

超声波对菠萝果蛋白酶活性和光谱的影响^{*}

朱国辉¹ 黄卓烈^{1**} 徐凤彩¹ 詹福建¹ 巫光宏¹ 丘泰球²

(1 华南农业大学生命科学学院 广州 510642)

(2 华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510641)

2002年8月28日收到

摘要 以菠萝果为材料,用盐析法制备菠萝果蛋白酶粗酶,进一步经 Sephadex G-50 和 DEAE-纤维素柱层析纯化,其 SDS-PAGE 呈单一的电泳带,并获得了菠萝果蛋白酶结晶。一定参数的超声作用可以使酶活力提高,经光谱分析,超声处理后酶的吸收光谱不改变,而荧光发射峰由 336nm 红移到 339nm,紫外差示光谱在一定的波长也呈现出明显的正峰和负峰。本文讨论了超声波影响菠萝果蛋白酶活性的机理。

关键词 菠萝果蛋白酶, 超声波, 光谱分析

Effect of ultrasound on the activity and spectrum of fruit bromelain

ZHU Guohui¹ HUANG Zhuolie^{1**} XU Fengcai¹ ZHAN Fujian¹

WU Guanghong¹ QIU Taiqiu²

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

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

Abstract Crude fruit bromelain was prepared from fruit juice of pineapples by means of salting out with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. It was further purified by chromatography on gel filtration on Sephadex G-50 and DEAE-cellulose. The preparation was shown to exhibited a single band on SDS-PAGE and was crystallized on 4°C after keeping at low temperature for a period of time. The activity of fruit bromelain was increased when it was treated by sufficient ultrasound. The spectrum analysis showed that the fluorescence emission peak of the enzyme affected by ultrasound was red-shifted from 336nm to 339nm. Differential UV-spectra also presented distinct negative peaks and positive peaks. The action mechanism of the effect of ultrasound on fruit bromelain activity was discussed.

Key words Fruit bromelain, Ultrasound, Spectrum analysis

1 引言

于菠萝茎叶和果实中的蛋白水解酶,其中存在于果中的菠萝蛋白酶称为菠萝果蛋白酶 (EC 3.4.22.5)。根据 Ota 等人的研究^[1],菠萝果蛋白

* 国家自然科学基金 (10074016 和 10174021)、广东省教育厅资助项目

** 通讯作者。 Corresponding author.

酶至少有 2 个组分, 分别称为 FBA 和 FBB。菠萝蛋白酶有广泛的用途, 在医药、食品、轻工、化妆品和生物科学等方面应用较多^[2-4]。但是由于菠萝蛋白酶本来是在生物细胞内合成并在细胞内行使功能的, 一旦提取出来用于细胞外的环境时, 再也没有细胞内部的那种适宜环境, 其分子构象可能发生改变。因此人们生产的各种生物酶制剂与生物体内的酶相比, 其生物学活性和稳定性已大为下降。为了使菠萝蛋白酶得到充分的应用, 运用各种外来手段提高其活力及稳定性显得尤为重要。

超声波是一种物理波。其在生物学上的应用越来越广泛。近年来有人开始将超声波的能量作用于酶分子, 使其活性改变^[5-8], 从而达到人为控制酶促反应的目的。本文报道使用功率超声提高菠萝蛋白酶活性的实验结果, 并且对超声波影响其活性的作用机理进行探讨。

2 实验方法

2.1 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

菠萝果蛋白酶的纯度鉴定和相对分子质量的测定在 DY-600 型电泳仪上用 SDS 聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳法进行。浓缩胶的浓度为 3.7%, 分离胶的浓度为 7.5%。点样量为每样品槽 50 μ L。以美国 Sigma 公司的相对分子质量为 14400-97400 的蛋白组为标准蛋白。电泳后用考马斯亮蓝 R-250 染色 1 小时。用对数作图法计算菠萝果蛋白酶的相对分子质量。

2.2 菠萝果蛋白酶吸收光谱和荧光光谱的测定

将菠萝果蛋白酶的纯酶在 H66025 型超声发生器上用一定参数的超声波处理后, 用 Ultrospec 4000 紫外/可见光谱仪测定其紫外吸收光谱; 用 Hitachi 850 荧光仪测定荧光发射光谱。以观察经超声处理的酶分子的紫外吸收光谱和荧光发射光谱与未经处理的有否区别。

