

丝兰酶及其提取工艺的研究*

Proteinases of *Yucca* and Their Extraction

叶启腾 陈强 李春香

Ye Qiteng Chen Qiang Li Chunxiang

(广西亚热带作物研究所 南宁市邕武路 530001)

(Guangxi Institute of Subtropical Crop, Yongwu Road, Nanning, Guangxi, 530001)

摘要 直接干燥丝兰叶表栅状组织获得粗酶。用硫酸铵分级盐析取得酶制剂, 它的最适 pH 值为 12。用有机汞作配基的琼脂糖凝胶 4B 柱分离出酶, 聚丙烯酰胺凝胶电泳证明柱分离物为两个蛋白酶组分 (Yuccain I、Yuccain II), 薄层等电聚焦电泳证实这两个组分等电点分别为 pH 值 9.77 和 pH 值 9.61, SDS 电泳两个酶仅看到 1 条染色带, 测得分子量为 3 万。它们的活性均依赖于巯基。

关键词 丝兰酶 蛋白酶 分离 纯化 性质

Abstract The crude enzyme was prepared by dehydration from palisade tissue. The enzyme preparation with an optimal pH of 12 was salted out with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Two fractions obtained by chromatography on sepharose 4B column with organic mercury dentate were Yuccains I, II (proteinases) using electrophoresis in thin polyacrylamide gel. Yuccains I, II just showed one strip in SDS-PAGE, and their molecular weights were 30000 and isoelectric points were pH values of 9.77 and 9.61 respectively. Their activities were subject to the SH-.

Key words Yuccain, proteinase, extraction, purification, property

百合科丝兰属 (*Yucca* L.) 植物常用作纤维制绳和造纸^[1,2]。我们在该属植物叶中测出了高活性蛋白酶 (Yuccain), 为了探索该酶的应用价值, 我们对其性质和提取工艺作了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

活化的琼脂糖凝胶 (CN-Br-activated sepharose 4B) 产自 Pharmacia Fine Chemicals, SDS 及丙烯酰胺为 Fluka 进口分装, 碘乙酸, 5, 5'-二硫双 (2-硝基苯甲酸) (DTNB) 为 SIGMA 产, 对氨基苯基汞醋酸盐取自复旦大学生化系, 其余试剂均是分析纯品。

1.2 蛋白水解酶活性测定

1.2.1 酪蛋白法^[3] 在 37℃ 以每分钟内水解酪蛋白释放出相当 1 μg 酪氨酸于 275 nm 的吸收值为 1 个酶活性单位。

1.2.2 DHT 酪蛋白法^[3] 在 40℃ 以每分钟内水解 DHT 酪蛋白释放出相当于 1 mg DHT 肽在 540 nm 的吸收值为 1 个酶活性单位。

1.3 丝兰酶的提取制备

1.3.1 直接法 采下丝兰健康叶, 洗净凉干, 刮取栅状组织, 鼓风烘干 (55℃) 至含水量 7% 左右, 粉碎包装即粗酶。

1.3.2 盐析法 丝兰新鲜叶、刮皮、压取皮汁、加入 1 倍量的蒸馏水, 置 10 min, 905 g 离心收集沉淀, 清液补足硫酸铵至 50% 饱和度, 离心收集沉淀, 抽真空冻干成酶制剂。

1.4 丝兰酶的分离纯化

基本参照 Lynn^[4] 提出的方法, 将活化的琼脂糖凝胶 4B 与对氨基苯基汞醋酸盐 (mp 165℃) 作用, 接上带有汞基的亲基团, 制成有机汞-琼脂糖凝胶 4B。将这种亲和载体装入 1 cm × 12 cm 柱, 用 20% 二甲亚砜充分洗去游离汞化物备用。分离时, 将酶制剂 100 mg (5670 单位) 溶于 10 mL pH=5 醋酸缓冲液 [含正丁醇 0.5%, KCl 0.1 mol/L, 乙二胺四乙酸

1995-05-21 收稿。

* 国家自然科学基金资助项目。

(EDTA) 1.0 mmol/L], 上样后用同一缓冲液系统洗去杂蛋白, 用含 0.5 mmol/L HgCl₂ 的同一缓冲液(无 EDTA) 洗下蛋白酶, 每收集管为 2 mL, 合并有蛋白水解活性的收集液, 浓缩后做进一步鉴定。最后用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH=7) 洗净柱子做下一个循环。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳的分析及分离

