

豆豉纤溶酶的酶动力性质研究

崔堂兵¹, 韩双艳¹, 舒 薇², 郭 勇¹

(1. 华南理工大学 生物科学与工程学院, 广东 广州 510640 2. 华南农业大学 测试中心, 广东 广州 510640)

摘要: 对豆豉纤溶酶 (DFE) 的催化动力学性质进行了研究, 结果表明: 酶的相对分子量为 41 970 是一种新的豆豉纤溶酶; 酶最适用 pH 为 7.0 酶活力在 pH7~8 范围内最稳定, 在 pH8~10 范围内相对稳定, 在 pH4 以下降为 0 最适作用温度为 41℃, 在 37~45℃ 范围内, 酶活性均较高, 在 15℃ 时酶的保存稳定性最好; Hg^{2+} 大大降低了酶活性, Fe^{3+} 和 Li^+ 则能显著提高酶活性; 以酪蛋白为底物时, 纤溶酶催化的反应受到底物的抑制.

关键词: 豆豉纤溶酶; 酶动力学; 研究

中图分类号: TQ920.1

文献标识码: A

文章编号: 1007-7162(2006)03-0026-05

从传统大豆发酵食品中分离提取纤溶酶, 是近年来溶血栓药物研究的新方向之一. 1987 年, 日本的须见洋行等人首先从日本纳豆食品中分离到一种具有强烈纤溶活性的酶, 即纳豆激酶 (Nattokinase), 此后在日本得到广泛深入的研究, 证明其具有优越的溶解血栓功能, 并已制成药品上市^[1]. 受到对纳豆激酶研究的启发, 我国研究人员开始把目光投向中国的传统大豆发酵食品, 经研究发现, 在豆豉、酱油等传统大豆发酵食品和调味品中, 同样也可以分离出高纤溶活性的酶, 其中分离自豆豉的纤溶酶活性更高, 命名为豆豉纤溶酶. 该酶不仅血栓溶解能力强, 而且无毒副作用^[2], 不引起内出血, 在体内半衰期长^[3]. 豆豉纤溶酶是从传统食品中发现的新型纤溶酶, 无论作为抗血栓药物还是预防血栓栓塞疾病的保健食品, 都具有十分重要的开发价值, 因此, 开发豆豉纤溶酶制剂具有极为广阔的前景.

本实验室亦从广东阳江豆豉中分离到一株可分泌高纤溶活性蛋白酶的芽孢杆菌菌株 WMI 1, 通过菌株的发酵和酶的分离纯化, 获得了电泳纯的豆豉纤溶酶. 本文对该酶 (DFE) 的酶学特性进行研究, 从而为进一步阐明该酶的纤溶机制和应用提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料

1) 供试材料: 豆豉纤溶酶, 从豆豉中分离的芽孢杆菌菌株 WM II 发酵液中提取分离纯化而得到, 相对分子质量约为 41 970

2) 主要试剂: 尿激酶, 凝血酶, 牛血纤维蛋白原均购自中国药品生物制品检定所. 牛血清白蛋白和酪蛋白购自上海伯奥生物科技有限公司. 其他试剂均为分析纯.

1.2 方法

1.2.1 纤溶酶活性测定

收稿日期: 2005-12-14

作者简介: 崔堂兵 (1968-), 男, 讲师, 主要研究方向为发酵工程和酶工程.

1) 琼脂 - 纤维蛋白平板的制备

综合有关 NK 活性测定的 Austrup 方法^[4]和中华人民共和国药典(二部)^[5]有关尿激酶的测定方法,并加以改良。

牛纤维蛋白原溶液: 取牛纤维蛋白原, 溶于巴比妥钠缓冲液 (pH 7. 8) 中, 制成 6. 67 mg/mL 可凝蛋白溶液;

牛凝血酶溶液: 取牛凝血酶, 溶于巴比妥钠缓冲液 (pH 7. 8) 中, 制成 6 BP/mL 溶液;

在 50 mL 巴比妥钠缓冲液 (pH 7. 8) 中加入 1% 琼脂, 融化灭菌后置 50 °C 水浴中, 加入 5 mL 牛凝血酶溶液, 再加入 10 mL 牛纤维蛋白原溶液, 迅速混匀倒平板。

