

元宝枫蛋白酶的分离纯化及其生化性质

马丽¹, 邱业先², 杨进军³, 杜天真⁴

(1. 安徽工业大学, 安徽 马鞍山 243002; 2. 仲恺农业技术学院, 广东 广州 510225;
3. 天津理工学院, 天津 300191; 4. 江西农业大学, 江西 南昌 330045)

摘要: 采用有机溶剂沉淀和柱层析方法, 从元宝枫 (*Acer truncatum* Bunge) 叶片中提取并纯化了叶蛋白酶。该蛋白酶的比活性为 $1\ 408.04\ \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 纯化倍数 50.77。以酪蛋白为底物时, 该蛋白酶最适 pH 7.5, 最适温度 60°C ; 该蛋白酶在 pH 5.0 ~ pH 10.0 范围内以及在 60°C 以下较为稳定。该酶的活力能被半胱氨酸和 EDTA 激活, 但受 HgCl_2 抑制, 具有巯基蛋白酶的特性。

关键词: 元宝枫蛋白酶; 酶活力; 最适 pH; 最适温度; 抑制剂

中图分类号: Q814.1; Q946.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2005)01-0006-04

Isolation and biochemical properties of a protease from *Acer truncatum* Bunge MA Li¹, QIU Ye-xian², YANG Jin-jun³, DU Tian-zhen⁴ (1. Anhui University of Technology, Ma' anshan 243002, China; 2. Zhongkai University of Agriculture and Technology, Guangzhou 510225, China; 3. Tianjin University of Technology, Tianjin 300191, China; 4. Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2005, 14(1): 6-9

Abstract: A protease was extracted and purified from the fresh leaves of *Acer truncatum* Bunge by means of Sephadex A-50, Sephadex G-200 column chromatography. The specific activity of the protease was $1\ 408.04\ \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, the purification times was 50.77. The optimal pH value of the protease taking casein as a substrate was about pH 7.5, and the optimal temperature 60°C . It was relatively stable at the ranging from pH 5.0 to pH 10.0 and at the temperature below 60°C . The protease has the properties of mercaptoproteinase, it could be activated by cysteine and EDTA, but inhibited by HgCl_2 .

Key words: *Acer truncatum* Bunge protease; enzyme activity; optimal pH; optimal temperature; inhibitor

蛋白酶是催化肽键水解的酶类, 广泛存在于动物内脏、植物茎叶和果实及微生物中。由于蛋白酶来源丰富, 很多胞外酶具有容易提纯、分子较小、功能较简单等特点, 因而在酶学研究中蛋白酶的研究较早也最深入, 是比较成熟经典的研究领域之一。

蛋白酶对蛋白质具有高效专一的分解特性, 不同来源的蛋白酶具有不同的用途, 广泛应用于医药、食品、轻工、化妆品、饲料和生命科学研究等方面, 目前饲料工业也开始利用包括蛋白酶在内的多种酶作为饲料添加剂。酶制剂市场需求旺盛, 开发植物蛋白酶新资源, 可以缓解目前蛋白酶的供需矛盾。

目前人们所利用的植物蛋白酶主要是木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶和无花果蛋白酶^[1]。随着研究的深入, 新的有使用价值的植物蛋白酶资源将会不断被发现。邱业先等的研究结果表明, 槭树科 (*Aceraceae*) 植物含有高蛋白酶活性^[2]。槭树科植

物在中国分布广泛, 为森林中常见树种之一, 也是常用的庭院或行道树种, 资源丰富。为此, 本文分离纯化了槭树属 (*Acer* L.) 元宝枫 (*Acer truncatum* Bunge) 的蛋白酶, 并对其性质进行了鉴定研究, 以期为这一优良蛋白酶资源的开发利用提供实验数据。

