

元宝枫叶蛋白酶的酶动力学特征

马丽¹, 邱业先², 杜天真³

(1. 安徽工业大学化学化工学院, 安徽 马鞍山 243002;

2. 仲恺农业技术学院, 广东 广州 510225; 3. 江西农业大学, 江西 南昌 330045)

Study on kinetic characteristics of protease from *Acer truncatum* Bunge MA Li¹, QIU Ye-xian², DU Tian-zhen³
(1. College of Chemist and Chemical Engineering, Anhui University of Technology, Ma'anshan 243002, China; 2. Zhongkai University of Agriculture and Technology, Guangzhou 510225, China; 3. Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2006, 15(1): 70-71

Abstract: Using casein as a substrate, the kinetic characteristics of protease from *Acer truncatum* Bunge leaf was studied. Michaelis-Menten constant (K_m) and the maximal reaction rate (V_{max}) of the protease were determined under different temperatures (40°C - 80°C) and different pH values (pH 6.5 - pH 8.5). The results indicated that the K_m decreased and the V_{max} increased when temperature increased from 40°C to 80°C. The K_m decreased and V_{max} increased with pH values rising from pH 6.5 to pH 7.5, but the K_m increased and V_{max} decreased with pH values rising from pH 7.5 to pH 8.5. The results show that the proper pH of enzymatic reaction of the protease is pH 7.5.

关键词: 元宝枫; 蛋白酶; 酶动力学

Key words: *Acer truncatum* Bunge; protease; enzyme kinetic

中图分类号: Q949.755.3; Q946.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2006)01-0070-02

酶促动力学是研究酶促反应的速度及各种因素如底物浓度、酶浓度、抑制剂、激活剂、温度、pH 等对酶促反应速度影响的科学,是酶学研究中重要的内容。在一定条件下,酶促反应都有其特定的酶动力学参数,如 K_m 值(米氏常数)和 V_{max} 值(最大反应速率)等。 K_m 是反映酶动力学性质的重要特征性常数,对某一酶促反应而言,在一定条件下都有特定的 K_m 值,可以用来鉴别酶。 K_m 值还可以判断酶的专一性和天然底物,其值随不同底物而异的现象有助于研究酶的活性部位,可以帮助推断某一代谢反应的方向和途径,对了解酶在细胞内的主要催化方向及生理功能有重要意义。 V_{max} 是反映酶-底物复合体分解为酶和产物的速度的指标。元宝枫(*Acer truncatum* Bunge)为槭树科(Aceraceae)槭属(*Acer* Linn.)植物,作者已经分离纯化了元宝枫叶蛋白酶,并对其性质进行了鉴定研究,为促进其开发应用,对其酶动力学特征做了进一步的研究,测定了不同温度、不同 pH 值条件下元宝枫叶蛋白酶的 K_m 值和 V_{max} 值,以期为元宝枫叶蛋白酶动力学研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

元宝枫蛋白酶从元宝枫叶片中提取^[1],其比活力为 $1408.04 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

1.2 动力学设计

以酪蛋白为底物,配制 5 种不同的底物浓度^[2],分别为 0.3125 、 0.625 、 1.25 、 2.5 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,实验设置 5 个反应温度(40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C)和 5 种反应 pH 值(6.5,

7.0, 7.5, 8.0, 8.5)。

1.3 酶活力的测定

用福林试剂法^[3]进行测定。反应初速度以 1 min 生成酪氨酸的微摩尔数表示。

1.4 数据处理

按照 Lineweaver-Burk 方法^[4], $\frac{1}{\nu} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$ 以 $\frac{1}{\nu}$ 对 $\frac{1}{[S]}$ 作图,求出 K_m 和 V_{max} 。 ν 为反应初速度, $[S]$ 为底物浓度。

2 结果和分析

2.1 温度对元宝枫蛋白酶的酶动力学常数的影响

温度变化对元宝枫蛋白酶 V_{max} 和 K_m 值影响趋势见图 1 和图 2。

当温度为 40°C ~ 80°C 时,元宝枫蛋白酶 V_{max} 随温度的提高而增加,这与最适反应温度为 60°C 的结论不同^[1],原因是在短时间内,温度对酶活性的钝化作用不及上升的温度通过增加反应系统的能量而提高的反应速度,短时间内仍在最适温度以上表现出高反应速度;而 K_m 值随着温度升高而降低,表明酶反应随着温度上升,酶分子对底物的亲和力增加。

