

文章编号:1673-1689(2005)02-0050-05

# 超声波对胰蛋白酶水解酪蛋白的影响

朱少娟, 施用晖\*, 乐国伟

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

**摘要:** 研究了超声场下胰蛋白酶水解酪蛋白的酶解反应条件与动力学. 在超声波频率 20 kHz、作用与间歇时间比为 1:1 时, 测定了不同功率下胰蛋白酶活性及该酶的最适温度、最适 pH 和米氏常数  $K_m$  的影响. 结果表明, 180, 225 W 功率下, 超声 10 min 的酪蛋白水解率显著高于常规对照组 ( $P < 0.05$ ); 225 W 超声功率下, 在 5 °C, 10 °C, 20 °C 下水解率分别比对照组提高 4.4 倍、2.47 倍和 2.33 倍 ( $P < 0.01$ ); 超声场下胰蛋白酶  $K_m$  值减小,  $V_m$  增大. 将胰蛋白酶、底物分别进行超声处理, 紫外和荧光光谱分析观察到, 超声处理后, 酶溶液荧光发射光波长从 334 nm 移至 332 nm, 荧光强度提高, 表明一定的超声波可能使酶及底物分子构象发生变化, 提高胰蛋白酶水解活性.

**关键词:** 超声波; 胰蛋白酶; 酪蛋白; 酶动力学特性; 光谱分析

中图分类号: Q 556

文献标识码: A

## Effects of Ultrasound on the Hydrolysis of Casein by Trypsin

ZHU Shao-juan, SHI Yong-hui\*, LE Guo-wei

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** The activity and hydrolysis kinetics of trypsin were studied under ultrasonic field. Hydrolysis percentages in the presence and absence of ultrasound were compared. The hydrolysis percentages of casein were increased under 180 W and 225 W ultrasonic powers for 10 min. The temperature curve changed significantly in the presence of ultrasound, the hydrolysis percentages subject to ultrasound were about 4.4, 2.47, 2.33 times higher than those under ordinary conditions at 5 °C, 10 °C, and 20 °C. The optimal pH value for trypsin subject to ultrasound was similar to that of the control condition, and  $K_m$  value decreased. The casein and trypsin were pretreated by the ultrasound. The result showed that pretreatment of casein increased the hydrolysis percentage. The spectrum analysis showed that the trypsin fluorescence intensity became stronger, and the trypsin fluorescence emission peak blueshifted from 334nm to 332nm after the ultrasonic treatment.

**Key words:** ultrasound; trypsin; casein; enzymatic kinetics; spectrum analysis

酶法对食品蛋白质进行改性, 是有效改善蛋白质的物理、化学性质, 提高适口性、贮存与营养特性

的技术. 近年来, 随着声学技术向生物、食品技术领域不断渗透<sup>[1,2]</sup>, 应用超声技术提高水溶液中酶活

收稿日期: 2004-05-19; 修回日期: 2004-10-30.

作者简介: 朱少娟(1978-), 女, 宁夏中卫人, 食品营养硕士研究生; \* 为通讯作者.

万方数据

力、促进酶催化反应已有一些研究报道<sup>[3]</sup>。超声波是频率大于 20 kHz 的声波,具有波动与能量的双重属性。当超声强度超过一定值时,可以通过传声媒质相互作用,影响和改变传声媒质的状态、性质及结构。超声可使液体介质中形成微泡,其破裂及伴随能量的释放,可以提高许多化学反应的反应速度,改善目的产物的选择性,引起了许多学者的关注,超声对不同酶、底物作用效果不尽一致,作用机理尚不清楚。作者主要研究超声波对胰蛋白酶反应速度、最适 pH 值、最适温度及其米氏常数  $K_m$  的影响,并通过光谱分析,初步探讨超声波促进酶反应机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

试剂:酪蛋白:中国医药(集团)上海化学试剂公司产品;胰蛋白酶(1:250):上海化学试剂分装厂产品;考马斯亮蓝(G250):上海化学试剂采购供应站经销。

仪器:KS-900 超声波细胞破碎仪:宁波科生仪器厂生产;722 光栅分光光度计:上海精密科学仪器有限公司生产;数显电热恒温水温箱:上海跃进医疗器械厂生产;F96 荧光分光光度计:上海棱光技术有限公司生产;UV-2102PCS 型紫外可见分光光度计:尤尼柯(上海)仪器有限公司生产。

