

海参内脏胶原降解酶的纯化及性质研究

麻金花, 翁 凌, 颜龙杰, 张凌晶, 刘光明, 曹敏杰*

(集美大学食品与生物工程学院,福建省水产品深加工工程研究中心,福建 厦门 361021)

摘要: 针对海参自溶现象,研究海参内脏中与胶原降解相关蛋白酶的存在情况,以期了解内源性蛋白酶在海参自溶过程中发挥的作用,为阐明自溶的内在机理提供理论依据。通过硫酸铵盐析、DEAE-Sephacryl 阴离子交换柱层析、Sephacryl S-200 凝胶过滤柱层析、Phenyl Sepharose FF 疏水柱层析及 Mini Q 离子交换柱层析等方法,从海参内脏中分离纯化出降解明胶的蛋白酶。利用荧光底物研究其酶学性质及其对海参体壁胶原蛋白的降解情况。结果表明,该酶最适温度为 30 ℃,最适 pH 为 7.5,可被金属蛋白酶抑制剂 EDTA、EGTA 完全抑制,亦可被 PMSF、Pefabloc SC 等丝氨酸蛋白酶抑制剂完全抑制。底物特异性表明,该酶只对金属蛋白酶荧光底物有分解作用,推测其为金属蛋白酶。该酶在 4 和 37 ℃ 下均能有效地分解海参体壁胶原蛋白,表明其在海参自溶过程中起重要作用。

关键词: 海参; 内脏; 明胶酶谱; 金属蛋白酶; 分离纯化

中图分类号: TS 254

文献标志码: A

海参 (*Stichopus japonicus*) 是一种极易发生自溶现象的海洋生物,自溶导致其在贮藏和加工过程中可食部体壁的组织结构破坏及品质下降,从而造成经济损失。海参自溶主要发生在海水污染、水温升高或受到机械性刺激时,首先表现为排脏,然后有表皮软化、溶解等现象的产生。海参排脏时,内脏中的蛋白酶被释放迁移,蛋白酶参与体壁胶原蛋白的降解,从而破坏体壁结构,促进自溶。Zhu 等^[1]通过电镜观察到海参自溶过程中完整的胶原纤维断裂成不规则片段,推测是由海参内源性蛋白酶降解胶原蛋白所引起。

已有研究表明,海参体壁和肠道都有丰富的酶系。Wu 等^[2]从海参体壁中纯化得到金属蛋白酶(metalloproteinase, MP),并发现 MP 能降解海参胶原蛋白,因此推测其可能参与海参自溶过程。付雪艳^[3]指出,海参消化道中有酸性蛋白酶和碱性蛋白酶,并采用柱层析方法纯化得到一种在碱性条件下具有高活力的蛋白酶。Zhou 等^[4]从海

参内脏中分离纯化得到类组织蛋白酶 L,并采用免疫组织化学技术研究该酶在海参体壁的分布。Yan 等^[5]从海参内脏中纯化得到一种丝氨酸蛋白酶(SP),并应用 Western blot 检测其在海参中的分布情况。以上研究对于了解海参内源性蛋白酶的性质,揭示海参自溶的本质具有重要参考价值。但是,由于海参体内酶的种类丰富,尤其是与胶原降解相关的酶的研究报道仍然很少。

近年来,随着北参南养技术的不断进步,我国南方(如福建)的海参产量逐年增加。由于南方气温高,海参加工过程中遇到的自溶问题更为突出,因此,研究海参体内的蛋白酶及其性质尤为重要。

本研究以海参为原料,探究其内脏中能分解明胶的蛋白酶类的相关性质,以期了解内脏蛋白酶在海参自溶过程中发挥的作用。进一步分离纯化得到一种金属蛋白酶,并对其酶学性质进行分析,为研究金属蛋白酶在海参自溶过程中的作用机理提供理论参考。

收稿日期:2015-02-24 修回日期:2015-04-17

资助项目:国家自然科学基金(31271838);十二五国家科技支撑计划(2012BAD38B09);福建省教育厅产学研专项(JA13173)

通信作者:曹敏杰,E-mail:mjcao@jmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

海参购于福建省泉州市泉港区某海参养殖基地,平均体质量 100 g。

DEAE-Sepharose, Sephacryl S-200, Phenyl Sepharose Fast Flow, Mini Q Sepharose, 美国 GE Healthcare 公司; Benzamidine, PMSF, 1, 10-phenanthroline monohydrate, EDTA, EGTA, 美国 Sigma 公司; 猪明胶, E-64, 乳化剂 Triton X-100, 美国 Amresco 公司; Pefabloc SC, 德国 Merck 公司; Pepstatin A, Tris Base, 德国 Roche 公司; MOCac-Pro-Leu-Dnp-Ala-Arg-NH₂ 等荧光底物, 日本 Peptide Institute 公司; 标准蛋白, 立陶宛 Fermentas 公司; 海参胶原蛋白由本研究室制备^[5]。

