

菠萝茎蛋白酶的纯化及酶活力受超声处理影响的机理

陈小丽^{1,2}, 黄卓烈^{*2}

(1. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524088; 2. 华南农业大学 生命科学学院, 广州 510642)

摘要: 对菠萝茎蛋白酶进行纯化和鉴定, 并研究酶活力受超声处理影响的机理。采用羧甲基纤维素柱层析纯化、PAGE 鉴定纯度, 测定纯化的酶经超声波处理后的酶活性、动力学参数以及紫外和荧光光谱。柱层析分离出 3 个蛋白峰区域, 其中第二蛋白峰经电泳鉴定纯度较高。酶经超声处理后 K_m 变小, V_m 也减小; 紫外吸收光谱不变, 而差示光谱出现了明显的正峰和负峰, 荧光发射光谱基本不变。羧甲基纤维素柱层析对菠萝茎蛋白酶纯化效果较好, 超声处理可能通过改变菠萝茎蛋白酶的构象从而改变酶活力。

关键词: 菠萝茎蛋白酶; 纯化; 酶活力; 超声波; 构象

中图分类号: TQ 925.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)05-0473-06

Purification of Stem Bromelain and Mechanism of Effect of Ultrasound on Its Catalysis Activity

CHEN Xiao-li^{1,2}, HUANG Zhuo-lie^{*2}

(1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088; 2. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract: To purify and identify stem bromelain for further study on its activity and mechanism after treated with ultrasound. Stem bromelain was purified and identified with carboxymethyl cellulose chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) respectively. Enzyme activity, kinetic parameter, ultraviolet spectrum and fluorescence spectrum were studied on purified enzyme treated with ultrasound. Three single protein apex regions were separated with gradient elution. The ingredient with the highest activity in the second protein apex region was identified with PAGE, showing considerably high purity. After treatment with ultrasound, both K_m and V_m decreased. No clear changes were observed in the ultraviolet absorption spectrum and the fluorescence emission spectrum while positive and negative peaks occurred in the differential ultraviolet spectrum. Conclusion: Considerably pure component of stem bromelain can be obtained after purified with carboxymethyl cellulose chromatography. It's probably conformation change that results activity change after treatment of the ultrasound on stem bromelain.

Key words: stem bromelain, purification, enzyme activity, ultrasound, conformation

收稿日期: 2011-04-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(10074016 和 10174021)。

作者简介: 陈小丽(1978-), 女, 湖北人, 博士研究生, 讲师, 主要从事生物化学方面的研究。chenxl89@gdou.edu.cn

* 通信作者: 黄卓烈(1950-), 男, 广东人, 教授, 博士生导师, 主要从事天然产物等方面的研究。zhuolieh@scau.edu.cn

菠萝茎蛋白酶(Stem bromelain, EC 3.4.22.32)是来源于菠萝茎的菠萝蛋白酶(Bromelain),广泛应用于制革、食品、饮料、医药等行业^[1-4]。它是一类糖蛋白,至少含有6个蛋白酶组分^[5-7]。由于组分较多,在生产和研究中对其进行纯化尤为重要。本试验即采用阳离子交换层析法分离纯化、阴极电泳鉴定菠萝茎蛋白酶,并通过对酶活力、动力学参数及光谱特性的研究,探讨了酶受超声处理影响的机理。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

菠萝茎蛋白酶、酪蛋白(Casein)为美国 Sigma 公司产品;考马斯亮蓝 G250、R250(Coomassie brilliant blue G250、R250)是从 Fluka 公司进口的生化试剂;羧甲基纤维素(Carboxymethyl cellulose)、聚乙二醇 10 000(Polyethylene glycol)、丙烯酰胺(Acrylamide)、N,N'-甲叉双丙烯酰胺(N,N'-Methylenebis-acrylamide)、TEMED 原液,为进口分装试剂。其他试剂为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备