### 1.2 实验方法

常规酶解:恒温水浴箱中将酪蛋白溶液和酶溶液预热,将酶溶液加入到酪蛋白溶液中,在设定的恒温条件下进行酶解反应,不同反应时间下取样,测定底物水解率。

超声酶促反应:与常规酶解相同温度和 pH 值条件下,在超声频率为 20 kHz,超声作用与间歇时间比为 1:1,于不同的超声输出功率和反应时间下,测定底物水解率。

### 1.3 酶水解率、水解速度的测定

参照 Bradford 的考马斯亮蓝 G250 染色法<sup>[4]</sup>测定反应不同时间时的蛋白含量,计算水解率和水解速度。水解率=(反应零时刻时的蛋白质质量-反应终止时刻的蛋白质质量)/反应零时刻时的蛋白质质量;水解速度=(反应零时刻时的蛋白质质量-反应终止时刻的蛋白质质量)/反应时间(min)。以酪蛋白为标准蛋白。

### 1.4 紫外吸收和荧光发射光谱分析

将 0.01 g/dL 胰蛋白酶溶液、0.1 g/dL 酪蛋白溶液,用一定参数的超声波分别处理后,进行紫外

吸收光谱、荧光发射光谱扫描测定。紫外吸收光谱扫描波长为 190~340 nm;荧光激发波长 256 nm,发射光谱扫描波长 200~500 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同超声功率对酶解速度的影响

质量浓度为 1.0 mg/dL 的酪蛋白溶液 10 mL,加入 0.002 mg/dL 胰蛋白酶溶液 5 mL,分别在无超声场和输出功率为 90,180,225 W 的超声场下进行酶解反应,不同时间下取样测定水解率。结果见图 1。

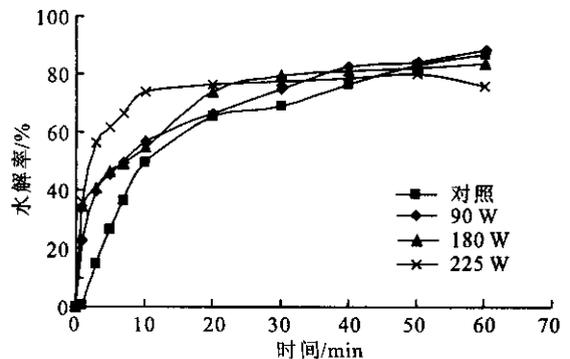


图 1 不同超声功率对水解率的影响

Fig. 1 Effect of ultrasonic power on the hydrolysis

从图 1 中可以看出,在反应的前 40 min 内,超声场下酪蛋白水解率均高于对照组,尤其在反应的前 10 min,超声场下的水解率显著高于对照( $P < 0.05$ )。黄卓烈<sup>[5]</sup>研究观察到,一定参数的超声波对多酚氧化酶和过氧化氢酶活性均有显著提高。Sakakibara 等观察到,在 3 种不同的超声强度下蔗糖酶水解蔗糖水解速度均高于对照<sup>[6]</sup>,与试验结果基本一致。

图 1 可见,不同功率超声对水解率影响有差异。在超声功率为 225 W 时底物水解率最高,10 min 时比对照组提高 48.8%,随着反应的进行,225 W 时超声场对酶解速度的促进作用减弱,20 min 时高于对照 16.5%,30 min 时高于对照 12.5%,60 min 后水解率低于 90 W、180 W 组和对照。而 90 W 和 180 W 组的水解速度仍呈缓慢升高趋势。

### 2.2 超声波对酶反应最适温度的影响

不同温度下,反应 10 min,测蛋白水解率结果见表 1、图 2。温度设置为:5,10,20,30,40,50,60,70 °C。超声条件为:超声时间与间歇时间比为 1:1,频率 20 kHz,输出功率 225 W。

超声场下胰蛋白酶的曲线发生了显著的变化。在 5~30 °C 范围内,底物水解率极显著高于对照( $P < 0.01$ ),水解率变化相对平缓,与对照的钟

形曲线不同;在 5 ℃ 时超声场下的水解率达到 54%,比对照提高了 4.4 倍;20 ℃ 时比对照高 2.33 倍;40 ℃ 时与对照水解率基本相同,50 ℃ 达到超声反应最佳反应温度,而常规酶解条件下 40 ℃ 为最佳温度.高大维等(1994)对超声波条件下糖化酶的研究中,未观察到温度对糖化酶活性影响<sup>[7]</sup>,可能是由于酶的种类不同所致.当水浴温度大于 50 ℃ 时,超声场下的酪蛋白水解率迅速降低,下降速率快于对照组.超声波作为一种能量形式,具有加热作用和空化作用,对酶反应可产生促进或抑制双重