1.2 仪器与设备

PT-2100 组织捣碎机, 瑞士 Kinematica 公司; Avanti JA-25 高速冷冻离心机, 美国 Beckman 公司; Centrifuge 541 小型冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; Lambda 35 紫外分光光度计, 美国 Perkin Elmer 公司; FP-6200 荧光分光光度计, 日本 Jasco 公司; UPC-900 AKTA 蛋白纯化系统, 美国 GE Healthcare 公司; Amicon 超滤浓缩装置, 美国 Millipore 公司; G-BOX 凝胶成像分析系统, 英国 Syngene 公司。

1.3 海参内脏粗酶制备

鲜活海参运到实验室后立即取出内脏, 预冷蒸馏水冲洗, 存储于 -80 °C 超低温冰箱备用。解冻后称取内脏, 切碎, 加入 4 倍体积的预冷缓冲液 A (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 含 0.02% NaN₃), 组织捣碎, 4 °C 下 12 000 × g, 离心 10 min, 取上清液, 即为粗酶液。

1.4 粗酶相关性质的分析

蛋白酶活力的测定 参照 Kleiner 等^[6]的方法采用明胶酶谱检测酶的活性。制备凝胶时, 分离胶中用 0.5 mL 8 mg/mL 明胶溶液替换 0.5 mL 去离子水, 其余与 SDS-PAGE 胶的制备相同。电泳结束后, 用 2.5% Triton X-100 充分洗去 SDS。然后将凝胶置于缓冲液 A 中, 于 37 °C 下孵育 14 h。孵育后将凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色。最终凝胶未着色的亮带表示明胶已被蛋白酶降解, 而着色区域则表示明胶未被降解, 并根据亮

带的强弱判断蛋白酶的活性。

抑制剂对粗酶活性的影响 将洗去 SDS 的凝胶分别放入含有不同抑制剂的孵育液中, 于 37 °C 孵育 14 h, 考马斯亮蓝染色后观察酶的活性变化, 以不加抑制剂的孵育液为对照。所用抑制剂: Pefabloc SC, 1 mmol/L; Benzamidine, 5 mmol/L; PMSF, 10 mmol/L; E-64, 20 μmol/L; Pepstatin A, 20 μmol/L; EDTA, 10 mmol/L; EGTA, 10 mmol/L; 1,10-phenanthroline, 10 mmol/L。

金属离子对粗酶活性的影响 将洗去 SDS 的凝胶分别放入含有不同金属离子的孵育液中, 37 °C 孵育 14 h 后, 考马斯亮蓝染色并观察酶活性变化, 以不加金属离子的孵育液为对照, 测定金属离子对粗酶活性的影响。所用金属离子浓度均为 10 mmol/L。

1.5 金属蛋白酶的分离纯化

取海参内脏 100 g, 于 4 倍体积缓冲液 B (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 含 0.02% NaN₃, 5 mmol/L CaCl₂) 中组织捣碎, 4 °C 下 12 000 × g, 离心 20 min, 取上清液, 加固体硫酸铵至饱和度为 80%, 4 °C 下 12 000 × g, 离心 20 min, 取沉淀, 溶于缓冲液 B 中。透析后样品上样于 DEAE-Sepharose 阴离子交换柱 (2.5 cm × 11.5 cm), 采用线性结合阶段洗脱的方式进行分离。收集酶活峰, 超滤浓缩后上样于 Sephacryl S-200 (2.5 cm × 95 cm) 凝胶柱, 用缓冲液 C (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 含 0.02% NaN₃, 5 mmol/L CaCl₂, 0.15 mol/L NaCl) 洗脱, 收集酶活峰, 加入固体硫酸铵至终浓度为 1.5 mol/L。上样于 Phenyl Sepharose 疏水层析柱 (1 mL), 采用降低 (NH₄)₂SO₄ 浓度从 1.5 到 0 mol/L 的缓冲液进行线性梯度洗脱, 收集活性部分用缓冲液 B 充分透析, 上样于 Mini Q Sepharose (0.8 mL), 采用 0~0.5 mol/L NaCl 线性洗脱。最终获得的活性部分进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.6 金属蛋白酶活力检测方法

参照 Knight 等^[7]的方法, 采用金属蛋白酶底物 MOCac-Pro-Leu-Gly-Leu-Dnp-Ala-Arg-NH₂ 进行酶活力检测, 并作适当修改: 37 °C 下, 在 900 μL 缓冲液 B 中依次加入 50 μL 酶液和 50 μL 的 10 μmol/L 荧光底物, 反应 10 min 后迅速加入 1.5 mL 终止液 (甲醇: 异丙醇: 水 = 35: 30: 35, V/V/V)。使用荧光分光光度计在激发波长 328 nm、发

射波长 393 nm 条件下进行酶活力检测。

1.7 金属蛋白酶的酶学性质研究

最适 pH 及其稳定性 在 37 °C, 以 MOCac-Pro-Leu-Gly-Leu-Dnp-Ala-Arg-NH₂ 为底物, 在浓度为 50 mmol/L 的不同 pH(4.0 ~ 11.0) 缓冲液中测定酶的活性, 确定其最适 pH。pH 稳定性的测定则是将酶置于上述缓冲液中, 于室温下放置 30 min 后, 按照酶活性的测定方法在 37 °C, pH 8.0 下测定酶的剩余活力。