1 材料和方法

1.1 材料

元宝枫叶片采自江西农业大学校园内, 为 10 月份期间生长良好的成熟叶片 (均匀采集)。

收稿日期: 2004-01-07

基金项目: 国家自然科学基金 (30060010) 和江西省自然科学基金 (0030032) 资助项目

作者简介: 马丽 (1978-), 女, 山东泰安人, 硕士, 助教, 从事蛋白质和酶的研究工作。

1.2 方法

1.2.1 蛋白酶的分离纯化 元宝枫叶片切碎匀浆后,按下列工艺流程经有机溶剂沉淀进行粗分离^[3],然后经 Sephadex A-50 和 Sephadex G-200 进行 2 次柱层析纯化^[4,5],得到元宝枫蛋白酶纯品。

工艺流程:元宝枫叶片→切碎→加入 pH 7.8 磷酸缓冲液匀浆→3 000 r·min⁻¹离心 10 min→弃渣,上清液 3 000 r·min⁻¹离心 10 min→弃渣,上清液加 100% 丙酮→4 000 r·min⁻¹离心 10 min→弃上清液,沉淀冷冻干燥(粗酶)→pH 7.8 磷酸缓冲液溶解→Sephadex A-50 层析柱→收集活力高峰管浓缩→Sephadex G-200 层析柱→收集活力高峰管,冷冻干燥(纯化酶)。

1.2.2 酶活力测定 采用福林试剂法测定酶活力^[6,7],以 25℃ 最适反应条件下 1 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.3 蛋白质含量测定 考马斯亮蓝 G-250 染色法^[6,7]。

1.2.4 最适 pH 测定 室温(25℃)下,酶活力测定体系用乙酸-乙酸钠缓冲液调节 pH 值为 5.0 和 5.5^[8],用磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液调节 pH 值为 6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0^[8],用 Tris-盐酸缓冲液调节 pH 值为 8.5 和 9.0^[8],用甘氨酸-氢氧化钠缓冲液调节 pH 值为 9.5 和 10.0^[8],10 min 后分别测定酶活力(重复 3 次,取平均值)。

1.2.5 pH 稳定性测定 室温(25℃)下,分别在 pH 值为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 和 10.0(缓冲液体系同 1.2.4)条件下处理 30

min 后测定酶活力(重复 3 次,取平均值)。

1.2.6 最适温度测定 酶液在 pH 7.5 条件下,分别在 20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃ 和 80℃ 条件下处理 10 min 后,测定酶活力(重复 3 次,取平均值)。

1.2.7 热稳定性测定 酶液在 pH 7.5 条件下,分别在 20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃ 和 80℃ 条件下处理 30 min 后,测定酶活力(重复 3 次,取平均值)。

1.2.8 激活剂对酶活力的影响 在酶活力测定体系(pH 7.5, 60℃)中分别加入 $1.00 \times 10^{-2} \sim 6.25 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 和 $1.00 \times 10^{-1} \sim 6.25 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 半胱氨酸(对照则加入蒸馏水),测定酶活力(重复 3 次,取平均值)。

1.2.9 抑制剂对酶活力的影响 在酶活力测定体系(pH 7.5, 60℃)中分别加入 $4 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HgCl}_2$ (对照则加入蒸馏水),测定酶活力(重复 3 次,取平均值)。

2 结果和分析

2.1 元宝枫蛋白酶的纯化结果

元宝枫蛋白酶的纯化结果见表 1。从表 1 可以看出,经过丙酮沉淀和 Sephadex A-50 和 Sephadex G-200 柱层析纯化后的元宝枫蛋白酶比活力可达 $1\ 408.04 \text{ U}/\text{mg}^{-1}$,但最终回收率不高,仅达 18.96%,造成此结果的主要原因是 Sephadex G-200 步骤的回收率较低。

表 1 元宝枫蛋白酶的纯化结果

Table 1 The purification result of the *Acer truncatum* Bunge protease

纯化步骤 Purification step	体积/mL Volume	总蛋白量/mg Total protein	总活力/U Total activity	比活力/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ Specific activity	纯化倍数 Purification multiple	回收率/% Rate of recovery
粗提液 Rough liquid	10	74.99	2 079.36	27.73	1.00	100.00
离心上清液 Centrifugal upper-liquid	10	52.03	1 904.70	36.61	1.32	91.60
Sephadex A-50 柱层析 Column chromatograph		1.93	834.24	432.25	15.59	40.12
Sephadex G-200 柱层析 Column chromatograph		0.28	394.25	1 408.04	50.77	18.96