表 1 超声波对酶反应最适温度的影响

Tab. 1 Effect of ultrasound on optimal enzyme reaction temperature

酶反应温度	5 ℃	10 ℃	20 ℃	30 ℃	35 ℃	40 ℃	50 ℃	60 ℃	70 ℃
对照	0.100±0.006 <sup>A</sup>	0.173±0.020 <sup>A</sup>	0.218±0.020 <sup>A</sup>	0.541±0.018 <sup>A</sup>	0.659±0.030 <sup>a</sup>	0.768±0.025 <sup>a</sup>	0.633±0.015 <sup>A</sup>	0.436±0.020 <sup>A</sup>	0.295±0.020 <sup>a</sup>
超声	0.540±0.014 <sup>B</sup>	0.600±0.020 <sup>B</sup>	0.727±0.004 <sup>B</sup>	0.736±0.007 <sup>B</sup>	0.759±0.016 <sup>a</sup>	0.777±0.004 <sup>b</sup>	0.786±0.006 <sup>B</sup>	0.536±0.006 <sup>B</sup>	0.164±0.006 <sup>b</sup>

实验重复 2 次;字母大写为极显著( $P < 0.01$ ),小写为显著( $P < 0.05$ ),字母相同为不显著.

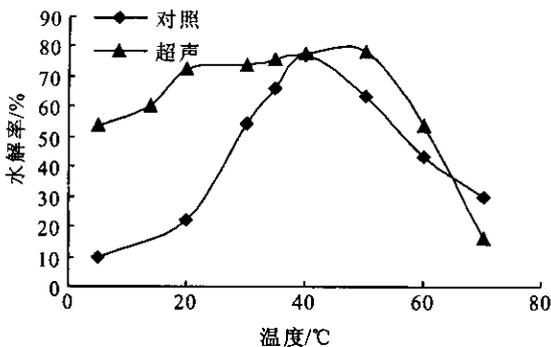


图 2 超声波对酶的最适温度的影响

Fig. 2 Effect of ultrasound on optimal enzyme temperature

### 2.3 超声波对酶反应最适 pH 的影响

取不同 pH 值的酪蛋白溶液及酶液,与 2.2 相同的超声条件下反应 10 min,测水解率.

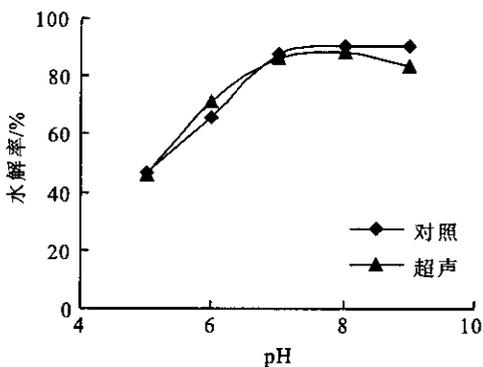


图 3 超声波对酶的最适 pH 的影响

Fig. 3 Effect of ultrasound on optimal enzyme pH

由图 3 可见,该超声条件下对胰蛋白酶的最适 pH 值影响不大,Sakakibara 等研究超声条件下,蔗糖酶水解蔗糖时最适宜 pH 值也未发生改变<sup>[7]</sup>,本

作用.当温度较低时,与空化作用相比,加热作用占主导,超声场下的反应体系吸收超声波能量,从而加速了酶促水解反应,表现为促进作用.随着温度的升高,空化作用显现,在液体介质中微泡的形成和破裂及伴随能量的释放,产生瞬时、局部高温、高压,可产生自由基,如水分子电离产生 H· 和 OH· 自由基,这些自由基进入酶活性中心,破坏酶分子构象,因此,当水浴温度进一步升高时,一方面酶蛋白热变性,另一方面可能是自由基的破坏作用,导致水解率快速下降.

