

萌发绿豆中水解大豆胰蛋白酶抑制子蛋白酶的纯化及固定化

陈 中 杨晓泉 赵谋明

(华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510641)

关键词 绿豆, 蛋白酶, 纯化, 大豆胰蛋白酶抑制剂, 固定化

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0211-04

大豆是豆类植物中最早发现存在蛋白酶抑制子的, 由于其存在影响了豆类的利用价值, 因此研究人员一直在寻找着解决办法。采用加热处理方法不能彻底钝化豆类蛋白的蛋白酶抑制子活性, 且豆类蛋白的含硫氨基酸主要存在于各类蛋白酶抑制子中, 从豆类蛋白中除去抑制子蛋白将大大降低其营养效价。本研究的目的是试图寻找一种可在常温下降解豆类胰蛋白酶抑制子的蛋白酶, 从而钝化豆类的胰蛋白酶抑制活性。在前期工作中, 我们发现枯草杆菌蛋白酶(Subtilisin)可在常温下降解花生及大豆胰蛋白酶抑制剂^[1], 近期我们的研究表明, Alcalase 蛋白酶可同时降解大豆蛋白和 大豆胰蛋白酶抑制子, 但 Alcalase 仅可降解 STI 中的 Kunitz Trypsin Inhibitor(KTI), 而不能降解 Bowman-birk Trypsin Inhibitor(BBTI)。鉴于豆类种子在萌发后即丧失了胰蛋白酶的抑制活性, 本文试图从萌发的绿豆种子中分离纯化可降解大豆胰蛋白酶抑制子的蛋白酶, 研究其酶学特性并进行固定化方面的研究。

1 实验材料与方法

1.1 材料

实验材料为市售绿豆(*Phaseolus aureus*)种子。绿豆种子在 25~35℃ 及黑暗条件下发芽不同时间, 液氮研磨成粉, -40℃ 保存备用。STI、N-苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基苯胺(BAPNA)和胰蛋白酶(活力为 5000BAEE/mg)购自 Sigma 公司。

1.2 酶的提取

发芽绿豆粉以 1:5 (W/V) 比例加入下述预冷的(4℃) 缓冲液: 50mmol/L Tris-HCl(pH8.2), 含 0.5mol/L NaCl, 10mmol/L β-巯基乙醇及 1mmol/L 苯甲基磺酰氟。漩涡振荡混合 10min, 20000r/min 离心 20min(4℃), 提取 2 次, 合并上清液为粗酶液。取不同发芽时间的粗酶液按 1.5 测定其

钝化 STI 的活性。另取粗酶液加入(NH₄)₂SO₄ 至饱和度 30%, 4℃ 过夜, 15000r/min 离心 15min, 上清液继续加入(NH₄)₂SO₄ 至饱和度 60%, 10000r/min 离心沉淀(4℃), 沉淀用 50mmol/L Tris-HCl(pH8.0)溶解, 对 50mmol/L Tris-HCl(pH8.0)透析 24h(4℃), PEG6000 浓缩, 冷冻干燥即为蛋白酶粗品。

1.3 酶的纯化

1.3.1 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换: 蛋白酶粗品按 10g/L 比例溶于 50mmol/L Tris-HCl(pH8.0)缓冲液, 过 DEAE Sepharose CL-6B 离子交换柱(2.6×30cm), 50mmol/L Tris-HCl(pH8.0)洗脱, Waters 650E 蛋白纯化系统(Waters 公司产品)控制流速 1.5mL/min, 待未结合蛋白洗脱后, 用含 0~1.0mol/L NaCl 的上述洗脱液于 1.0mL/min 流速线性洗脱 10h, 每管收集 10mL, 按 1.5 测定胰蛋白酶抑制剂钝化活性, 收集具有酶活的组分, 对 Tris-HCl 缓冲液(50mmol/L pH8.0)透析 24h, 然后 PEG-6000 浓缩至一定体积。

1.3.2 Sephacryl S-200 凝胶过滤: 浓缩的酶液过 Sephacryl S-200 离子交换柱(1.5×100cm), 50mmol/L Tris-HCl(pH8.0)洗脱, Waters 650E 蛋白纯化系统控制流速 1.5mL/min, 每管收集 10mL, 按 1.5 测定胰蛋白酶抑制剂钝化活性, 收集具有酶活的组份, 用 PEG6000 浓缩至一定体积。