北京凯奥科技发展有限公司 752 型紫外光栅分光光度计;上海沪西分析仪器厂生产的 BS-100A 自动部分收集器、HL-2 恒流泵、TH-梯度混合器;2.4 cm×30 cm 层析柱;北京六一仪器厂生产的 DYY-III 型电泳槽、DYY-5 型稳压稳流电泳仪;H66025 超声波发生仪,无锡市超声电子设备厂产品;HWS24 型电热恒温水浴锅;上海合恒仪器设备有限公司产品;日本岛津 UV-2401PC 紫外分光光度计;日本日立 F-4500 荧光分光光度计。

1.3 测定方法

在酶的分离和纯化中,柱层析参考前人^[5,8-9]分离菠萝茎蛋白酶的方法,聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)参考何忠效^[10]的方法。以酪蛋白为底物测定菠萝蛋白酶的酶活性,酶活力单位定义为:1 min 内每毫克蛋白质产生酪氨酸的 μg 数($\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{min}$)表示。蛋白质浓度的测定参照 Bradford^[11]的方法,以牛血清蛋白为标准蛋白。

2 结果与分析

2.1 菠萝茎蛋白酶的纯化结果与鉴定

菠萝茎蛋白酶用羧甲基纤维素经梯度洗脱后

分离出3条单独的蛋白峰区域(见图1A),其中第二蛋白峰的蛋白质含量最高,经检测3个蛋白峰均有酶活力,且酶活力峰与蛋白峰基本吻合。3种成分应为菠萝茎蛋白酶的同工酶,可选取其中一种成分进行深入研究。将柱层析得到的第二蛋白峰中酶活力最高的一支管酶液浓缩后进行 PAGE,电泳图谱(见图1B)显示酶纯度较高。

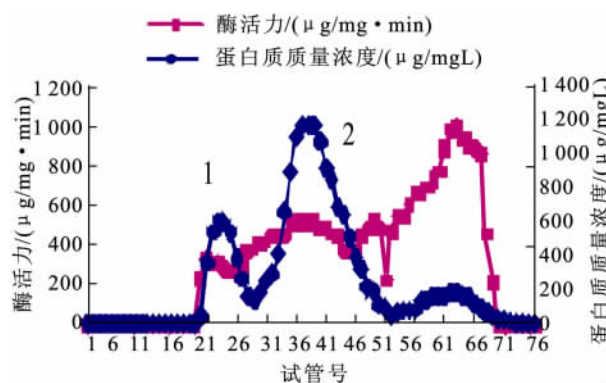


图 1A 菠萝茎蛋白酶 CM-纤维素层析图谱

Fig. 1A CM-cellulose chromatography figure of stem bromelain

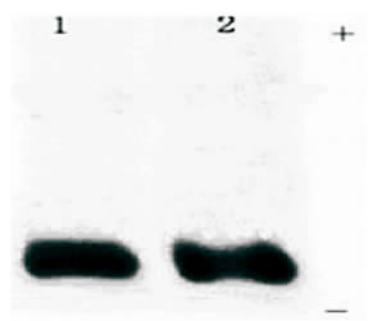


图 1B 菠萝茎蛋白酶 PAGE 图谱

Fig. 1B PAGE figure of stem bromelain

2.2 超声波对菠萝茎蛋白酶催化作用的影响

菠萝茎蛋白酶经过 25W、不同频率的超声波处理 5 min 后,酶活力均有提高(见表 1);采用新复极差法进行多重比较,结果见表 1。该酶经过 16.5 kHz、不同功率的超声波处理 5 min 后(见表 2),或经过 16.5 kHz、20W 的超声波处理不同时间后(见表 3),酶活力均有提高。故激活菠萝茎蛋白酶的最佳超声波参数组合为:频率 16.5 kHz,功率 20W,处理时间 5 min。

表 1 25 W 不同频率超声波处理菠萝茎蛋白酶 5 min 效果
Tab.1 Effect of treatment of ultrasound on stem bromelain with 25W、5 minutes and different frequency

