

长腕和尚蟹耐盐蛋白酶的纯化 及性质的研究*

苏拔贤 叶清莉 黄敏
(生物学系)

摘 要

本文报导从长腕和尚蟹(*Mictyris longicarpus latreille*)中分离出一种耐盐的蛋白水解酶,测定了该酶作用最适pH和温度、米氏常数、耐盐度、抑制剂与激活剂等性质,其分子量为60 000~63 000,等电点为4.5。该酶与木瓜蛋白酶水解海洋鱼肉蛋白的活力作比较,前者不仅具有很高活力,而且有耐高温、耐盐等优点。

关键词 长腕和尚蟹,耐盐性蛋白酶,纯化

蛋白水解酶是食品、医药、轻化工广泛应用的一类酶^[1,2],目前主要来源于微生物、动物内脏和植物的果实等,海洋生物中的蛋白酶报导极少。长腕和尚蟹(*Mictyris longicarpus latreille*)主要分布于印度、中国南海及北部湾等处的潮间带。广西钦廉一带民间称为“沙蟹”,在夏秋间捕获后经短期腌制,具有开胃消滞功能,其风味芳香,增进食欲,是当地人民一种传统的海鲜调味品。作者经过了对腌制物及活体多次试验,发现了“沙蟹”体液中含有极丰富的蛋白水解酶(简称为MLC蛋白酶)。本文报导了此酶的分离纯化和有关性质的初步研究结果,并对其应用前景作了扼要的讨论。

1 材料与方 法

1.1 材 料

长腕和尚蟹,为广西北海市渔民采集的新鲜活体;木瓜蛋白酶,购自广州园艺场植物蛋白厂,规格为30万单位/g。

1.2 试 剂

考马斯亮蓝G250, Sephadex G-75, Ampholine (pH3~10)等系Pharmacia产品。DEAE-纤维素为Sigma产品。

其余试剂除特别说明外,均为国产化学纯或分析纯级。

本文1988年9月5日收到

● 广西北海海洋食品厂的郑家烈、郑荫泉参加了部分实验研究工作

1.3 实验方法

1.3.1 蛋白质浓度测定 按Bradford法(又称染料法)^[3]。

1.3.2 蛋白酶活性测定 按福林(Folin)法^[4],酶活力单位表示为在最适反应温度和pH条件下,每分钟水解酪蛋白所产生一微摩尔的酪氨酸为该蛋白酶一个活力单位。为了方便起见,本实验在比较活力时,有时直接用福林法O.D._{630nm}吸收值或以紫外分光法O.D._{280nm}吸收值^[5,6]的大小表示酶活力的大小。

1.3.3 氨基氮含量的测定 按甲醛滴定法^[7]。

1.3.4 聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳——蛋白质纯度的鉴定^[8] 阴离子电泳系统:用浓度为7.5%作分离胶、浓度为2.5%作浓缩胶的聚丙烯酰胺不连续系统,电极缓冲液为0.1mol/L, pH8.3的Tris—甘氨酸溶液,此条件下MLC蛋白酶带负电,向正极移动。电泳后,以10%三氯醋酸固定,0.25%考马斯亮蓝R250液染色。

1.3.5 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳——作蛋白酶分子量的测定^[9] 上样前将标准蛋白样品溶于1%SDS—1%巯基乙醇—10%甘油—0.01mol/L磷酸缓冲液(pH7.2)中,待测样品溶于2%SDS—2%巯基乙醇—20%甘油—0.02%溴酚蓝—0.01mol/L磷酸缓冲液(pH7.2)中。凝胶含10%聚丙烯酰胺,电极缓冲液为0.1%SDS—0.1mol/L磷酸缓冲液(pH7.2)。电泳完毕后以考马斯亮蓝染色,以冰醋酸:水:甲醇(75:875:50,体积比)脱色液脱色,以标准蛋白分子量对数值对相对迁移率作图,根据待测样品的相对迁移率查出其分子量。

