

## 罗非鱼肠蛋白酶的分离纯化及其性质

吴燕燕<sup>1\*</sup>, 李来好<sup>1</sup>, 郝志明<sup>2</sup>, 杨贤庆

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300;

2. 国家加工食品质量监督检测中心, 广东 广州 510330)

**摘要:**以罗非鱼肠为原料,采用超声波辅助提取技术、电泳技术和层析技术等对罗非鱼肠道蛋白酶进行研究,结果表明:将鱼肠匀浆经超声波提取的粗酶液,用30%~70%的硫酸铵盐进行盐析、Hitrap™ Q FF阴离子交换柱纯化及Sephadex G-100凝胶柱分离纯化,得到罗非鱼肠蛋白酶纯品,其比活为335 U/mg,得率为32.8%;SDS-PAGE电泳为单一蛋白酶带,分子量为28 ku。该酶最适pH为8.0~8.5,在pH 7.0~9.0的条件下稳定;最适温度为37~42℃,热稳定性好;该酶的 $K_m$ 值和 $V_{max}$ 值分别为0.605 g/L和9.407 μg/min。金属离子 $Ag^+$ 、 $Pb^{2+}$ 对蛋白酶有完全抑制作用, $Na^+$ 、 $K^+$ 对该酶无抑制作用。丝氨酸蛋白酶抑制剂能完全抑制该酶活性,胃蛋白酶抑制剂和脲素对该酶有一定抑制作用,EDTA没有明显抑制作用,DTT能激活该酶活性,该酶为丝氨酸蛋白酶。

**关键词:**罗非鱼肠;蛋白酶;纯化;性质

**中图分类号:**TS 254.1; S 917

**文献标识码:**A

蛋白酶作为市场上需求量最大的三种酶之一,在食品、医药、化工等方面都有很广泛的应用<sup>[1]</sup>。消化道蛋白酶是最早受到广泛研究的一类蛋白酶,几十年来,人们发现几乎所有种属的脊椎动物消化道都含有相类似的蛋白酶。有关牛、羊、猪、马、鲸等来源的消化道蛋白酶已有研究报道<sup>[2-3]</sup>。在鱼类消化道蛋白酶的活性研究方面,国外先后报道了野鳗(*Labeorohita*)、粘胡子鲶(*Clarias batrachus*)、叉尾鲶(*Wallago attu*)等鱼类的消化酶活性,国内学者也对淡水白鲢(*Piaractus brachypomus*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)等鱼类的淀粉酶、蛋白酶的分布和活性进行了研究<sup>[4-5]</sup>。

近几年,罗非鱼在我国发展迅速,已经形成从繁殖、养殖到加工的良好生产体系,2008年我国罗非鱼产量已达100万t,随着罗非鱼在全球的消费呈上升趋势,罗非鱼成为我国加工出口创汇的主要品种,罗非鱼加工过程产生大量的废弃物,所以亟待对罗非鱼加工废弃物进行高值化利用<sup>[6]</sup>。

集约型的鱼类加工方式为罗非鱼内脏的收集与利用提供了有利条件。鱼类内脏中蛋白酶含量丰富,所含蛋白酶在较宽的温度范围内都具有活性,是良好的蛋白酶来源<sup>[7]</sup>。目前,对于罗非鱼内脏中酶类资源的开发利用研究甚少。因此,研究罗非鱼肠蛋白酶分离纯化技术及其酶学特性,为下一步开发利用罗非鱼肠蛋白酶提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

**原料** 罗非鱼肠,由中山食品(水产)进出口集团有限公司提供,于-18℃冷冻备用。

**主要试剂** Hitrap™ Q FF, Sephadex G-100, Trypsin inhibitor, Pepstatin A, PCMB为Amersham公司产品;酪蛋白, SDS, TEMED为Sigma公司产品;丙稀酰胺,三(羟甲基)氨基甲烷(Tris),甘氨酸,溴酚蓝, PMSF为Mechem公司产品;牛血清蛋白为Genview公司产品; Sephadex™ G-100凝胶为Amersham Biosciences

公司;其他试剂为国产分析纯。

**主要仪器设备** ULTRA-TURRAX<sup>®</sup> T25 匀浆机(德国 IKA), GENESYST M5 紫外-可见分光光度计(美国 Thermo Spectronic), 3K30 高速冷冻离心机(德国 SIGMA), CHRIST 冷冻干燥机(德国 SIGMA), Hitrap<sup>™</sup> Q FF 阴离子交换柱(Amersham Biosciences 公司), Mini Protean 小型垂直电泳槽(德国 Bio-rad), TI-H-10 MF2/MF3 型超声波仪(德国 ELMA 公司), 贮酶冰箱(日本 SANYO 公司)等。

## 1.2 方法

**蛋白酶提取、分离方法**<sup>[8-9]</sup> 将罗非鱼肠解冻,洗净,用滤纸吸去水并称重,加 5 倍体积(W:V)的 0.02 mol/L pH 7.5 PBS 缓冲溶液,匀浆,匀浆液放在超声波仪中提取 85 min、超声波输出功率为 280 W、温度为 35 ℃,再将提取液在 4 ℃ 10 000 r/min 离心 30 min,收集上清液,用 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 分级盐析,收集沉淀并溶于少量蒸馏水中,4 ℃ 下用 0.02 mol/L PBS 缓冲液透析 12 h,离心,收集上清液为粗酶液。

**蛋白酶活性测定方法** 以酪蛋白为底物,用不同 pH 的缓冲溶液配制成 1% 酪蛋白溶液,并用酸碱调节至所需的 pH。测定方法参照文献[10]。一个酶活力单位定义为,在测定条件下(37 ℃),样品水解酪蛋白时每分钟产生 1 μg 酪氨酸所需的酶量,以 U 表示。