2.2 元宝枫蛋白酶的生化性质

2.2.1 最适 pH 值 不同 pH 条件下,元宝枫蛋白酶的酶活力变化见表 2。结果表明,元宝枫叶蛋白酶酶促反应的最适 pH 值为 pH 7.5,与木瓜蛋白酶(papain, pH 7.3 ~ pH 7.6),剑麻(*Agave sisalana*

Perr. ex Engelm.)蛋白酶(pH 7.5)^[5]等植物蛋白酶相近,而低于菠萝蛋白酶(bromelain, pH 8.3)^[9]。

2.2.2 pH 稳定性 纯化的元宝枫蛋白酶在 pH 5.0 ~ pH 10.0 范围内都较稳定(表 3),酶活力差异不明显($186.4 \sim 213.4 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$),在 pH 7.0 和 pH 7.5 时

酶活力达最高,与木瓜蛋白酶和剑麻蛋白酶相似,这些蛋白酶都在接近中性的 pH 值范围内最稳定。

表2 元宝枫蛋白酶最适 pH 值测定
Table 2 The optimal pH value of the *Acer truncatum* Bunge protease

pH	酶活力/ $U \cdot mg^{-1}$ Enzyme activity	pH	酶活力/ $U \cdot mg^{-1}$ Enzyme activity
5.0	15.69	8.0	162.91
5.5	21.76	8.5	80.34
6.0	35.60	9.0	68.49
6.5	63.74	9.5	34.18
7.0	208.48	10.0	9.86
7.5	220.54		

表3 元宝枫蛋白酶的 pH 稳定性
Table 3 The pH stability of the *Acer truncatum* Bunge protease

pH	酶活力/ $U \cdot mg^{-1}$ Enzyme activity	pH	酶活力/ $U \cdot mg^{-1}$ Enzyme activity
5.0	186.4	8.0	205.3
5.5	202.1	8.5	208.4
6.0	198.4	9.0	205.1
6.5	200.3	9.5	200.1
7.0	213.4	10.0	197.2
7.5	210.6		

2.2.3 最适温度 不同温度下,元宝枫蛋白酶的酶活力见表4。结果表明,以酪蛋白为底物,元宝枫蛋白酶的酶促反应最适温度为 $60^{\circ}C$,当温度达 $70^{\circ}C$ 时,酶活力显著下降。

表4 元宝枫蛋白酶最适温度测定
Table 4 The optimal temperature of the *Acer truncatum* Bunge protease

温度/ $^{\circ}C$ Temperature	酶活力/ $U \cdot mg^{-1}$ Enzyme activity	温度/ $^{\circ}C$ Temperature	酶活力/ $U \cdot mg^{-1}$ Enzyme activity
20	130.16	60	551.58
30	146.52	70	176.31
40	220.54	80	156.21
50	534.14		

2.2.4 热稳定性 元宝枫蛋白酶在 $60^{\circ}C$ 以内具有较好的稳定性(表5),温度高于 $70^{\circ}C$ 后,酶活力急剧降低,酶活力仅为最大活力的 29.17%。

2.2.5 EDTA 对元宝枫蛋白酶活力的影响 不同浓度 EDTA 对元宝枫蛋白酶活力的影响见表6。结果表明,EDTA 具有激活元宝枫蛋白酶的作用,加入不同浓度的 EDTA,酶活力均大于对照,并且激活程度随 EDTA 浓度增加而增大。

表5 元宝枫蛋白酶的热稳定性
Table 5 The temperature stability of the *Acer truncatum* Bunge protease

温度/ $^{\circ}C$ Temperature	酶活力/ $U \cdot mg^{-1}$ Enzyme activity	温度/ $^{\circ}C$ Temperature	酶活力/ $U \cdot mg^{-1}$ Enzyme activity
20	254.38	60	423.41
30	279.27	70	123.51
40	382.46	80	85.36
50	400.28		

