

## 果实菠萝蛋白酶的动力学研究

赵武玲<sup>①</sup> 吴玮 李藏铭

(中国农业大学生物学院)

王秀蛟

(江苏无锡轻工业研究所)

**摘要** 用 Sephadex G50 凝胶过滤纯化果实菠萝蛋白酶在 SDS-聚丙烯酰胺电泳上表现为一条带。在以酪蛋白为底物, pH7.2~35℃ 条件下, 果实菠萝蛋白酶的  $K_M$  值为 0.7,  $V_{max}$  为  $134.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。果实菠萝蛋白酶的最适温度为 55~65℃ (以酪蛋白为底物, pH7.2), 最适 pH 为 7~9 (以酪蛋白为底物, 35℃), 活化能  $\Delta G$  为  $111.67 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

**关键词** 酶动力学; 热稳定性

**分类号** Q556.3

## Kinetic Study of Fruit Bromelain

Zhao Wuling Wu Wei Li Cangming

(College of Biological Science, CAU)

Wang Xiujiao

(Wuxi Light Industry Institute)

**Abstract** Fruit bromelain purified by Sephadex G50 gel filtration shows a single band on SDS-PAGE. The enzyme has a  $K_M$  of  $0.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $V_{max}$  of  $134.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ . The optimum temperature of this enzyme is 55~65℃ with casein as substrate at pH7.2, and optimum pH is 7~9 with casein as substrate at 35℃. The active energy  $\Delta G$  of fruit bromelain is  $111.67 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

**Key words** kinetic; thermostability

菠萝蛋白酶是一种巯基蛋白酶, 包括果实菠萝蛋白酶和茎菠萝蛋白酶。由于菠萝蛋白酶在食品和医药工业有广泛的应用而得到大量研究。如: 系统分离果实和茎菠萝蛋白酶<sup>[1]</sup>, 用圆二色法分析茎菠萝蛋白酶的结构及热变性过程<sup>[2,3]</sup>, 分析果实菠萝蛋白酶分子构象与活力变化的关系<sup>[4]</sup>。但目前对果实菠萝蛋白酶的最适温度、最适 pH 以及酶的热稳定性尚缺乏进一步的了解。本试验就以上几个问题进行了探讨: 菠萝蛋白酶的最适温度、最适 pH 以及酶的热稳定性。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

实验采用的果实菠萝蛋白酶为广西南宁罐头食品厂生产的粗制品, 牛血清白蛋白、酪蛋白及标准蛋白购自华美生物工程公司, Sephadex G50 为 Pharmacia 公司产品, 其他试剂均为分析纯。

#### 1.2 方法

果实菠萝蛋白酶的纯化及活性测定参照 Ota<sup>[1]</sup>。蛋白质浓度的测定参照 Bradford<sup>[5]</sup>。SDS-

收稿日期: 1997-03-18

①赵武玲, 北京市圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区), 100094

聚丙烯酰胺凝胶电泳参照 Laemmli<sup>[6]</sup>, 标准蛋白包括磷酸化酶 B, 分子量 94 kD; 牛血清白蛋白 67 kD; 肌动蛋白 43 kD; 碳酸酐酶 30 kD; TMV 外壳蛋白 17.5 kD。果实菠萝蛋白酶动力学性质的测定参照张其玖<sup>[7]</sup>。果实菠萝蛋白酶热稳定性的测定参照 Smith<sup>[8]</sup>。

## 2 结果

果实菠萝蛋白酶的粗制品经 Sephadex G50 凝胶过滤纯化, 纯化后的酶在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的胶上呈一条带(图 1), 分子量相当于 28.8 kD。

测定酶在不同浓度的酪蛋白为底物时的活性(pH7.2, 35℃), 用非线性回归程序 ENIFIT-TER Data Analysis Program 分析所得的数值, 求得  $K_M$  值为  $0.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $V_{max}$  为  $134.2 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图 1)。

在以酪蛋白为底物, 35℃条件下, 在 pH4.5~8.5 范围内, 酶活性随 pH 的增加而增加, 最大酶活力在 pH7~8 之间。当 pH>8.5 时, 酶活性随 pH 的增加而降低, 可知果实菠萝蛋白酶的最适 pH 为 7.5~8.5。

以酪蛋白为底物, 在 pH7.2 条件下, 分别将酶在 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80℃保温 10 min, 然后立即测定酶活性。以酶活性对温度作图, 发现在温度从 30~60℃范围内, 酶活力随温度的升高而增加, 超过 60℃后, 酶活力随温度的升高而降低。表明果实菠萝蛋白酶的最适温度应在 55~65℃。