**蛋白含量测定方法** 采用考马斯亮兰 G250 染色法,以牛血清蛋白为标准样品<sup>[11]</sup>。

**硫酸铵分级沉淀**<sup>[12]</sup> 将粗酶液分成 6 等份,每份 10 mL,分别加硫酸铵至 10%、25%、40%、55%、70%、75% 的饱和度,4 ℃ 静置过夜。离心取上清液,蒸馏水透析去除 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>,离心去沉淀,分别测定上清液蛋白酶活力和蛋白质含量,制作盐析曲线。将硫酸铵沉淀活性组分置于透析袋中,用 5 mmol/L、pH 8.0 Tris-HCl 缓冲溶液于 4 ℃ 冰箱中透析 16~24 h,期间换液数次。

**Hitrap<sup>™</sup> Q FF 阴离子交换层析** Hitrap<sup>™</sup> Q FF 柱(5 mL)用起始缓冲液平衡。将罗非鱼肠蛋白酶液上样 2 mL,用 0.2 mol/L Na<sup>+</sup>、pH 7.80、0.01 mol/L Tris-HCl 的缓冲溶液洗去未被吸附的组分,再用 0.2~0.7 mol/L Na<sup>+</sup>、pH 7.80、0.01 mol/L Tris-HCl 的缓冲溶液梯度洗脱蛋白酶,收集蛋白酶的活性部分。

**凝胶层析** 采用 Sephadex G-100 凝胶层析进行分子筛纯化。Sephadex G-100 柱(1.6 cm × 50 cm)用起始缓冲溶液平衡,将 Hitrap<sup>™</sup> Q FF 阴离子层析收集的活性组分上柱,用 5 mmol/L、pH 8.0 Tris-HCl 缓冲溶液进行洗脱,流速 1 mL/min,每管 5 min。测定各管的蛋白酶活性和蛋白质含量,收集蛋白酶活性峰。

**蛋白酶纯度和分子量的测定** 采用 SDS-PAGE 电泳测定<sup>[13]</sup>。

**酶 K<sub>m</sub> 值的测定**<sup>[10]</sup> 分别以质量浓度(g/L)为 5、4、3、2、1、0.5 的酪蛋白(pH 2.0)溶液为底物,在 37 ℃ 下反应,测其活性,以 Lineweaver-Burk 双倒数法作图,测定 K<sub>m</sub> 和 V<sub>max</sub> 值。

**罗非鱼肠蛋白酶最适温度和热稳定性分析** 以 1% 酪蛋白为底物,测定在不同温度下(10~70 ℃)下,纯化的肠蛋白酶的活力,蛋白酶活力以 OD<sub>275 nm</sub> 值表示。将该蛋白酶置于 4、25、40、50 ℃ 环境中热处理 15、30、45、60 min 后立即测定蛋白酶活性,并计算出酶活性残留率。

**罗非鱼肠蛋白酶最适 pH 和酸碱稳定性分析** 用 pH 1~13 的缓冲溶液配制 1% 的酪蛋白溶液,用 HCl 和 NaOH 调节 pH 值分别至 1~13,与粗酶液进行反应。测定粗酶液在不同 pH 条件下活力的变化。蛋白酶活力以 OD<sub>275 nm</sub> 值表示。

在 37 ℃ 下,将蛋白酶用不同 pH 值的缓冲液处理 30 min 后测定活性残留率。

**金属离子对酶活性的影响** 在蛋白酶液中加入以 0.01 mol/L、pH 7.80 Tris-HCl 配制的金属离子溶液,金属离子分别为 Mn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>,分别使其终浓度为 1.0 × 10<sup>-3</sup> mol/L,对照实验中加入同样体积的 Tris-HCl 溶液。样品于 25 ℃ 处理 15 min 后,以 1% 酪蛋白为底物,测定蛋白酶的活性。

**生化试剂对酶活性中心的化学修饰** 在酶液中加入以 0.01 mol/L、pH 7.80 Tris-HCl 配制的生化试剂溶液,生化试剂为 DTT,胃蛋白酶抑制剂,TI, Pepstatin A, PMSF, EDTA, 脲素, TNBS, PCMB, NBS, BrAc。终浓度都为 10 × 10<sup>-3</sup> mol/L,对照实验中加入同样体积的 Tris-HCl。样品于 25 ℃ 处理 15 min 后,以 1% 酪蛋白为底物,测定蛋白酶残留活性。同时用制备蛋白酶修饰剂的溶剂代替修饰剂,在相同的条件下测定酶活力,并以此酶活力为 100%。

### 1.3 数据处理

文中提取、纯化工艺的确定和性质测定分析都经 3 次以上重复实验,所有试验数据用 SAS (V 8.0)、Excel 2003 软件进行处理,数据以平均值 ± 标准差(±SD)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 罗非鱼肠蛋白酶硫酸铵分级研究

采用硫酸铵分级盐析法初步纯化蛋白酶,结果如图 1。结果表明,当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  饱和度为 30% 时,离心上清液中蛋白酶活力,用  $\text{OD}_{275}$  值表示为 0.710。酶活力与初值相比,几乎保持不变。而蛋白浓度,用  $\text{OD}_{595}$  表示为 0.119 即只有初始值的 14%。当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  饱和度为 70% 时,上清液中蛋白酶活力  $\text{OD}_{275}$  值只有 0.011,说明上清液中酶活力基本失去。由此可以确定,肠蛋白酶硫酸铵分级沉淀的硫酸铵饱和度为 30% ~ 70%。