超声频率 (KHz)	酶活力 ($\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{min}$)	差异显著性
0	519.97 ± 5.04	c
13.5	540.19 ± 5.10	b
15	555.08 ± 13.18	ab
16.5	576.82 ± 1.58	a
17	552.95 ± 15.14	ab
18	531.62 ± 7.18	b

注:表中差异显著性为多重比较结果,凡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)

表 2 16.5 kHz 不同功率超声波处理菠萝茎蛋白酶 5 分钟效果
Tab.2 Effect of treatment of ultrasound on stem bromelain with 16.5 kHz、different power and 5 minutes

超声功率 (W)	酶活力 ($\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{min}$)	差异显著性
0	520.59 ± 4.03	c
10	560.45 ± 9.68	ab
15	560.96 ± 9.59	ab
20	584.58 ± 13.47	a
25	563.94 ± 8.30	ab
30	553.47 ± 10.18	b
35	549.44 ± 9.42	b
40	545.39 ± 7.68	b
70	537.47 ± 1.64	b

表 3 16.5 kHz、20 W 超声波对菠萝茎蛋白酶处理不同时间效果
Tab.3 Effect of treatment of ultrasound on stem bromelain with 16.5 kHz、20 W and different time

超声处理时间 (min)	酶活力 ($\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{min}$)	差异显著性
0	525.57 ± 22.54	c
1	555.70 ± 8.31	b
3	569.24 ± 15.30	ab
4	584.11 ± 9.93	ab
5	603.69 ± 9.47	a
6	576.22 ± 9.01	ab
7	570.72 ± 17.45	ab
9	555.94 ± 15.20	b
10	556.70 ± 14.14	b

2.3 菠萝茎蛋白酶动力学研究

用双倒数作图方法(见图 2A)求得菠萝茎蛋白酶纯酶 K_m 值为 $36.94(\text{mg}/\text{mL})$, V_m 值为 $7.22 \times 10^3(\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{min})(37^\circ\text{C}, \text{pH}7.0)$;经适宜的超声波处理后酶的 K_m 值为 $9.18(\text{mg}/\text{mL})$, V_m 值为 $2.46 \times 10^3(\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{min})(37^\circ\text{C}, \text{pH}7.0)$ (见图 2B)。即超声处理后菠萝茎蛋白酶的 K_m 变小,比对照下降了 3.02 倍;而 V_m 也变小,比对照下降了 1.93 倍。

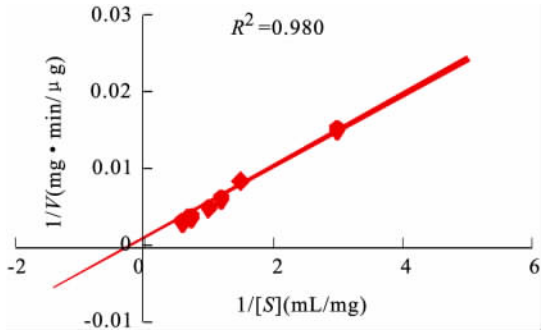


图 2A 菠萝茎蛋白酶催化反应双倒数曲线图谱
Fig. 2A Lineweaver-Burk chart of stem bromelain

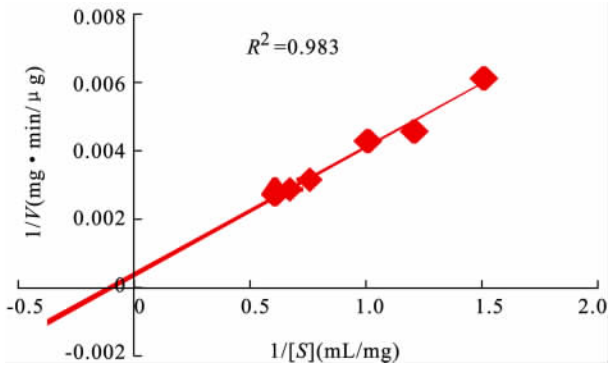


图 2B 菠萝茎蛋白酶超声处理后催化反应双倒数曲线图谱
Fig. 2B Lineweaver-Burk chart of stem bromelain after ultrasound treatment