1.3.6 等电聚焦电泳—测定蛋白酶等电点 凝胶含7.3%聚丙烯酰胺及2.44%的Ampholine(pH3-8),样品液直接加入按比例配好的不连续凝胶系统中,电极缓冲液上槽为0.2% H₂SO₄(正极),下槽为0.4%乙醇胺溶液(负极)。开始电泳时电流强度为2mA/管,150V;半小时后,电压调至350V。聚焦3小时完毕后加入染色液(4.7% TCA—4.2%碘基水杨酸—35.3%甲醇—0.1%考马斯亮蓝R250),在60℃水浴中染色1小时,最后以乙醇:水:冰醋酸(25:25:8,体积比)洗脱。

1.3.7 硫酸铵分级沉淀及反抽提分离法 一定量的长腕和尚蟹经pH8的0.02mol/L磷酸缓冲液反复提取后,获得的蛋白酶提取液,依次用35%,40%,50%,60%饱和度的硫酸铵分级沉淀,每次沉淀后经4000转/min离心10分钟,收集沉淀,测定蛋白含量及酶活力。取分离效果最佳的50%饱和度硫酸铵沉淀,按1:2体积以50%、40%、30%、20%饱和度硫酸铵对沉淀分别进行反抽提,以清除盐析中由于共沉作用所带入杂质。

1.3.8 Sephadex G—75凝胶过滤层析分离 样品经硫酸铵反抽提,对水透析除盐后上Sephadex G—75柱。层析柱先以0.05mol/L NaCl溶液平衡,加样后仍以0.05mol/L NaCl洗脱,流速为21ml/h,每管收集3ml并测定蛋白含量和酶活力。

1.3.9 DEAE—纤维素离子交换层析分离 根据预备实验,该酶在CM—纤维素层析及凝胶电泳行为在pH8.0时带负电荷,而采取DEAE—纤维素层析进一步纯化。DEAE—纤维素经处理为OH⁻型,柱体积为1.0×15.5cm,用0.02mol/L, pH8.0磷酸缓冲液平衡,上柱总蛋白量为11.71mg,以0.02~1mol/L的NaCl—磷酸缓冲液(pH8.0, 0.02mol/L)连续梯度洗脱,洗脱时,流速为10ml/h,每管收集3ml,分别测定蛋白含

量及酶活力。

1.3.10 最适应pH值测定 取不同pH值(pH7—9.6) 0.04mol/L巴比妥缓冲液 2 ml, 分别加入2.5%酪蛋白0.5ml, 65℃预热2分钟, 迅速加入经适当稀释的MLC蛋白酶液, 准确反应10分钟, 5%三氯醋酸终止反应, 过滤, 按福林法测定酶活, 以pH值对酶活力作图。

1.3.11 最适反应温度的测定 在不同温度(20~80℃)下, 操作如10, 所得结果以不同温度对酶活力作图。

1.3.12 酶的耐盐性试验 取不同浓度(0~16%)的NaCl溶液 2 ml, 加入0.5ml, 0.5%酪蛋白, 65℃预热数分钟, 加入适当稀释的酶液0.5ml, 反应10分钟后, 测定酶活力方法同上。以0%NaCl所测的酶活力为100, 实验结果以酶的相对活力与百分盐浓度作图。

1.3.13 酶的一些基本动力学性质测定 ①酶反应初速度: 取试管15支编号后, 分别加入2.5ml 0.5%酪蛋白, 在65℃恒温水浴中进行反应, 按不同间隔时间取出, 终止反应后测定酶活力, 求出酶反应速度进程曲线。②米氏常数: 用0.2mol/L, pH8.0的磷酸缓冲液稀释酪蛋白, 配成一系列(0.02, 0.06, 0.14, 0.20, 0.30, 0.40%)不同百分浓度的底物, 65℃预热2分钟, 每管加入酶液0.5ml时, 准确计时。第1~6管反应10分钟, 第7~12管反应15分钟, 终止反应后测定酶活如前, 并以 $1/[S]$ 对 $1/v$ 作图。③金属离子及某些还原剂对酶活力试验: 金属离子除 Na^+ 外, 选择了 Hg^{++} , Cu^{++} , Pb^{++} , Zn^{++} , Co^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Ag^+ , K^+ 等的盐类, 配成1, 5, 10mmol/L三种浓度, 各种不同浓度的金属离子吸取0.4ml, 与酶液65℃预保温2分钟后, 再加入底物反应10分钟, 按上法测定酶活力。还原剂巯基乙醇配成0.5, 1, 2%三种百分浓度, 半胱氨酸配成4, 8, 12mmol/L三种浓度, 其对酶活力影响试验如同金属离子操作, 所得结果均与对照作比较。