最适温度及热稳定性 按照酶活力的测定方法, 不改变其他条件, 于不同温度(4 ~ 60 °C) 下测定酶的活性, 确定其最适温度。将酶置于 50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0) 缓冲液中, 分别在不同温度(10 ~ 60 °C) 下孵育 30 min 后, 加入荧光底物, 于 37 °C 下测定酶的剩余活性, 以研究酶的热稳定性。

蛋白酶抑制剂对酶活性的影响 将不同类型的蛋白酶抑制剂加入到缓冲液 A 中, 至相应的终浓度, 同时加入 50 μL 适当稀释的酶液, 在室温下放置 30 min, 按照酶活力测定方法, 测定酶的剩余活性。对照组为不加蛋白酶抑制剂的样品。

酶对海参体壁胶原蛋白的降解 将 50 μL 酶液与 50 μL 海参胶原蛋白混合于 100 μL 缓冲液 A 中, 对照组用等量的缓冲液代替酶液, 于 4 和 37 °C 下分别反应不同时间后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 然后用考马斯亮蓝染色观察胶原蛋白的降解情况。

2 结果与分析

2.1 海参内脏粗酶的鉴定

海参内脏肌浆中能分解明胶的蛋白酶类分子量主要集中于 20 ~ 35 ku, 此外还存在分子量为 85 ku 左右的蛋白酶, 表明海参内脏中含有多种能分解明胶的蛋白酶(图 1)。水产动物内脏中含有丰富的蛋白酶。Cohen 等^[8] 从鲤 (*Cyprinus carpio*) 胰脏中鉴定出 4 种分子量在 25 ~ 34 ku 的蛋白酶, Aoki 等^[9] 从北方长额虾 (*Pandalus eous*) 的肝胰腺中分离纯化了 3 种可降解胶原的丝氨酸蛋白酶。海参内脏组织较鱼类等水产动物复杂, 受刺激后的排脏作用又易导致内脏的破裂, 增加了研究的难度。本研究利用明胶酶谱的方法检测海参内脏粗酶, 所得蛋白酶多样性存在的结果与其他水产动物相似。

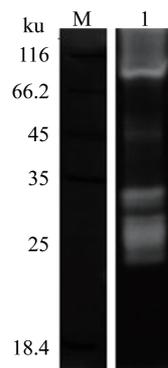


图 1 海参内脏蛋白酶的明胶酶谱

M. 标准蛋白; 1. 海参内脏粗酶

Fig. 1 Gelatin zymography of crude proteinases in sea cucumber viscera

M. protein marker; 1. crude sample

2.2 海参内脏中粗酶的性质研究

海参内脏粗酶的最适 pH 为 8.0 ~ 9.0, 最适温度为 30 ~ 40 °C, 丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 和金属蛋白酶抑制剂 EDTA、EGTA 对酶活力均具有强烈抑制作用(图 2)。丝氨酸蛋白酶抑制剂 Pefabloc SC 对酶活力有部分抑制效果, 而凝血酶和胰蛋白酶抑制剂 Benzamidine、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 E-64 和天冬氨酸蛋白酶抑制剂 Pepstatin A 对酶活力几乎没有抑制作用。因此, 可判断海参内脏中分解明胶的蛋白酶主要为丝氨酸蛋白酶和金属蛋白酶。王诚等^[10] 在鲤肌肉中发现了具有分解明胶活性的丝氨酸蛋白酶和金属蛋白酶; 颜龙杰^[11] 利用海参胶原蛋白作为底物, 在海参内脏粗酶液中添加不同类型的蛋白酶抑制剂, 研究降解海参胶原的蛋白酶类型, 发现 PMSF、Pefabloc SC 和 EDTA、EGTA 均可抑制粗酶对胶原蛋白的降解, 而 E-64 不能抑制粗酶活性, 结论与本研究相似。值得注意的是, Ca²⁺ 对分子量为 33.2 ku 的蛋白酶有激活作用, 且该酶的活性又可被 EDTA 所抑制, 表明其为金属蛋白酶。其他金属离子, 如 Mn²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺ 则可强烈抑制粗酶活性, Ba²⁺、Mg²⁺ 也可部分抑制酶的活性。

2.3 金属蛋白酶的分离纯化

为进一步研究分子量为 33.2 ku 的金属蛋白酶(MP), 利用柱层析方法对其进行分离纯化。采用 80% 硫酸铵进行分级沉淀。所得沉淀经透析后上样于 DEAE-Sepharose 阴离子交换柱, 酶活峰主要出现在 115 ~ 133 管之间, 经过凝胶过滤层析后, 酶活峰与大分子量杂蛋白得到有效分离