2.3 菠萝果蛋白酶的紫外差示光谱测定

将菠萝果蛋白酶纯酶用超声波处理后, 分

别在 0 分钟和 10 分钟用 Ultrospec 紫外光谱仪测定其紫外差示光谱。以确定经超声处理后菠萝果蛋白酶的分子构象是否起了变化。

2.4 蛋白质含量和菠萝果蛋白酶活性的测定方法

菠萝果蛋白酶活性的测定采用陶宙谔等人^[9]的方法进行, 以美国 Sigma 公司的酪蛋白为底物, 在 752 紫外光栅光度计测定。酶活力单位定义为: 每 mg 蛋白质每 min 使 275nm 波长光密度变化 0.01 作为一个酶活力单位 (U/mg protein·min)。蛋白质浓度的测定参照 Bradford^[10] 所介绍的方法, 以牛血清蛋白为标准蛋白。

3 结果与分析

3.1 菠萝果蛋白酶的提取和纯化过程

本试验用新鲜菠萝 (*Ananas comosus*) 果为材料。将菠萝果洗干净, 称取果肉若干, 加 0.1mol/L、pH6.0 的柠檬酸缓冲液进行匀浆, 过滤后的滤液加固体 (NH₄)₂SO₄ 盐析, 使溶液中硫酸铵饱和度为 30%。离心后将沉淀溶于 0.1mol/L、pH7.0 的磷酸缓冲液, 即得粗酶液。将粗酶液透析后离心 (5000 转 /min, 10min), 取上清液上 Sephadex G-50 层析柱 (2cm \times 30cm), 以 0.1mol/L、pH 7.0 的磷酸缓冲液洗脱, 流速为 0.5mL/min, 在部分收集器上收集 3.5mL/管, 随时检测酶活性和蛋白质含量。层析结果, 洗脱液出现两个蛋白峰, 其中酶活性峰与第一个蛋白峰重叠 (图 1)。收集第一个峰具有酶活性的洗脱部分, 用聚乙二醇加以浓缩。浓缩液进一步经 DEAE-纤维素离子交换层析柱 (2cm \times 30cm), 用含 0.4mol/L、pH5.8-0.8mol/L NaCl、pH8.0 的磷酸缓冲液进行离子强度线性梯度洗脱^[11], 流速为 0.4mL/min, 在部分收集器上收集 3.5mL/管 (图 2)。收集具有酶活性的部分, 即得到纯酶。每步纯化的过程及其纯化效果见表 1。