1.3.3 Waters AP-1 column(ProteinTM-Pak DEAE 15HR)离子交换: 浓缩的酶液过 ProteinTM-Pak DEAE 15HR 柱(Waters AP-1)离子交换柱, 50mmol/L Tris-HCl(pH8.0)洗脱, Waters 650E 蛋白纯化系统控制流速 0.8mL/min, 待未结合蛋白洗脱后, 用含 0~1.0mol/L NaCl 的上述洗脱液于 0.8mL/min 流速线性洗脱 50min, 每管收集 3mL, 按 1.5 测定胰蛋白酶抑制剂钝化活性, 收集具有酶活的组份, 对 Tris-HCl 缓冲液(50mmol/L, pH8.0)透析, 然后用 PEG-6000 浓缩, 冷冻干燥即得到蛋白酶纯品。

收稿日期 2000-08-08, 修回日期 2000-12-11。

基金项目 国家自然科学基金(29806008)资助项目。

* 联系作者。 Tel: 86-20-87114486 Fax: 86-20-87111548 E-mail: chzhminaa@163.com

1.4 蛋白酶学特性的测定

绿豆蛋白酶的浓度采用 Bradford 方法测定^[2]。蛋白酶的纯度按 1.6 的 SDS-PAGE 方法测定。分子量以低分子量标准蛋白在 SDS-PAGE 胶上的相对迁移率对蛋白质分子量作半对数图得出。绿豆蛋白酶的热稳定性和 pH 稳定性如下测定:将绿豆蛋白酶在设定的 20~80℃ 系列温度范围、pH8.0 的条件下,恒温水浴 1h 后,按 1.5 方法测定该酶钝化 STI 的相对活力,检测出其热稳定性。将绿豆蛋白酶以 0.2mol/L 浓度溶解于 pH4.0~9.0 的系列缓冲液中,4℃ 下保存 24h,按 1.5 方法测定该酶钝化 STI 的相对活力,检测出其 pH 稳定性。蛋白酶的 K_m 值和 V_{max} 测定采用 Lineweaver-Burk 作图法测定^[3]。

1.5 酶降解 STI 活性测定

可降解 STI 蛋白酶的活性采用改进的 BAPNA 法测定^[4,5]。首先在总体积为 500 μ L 的反应体系中加入 100 μ L 蛋白酶溶液(以一定比例稀释)和 100 μ L 大豆胰蛋白酶抑制剂(Sigma 产品),37℃ 水浴反应 4h,迅速吸取 100 μ L 反应液,加入 100 μ L 胰蛋白酶溶液(活力为 5000BAEE/mL),37℃ 水浴 10min,然后加入 1mmol/L BAPNA 溶液 1mL,37℃ 水浴 10min,加入 100 μ L 30% 的醋酸终止反应,410nm 比色,用空白样作参比。通过比较加与不加蛋白酶样品的吸光值,就可通过残留的胰蛋白酶抑制剂活性间接反映出粗酶液对 STI 的酶解程度。

1.6 SDS-PAGE 电泳分析

SDS-PAGE 按 Laemmli(1970)^[6]方法。蛋白酶反应液加入等体积的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH6.8,含 5%(W/V)SDS;10%(V/V) β -ME;20%(V/V)甘油;0.02%(W/V)溴酚蓝)。SDS-PAGE 方法分析蛋白酶酶解产物。浓缩胶浓度 4%,分离胶浓度 12.5%。

1.7 绿豆蛋白酶的固定化

将绿豆芽酶配制成 10mL 活力为 25000 BAEE/mL 的酶溶液后,加入到 25mL 30% 的丙烯酰胺单体胶储备液(Acr:Bis=29:1)中,再加入 Tris-HCl 缓冲液(50mmol/L,pH8.0)14.2mL,混匀后分别加入加速剂和引发剂,即 10% 的过硫酸铵(AP)溶液 0.4mL 以及 10% 的 TEMED 溶液 0.4mL,混匀后室温下待溶液凝胶,然后将凝胶切碎,就制成了聚丙烯酰胺固定化酶。制备好的固定化酶 4℃ 下保存。

