

菠萝蛋白酶的基本性质研究

李明春 蔡振元 陈创业

(应用化学系)

摘要 本文介绍了菠萝蛋白酶的紫外吸收光谱、分子量、米氏常数 K_m 、激活剂等的影响,以及最适的 pH 和温度、热失活情况等基本性质. 实验表明菠萝蛋白酶为非金属酶;发现不同来源的菠萝蛋白酶的最适 pH 为中性,都具有一定的耐热性.

关键词 蛋白酶, 菠萝蛋白酶, 性质

0 前言

菠萝蛋白酶(Bromelain)即植物巯基蛋白酶^[1],是从菠萝表皮、果肉和茎中提取出来的蛋白水解酶,由 R. H. Chittenden 于1892年首先发现^[2]. 据报道^[3],含八种有活力的酶组分,并具有自消化作用,因而给该酶的分离提纯及研究工作带来很大困难. 迄今为止,对该酶的研究主要有以下三个方面:(1)酶一级结构的初步研究^[3,4];(2)对不同合成底物的研究与比较^[5,6];(3)用拉曼光谱研究酶与底物结合的情况^[7,8]. 此外,尚未见系统地报道该酶的基本性质. 本文针对菠萝果酶的主要成分进行较系统的基本性质研究,并结合菠萝茎酶的某些性质进行比较.

1 实验部分

1.1 仪器

SPECORD UV VIS 自动扫描可见紫外分光光度计;751-G 型分光光度计;JLXJ- I 型离心沉淀机.

1.2 试剂与材料

试剂:葡聚糖凝胶 Sephadex G-75, G-150 为 Pharmacia 公司进口分装;干酪素(Casein)为 Merck 公司进口分装;其它试剂均为国产分析纯. 材料:菠萝果系亚热带鲜果,取七成熟于4℃下冰箱贮存备用.

本文1989-09-03收到.

• 中侨办资助项目.

1.3 酶的提取及活力测定

将菠萝果肉或茎切碎榨汁,经硫酸铵沉淀,离心分离,除去杂蛋白、多糖等非酶物质,所得沉淀物即为粗酶。再经 Sephadex 层析柱进一步分离提纯。Sephadex 凝胶按文[9]方法进行处理。蛋白浓度采用751-G型紫外分光光度计测定,波长为280nm。然后进行酶活力的测定,在1ml 0.75%干酪素中加入1ml 15mmol/L EDTA 溶液,0.1ml 0.12mol/L 巯基乙醇,于37℃恒温15min,再加入0.4ml 酶液于37℃反应10min后,加入2.5ml 10%三氯醋酸溶液终止酶反应,于室温放置20min,过滤。滤液于分光光度计测定,波长为275nm。以标准酪氨酸为产物浓度参比,计算酶活力,在37℃下,单位定义为每分钟酶水解干酪素产生1 μ g 酪氨酸,定为1个酶活力单位。

2 结果与讨论

2.1 酶的分离提纯

将粗酶透析至无 SO_4^{2-} 后,上 Sephadex G-75 层析柱, $\varnothing 25 \times 800$, 水柱压头 6900Pa, 以 0.02mol/L pH7.0 磷酸缓冲液洗脱,流速为 0.3—0.4ml/min, 每10min 收集一管,分别测定每管的蛋白浓度及活力。柱层析谱图(图1),由此可获供本实验用的纯酶。