试验结果与其一致.溶液 pH 是决定酶催化活性的重要参数之一,酶只有在有限的 pH 值范围内保持较高的活性;主要由于酶分子活性部位可解离基团的解离状态,随溶液 pH 值的变化而改变,影响到酶的活性以及酶与底物的亲和力.此外,pH 值亦引起底物的带电状态变化,影响酶与底物的结合,使酶催化活力降低或升高.在低 pH 值时,胰蛋白酶活力下降是由于较强的酸性使酶分子发生不可逆变性,而其活性中心的基团被离子化,也直接影响酶与底物的结合以及产物的生成.

### 2.4 超声对酶米氏常数的影响

超声条件为 20 kHz,输出功率 225 W,作用时间与间歇时间比为 1:1 的超声作用下,以不同底物浓度进行酶解反应,以  $[S]$  对  $[S]/V$  作图.

试验结果表明,超声波可影响胰蛋白酶的米氏常数.计算得对照组  $K_m$  为 0.176,  $V_m$  为 1.36;超声场下米氏常数  $K_m$  为 0.169,小于对照组,而  $V_m$  为 1.55.  $K_m$  是反映酶特性的常数,表示酶与底物的亲和能力,  $K_m$  值越小,亲和力越强.  $V_m$  是衡量酶分子转换率的参数,表示当酶浓度不变时,酶受底物饱和,反应速度达到最大的状态.  $V_m$  越大,酶分子将底物转化成产物的效率越高.高大维等、Sakakibara 研究了在超声作用下糖化酶、纤维素酶米氏常数,也出现了变化<sup>[6,7]</sup>.超声波是一种纵波,经过反应液时,对酶与底物分子作用,可能使酶与底物碰撞的几率增多,提高二者的结合几率,表现为亲和力增大;而以能量形式作用于酶分子时,可加快酶分子

的周转,再者超声波的振荡作用,可以加快产物从酶-产物复合物中离去,提高催化效率。

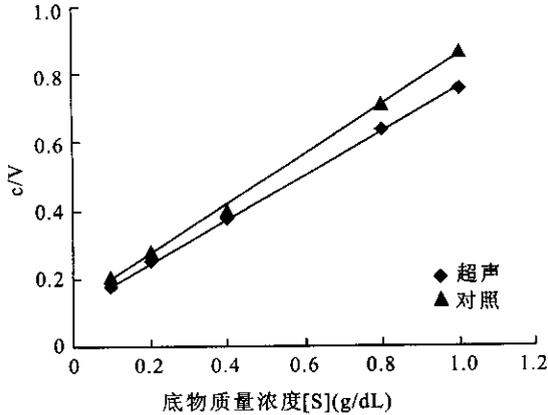


图 4 超声波对酶的  $K_m$  的影响

Fig. 4 Effect of ultrasound on  $K_m$  of trypsin

## 2.5 超声波预处理酪蛋白对酶反应的影响

用超声波分别对质量浓度为 1.0 mg/dL 的酪蛋白溶液分别预处理 20, 60 min, 再加入 0.01 mg/dL 酶溶液 5 mL, 40 °C 保温反应, 分别在 0, 1, 3, 5, 7, 10 min 时测定水解率, 结果见表 2. 底物超声 60 min 预处理后, 酪蛋白水解率高于未处理的水解率 15%, 表明超声波预处理酪蛋白, 可影响酶解反应速度. Masanao Imai 等将纤维素超声波预处理再与酶解共同作用, 观察到纤维素经超声波预处理后再酶解, 酶解速度提高显著<sup>[8]</sup>, 与本试验对酪蛋白预处理的结果相似。

表 2 超声预处理底物对酪蛋白水解率的影响

Tab. 2 Effect of ultrasonic substrate pretreatment on the hydrolysis of casein

反应时间/min	(对照) 水解率	超声处理 20 min 水解率	超声处理 60 min 水解率
1	0.19	0.23	0.34
3	0.33	0.32	0.41
5	0.43	0.41	0.51
7	0.55	0.54	0.6
10	0.58	0.59	0.68