### 2.2 离子交换层析纯化罗非鱼肠蛋白酶

**初始 pH 的确定** 经硫酸铵分离后的酶溶液加入 Hitrap™ Q FF 阴离子交换柱中,用相同的缓冲液平衡柱体。收集流出的洗脱液并测定其中

未被吸附的蛋白酶活性,以  $\text{OD}_{275}$  值表示(表 1)。

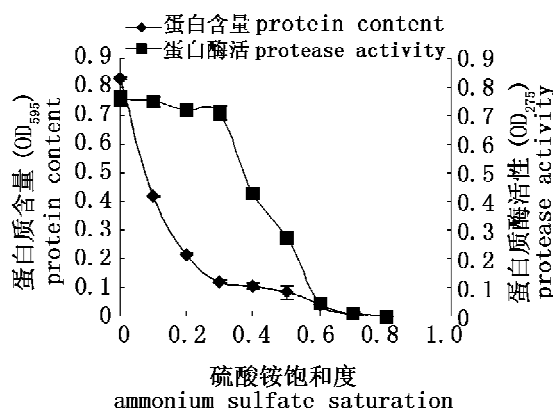


图 1 硫酸铵分级盐析分离蛋白酶  
Fig.1 Ammonium sulfate precipitations

由表 1 可见,在 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液中当  $\text{pH} \geq 7.13$  时蛋白酶加入 Hitrap™ Q FF 阴离子交换柱后,蛋白酶均不出现于流出液中。这表明罗非鱼肠蛋白酶的等电点应在  $\text{pH} 7.13$  以下,因而在上述缓冲液中带负电荷,可以被 Hitrap™ Q FF 吸附,所以 Tris-HCl 缓冲液  $\text{pH}$  可选择范围为 7.2 ~ 8.5。

表 1 Hitrap™ Q FF 阴离子交换层析纯化蛋白酶初始缓冲液 pH 的确定

Tab.1 Determination of the initial pH of buffer on Hitrap™ Q FF column chromatography

	pH					
	6.30	6.48	7.13	7.65	8.04	8.58
$\text{OD}_{275\text{nm}}$	$0.061 \pm 0.001$	$0.022 \pm 0.001$	0.000	0.000	0.000	0.000

**初始离子强度的确定** 以不同  $\text{Na}^+$  离子强度的  $\text{pH} 7.80$ , 0.01 mol/L Tris-HCl 为初始纯化条件(表 2)。在 NaCl 浓度为 0.2 mol/L 时即

可导致罗非鱼肠蛋白酶的不完全吸附,吸附率为 82.6%。随着钠离子强度的提高,吸附率下降,所以确定初始  $\text{Na}^+$  离子强度为 0.2 mol/L。

表 2 Hitrap™ Q FF 阴离子交换层析初始离子强度的确定

Tab.2 Determination of the initial ionic strength on Hitrap™ Q FF column chromatography

$\text{Na}^+$ 离子强度 (mol/L) $\text{Na}^+$ strength	流出液中酶活 ( $\text{OD}_{275\text{nm}}$ ) enzyme activity of outflow	吸附率 (%) absorption rate
0.0	0.000	100
0.2	$0.109 \pm 0.005$	82.6
0.4	$0.333 \pm 0.005$	39.2
0.6	$0.532 \pm 0.001$	11.3

**吸附容量的测定** 将不同体积的 0.3 mg/mL 的蛋白酶液加入 5 mL 的 Hitrap™ Q FF 离子交换柱中,用 0.23 mol/L  $\text{Na}^+$ 、 $\text{pH} 7.80$ 、0.01 mol/L Tris-HCl 的缓冲溶液洗脱,收集流出液并测定其蛋白酶的活性,计算酶在阴离子交换柱中

的吸附率,结果如表 3。从表 3 中可以看出随着样品量的增加,吸附量在上升,但吸附率却呈下降趋势。在上样量达到 2.5 mL 时回收率只有 63.0%。为保证蛋白酶的回收率,选择上样量为 2.0 mL。

表 3 Hitrap™ Q FF 阴离子交换层析样品上样量的确定

Tab.3 Determination of the sample volume on Hitrap™ Q FF column chromatography

样品量(mL) sample volume	加入酶活(U) enter protease activity	洗出液酶活(U) enzyme activity of eluent	吸附率(%) absorption rate	吸附酶量(U) enzyme activity of absorption
0.5	324	0	100	324
1.0	649	24 ± 20	96.4 ± 0.5	625 ± 20
1.5	973	86 ± 36	91.1 ± 0.6	887 ± 36
2.0	1 297	342 ± 14	73.6 ± 0.3	955 ± 14
2.5	1 622	599 ± 23	63.0 ± 0.55	1 022 ± 23

Hitrap™ Q FF 阴离子交换柱层析纯化蛋白酶 采用上述实验确定的条件在 Hitrap™ Q FF 阴离子交换层析柱进行离子交换实验,由图 2 可见,经 Hitrap™ Q FF 阴离子交换层析可得 4 个蛋白峰,其中峰 II 有酶活性;峰 I 有酶活性,但是杂蛋白含量高。峰 III、IV 有少量酶活性。峰 II 在 0.3 ~ 0.4 mol/L NaCl 处洗出。收集峰 II 作为样品 C。将样品 C 浓缩、进一步纯化。

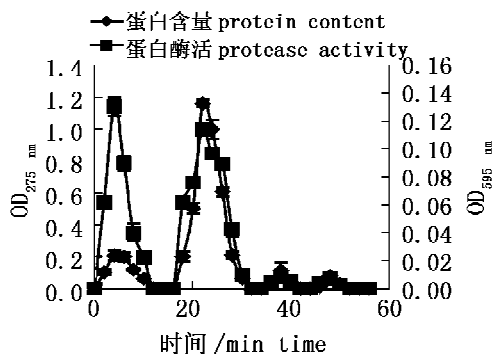


图 2 Hitrap™ Q FF 阴离子交换柱层析纯化罗非鱼肠蛋白酶

洗脱液流速为 2.5 mL/min, 2 min 收集一管。

Fig.2 Hitrap™ Q FF column chromatography of protease from tilapia intestine

Buffer at a flow speed is 2.5 mL/min, 2 mL per tube.