1.3.14 与木瓜蛋白酶作耐盐性及水牛鱼肉蛋白的比较试验 两种蛋白酶均需按其酪蛋白的水解活力求出每毫升酶液活力单位, 然后取相等活力单位的酶液作试验。耐盐性试验如方法12。水解鱼肉蛋白的试验操作如下: 海洋鱼类先除去内脏, 取部份鱼肉洗净并磨成鱼糜。称取每份10克分别加入A、B两个100ml锥形瓶内, 各加入39ml 0.2mol/L, pH8.0磷酸缓冲液, 煮沸使蛋白变性。冷至室温后, 在A、B两瓶中分别加入1ml相当于40个酶活性单位的两种酶液, 在各自最适温度下开始水解。每隔一定时间取样一次, 离心, 取上清液, 按甲醛滴定法测定游离氨基酸的生成量, 酶活力以滴定时消耗NaOH毫升数表示。

2 结果与讨论

2.1 MLC蛋白酶的分离纯化

2.1.1 新鲜采集与盐腌后的MLC蛋白酶活力比较 当天捕获的与经过15天18%NaCl腌制后的长腕和尚蟹, 取同样重量样品用相同体积pH8.0, 0.02mol/L磷酸缓冲液提取, 所得酶液进行酶活力比较, 结果见表1。

表1 新鲜的与腌制的材料所含MLC蛋白酶活力的比较

Tab. 1 Protease activity comparison of fresh and salted *Mictyris longicarpus* Latreille

项 目	新鲜材料	经18%NaCl浸泡
保 存 期	当天	15天后
提取液的酶活力 (O.D ₆₈₀ /mg/ml)	3.28	2.56
相对活力比较	100%*	78%

● 以新鲜材料活力为100%，活力表示为 酶液中每毫克蛋白量在680nm处的O.D值

表1说明，经15天18%NaCl浸渍的材料，除已泄漏到体外，蟹体内尚含有78%的酶活，可见盐腌对酶活力损失很少，有利于材料的保存和蟹体内的蛋白类物质的缓慢分解。

2.1.2 硫酸铵分级沉淀及反抽提分离 取新鲜长腕和尚蟹200g，得酶提取液625ml，经硫酸铵分级沉淀后，测得各部分酶活力如图1所示。

根据图1酶活力分布，以50%饱和度硫酸铵所得沉淀，进行反抽提，所得结果见表2。

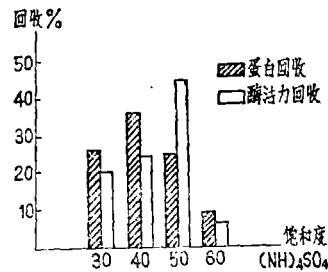


图1 MLC蛋白酶分级盐析中酶活力分布

Fig.1 The distribution of MLC protease activity by (NH₄)₂SO₄ fractionation

表2 不同饱和度硫酸铵反抽提酶活分布

Tab. 2 The distribution of MLC protease activity by backextraction of difference percentage (NH₄)₂SO₄

反抽提液的 (NH ₄) ₂ SO ₄ 饱和度	总体积 (ml)	总活力 (u)	总蛋白 (mg)	比活力 (u/mg蛋白)
(沉淀)	5	255.72	77.5	3.3
50%	10	11.33	3.45	4.15
40%	10	68.28	14.25	4.79
30%	10	135.48	21.34	6.35
20%	10	37.30	38.5	0.97

