

十二烷基苯磺酸钠共振散射光谱法测定木瓜蛋白酶活力

黄国霞¹, 蒋治良^{1, 2*}, 梁爱惠², 邓业成¹

1. 广西师范大学环境与资源学院, 广西 桂林 541004
2. 桂林工学院材料与化学工程系, 广西 桂林 541004

摘要 在 pH 值 6.5 的磷酸盐缓冲溶液中, 十二烷基苯磺酸钠(SDBS)与酪蛋白(Casein)形成缔合物微粒, 在 470, 360, 400, 420 和 520 nm 产生 5 个瑞利散射峰。在选定条件下, 木瓜蛋白酶(Papain)可水解酪蛋白(Casein), 加 SDBS 可中止酶催化反应并与未反应的酪蛋白底物结合形成缔合物微粒。随着 Papain 浓度的增大, 470 nm 处的共振散射峰强度降低。Papain 的酶活力在 0.048~4.8 USP·mL⁻¹ 范围内与 $\Delta I_{470\text{nm}}$ 呈现良好的线性关系。其线性回归方程为 $\Delta I_{\text{SDBS}} = 1.972c + 2.31$, 相关系数分别为 $r = 0.9999$, 检测限为 0.020 USP·mL⁻¹。该法用于嫩肉粉中木瓜蛋白酶活力测定, 结果令人满意。

关键词 木瓜蛋白酶; 酪蛋白; 十二烷基苯磺酸钠; 共振散射光谱法

中图分类号: O657.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2007)05-1003-03

引言

木瓜蛋白酶(Papain)是从未成熟的番木瓜中提取的巯基类蛋白酶, 有很强的分解蛋白质的能力, 在医药及医疗、食品工业、纺织和皮革业、饲料、日用化妆品工业等方面有广泛的用途^[1]。目前, 木瓜蛋白酶活力的测定方法主要有福林法和紫外分光光度法等^[1-4]。共振散射光谱法具有简便灵敏等特点^[5, 6], 已用于痕量无机和有机分析, 但未见有通过测定底物剩余量的散射信号来测定木瓜蛋白酶活力的报道。本实验以酪蛋白为底物, 以 SDBS 终止反应并与剩余底物相互作用形成缔合物微粒, 据此建立了共振散射光谱法(RSS)测定木瓜蛋白酶活力的新方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

RF-540 型荧光分光光度计(日本岛津公司), 电热恒温水浴锅(绍兴县医疗器械厂), TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

木瓜蛋白酶液: 准确称取 0.500 g 木瓜蛋白酶(6000 USP·mg⁻¹, 上海华美生物工程公司), 用缓冲液溶解, 定容至 50 mL, 形成 10 mg·mL⁻¹ 储备液, 使用时用缓冲液稀释至所需浓度; 10 mg·mL⁻¹ 酪蛋白溶液: 取 1.0 g 酪蛋白(广东汕头新宁化工厂), 加 0.05 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄ 溶液

50 mL, 置沸水浴中加热 30 min, 搅拌, 取出冷至室温, 用 0.05 mol·L⁻¹ 柠檬酸溶液调节 pH 值至 6.5, 同时迅速搅拌, 以防止酪蛋白沉淀, 用水稀释至 100 mL(临用新配); 5.0×10⁻⁵ mol·L⁻¹ 十二烷基苯磺酸钠溶液(SDBS); 2.0 mol·L⁻¹ L-盐酸半胱氨酸溶液; 缓冲液: 取 1.79 g Na₂HPO₄·12H₂O, 加 50 mL 水溶解, 加二水合乙二胺四醋酸二钠(EDTA-2Na·2H₂O)0.244 g、L-盐酸半胱氨酸 0.47 g, 溶解, 用盐酸或氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.5±0.1, 用水稀释至 100 mL(新配)。所用试剂均为分析纯, 水均为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

在 10 mL 具塞比色管中, 加入 1.0 mL 5 mg·mL⁻¹ 酪蛋白, 置 55 °C 水浴锅中预热 10 min, 加入适量 60 USP·mL⁻¹ 木瓜蛋白酶, 用缓冲液稀释至 1.5 mL, 摇匀并开始计时, 放回 55 °C 水浴锅中, 60 min 后取出, 加入 2.0 mL 5.0×10⁻⁵ mol·L⁻¹ SDBS, 用二次蒸馏水定容至 5.0 mL, 摇匀, 放置 15 min。用荧光分光光度计同步扫描($\lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}} = 0$ nm)得到体系的共振散射光谱。在 470 nm 处测定体系的散射光强度 $I_{470\text{nm}}$ 和试剂空白 I_0 , 计算 $\Delta I = I_{470\text{nm}} - I_0$ 值。