2.4 菠萝茎蛋白酶的光谱研究

紫外吸收光谱:天然菠萝茎蛋白酶纯酶有两个明显的紫外吸收峰(见图 3A),分别在 279.2 nm 、 231.6 nm 处。可以推测,酶分子中含酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)和苯丙氨酸(Phe),其中 Tyr 和 Trp 吸收强度很大,而 Phe 只有微弱吸收。经适宜参数(16.5 kHz、20 W)超声波处理 5 min 后,菠萝茎蛋白酶两个紫外吸收峰分别出现在 278.6 、 231.2 nm (图 3B),即超声波处理后酶的紫外吸收峰基本没有变化,只是吸光值均略有增加。

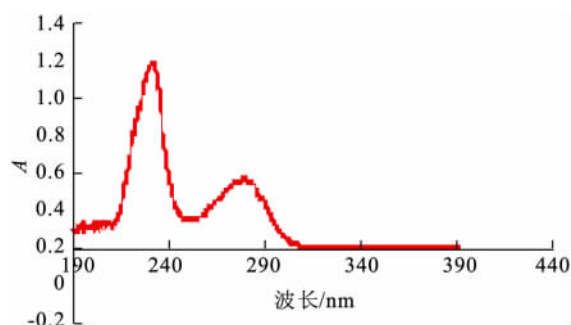


图 3A 菠萝茎蛋白酶紫外吸收光谱

Fig. 3A Ultraviolet absorption spectrum of stem bromelain

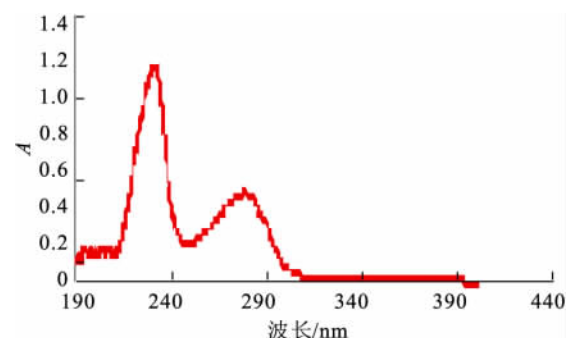


图 3B 16.5 kHz、20 W 超声波处理菠萝茎蛋白酶紫外吸收光谱

Fig. 3B Ultraviolet absorption spectrum of stem bromelain after ultrasound treatment

紫外差示光谱: 菠萝茎蛋白酶经 16.5 kHz、20 W 的超声波处理 5 min 后, 其紫外差示光谱表明

(见图 4A), 在 262 nm 处出现一正峰, 在 236.8 nm 处出现一负峰。另外, 在 190~221 nm 范围内有大量的正峰出现, 且差示吸收值较大。

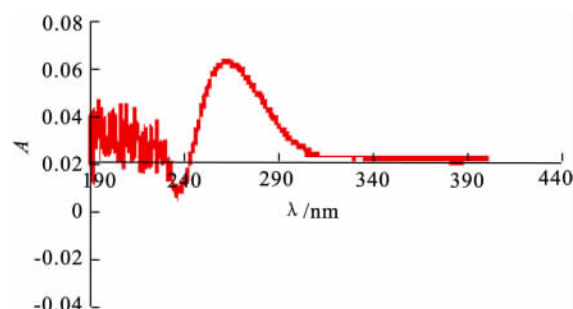


图 4A 16.5 kHz、20 W 超声波处理菠萝茎蛋白酶紫外差示光谱

Fig. 4A Ultraviolet differential spectrum of stem bromelain after ultrasound treatment

将用适宜的参数超声波处理后的酶放置 10 min 后, 在 257、234 nm 处出现 2 个正峰; 放置 20、30、40、50、60 min 时, 酶均出现两个正峰, 其中一个峰值分别位于 257.2、257.4、257.4、257.2、257.2 nm, 且随着放置时间增加差示吸收值逐渐增大, 放置 40 min 以上后变化逐渐减小, 趋于稳定; 另一个峰值分别位于 234、233、231.6、233.2、230.6、233.4 nm, 除放置 50 min 时的差示吸收增大外, 其它时间差示吸收值基本不变(见图 4B)。

