}，$V_{max} = 0.97$ mmol · mg^{-1} · min^{-1}. 采用连续模型对 BSE-1 在 70 ℃的热失活动力学进行模拟，求得酶的失活速率常数 $k_1 = 1.41$，$k_2 = 0.28$.

关　键　词：海洋芽孢杆菌；酯酶；催化动力学；失活动力学
中图分类号：O643.32　　**文献标识码：**A

酯酶(esterase) 广义上是指具有催化水解酯键能力的一类水解酶的统称，而通常所说的酯酶往往是指羧酸酯酶(carboxylesterase，E.C.3.1.1.1)，主要是能够催化水解脂肪酸族及芳香族酯类的化合物，α-萘酚酯和对硝基苯酯类物质也是其特异性较高的底物，其催化活性随碳链的增加而降低，当碳链增到 C_8 时活性几乎全部消失. 微生物酯酶、脂肪酶作为生物催化剂，可催化不同类型底物的水解和合成反应，广泛应用于医药、化工、食品等行业[1,2]，尤其是在医药化工[3]和有机合成反应中[4~6]，具有明显的优越性.

目前，来源于海洋微生物的酯酶研究较少[7,8]，海洋微生物酯酶催化反应动力学相关的研究更是鲜有报道. 本实验室从海洋微生物中，筛选出一株产酯酶的芽胞杆菌(*Bacillus* sp.)，并对该新型海洋微生物酯酶 BSE-1 进行了分离纯化和性质研究，发现 BSE-1 为嗜热碱性酯酶，在食品工业，以及在香精、香料等食品添加剂中，有广泛的应用价值. 在此基础上对电泳纯 BSE-1 的催化动力学和失活动力学进行了系统的研究，以期为阐明酶的结构与功能的关系和酶作用机理的研究提供数据，探寻最有利的反应条件，以最大限度地发挥酶催化反应的高效率，为海洋微生物酯酶的工业化生产和推广应用奠定良好的基础. 因此，对 BSE-1 的动力学研究具有重要的理论意义和实践意义.

1 材料和方法

1.1 材料

BSE-1：电泳纯的磷酸酯酶，酶活力为 550 U/mg；对硝基苯磷酸酯(PNPP)为美国 BBI 产品；其它化学试剂均为进口或国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 BSE-1 的测活方法[9]　将 20 μL 酶液加到 2 mL 含 0.1 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 10.0)和 17 mmol/L 底物 PNPP 的反应体系中，60 ℃保温 3 min，然后用 2 mol/L 的 NaOH 溶液终止反应，用 20 μL 热失活的酶液代替样品作为空白对照，在光波长 405 nm 下测定吸光值. 产物对硝基苯酚的摩尔消光系数按 18750 L · mol^{-1} · cm^{-1} 计算. 酯酶活力单位的定义为：在上述条件下，每分钟 BSE-1 催化 PNPP 水解产生 1 μmol 对硝基苯酚的酶量，定义为一个活性单位.

1.2.2 BSE-1 的酶促反应动力学　实验用不同反应温度和 pH 值的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 3 ~

收稿日期：2008-03-10；**修回日期：**2008-04-01.
基金项目：国家自然科学基金(30571429)；科技部国际重点合作项目(2005DFA30830).
作者简介：高　强，男，生于 1982 年，硕士.
* 通讯联系人，Tel：0532-85833961；E-mail：sunmi@ysfri.ac.cn.

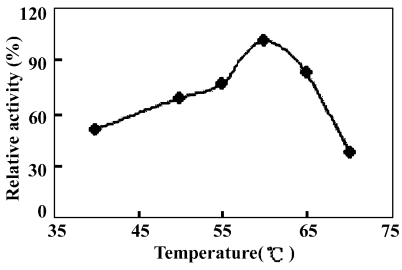
7)和0.1 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 8~13)条件下测定 BSE-1 的活性，确定温度和 pH 对反应速率的影响；改变测活体系中底物 PNPP 的浓度，在最适反应条件下，测定酶促反应速率的变化，利用数据拟合软件 Curve Expert 1.3 求得米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max}；在测活体系中添加不同种类的 1 mmol/L 的金属离子，实验不同金属离子对 BSE-1 活性的影响；改变反应体系中的 Ca^{2+}、Ba^{2+} 浓度和底物浓度，测定酶促反应的初速度，并以 Lineweaver-Burk 双倒数法作图，判断其效应机理.