取纯化酶进行 SDS-PAGE 电泳, 可看到电泳后纯化酶在凝胶上呈一条蛋白质谱带 (图 3),

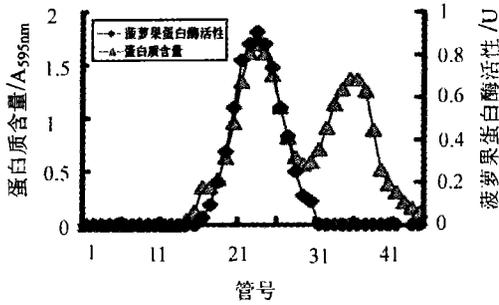


图1 菠萝蛋白酶用 Sephadex G-50 柱层析洗脱程序

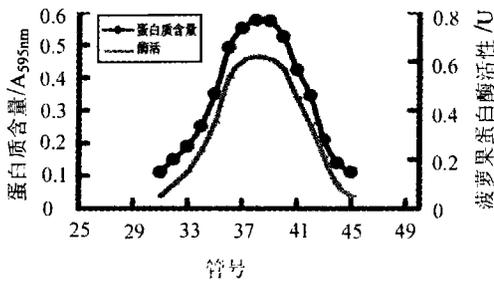


图2 菠萝蛋白酶的 DEAE-纤维素色谱

其相对分子质量相当于 28.8KD。另外,取适量纯酶液保存于 4°C 冰箱,一周后,可观察到有结晶析出,晶形如图 4 所示。

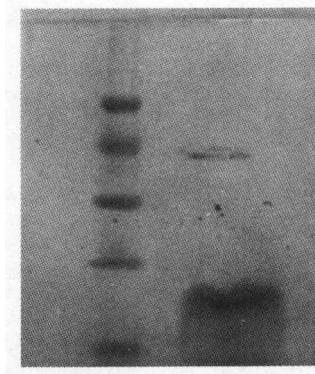


图3 菠萝蛋白酶的 SDS-PAGE 电泳图谱

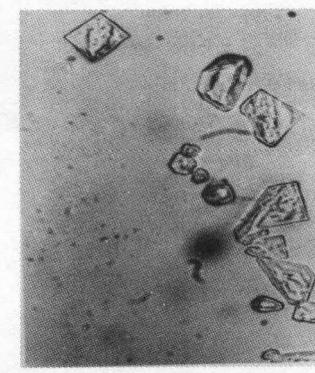


图4 菠萝蛋白酶的结晶体

表1 分离纯化过程中的酶活性的变化

纯化步骤	总体积 (mL)	总蛋白 (mg)	总活性 (U)	比活 (U/mg)	活力回收 (%)	提纯倍数
粗提取液	250	145.8	27375	187.8	100	1
盐析	50	81.8	18525	226.5	67.67	1.21
Sephadex G-50 层析	20.3	66.1	17214	260.4	62.88	1.39
DEAE-纤维素层析	10.0	31.3	9630	307.7	35.18	1.64

3.2 超声波对菠萝蛋白酶催化活性的影响

在菠萝蛋白酶与底物酪蛋白反应的过程中,一定参数的超声作用会在一定程度上改变菠萝蛋白酶的分子构象,并影响其活力。当把酶反应系统置于 H66025 型超声发生器 (50-250W, 16.5kHz, 10min) 时,测得的酶活力都有一定的提高。在 150W 范围内,随着功率的增加,作用效果越明显 (表 2)。当然这种增长不

会是无限的,当作用功率超过 150W 后,酶活力不再增加,并稍有下降。方差分析结果 (表 3) 表明,经超声处理的酶活性极显著地高于不经处理的对照酶活性。

如果把酶反应系统置于较小功率的超声发生器 (20W, 33kHz) 时,发现作用效果并不明显。因此使用超声提高酶活性时,一定范围的超声作用功率是必须的。作用时间也是一个重要

的影响因子, 实验中使用 1min, 3min, 5min 时 一个比较适宜的超声作用参数组合是 150W, 作用效果也不明显, 酶活性没有明显的提高。 16.5kHz, 10min。

表 2 用超声波 (10min, 16.5kHz) 处理和未经超声波处理对菠萝果蛋白酶活性的影响

超声波声功率 (W)	50	100	150	200
未经超声波处理酶活性 (U/mg protein·min)	37.8 ± 1.04	38.4 ± 0.72	26.7 ± 1.77	28.6 ± 3.17
经超声波处理酶活性 (U/mg protein·min)	42.6 ± 0.76	44.9 ± 1.67	31.9 ± 1.17	32.4 ± 1.22
处理酶活性比未经处理酶活性提高 (%)	12.70	16.93	19.48	13.29

注: 3 次重复。

表 3 超声波对菠萝果蛋白酶活性影响的方差分析^[12]

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	标准值 F _{0.05}	标准值 F _{0.01}
功率大小之间	11	117.48	10.68	0.772	2.82	4.46
超声处理与不处理之间	1	816.04	816.04	59.01**	4.84	9.65
误差	11	152.11	13.83			
总变异	23	1085.64				

3.3 菠萝果蛋白酶的吸收光谱和荧光发射光谱分析

为了研究超声作用促进菠萝果蛋白酶催化活性的作用机理, 本研究对菠萝果蛋白酶的吸收光谱和荧光发射光谱进行了研究。首先对纯化的菠萝果蛋白酶进行紫外吸收光谱的扫描, 发现在 280nm 处有一特征吸收峰 (图 5(a))。