采用 Reisfield 法^[5], 分离胶 pH=4.3, 浓缩胶 pH=6.8, 胶浓度 7.5% 或 15%, 槽液 β-丙氨酸/醋酸, 缓冲液 pH 4.3。采用花篮式圆盘电泳器, 每管 6 mA, 于 4℃ 电泳分析, 电泳时间 1.2 h。电泳胶用考马斯亮兰 R250 染色, 做对照。电泳分离采用 14 cm × 11 cm 板电泳器, 电泳条件同上法。电泳结束即将胶板浸入 1% 丹宁液 (用 0.1 mol/L pH=5.6 醋酸缓冲液配)。当胶表面出现白色时 (约 6 min) 立即将胶取出令胶内部不至渗入丹宁。切下蛋白带, 用冰冷的 0.1 mol/L, pH=5.6 醋酸缓冲液抽提 3 次, 合并提液, 用含 2 mmol/L EDTA 及 5 mmol/L Na₂SO₄ 液于 4℃ 透析, 以聚乙二醇浓缩后重复电泳, 并以巯基试剂检验。

1.6 聚焦电泳测定酶等电点

采用 L. K. B 的 pH=3.5~10 的 Ampholine 系统, 将丙烯酰胺配成 29.1% 溶液, 取 3.5 mL, 甲叉双丙烯酰胺 0.9% 液取 3.5 mL, 加入 pH=3.5~10 的两性电质载体 Ampholine 1 mL。抽气 15 min。再加入过硫酸铵 0.5 mL 制成 10.3 cm 长 25 cm 宽 0.5 mm 厚胶板, 正极为 1 mol/L H₃PO₄, 负极为 1 mol/L NaOH, 上样。预电泳用 100 V, 30 min

后升压至 800 V, 1 h 后再升至 1000 V, 电泳 1.5 h。当电流降至 4mA 不能再降时停止, 取出胶, 用考马斯亮兰染色。

1.7 SDS 电泳测定酶分子量

采用 T. G. Cooper 的 SDS-PAGE 系统^[7]测定丝兰酶的分子量, 用亲和层析分离得到的蛋白水解活性成分, 经聚乙二醇浓缩后做酶样。凝胶浓度 7.5%, 电泳电压 45 V, 每管初始电流为 3 mA, 20 min 后增加到 8 mA, 电泳时间总计为 2 h。以牛血清白蛋白, 蛋清蛋白, 胰蛋白酶, 细胞色素 C 做标样 (它们的分子量分别为 68 000、43 000、23 300、11 700)。电泳结束后用考马斯亮兰染色。测量电泳带迁移率, 以其迁移率及分子量作半对数图。

2 结果与分析

2.1 丝兰酶分布

对丝兰叶片的栅状组织、海绵组织及新老叶片取汁测定活性。表现情况如表 1、表 2。同时还对同属不同种的植物 *Y. filimantosa* 等的含酶情况做了测定。结果发现 *Y. gloriosa* 活性最高 (表 3), 其量与菠萝相当, 酶主要存于叶表栅状组织。

2.2 两种工艺的酶得率

用直接干燥法和硫酸法提取丝兰酶, 结果见表 4。可见直接干燥法酶活性回收要比硫酸法高 27.8%。

2.3 酶的亲和层析和电泳鉴定

按前述方法层析、层析监测波长为 275 nm, 结果见图 1。所得的两个蛋白组分, 前一个无酶活性, 后

表 1 *Y. gloriosa* 叶不同组织酶活力

Table 1 The proteinase activities in different tissues of *Y. gloriosa* leaves

总重量(克) All weight (g)	部位 Tissue	重量(克) Weight (g)	汁 Juice (mL)	加 CYSH 激活活力 Activity with CYSH (μ/mL)	不加 CYSH 激活活力 Activity without CYSH (μ/mL)	不激活总活力 Total activity without CYSH (u)
1000	绿色栅状组织 Green palisade tissue	321.4	205	19 816	9566	1961 030
	海绵组织 Spongy tissue	678.6	440	293	174	16 824
	芯部/皮部 Palisade/Spongy	0.47	0.46	67.56	54.9	116.5

CYSH: 半胱氨酸 Cysteine

表2 *Y. gloriosa* 不同叶龄的蛋白酶活性
Table 2 The proteinase activity in the leaves of different ages in *Y. gloriosa*

类别 Part	吸光值 O. D	
	加 CYSH 激活 Activated with CYSH	不加 CYSH 激活 Activated without CYSH
老叶 Old leaf	0.035	0.02
未张开白色嫩叶 White young leaf	0.03	0.02
健康叶 Healthy leaf	0.53	0.315
菠萝健康叶 Pineapple heathy leaf (control)	0.51	0.315

CYSH: 半胱氨酸 Cysteine; DHT: 重氮 5-氨基四唑酪蛋白, DHT-Casein.