以酪蛋白为底物, 在 pH7.2 条件下, 将酶在 46, 51, 62, 70℃保温, 分别在 0, 2, 5, 10, 20, 30, 50, 60, 70, 80 min 时抽取一定量的酶液, 立即测定酶活性。可见酶活性的消失遵循一级反应。以酶活性百分数的对数对保温时间作图(图 2), 求得反应速度常数  $k$ 。再由不同的  $k$  值求得酶在不同温度( $T$ )的半寿期(表 1), 用 Arrhenius 方程分析所得的数据, 以  $\ln k$  对  $1/T$  做图(图 3), 求得酶反应的活化能  $\Delta G$  为  $111.67 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

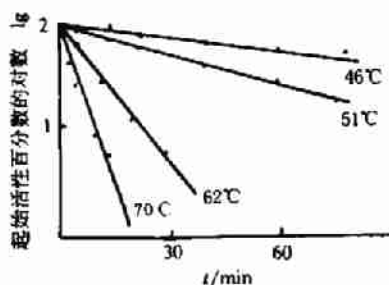


图 2 果实菠萝蛋白酶的热变性

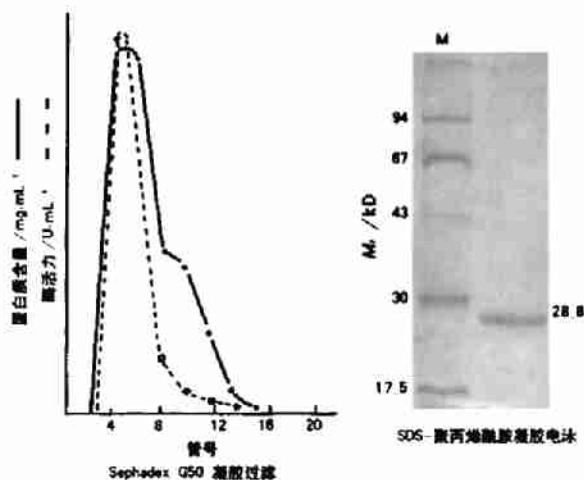


图 1 果实菠萝蛋白酶的纯化

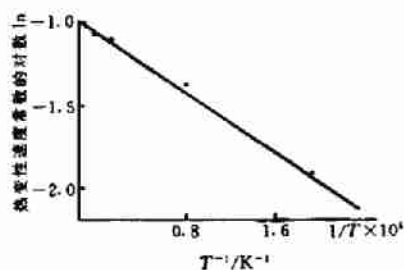


图 3 Arrhenius 做图

### 3 讨论

了解果实菠萝蛋白酶的催化机制不仅对科学研究很重要,也为该酶的商业开发提供了依据。在蛋白酶的动力学研究中,大多数采用人工合成的底物,如: CBZ-Lys. pNP<sup>[4]</sup>,但酪蛋白也可以作为天然底物进行蛋白酶动力学的研究<sup>[2]</sup>。本研究采用酪蛋白为底物,以便于将所得的数据为果实菠萝蛋白酶的实际应用提供参考。

用凝胶过滤法纯化果实菠萝蛋白酶的粗制品,在酶的洗脱峰上有一个肩,可能是酶的自身水解所致。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,纯化的酶在胶上为一条带,说明所分离的酶达到了电泳纯。

虽然果实菠萝蛋白酶的最适温度为 55~65 °C,但在这个温度范围内,酶却具有较短的半寿期。因此,在动力学的研究中采用 35 °C, pH7.2 的反应条件。

表 1 果实菠萝蛋白酶在不同温度下的热变性速度常数及半寿期

反应 $\theta/^\circ\text{C}$	热变性速度常数 $\text{min}^{-1}$	半寿期 $t/\text{min}$
46	$5.0 \times 10^{-3}$	138.6
51	$9.6 \times 10^{-3}$	72.2
62	$4.0 \times 10^{-2}$	17.3
70	$8.6 \times 10^{-2}$	8.1

### 参 考 文 献

- Ota S, Muta E, Katahira Y, et al. Reinvestigation of fractionation and some properties of the proteolytically active component of stem and fruit bromelains. *J Biochem*, 1985,98:219~228
- Arroyo-Reyna A, Hemandel-Arana A. Arreguin-Espinesa Circular dichroism of stem bromelain: a third spectral class within the family of cysteine proteinase. *Biochem J*, 1994,300:107~110
- Arroyo-Reyna A, Hemandel-Arana A. The thermal denaturation of stem bromelain is consistent with an irreversible two-state model. *Biochem Biophys Acta*, 1995,1248:123~128
- 陈清西, 颜思旭. 果菠萝蛋白酶分子结构与活力变化的研究. *生物化学杂志*, 1991,7:301~306
- Bradford R M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976A,72:248~254
- Laemmli U K. Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970,227:680~685