### 2.3 罗非鱼肠蛋白酶的凝胶层析

将上述阴离子交换层析蛋白峰 II 收集浓缩的样品 C, 采用 Sephadex™ G-100 凝胶层析进行分子筛纯化, 结果如图 3, Sephadex™ G-100 凝胶层析结果得到一个蛋白峰, 具有酶活, 收集峰样品液, 经 SDS-PAGE 电泳检测, 该峰为单一蛋白组份。收集活性峰洗脱液, 在 4 °C 下经去离子水透析, 冷冻干燥得到蛋白酶电泳纯样品。

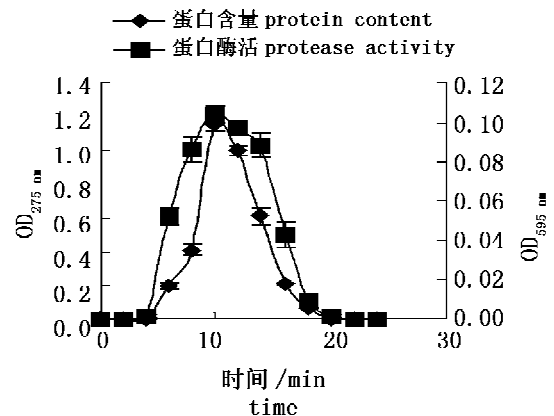
图 3 Sephadex G-100 凝胶纯化罗非鱼肠蛋白酶  
洗脱液流速为 2.5 mL/min, 2 min 收集一管。

Fig.3 Column chromatography of protease from tilapia intestine on sephadex G-100

Buffer at a flow speed is 2.5 mL/min, 2 mL per tube.

### 2.4 罗非鱼肠蛋白酶的分离纯化步骤及结果

罗非鱼肠分离、纯化蛋白酶各实验步骤结果列于表 4 中。数据统计看出, 提取的罗非鱼肠道蛋白酶经过硫酸铵层析分离后达到了部分纯化的效果, 蛋白酶比活力由原来粗提取液的 (40.3 ± 0.27) U/mg 纯化为 (208.2 ± 2.8) U/mg, 纯化了近 5 倍。经过离子交换层析和 Sephadex™ G-100 凝胶柱层析纯化后已达到了相当的纯度, 酶的比活力提高到 (335.9 ± 0.52) U/mg。

### 2.5 罗非鱼消化道蛋白酶的 SDS-PAGE 分析及分子量的测定

图 4 为经纯化后罗非鱼肠蛋白酶电泳图, 经染色后样品蛋白为一条电泳带。以蛋白 marker SDS-PAGE 电泳结果做蛋白对数分子量 - 相对迁移率曲线 (图 5)。用直尺量得样品蛋白的相对迁移率为  $R_f = 0.89$ , 根据图中的函数计算得该蛋白酶的对数分子量为 28 ku。

表 4 罗非鱼肠蛋白酶提取、分离主要步骤和结果  
Tab.4 The results of protease extracted and purified

操作程序 process	总蛋白(mg) total protein	总活性(U) total activity	比活(U/mg) specific activity	得率(%) recovery	纯化倍数 purified fold
提取液 crude enzyme solution	3 048 ± 8	122 754 ± 48	40.3 ± 0.27	100	1
0.3 饱和度盐析上清 solution of 0.3 saturation ammonium sulfate	455 ± 12	108 100 ± 89	237.8 ± 6.1	88.1	5.9
0.7 饱和度盐析沉淀 deposition of 0.7 saturation ammonium sulfate	333 ± 5	69 375 ± 125	208.2 ± 2.8	56.5	5.2
Hitrap™ Q FF 阴离子交换层析 Hitrap™ Q FF column chromatography	134.3 ± 0.6	42 717 ± 61	318.1 ± 1.3	34.8	7.9
Sephadex™ G-100 凝胶纯化 Sephadex™ G-100 column chromatography	119.9 ± 0.2	40 263 ± 32	335.9 ± 0.52	32.8	8.3

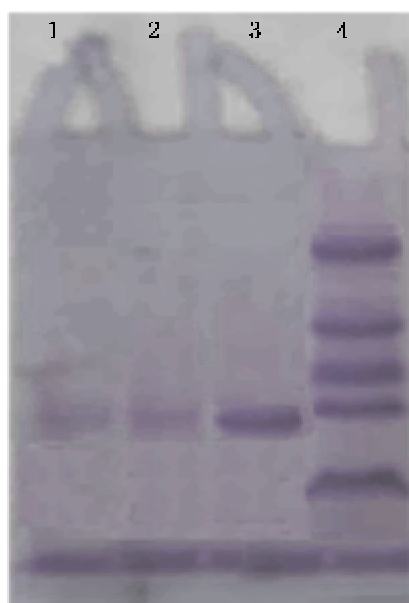


图 4 罗非鱼肠蛋白酶 SDS-PAGE 电泳  
1,2,3 为样品,4 为标准蛋白;abcde 表示标准蛋白分子量:a 为兔磷酸化酶 B 97 400 u,b 为牛血清蛋白 66 200 u,c 为兔肌动蛋白 43 000 u,d 为牛碳酸酐酶 31 000 u,e 为胰蛋白酶抑制剂 20 100 u。  
Fig.4 Purity and molecular weight determination of protease from tilapia intestine by SDS-PAGE  
1,2,3 Sample,4 Marker; SDS-PAGE Molecular weight markers for proteins are expressed a,b,c,d,e.

