

研究快报

稀土离子对磷脂酶 A₂ 水解卵磷脂反应的影响

张颖¹, 安学勤²

(1. 兰州大学化学化工学院, 730000, 甘肃, 兰州)

(2. 南京师范大学化学与环境科学学院, 210097, 江苏, 南京)

[摘要] 在 AOT-卵磷脂微乳液中, 采用改进的可见-紫外分光光度法研究稀土离子(La^{3+} , Pr^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , Y^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+})对磷脂酶 A₂ 水解卵磷脂反应的影响. 研究表明, 磷脂酶的活性随稀土离子浓度变化呈钟型曲线, 对于不同的稀土离子, 这种变化随着有效离子半径而改变.

[关键词] 稀土离子, 磷脂酶 A₂, 水解, 微乳液

[中图分类号] O614.33, **[文献标识码]** A, **[文章编号]** 1001-4616(2004)02-0063-02

稀土离子对生物体内某些物质的代谢和酶活性具有促进或抑制作用, 有抗血凝、抗炎症和抑制肿瘤生长等药理作用. 三价稀土离子具有和钙离子相近的离子半径和配位化学环境, 它们进入生物体内后通常表现出拮抗钙的作用, 影响着钙离子生理功能的发挥. 因此, 稀土元素生物效应的研究引起了人们的广泛重视^[1,2].

磷脂酶 A₂ 是一类催化磷脂二位酰基水解的脂肪酶, 广泛存在于细菌、植物、哺乳动物的组织、细胞和分泌物中, 具有产生炎性介质、参与磷脂重建、促进血液凝固等作用. 研究证明, 在脏器、心血管、胃肠道、皮肤、骨骼等系统的急、慢性炎症中, 磷脂酶 A₂ 的活性均有增高并介导一系列病理、生理过程. 另外, 磷脂酶 A₂ 水解卵磷脂形成的溶血性卵磷脂在化学、制药和食品工业方面有重要的用途. 因此研究稀土离子对磷脂酶 A₂ 水解反应的影响具有重要意义. 油包水型微乳液是水滴(也称为“水池”)以纳米尺寸分散到油中形成的热力学稳定体系, 胶束酶学研究的权威 Marinek 指出, 微乳液体系可能成为生物转化的通用介质^[3]. 目前国内外还未见到关于在微乳液中稀土离子对磷脂酶 A₂ 催化水解反应的影响. 本文采用近期改进的在线检测可见-紫外分光光度法^[4]考察了 7 种稀土离子对在微乳液中进行的磷脂酶 A₂ 催化水解卵磷脂反应的影响.

1 实验部分

仪器: Agilent 8453 可见-紫外分光光度计.

试剂: 磷脂酶 A₂、卵磷脂、双-2-乙基己基硫代琥珀酸钠(AOT, 纯度 98%)购置于 SIGMA 公司, 酚红、三羟甲基氨基甲烷[Tris-(hydroxymethyl)aminomethane]、异辛烷、HCl、CaCl₂ 等为国产试剂, 纯度均高于 98%. 稀土(La^{3+} , Pr^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , Y^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+})硝酸盐采用如下方法制取: 稀土氧化物(纯度 > 99.9%)溶于 1:1 稀硝酸(15%), 水浴加热除去过量硝酸至弱酸性, 浓缩近干, 用 P₂O₅ 干燥结晶.

实验过程: 根据实验要求, 在磨口锥形瓶中加入一定量的 AOT 异辛烷溶液, 磷脂酶 A₂ 溶液, Tris-HCl 缓冲液, 酚红水溶液, 稀土离子溶液, 搅拌混合后转移至比色皿中, 放置于 45℃ 恒温水浴恒温 10 min, 加入适量的卵磷脂溶液(底物), 用力振荡 1 min 后, 反应开始计时. 为了减少实验误差, 该样品的参比采用除了磷脂酶 A₂ 以外的所有物质的混合液. 磷脂酶 A₂ 水解卵磷脂反应的产物游离脂肪酸可与酚红作用, 在 560 nm 处产生吸收. 用 Agilent 8453 可见-紫外分光光度计连续检测在 560 nm 处吸光度随反应时间的变化. 用

收稿日期: 2004-02-12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20273032, 29873020), 教育部高等学校骨干教师资助计划资助项目.