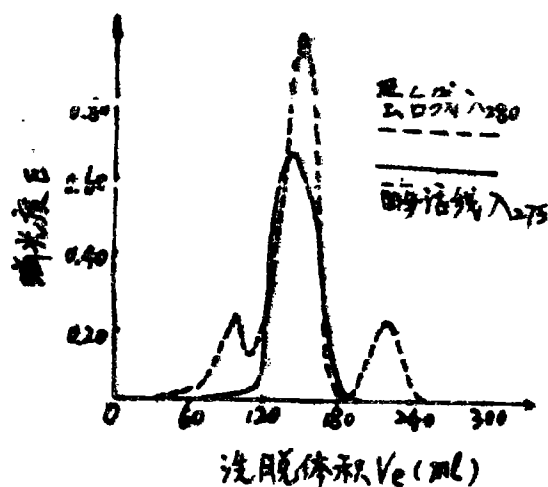


图1 菠萝蛋白酶柱层析谱图

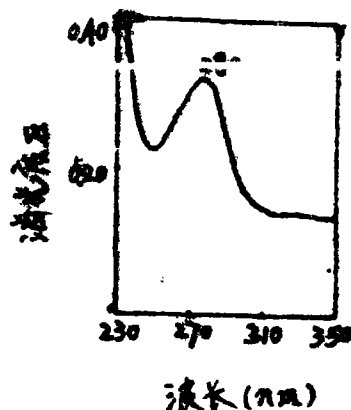


图2 酶的紫外吸收光谱

2.2 酶的紫外吸收谱图

对纯酶液的紫外吸收光谱测定结果见图2,在280nm 处有一个特征吸收峰。

2.3 分子量的测定

应用 Sephadex G-150 凝胶渗透色谱法测定标准蛋白和菠萝蛋白酶的洗脱体积 V_e , 以 V_e 对已知蛋白质分子量之对数 ($\lg M_r$) 作图, 见图3。未知酶蛋白分子量可从图3求得, 结果为 29,500。

2.4 激活剂对酶活力的影响

由于酶的活性基团为巯基, 容易被氧化成二硫键而使酶失去活力, 加入的激活剂为含巯基化合物, 如二巯基苏糖醇 (DTT)、巯基乙醇 (ME)、半胱氨酸 (Cys) 等。它们能与酶的巯基竞争氧

化,起到保护酶的作用,同时能把已被氧化的酶的二硫键还原,而使酶重新恢复活力,即所谓的酶激活.激活剂浓度对菠萝蛋白酶活力的关系曲线如图4.

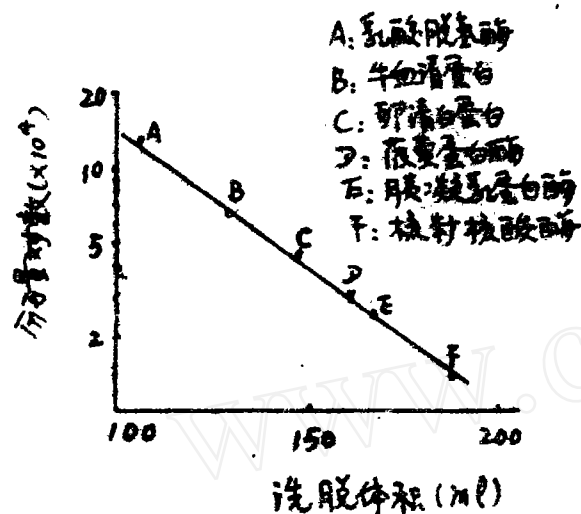


图3 Sephadex G-150洗脱体积
对分子量对数作图

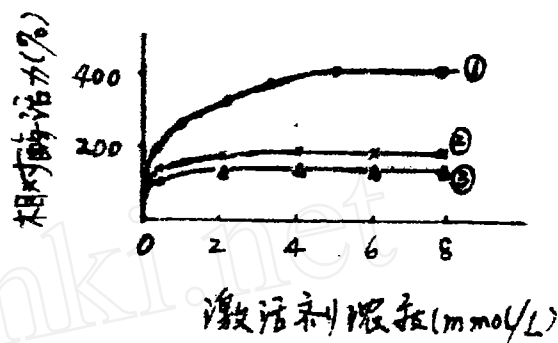


图4 激活剂对酶活力的影响
①为巯基乙醇对酶活力的影响;
②为半胱氨酸对酶活力的影响;
③为二巯基苏糖醇对酶活力的影响

从图中的三条曲线可以看出,随着激活剂浓度的增加,其激活程度加大,但达到一定浓度后,其激活能力不再显著增加而趋向一定值.上述三种激活剂以巯基乙醇的效果最好,其激活能力可高达4倍.通过此性质的研究,为激活剂及用量的选择提供了依据.