结果表明，沉淀经30%(NH₄)₂SO₄反抽提后，酶的比活力比原来约提高了一倍。

2.1.3 Sephadex G—75柱层析分离 实验结果如图2所示。

从图2层析图谱看到,蛋白洗脱峰与酶活洗脱峰基本重叠,但蛋白峰前后缘拖延较长,样品仍获得一定程度的纯化。

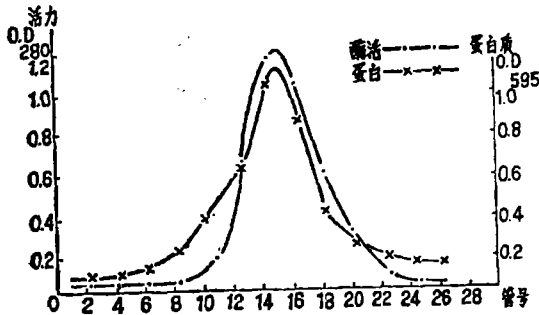


图2 MLC蛋白酶 Sephadex G-75柱层析图谱

Fig. 2 Chromatography of partially purified MLC protease on Sephadex G-75

柱体积:1.1×56cm; 上柱量:21.34mg, 平衡及洗脱缓冲液:0.05mol/L NaCl; 流速:24ml/h; 每管收集:3ml

2.1.4 DEAE—纤维素层析分离 实验结果见图3。

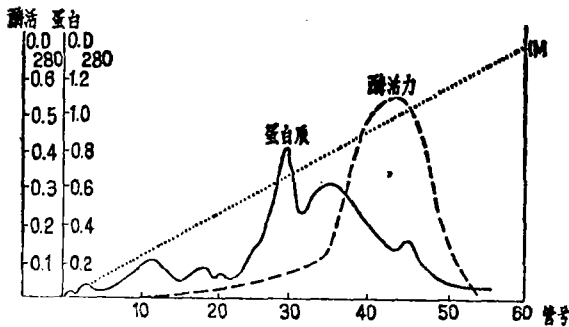


图3 MLC蛋白酶DEAE—纤维素柱层析图谱

Fig. 3 Chromatography of partially purified MLC protease on DEAE-cellulose

柱体积:1.0×15.5cm, 上柱量:11.71mg, 平衡液:0.02mol/L, pH8.0磷酸缓冲液 洗脱液:0.02~1mol/L NaCl—磷酸缓冲液 流速:40ml/h; 每管收集:3ml

DEAE—纤维柱层析所得活性部份,经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。主要呈现一条十分清晰的区带及附近一条很浅的带(见图12b)说明经DEAE—纤维素柱分离后,样品已达相当纯度。MLC蛋白酶分离纯化结果见表3。

表3 MLC蛋白酶提纯小结

Tab. 3 Purification of MLC protease

提纯步骤	体积 (ml)	总活力 (u)	总蛋白 (mg)	比活 (u/mg)	产率 (%)	提纯倍数
原提取液	625	585	311.83	1.876	100	1
40~50%硫酸铵分级沉淀	5	255.72	77.5	3.3	43.71	1.76
30%硫酸铵反抽提	10	135.5	21.34	6.35	23.16	3.38
Sephadex G-75柱层析	28.6	121.8	11.71	10.4	20.82	5.54
DEAE—纤维素柱层析	66	63.5	3.9	16.3	10.86	8.69

2.2 MLC蛋白酶基本性质

2.2.1 pH对酶活力的影响 实验结果如图4所示。图4表示，pH8时，MLC蛋白酶活力最高，说明此酶作用环境属微碱性蛋白水解酶。而在一定范围内对pH变化不甚敏感。

2.2.2 温度对酶活力的影响 实验结果如图5所示。图5表明，在本实验条件下，MLC蛋白酶最适反应温度为65℃左右，属于中等耐热性的蛋白酶。

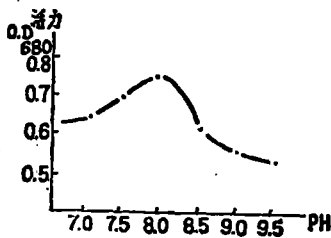


图4 pH对酶活力影响
Fig. 4 Effect of pH on MLC protease activity

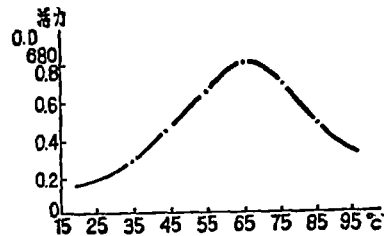


图5 温度对酶活力影响
Fig. 5 Effect of temperature on MLC protease activity

2.2.3 不同浓度NaCl对酶活性影响 实验结果见图6。图中说明，低于3.33%的NaCl，酶活性随着NaCl浓度增加而提高，当盐浓度达4%时酶活缓慢下降，盐浓度达12%时，酶仍保持原来活性的一半，说明此酶在游离情况下耐盐性还是相当强的。