2.6 罗非鱼肠蛋白酶的生化特性

罗非鱼肠蛋白酶最适 pH 值和最适温度

罗非鱼肠蛋白酶在 pH 8.0 ~ 8.5 时出现了活性的高峰(图 6),而在 pH < 8.0 和 pH > 8.5 时酶活性都有明显的下降,该蛋白酶的最适为 pH 8.0 ~ 8.5。

罗非鱼肠蛋白酶在 37 ~ 42 °C 时出现活性高峰(图 7),当温度小于 37 °C 或大于 42 °C 时酶活性都有明显的下降,该蛋白酶的最适温度为 37 ~ 42 °C。

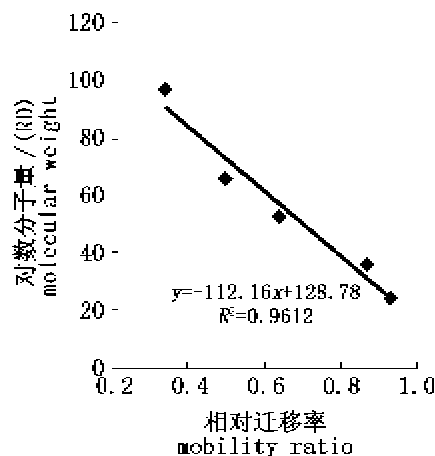


图 5 蛋白分子量 - 相对迁移率曲线  
Fig.5 Stand line of molecular weight-mobility

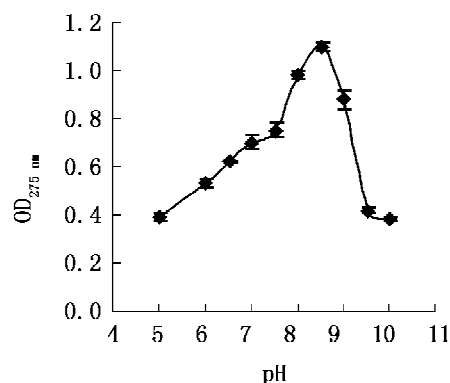


图 6 罗非鱼肠蛋白酶的最适 pH  
Fig.6 Optimum pH of protease from tilapia intestine

酶的热稳定性和 pH 值稳定性研究

由图 8 可见,罗非鱼肠蛋白酶在 4 °C 与 25 °C 中保存 60 min,其酶活的残留率均在 95% 以上;在 40 °C 或 50 °C 中 15 min,酶活残留率在 80% 以上,说明该酶热稳定性较好。通过该酶的酸碱稳定性实验(图 9),在

pH 7.0~9.0的缓冲液中处理 30 min 后,样品蛋白酶活性仍有 80% 以上,说明该酶在中性和弱碱性的条件中是稳定的。

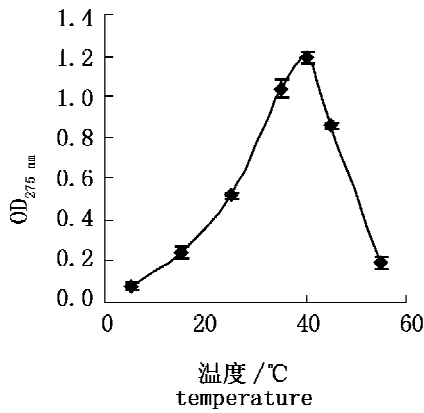


图7 罗非鱼肠蛋白酶的最适温度

Fig.7 Optimum temperature of protease from tilapia intestine

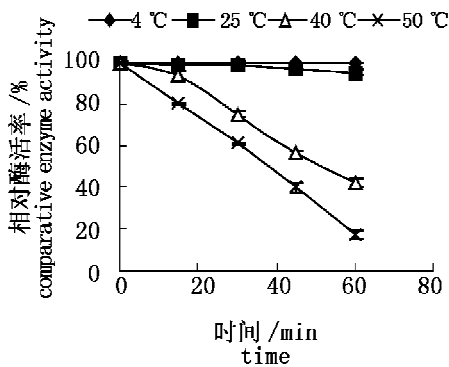


图8 罗非鱼肠蛋白酶的热稳定性

Fig.8 Temperature stability of protease from tilapia intestine

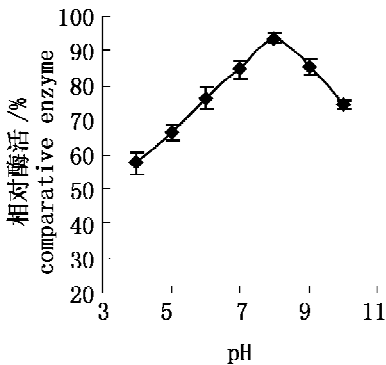


图9 罗非鱼肠蛋白酶 pH 值稳定性

Fig.9 pH stability of protease from tilapia intestine

罗非鱼肠蛋白酶的酶促反应动力学参数 以 Lineweaver-Burk 作图,经线性拟合得到方程  $y = 0.0643x + 0.1063$ ,计算可得罗非鱼肠蛋白酶的 动力学参数: $K_m = 0.605 \text{ g/L}$ , $V_{max} = 9.407 \text{ } \mu\text{g/min}$ (图 10)。