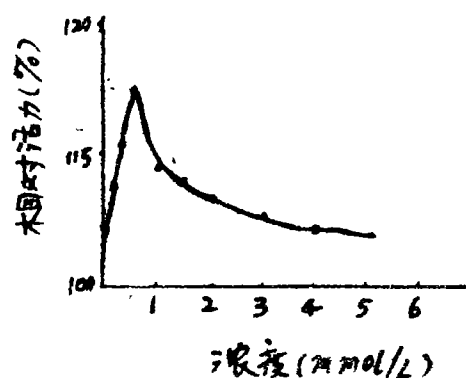


图5 EDTA 浓度对酶活力影响

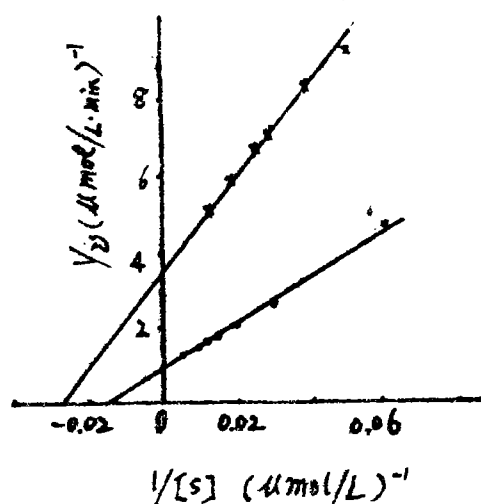


图6 酶水解干酪素的 Lineweaver-Burk 作图

2.5 EDTA 对酶活力的影响

EDTA 对酶的作用机理与巯基类化合物的激活机理不同. 它是用络合的方法除去对酶活力有影响的金属离子. 因而其作用曲线不一定与巯基类的激活曲线相同. 该曲线为何出现一小峰有待于进一步探讨. 图5表明, 菠萝蛋白酶是非金属酶. 否则, EDTA 的加入不仅不能提高酶活力, 还可能使酶失活.

2.6 米氏常数 K_m 的测定

米氏常数 K_m 表示酶催化反应达到最大反应速度一半时的底物浓度. K_m 是酶的一个基本特征常数, 它与酶浓度无关, 但与 pH 及温度等因素有关. K_m 的测定方法: 以干酪素为底物, 在 37℃ pH7.0 下测定不同底物浓度时酶反应的初速度. 用 Lineweaver-Burk 的双倒数作图法^[10], 求得 K_m 值. 干酪素的分子量按 60000 计. 从图6可求得 $K_{m\text{茎}} = 3.7 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $K_{m\text{果}} = 6.7 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 其中, $K_{m\text{茎}}$ 代表茎酶的米氏常数; $K_{m\text{果}}$ 代表果酶的米氏常数.

2.7 pH 对酶反应速率的影响

在同一实验条件下, 温度采用 37℃, 改变体系的 pH, 测定酶促反应的初速度, 表明该酶有最适 pH 区域, 见图7. 由图可见, 两种不同来源的菠萝蛋白酶, 其最适 pH 均为中性.

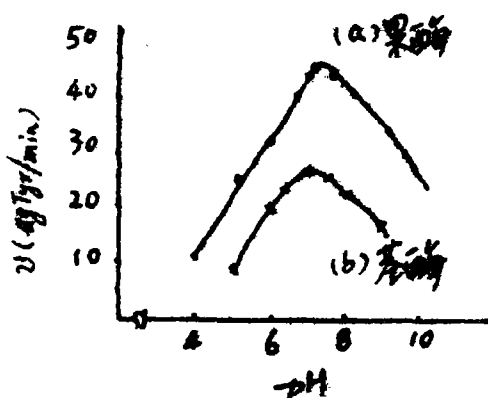


图7 pH 对酶反应速率的影响

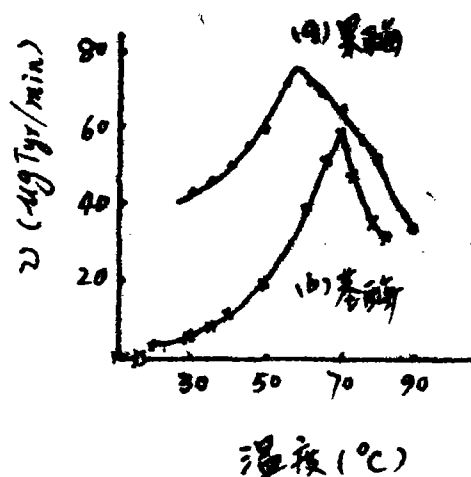


图8 温度对酶反应速率的影响

2.8 温度对酶反应速率的影响

在 pH 7.0, 同一实验条件, 测定温度对酶促反应的影响. 结果表明: 酶催化作用有个最适区域. 果酶和茎酶的最适温度分别为 58℃ 和 69℃, 见图8.

2.9 酶的热稳定性

在不同温度下, 测定酶活力随保温时间的变化, 结果如图9. 实验表明在高至 55℃ 时, 其酶活力仍然基本不随保温时间的延长而下降, 呈现出一定的耐热性.