表3 不同品种的丝兰酶活性

Table 3 The proteinase activity of different varieties of *Yucca*

品种 Variety	活性 (Casein 法) Activity (by Casein) (μ /mL)
<i>Y. filamontosa</i>	<100
金边丝兰 Golden side <i>Yucca</i>	1100~2000
光叶丝兰 Bare leaf <i>Yucca</i>	6000~8000
<i>Y. gloriosa</i>	10 000~19 000

一个有酶活性。收集活性组分, 浓缩后用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离并扫描, 结果见图2。将蛋白带各自测定活性。得知柱层析所得的活性物质含有两个活性组分, 即组分 I 和组分 II。

将柱层析所得活性物质用电泳分离后的胶板以丹宁染色, 收集方法如前述。各取浸出液 0.5 mL 分

表4 两种工艺的酶得率

Table 4 The rates of recovery from two sorts of techniques

工艺 Technique	叶重 Leaf weight (kg)	栅状组织重 Palisade tissue weight (kg)	酶重 Enzyme preparation (kg)	活性 Activity (μ /g)	总活性 Total activity (u)	酶得率 Rate of recovery (%)
直接法 The direct method	30.05	12.6	3.94	15 718	61 928 920	100
硫酸法 Ammonium sulfate method	30	17.4	0.411	108 775	44 706 525	72.2

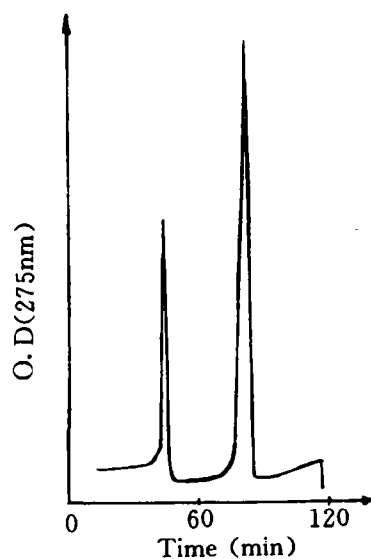


图1 丝兰酶亲和层析分离图

Fig. 1 Elution profile of Yuccain by affinity chromatography

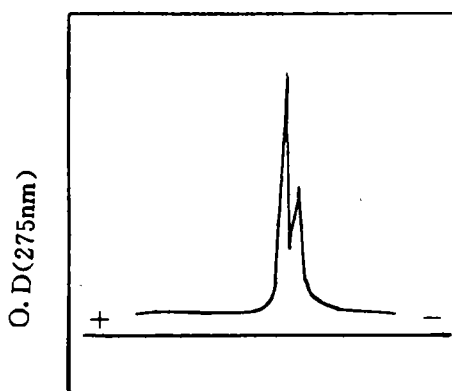


图2 丝兰酶电泳扫描图

Fig. 2 Scanning profile on SDS-PAGE of purified Yuccain

别加进 0.5 mL 2×10^{-5} mol/L 碘乙酸或 $HgCl_2$ 做酶的半胱氨酸激活和不激活测定, 结果见表5。组分 I 和组分 II 活性分别为 89% 和 28%。以碘乙酸抑制的组分 I 和组分 II 无论是否用半胱氨酸激活, 都无法测

出活性。以二氯化汞抑制的组分 I 和组分 II 都可用半胱氨酸基本恢复活性。因为碘乙酸在 pH=7 时是经典的巯基酶不可逆抑制剂。酶被它抑制后活性不可恢复。而被 HgCl₂ 结合的酶为半胱氨酸恢复活性只有一种情况，即酶活性中心为 SH 基^[6]，这一组试验证明组分 I、组分 II 确是巯基酶。以重复电泳证明了组分 I 和组分 II 都是均一的。

为了进一步确定酶的等电点，我们将亲和层析收表 5 抑制剂和激活剂对组分 I 和组分 II 的影响

Table 5 The activities of Yuccains I, II in specific inhibitors

处 理 Treatment		活性 Activities (%)	
		组分 I Yuccain I	组分 II Yuccain II
碘乙酸 Iodoacetic acid	加 SYSH 激活 with CYSH	0	0
	不加 SYSH 激活 without CYSH	0	0
氯化汞 HgCl ₂	加 SYSH 激活 with CYSH	89	28
	不加 SYSH 激活 without CYSH	0	0