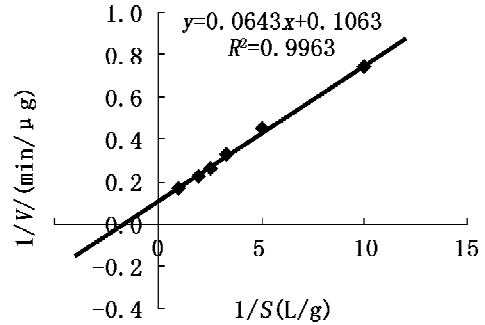


图10 罗非鱼肠蛋白酶的 Lineweaver-Burk 图  
Fig.10 Lineweaver-Burk plot of protease from tilapia intestine

金属离子对罗非鱼肠蛋白酶活性的影响

$\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 对罗非鱼肠蛋白酶没有抑制作用(表 5), $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 对罗非鱼肠蛋白酶的显著的抑制作用,而  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 等离子均对肠酶有一定的抑制作用。

表5 金属离子对蛋白酶活的影响

Tab.5 Effect of metal ion on protease activity

金属离子 ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ) metal ion	相对酶活 (%) relative enzyme activity
空白对照 control	100
$\text{Mn}^{2+}$	63.5
$\text{Ca}^{2+}$	50.6
$\text{Na}^+$	100
$\text{K}^+$	100
$\text{Mg}^{2+}$	72.2
$\text{Cu}^{2+}$	43.2
$\text{Ag}^+$	0.1
$\text{Pb}^{2+}$	3.1
$\text{Co}^{2+}$	81.8
$\text{Fe}^{3+}$	61.3

生化试剂对罗非鱼肠酶活力中心的化学修饰 PMSF 和 NBS 对该蛋白酶表现出的强烈抑制作用(表 5),TI 能够完全抑制该酶的活性,而 Pepestin A、PCMB 对酶活没有影响。胃蛋白酶抑制剂可以部分抑制酶活;脲素对蛋白酶表现出了少量的抑制作用,表明脲素可以对酶游离氨基酸与羧基形成的疏水键起破坏作用;DTT 对酶活有激活作用,其机理可能是还原分子中的二硫键;

EDTA 对蛋白酶活力没有影响说明该酶的活性中心不含有金属离子,该蛋白酶不是金属蛋白酶。

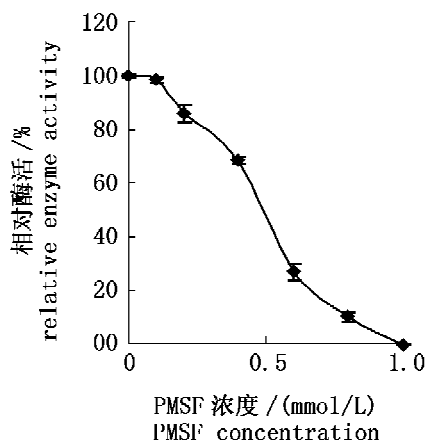


图 11 PMSF 对罗非鱼肠蛋白酶的影响

Fig. 11 Effect of PMSF on intestine protease

表 6 生化试剂对酶活力中心的化学修饰

Tab.6 Effect of biochemical agency on protease activity

生化试剂 ( $10 \times 10^{-3}$ mol/L) biochemical agency	相对酶活 (%) relative enzyme activity
空白对照 control	100
DTT	110.2
PMSF	6.5
Pepstatin A	98.4
PCMB	99.8
Trypsin inhibitor	0.0
EDTA	99.7
脲素 urea	89.5
BrAc	82.0
TNBS	94.6
NBS	13.0

(1) 丝氨酸残基的化学修饰:丝氨酸残基是蛋白酶活性中心出现频率较高的一种氨基酸残基,在酶的化学修饰当中,常常作为不可缺少的一个研究对象。苯甲酰磺酰氟(PMSF)是丝氨酸蛋白酶的专一性不可逆抑制剂。本实验用不同浓度的 PMSF 作用于酶液,然后检测酶的活性变化(图 11)。从图中可以看出,随着 PMSF 浓度的提高,蛋白酶活性被完全抑制,这说明丝氨酸残基是酶活性中心的必需基团,与酶的活性有重要关系,罗非鱼肠蛋白酶为丝氨酸蛋白酶。

(2) 半胱氨酸残基的化学修饰:对氯汞苯甲酸(PCMB)是一种特效的巯基修饰剂,能专一的与巯基起反应,是目前用于修饰蛋白质分子侧链巯基的常用试剂,常用于修饰半胱氨酸残基。本

实验用不同浓度的 PCMB 作用于酶液,然后检测酶的活性变化(图 12)。从图中可以看出,随着 PCMB 浓度的提高,蛋白酶活性没有什么变化,酶活残留率为 99.8%,说明巯基修饰对酶活力影响不大,巯基不是酶活性中心的必需基团。

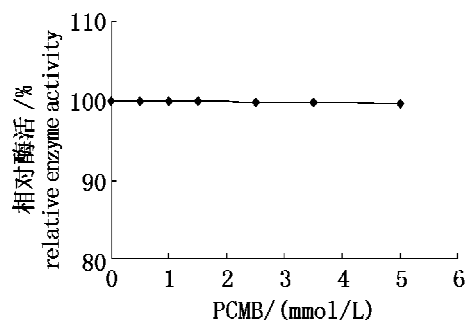


图 12 PCMB 对罗非鱼肠蛋白酶的影响

Fig. 12 Effect of PCMB on intestine protease

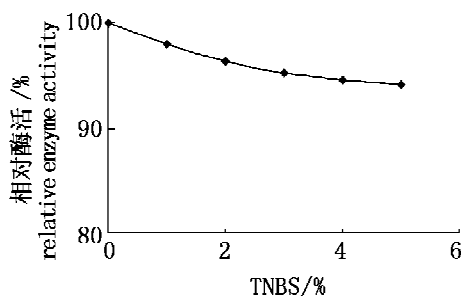


图 13 TNBS 对罗非鱼肠蛋白酶的影响

Fig. 13 Effect of TNBS on intestine protease

(3) 赖氨酸残基的化学修饰:三硝基苯磺酸(TNBS)是一种作用于酶分子氨基的有效抑制剂,它能够与赖氨酸残基的  $\epsilon$ -氨基发生反应,使酶分子被修饰,从而抑制酶的催化活性。从结果中可以看出(图 13),随着 TNBS 浓度的增加,酶活性没有任何变化,说明赖氨酸残基不是酶活性中心的必需基团。