2.10 酶的热失活动力学及热力学参数

根据文献^[11], 我们观察了茎酶在 55℃, 65℃, 70℃, 75℃ 等四个温度下的热失活反应情况. 反应在 pH 7.0 下进行. 实验结果见图10. 在这些温度下, 酶的热失活反应都是很好的一级反应. 从图10可以求出各温度下一级反应速率常数 k_0 , 用 Arrhenius 公式作 $\ln(k_0) - 1/T$ 关系图(图

11), 可以求出热失活反应的活化能 E_a 及活化热焓 ΔH^\ddagger , 用 Eyring 的绝对反应速度理论^[12] 可求得 ΔG^\ddagger 及 ΔS^\ddagger . 表1只列出65℃和70℃下酶失活反应的动力学及热力学参数.

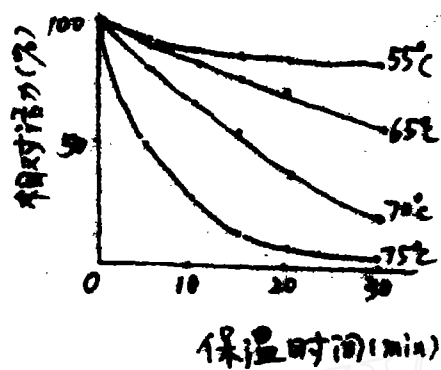


图9 酶的热稳定曲线

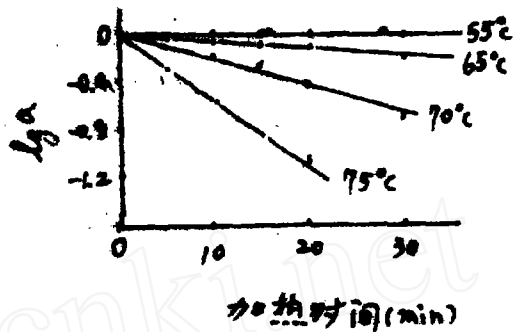


图10 酶热失活反应情况

表1 酶的热失活热力学参数

温度(℃)	$k_0(s^{-1})$	$E_a(J/mol)$
65	2.897×10^{-4}	1.62×10^5
70	7.98×10^{-4}	1.62×10^5
$\Delta H^\ddagger(J/mol)$	$\Delta G^\ddagger(J/mol)$	$\Delta S^\ddagger(J/mol \cdot K)$
1.592×10^5	1.061×10^5	1.570×10^2
1.591×10^5	1.048×10^5	1.582×10^2

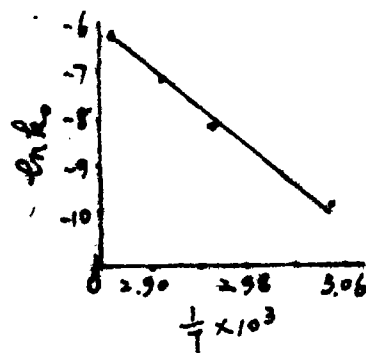


图11 酶热失活速度与温度关系

本项工作曾得到厦门大学颜思旭教授的指导,在此谨表谢意.

参 考 文 献

[1] Malcolm, D. , *Enzymes*, Longman, (1979).
[2] Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. , *Methods in Enzymology*, Academic Press, 19, (1976).
[3] Ota, S. , etal, *J. Biochem.* , 98, (1985), 219—118.
[4] Scooca, J. , etal, *J. Biol. chem.* , 244, 18(1969), 4852—4863.
[5] Gray, C. J. , etal, *Biochem.* , 219, 1(1984), 325—328.
[6] Baggett, N. etal, *Enzyme Microb. Technol.* , 7, (1985), 300—305.
[7] Storer, A. C. , etal, *J. Biol. chem.* , 254, (1974), 3163—3165.
[8] Carey, P. R. , etal, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 17, 3(1983), 725—731.
[9] 张龙翔等,生物化学实验方法和技术,高等教育出版社, (1983).
[10] 沈同等,生物化学,高等教育出版社, (1980).

- [11] 涂光寿、邹承鲁,生物化学与生物物理学报,5,6(1965),589.
[12] Eyring, H. and Stearn, A. E., *Chem. Rev.*, 24, (1939), 253.

A Study of the Properties of Bromelain

Li Mingchun Cai Zhenyuan Chen Chuangye

(*Department of Applied Chemistry*)

Abstract This paper gives a systematic account of such properties of bromelain as ultraviolet absorption spectrum, molecular weight, Michaelis constant K_m , effects of activators and EDTA, optimal pH, optimal temperature, and thermal inactivation. Bromelain is verified experimentally to be a non-metallic enzyme. Bromelain from different source, stem and fruit, are found to have the same optimal pH and a similar higher heat resistance.

Key words proteinase, bromelain, property