测定时, 取 10 μ L 样品于平板上, 置于 37 °C 恒温培养 18 h 测量其溶栓圈垂直直径。在同样的平板上点 10 μ L 1 667 $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的激酶作对照, 计算出样品酶活。

2) 纤溶酶活性的测定

将尿激酶标准品溶于 pH 7. 8 巴比妥钠缓冲液中, 配制成 166. 7 $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、333. 4 $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、500. 0 $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、666. 8 $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、833. 5 $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1 000. 2 $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1 166. 9 $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1 333. 6 $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1 500. 3 $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1 667. 0 $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, 分别取 10 μ L 样品点于平板上, 置于 37 °C 恒温培养 18 h 测量其溶栓圈直径。以溶栓圈垂直直径乘积 (cm^2) 为横坐标, 尿激酶浓度 ($\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为纵坐标, 作出尿激酶标准曲线。测定时, 取 10 μ L 样品点于平板上, 置于 37 °C 恒温培养 18 h 测量其溶栓圈垂直直径。在同样平板上点 10 μ L 1 667 $\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的尿激酶作对照, 计算出样品酶活。

1. 2. 2 豆豉纤溶酶分子量的测定

采用 SDS- PAGE 电泳法^[6]。

2 结果与讨论

2. 1 豆豉纤溶酶的分子量

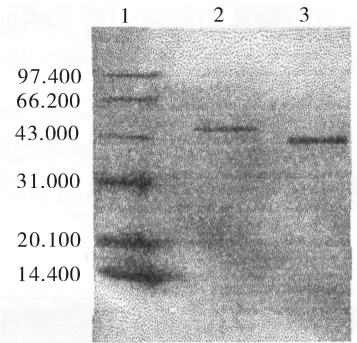
由于在进行 Sephadex G - 100 凝胶层析分离纯化纤溶酶发酵液时, 分别收集到两个纤溶酶活性峰, 这也说明有两种不同分子量的纤溶酶存在。

根据 SDS- PAGE 电泳图谱测定纤溶酶的分子量 (电泳图谱见图 1)。纤溶酶 1 的电泳距离约为 33. 5 mm, 纤溶酶 2 的电泳距离约为 38. 0 mm, 其相对分子质量分别为 52 783 和 41 970 其中相对分子质量为 41 970 的纤溶酶 2 是一种新发现的酶, 在文献中未发现有相近分子量的豆豉纤溶酶。以下就是对纤溶酶 2 其他性质研究的结果。

2. 2 pH 对豆豉纤溶酶活性的影响

2. 2. 1 豆豉纤溶酶的最适反应 pH

配制一系列 pH 为 5. 0~9. 0 测定不同 pH 下豆豉纤溶酶活性, 结果如图 2 当 pH 为 7. 0 时, 反应酶活力最高, pH 升高或降低都会引起酶活力的降低, 其中酶在酸性环境下酶活力降低很快, 在 pH 为 5. 0 时酶活力下降为 0。



1 低分子标准蛋白
2 纤溶酶 3 纤溶酶 2

图 1 纤溶酶 SDS- PAGE 电泳图谱

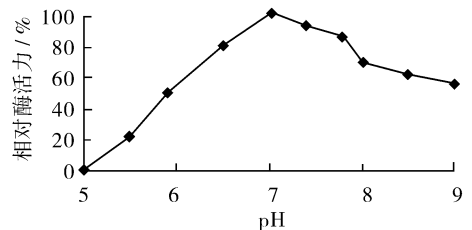


图 2 pH 对豆豉纤溶酶活力的影响

2.2.2 pH 稳定性

pH 除了能影响酶的动力学参数,即酶的反应速率,还会影响酶的稳定性.这是因为 pH 可以改变酶的构象,过酸或过碱都会使酶活力丧失^[7].酶的最适 pH 与酶活最稳定 pH 不一定是相符的.对于蛋白酶类,在最适 pH 下,有可能因为其自降解现象而失活.

将酶保存在不同 pH 值的缓冲液中,37℃放置 24 h,测定其纤溶酶活性,结果如图 3

结果表明,酶活性在 pH 7~8 范围内比较稳定,以 pH 7.8 时残存酶活力最高; pH 小于 6 酶活力迅速下降,在 pH 4 以下酶活力为 0.酶在碱性条件下 (pH 8~10) 相对较稳定.