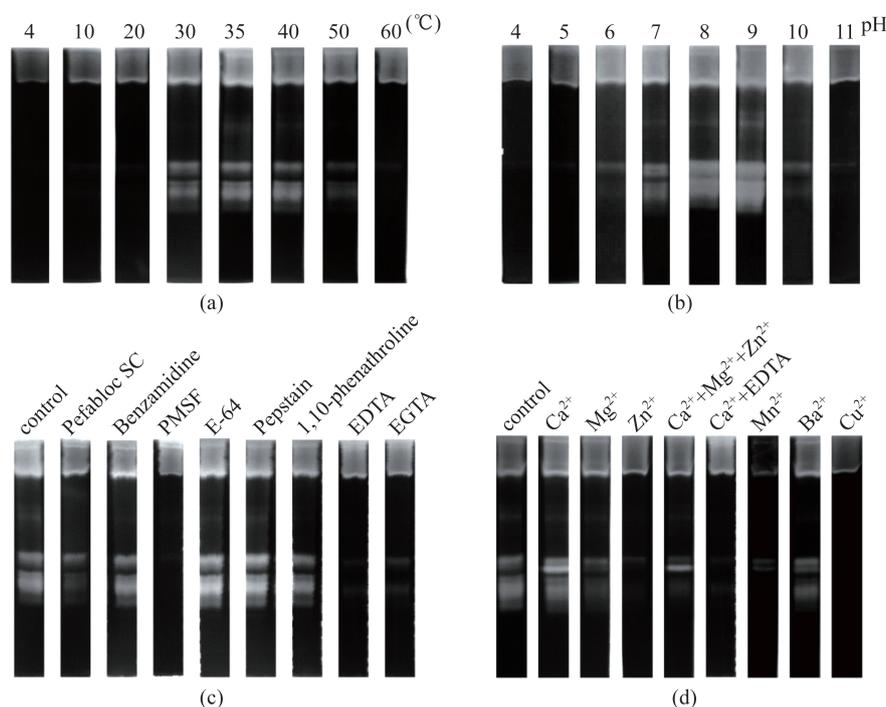


图 2 各种因素对海参内脏粗酶活力的影响

(a) 温度的影响; (b) pH 的影响; (c) 各种蛋白酶抑制剂的影响; (d) 金属离子的影响

Fig. 2 The effect of different factors on the crude enzyme activity as detected by gelatin zymography

(a) the effect of temperature; (b) the effect of pH; (c) the effect of different proteinase inhibitors; (d) the effect of metal ions

(图 3)。利用疏水层析作进一步纯化,在吸附部分出现一个蛋白峰,同时也只有一个酶活峰,但其主要在蛋白峰的右肩部分(图 3-c)。收集活性部分,透析后上样于 Mini Q 阴离子交换柱,酶活峰与蛋白峰重叠,目的蛋白酶得到纯化。SDS-PAGE 结果显示,目的蛋白酶分子量约为 33.2 ku,与明胶酶谱结果相对应。该酶的纯化倍数和回收率分别为 190.0% 和 0.9% (表 1)。

前期研究报道的水产动物金属蛋白酶的分子量较高,如从鲤肌肉中纯化得到分子量为 75、67 和 64 ku 的金属蛋白酶^[12],在真鲷 (*Pagrus major*) 肌肉中发现的金属蛋白酶分子量为 52 ku^[13],Wu 等^[2]从海参体壁中纯化出一种分子量为 45 ku 的金属蛋白酶。而付雪艳^[3]在研究海参肠道蛋白酶时,发现了分子量为 20.6 ku 的金属蛋白酶,与本研究得到的 33.2 ku 较为接近。在不同水产动物中存在不同分子量的金属蛋白酶,推测原因是由于物种以及生理功能差异导致的结果。迄今为止,已报道的金属蛋白酶有近 40 种,因此,在今后的研究工作中,应对

来源于海参的金属蛋白酶的具体种类作详细分析。

2.4 MP 的最适温度和热稳定性

对纯化的 MP 进行性质分析,其最适温度为 30 °C,当温度高于 40 °C 时,酶活力快速下降(图 4)。在低温时,MP 具有较强的活性,即便在 4 °C 时,仍表现出 70% 的活性。该酶在 10 ~ 40 °C 范围内的热稳定性较好,孵育 30 min 后,相对酶活力均保持在 90% 以上,高于 40 °C 时,其活性急剧下降,60 °C 下孵育 30 min 后,相对活力仅为 10%。与本研究相比,从草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 肌肉中纯化所得具有明胶水解活性的基质金属蛋白酶的最适温度为 40 °C^[14]。Wu 等^[2]从海参体壁中纯化所得 MP 的最适温度则为 40 ~ 45 °C,推测这种差异可能与酶存在的部位或酶所作用的底物不同有关。此外,海参是生活在低温环境中的生物,本研究纯化的 MP 在较宽的低温范围内具有较高的活性,使得 MP 在海参正常的生长条件下有较强的活性以维持其生理功能。