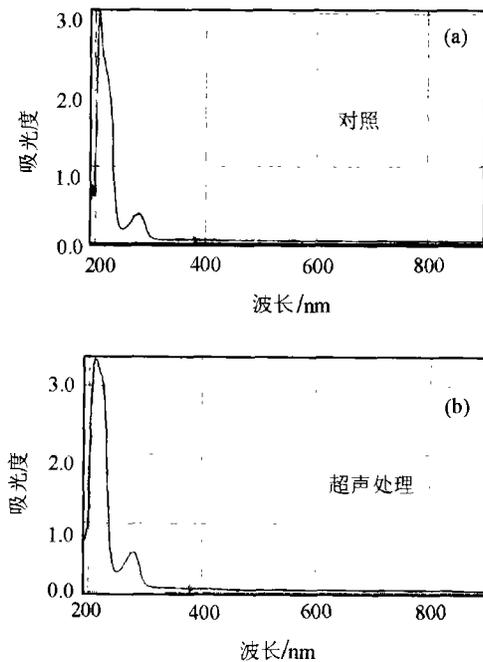


图 5 菠萝果蛋白酶的吸收光谱

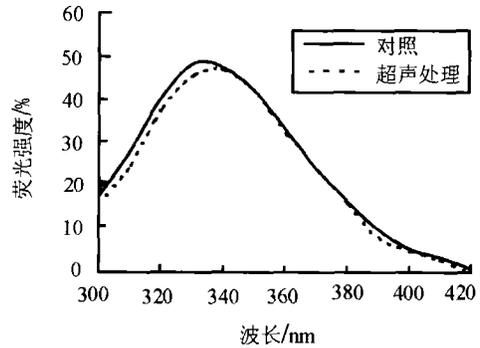


图 6 菠萝果蛋白酶的荧光发射光谱

当用 150W、频率 16.5kHz 的超声处理 10min 后, 菠萝果蛋白酶的紫外吸收光谱与对照的图谱几乎没有差别 (图 5(b))。也就是说, 经超声处理后对菠萝果蛋白酶的吸收光谱没有明显的影响。说明经超声处理后, 酶分子的分子构型没有改变, 分子的原子组成、化学基团和化学键等都没有改变。当以 280nm 为激发波长扫描菠萝果蛋白酶的荧光发射光谱时, 未经超声处理的酶分子的荧光发射峰在 336nm 处 (图 6)。而经超声处理后 (超声处理参数同前) 菠萝果蛋白酶的荧光发射光谱发射峰在 339nm 处, 比对照的酶的发射峰向右红移了 3nm。这个变化从一个侧面证明了经超声作用后菠萝果蛋白酶分子的构型虽然没有变化, 但其构象发生了变化。

3.4 菠萝蛋白酶紫外差示光谱变化

为了进一步探讨超声处理后菠萝蛋白酶分子的构象是否发生了变化,本试验研究了菠萝蛋白酶分子的差示光谱变化。用一定参数的超声(150W, 16.5kHz, 10min)处理菠萝蛋白酶后,立即进行紫外差示光谱的扫描分析。可以看到,在一定的波长范围内出现了大量正峰和负峰(图7(a))。这些正峰和负峰的出现是菠萝蛋白酶经超声处理后分子构象改变引起的。放置10min后,再次进行扫描,此时图谱

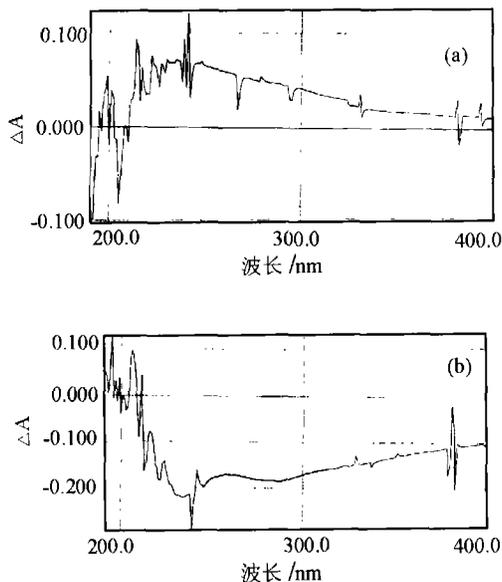


图7 经超声处理后菠萝蛋白酶的紫外差示光谱的变化

已经发生了变化,既有大量负峰,又有正峰(图7(b))。这些结果说明,经超声波处理后,菠萝蛋白酶分子的构象确实发生了明显的变化。由此认为,经超声波处理后酶活性的改变是由酶分子构象的改变所引起的。这是前人研究尚未得到过的新观点。