1.8 固定化酶的酶学特性的测定

绿豆蛋白酶的热稳定性和 pH 稳定性如下:将固定化绿豆芽酶在设定的系列温度范围(20~80℃),pH8.0 的条件下,恒温水浴保温 1h 后,按 1.5 方法测定该酶钝化 STI 的相对活力,检测出其热稳定性。将固定化绿豆芽酶用系列 pH 范围(4.0~10.0)的缓冲液(0.2mol/L)浸泡后,4℃ 下保存 24h,按 1.5 方法测定该酶钝化 STI 的相对活力,检测出其 pH 稳定性。固定化酶的表现 K_m 值和 V_{max} 测定采用 Lineweaver-Burk 作图法测定。固定化绿豆芽酶半衰期通过测定 4℃ 下存放不同时间后固定化酶水解抑制子的能力,然后对时间作图,从而推算出固定化酶的半衰期 $t_{1/2}$ ^[7]。

2 结 果

2.1 萌发绿豆种子存在可降解 STI 的蛋白酶

本文首先确定了萌发绿豆种子中存在可降解 STI 的蛋白酶(图 1)。图 1 中粗酶可以降解掉部分的 STI。在 A 样品中对应 STI 的位置,颜色较对照样 B 及标样的浅,这说明反应液中的 STI 剩下的量较原来减少了,也就证明了从萌发绿豆芽提取出的粗酶中,存在能降解 STI 的酶类。接着我们确定了提取绿豆蛋白酶的最适发芽时间。当绿豆发芽时间大约在 18~20h 时,粗酶液降解 STI(Sigma 产品)的相对酶活力达到最高(图 2),可钝化 60% 的 STI 活性。因此确定绿豆萌发的最适时间为 18~20h。

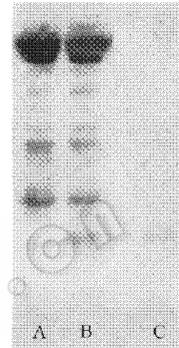


图 1 SDS-PAGE 照片

Fig. 1 SDS-PAGE picture

A Crude enzyme and STI(reaction time 4h)

B Crude enzyme and STI(reaction time 0h)

C STI

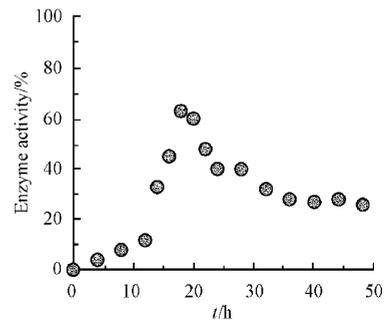


图 2 绿豆发芽时间与酶活的关系

Fig. 2 Enzyme activity of mung bean germinating time

2.2 绿豆蛋白酶的纯化及酶学特性测定

经 30%~60% $(NH_4)_2SO_4$ 分级沉淀的蛋白酶进行 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换柱层析、Sephacryl S-200 凝胶过滤层析和 Protein-PakTMDEAE 15HR 离子交换柱(Waters AP-1)层析进行进一步的纯化,测定每步纯化后提取物的蛋白质含量及其降解 STI 的活性,计算出其比酶活(以 BAEE/mg 表示)、纯化倍数和活性回收率(表 1)。由表 1 可见,50g 绿豆种子经萌发制成 150g 豆芽,经过破碎提取、盐析、离子交换、凝胶过滤和离子交换等 5 步分离纯化过程,可得到 68.3mg 蛋白酶纯品。其比酶活可达 54483.1BAEE/mg。

表 1 发芽绿豆中蛋白酶的纯化

Table 1 Purification of the proteinase from Mung bean burgeon

Purification step	Total proteins /mg	Relative enzyme activity / (BAEE/mg)	Purification factor	Recovery /%
Crude enzyme	7 168.7	976.4	1.00	100
(30% ~ 60% s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3 804.3	1 641.3	1.681	89.21
DEAE-Sepharose CL-6B	314.8	13 542.7	13.87	60.91
Sephacryl S-200	143.4	27 798.1	28.47	56.95
Protein-Pak TM DEAE 15HR	68.3	54 483.1	55.80	53.16