### 3 讨论

鱼类消化蛋白酶中最重要的是胃酸性蛋白酶和肠碱性蛋白酶。肠碱性蛋白酶主要包括胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶,它们都属于丝氨酸蛋白酶家族(E. C. 3. 1. 21. x)。作为丝氨酸蛋白酶,它们能够被 PMSF 抑制,在碱性条件下有活性,在酸性条件下失活或不稳定<sup>[10]</sup>。罗非鱼为淡水养殖鱼类,杂食性,肠道细长,蛋白酶主要存在

于肠,且含量丰富,本文对罗非鱼肠蛋白酶进行分离纯化和生化特性研究,旨在为该酶的开发利用提供理论依据。

经三步纯化从罗非鱼消化道中分离到的蛋白酶在 SDS-PAGE 上显示为单一条带,经测定,其亚基分子量为 28 ku,这在鱼类胰蛋白酶分子量范围 18 ~ 28 ku 之内,如蒙特里沙丁鱼 (*Sardinops sagax caerulea*) 25.0 ku, 鲤 (*Cyprinus carpio*) 25.0 ku<sup>[14]</sup>。

国内关于胰蛋白酶最适 pH 的研究资料较少,根据国外学者所研究过的 14 种鱼类的结果显示,鱼类胰蛋白酶的适宜 pH 一般为 7.0 ~ 9.0,如蒙特里沙丁鱼<sup>[15]</sup>,黄鳍金枪鱼 (*Thunnus albacores*)<sup>[16]</sup> 胰蛋白酶的最适 pH 分别为 8.0, 8.5;黄峰等<sup>[17]</sup> 根据试验得出鲢、鳙胰蛋白酶适宜 pH 均为 8.3。但是鱼类胰蛋白酶的最适 pH 因鱼种的不同也存在一些差异,如从虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和鲑 (*Salmo salar*)<sup>[18]</sup> 分离得到的胰蛋白酶最适 pH 分别为 pH 9.5 和 pH 10.6;与此同时,同属不同种的鱼类胰蛋白酶的适宜 pH 有时也存在明显差异。本实验所纯化的罗非鱼肠蛋白酶最适 pH 值为 8.0 ~ 8.5。

胰蛋白酶的碱稳定性与其蛋白质分子在特定 pH 条件下的净电荷有关,根据研究,鱼类的胰蛋白酶在酸性和强碱性条件下不稳定。本实验所纯化蛋白酶在 pH 7.0 ~ 9.0 的条件下稳定,pH 低于 5.0 或高于 9.0 酶都不稳定,这一结果符合胰蛋白酶的一般规律。

鱼类胰蛋白酶的最适反应温度差异较大,一般在 30 ~ 60 °C 范围内,如非洲鲶 (*Clarias gariepinus*) 胰蛋白酶的最适温度为 35 °C,格林兰鳕 (*Gadus ogac*),凤尾鱼 (*Engraulis encrasicolus*) 等的最适温度通常 40 ~ 50 °C,沙丁鱼<sup>[19-20]</sup> 胰蛋白酶的最适温度可高达 60 °C。本实验所纯化罗非鱼肠蛋白酶最适温度为 37 ~ 42 °C,这与消化酶适宜的温度范围相一致。本实验所纯化罗非鱼肠蛋白酶具有非常好的热稳定性,说明该酶具有较高的应用价值。以酪蛋白为底物测得该酶的  $K_m$  值和  $V_{max}$  值分别为 0.605 g/L 和 9.407  $\mu\text{g}/\text{min}$ 。

鱼类消化酶活性与自身的一级结构和高级结构存在密切的关系,金属离子一方面可以通过影响消化酶的空间构象及活性,另一方面能够通过与蛋白酶的关键基团结合影响酶促反应速度,金

属离子还可能参与酶促过程中的电子转移即氧化还原反应。根据已有的报道,在体外条件下,对蛋白酶有激活作用的离子包括  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Li}^+$ , 有抑制作用的包括  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$ ,但金属离子对蛋白酶的激活或抑制的结果并不统一,说明金属离子对消化酶的效应多样复杂。陈清西等<sup>[21]</sup> 报道 10 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$  可使鳃肠道蛋白酶活性提高 50%,0.5 mmol/L 的  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  会使肠道蛋白酶活性分别降低 44% 和 86%。蛋白酶对重金属离子很敏感,推测其抑制作用可能是与活性中心组氨酸残基起络合作用。本实验研究表明,除  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  对该酶无明显作用外,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  离子对酶活均有不同程度的抑制,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  对蛋白酶有完全抑制作用。

PMSF, PCMB, BrAc, TNBS, NBS 和 BME 分别是丝氨酸残基、半胱氨酸残基、组氨酸残基、赖氨酸残基、色氨酸残基、二硫键和金属离子特异性修饰剂。TI, Pepstatin A 和 EDTA 分别是胰蛋白酶、胃蛋白酶和金属蛋白酶的特异性抑制剂。通过实验结果可以看出, PMSF 对该蛋白酶表现出强烈的抑制作用,表明酶的活性中心含有丝氨酸,该酶是一种丝氨酸蛋白酶; TI 能够完全抑制该酶的活性而 Pepstatin A 对酶活没有影响,说明该酶是胰蛋白酶而不是胃蛋白酶。NBS 除了能够修饰色氨酸残基外,也会对巯基产生抑制作用,但是由于 PCMB 对酶活没有影响,表明巯基不是酶活性中心的必需基团,因此可以不必考虑巯基的作用。NBS 也能抑制该酶的活性,说明色氨酸残基也是酶活性中心的必需基团。

