

## 低压段 DHPM 作用对木瓜蛋白酶结构影响的荧光光谱分析

刘伟, 谢明勇\*, 钟业俊, 刘成梅, 官斌, 王倩

南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047

**摘要** 以荧光光谱为检测手段研究了低压段(60~100 MPa)动态高压微射流作用(DHPM)对木瓜蛋白酶(Papain)分子结构的影响。结果显示,在60~100 MPa下经DHPM处理后,Papain, Tyr残基和Trp残基荧光强度均有不同程度降低,且随着处理压力的增加,Papain, Tyr残基和Trp残基的荧光强度逐渐增大,Papain, Trp残基荧光发射峰的位置分别从未处理时的334和277.5 nm逐渐红移至100 MPa处理后的335和278.5 nm;在0~4 °C放置24 h后,Papain, Tyr残基和Trp残基的荧光光谱均基本保持了0 h时的变化趋势。表明低压DHPM处理后,Papain中Trp残基逐渐暴露出来,并形成了较为稳定的新分子构象。

**关键词** 动态高压微射流作用; 低压段; 木瓜蛋白酶; 荧光光谱

**中图分类号:** O433.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)02-0387-04

### 引言

木瓜蛋白酶通过水解蛋白质分子内部肽链而生成分子量较小的多肽类,在生物医药和食品化工等领域具有广阔的商业应用。Papain是一种巯基单体蛋白酶,由212个氨基酸残基组成,含有19个Tyr残基、5个Trp残基、4个Phe残基<sup>[1]</sup>。荧光光谱法是研究酶分子构象的一种有效方法,它能提供包括激发光谱、发射光谱以及荧光强度等物理参数,这些参数从各个角度反映了分子的成键和结构情况,以及酶分子在各种环境下的构象变化,从而阐明结构与功能之间的关系<sup>[2]</sup>。近年来,利用荧光光谱分析技术对酶的酶学性质和结构的影响方兴未艾,何平等<sup>[3]</sup>利用紫外吸收光谱、荧光发射光谱研究了二甲基亚砷对木瓜蛋白酶活性与构象的影响;曾新安等<sup>[4]</sup>采用荧光光谱研究了脉冲电场对木瓜蛋白酶的影响。

动态高压微射流作用(dynamic high pressure microfluidization, DHPM)是一种新兴的高压技术,其压力可达180 MPa,通过高速撞击、高速剪切、高频震荡、瞬间压降、空穴作用等机械作用可实现对生物大分子的改性<sup>[5-8]</sup>。本课题组在前期工作中研究了动态高压微射流作用对早酥梨中多酚氧化酶酶学性质的影响<sup>[9,10]</sup>,以及通过圆二色谱、荧光光谱和紫外光谱分析了DHPM对蘑菇多酚氧化酶的结构变化,发现处理后的酶分子中 $\alpha$ -螺旋含量降低,Trp和Tyr残基不同

程度暴露于溶剂中,部分二硫键发生断裂后形成新的巯基<sup>[11]</sup>。

本课题组采用低压段(60~100 MPa)DHPM对Papain处理时发现,随着处理压力增加,Papain酶活逐渐下降,在0~4 °C下放置24 h后酶活基本不变,这种酶活变化与其结构变化存在何种相关性,为探索这一作用机理,本实验以荧光光谱为分析手段研究DHPM对木瓜蛋白酶结构的影响,为揭示DHPM对木瓜蛋白酶的酶学性质与分子结构之间的影响规律奠定基础。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料

木瓜蛋白酶:酶活(干酪素, pH 6.0, 40 °C)/(USP-U/mg)  $\geq 6\ 000$ ,购于沃凯(Ourchem),反应底物为酪蛋白。所用化学试剂均为分析纯。

#### 1.2 动态高压微射流处理

用0.05 mol·L<sup>-1</sup>半胱氨酸、0.035 mol·L<sup>-1</sup> EDTA二钠盐、0.05 mol·L<sup>-1</sup> pH 6.0磷酸缓冲液配制酶液,酶液浓度为1 mg·mL<sup>-1</sup>,采用廊坊通用机械有限公司生产的NCJJ(0.007/200)型纳米超高压均质机,在室温(20±3)°C条件下进料,处理压力为60,80和100 MPa,各压力处理1次,每个压力下取样50 mL,进行指标测定或转移至0~4 °C下低温贮藏备用。

收稿日期:2009-02-20, 修订日期:2009-05-18

基金项目:食品科学与技术国家重点实验室目标导向项目(SKLF-MB-200808)和国家(863计划)重点项目(2007AA100403)资助

作者简介:刘伟,1972年生,南昌大学生命科学与食品工程学院副教授 e-mail: liuwei@ncu.edu.cn

\* 通讯联系人 e-mail: myxie@ncu.edu.cn

### 1.3 Papain 荧光光谱分析

采用 F-2500 荧光分光光度计 (HITACHI), 扫描速度:  $1\ 500\ \text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$ , Delay: 0 s, EX Slit: 10.0 nm, EM Slit: 10.0 nm.