2.2.4 酶的反应速度进程曲线 图7指出MLC蛋白酶酶促反应的初速度是反应开始后20分钟范围内。在此区域，反应速度与时间成正比例。

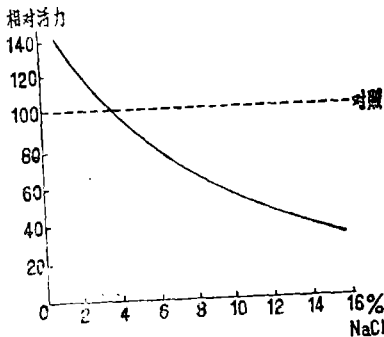


图6 NaCl浓度对酶活力的影响
Fig. 6 Effect of NaCl concentration on MLC protease activity

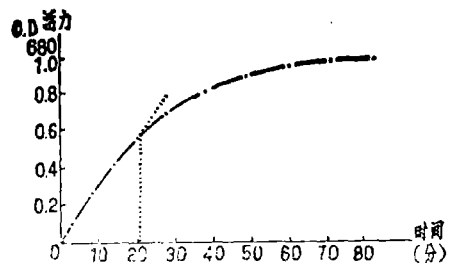


图7 MLC蛋白酶反应速度进程曲线
Fig. 7 Reaction-time curves for hydrolysis casein of MLC protease

2.2.5 米氏常数(K_m)的测定 实验结果见图8。从图8测出的MLC蛋白酶的K_m值为4.7×10⁻⁵mol/L,由于使用的底物——酪素分子量的大小只能采取平均值计算,所得K_m只能表示一定范围值,此值与文献报导的猪胃蛋白酶以乙酰-L-苯丙氨酸--二碘酪氨酸为底物的K_m值(7.5×10⁻⁵mol/L)和牛胰蛋白酶以苯酰-L-精氨酸乙酯为底物的K_m值(5×10⁻⁵mol/L)相比较,处于同一数量级且相当接近,可以认为,MLC蛋白酶对底物酪蛋白的亲合力还是相当高的^[10]。

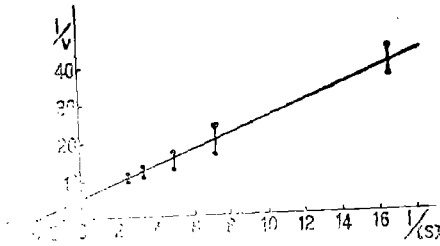


图8 MLC蛋白酶活力对酪蛋白浓度的L—B图
Fig. 8 Lineweaver-Burk plot of MLC protease activity versus casein concentration

图中求出-1/K_m' = -2.5,酪蛋白分子量为70000~100 000,取平均值85 000计算,得K_m = 0.4% (酪蛋白)相当于0.047mmol/L(即≈4.7×10⁻⁵mol/L)。1/v为酪氨酸μmol/min的倒数,1/[S]为酪蛋白百分浓度的倒数

2.2.6 金属离子和某些还原剂对酶活性影响 在已试验的金属离子中,经过定性观察,对酶活力有较明显抑制作用的有Hg⁺⁺、Cu⁺⁺、Pb⁺⁺、Zn⁺⁺和Ag⁺等,作用不明显的有Mn⁺⁺和K⁺,对酶活力有较明显激活作用的只有Mg⁺⁺。为了使以上定性观察能深入一步,每组加入与金属离子等当量的EDTA,结果表明Hg⁺⁺、Cu⁺⁺、Ag⁺组加入EDTA后,酶活有不同程度回复,其中Cu⁺⁺被螯合后酶活回复率接近100%。而Mg⁺⁺被EDTA螯合后,酶活力明显下降,说明MLC蛋白催化活力需要Mg⁺⁺的存在。