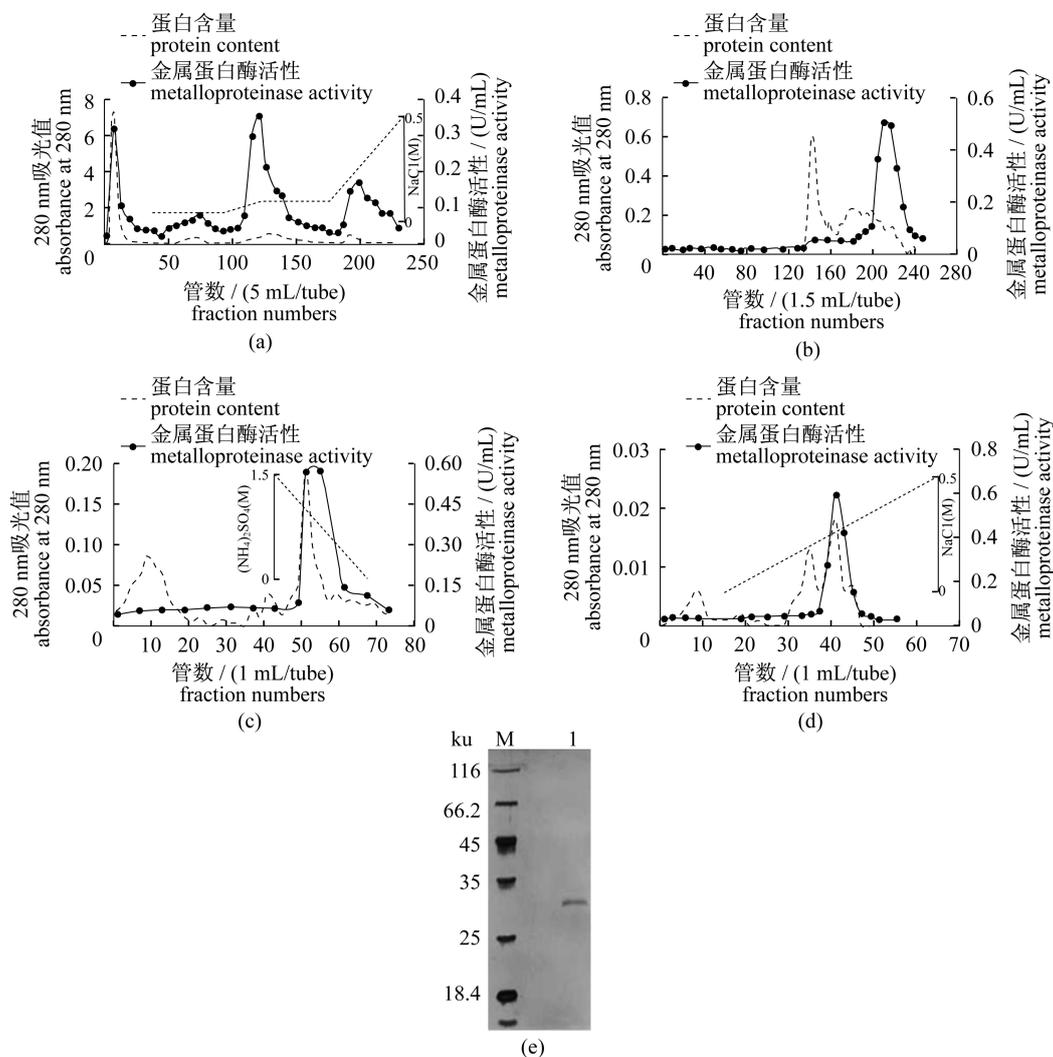


图3 金属蛋白酶纯化图

(a)金属蛋白酶的DEAE-Sepharose离子交换层析；(b)Sephacryl S-200凝胶过滤层析；(c)Phenyl-Sepharose FF疏水层析；(d)Mini Q强阴离子交换层析；(e)金属蛋白酶的SDS-PAGE电泳；M.标准蛋白；1.海参内脏粗酶

Fig. 3 Column chromatography purification of metalloproteinase

(a) DEAE-Sepharose chromatographic purification of MP; (b) Sephacryl S-200 chromatographic purification of MP; (c) Phenyl-Sepharose FF chromatographic purification of MP; (d) Mini Q chromatographic purification of MP; (e) SDS-PAGE of MP; M. protein marker; 1. crude sample

表1 海参内脏MP的分离纯化

Tab. 1 Summary of purification of MP from the viscera of sea cucumber

纯化步骤 purification step	总蛋白/mg total protein	总酶活力/U total activity	酶比活/(U/mg) specific activity	酶活回收率/% yield	纯化倍数 purification fold
粗酶液 crude sample	2 750.0	210.2	0.1	100.0	1.0
硫酸铵分级沉淀 ammonium sulfate	405.6	40.1	0.1	19.1	1.0
DEAE-Sepharose	38.3	11.6	0.3	5.5	3.0
Sephacryl S-200	1.7	7.7	4.5	3.7	45.0
Phenyl - Sepharose FF	0.7	6.2	8.9	2.9	89.0
Mini Q	0.1	1.9	19	0.9	190.0