收稿日期: 2005-04-27

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,山东泰山人,硕士,讲师,从事蛋白质和酶的研究工作。

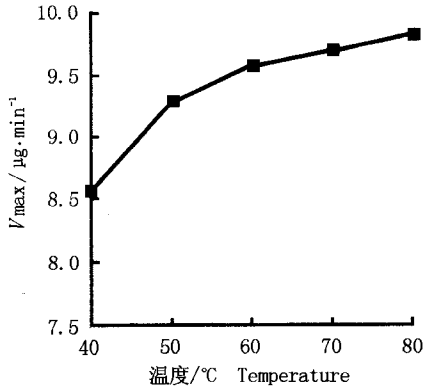


图 1 元宝枫蛋白酶 V_{max} 与温度的关系
Fig. 1 Relationship between V_{max} of *Acer truncatum* Bunge protease and temperature

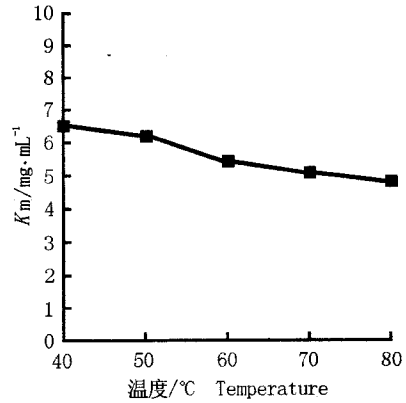


图 2 元宝枫蛋白酶 K_m 与温度的关系
Fig. 2 Relationship between K_m of *Acer truncatum* Bunge protease and temperature

2.2 pH 值对元宝枫蛋白酶的动力学常数的影响

pH 值对元宝枫蛋白酶动力学常数的影响见图 3。

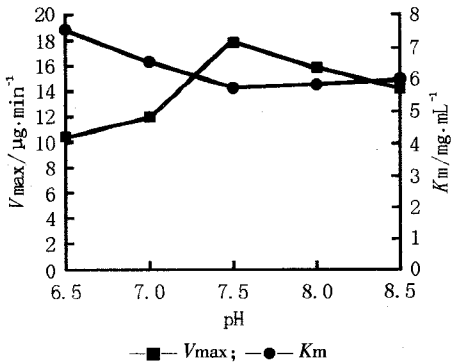


图 3 元宝枫蛋白酶 K_m , V_{max} 与 pH 的关系
Fig. 3 Relationship between K_m , V_{max} of *Acer truncatum* Bunge protease and pH

pH 值为 6.5~7.5 时,元宝枫叶蛋白酶的 K_m 值随着 pH 值的增大而减小,而 V_{max} 值随着 pH 值增大而增大;当 pH 值为 7.5~8.5 时, K_m 随着 pH 的增大而增大,而 V_{max} 则随着 pH 值增大而减小。

3 讨 论

pH 7.5 时,元宝枫叶蛋白酶的 K_m 值最小,而 V_{max} 值

达到最大,此时酶分子对底物的亲和力最大,所以 pH 7.5 为该酶的最佳反应 pH 值。元宝枫蛋白酶的酶促反应受到温度变化的影响,这也是酶反应的共性,在一定的温度范围内,温度越高,反应底物的活化能越高,反应速度越快^[5]。本实验中元宝枫蛋白酶的 V_{max} 值随着温度的升高而升高,甚至在超出最适温度时的反应速度比最适温度下的还要高,这与最适反应温度为 60℃ 的结论不同,原因是短时间内酶分子的变性不明显,总体上仍使反应速度加快,但在生产中酶促水解反应是长效的,而且温度越高对设备的要求也越高,所以实际生产中还是应选择 60℃ 左右的温度。

参考文献:

[1] 马 丽,邱业先,杨进军,等. 元宝枫蛋白酶的分离纯化及其生化性质[J]. 植物资源与环境学报, 2005, 14(1): 6-9.
 [2] 吴晓黎,陶建蜀. 底物浓度选择在酶 K_m 值测定中的重要性[J]. 贵阳医学院学报, 1994, 19(3): 239-242.
 [3] 赵 贇,陈鑫磊. 生物化学实验指导[M]. 南昌:江西科学出版社, 2000. 57-60.
 [4] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学(第三版上册)[M]. 北京:高等教育出版社, 2002. 362.
 [5] 赵武玲,王秀蛟. 果实菠萝蛋白酶的动力学研究[J]. 中国农业大学学报, 1999, 4(1): 11-13.