还原剂巯基乙醇和半胱氨酸对MLC蛋白酶的影响见图9和图10。图中曲线表明,以上两种还原剂对酶均有一定保护及激活作用。意味着巯基与该酶活性中心有关。

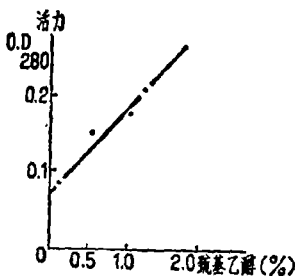


图9 巯基乙醇对MLC蛋白酶活力影响
Fig. 9 Effect of β-mercaptoethanol on MLC protease activity

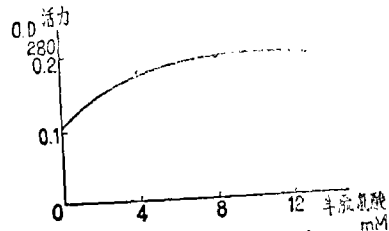


图10 半胱氨酸对MLC蛋白酶活力影响
Fig. 10 Effect of cysteine on MLC protease activity

2.2.7 分子量及等电点的测定 MLC蛋白酶的分子量按SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳测定结果如图11。由于电泳图谱显示出一深一浅迁移率十分相近的两条带,根据蛋白质含

量推算深色主带应是MLC蛋白酶，在标准曲线位置计算，该酶分子量范围（或亚基分子量）在60000—63000道尔顿左右。

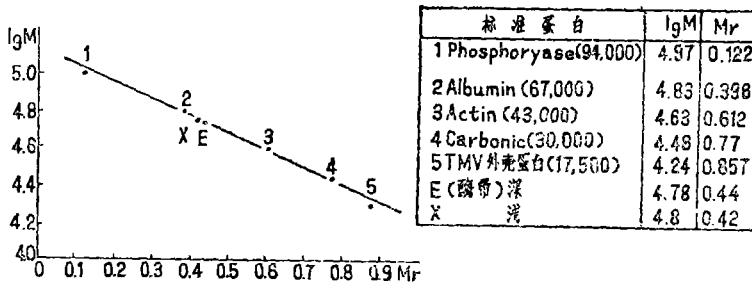


图11 MLC蛋白酶分子量测定(SDS--PAGE法)，以IgM分子一相对迁移率(mr)作图
Fig. 11 Molecular weight of MLC protease detemined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

等电点聚焦法测定MLC蛋白酶的等电点，在凝胶带近pH3的一端，也显示出一深一浅两条带纹(见图12b)，取主带计算该酶的等电点为4.5。

从图12可看到三种凝胶电泳对 MLC 蛋白酶的分离结果，均获得一深一浅两条带，它们带电性质和分子量均十分相近，以至 Sephadex G—75和DEAE—纤维素柱层析均未能把它分开。虽然从蛋白含量可以推定深色主带为MLC蛋白酶，但浅色带所含微量蛋白是什么成份仍有待研究。

2.3 MLC蛋白酶与木瓜蛋白酶的耐盐性及水解鱼肉蛋白的活性比较

耐盐性比较实验结果如图13所示，在盐浓度为2%时，木瓜蛋白酶活力损失近半，而MLC蛋白酶仍有95%以上活力。当盐浓度达10%时，MLC蛋白酶还有42%活力，而木瓜蛋白酶活力已绝大部份被抑制。

从图14中可见，相同活力单位（以酪素为底物）的两种酶，在各自最适pH和温度下水解等量的鱼肉蛋白。MLC蛋白酶的水解效力明显比木瓜蛋白酶高，并在反应开始后较长一段时间内维持较高水解活力。已知木瓜蛋白酶是一种非特异性酶，能切断多种不同侧链组成的肽键。在工业上应用于啤酒澄清及各种肉类的嫩化，效果显著。故推测MLC蛋白酶作用的特异性也不会太高，更适于含盐份较多的蛋白质水解作用。