1.2.3 BSE-1 的失活反应动力学　在70 ℃时保温不同的时间，测定并计算 BSE-1 的保留活性，构建 BSE-1 在 70 ℃时的连续失活动力学模型，对 BSE-1 的连续失活模型进行分析，研究其热失活规律.

2 结果和分析

2.1 BSE-1 的催化动力学研究

2.1.1 温度和 pH 对反应速率的影响　温度和 pH 对 BSE-1 催化 PNPP 的反应速率的影响显著，BSE-1 的最适反应温度为60 ℃(图 1)，最适 pH = 10.0.



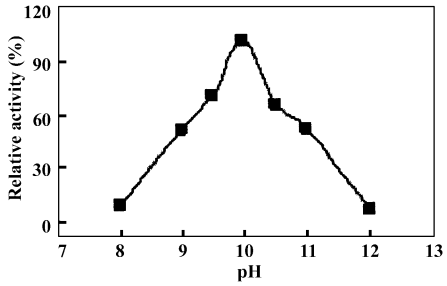


图 1 温度和 pH 值对 BSE-1 酶活力的影响

Fig. 1 Effect of temperature and pH on esterase activity

2.1.2 酶促反应时间进程　为确定酶促反应的最佳时间，作酶促反应时间的进程曲线. 准确测定反应不同时间下的吸光度，绘制反应时间——吸光度值曲线(图 2). 由图 1 可知，在前 10 min 内酶活力与反应时间具有很好的线性关系，利用软件 Curve Expert 1.3 将 10 min 的实验数据选择公式 Y = a + b · X 进行数据拟合，最终求得拟合系数 a = 0.00973，b = 0.07941，得到回归方程 Y = 0.00973 + 0.07941X，相关系数 r = 0.99719.

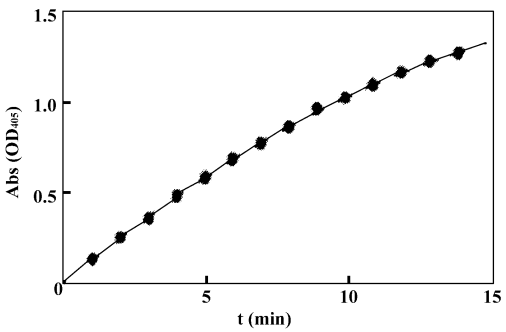


图 2 酶促反应时间进程曲线

Fig. 2 Time course of enzymatic reaction

2.1.3 动力学参数的确定　研究发现，反应速率与底物浓度呈典型的米氏曲线关系(图 3)：当 PNPP 浓度较低时，反应速率近乎直线上升，但随 PNPP 浓度的增大，酶促反应速率增加变慢. 当 PNPP浓度增加到17 mmol/L 时，反应速率趋近于

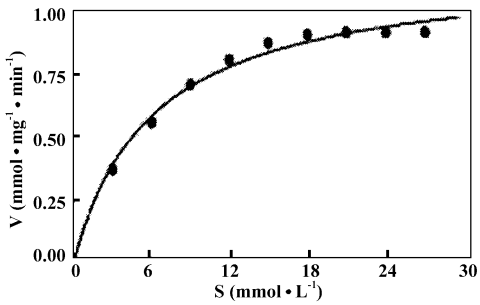


图 3 PNPP 浓度对反应速率影响

Fig. 3 Effect of PNPP on the BSE-1 activity

最大值，说明 BSE-1 催化 PNPP 水解反应遵循 Michaelis-Menten 方程式. 利用软件 Curve Expert 1.3 对实验数据选择公式 Y = a · X/(b + X)进行数据拟合，求得拟合系数 a = 0.97 ，b = 8.15，即 BSE-1 催化 PNPP 水解反应的 K_m = 8.15 mmol/L 和 V_{max} = 0.97 mmol · mg^{-1} · min^{-1}.

