

超声波对木瓜蛋白酶催化活性影响的机理研究*

陈小丽^{1†} 黄卓烈² 何平² 巫光宏² 詹福建² 丘泰球³

(1 广东海洋大学水产学院 湛江 524088)

(2 华南农业大学生命科学学院 广州 510642)

(3 华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510641)

摘要 木瓜蛋白酶经适当参数的超声波处理后酶活力提高。超声处理后酶的米氏常数 K_m 变小,最大反应速率 V_m 也减小。超声处理后酶的紫外吸收光谱不变,荧光发射光谱也不改变,而差示光谱出现明显的正峰和负峰。研究表明,超声波处理后,木瓜蛋白酶的构型没有改变,而构象发生了变化。本文讨论了超声波影响木瓜蛋白酶活性的可能机理。

关键词 超声波,木瓜蛋白酶,酶活力,构象

Study on effect of ultrasound on catalysis activity of papain

CHEN Xiao-Li¹ HUANG Zhuo-Lie² HE Ping² WU Guang-Hong²
ZHAN Fu-Jian² QIU Tai-Qiu³

(1 College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088)

(2 College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

(3 College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641)

Abstract The papain activity increased after the papain was treated with ultrasound of appropriate parameters. K_m and V_m of papain decreased after the treatment. Ultrasound did not change the ultraviolet absorption spectrum and fluorescence emission spectrum of papain, but positive peaks and negative peaks appeared in the differential ultraviolet spectrum of papain. The results indicated that conformation of papain was possibly transformed by ultrasonic treatment. The mechanism of effect of ultrasound on papain activity was discussed in this paper.

Key words Ultrasound, Papain, Enzyme activity, Conformation

2007-04-17 收稿; 2007-07-13 定稿

* 国家自然科学基金(10074016 和 10174021)及广东省高教厅资助项目。

作者简介:陈小丽(1978 -),女,湖北十堰人,博士研究生,研究方向:酶工程。

黄卓烈(1950 -),男,教授,博士生导师。何平(1967 -),男,副教授。巫光宏(1964 -),女,副教授。

詹福建(1967 -),男,实验师。丘泰球(1941 -),男,教授,博士生导师。

† 通信联系人 E-mail: lilychen77@163.com

1 引言

木瓜蛋白酶(Papain, EC3. 4. 22. 2)属于巯基蛋白酶,由212个氨基酸残基组成,分子量约为27,000^[1]。该酶具有广泛的底物专一性,有很强的分解蛋白质的能力,此外也具有水解酰胺键和酯键的特性,广泛存在于番木瓜茎叶和果实中,以未成熟果实的乳汁中为最高^[2,3]。该酶目前已被广泛应用于医药、食品、纺织、制革、饲料、染料等各个行业;它还可以用于研究蛋白质结构^[4,5]。

超声波是弹性介质中的一种机械波,它在传播过程中可产生一定的能量。近年来,已有一些研究利用超声波的物理能量作用于酶分子,使酶分子的构象改变,从而影响其催化活性^[6-14]。本文通过研究超声波对木瓜蛋白酶活力、动力学参数及光谱特性的影响,探讨了超声波影响酶催化反应的规律及机理。

2 材料与方法

2.1 材料

木瓜蛋白酶粗酶为广西生物技术研究所以生产;纯酶为美国Sigma公司产品。所用试剂中酪蛋白(Casein)为美国Sigma公司产品;考马斯亮蓝G250(Coomassie brilliant blue G250)是Fluka公司产品;其他试剂均为国产分析纯。使用仪器有:752型紫外光栅分光光度计;H66025槽式超声波发生仪;HWS24型电热恒温水浴锅;紫外分光光度计(UV-2401PC);荧光分光光度计(F-4500)。

2.2 测定方法

木瓜蛋白酶活性的测定采用陶宙镛等人^[15]的方法进行,以酪蛋白为底物。酶活力单位定义为:1min内每mg蛋白质产生的酪氨酸的 μg 数($\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{min}$)。蛋白质浓度的测定参照Bradford^[16]的方法,以牛血清蛋白为标准蛋白。