#### 1.3.1 荧光光谱

以 280 nm 为激发波长, 记录 300~400 nm 波长范围内的发射光谱。

#### 1.3.2 同步荧光光谱

当  $\Delta\lambda=20\ \text{nm}$  时, 令激发波长在 240~360 nm 范围内扫描, 得到不同压力处理后 Tyr 残基的同步荧光光谱; 当  $\Delta\lambda=60\ \text{nm}$  时, 令激发波长在 240~360 nm 范围内扫描, 得到不同压力处理后 Trp 残基的同步荧光光谱。

## 2 结果与分析

### 2.1 低压 DHPM 作用对 Papain 荧光光谱的影响

在蛋白质分子中, 蛋白质的内源荧光主要来自 Trp 和 Tyr 残基, 因而常作为内源荧光探针来研究溶液状态下蛋白质的构象。木瓜蛋白酶含有 19 个 Tyr 残基、5 个 Trp 残基<sup>[1]</sup>。在 280 nm 激发 Papain 时, Trp 和 Tyr 残基同时受影响产生荧光发射光谱。图 1 中 (a) 和 (b) 分别表示 DHPM 处理后 0 和 24 h 时 Papain 荧光光谱变化情况。

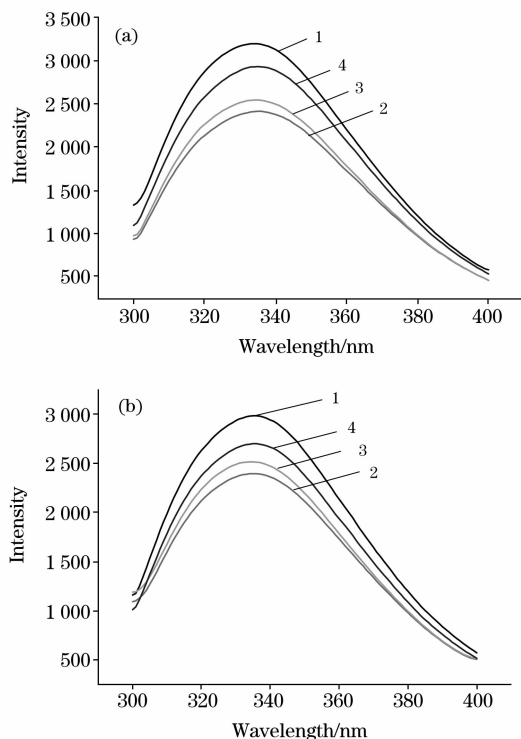


Fig. 1 Effect of pressure on the fluorescence spectra of papain

1: Control group; 2: 60 MPa treatment group;  
3: 80 MPa treatment group; 4: 100 MPa treatment group;  
(a): 0 h; (b): 24 h

在 60~100 MPa 下处理后立即检测, Papain 荧光强度均有不同程度下降, 60 MPa 时最低, 随着压力的增大, 荧光强

度逐渐升高, 荧光发射峰的位置从未处理时的 334 nm 逐渐红移至 100 MPa 处理后的 335 nm[如图 1(a)所示]。

DHPM 处理后于 0~4 °C 下放置 24 h, 各处理组 Papain 的荧光强度依然小于对照组, 且随着处理压力的增加逐渐增大, 荧光发射峰逐渐偏移, 基本保持了 0 h 时的变化趋势(如图 1(b)所示)。

### 2.2 低压 DHPM 作用对酪氨酸荧光光谱的影响

60~100 MPa DHPM 处理后, Papain 中酪氨酸的荧光强度均有所下降, 且随着处理压力的上升, 荧光强度逐渐增大, 荧光发射峰在 285 nm 处未发生移动[如图 2(a)所示]。

