

文章编号: 1005-8893(2000)03-0033-03

木瓜酶水解珍珠角壳蛋白^{*}

金凤明¹, 李桂贞², 孙晓娟¹

(1. 江苏石油化工学院 化学工程系, 江苏 常州 213016; 2. 华东理工大学 分析测试中心, 上海 200237)

摘要: 用异硫氰酸苯酯柱前衍生高效液相色谱法测定了淡水养殖珍珠中角壳蛋白的氨基酸组成, 对影响木瓜酶水解珍珠角壳蛋白的主要因素如木瓜酶用量、蛋白质质量浓度、反应时间、酸度和温度等进行了研究和优化, 为珍珠资源的有效利用提供依据。

关键词: 珍珠; 蛋白质; 木瓜酶; 水解

中图分类号: Q 512.6; Q 556.9

文献标识码: A

我国珍珠资源十分丰富, 目前已具有年产珍珠(800~1 000)吨的规模, 除部分中上等珍珠用于制作饰物外, 大约有40%的劣质珍珠有待进一步开发利用^[1]。珍珠是一个由大量碳酸钙、一定量的蛋白质(以下称角壳蛋白)及多种微量元素所组成的复合物, 具有重要的药效和保健作用^[2], 但传统工艺所制成的珍珠产品, 由于吸收率低而其作用没有得到充分利用。随着生化技术的发展, 酶制剂越来越广泛地应用于食品、发酵、医药、制药和日用化工等工业中^[3], 本文通过酶法水解珍珠角壳蛋白的研究, 为珍珠资源的充分利用提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器、材料和试剂

Shimadzu LC-6A 高效液相色谱仪(包括SPD-6A 紫外检测器、C-R3A 色谱数据处理机、SCL-6A 梯度控制器); 国产 C18 色谱柱(20 cm × 5 mm, 10 μm); 电热恒温水浴锅; 凯氏烧瓶及凯氏定氮蒸馏吸收装置(上海玻璃仪器公司); 淡水养殖珍珠(浙江诸暨珠力神营养品厂); 异硫氰酸苯酯(CP); 乙腈(色谱纯); 其余试剂均为分析纯。

木瓜蛋白酶: 华美上海分公司提供, 用

Kimmei & Smith 法^[4]测得活力 12 u/mg。

1.2 实验方法

1.2.1 角壳蛋白的提取及浆料的制备

取适量洁净珍珠, 用过量稀盐酸(2 mol·L⁻¹)溶液室温浸泡至其中碳酸钙全部溶解, 过滤并用蒸馏水洗涤。将提取的珍珠角壳蛋白转入研钵中研磨, 加适量蒸馏水稀释制成浆料, 并用凯氏定氮法测定其中蛋白质的浓度, 于冰箱中冷藏备用。

1.2.2 角壳蛋白氨基酸组成分析

取适量 1.2.1 法制备的珍珠角壳蛋白浆料于安瓿中, 加数毫升 6 mol·L⁻¹ HCl 及 2 至 3 滴苯酚, 封口, 于 105 °C 水解 24 小时。开管, 将水解液中和, 并加蒸馏水适当稀释。取一定量上述水解液, 经异硫氰酸苯酯衍生后, 在一定色谱条件下进样, 254 nm 紫外检测, 用峰面积外标法定量。

1.2.3 角壳蛋白酶解方法

分取适量角壳蛋白浆料于具塞锥形瓶中, 分别依次加入一定量的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液、蒸馏水及新鲜配制的木瓜蛋白酶溶液, 盖以瓶塞, 置于一定温度的水浴中酶解, 间隙摇匀, 待反应一定时间后冷水冷却, 中速滤纸过滤, 蒸馏水洗涤并定容至一定体积。取部分滤液, 用凯氏定氮法测定其含氮量并按下式计算水解率:

* 收稿日期: 2000-06-29

作者简介: 金凤明(1962-), 男, 江苏昆山人, 讲师, 硕士, 主要从事分析化学教学及研究工作。

$$\% \text{水解率} = \frac{\text{水溶液中可溶部分的含氮量}}{\text{水溶液总含氮量}} \times 100$$

根据水解率大小评价蛋白水解程度的好坏。

2 结果与讨论

2.1 角壳蛋白中氨基酸含量测定

珍珠角壳蛋白中氨基酸含量测定结果见表 1。由表可知, 珍珠角壳蛋白中氨基酸品种齐全, 但主要是由天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸、亮氨酸等 10 种氨基酸组成, 这些氨基酸约占角壳蛋白的 85%。

表 1 珍珠角壳蛋白氨基酸含量

No	氨基酸	含量, %
1	天冬氨酸 (Asp)	10.30
2	谷氨酸 (Glu)	4.43
3	丝氨酸 (Ser)	7.91
4	甘氨酸 (Gly)	16.60
5	组氨酸 (His)	0.52
6	苏氨酸 (Thr)	1.86
7	丙氨酸 (Ala)	18.80
8	精氨酸 (Arg)	6.10
9	脯氨酸 (Pro)	3.33
10	酪氨酸 (Tyr)	3.88
11	缬氨酸 (Val)	2.36
12	蛋氨酸 (Met)	1.31
13	胱氨酸 (Cys)	1.89
14	异亮氨酸 (Ile)	2.04
15	亮氨酸 (Leu)	7.31
16	苯丙氨酸 (Phe)	6.57
17	色氨酸 (Trp)	①
18	赖氨酸 (Lys)	4.86

①在盐酸水解过程中色氨酸完全被破坏。

说明: 色谱条件为流动相 A (pH6.3 醋酸-醋酸钠缓冲液) + 流动相 B (60% 乙腈水溶液); 适宜梯度洗脱; 柱温 50℃; 进样量 20 μ L。

2.2 角壳蛋白酶解反应条件试验

2.2.1 反应时间

酶解反应时间对水解率的影响结果见图 1。由图可见, 在 0~0.5 小时, 反应速度较快, 水解率几乎呈直线上升; (0.5~6) 小时, 反应速度趋缓, 水解率平稳上升; 6 小时后, 曲线平坦, 这是因为木瓜酶逐渐失去活性的缘故。为此, 取酶解反应时间 (12~24) 小时为宜。

2.2.2 木瓜酶用量

木瓜酶用量对珍珠角壳蛋白水解率的影响结果如图 2 所示。可以看出, 水解率随着木瓜酶用量的

增加而上升, 但上升的趋势逐渐平缓, 从经济角度考虑, 每毫克珍珠角壳蛋白加木瓜酶 3 至 5 个活力单位较为适宜。

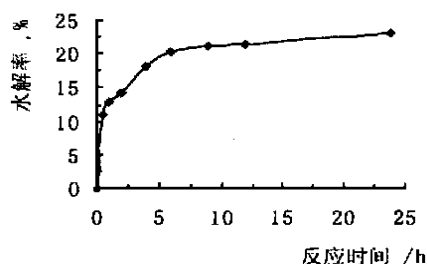


图 1 反应时间对珍珠角壳蛋白水解率的影响

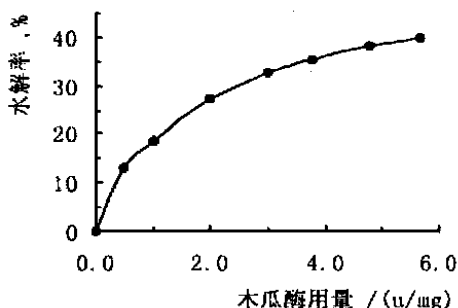


图 2 木瓜酶用量对珍珠角壳蛋白水解率的影响

2.2.3 温度

适当提高温度对珍珠角壳蛋白的酶解反应速度是有利的, 但温度过高, 由于木瓜酶很快失去活性, 水解率反而下降 (见图 3), 由实验结果知, 用木瓜酶水解珍珠角壳蛋白的最适宜温度为 55℃。