3 结果与分析

3.1 超声波处理对木瓜蛋白酶活性的影响

3.1.1 150W不同频率超声波处理5分钟对木瓜蛋白酶活性的影响

木瓜蛋白酶经过150W(超声波换能器输出声功率,下同)、不同频率的超声波处理5分钟后,不同频率的超声处理对酶活力均有激活作用,激活酶的最适频率为16.5kHz(表1(a)),此频率超声波使酶活性比对照升高15.97%。方差分析结果表明,不同频率超声波处理对木瓜蛋白酶活性的改变效果达到显著水平(表1(b));采用新复极差法^[17]进行多重比较(显著水平为 $\alpha=0.05$,凡在此水平上差异显著的平均数标注不同字母,差异不显著的标注相同字母,下同),结果见表1(a)。

表1(a) 150W不同频率超声波处理木瓜蛋白酶5分钟效果

超声波频率(kHz)	酶活力平均数($\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{min}$)	差异显著性
0	973.11 ± 43.28	b
13.5	1067.32 ± 33.91	a
15	1070.70 ± 20.04	a
16.5	1128.53 ± 22.05	a
17	1072.36 ± 14.06	a
18	1064.04 ± 27.37	a

表1(b) 不同频率超声波处理木瓜蛋白酶酶活性数据方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
处理	83313.1659	5	16662.63319	3.525*	0.0157	2.62	3.90
误差	113437.577	24	4726.565706				
总变异	196750.743	29					

3.1.2 16.5kHz 不同功率超声波处理5分钟对木瓜蛋白酶活性的影响

木瓜蛋白酶经过16.5kHz、不同功率的超声波处理5分钟后,超声处理对酶活力均有提高作用,激活酶的最适功率为150W(表2(a)),酶活性比对照升高15.50%。方差分析得到,不同功率超声波处理木瓜蛋白酶的效果达到显著水平(表2(b));多重比较结果见表2(a)。

表2(a) 16.5kHz 不同功率超声波处理木瓜蛋白酶5分钟效果

超声波频率 (kHz)	酶活力平均数 ($\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{min}$)	差异显著性
0	977.05 \pm 45.49	c
10	1036.43 \pm 25.15	b
50	1063.79 \pm 26.96	ab
100	1095.59 \pm 30.27	ab
150	1128.53 \pm 22.05	a
200	1051.67 \pm 42.32	ab

表2(b) 不同功率超声波处理木瓜蛋白酶酶活性数据方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
处理	90672	5	18134.4	3.053*	0.0253	2.56	3.75
误差	166305	28	5939.46				
总变异	256977	33					

3.1.3 16.5kHz、150W 超声处理不同时间对木瓜蛋白酶活性的影响

木瓜蛋白酶经过16.5kHz、150W的超声波处理不同时间后,酶活力均有提高,对酶活力提高最多的处理时间为10分钟(表3(a)),酶活性比对照上升23.19%。方差分析得到,不同时间超声波处理对酶活性改变的效果达到显著水平(表3(b));多重比较结果见表3(a)。综合上述参数,可知本实验中激活木瓜蛋白酶的最佳超声波参数组合为:16.5kHz、150W、处理时间为10分钟。

表3(a) 16.5kHz、150W 超声对木瓜蛋白酶处理不同时间效果

超声波处理时间 (min)	酶活力平均数 ($\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{min}$)	差异显著性
0	970.88 \pm 27.48	c
1	1037.49 \pm 69.62	b
3	1082.48 \pm 63.59	ab
5	1125.10 \pm 21.13	ab
7	1152.99 \pm 100.70	ab
10	1196.02 \pm 56.94	a
15	1059.76 \pm 22.17	ab
20	1064.39 \pm 23.71	ab

表3(b) 不同时间超声波处理木瓜蛋白酶酶活性数据方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
处理	142027.562	7	20289.65169	2.932*	0.0229	2.42	3.50
误差	166077.914	24	6919.913081				
总变异	308105.476	31					

3.2 木瓜蛋白酶动力学研究

根据双倒数作图法^[18]作出木瓜蛋白酶经超声波处理前后的催化反应的双倒数曲线(图1)(v :反应速率,[S]:底物浓度),求得未经超声处理前木瓜蛋白酶纯酶的米氏常数 K_m 值为79.84 (mg/mL),最大反应速率 V_m 值为