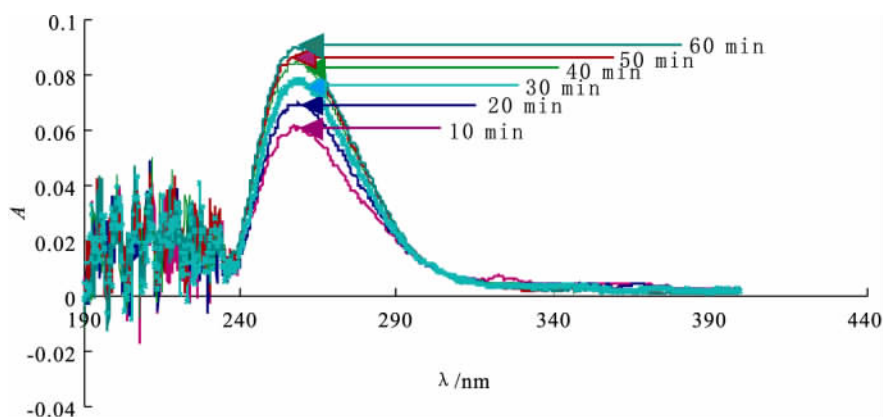


图 4B 16.5 kHz、20 W 超声波处理菠萝茎蛋白酶后放置 10—60min 紫外差示图谱

Fig. 4B Ultraviolet differential spectrum of stem bromelain after ultrasound treatment and laid 10 to 60 minutes

荧光光谱: 天然菠萝茎蛋白酶有两个荧光发射峰(图 5A), 分别位于 344.6、559.8 nm (此峰值很小, 在本图中因纵坐标较大, 故此峰峰形不明显) 处。因游离 Trp、Tyr 荧光发射峰分别位于 348、

303 nm, 故第一个发射峰(344.6 nm)由 Trp 和 Tyr 共同作用引起, 而由于 Trp 的存在, Tyr 的发射光谱未表现出来; 由于第二发射峰(559.8 nm)荧光值很小, 且经鉴定与背景溶液的发射峰吻合, 故认为

是由背景溶液中激活剂与酶分子相互作用引起,不是酶分子的特征发射峰。

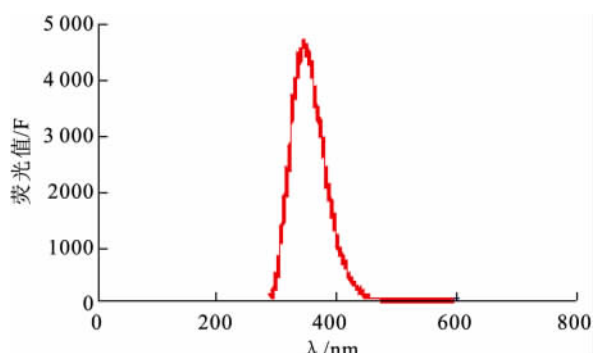


图 5A 菠萝茎蛋白酶荧光发射光谱

Fig. 5A Fluorescence spectrum of stem bromelain

经超声波处理后酶的荧光发射峰略有红移(见图 5B),位于 346.8 nm,荧光值降低;但是发射波长只改变约 2 nm,没有较大的改变,因而不是酶分子构型改变引起的。天然酶中存在的第二发射峰经超声处理后消失。处理后的酶放置 10 min 后,荧光发射峰开始由 346.8 nm 向低波长移动,位于 345.2 nm,荧光值继续降低;放置 20 min 后,荧光发射峰继续向低波长移动,恢复到天然酶发射峰,即位于 344.6 nm,荧光值则升高,接近天然酶荧光值(见图 5B)。