CYSH: 半胱氨酸 Cysteine

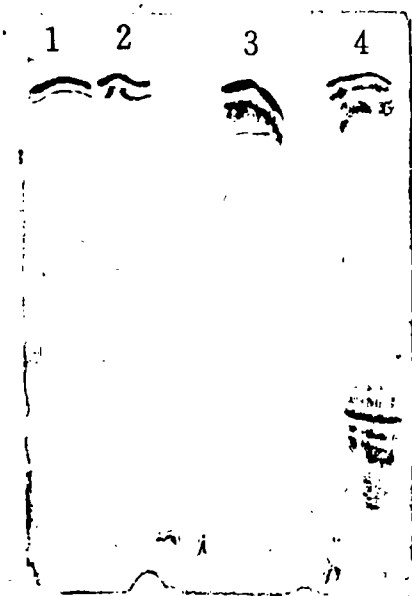


图 3 丝兰酶的聚焦电泳图

Fig. 3 Electrofocusing profile of Yuccain purified by affinity chromatography

1, 2: 亲和层析所得活性成分电泳带 Yuccains I, II; 3: DE₅₂ 层析所得活性成分电泳带 The fraction of enzyme separated by chromatography on DE₅₂; 4: 盐析成分电泳带 The fraction of enzyme salted out.

集的活性峰浓缩后做聚焦电泳鉴定，从图 3 中可见距负极 3 mm 和 6 mm 处各有一条染色带，测算得这两组分的 pH 值分别为 9.77 和 9.61。

SDS 电泳对亲和层析物分析，染色后测得牛血清白蛋白、蛋清蛋白、胰蛋白酶、细胞色素 C 的迁移率分别为 0.3100、0.4495、0.7085、0.8990。而丝兰酶亲和层析样仅出现一条染色带，迁移率为 0.3740，测算得分子量为 3 万（见图 4）。多次重复试验、结果一样。因此认为这两个酶有相同的分子量。

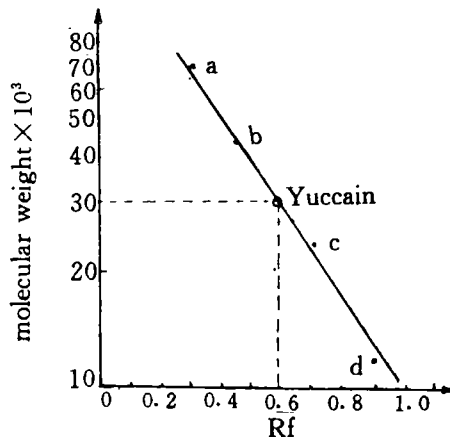


图 4 SDS-PAGE 电泳中各蛋白质的分子量对数与相对迁移率图

Fig. 4 Determination of the molecular weight of Yuccain by SDS-PAGE

a. 牛血清白蛋白 Bovine seroalbumin (68000); b. 蛋清蛋白 O-valbumin (43000); c. 胰蛋白酶 Trypsin (23300); d. 细胞色素 Cytochrome (11700)

2.4 丝兰酶的性质

2.4.1 温度对丝兰酶制剂活力及稳定性的影响

在 pH=7，反应时间 10 min 的条件下，将丝兰酶置于不同温度下测定活性，结果如图 5，它表明丝兰酶最适反应温度在 60℃ 附近，且在 20℃ 以下或 70℃ 以上仍表现出一定活性。

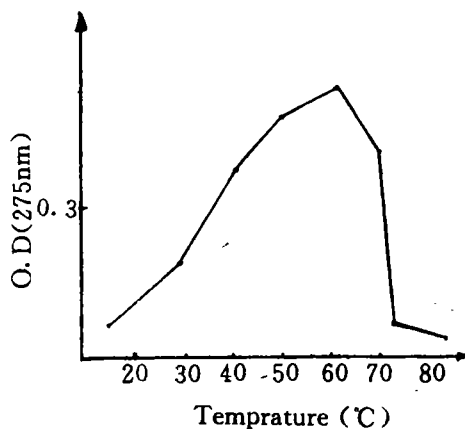


图 5 丝兰酶活性温度曲线

Fig. 5 Temperature curve of Yuccain activity

取 33、40、60℃ 三个温度测定酶在不同放置时间的活性, 结果见图 6。可以看到酶在 33℃ 和 40℃ 时十分稳定、60℃ 时较差、但 60℃ 下放置 1 h, 其活性仍有 30 min 时的 30%。此特性对酶的提取和应用是有利的。