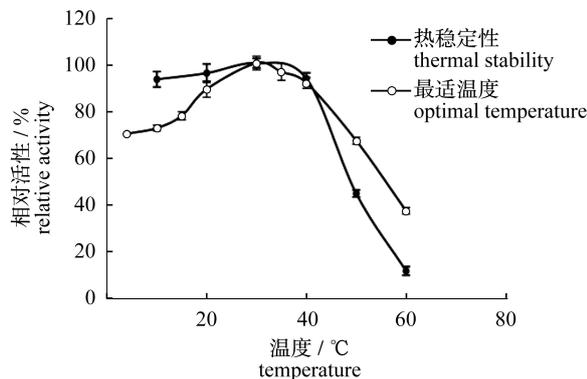


图4 MP 的最适温度及热稳定性

Fig. 4 The optimum temperature and thermal stability of MP

2.5 最适 pH 及其稳定性

海参内脏 MP 的最适 pH 值为 7.5, 在 pH 7.0~10.0 范围内该酶的相对酶活均保持在 70% 以上(图 5)。MP 在 pH 6.0~9.0 范围内较为稳定, 当 pH 值低于 6.0 时, 酶活快速下降, 而该酶对碱性条件的耐受性较好, 在 pH 11.0 时仍剩余 55% 的活性。大多数金属蛋白酶发挥降解细胞外基质作用时的 pH 接近中性。而本研究所纯化的 MP 最适 pH 偏碱性, 这与已报道的大多数关于金属蛋白酶的研究结果相似, 如鲤红色肉中的金属蛋白酶 GP-1 和 GP-2 降解明胶的最适 pH 为 8.0^[12], Sivakumar 等^[15]报道的锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 肝胰腺明胶酶的最适 pH 为 8.0, 并且在碱性条件下酶活力较强; Bracho 等^[16]报道太平洋岩鱼 (*Sebastes* sp.) 中的 MP 最适 pH 为 8.5 左右。由此可见, 不同水产动物中的 MP 具有较为相似的最适 pH。

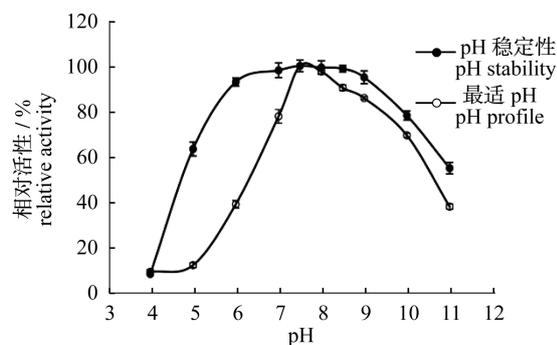


图5 MP 的最适 pH 及其稳定性

Fig. 5 The optimum pH and pH stability of MP

2.6 蛋白酶抑制剂对 MP 活性的影响

金属蛋白酶抑制剂 EDTA、EGTA 能够强烈

抑制 MP 的活性, 1,10-phenanthroline 能够部分抑制其活性, 而半胱氨酸蛋白酶抑制剂 E-64 和天冬氨酸蛋白酶抑制剂 pepstatin A 对酶活性几乎无影响。值得注意的是, 该蛋白酶活性也可以被丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF、Pefabloc SC 强烈抑制(表 2)。Wu 等^[2]从海参体壁中纯化所得 MP 只能被金属蛋白酶抑制剂所抑制, 其他蛋白酶抑制剂对其无作用; 王诚^[10]在鲤肌肉中发现的金属蛋白酶也被金属蛋白酶抑制剂特异性抑制。而本研究所得 MP 也可以被丝氨酸蛋白酶抑制剂抑制, 推测在其活性中心附近含有丝氨酸残基, 与丝氨酸蛋白酶抑制剂作用后影响 MP 与底物的结合, 从而抑制其活性。Fu 等^[17]利用底物-SDS-PAGE 方法在 pH = 8.0 条件下研究蛋白酶抑制剂对海参消化酶的影响, 发现 EDTA 和 PMSF 均可抑制分子量为 39.1 ku 的胶原蛋白酶的活性, 这与本研究所得 MP 性质相似。

表 2 蛋白酶抑制剂对 MP 活性的影响

Tab. 2 Inhibitory effect of different proteinase inhibitors on the activity of MP

抑制剂 inhibitor	浓度 / (mmol/L) concentration	残余相对活性 / % residual activity
对照 control	0	100
EDTA	10	9
EGTA	10	9
1,10-phenanthroline	10	78
Benzamidine	5	93
PMSF	5	12
Pefabloc SC	1	10
E-64	0.02	91
Pepstatin A	0.02	94

2.7 MP 对海参胶原蛋白的降解效果

为探究纯化的 MP 是否参与海参的自溶过程, 以海参体壁胶原蛋白为底物, 观察 MP 对其降解情况。在 37 °C 下反应 30 min, MP 对胶原蛋白即有较明显的分解(图 6)。随着时间的延长, 胶原蛋白继续被分解, 反应 3 h 后, 胶原蛋白几乎被完全分解。在 4 °C 下, 可观察到相似的分解作用, 只是作用时间较长, 可见 MP 对胶原蛋白的降解效率与反应温度关系密切。这可能与胶原蛋白的热变性温度有关, 胶原蛋白发生热变性后使得胶原的三股螺旋结构解旋^[18], 更有利于蛋白酶对其降解。