## 2.6 胰蛋白酶、底物的紫外吸收光谱和荧光发射光谱分析

近年来为了研究超声波促进酶催化活性的作用机理, 人们从超声波对溶液中酶分子构象的影响角度进行探讨<sup>[9]</sup>. 配制质量浓度为 0.01 mg/dL 的胰蛋白酶溶液, 用 225 W, 20 kHz 的超声处理 10 min, 对胰蛋白酶溶液进行紫外吸收光谱的扫描, 扫描波长 190~340 nm, 结果见图 5(a, b). 实验观察到, 在 280 nm 附近有一特征吸收峰, 为酪氨酸特征吸收. 荧光光谱扫描在激发波长 256 nm 下, 观察到

荧光强度和发射波长均有变化(见图 6). 胰蛋白酶的荧光发射光谱, 有两个特征吸收, 一个在 280 nm 附近, 为酪氨酸特征吸收, 另一个在 330 nm 附近, 为色氨酸特征吸收. 超声波作用下酶溶液荧光发射光波长从 334 nm 蓝移至 332 nm, 荧光强度提高, 表明超声波使胰蛋白酶的分子中某些基团暴露, 构象发生了变化。

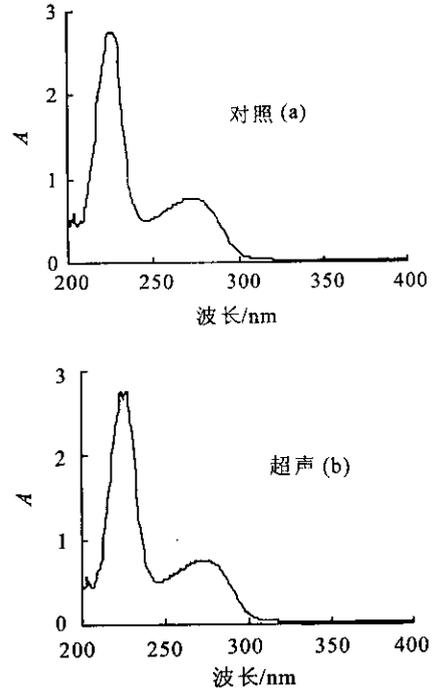


图 5 胰蛋白酶的紫外吸收光谱

Fig. 5 Spectrum of UV absorption of trypsin

底物超声、未超声荧光发射光谱(见图 6)可以看出, 超声预处理 60 min 的酪蛋白溶液, 荧光强度显著提高, 表明超声波引起了酪蛋白荧光基团的暴露或内埋, 使构象发生变化; 结合水解率提高的结果, 说明一定的功率下, 超声波预处理底物, 由于引起酪蛋白一些基团暴露或某些次级键受到影响, 使胰蛋白酶容易作用于其一级结构肽键, 产生肽键断裂, 加速酪蛋白的水解。

## 3 结 论

研究表明, 超声波在一定的功率和作用方式下, 能提高胰蛋白酶水解酪蛋白的速度, 即使酶活性提高, 酶的米氏常数  $K_m$  减小, 酶与底物的亲和力增强; 超声场下在较低温度下, 能显著提高酪蛋白水解率, 在 5 °C 时超声场下的水解率已达到 54%, 比对照提高了 4.4 倍, 达到最高水解率的 31.3%, 在工业生产中具有实际意义. 此外, 超声波使底物和胰蛋白酶荧光光谱、荧光强度发生变化, 超声波对酶作用机理还有待于进一步深入研究。