2.2 金属离子对动力学的影响

2.2.1 金属离子对 BSE-1 的活性影响　通过不同种类的金属离子对 BSE-1 的酶活影响研究发现，Ca^{2+} 对 BSE-1 有很好的激活作用，而 Ba^{2+} 对其有明显的抑制作用；Ca^{2+} 在浓度为 1 mmol/L 时，具有最大激活作用，酶活提高 250%(图 4)，降低或者再增大 Ca^{2+} 的浓度，对 BSE-1 的激活作用均减弱；随着 Ba^{2+} 浓度的增大，BSE-1 的酶活不断降低，Ba^{2+}

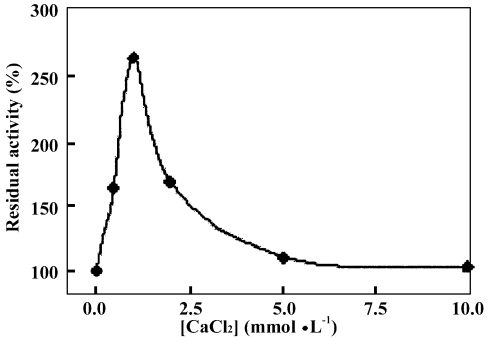


图 4 $CaCl_2$ 对 BSE-1 的酶活性影响

Fig. 4 Effect of $CaCl_2$ on the activity of BSE-1

浓度≥1 mmol/L 时酶活损失严重，在 1 mmol/L 浓度下仅能保留 10% ~20% 的活性(图 5).

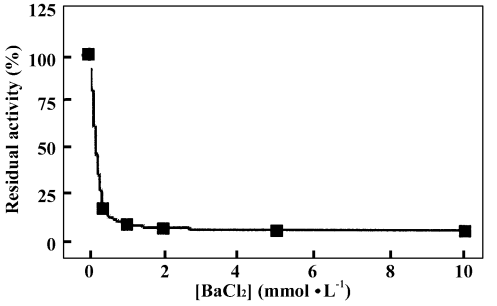


图 5 $BaCl_2$ 对 BSE-1 的酶活性影响

Fig. 5 Effect of $BaCl_2$ on the activity of BSE-1

2.2.2 Ca^{2+} 对 BSE-1 的激活作用动力学　　准确测定并计算不同底物浓度和不同 Ca^{2+} 浓度时的酶促反应速率，实验结果以 Lineweaver-Burk 双倒数作图(图 6). 研究发现：加入激活剂 Ca^{2+} 后，随着 Ca^{2+}

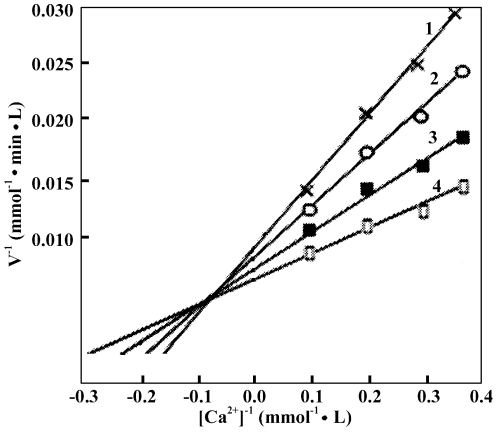


图 6 Ca^{2+} 对 BSE-1 的激活作用

Fig. 6 Lineweaver-Burk plots for activation of Ca^{2+} on BSE-1

The of Ca^{2+} (1 ~4)：0、0.25、0.5、1 mmol/L

对酶的激活作用的增强，使得 V_{max} 增大，而 K_m 值降低，其效应为混合型激活作用.