海参体壁中胶原蛋白含量达总蛋白的

70%^[19],因此,胶原蛋白的降解直接导致海参自溶的发生。尽管前期实验从海参体壁中分离了可降解胶原的金属蛋白酶,但该酶的含量较低^[2]。最近,Yan等^[5]在海参中分离纯化了具有降解胶原蛋白作用的丝氨酸蛋白酶 SP,而 SP 在海参肠道中的含量也极低。鉴于海参自溶过程的快速

性、与温度的相关性以及中性偏碱性的 pH 条件,多种含量较低的蛋白酶共同参与胶原蛋白降解的可能性极大,尤其是排肠作用导致的内脏中蛋白酶释放,使生理条件下完全隔离的内脏蛋白酶与体壁直接接触,加快了体壁胶原蛋白的降解和自溶的发生。

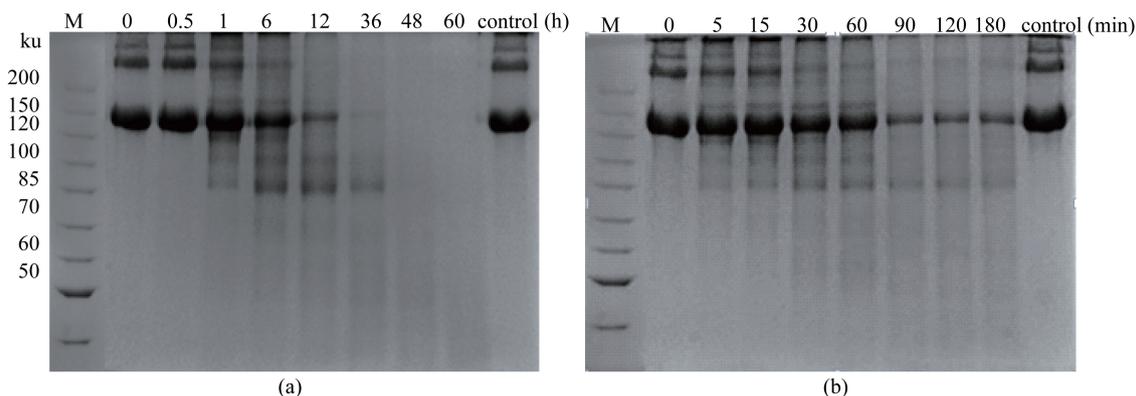


图 6 两种温度下 MP 对海参胶原蛋白的降解效果

(a) MP 与胶原蛋白在 4 °C 下反应不同时间; (b) MP 与胶原蛋白在 37 °C 下反应不同时间

Fig. 6 Degradation of sea cucumber collagen by MP at two different temperatures

(a) MP and sea cucumber collagen were incubated at 4 °C for different intervals; (b) MP and sea cucumber collagen were incubated at 37 °C

3 结论

利用明胶酶谱法分析发现海参内脏中存在多种分解明胶的蛋白酶,这些蛋白酶主要为丝氨酸蛋白酶和金属蛋白酶。其中分子量为 33.2 ku 的蛋白酶可被 Ca^{2+} 所激活,而被 EDTA 所抑制。通过硫酸铵盐析以及系列柱层析,分离纯化得到该蛋白酶。性质研究结果表明,该酶的最适温度为 30 °C,最适 pH 为 7.5,对金属蛋白酶的荧光底物有特异性的分解,推测其为金属蛋白酶。此外,该蛋白酶在 4 和 37 °C 下均能有效地分解海参体壁胶原蛋白,推测其参与海参自溶过程。本研究初步探讨了海参内脏中降解胶原的金属蛋白酶,今后有必要在蛋白质水平上深入研究海参内脏中参与胶原降解的蛋白酶,并结合分子生物学和免疫学手段分析它们在海参中更精确的存在部位以及它们的生理功能,为解明海参自溶的内在机制提供可靠的依据。

参考文献:

[1] Zhu B W, Zheng J, Zhang Z S, *et al.* Autophagy plays a potential role in the process of sea cucumber body wall “melting” induced by UV irradiation[J].

Wuhan University Journal of Natural Sciences, 2008, 13(2):232-238.

[2] Wu H L, Hu Y Q, Shen J D, *et al.* Identification of a novel gelatinolytic metalloproteinase (GMP) in the body wall of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) and its involvement in collagen degradation [J]. Process Biochemistry, 2013, 48(5-6):871-877.

[3] Fu X Y. Study of Proteases from Digestive Tract of Sea Cucumber (*Stichopus Japonicus*) [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004. [付雪艳. 海参 (*Stichopus japonicus*) 消化蛋白酶初步研究. 青岛: 中国海洋大学, 2004.]

[4] Zhou D Y, Chang X N, Bao S S, *et al.* Purification and partial characterisation of a cathepsin L-like proteinase from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) and its tissue distribution in body wall [J]. Food Chemistry, 2014, 158(3):192-199.