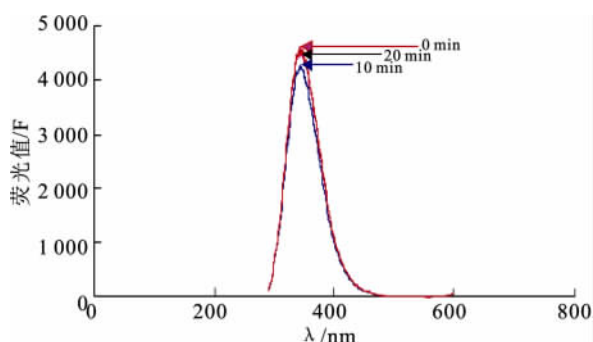


图 5B 超声波处理后放置 0、10、20 min 菠萝茎蛋白酶荧光发射光谱

Fig. 5B Fluorescence spectrum of stem bromelain after ultrasound treatment and lysis at 0, 10 and 20 minutes

3 结 语

菠萝茎蛋白酶是一类碱性蛋白质, pI 约为 9.55; 虽然 T L Mynott et al^[12] 采用 pH 5.0 的乙酸缓冲液在 S-Sepharose 上快速高效液相层析将菠萝蛋白酶纯化得到约 15 070、25 850 和 27 450 相对分子质量并具有等电点 10.4 和 10.45 的蛋白, 并申请了专

利, 但研究发现采用阴离子交换剂进行柱层析分离效果欠佳, 而文献^[7,13-14] 中也多采用阳离子交换剂进行纯化, 都得到了 3~5 种较单一的组分。故本研究采用阳离子交换剂羧甲基纤维素进行分离, 得到了 3 个均具有酶活力的蛋白峰, 其中酶活最高的蛋白峰经电泳鉴定表明为单一条带, 分离效较好。由于等电点高, 采用一般的阳极电泳时该酶在相应缓冲系统中解离的离子不泳动, 所以本研究在柱层析后采用阴极电泳鉴定纯度, 效果较好。

经超声波处理后, 菠萝茎蛋白酶 K_m 减小, 而 V_m 也减小。 K_m 变小, 说明酶与底物的亲和力变大; 而 V_m 也变小, 可能是由于超声处理后的酶构象发生变化, 虽然由于与底物亲和力增大酶很快被饱和, 但酶与底物复合物不能迅速分解为产物, 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。在两种情况中, 酶与底物亲和力增大是超声波处理后酶活力增大的主要影响因素。

一般认为在 230 nm 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; 240~300 nm 波长内紫外吸收光谱的变化主要是 Trp、Tyr 和 Phe 的作用。紫外光谱的研究表明, 超声波处理后, 菠萝茎蛋白酶的紫外吸收光谱与对照比较并没有多少改变, 因而其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; 而处理后紫外差示光谱出现了明显的正峰和负峰, 因 Phe 的苯基在 261 nm 处有吸收峰, 而 Tyr 的酚基和半胱氨酸(Cys)残基在 235 nm 处有一吸收峰, 表明酶的构象发生了变化, 从而使 Phe、Tyr 和 Cys 所处的微环境改变, 出现明显的差吸收峰。另外, 在 190~221 nm 范围内有大量的正峰出现, 且差示吸收值较大, 表明酶分子的二级结构改变, 可能是主链上大量基团暴露, 出现大量正峰。处理后的酶放置 10 min 时的光谱特征说明, 在超声波处理后, 酶的构象仍在变化, 有可能是超声波处理时传递给酶的能量在放置一段时间后逐渐消失, 生色氨基酸残基微环境逐渐复原。放置至 60 min, 差吸收峰基本不变, 但 257 nm 处的吸收强度逐渐增大, 可能是因为 Phe 已经完全暴露出来; 而 234 nm 附近的吸收峰强度变化不大, 说明 Tyr 或 Cys 微环境放置 10 min 以上后不再变化。