3.40×10^4 ($\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{min}$) (37 $^{\circ}\text{C}$, pH7.0);经适宜参数的超声波处理以后,该酶的 K_m 值为28.85 (mg/mL), V_m 值为 1.29×10^4 ($\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{min}$) (37 $^{\circ}\text{C}$, pH7.0)。即超声处理后木瓜蛋白酶的 K_m 变小,比对照下降1.77倍; V_m 也变小,比对照下降1.64倍。

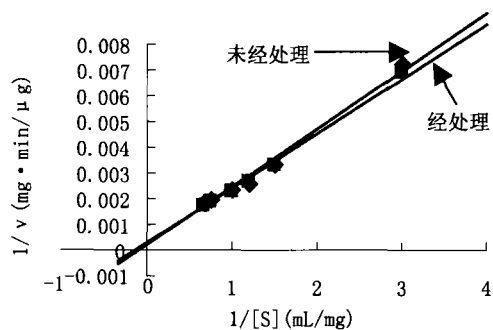


图1 木瓜蛋白酶催化反应双倒数曲线

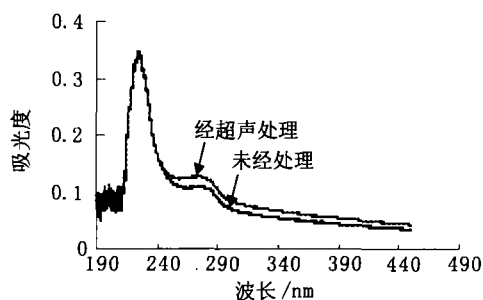


图2 木瓜蛋白酶紫外吸收光谱

3.3 木瓜蛋白酶光谱研究

紫外吸收光谱:未经超声处理的木瓜蛋白酶在紫外区有两个较明显的吸收峰和一个很小的吸收峰,分别位于 273.8nm、224.2nm、199.4nm;经 16.5kHz、150W 超声波处理 10 分钟后,三个吸收峰分别位于 273nm、223.8nm、200.4nm(图 2)。与未经超声处理的酶相比,超声波处理后酶的主要吸收峰都基本没有变化,只是较小的两个吸收峰吸光值均有所增大。

紫外差示光谱:经 16.5kHz、150W 的超声波处理 10 分钟后,木瓜蛋白酶的紫外差示光谱(图 3)显示,酶在 274.6nm 处出现一个明显的正峰,在 232.4nm、226.6nm 处也出现正峰;此外,在 190~221 nm 范围内有大量的正峰出现,且差吸收值较大。

处理后的酶放置 10 分钟时,紫外差示光谱(图 4)发生明显变化。281.6nm 处有一个很小的正峰,在 240.8nm 处出现一个大正峰,235.4nm、231 nm 处也有明显的正峰,此外,在

224.2 nm 处也有小正峰。处理后放置 20、30、40、50、60 分钟时,其紫外差示光谱不断变化,吸收峰基本不变,但 281nm 附近的差示吸收峰逐渐消失;吸收强度改变,235 nm 附近的吸收峰强度逐渐增大。