作者简介: 张颖, 女, 1978-, 兰州大学化学化工学院硕士研究生, 主要从事物理化学的学习与研究.

通讯联系人: 安学勤, 女, 1951-, 南京师范大学化学与环境科学学院教授, 博士生导师, 主要从事物理化学的教学与研究. E-mail:

anxueqin@163.com

油酸作标准曲线,根据标准曲线将磷脂酶 A₂ 水解反应得到的“吸光度-时间”曲线转化为“产物浓度-时间”曲线^[4].由此计算该反应的初速率(initial reaction rate)和酶活性(specific activity).

2 结果与讨论

用 AOT/异辛烷/水形成的油包水型微乳液作为反应介质,在固定微乳液的含水量、温度、酶浓度、底物浓度, pH = 8.0 和 $T = 45^{\circ}\text{C}$ 的条件下,分别考察了 3 种轻稀土三价离子和 4 种重稀土三价离子对在微乳液中磷脂酶 A₂ 水解卵磷脂反应动力学的影响.

磷脂酶 A₂ 是一种界面酶,微乳液中“水池”的界面组成、微结构等因素对脂肪酶的催化作用影响很大^[5].在 AOT/异辛烷/水形成的油包水型微乳液中,AOT 电离出 Na⁺,以阴离子表面活性剂的形式位于“水池”的两相界面上,它的亲水基团朝向“水池”,钠离子分布于阴离子基团附近和“水池”中,磷脂酶 A₂ 分布在“水池”的界面上.稀土离子加入微乳液后,主要分布在“水池”中和界面上,一方面改变“水池”中水的活度^[6],影响酶催化反应,另一方面,它们可能吸附在界面上,使“水池”的界面组成和微结构发生改变,影响酶活性中心的位置与活性,直接参与或影响酶催化反应.图 1 和图 2 分别给出了不同浓度的三价轻稀土离子和重稀土离子对磷脂酶 A₂ 水解卵磷脂反应初速率的影响.由图可以看出,稀土离子对磷脂酶 A₂ 水解卵磷脂反应初速率的影响呈钟型曲线.低浓度的稀土离子能够促进酶的活性,但高浓度的稀土离子可能会抑制酶活性.研究结果还发现每一种稀土离子对磷脂酶 A₂ 水解卵磷脂反应都有一个最佳活化浓度,该活化浓度与稀土离子的有效离子半径有关.表 1 中列举了配位数为 6 的稀土离子的有效离子半径和最佳酶浓度,数据表明:离子的有效离子半径越小,所需要的激活酶的最佳浓度越低.三价轻稀土离子和重稀土离子都有同样的规律.研究结果也表明,如表 1 所示,三价稀土离子的有效离子半径也影响酶催化反应的初速率,轻稀土三价离子对该反应速率的影响规律为:有效离子半径越小,对反应速率的影响越大.对于重稀土三价离子,因为有效离子半径的变化不大,因此,它们对该反应初速率影响的差别也不大.