2 结果与讨论

2.1 共振散射光谱

Papain, casein, papain-SDBS 体系的散射信号均很微弱。

收稿日期: 2006-03-28, 修订日期: 2006-06-28

基金项目: 广西自然科学基金项目(0575042)和广西“新世纪十百千人才工程”计划资助

作者简介: 黄国霞, 女, 1976 年生, 广西师范大学环境与资源学院研究生 * 通讯联系人 e-mail: zjiang@mailbox.gxnu.edu.cn

在 papain-casein 酶催化反应体系中加入 SDBS 使反应终止后,其散射信号显著增强。这是由于剩余底物即酪蛋白与 SDBS 作用形成了缔合物微粒。该微粒在 470, 360, 400, 420 和 520 nm 产生 5 个瑞利散射峰,最强峰位于 470 nm 处。本文选择 470 nm 测量。

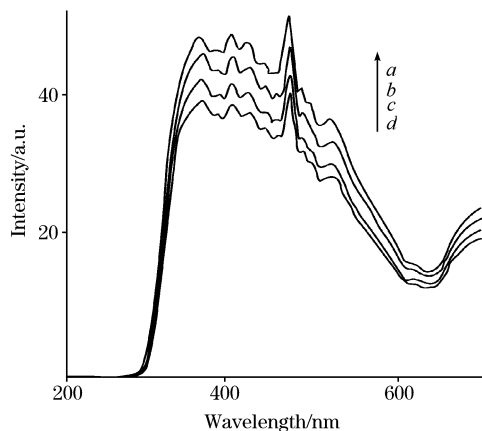


Fig. 1 Resonance scattering spectra of SDBS-casein-papain system

a: $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ casein- $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDBS;

b: a-0.48 USP $\cdot \text{mL}^{-1}$ papain;

c: a-1.5 USP $\cdot \text{mL}^{-1}$ papain; d: a-2.4 USP $\cdot \text{mL}^{-1}$ papain

2.2 条件的优化

考察了缓冲液 pH 值对体系的影响。当缓冲液的 pH 值为 6.5 时,体系的 $\Delta I_{470 \text{ nm}}$ 值最大,为实验选用值。酶反应温度对体系的影响实验结果表明,当温度为 55°C 时,体系的 $\Delta I_{470 \text{ nm}}$ 值最大。故本方法选择在 55°C 进行酶反应。在 60 min 内,随着酶反应时间的延长,体系相应的 $\Delta I_{470 \text{ nm}}$ 值成线性增加,60 min 以后增大的幅度比较小,本实验选择酶反应时间为 60 min。木瓜蛋白酶是以巯基为活性基团的酶,这类酶在分离提纯过程中分子中的巯基常被氧化而降低活力^[1]。L-盐酸半胱氨酸中的半胱氨酸能使氧化了的巯基还原以恢复活力,因此 L-盐酸半胱氨酸是木瓜蛋白酶的良好激活剂。随着 L-盐酸半胱氨酸浓度的增大,体系的 $\Delta I_{470 \text{ nm}}$ 值随之增大,到 $2 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最大值,之后逐渐减小。本法选择 L-盐酸半胱氨酸的浓度为 $2 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。SDBS 既是该酶促反应的终止剂又是酪蛋白的共振散射光谱测量试剂。考察了 SDBS 浓度对体系的影响。当 SDBS 浓度为 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,体系的 $\Delta I_{470 \text{ nm}}$ 值最大。本方法选择 SDBS 的

浓度为 $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。随着酪蛋白浓度的增加,体系的 $\Delta I_{470 \text{ nm}}$ 值逐渐增大,酪蛋白则在 $0.6 \sim 1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内有良好的线性关系。本方法选择的酪蛋白浓度为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 体系的稳定性

在室温下,SDBS 与 Casein 反应 15 min 基本反应完全, $\Delta I_{470 \text{ nm}}$ 值至 1 h 内基本不变。本实验选择在 15 min 测定 $I_{470 \text{ nm}}$ 值。

2.4 共存物质的影响

按照实验方法,考察了共存物质对体系共振散射测定的影响。当 Papain 的活力为 $4.2 \text{ USP} \cdot \text{mL}^{-1}$,相对误差在 $\pm 5\%$ 之内时, $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的组氨酸、甘氨酸、L-酪氨酸、葡萄糖、维生素 C、HAS, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ag^+ 等离子对反应的测定无干扰,说明本法具有较好的选择性。