2.3 温度对豆豉纤溶酶活性的影响

2.3.1 豆豉纤溶酶的最适反应温度

将豆豉纤溶酶在不同温度下测定酶活性,结果如图 4

从图 4 可见,纤溶酶活力随温度升高,呈钟形曲线变化.在 37~45℃ 范围内,纤溶酶活性最大.据图中推断,在 41℃ 左右酶活性可达到最大值,故 41℃ 应是纤溶酶反应的最适温度.当温度低于 37℃ 或高于 45℃,纤溶酶活性迅速下降,在 65℃ 时,纤溶酶活性为 0.

2.3.2 温度稳定性相对酶活力

了解酶的温度稳定性关系到酶的保存,尤其是纤溶酶在进入人体后,在人体温度 37℃ 左右的温度稳定性还关系到酶的实际作用,因此,将酶用 pH 7.8 的缓冲液配成纤酶溶液,在不同温度下放置一定时间,测定酶活力,结果见图 5

从图 5 可看出,在 15℃ 下酶的稳定性很好,3 h 内酶活性基本没有损失;在 25℃ 和 37℃ 时酶的稳定性也较好,3 h 内相对酶活力仍达到 96.4% 和 91.2%;45℃ 以上,酶稳定性明显下降,55℃ 时酶活力在 1 h 内全部丧失,65℃ 以上在 30 min 内已无纤溶酶活性.

将酶液在不同温度下放置 24 h,测定残余酶活力,结果见图 6

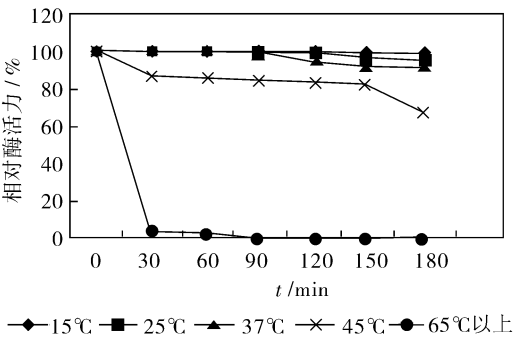


图 5 豆豉纤溶酶在不同温度下的稳定性

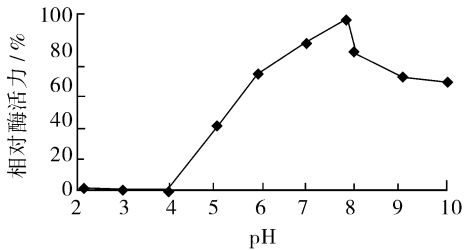


图 3 豆豉纤溶酶在不同 pH 时的稳定性

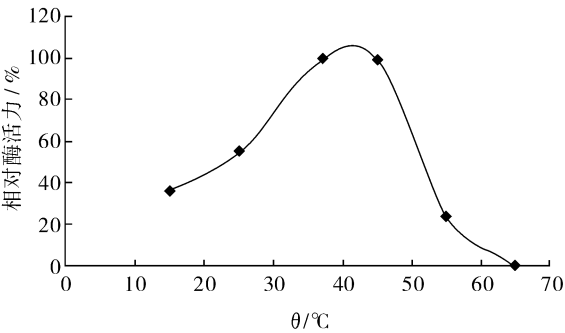


图 4 温度对豆豉纤溶酶活力的影响

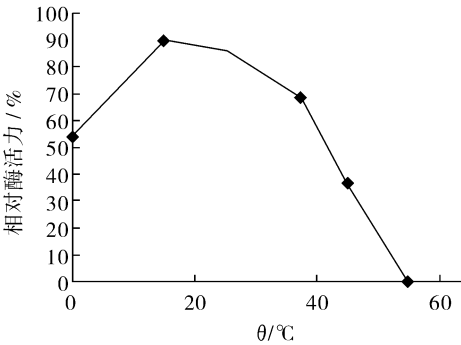


图 6 24 h 内豆豉纤溶酶在不同温度下的稳定性

从图 6 可见, 豆豉纤溶酶溶液在 15℃ 下保存的稳定性最好, 24 h 后残余酶活力仍有 90%; 37℃ 下 24 h 酶液残余酶活力为 68.7%; 而在 0℃ 下, 酶液放置 24 h 后酶活力下降至 53.8%, 这可能是因为酶液结冰时破坏了酶的构型, 从而使酶活力下降, 因此豆豉纤溶酶的溶液不适合反复冻融。