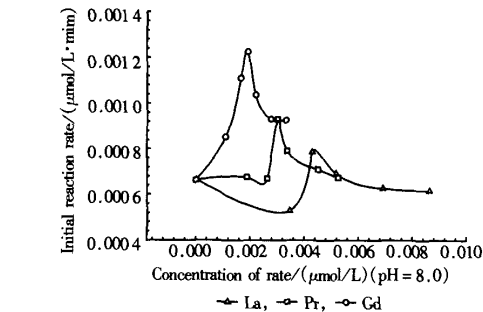


图 1 不同浓度的轻稀土离子对磷脂酶 A₂ 水解卵磷脂反应初速率的影响

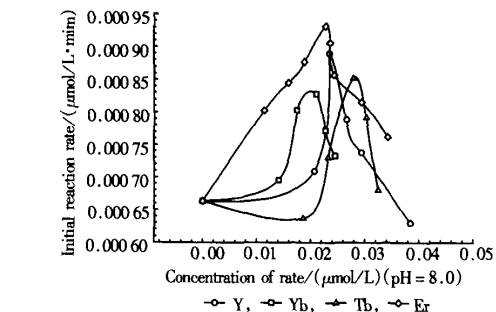


图 2 不同浓度的重稀土离子对磷脂酶 A₂ 水解卵磷脂反应初速率的影响

表 1 配位数为 6 的三价稀土离子的有效半径、最佳酶激活浓度和反应初速率

稀土离子	轻稀土			重稀土			
	La ³⁺	Pr ³⁺	Gd ³⁺	Tb ³⁺	Y ³⁺	Er ³⁺	Yb ³⁺
有效离子半径/(10 ⁻¹⁰ m)	1.06	1.01	0.94	0.92	0.90	0.88	0.86
最佳激活浓度(μmol/L)	4.3	3.0	1.9	27.8	23.5	22.7	21.0
反应初速率(mmole/(L·min))	7.86	9.30	12.26	8.52	8.89	9.32	8.28

3 结论

研究结果表明,稀土离子对磷脂酶 A₂ 水解卵磷脂反应初速率的影响可用钟型曲线表示,每一种稀土离子对磷脂酶 A₂ 水解卵磷脂反应初速率的影响都有一个最佳活化浓度,该活化浓度与稀土离子的有效半径有关,随着有效离子半径减少,最佳离子活化浓度减少.

(下转第 69 页)

- [34] Cumming J R. Phosphate-limitation physiology in ectomycorrhizal pitch pine (*Pinus rigida*) seedlings[J]. *Tree Physiol*, 1996, 16 (11—12):977—983.
- [35] Harvey L M. Cultivation techniques for the production of ectomycorrhizal fungi[J]. *Biotechnol Adv*, 1991, 9(1):13—29.
- [36] 杨新美,主编. 中国菌物学传承与开拓[M]. 北京:中国农业出版社,2001. 277—282.
- [37] 花小梅. 菌根应用新技术[M].北京:科学普及出版社,1999.1—20.
- [38] 王茂胜,连宾. 美味牛肝菌研究[J]. *贵州林业科技*, 2003, 31(3):34—38.

Several Hot Problems Analysis of Microbiological Fertilizer Research

Lian Bin, Zang Jinping, Yuan Sheng

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

Abstract: The microbiological fertilizer (MF) possesses special fertilizer effect that can help plants to gain nutrition from environment. With the development of MF, many kinds of MF are different from traditional MF or inoculants and are used widely in the agricultural practice in China, especially in the economical crops planting by organic agricultural manipulation. Some hot problems related to MF in the research and application are given in this paper, such as oligosaccharides research and application, micro-ecology theory and PGPR (plant growth promoting bacterial) used in the respect of promoting crop growth. The authors emphasize that MF development could be connected with food safety, environment protection and organic living refuse treatment.

Key words: microbiological fertilizer, oligosaccharides, micro-ecology, resource utilization

[责任编辑:孙德泉]

(上接第 64 页)

[参考文献]

- [1] Alexandre A, Shvartsburg A A. DMSO complexes of trivalent metal ions: first microsolvated trications outside of group 3[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 12343—12351.
- [2] Kobayashi S, Manabe K. Development of novel lewis acid catalysts for selective organic reactions in aqueous media[J]. *Acc Chem Res*, 2002, 35: 209—217.
- [3] Martinek K, Klyachko N L, Kabanov A V, *et al.* Micellar enzymology: its relation to membranology[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 981: 161—172.
- [4] 李严, 张英华, 王琛, 等. 磷脂酶 A₂ 水解卵磷脂研究的新方法[J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 2003, 26: 44—46.
- [5] Jing Fei, An Xueqin, Shen Weiguo. The characteristics of hydrolysis of triolein catalyzed by wheat germ lipase in water-in-oil microemulsions[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, 24: 53.
- [6] 安学勤, 王涛, 沈伟国. 微乳液体系中过硫酸钾氧化碘离子的动力学研究[J]. *化学学报*, 2002, 60: 980—984.

[责任编辑:孙德泉]