2.2.3 Ba^{2+} 对 BSE-1 的抑制作用动力学　　准确测定并计算不同底物浓度和不同 Ba^{2+} 浓度时的酶促反应速率，实验结果以 Lineweaver-Burk 双倒数作图(图 7). 研究发现：Ba^{2+} 对酶的抑制作用，使得 K_m

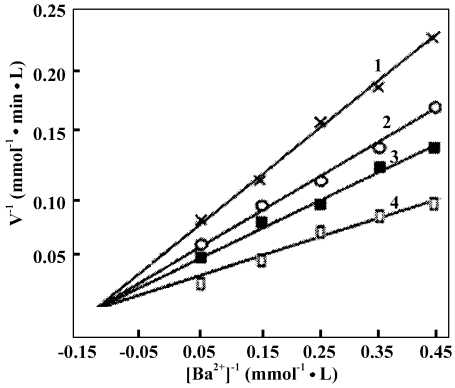


图 7 Ba^{2+} 对 BSE-1 的抑制作用

Fig. 7 Lineweaver-Burk plots for inhibition of Ba^{2+} on BSE-1

The of Ba^{2+} (1 ~4)：0、0.1、0.25、0.5 mmol/L

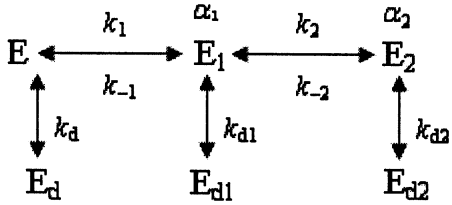
值不变，V_{max} 随着 Ba^{2+} 浓度的增加而下降，双倒数作图直线相交于横轴，其效应为非竞争性抑制作用.

3 BSE-1 的热失活动力学

对 BSE-1 的热稳定性研究发现，BSE-1 在≤60 ℃条件下性质稳定；在 70 ℃时，活性损失较为明显. 为了进一步研究 BSE-1 的热失活情况，对其在 70 ℃的热失活动力学进行了研究，为 BSE-1 在食品中的潜在应用奠定基础.

3.1 模型构建

酶的失活是一个非常复杂的过程，即使失活遵循一级反应动力学，失活的机理也未必清楚. 有时，酶在结构上发生一些变化，可能并不完全失去催化能力，却影响了它的比活力. 人们很早就提出失活一般是多步过程，或是串联，或是平行，或两者交错[10]. 我们采用连续模型对 BSE-1 的失活过程进行模拟，即将 BSE-1 的失活过程看作不是一个阶段，而是通过一个中间过渡态进行的，发生下列过程：



其中 E_d、E_{d1} 和 E_{d2} 为完全失活的“死酶”，α_1、α_2 是 E_1、E_2 对 E 的相对活力，k_i 为反应速率常数.

在此模型的基础上，作如下假定：

1. 时间 t = 0 时，E_1、E_2 的浓度 $c_{E1} = 0$、$c_{E2} = 0$.

2. E 到 E_1 到 E_2 是不可逆反应，这样 $k_{-1} = 0$、$k_{-2} = 0$；当 t 趋于∞时，所有的酶都变成 E_2 的形式，且它是稳定的，则 $k_{d2} = 0$.

3. 没有平行失活现象，这样 $k_d = 0$、$k_{d1} = 0$.

通过以上假设，将时间 t 时 E 的浓度记为 c_t，则总酶的残存活性 α(t) 可记为如下公式[11].

$$\alpha(t) = (c_E + \alpha_1 c_{E1} + \alpha_2 c_{E2})/c_0 = (1 + \frac{\alpha_1 k_1 - \alpha_2 k_2}{k_2 - k_1})\exp(-k_1 t) + \frac{(\alpha_2 - \alpha_1)k_1}{k_2 - k_1}\exp(-k_2 t) + \alpha_2 \qquad (公式\ 1)$$

3.2 模型拟合结果

利用以上酶失活的连续模型，用数据拟合软件 Data Fit 8.0 对 70 ℃时酶的失活实验数据选择公式 $Y = a \cdot \exp(b \cdot X) + c \cdot \exp(d \cdot X) + e$ 进行拟合(图 8)，求得 a = 0.77，b = −1.41，c = 0.06，d = −0.28，e = 0.17 与公式 1 相比较求得拟合参数 α_1 = 0.22，α_2 = 0.17，k_1 = 1.41，k_2 = 0.28. 其中散点和曲线分别代表实验值和计算值. 图 7 表明，二者的拟合效果良好，说明所选择的模型是适合的.