表6 EDTA 对元宝枫蛋白酶活力的影响¹⁾
Table 6 The effect of EDTA on activity of the *Acer truncatum* Bunge protease¹⁾

EDTA 浓度/ $mol \cdot L^{-1}$ Concentration of EDTA	酶活力/ $U \cdot mg^{-1}$ Enzyme activity	EDTA 浓度/ $mol \cdot L^{-1}$ Concentration of EDTA	酶活力/ $U \cdot mg^{-1}$ Enzyme activity
CK	551.58	2.50×10^{-3}	623.95(13.12)
6.25×10^{-4}	564.54(2.35)	5.00×10^{-3}	645.57(17.04)
1.25×10^{-3}	582.36(5.58)	1.00×10^{-2}	696.92(26.35)

¹⁾ 括号中的数值表示与对照相比酶活力提高的百分率 The numbers in brackets indicate the percentage of enzyme activity increasing comparing with CK.

2.2.6 半胱氨酸对元宝枫蛋白酶活力的影响 不同浓度半胱氨酸对元宝枫蛋白酶活力的影响见表7。结果表明,半胱氨酸对元宝枫蛋白酶具有较强的激活效果,在 $6.25 \times 10^{-3} \sim 1.00 \times 10^{-1} mol \cdot L^{-1}$ 的浓度范围里,随半胱氨酸浓度的增加激活效果增强,这与前人报道的木瓜蛋白酶等植物蛋白酶受半胱氨酸激活的效果是一致的。

表7 半胱氨酸对元宝枫蛋白酶活力的影响¹⁾
Table 7 The effect of cysteine on activity of the *Acer truncatum* Bunge protease¹⁾

半胱氨酸浓度/ $mol \cdot L^{-1}$ Concentration of Cys	酶活力/ $U \cdot mg^{-1}$ Enzyme activity	半胱氨酸浓度/ $mol \cdot L^{-1}$ Concentration of Cys	酶活力/ $U \cdot mg^{-1}$ Enzyme activity
CK	551.58	2.50×10^{-2}	751.53(36.25)
6.25×10^{-3}	607.18(10.08)	5.00×10^{-2}	816.49(48.03)
1.25×10^{-2}	682.46(23.73)	1.00×10^{-1}	923.95(67.51)

¹⁾ 括号中的数值表示与对照相比酶活力提高的百分率 The numbers in brackets indicate the percentage of enzyme activity increasing comparing with CK.

2.2.7 $HgCl_2$ 对元宝枫蛋白酶活力的影响 不同浓度 $HgCl_2$ 对元宝枫蛋白酶活力的影响见表8。结果表明, $HgCl_2$ 对元宝枫蛋白酶活力具有抑制作用,并且在 $5 \times 10^{-8} \sim 4 \times 10^{-7} mol \cdot L^{-1}$ 的浓度范围内随 $HgCl_2$ 浓度的增高抑制作用加强。

表8 HgCl₂对元宝枫蛋白酶活力的影响¹⁾
Table 8 The effect of HgCl₂ on activity of the *Acer truncatum* Bunge protease¹⁾

HgCl ₂ 浓度/mol·L ⁻¹ Concentration of HgCl ₂	酶活力/U·mg ⁻¹ Enzyme activity	HgCl ₂ 浓度/mol·L ⁻¹ Concentration of HgCl ₂	酶活力/U·mg ⁻¹ Enzyme activity
CK	551.58	2 × 10 ⁻⁷	488.81(11.38)
5 × 10 ⁻⁸	530.23(3.87)	3 × 10 ⁻⁷	418.10(24.20)
1 × 10 ⁻⁷	505.41(8.37)	4 × 10 ⁻⁷	374.79(32.05)

¹⁾ 括号中的数值表示与对照相比酶活力提高的百分率 The numbers in brackets indicate the percentage of enzyme activity increasing comparing with CK.