蛋白质的内源荧光来自芳香族氨基酸。Trp 残基, Tyr 残基和 Phe 残基由于其发色团(侧链基团)不同, 而有不同的荧光光谱, 其最大荧光强度的波长分

别是 348、303 和 282 nm^[15]。荧光光谱的研究进一步揭示了超声处理后菠萝茎蛋白酶的构型与构象的关系。处理后酶分子的荧光发射峰的波长虽然稍有改变,但并没有太大的变化,而处理前后的差别主要是发射强度的改变。这些进一步说明超声波处理后酶分子的构型没有变化,但分子的构象确实改变了。主要表现为芳香族氨基酸荧光强度改变。文献^[16]曾经报道,菠萝茎蛋白酶包含 5 个 Trp 残基,大量序列与木瓜蛋白酶同源表明 3 个埋在疏水核内,而另两个位于分子表面。菠萝茎蛋白酶经超声波处理后,荧光值

降低;说明 Trp 所处的微环境极性增大,可能的原因是超声作用改变酶的构象,使原本处于分子内部疏水环境中的 Trp 暴露到分子表面。天然酶中存在的第二发射峰消失,可能是超声处理使酶的构象发生了变化,影响激活剂与酶之间的互作,使荧光熄灭。超声处理后的酶放置一段时间后,Trp 所处的微环境极性逐渐变小,酶分子构象逐渐恢复到天然状态。由此进一步说明,超声波处理改变菠萝茎蛋白酶活力不是改变酶分子构型,而是使分子构象改变,从而导致酶活力的改变。

参考文献(References):

- [1] Ilaria Benucci, Katia Liburdi, Anna Maria Vittoria Garzillo, et al. Bromelain from pineapple stem in alcoholic-acidic buffers for wine application[J]. **Food Chemistry**, 2011, 124(4): 1349—1353.
- [2] Katya Chobotova, Ann B. Vernallis, Fadzilah Adibah Abdul Majid. Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives[J]. **Cancer Letters**, 2010, 290(2): 148—156.
- [3] Jane E. Onken, Paula K. Greer, Brian Calingaert, et al. Bromelain treatment decreases secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by colon biopsies *in vitro* [J]. **Clinical Immunology**, 2008, 126(3): 345—352.
- [4] David J. Fitzhugh, Siqing Shan, Mark W. Dewhirst, et al. Bromelain treatment decreases neutrophil migration to sites of inflammation[J]. **Clinical Immunology**, 2008, 128(1): 66—74.
- [5] Murachi T, Yasui M, Yasuda Y. Purification and physical characterization of stem bromelain[J]. **Biochemistry**, 1964, 3(1): 48—55.
- [6] Ota S, Moore S, Stein W. H. Preparation and chemical properties of purified stem and fruit bromelains[J]. **Biochemistry**, 1964, 3(2): 180—185.
- [7] Ota S, Muta E, Katahira Y, et al. Reinvestigation of fractionation and some properties of the proteolytically active components of stem and fruit bromelain[J]. **J Biochem**, 1985, 98: 219—228.
- [8] Arroyo-Reyna A, Hernandez-Arana A, Arreguin-Espinosa R. Circular dichroism of stem bromelain: a third spectral class within the family of cysteine proteinases[J]. **J Biochem**, 1994, 300: 107—110.
- [9] Devakate R V, Patil V V, Waje S S, et al. Purification and drying of bromelain[J]. **Separation and Purification Technology**, 2009, 64(3): 259—264.
- [10] 何忠效, 张树政. 电泳[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [11] Bradford R M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Anal Biochem**, 1976, 72: 248—254.
- [12] Cortecs (UK) Ltd. Component of bromelain [P]. 中国: CN1252096A(C12N9/50)
- [13] Rowan AD, Buttle DJ, Barrett AJ. Ananain; a novel cysteine proteinase found in pineapple stem[J]. **Arch Biochem Biophys**, 1988, 267: 262—270.
- [14] Harrach T, Eckert K, Maurer HP, et al. Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinases[J]. **J Protein Chem**, 1998, 17(4): 351—361.
- [15] 陶慰孙, 李惟, 姜涌明. 蛋白质分子基础[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [16] Haq S K, Rasheedi S, Khan R H. Characterization of a partially folded intermediate of stem bromelain at low pH[J]. **Eur. J. Biochem**, 2002, 269: 47—52.