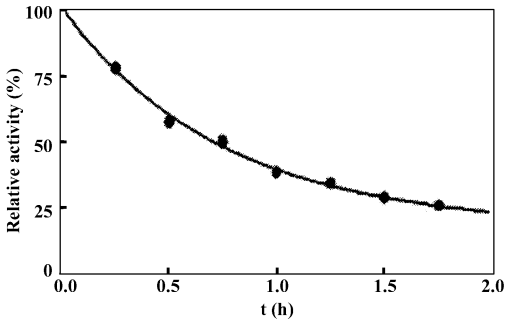


图 8 BSE-1 的热失活效应

Fig. 8 Effect of thermal inactivation on BSE-1

通过对实验结果和拟合参数的研究，得到如下结论：第一，α_1、α_2 均小于 1，说明在加热过程中 BSE-1 的中间态 E_1 和终态 E_2 的活性均小于原酶 E，存在酶热失活现象；第二，α_1 和 α_2 相差不大，表明 E_1 和 E_2 的活性差别不大，BSE-1 的保留活性趋于稳定；第三，BSE-1 的失活速率常数 k_1 明显大于 k_2，这表明 BSE-1 的两步失活过程中，第一步失活速率要快，BSE-1 的失活主要集中在第一步，在 2 h 的加热过程中，随着时间的延长失活速率变小，酶趋于稳定.

通过 BSE-1 的热失活模型研究发现，此连续模型很好的模拟了 BSE-1 的失活过程，结果表明：在 70 ℃时，酶的第一步失活速率较大，酶的活性损失比较严重，随后酶趋于稳定，在 < 70 ℃时，BSE-1 能得到很好的应用.

4 讨 论

目前，对不同微生物来源酯酶的酶学性质以及动力学研究都已有相关报道，其中芽孢杆菌来源的酯酶研究较多. *Bacillus circulans* 酯酶(BCE)[12] 的最适温度 60 ℃，最适 pH = 8.5，BCE 能很好的催化短中链的对硝基苯酯. Ca^{2+} 能使 *Bacillus subtilis* RRL 1789 酯酶[13] 的活性提高 20%，但是此酯酶并不属于金属酶，在结构上与丝氨酸蛋白酶家族类似. 来源于 *Acinetobacter lwoffii* I6C-1 酯酶[14] 的最适温度为 37 ℃，最适 pH 8.0，Ca^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+} 等金属离子是它的强抑制剂. 与以上微生物酯酶相比较，BSE-1 具有较高的最适反应温度和 pH 值，属于嗜热碱性酯酶；金属离子对酶活影响显著，1 mmol/L 的 Ca^{2+} 能使酯酶活性提高 250%，Ba^{2+} 是其强抑制剂；在催化 PNPP 时的 K_m = 8.15 mmol/L，V_{max} = 0.97 mmol · mg^{-1} · min^{-1}，具有自己独特的催化性质.

我们主要研究了酯酶 BSE-1 水解底物 PNPP 的催化动力学和热失活动力学，探讨了 BSE-1 的最适反应条件和金属离子对其动力学的影响，并成功构建热失活动力学模型. 研究表明 BSE-1 能很好的催化 PNPP，抑制类型显示，Ca^{2+} 为混合型激活作用，Ba^{2+} 为非竞争性抑制作用. 利用连续失活模型对 BSE-1 的失活动力学进行模拟发现，两步失活模型能够很好的模拟酶失活过程，相关系数大于 0.99.