0~4 °C 冰箱放置 24 h 后, 各处理组 Papain 酶液中酪氨酸的荧光强度仍低于对照组, 且随着处理压力的增加而增大, 荧光发射峰位置未发生移动, 基本保持了 0 h 时的变化趋势[如图 2(b)所示]。

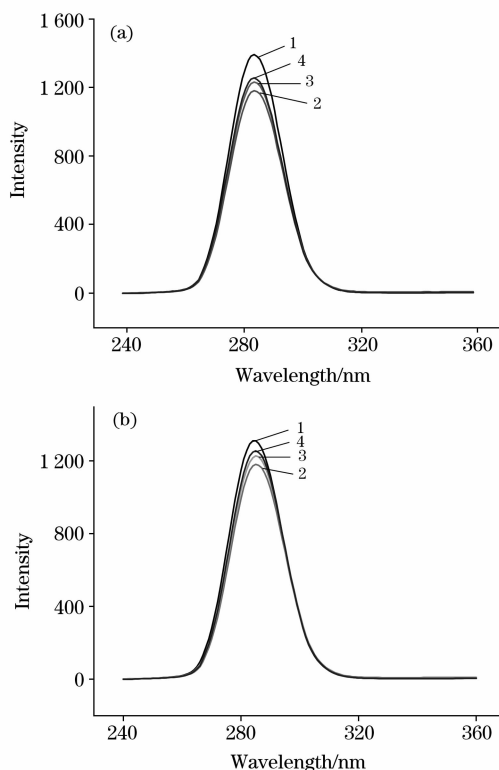


Fig. 2 Effect of pressure on the synchronous fluorescence spectra of papain ( $\Delta\lambda=20\ \text{nm}$ )

1: Control group; 2: 60 MPa treatment group;  
3: 80 MPa treatment group; 4: 100 MPa treatment group;  
(a): 0 h; (b): 24 h

### 2.3 低压 DHPM 作用对色氨酸荧光光谱的影响

经低压 DHPM 处理后 Papain 中色氨酸的荧光强度均有所下降, 且随着处理压力的增加, 色氨酸荧光强度逐渐升高, 荧光发射峰的位置从未处理时的 277.5 nm 红移至处理后的 278.5 nm[如图 3(a)所示]。

0~4 °C 下放置 24 h 后, 各处理组色氨酸的荧光强度仍低于对照组, 且随着处理压力的增加而增大, 荧光发射峰红移, 基本保持了 0 h 时的变化趋势[如图 3(b)所示]。

### 3 结 论

本实验以木瓜蛋白酶为研究对象,采用荧光光谱,检测分析低压段(60~100 MPa)DHPM对Papain分子结构的影响。结果显示,DHPM处理后,Papain, Tyr 残基和 Trp 残基荧光强度均有不同程度降低,且随着处理压力的增加,Papain, Tyr 残基和 Trp 残基的荧光强度逐渐增大,Papain, Trp 残基的荧光发射峰位置分别从未处理时的 334 和 277.5 nm 逐渐红移至 100 MPa 处理后的 335 和 278.5 nm, Tyr 残基荧光发射峰位置则保持不变;表明经低压 DHPM 处理后,Papain 中 Trp 残基的微环境极性逐渐增大,在 DHPM 处理时高速撞击、高速剪切等强烈机械作用下,原来紧密的蛋白质大分子打开成疏松状态或者更小的蛋白碎片,处于疏水环境的 Trp 残基暴露出来,同时荧光发色基团与溶剂(水)迅速接触,造成荧光猝灭,但随着处理压力增大,猝灭程度逐渐降低,荧光强度上升;这与本课题组采用 DHPM 对蘑菇 PPO 处理的结果有些类似<sup>[1]</sup>。处理液于 0~4 °C 下放置 24 h, Papain, Tyr 残基和 Trp 残基的荧光光谱均基本保持了 0 h 时的变化趋势;表明低压 DHPM 处理后, Papain 形成了较为稳定的新分子构象。在后续工作中将通过圆二色谱、红外光谱、紫外光谱进一步揭示 DHPM 对木瓜蛋白酶的酶学性质与分子结构之间的影响规律。