2.4 金属离子对豆豉纤溶酶活性的影响

为检测金属离子对酶稳定性的影响, 向酶溶液中分别加入不同的氯化金属盐, 使金属离子最终浓度为 1 mol/mL, 在 37℃ 放置 24 h, 测定残余酶活力, 并与不加金属离子的空白对照相比较, 结果如表 1 所示。

Hg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶活性都有不同程度的抑制作用, 尤其是 Hg^{2+} 的加入, 会引起蛋白质的变性失活, 从而使纤溶酶活性大大下降; Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 K^{+} 、 Na^{+} 对酶活性影响不大, 是较好的酶活性稳定剂; Fe^{3+} 和 Li^{+} 对酶有非常显著的激活作用。

2.5 以酪蛋白为底物的酶学特性研究

纤溶酶活性的测定方法——琼脂-纤维蛋白平板法在检测中存在一些缺点, 如平板的制作、点样技术以及溶栓圈直径的测量都会使结果出现误差, 该法无法检测反应产物的生成, 因而不能测定反应曲线及研究其反应动力学。

考虑到纤溶酶实际上也是一种蛋白酶, 于是按照蛋白酶测定方法的 Folin 酚法, 以酪蛋白为底物进行研究。

2.5.1 两种酶活测定方法的相关性

配制不同浓度的酶液, 用两种方法测得的酶活性作图如图 7。由此可得其相关方程: $y(\text{Folin 酚法}) = 1.8534x + 0.0433$ (琼脂-纤维蛋白平板法), $r = 0.9874$ 。由此可见, Folin 酚法与琼脂-纤维蛋白平板法有一定的相关性。

2.5.2 反应过程曲线

以酪蛋白为底物, 在不同反应时间测定所生成的酪氨酸的量, 结果如图 8。

在酶反应前期, 即 0~30 min 内, 酪氨酸生成量随着反应时间的延长而呈上升趋势; 30 min 以后, 随着时间的增长, 酪氨酸生成的量大大减少, 直至不再增加。

2.5.3 底物浓度对酶反应速率的影响

配制 2 mg/mL、4 mg/mL、6 mg/mL、8 mg/mL、10 mg/mL、12 mg/mL、14 mg/mL、16 mg/mL、18 mg/mL、20 mg/mL、24 mg/mL、28 mg/mL、32 mg/mL、36 mg/mL、40 mg/mL 一系列底物质量浓度溶液, 测定不同底物浓度下的反应速率。结果见图 9。

图 9 的结果显示, 当底物浓度很小 ($< 18 \text{ mg/mL}$) 时, 反应速率 v 近似地与底物浓度 $[S]$ 成

表 1 金属离子对豆豉纤溶酶活性的影响

金属离子	相对酶活力 / %
对照	100
Hg^{2+}	41.0
Ca^{2+}	85.7
Mg^{2+}	103.1
Cu^{2+}	79.9
Mn^{2+}	106.4
Fe^{3+}	113.1
Ni^{2+}	101.8
Na^{+}	95.8
K^{+}	99.9
Li^{+}	120.2