长腕和尚蟹现仅在中国北部湾沿海一带发现，其繁殖力极强。MLC蛋白酶具有耐热、耐盐，在偏碱条件具有极高活力，在一定盐浓度下可长期保存等优点，而且对海产

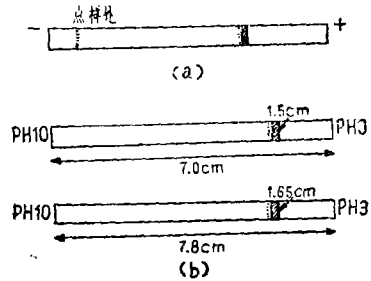


图12 MLC蛋白酶的纯度电泳鉴定(a)及等电点聚焦图谱(b)
Fig. 12 PAGE of purified MLC protease (a), Isoelectric focusing of MLC protease on Ampholing(pH3-10)-Acrylamide gels (b)

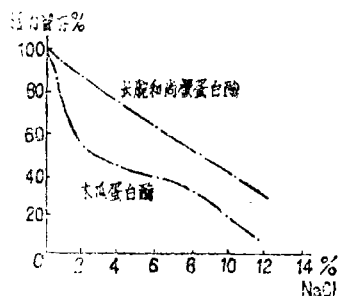


图13 MLC蛋白酶与木瓜蛋白酶耐盐能力的比较

Fig. 13 Comparison the degradation of fish-protein by MLC protease and papain at optimum pH and temperature respectively

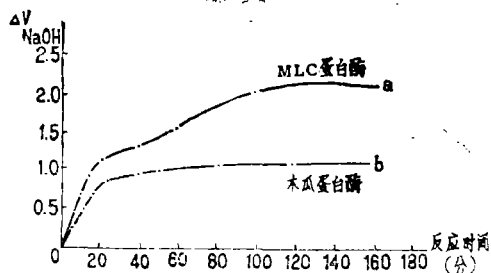


图14 MLC蛋白酶与木瓜蛋白酶水解鱼肉活力比较

Fig. 14 Comparison the activity of MLC protease and papain in different NaCl concentration

鱼类加工所得产品风味甚佳, 宜于老人及幼儿食用。因此, MLC蛋白酶在鱼肉蛋白类食品的加工及保健医疗上的应用是很有前途的, 是一项有价值的可供开发的海洋生物资源^[11,12]。

参 考 文 献

- [1] 张树政主编, 酶制剂工业, 科学出版社, 1983, 387~447
- [2] Douglas E E, *Scientific America*, 11 (1981), 72
- [3] Bradford M M, *Analytical Biochemistry*, 72 (1976), 248~254
- [4] Folin O et al., *J. Biol. Chem.*, 73 (1927), 627
- [5] 中山大学生物系生化微生物教研室编, 生化技术导论, 人民教育出版社, 1979, 53~54
- [6] Layne E, *Methods in Enzymology*, 1957, 3, 450
- [7] Sorensen S P L, *Biochem. Z.*, 7 (1907), 45
- [8] 张龙翔主编, 生化实验方法和技术, 高等教育出版社, 1981, pp. 111~117
- [9] Weber K et al., *J. Biol. Chem.*, 244 (1969), 4406
- [10] 吉尔鲍特 G G 著, 酶法分析手册(中译本), 上海科技出版社, 1983, 136~153
- [11] 横山定治, *化学与生物*, 14 (1976), 2, 92
- [12] 湘泽孝亮, *食品开发*, 5(1970), 3, 16

Purification and Characterization of a Salt-tolerant Proteolytic Enzyme from a Marine Crab,

Mictyris longicarpus latreille

Su Baxian Ye Qingli Wang Min

Abstract

A salt-tolerant proteolytic enzyme has been isolated from *Mictyris longicarpus latreille* (shortly call MLC protease) by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and extraction, gel filtration on Sephadex G-75 and DEAE-cellulose ion-exchange chromatography. As determined by SDS-PAGE, the molecular weight of the enzyme was about 60000-63000 and it contained a major band with an apparent pI of about 4.5 on IEF. The optimal pH and temperature was 8 and 65°C, respectively. MLC protease was inhibited by Ag^+ , Cu^{2+} , Hg^+ and activated by Mg^{2+} , mercaptoethanol, or cysteine, and when it acts on the substrate, casein, the K_m of this enzyme was $4.7 \times 10^{-5} \text{M}$. Compared with papain, the activity of hydrolysis of some marine fish indicated that MLC protease not only appears higher activity, but also stable in concentrated solution of NaCl.

Keywords *Mictyris longicarpus latreille*, salt-tolerant protease, purification