4 讨论

一定范围的超声作用参数是超声波对酶反

应产生影响的必要因子。实验中,当酶反应系统置于较小功率的超声场时,超声波对酶反应并没有产生影响,而加大其功率,作用效果明显。因此我们可以推测,只有当超声达到一定的能量水平时,才有可能对酶分子产生影响,并从宏观上表现出酶活性的变化。

超声在介质中的相互作用机制可分为加热作用、机械作用及空化作用^[13],其作用的强弱与超声波的频率和强度有关。实验中所有的酶促反应都是恒温条件下完成的,不存在加热效应。因此超声作用对酶活性的提高似乎可以从另外两个机制来解释。首先,超声在介质中传播时,加速了介质中的质量传递作用。这有利于反应底物进入酶的催化部位及产物进入介质的传质作用,从而表现出酶活性的增加。超声作用产生的空化效应是酶活性提高的主要原因。超声空化是指液体中气泡在声场作用下发生的一系列动力学过程,表现为泡核的振荡、生长、收缩及崩溃等过程。气泡的收缩至崩溃瞬间,可产生强大的冲击波。在酶促反应中,这种冲击波可以改变酶分子的构象,从而影响酶促反应的进程。有研究表明:酶活力的表现在很大程度上依赖于酶分子的构象^[14]。本试验中也观察到,超声处理后的酶分子的荧光发射光谱发生了变化,紫外差示光谱在一定的波长呈现正峰和负峰,这说明酶分子构象已经发生了变化,并导致了酶活性的提高。因此可以说,适宜的声场作用会使菠萝蛋白酶分子的构象发生变化,使其折叠更合理,更容易与底物结合成中间产物,从而提高酶的催化活力。

超声作用引起了酶分子构象的改变,这种改变是可逆的。在不同的时间段,可以测得超声处理后酶的紫外差示光谱是变化的(图7)。这意味着超声作用对酶分子构象的改变不是永久性的改变,而是具有一定的半衰期的改变。也就是在超声处理时,酶分子的构象会发生相应的变化。而在停止超声波处理后的一段时间内,酶分子的构象又会慢慢地恢复。

(下转第38页)

$$R = \frac{K_s \beta^2}{1 - \beta - \frac{K^*}{K_s} + \beta \frac{K_s}{K_f}} \quad (\text{A4})$$

$$\rho_{11} + \rho_{12} = (1 - \beta)\rho_s \quad (\text{A5})$$

$$\rho_{22} + \rho_{12} = \beta\rho_f \quad (\text{A6})$$

$$\rho_{12} = (1 - \alpha(\omega))\beta\rho_f \quad (\text{A7})$$

$$K_s = \frac{E_s}{3(1 - 2\nu_s)} \quad (\text{A8})$$

$$\mu^* = \frac{E^*}{2(1 + \nu^*)} \quad (\text{剪切模量}) \quad (\text{A9})$$

$$E^* = E_s(1 - \beta)^n \quad (\text{杨氏模量}) \quad (\text{A10})$$

$$K^* = \frac{E^*}{3(1 - 2\nu^*)} \quad (\text{体积模量}) \quad (\text{A11})$$

其中 K_s 、 K_f 和 K^* 分别为松质骨组织、骨髓和骨架的体积模量, β 为松质骨孔隙度, E_s 为松质骨组织的杨氏模量, E^* 为小梁骨架的杨氏模量, ν_s 和 ν^* 分别为松质骨组织和骨架的泊松比, $\alpha(\omega)$ 为动力扭曲度。