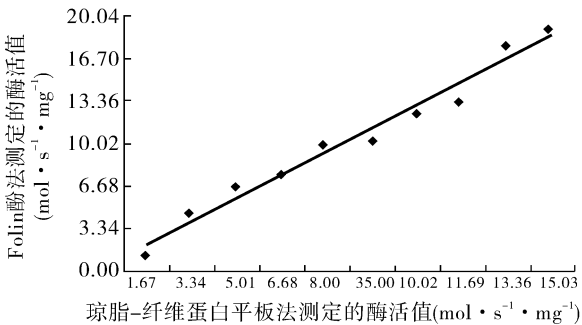


图 7 Folin 酚法与琼脂-纤维蛋白平板法测定酶活值的相关性

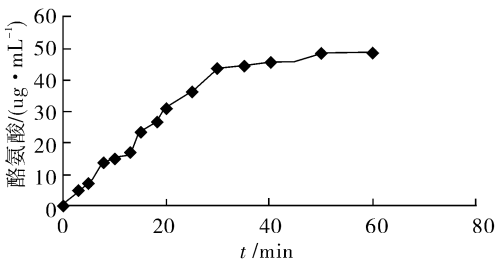


图 8 豆豉纤溶酶的反应过程曲线

正比, 但底物浓度大于 18mg/mL 后, 反应速率随着底物浓度 $[S]$ 的增大而减小。

3 小结

1) 豆豉纤溶酶的最适反应 pH 为 7.0, 酶活力在 $\text{pH} 7 \sim 8$ 范围内最稳定, $\text{pH} 4$ 以下酶活力为 0, $\text{pH} 8 \sim 10$ 范围内相对稳定。

2) 酶的最适作用温度为 41°C , 在 $37 \sim 45^\circ\text{C}$ 范围内, 纤溶活性均较强, 在 15°C 下酶的稳定性很好。

3) Hg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶活性都有不同程度的抑制作用, 尤其是 Hg^{2+} 的加入, 会引起蛋白质的变性失活, 从而使纤溶酶活性大大下降; Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 对酶活性影响不大, 是较好的酶活稳定剂, Fe^{3+} 和 Li^+ 对酶有非常显著的激活作用。

4) 当底物质量浓度很低 ($< 18\text{mg/mL}$) 的时候, 反应速率 v 近似地与底物浓度 $[S]$ 成正比; 但底物质量浓度大于 18mg/mL 后, 反应速率随着底物浓度 $[S]$ 的增大而减小, 纤溶酶催化的反应受到底物的抑制。

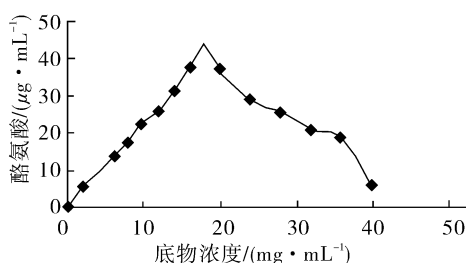


图 9 底物浓度对豆豉纤溶酶反应速率的影响

参考文献

- [1] 陈启和, 何国庆. 纳豆激酶的研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(12): 55-58
- [2] 李江伟, 冉国侠. 豆豉纤溶酶的分离纯化及体外溶栓作用 [J]. 中国生物药物杂志, 1999, 20(3): 148-150
- [3] 王金英, 刘宇峰. 豆豉抗栓作用的研究 [J]. 生物技术, 1997, 7(5): 18-20
- [4] 向梅, 杨金树, 吴思方. 豆豉纤溶酶的研究进展 [J]. 武汉工业学院学报, 2002(4): 23-26
- [5] 王金英, 刘宇峰. 豆豉抗栓作用的研究 [J]. 生物技术, 1997, 7(5): 18-20
- [6] 白震, 徐梅, 韩斯琴. 纳豆激酶分离纯化及性质研究 [J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(6): 667-673
- [7] 郭勇. 酶工程 (第 2 版) [M]. 北京: 科学出版社, 2004

Study on Catalysis Kinetics of Douchi Fibrinolytic Enzyme

CUI Tang-bing¹, HAN Shuang-yan¹, SHU Wei², GUO Yong¹

(1 School of Bioscience and Bioengineering South China University of Technology, Guangzhou 510640 China)

(2 Instrumental Analysis and Research Center South China Agricultural University, Guangzhou 510640 China)

Abstract Catalysis kinetics characterization of douchi fibrinolytic enzyme (DFE) is studied. The results show that the relative molecular weight is 41 970, the optimal reaction pH is $\text{pH} 7.0$. DFE's activity is the stablest at the pH range of $7 \sim 8$, relatively stable at the pH range of $8 \sim 10$. 0 under the $\text{pH} 4$, the optimal reaction temperature is 41°C , enzyme activity is higher at the temperature range of $37 \sim 45^\circ\text{C}$; the stability of conservation is best at 15°C ; Hg^{2+} could remarkably inhibit DFE's activity, Fe^{3+} and Li^+ could enhance it. When casein is used as a substrate, the reaction catalyzed by DFE is inhibited by the substrate.

Key words douchi fibrinolytic enzyme; catalysis kinetics; study