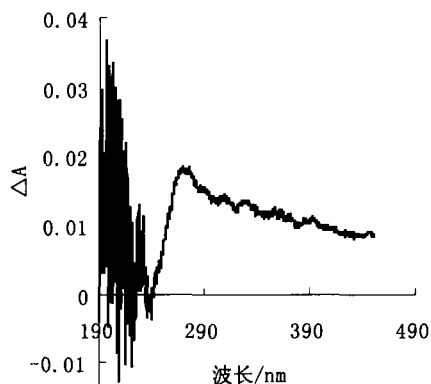


图3 16.5kHz、150W 超声波处理木瓜蛋白酶紫外差示光谱

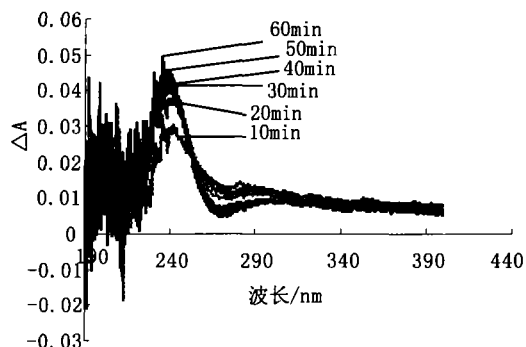


图4 16.5kHz、150W 超声波处理木瓜蛋白酶放置 10~60 分钟紫外差示光谱

荧光光谱:天然木瓜蛋白酶溶液(图 5)有两个荧光发射峰,分别位于 342.8nm、559 nm 处;经实验鉴定,第二发射峰(559 nm)与背景溶液的发射峰吻合,因而认为此峰是由背景溶液中激活剂与酶分子相互作用引起,不是木瓜蛋白酶分子的特征发射峰。经超声波处理后,木瓜蛋白酶的第一个荧光发射峰略向低波长移动,位于 339.6nm(图 6),但发射波长并没有较大的改变,因而不是酶分子构型改变的结果。

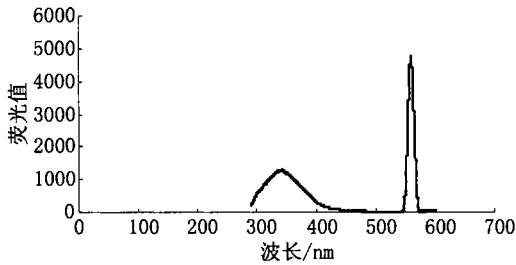


图 5 木瓜蛋白酶荧光发射光谱

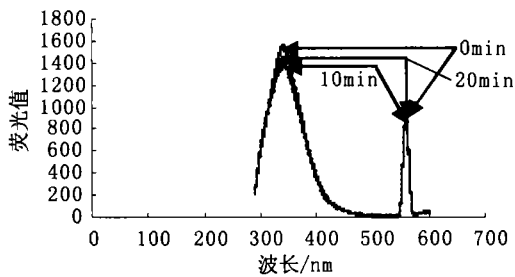


图 6 超声波处理后放置 0、10、20 分钟木瓜蛋白酶荧光发射光谱

处理后的酶放置 10 分钟后,荧光光谱第一发射峰红移,位于 341.2 nm,荧光值略有降低;第二发射峰未变,位于 558.8 nm,荧光值略有增强。放置 20 分钟后,第一发射峰继续红移,位于 343.6 nm,荧光值略高于放置 10 分钟时相应值;第二发射峰未变,荧光值则降低(见图 6)。

4 讨论

超声波处理后木瓜蛋白酶的 K_m 减小,说明酶与底物的亲和力变大,可能原因是:超声改变了酶分子的构象,使其和底物的契合程度加大;超声改变了底物(本实验中为酪蛋白)的构象,使其与酶的亲和力增强;由于微声流的作用,使底物和酶接触次数增加,表现为二者亲和性变大。酶的 V_m 也变小,可能是由于酶与底物的 K_m 很小,随着底物浓度增大,酶很快被饱和,反应速度不能随着底物浓度的增加而增大,而且在高底物浓度时活力被抑制。 K_m 和 V_m 都变小,前者是主要影响因素,所以

超声波处理后酶活力增大。

一般认为在 230nm 波长以下的紫外吸收光谱的变化反映酶蛋白主链构型的变化,240~300nm 波长范围内的变化主要是色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)的作用。紫外吸收光谱的研究表明,木瓜蛋白酶中肽键吸收最强烈,Tyr 和 Trp 有一定程度的吸收,Phe 吸收最微弱;超声波处理后该酶的分子构型并没有发生变化,分子的各种共价键依然保持原来的结构。紫外差示光谱表明处理后酶的构象发生了非常明显的变化,Tyr、Trp 微环境改变,因而出现差示吸收峰;190~221 nm 范围的大量正峰说明酶的二级结构发生了明显的变化,可能是主链上大量基团变得比较暴露。处理后的酶放置过程中紫外差示光谱的变化表明,Trp 吸收强度大幅度下降,而 Tyr 或 Cys 吸收强度则增大;说明酶的构象仍在变化,可能是由超声引起的 Trp 微环境变化逐渐恢复原状,而 Tyr 吸收强度的不断增加可能是其逐渐暴露所致。放置过程中二级结构变化不大。