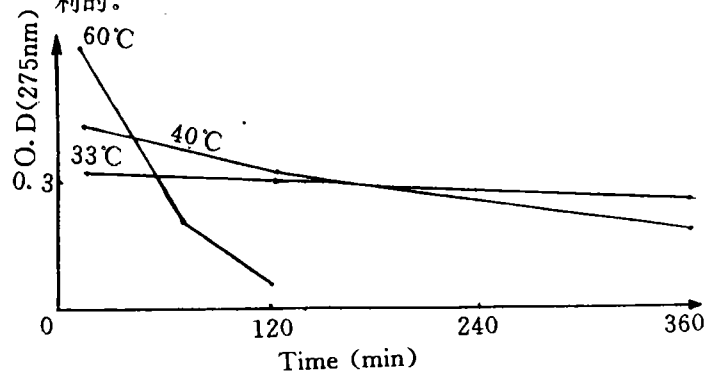


图 6 丝兰酶的温度稳定曲线

Fig. 6 Effect of temperature on stability of Yuccain

2.4.2 丝兰酶的最适 pH

将酪蛋白用不同的缓冲液配制成 pH=5~12.7 的底物系列, 并将酶液用缓冲液调成相应的 pH 值然后进行活性测定。结果见图 7。它表明丝兰酶制剂的最适 pH=12, 适应 pH=7~12。在 pH=6~12 之间, 它对 pH 值变化反应不敏感, 可以认为它是碱性蛋白酶。

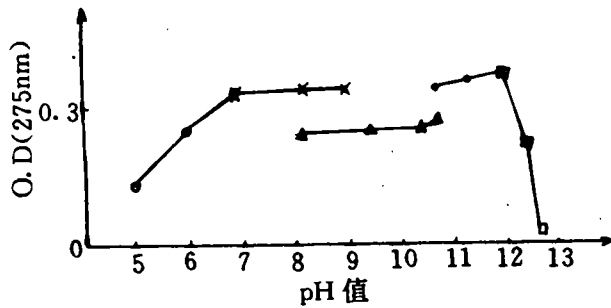


图 7 丝兰酶的 pH-酶活力曲线

Fig. 7 pH-activity curve of Yuccain

3 讨论

用亲和层析技术从丝兰叶子中获得的水解蛋白酶活性成分在聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦电泳中都呈现两条染色带, 并且胶中两带分别都可测出活性, 证明丝兰叶含两个蛋白酶组分。因这两个组分均为 pH=7 时的碘乙酸 (典型的巯基试剂) 抑制, 同时被 HgCl₂ 抑制后的酶能用半胱氨酸恢复活性, 说明这两个酶活性均依赖于巯基。它们的等电点分别为 pH=9.77 和 pH=9.61。而两个酶组分在 SDS 电泳中不能分离, 只呈现一条带, 提示这两个酶组分的分子量很接近, 测得其分子量均为 3 万。我们称之为丝兰酶 I 和丝兰酶 II (即 Yuccain I 和 Yuccain II)。

丝兰酶在其植物叶汁的含量与菠萝酶在菠萝果汁中的相当, 这在表 2 中可明显看出。丝兰在我国常作为纤维植物栽培, 它的来源相当广泛。丝兰酶制剂的最适酸碱度为 pH=12, 很耐碱。它可用直接脱水干燥的简单方法获取。这在生产成本上就远优于需硫酸两次盐析法, 提示丝兰酶在洗涤剂应用有着广阔的前景。

参考文献

- 1 中科院植物所. 中国高等植物科属检索表. 北京: 科学出版社, 1985, 1: 512.
- 2 中科院植物所. 中国高等植物图鉴. 北京: 科学出版社, 1980, 5: 545.
- 3 中科院上海生物化学研究所. 酶制剂的生产的测定方法. 北京: 轻工业出版社, 1971. 85.
- 4 Lynn K R, Anal, Biochem, 1973, 74: 355.
- 5 Reisfield R A et al. Nature, 1962, 195: 281.
- 6 Beynort R J, Bond J S, Proteolytic Enzymes a Practical Approach. New York: IRL Press Oxford University Press. 1989.
- 7 Terrance G Cooper. The Tools of Biochemistry, 1977.

(责任编辑: 蒋汉明 邓大玉)