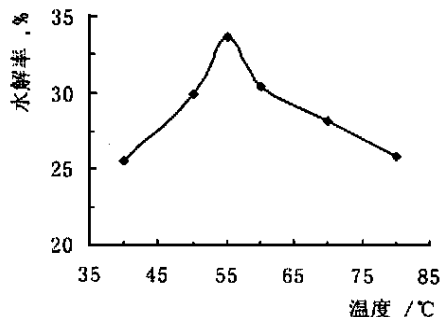


图 3 温度对珍珠角壳蛋白水解率的影响

2.2.4 酸度

酸度对珍珠角壳蛋白的水解有一定影响, 这是因为酶的催化活性部位一般是一些带电的氨基酸侧链基团, 这些基团在结合底物和转化底物为产物时, 必须处于某一特定的解离状态, 而溶液 pH 的变化可以直接影响氨基酸侧链基团的解离状态, 从而影响酶的活性。由图 4 所示的实验结果可知, 木

木瓜酶水解珍珠角壳蛋白的最佳酸度在 6.5 左右。

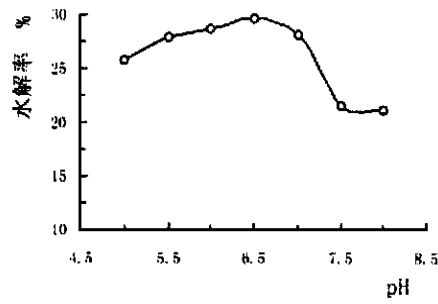


图 4 酸度对珍珠角壳蛋白水解率的影响

2.2.5 角壳蛋白质的质量浓度

酶解反应时，蛋白质的质量浓度对水解率的影响结果如表 2 所示，由此可见，反应液中角壳蛋白质的质量浓度在 1.0 mg/mL 左右较为适宜。

表 2 蛋白质的质量浓度对水解率的影响

No	蛋白质的质量浓度/ (mg/mL)	水解率, %
1	0.50	28.9
2	0.80	33.0
3	1.00	34.1
4	1.33	34.7

3 结 论

综上所述，组成珍珠角壳蛋白的氨基酸品种齐全，用木瓜酶水解珍珠角壳蛋白的最佳条件为：按每毫克角壳蛋白加 3 至 5 个活力单位的木瓜酶，加水使蛋白质的质量浓度在 1.0 mg/mL，控制酶解液 pH 6.5 左右，在 55℃ 酶解（12~24）小时。木瓜酶水解珍珠角壳蛋白具有工艺简单，不污染环境的特点，水解产物为氨基酸和多肽，因而可直接用于食品、化妆品和保健品中，是值得推广的珍珠深加工方法。

参考文献:

[1] 文·曹家录. 发展中的我国珍珠养殖业 [J]. 中国宝玉石, 1997 (1): 34

[2] 翁林福. 淡水珍珠和海水珍珠化学成分的分析比较 [J]. 中国药学杂志, 1989, 24 (5): 276

[3] 周晓云. 酶技术 [M]. 北京: 石油工业出版社, 1995. 263—273.

[4] Bruno Stellmach. 酶的测定方法 [M]. 钱嘉渊译. 北京: 中国轻工业出版社, 1992. 247—250.

A Study on Hydrolysis of Protein in Pearls by Papain

JIN Feng—ming¹, LI Gui—zheng², SUN Xiao—juan¹

(1. Department of Chemical Engineering, Jiangsu Institute of Petrochemical Technology, Changzhou 213016, China;
2. Center of Analysis and Research, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: The contents of amino acids in protein of pearls were determined by reverse—phase high—performance liquid chromatography after precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. The effect of such factors as dosage of papain, concentration of protein, time of reaction, acidity, temperature on hydrolytic ratio of protein in pearls by papain was studied. A simple and no—pollution technique for hydrolyzing protein in pearls by papain to obtain amino acids and peptides was developed in order to provide a basis for the effective use of pearl resources in our country.

Key words: pearls; protein; papain; hydrolysis