3 结论和讨论

本文对元宝枫蛋白酶的提取及纯化做了初步探索,纯化的元宝枫蛋白酶的比活力可达 1 408.04 U·mg⁻¹,但回收率不高,仅为18.96%,主要原因是 Sephadex C-200 步骤的回收率低。

元宝枫蛋白酶的酶促反应最适 pH 值、最适温度、pH 稳定性和热稳定性等性质与木瓜蛋白酶和无花果蛋白酶(ficin)等植物巯基蛋白酶相似。

目前人们已利用的植物蛋白酶主要有木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、无花果蛋白酶、剑麻蛋白酶和骆驼刺(*Alhagi sparsifolia* Shap. ex Keller et Shap.)蛋白酶,但是这些植物多产自热带地区,产地温度高,从

生产地到销售地需要经过长距离运输,这些都对酶活力的保持极为不利,因而在热带以外地区开发新的蛋白酶资源极为重要。槭树科植物如元宝枫,不仅蛋白酶含量高,而且性能好,是可替代木瓜等植物制取蛋白酶的新资源之一。

参考文献:

- [1] 路英华. 蛋白酶的研究进展[J]. 生物科学信息, 1991, 3(2): 8-10.
- [2] 邱业先,陈尚研,杜天真,等. 几种槭树科植物叶蛋白酶活性的季节变化[J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(5): 652-655.
- [3] 邱业先,刘勇,周群,等. 无花果蛋白酶的分离纯化及其理化性质研究[J]. 江西农业大学学报, 1996, 18(1): 46-50.
- [4] 徐凤彩,李明启. 番麻蛋白酶的分离纯化及其部分特性研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1993, 25(1): 25-31.
- [5] 许智强,徐凤彩,李明启. 剑麻蛋白酶的分离纯化及其部分特性的研究[J]. 植物学报, 1993, 35(3): 171-178.
- [6] 赵赣,陈鑫磊. 生物化学实验指导[M]. 南昌:江西科学出版社, 2000. 57-60.
- [7] 鲁子贤. 蛋白质和酶学研究方法[M]. 北京:科学出版社, 1989. 5-6.
- [8] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用[M]. 武汉:武汉大学出版社, 1999. 414-441.
- [9] 黄卓烈,林韶湘,李明启. 菠萝茎蛋白酶的提取及其活性保护研究[J]. 华南农业大学学报, 1993, 14(1): 139-143.

(责任编辑:惠红)

《云南植物研究》征订启事

《云南植物研究》是国家科委(79)国科发条字341号文批准创办的植物学专业学报,是中国科学院主管的全国性自然科学期刊,现已成为中国植物科学研究发表论文的主要学术性刊物之一,为中国生物学类科技核心期刊、中国自然科学核心期刊。本刊荣获中国科学院优秀期刊二等奖(1996)及一等奖(2000)、第二届全国优秀期刊三等奖(1997)及云南省优秀科技期刊一等奖(1997)等,2001年进入中国期刊方阵,并入选国家“双效期刊”。所发表的论文被CA、BA、CABS、中国生物文摘、中国林业文摘、中国药学术文摘、中国科学引文数据库、万方数据库及中国学术期刊(光盘版)等国内外数据库所收录。凡从事植物学各分支学科研究的科研人员及各大专院校的生物学教师及学生均可订阅本刊。

本刊报道植物学各分支学科具有创新水平的原始研究

论文和简报,植物学领域的新发现及重大应用价值的新成果快报;结合本人研究工作,反映国际最新研究水平的短篇综述等。中英文稿件均受欢迎。撰稿格式请参见本刊“征稿简则”要求。本刊论文发表周期6~10个月,热情欢迎同行学者赐稿。

《云南植物研究》为双月刊,双月25日出版,2005年每期定价15元,需要的单位或个人请到当地邮局订阅,邮发代号:64-11。若错过订阅时间,可将款直接汇至编辑部,编辑部将按期定时给您邮寄。

联系地址:云南省昆明市北郊黑龙潭 中国科学院昆明植物研究所;邮政编码:650204;E-mail: Bianji@mail.kib.ac.cn;电话:0871-5223032;传真:0871-5223163;网址://www.kib.ac.cn/editor/。