蛋白酶的活性回收率为 53.16% 纯化倍数达到 55.80 倍。

本文的研究表明, 绿豆蛋白酶酶解 STI 的最适反应温度为 40~50℃。随温度的升高该酶降解 STI 的能力下降, 当温度高于 70℃ 时, 酶基本上失去活性。绿豆蛋白酶酶解 STI 的最适 pH 值为 7.5~8.5。采用 Lineweaver-Burk 作图法测定出该蛋白酶的 K_m 值和 V_{max} 分别为 :769.2 BAEE/mL 和 115.3 BAEE/(min·mL⁻¹)。

蛋白酶的纯度及分子量由 SDS-PAGE 测定(图 3)。由图 3 可见, 经过上述 5 步分离纯化步骤, 所提取的蛋白酶含杂蛋白的量逐渐减少, 酶的纯度逐步提高, 最后经 Protein-PakTM DEAE 15HR 离子交换柱 (Waters AP-1) 层析后只剩下一条泳带(考马斯亮蓝 R-250 染色), 说明该蛋白酶已较纯。用低分子量标准蛋白的分子量对蛋白质相对迁移率作半对数图, 计算出该蛋白酶的分子量为 29.8kD。

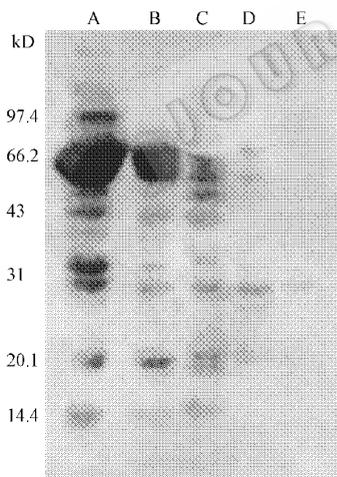


图 3 SDS-PAGE 电泳检测酶的纯度及分子量

Fig. 3 SDS-PAGE of purification enzyme from

Mung bean burgeon

A Crude enzyme

B Fractional precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

C Anion-exchange on DEAE-Sepharose CL-6B

D Gel filtration of proteins on Sephacryl S-200

E Anion-exchange chromatography on Waters AP-1 column

2.3 绿豆蛋白酶的固定化

本文的研究表明, 经聚丙烯酰胺固定化, 绿豆蛋白酶的

酶活损失约 30%。固定化绿豆蛋白酶酶解 STI 的最适反应温度为 40~60℃, 当温度高于 80℃ 时, 基本上失去活性。酶解 STI 的最适 pH 值为 7.0~9.0。采用 Lineweaver-Burk 作图法测定出该固定化酶的表现 K_m^* 值和 V_{max}^* 分别为 :1303.8BAEE/mL 和 94.34BAEE/(min·mL⁻¹)。固定化酶在 4℃ 时的半衰期 $t_{1/2}$ 约为 12d, 较游离酶有所增加(图 4)。

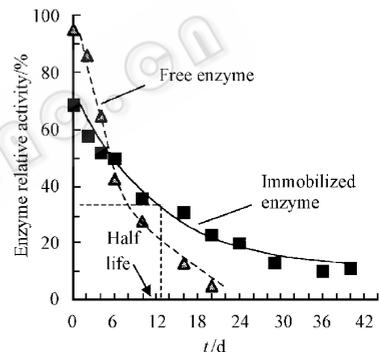


图 4 4℃ 下存放时间对固定化酶水解 STI 的影响

Fig. 4 Effect of the hold time on the immobilized enzyme activity at 4°C

3 讨论

国外研究者关于豆类胰蛋白酶抑制子的研究目前主要集中在蛋白酶抑制子的结构及其与靶酶的作用机理, 以及抑制子的基因表达和药用等方面^[8,9]。国内对蛋白酶抑制子的研究较少, 杨晓泉等曾从花生种子中提取纯化了胰蛋白酶抑制子(Peanut trypsin inhibitor, 简称 PTI), 研究了其性质, 测定了 PTI 的等电点和分子量, 并发现 PTI 高度耐热、耐酸且不易被蛋白酶降解^[10]。至于对抑制子的酶水解研究则更少, 印度学者 Ashok P. Giri 等最近发现某些昆虫中存在能钝化豆类蛋白酶抑制子的蛋白酶^[11]。本论文从萌发的绿豆种子中纯化出一种可降解 STI 的蛋白酶, 并进行了酶的固定化研究。