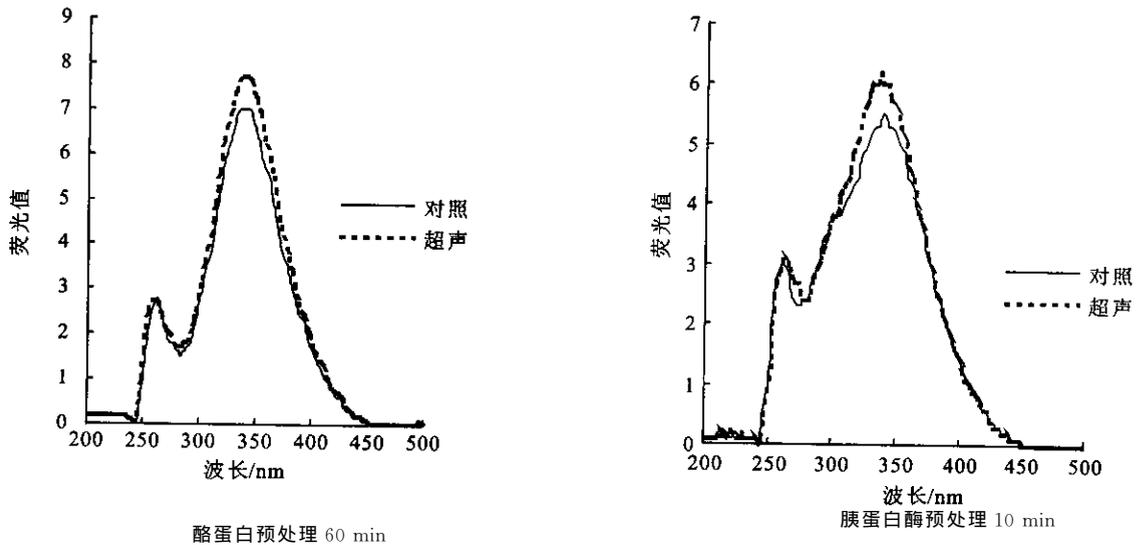


图6 超声对酪蛋白与胰蛋白酶的荧光发射光谱的影响

Fig. 6 Spectrum of fluorescence emission of trypsin

## 参考文献:

- [1] Yusuf Chisti. Sonobioreactors; using ultrasound for enhanced microbial productivity[J]. **TRENDS in Biotechnology**, 2003, 21(2): 89-93.
- [2] Mason T J, L Paniwnyk J, P. Lorimer. The uses of ultrasound in food technology[J]. **Ultrasound Sonochemistry**, 1996, 3: 253-260.
- [3] 朱国辉, 黄卓烈. 功率超声对酶促反应的影响[J]. **应用声学**, 2001, 20(4): 45-48.
- [4] 周慧, 鲁治斌, 齐杰, 等. 蛋白质水解酶活力测定新方法[J]. **生物化学杂志**, 1994, 10(5): 630.
- [5] 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[J]. **中国生物工程杂志**, 2003, 23(4): 89-93.
- [6] Sakakibara M, Wang D, Takahashi R, *et al.* Influence of ultrasound irradiation on hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase[J]. **Enzyme Microb Technol**, 1996, 18: 444-448.
- [7] 高大维, 陈满香. 超声波催化糖化酶水解淀粉的初步研究[J]. **华南理工大学学报(自然科学版)**, 1994, 22(1): 70-74.
- [8] Masanao Imai, Kohei Ikari, Isao Suzuki. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2004, 17: 79-83.
- [9] 丘泰球, 刘石生. 声场对蛋白酶催化活力及分子构象的影响[J]. **声学技术**, 2000, 4: 233-235. (责任编辑: 杨萌)

(上接第49页)

## 参考文献:

- [1] 冯美卿, 曹秀格, 卢永辉. L-丝氨酸制备方法评述[J]. **氨基酸和生物资源**, 2000, 22(3): 42-44.
- [2] 傅莉, 刘信洪, 徐春艳, 等. HPLC法监测DL-丝氨酸的合成研究[J]. **北京化工大学学报(自然科学版)**, 2003, 30(4): 105-108.
- [3] 张炳荣. 氨基酸生产技术讲座[J]. **中国调味品**, 1986, (10)22: 28-32.
- [4] Hideaki Yamada, Silvia Susana Miyazaki. L-Serine production by a glycine-resistant mutant of methylotrophic *Hyphomicrobium metylovorum*[J]. **Agric Biol Chem**, 1986, 50(1): 17-21.
- [5] Yasushi Morinaga, Shigeru Yamada, Koichi Takinami. L-Serine Production by methanol-utilizing bacterium *Pseudomonas MS31*[J]. **Agric Biol Chem**, 1981, 45(6): 1419-1424.
- [6] Yoshiki Tani, Takahiro Kanagawa. Production of L-Serine by a methanol-utilizing bacterium, *Arthrobacter globiformis* SK-200[J]. **Agric Biol Chem**, 1978, 42(12): 2275-2278.
- [7] 范秀容, 沈萍. 微生物学实验[M]. 北京: 人民教育出版社, 1980.
- [8] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [9] 潘家秀, 任梅轩, 徐俊杰, 等. 蛋白质化学研究技术[M]. 北京: 科学出版社, 1962.
- [10] Behrendt U, Bang W G, Wagner F, *et al.* The production of L-serine with a methylotrophic microorganism using the L-serine pathway and coupling with an L-tryptophan-producing process[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1984, 26: 308-314.