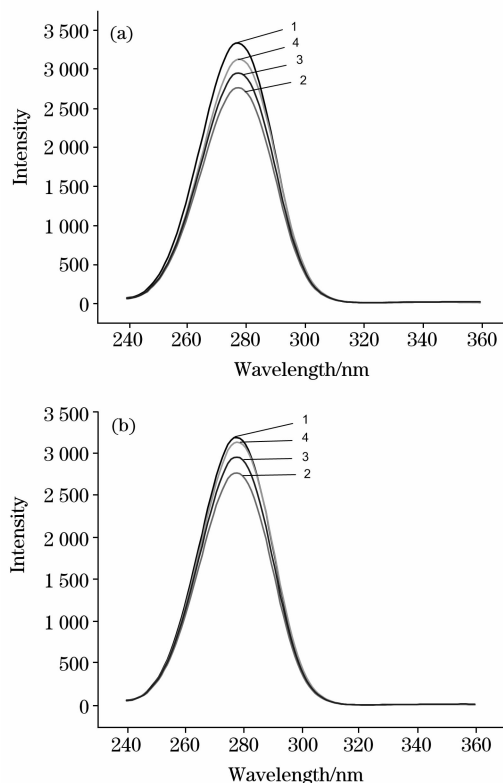


Fig. 3 Effect of pressure on the synchronous fluorescence spectra of papain( $\Delta\lambda=60$  nm)

1: Control group; 2: 60 MPa treatment group;  
3: 80 MPa treatment group; 4: 100 MPa treatment group;  
(a): 0 h; (b): 24 h

### 参 考 文 献

- [1] Drenth J, Jansonius J N, Koekoek R, et al. Nature, 1968, 218: 929.
- [2] WANG Shou-ye, XU Xiao-long, LIU Qing-liang, et al(王守业, 徐小龙, 刘清亮, 等). Progress in Chemistry(化学进展), 2001, 13(4): 257.
- [3] HE Ping, HUANG Zhuo-lie, WU Guang-hong, et al(何平, 黄卓烈, 巫光宏, 等). Journal of South China Agricultural University(华南农业大学学报), 2008, 29(3): 37.
- [4] ZENG Xin-an, YU Shu-juan, XU Ya-li(曾新安, 于淑娟, 徐娅莉). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(12): 2558.
- [5] Liu C M, Liu W, Xiong H W, et al. Effect of Instantaneous High Pressure (IHP) Treatment on Solubility and Rheologic Properties of Soybean Dietary Fiber. In 232nd ACS national meeting, San Francisco, America. 2006. 33.
- [6] Iordache M, Jelen P. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2003, 4: 367.
- [7] Jafari S M, He Y, Bhandari B. European Food Research and Technology, 2007, 255: 733.
- [8] Thompson A K, Sigh H. Journal of Dairy Science, 2006, 89: 410.
- [9] LIU Wei, LIU Cheng-mei, ZHONG Ye-jun, et al(刘伟, 刘成梅, 钟业俊, 等). Food Science(食品科学), 2006, 27(10): 179.
- [10] Liu W, Xie M Y, Liu J H, et al. Effect of Instantaneous High Pressure Treatment on Activity of Polyphenol Oxidase from Pears, 14th World Congress of Food Science & Technology, Shanghai. 2008. 538.
- [11] Liu W, Liu J H, Liu C M, et al. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2008, 9(2): 142.

## Fluorescence Spectra Analysis of Papain Structure Treated by Dynamic High Pressure Microfluidization in Low Pressure Ranges

LIU Wei, XIE Ming-yong\*, ZHONG Ye-jun, LIU Cheng-mei, GUAN Bin, WANG Qian

State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China

**Abstract** The present research investigated the effect of dynamic high pressure microfluidization (DHPM) in low pressure ranges (60-100 MPa) on the molecular structure of papain with the help of fluorescence spectra as the detection method. The result showed that after the treatment of DHPM at 60-100 MPa, the fluorescence intensity of papain, tryptophan (Trp) and tyrosine (Tyr) residues all decreased to different extents. Meanwhile, with the increase in the treatment pressure, their fluorescence intensity would gradually increase and the fluorescence emission peak would gradually red shift from 334 and 277.5 nm before treatment to 335 and 278 nm after 100 MPa treatment for papain and Trp residue respectively; after the treatment, with the samples being placed at 0-4 °C for 24 h, the fluorescence spectra of papain, Tyr and Trp residues in various experiment groups basically maintained the same changing tendency compared to that of newly treated samples. Hence, it showed that after the treatment of DHPM in low pressure ranges, the Trp residue of papain was gradually brought to light and formed new and comparatively stable molecular conformation.

**Keywords** Dynamic high pressure microfluidization; Low pressure ranges; Papain; Fluorescence spectra

(Received Feb. 20, 2009; accepted May 18, 2009)

\* Corresponding author