[5] Yan L J, Zhan C L, Cao M J, *et al.* Purification, characterization, cDNA cloning and *in vitro* expression of a serine proteinase from the intestinal tract of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) with collagen degradation activity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(20):4769-4777.

[6] Kleiner D E, Stetler W G. Quantitative zymography:

- Detection of picogram quantities of gelatinases [J]. Analytical Biochemistry, 1994, 218 (2) : 325 - 329.
- [7] Knight C G, Willenbrock F, Murphy G. Assay method using MCA/Dnp type Fluorescence-Quenching substrates [J]. FEBS lett, 1992, 296 : 263.
- [8] Cohen T, Gertler A, Birk Y. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*) - I purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase B [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B; Comparative Biochemistry, 1981, 69 (3) : 639 - 646.
- [9] Aoki H, Ahsan M N, Matsuo K, *et al.* Purification and characterization of collagenolytic proteases from the hepatopancreas of northern shrimp (*Pandalus eous*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51 (3) : 777 - 783.
- [10] Wang C. Study on collagenolytic proteinases in the softening of common carp (*Cyprinus carpio*) muscle [D]. Xiamen: Jimei University, 2013. [王诚. 胶原蛋白酶在鲤鱼肌肉软化过程中的作用及机理研究. 厦门:集美大学, 2013.]
- [11] Yan L J. Study on a serine proteinase from the viscera of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [D]. Xiamen: Jimei University, 2014. [颜龙杰. 海参内脏丝氨酸蛋白酶的研究. 厦门:集美大学, 2014.]
- [12] Wu J L, Lu B J, Cao M J, *et al.* Purification and characterization of gelatinase-like proteinases from the dark muscle of common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56 (6) : 2216 - 2222.
- [13] Wu G P, Cao M J, Chen S H, *et al.* Purification and characterization of a gelatinolytic metalloproteinase from the skeletal muscle of red sea bream (*Pagrus major*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58 (9) : 5730 - 5736.
- [14] Wu J L, Ge S Y, Cai Z X, *et al.* Purification and characterization of a gelatinolytic matrix metalloproteinase from the skeletal muscle of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Food Chemistry, 2014, 145 (7) : 632 - 638.
- [15] Sivakumar P, Sampath P, Chandrakasan G. Collagenolytic metalloprotease (gelatinase) from the hepatopancreas of the marine crab (*Scylla serrata*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B; Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 123 (3) : 273 - 279.
- [16] Bracho G E, Haard N F. Identification of two matrix metalloproteinases in the skeletal muscle of Pacific rockfish (*Sebastes* sp.) [J]. Journal of Food Biochemistry, 1995, 19 (4) : 299 - 319.
- [17] Fu X Y, Xue C H, Wang D F, *et al.* Study of a highly alkaline protease extracted from digestive tract of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. Food Research International, 2005, 38 (3) : 323 - 329.
- [18] Nagai T, Suzuki N, Nagashima T. Collagen from common minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) unesu [J]. Food Chemistry, 2008, 111 (2) : 296 - 301.
- [19] Saito M, Kunisaki N, Urano N, *et al.* Collagen as the major edible component of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. Journal of Food Science, 2002, 67 (4) : 1319 - 1322.

Study on proteinases responsible for collagen degradation in the viscera of sea cucumber (*Stichopus japonicus*)

MA Jinhua, WENG Ling, YAN Longjie, ZHANG Lingjing, LIU Guangming, CAO Minjie*

(College of Food and Biological Engineering, Fujian Engineering Research Center of Deep Processing of Aquatic Products, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Sea cucumbers are easy to undergo autolysis after harvest or under physical stimulations. Proteinases in sea cucumber viscera are supposed to play important roles in the degradation of major structural protein collagen. In the present study, crude proteinases were extracted from sea cucumber viscera and their hydrolysis ability on gelatin was investigated by zymography. The degradation of gelatin by crude proteinases was strongly inhibited by serine proteinase inhibitor PMSF and metalloproteinase inhibitors, including EDTA and EGTA. It was of interest to notice that the gelatinolytic activity of an enzyme with molecular weight of 33.2 ku was activated by Ca^{2+} and inhibited by EDTA, indicating that it may belong to metalloproteinase. This proteinase was further purified to homogeneity from sea cucumber viscera by 80% ammonium sulfate fractionation and a combination of chromatographic steps including DEAE-Sepharose ion exchange, Sephacryl S-200 gel filtration, Phenyl Sepharose Fast Flow hydrophobic interaction and Mini Q Sepharose ion exchange. The optimum temperature and pH of the finally purified proteinase were 30 °C and 7.5, respectively. Its enzymatic activity was almost completely suppressed by metalloproteinase proteinase inhibitors (EDTA, EGTA) and serine proteinase inhibitors (PMSF, Pefabloc SC). Furthermore, the enzyme effectively hydrolyzed native sea cucumber collagen both at 4 and 37 °C, suggesting its important role in the autolysis of sea cucumber.

Key words: *Stichopus japonicus*; gelatin zymography; metalloproteinase; purification

Corresponding author: CAO Minjie. E-mail: mjcao@jmu.edu.cn