豆类由于含有胰蛋白酶抑制剂等营养限制因子, 一直影响着人类对其的利用, 纯化抑制子酶的发现使我们可以常在常温下快速地去大豆胰蛋白酶抑制子, 大大拓展豆类蛋白资源的利用范围。

REFERENCES (参考文献)

- [1] CHEN Z (陈中), YANG X Q (杨晓泉), PENG Z Y (彭志英). Study on soybean trypsin inhibitor hydrolyzed by proteinase, *Journal of Zhengzhou Grain College* (郑州粮食学院学报), accepted.
- [2] LI R L (李如亮). Biochemical Wuhan :Wuhan University Publishing Company ,1998
- [3] WANG C Q (王重庆), LI Y L (李云兰), LI D C (李德昌) *et al.* Tutorial of High Biochemical Experiments ,Beijing :Beijing University Publishing Company ,1994
- [4] Preiser H ,Schmitz J ,Maestraci D *et al.* Modification of an assay for trypsin and its application for the estimation of entero peptidase ,*Clinica Chimica Acta* ,1975 **59** :169~175
- [5] Nakata ,H ,Ishii S. Substrate activation of trypsin and acetyl trypsin caused by α -N-Benzoyl-L-arginine-*p*-Nitroanilide , *J Biochem* ,1972 **72** :281~290
- [6] Laemmli U K ,Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 ,*Nature* ,1970 **227** :680
- [7] CHEN S G (陈石根), ZHOU R Q (周润琦), *Enzymology* , Changsha :HU HAN Univeristy of Science and Technology Publishing Company ,1987
- [8] Teresa Altabella , Maarten J. Chrispeels ,tobacco plants transformed with the bean α -gene express an inhibitor of insect α -amylase in their seeds ,*Plant Physiol* ,1990 **93** :805~810
- [9] Charles Schick ,Allison J Bartuski ,Yoshiki Uemura *et al.* The reactive site loop of the serpin SCCA1 is essential for cysteine proteinase inhibition ,*Proc Natl Acad Sci USA* ,1998 **11** (95) : 13465~13470
- [10] YANG X Q (杨晓泉), ZHANG S H (张水华), WEN F D (文方德) *et al.* Purification and inactivation of trypsin inhibitor from peanut (*Arachis Hypogaea L*) seeds ,*Acta Nutrimenta Sinica* (营养学报) ,1998 **20** (3) :246~252
- [11] Ashok P Giri ,Abhay M Harsulkar ,Vasanti V Deshpande *et al.* Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinase ,*Plant physiol* ,1998 **116** :393~401

Purification and Immobilization of the Proteinase from Mung Bean Burgeon Inactivating Soybean Trypsin Inhibitor

CHEN Zhong* YANG Xiao-Quan ZHAO Mou-Ming

(College of Food Science and Bioengineering ,South China University of Technology ,Guangzhou 510641 ,China)

Abstract By 30% ~60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractional precipitation anion-exchange chromatographs on DEAE-Sephacryl CL-6B gel filtration on Sephacryl S-200 and anion-exchange chromatographs on Waters AP-1 column (ProteinTM-Pak DEAE 15HR) a proteinase which can inactivated STI was purified from mung bean (*Phaseolus aureus*) burgeon. It was stable at temperatures lower than 50°C and pH7.5~8.5 and the K_m and V_{max} of the proteinase for STI was 769.2 α -N-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) μmol and 115.3 BAEE/min/ μmol respectively. The molecular weight of the proteinase was estimated to be 29.8kD by SDS-PAGE. The proteinase immobilized by polyacrylamide was stable at temperatures lower than 60°C and pH7.0~9.0 ,and the apparent K_m^* and V_{max}^* of the immobilized proteinase for STI was 1303.8 (BAEE) μmol and 94.34 (BAEE) /min/ μmol respectively. The half-life of the immobilized proteinase was about 12 days at 4°C

Key words mung bean , proteinase , inactivate , soybean trypsin inhibitor , immobilize