蛋白质的内源荧光来自 Trp、Tyr 和 Phe,三者最大荧光强度的波长分别是 348,303 和 282nm^[19]。木瓜蛋白酶经超声波处理后,第一荧光发射峰荧光值增大;表明 Trp 所处的微环境极性降低,可能是因为超声作用改变酶分子构象,使 Trp 处于较为疏水的环境中。第二发射峰基本不变,但荧光值大大降低,可能是超声处理改变酶的构象,影响激活剂与酶之间的互作,从而使荧光强度急剧减小。处理后的酶放置一段时间后,Trp 所处微环境极性逐渐增大,酶分子逐渐恢复到天然构象状态。这进一步说明适宜参数的超声波处理时酶活性的变化是声波能量使酶分子构象改变的结果。

综上所述,可以初步认为超声在酶促反应过程中起作用的机理是:(1)直接作用于底物,使其溶解度增大,或者改变底物(底物为蛋白质时)的构象,使底物在反应中更易被酶催化降解;(2)产生微声流,对底物和酶分子产

生一定程度的冲击,使二者接触次数增加,进而促进反应速率增加,产物在此微声流作用下也可能释放速度加快;(3)通过稳态空化产生一定的能量,传递给反应系统,从而改善底物进入酶及产物进入溶质的传质扩散过程;(4)改变酶分子构象,使其空间结构更适宜与底物结合发挥催化功能。

参 考 文 献

- [1] 赵元藩,丁认全.木瓜蛋白酶的加工工艺及应用.云南师范大学学报,1999,19(5):46-48.
- [2] 方焕,生吉萍,吴显荣.工业生产中木瓜蛋白酶的活性检测方法比较.食品与机械,2000,(6):27-29.
- [3] 乙引,陈平,王茜,等.木瓜蛋白酶应用开发的性质研究.贵州师范大学学报(自然科学版),1998,16(4):17-20.
- [4] 姚文兵,吴梧桐,范光斌,等.不同来源木瓜蛋白酶合成 Aspartame 前体能力的研究.中国药科大学学报,1994,25(2):113-116.
- [5] 乙引,张显强,唐金刚,等.木瓜蛋白酶的纯化和性质.贵州师范大学学报(自然科学版),2002,20(1):11-14.
- [6] Ateqad N. Effect of ultrasound on papain. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 1985, 22(3):190-192.
- [7] Evgeni N Vulfson, Dotglas B Sareg and Barry A Law. Enhancement of subtilisin-catalyzed interesterification in organic solvents by ultrasound irradiation. Enzyme Microb. Technol., 1991, 13(2):123-126.
- [8] Barton S, Bullock C, Weir D. The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance. Enzyme Microb. Technol., 1996, 18(3):190-194.
- [9] Sakakibara M, Wang D, Takahashi R, et al. Influence of ultrasound irradiation on hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase. Enzyme Microb. Technol., 1996, 18: 444-448.
- [10] 朱国辉,黄卓烈,徐凤彩,等.超声波对菠萝蛋白酶活性和光谱的影响.应用声学,2003,22(6):10-14,38.
- [11] 钱春梅,谭兆赞,李云,等.超声波对菜豆种子超氧化物歧化酶活性的影响.华南农业大学学报,2004,25(3):73-77.
- [12] 黄卓烈,林茹,何平,等.超声波对酵母过氧化氢酶及多酚氧化酶活性的影响.中国生物工程杂志,2003,23(4):89-93.
- [13] 陈小丽,黄卓烈,巫光宏,等.超声波对淀粉酶催化活性的影响.华南农业大学学报,2005,26(1):76-79.
- [14] 陈海英,张春红,孙焕,等.超声波对中性蛋白酶解谷朊粉影响的研究.食品工业科技,2006,27(5):75-77.
- [15] 陶宙镛,谭知敏,黄荣芳.菠萝蛋白酶活力测定法的改进.药物分析杂志,1982,2(2):102-103.
- [16] Bradford R M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem., 1976,72: 248-254.
- [17] 李春喜.生物统计学.第二版.北京:科学出版社.2000:86-89.
- [18] 沈同,王镜岩.生物化学.第二版.北京:高等教育出版社.1990:250-251.
- [19] 陶慰孙.蛋白质分子基础.北京.人民教育出版社,1987:254-262.