参考文献：

[1] Atomi H , Imanaka T. *Tetrahedron*: *Asymmetry* [J], 2004, **69**(15): 2 729 ~ 2 735

[2] Panda T, Gowrishankar B S. *Appl. Micro. Biotech.* [J], 2005, **67**(2): 160 ~ 169

[3] Dong Ya-qin(董亚琴), Meng Chu(孟 春), Shi Xian-ai(石贤爱), *et al. J. Mol. Catal.* (China)(分子催化)[J], 2006, **20**(4): 351 ~ 354

[4] Xin Jia-ying(辛嘉英), Zheng Yan(郑 妍), Wu Xiao-

mei(吴小梅), *et al. J. Mol. Catal.* (China)(分子催化)[J], 2006, **20**(6): 574 ~ 578

[5] Zhang Yong-xue(张永学), Wumanjiang Aili(吴满江艾力), Liu Yong(刘　勇). *J. Mol. Catal.* (China)(分子催化)[J], 2006, **20**(5): 438 ~ 442

[6] Wang Hai-ou(王海鸥), Wang Yan-ji(王延吉), Li Fang(李　芳), Zhao Xin-qiang(赵新强). *J. Mol. Catal.* (China)(分子催化)[J], 2007, **21**(1): 87 ~ 89

[7] Kim J T, Kang S G, Woo J H, *et al. J. Appl. Micro. Biotech.* [J], 2007, **74**(4): 820 ~ 828

[8] Karpushova A, Br mmer F, Barth S, *et al. Appl. Micro. Biotech.* [J], 2005, **67**(1): 59 ~ 69

[9] Gong N P, Chen C Y, Xie L P, *et al. Biochim. Biophys. Acta*[J], 2005, **1 750**(2): 103 ~ 111

[10] Zhang Yuan-xing(张元兴), Xu Xue-shu(许学书). (生物反应器工程)[M]. 上海: 华东理工大学出版社. 2001, 21 (Bioreactor Engineering. Shang-hai: ECUST Press), 2001, 21

[11] Ajit Sadana, James P H. *Biotechnol Bioeng*[J], 1986, **28**(7): 977 ~ 987

[12] Kademi A, Abdelkader N A, Fakhreddine L, Baratti J C. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* [*J*], 2000, **10**(4): 395 ~ 401

[13] *Kaiser P*, *Raina C*, *Parshad R*, et al. Protein Expr. Purif. [*J*], 2006, **45**(2): 262 ~ 268

[14] *Kim H E*, *Park K R*. Curr. Microbiol. [*J*], 2002, **44**(6): 401 ~ 405

Catalytic Kinetics and Inactivation Kinetics of an Esterase BSE-1 from Marine Bacillus sp.

GAO Qiang[1,2], HAO Jian-hua[1], WANG Yue-jun[1], YU Jian-sheng[2], SUN Mi[1*]

(1. *Yellow Sea Fisheries Research Institute*, *Chinese Academy of Fishery Sciences*. *Qingdao* 266071, *China*;
2. *College of Chemical Engineering*, *Qingdao University of Science & Technology*, *Qingdao* 266042, *China*)

Abstract: The catalytic kinetics and thermal inactivation kinetics of a novel alkaline esterase BSE-1 were studied after it was purified from a marine Bacillus sp.. The survey of effects of metal ions on the enzyme showed that Ca^{2+} activated the enzyme, and the activation effect of Ca^{2+} on the enzyme was found to be of mixed type. Ba^{2+} inhibited the enzyme, the inhibition of Ba^{2+} on the enzyme appeared to be a partial noncompetitive type. The behavior of the enzyme during hydrolysis of PNPP followed Michaelis-Menten kinetics, with $K_m = 8.15$ mmol · L^{-1} and $V_{max} = 0.97$ mmol · mg^{-1} · min^{-1}. In addition, thermal deactivation kinetics of BSE-1 was analyzed by continuous model in the temperature of 70°C. Suitable mechanism was proposed to describe the deactivation process. And the rate constants of the thermal inactivation were $k_1 = 1.41$ and $k_2 = 0.28$.

Key words: Bacillus sp.; Esterase; Catalytic kinetics; Inactivation kinetics