#### 参考文献:

- [1] Gildberg A. Recovery of proteinase and protein hydrolysate from viscera [J]. Bioresour Technol 1992, 39: 271 - 236.
- [2] 吴克佐, 戚正武. 牛羊猪结晶胰蛋白酶的一些性质的比较研究 [J]. 生物化学与生物物理学报, 1966, 6: 32 - 410.
- [3] 郭善军, 陈章宝. 团头鲂、淡水白鲢、黄颡鱼的淀粉和蛋白酶活性研究 [J]. 重庆工学院学报, 2004, 18(5): 34 - 37.
- [4] 吴婷婷. 鳊鱼、青鱼、草鱼、鲤、鲫、鲢消化酶活性的研究 [J]. 中国水产科学, 1994, 1(2): 10 - 17.



- [5] Agrawal V P, Sastery K V, Kaushab S K. Digestive enzymes of three teleost fishes [J]. *Acta Physiol Hung*, 1975, 46(2): 93-98.
- [6] 吴燕燕,李来好,岑剑伟,等.酶法由罗非鱼加工废弃物制取调味料的研究[J].*南方水产*,2006,2(1): 49-53.
- [7] Cancre I, Ravallec R, van Wormhoudt A, *et al.* Secretagogues and growth factors in fish and crustacean protein hydrolysates [J]. *Mar Biotechnol*, 1999, 1(5): 489-499.
- [8] 吴燕燕,王剑河,李来好,等.罗非鱼内脏蛋白酶超声波提取工艺的研究[J],*食品科学*,2007,28(7): 245-248.
- [9] 郝志明,吴燕燕,李来好.罗非鱼内脏中酶的筛选[J].*南方水产*,2006,2(2): 38-42.
- [10] 罗九甫.酶与酶工程[M].上海:上海交通大学出版社,1996:262-280.
- [11] 赵亚华,高向阳,罗素萍,等.生物化学与分子生物学实验技术教程[M].北京:高等教育出版社,2005:95-96.
- [12] 余冰宾.生物化学实验指导[M].北京:清华大学出版社,2004:32-34.
- [13] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].2版.北京:科学出版社,2005:100-106.
- [14] Castillo-Yanez F J, Pacheco-Aguilar R, Garcia-Carreno F L, *et al.* Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2005, 140(1): 91-98.
- [15] Hordur G K, Barbara A R. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture [J]. *Process Biochem*, 2000, 36(1-2): 131-139.
- [16] Souza A A G, Amaral I P G, Santo A R E, *et al.* Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*) [J]. *Food Chem*, 2007, 100(4): 1429-1434.
- [17] 黄峰,严安生.鲢、鳙胰蛋白酶的研究[J].*水产学报*,1996,20(1): 68-71.
- [18] Kristjansson M M. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *J Agric Food Chem*, 1991, (39): 1738-1742.
- [19] Bouggataf A, Souissi N, Fakhfakh N, *et al.* Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*) [J]. *Food Chem*, 2007, 102(1): 343-350.
- [20] Uys W, Hecht T. Changes in digestive enzyme activities of catfish, *Clarias gariepinus* [J]. *Aquaculture*, 1987, 63: 243-250.
- [21] 陈清西,陈祥仁.鳖鱼肠道蛋白酶的分离纯化及性质的初步研究[J].*厦门大学学报(自然科学版)*, 1994, 33(6):843-847.

## Purification and characterization of protease from intestine of tilapia

WU Yan-yan<sup>1\*</sup>, LI Lai-hao<sup>1</sup>, HAO Zhi-ming<sup>2</sup>, YANG Xian-qing<sup>1</sup>

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. National Centre for Quality Supervision and Test of Processed Food, Guangzhou 510330, China)

**Abstract;** Tilapia intestines as enzyme raw materials are studied systematically by ultrasonic extraction technology of auxiliary, electrophoresis, chromatography techniques and so on for the first time. The results showed that; after organic mashing and ultrasound-assisted extracting, 30% – 70% of ammonium sulfate fractions, QFF anion chromatography and Sephadex G-100 gel chromatography, the purified protease from tilapia intestines was obtained. The purified protease specific activity is 335 U/mg and yield is 32.8%. The result of SDS-PAGE showed a single band and the subunit molecular weight of tilapia intestines protease was 28 ku. The protease optimum pH value and temperature are 8.0 – 8.5 and 37 – 42 °C respectively. It is stable at pH range from 7.0 to 9.0 and has good thermal stability. Enzyme  $K_m$  value and  $V_{max}$  value are 0.605 g/L and 9.407  $\mu\text{g}/\text{min}$ .  $\text{Ag}^+$  and  $\text{Pb}^{2+}$  can inhibit the enzymatic activity completely while  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  without inhibition. PMSF can strongly inhibit the activity of the enzyme. Pepstatin A and urea partly inhibit the activity of the enzyme. EDTA has no effect on the enzyme while DTT can activate the enzyme activity. The protease from tilapia intestines is a kind of serine protease. Further work should be carried out on the sequences of the enzyme and its applications.

**Key words;** tilapia intestine; protease; purification; characterization

**Corresponding author;** WU Yan-yan. E-mail: wuyy1028@yahoo.com.cn