参 考 文 献

- 1 曹海伟, 梁峭嵘, 郎江明等. 中国骨质疏松杂志, 2001, 7(2): 110-112.
- 2 Gluer C C. *J. Bone Miner. Res.*, 1997, 8: 1280-1288.
- 3 Langton C M. *Clin. Rheum*, 1994, 13(Suppl): S113-S117.
- 4 Njeh C F, Boivin C M, Langton C M. *Osteopor. Int.*, 1997, 7(1): 7-22.
- 5 Njeh C F. PHD thesis. Sheffield, UK: Sheffield Hallam University, 1995.
- 6 Abendschein W, Hyatt G W. *Clin. Orthopaed Related Res.*, 1970, 69: 294-301.
- 7 Rho J Y. *Med. Biol. Eng. Computing*, 1998, 36(1): 57-59.
- 8 Hosokawa A, Otani T. *J. Acoust. Soc. Am.*, 1997, 101(1): 558-562.
- 9 Biot M A. *J. Acoust. Soc. Am.*, 1956, 28(2): 168-178.
- 10 Biot M A. *J. Acoust. Soc. Am.*, 1956, 28(2): 179-191.
- 11 Williams J L. *J. Acoust. Soc. Am.*, 1992, 92(2): 1106-1112.
- 12 Lauriks W, Thoen J, Van Asbroek I, et al. *J. Phys.*, 1994, 4: 1255-1258.
- 13 Kaczmarek M, Pakula M, Kubik J. *Ultrasonics*, 2000, 38: 703-707.
- 14 Lawrence D E P, Don C G. *J. Acoust. Soc. Am.*, 1996, 97: 1477-1485.
- 15 Hughes E R, Leighton T G, Petley G W, et al. *Ultrasound in Med. & Biol.*, 1999, 25(5): 811-821.
- 16 Lakes R S, Yoon H S, Katz J L. *Science*, 1983, 220: 513-515.
- 17 Nicholson P H F, Strelitzki R. *Ultrasonics*, 1999, 37: 445-449.
- 18 Mckelvie M L, Palmer S B. *Phys. Med. Biol.*, 1991, 36: 1331-1340.
- 19 Williams J L, Grimm M J, Wehrli F W, et al. *Prediction of frequency and pore size dependent attenuation of ultrasound in trabecular bone using Biot's theory. Selvadurai, A.P.S., Ed. Mechanics of Poroeastic Media. Dordrecht: Kluwer, 1996. 263-274.*
- 20 Wear K A. *IEEE Trans. UFFC*, 2001, 48(4): 1079-1083.
- 21 Schoenberg M. *Wave Motion*, 1984, 6: 303-320.
- 22 Hosokawa A, Otani T. *J. Acoust. Soc. Am.*, 1998, 103(1): 2718-2722.

(上接第 14 页)

参 考 文 献

- 1 Ota S, Muta E, Katahira Y et al. *J. Biochem.*, 1985, 98: 219-228.
- 2 Vallejo-Cordoba B, Nakai S, Powrie W D et al. *J. Food Sci.*, 1986, 51(5): 1156-1161.
- 3 林韶湘, 黄卓烈, 李明启等. 植物资源与环境, 1994, 3(2): 22-26.
- 4 颜青, 陈瑞川, 郭大勇等. 厦门大学学报(自然科学版), 1999, 38(1): 103-107.
- 5 Barton S, Bullock C, Weir D. *Enzyme Microb. Technol.*, 1996, 18(3): 190-194.
- 6 Ateqad N, Iqbal J. *Indian J Biochem Biophys*, 1985, 22(3): 190-192.
- 7 Toba T, Hayasaka I, Taguchi S. *J. Sci. Food Agric.*, 1990, 52: 403-407.
- 8 Evgeni N, Vulfson D, Sarney B, et al. *Enzyme Microb. Technol.*, 1991, 13: 123-126.
- 9 陶宙铭, 谭知敏, 黄荣芳. 药物分析杂志, 1982, 2: 102-103.
- 10 Bradford R M. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248-254.
- 11 李建武, 萧能庚, 余瑞元等. 生物化学实验原理和方法, 北京: 北京大学出版社, 1994.
- 12 南京农业大学. 田间试验设计和统计方法. 北京: 农业出版社, 1985.142-164.
- 13 冯若, 赵逸云, 李化茂. 生物化学与生物物理进展, 1994, 21(6): 500-503.
- 14 邹承鲁. 科学通报, 1989, 34(5): 321-325.