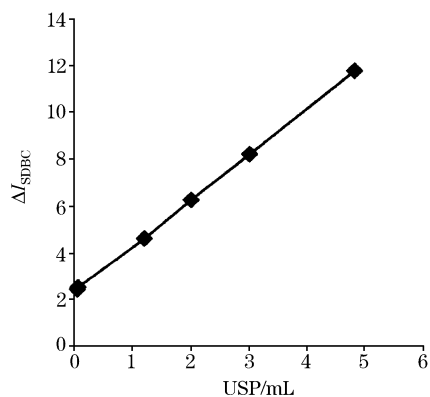


Fig. 2 Working curve

2.5 标准曲线

在最佳实验条件下,按照实验方法绘制标准曲线。体系的 $\Delta I_{470 \text{ nm}}$ 与木瓜蛋白酶活力的线性范围为 $0.048 \sim 4.8 \text{ USP} \cdot \text{mL}^{-1}$,回归方程为 $\Delta I_{\text{SDBS}} = 1.972c + 2.31$,相关系数 0.999 9,检测限为 $0.020 \text{ USP} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。用紫外-分光光度法^[3]做对比实验,所得其线性范围为 $0.24 \sim 24.0 \text{ USP} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。可见,共振散射法比紫外-分光光度法灵敏。

2.6 样品测定

样品处理:分别准确称取各品牌不同批次嫩肉粉 0.5 g,用缓冲液充分溶解,定容至 50 mL,过滤,取滤液,使用时用缓冲液稀释 20 倍至 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。按实验方法测定各个品牌嫩肉粉中木瓜蛋白酶的活力,结果见表 1。同时用紫外-分光光度法^[3]做对比实验。两种方法所测结果基本一致。

Table 1 Results for the enzymatic activity in samples and the recovery($n=5$)

样品	测得值/(USP $\cdot \text{mg}^{-1}$)	平均值/(USP $\cdot \text{mg}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%	光度法/(USP $\cdot \text{mg}^{-1}$)
1#	298.8, 334.2, 324.0, 313.9, 334.2	321.01 ± 4.7	91.8	4.7	320.74 ± 2.4
2#	313.9, 319.0, 308.9, 334.2, 303.8	315.94 ± 3.7	96.6	3.7	317.55 ± 3.6
3#	157.0, 146.8, 154.4, 149.4, 144.3	150.38 ± 3.5	101.5	3.5	149.20 ± 2.2

参 考 文 献

- [1] Hong L, Hai Y W, Chang H X, et al. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31: 588.
- [2] Kumara A B, Varadarajb M C, Lalithac R G, et al. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1670: 137.
- [3] FENG Jian-wen(冯健雯). *Phy. Tes. Chem. Anal. Chem. Part B(理化检验, 化学分册)*, 2001, 37(6): 277.
- [4] LUO Yuan-xiu(罗远秀). *Chin. J. Pharm. (中国药学杂志)*, 2000, 35: 556.
- [5] WEI Yong-ju, KANG Zhi-min, LIU Cui-ge, et al(魏永巨, 康志敏, 刘翠格, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2004, 24(12): 1659.
- [6] LI Zhen-zhong, JIANG Zhi-liang, YANG Guang, et al(李振中, 蒋治良, 杨光, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2005, 25(8): 1286.

Resonance Scattering Spectral Assay of Papain Enzymatic Activity with Sodium Dodecyl Benzene Sulfonate

HUANG Guo-xia¹, JIANG Zhi-liang^{1, 2*}, LIANG Ai-hui², DENG Ye-cheng¹

1. School of Environment and Resource, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China

2. Department of Material and Chemical Engineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China

Abstract In pH 6.5 phosphate buffer solutions, dodecyl benzene sulfonate (SDBS) was combined with casein to form association particles, which exhibited five Rayleigh scattering peaks at 470, 360, 400, 420 and 520 nm, respectively. Under suitable conditions, papain has catalytic effect on the hydrolysis of casein, and SDBS can stop the catalytic reaction and be combined with the excess casein to form association particles. The scattering peak at 470 nm decreased with the activity of papain. The $\Delta I_{470\text{ nm}}$ value was linear with the papain activity in the range of 0.048-4.8 USP · mL⁻¹. Its regress equation is $\Delta I_{\text{SDBS}} = 1.972c + 2.31$, with a related coefficient of 0.999 9 and detection limit of 0.020 USP · mL⁻¹. This new assay has been applied to the assay of the papain activity in food additive with satisfactory results.

Keywords Papain; Casein; Sodium dodecyl benzene sulfonate; Resonance scattering spectral assay

(Received Mar. 28, 2006; accepted Jun. 28, 2006)

* Corresponding author