

桃榔蛋白酶的分离、纯化及性质的研究*

陈 强 叶启腾 李春香 覃寿平

(广西亚热带作物研究所 南宁 530001) (广西农业大学 南宁 530005)

摘要 在桃榔属的 *Arenga pinnata* 的果实中, 发现了丰富的蛋白水解酶。我们称之为桃榔酶 (Arengain)。用硫酸铵将果肉汁分级盐析获得粗酶制品, 用 DE52 层析分出三个蛋白水解活性峰, 其中层析成分 5 为主要活性组分, 等电聚焦电泳证实该组分均一, 等电点在 pH3.99 左右, 用 SDS-PAGE 电泳法测算得分子量为 44000。

10^{-3} mol/L 的 Hg^{2+} 、PCMB、IAA、DTNB 可计量地使酶失活, Hg^{2+} 、PCMB 抑制了的酶可为 EDTA 恢复活性。一定时间内巯基乙醇能令酶活性增加。二异丙基氟磷酸虽可抑制酶活性, 但先加半胱氨酸, 后加二异丙基氟磷酸, 可使这种抑制不能实现。证明桃榔酶是巯基酶。

酪蛋白做底物, 桃榔酶反应的最适温度为 60℃, 最适 pH 为 pH11。该酶的 pH 稳定性很好, pH6~12 都表现了很高活性, 酶液于 pH6~12 中 24 小时活性基本不变; 该酶还表现了极高的乙醇耐受力, 在 50%~70% 的乙醇中都显示出高活性。它还耐受 3mol/L 盐酸胍, 50% 曲拉通, 0.1mol/L 的二硫苏糖醇。

关键词 桃榔 蛋白酶 桃榔蛋白酶

1 材料和方法

1.1 桃榔酶的制备 取果肉榨汁, 盐析得粗酶, 经柱层析, 取其中层析成分 5 干燥成酶制剂。并以木瓜酶、菠萝酶、剑麻酶作对照材料。

1.2 蛋白水解酶活性测定

1.2.1 酪蛋白法^[1]: 除注明外, 酶用量用 0.05mg/mL, 并按定量比例加入试剂。

1.2.2 DHT 酪蛋白法^[1]: 酶用量 1mg/mL。

1992年12月7日收稿

*国家自然科学基金资助项目。

2 研究内容和分析

2.1 桃椰酶的分布和活性情况

2.1.1 桃椰酶在植株的分布: 取植株不同部位组织直接榨汁测定活性, 结果见表1。

表1 植株不同部位组织的榨汁率、活性和汁液活性
(酪蛋白法—即紫外单位)

项目 \ 植株部位	茎	果实柄	果皮	果肉
组织活性 (u/g)	51	200	0	8000
汁液榨取率 (%)	22	26	15	58
汁液活性 (u/g)	68	315	0	83800

结果表明, 酶是非均一地分布于桃椰植物组织的不同部位, 主要存在于果肉中。

2.1.2 不同果期的果实的含酶量及制剂活性:

分取果期为种子刚形成、果实充分长大及果实成熟变软的桃椰果, 并各取其果肉1000克榨汁制成硫酸酶制剂, 计算它们的得率并测定活性, 结果见表2。

表2 不同成熟度桃椰果的榨汁率及硫酸酶制剂活性
(酪蛋白法测活性)

果 期	种子刚形成	果实充分长大	果实成熟变软
千克果肉得汁量 (克)	610	580	560
千克果肉得粗酶 (克)	25.3	38.2	4.1
活性 (万单位/克)	81.3	117.5	12.0

从表2中可见, 果实充分长大时酶量最大, 活性最高, 成熟变软的果实含酶量和活性都降低。

2.2 桃椰酶的提取纯化及纯度鉴定

2.2.1 提取工艺

采果→剥取果肉→榨取果肉汁→30%饱和度硫酸铵去杂→上清补足50%饱和硫酸铵取沉淀→干燥为粗酶^{透析}→调pH9.3去沉淀→DE52层析, 取层析成分5→干燥(酶制剂)得率见表3和表4。粗酶回收率达74.5%, 酶制剂回收率为47.5%。

2.2.2 DE52柱层析分离及等电聚胶电泳鉴定

采用岛津LC-6A高效液相层析系统作酶分离, 柱用DE52, 柱大1.5cm×30cm, 甘氨酸缓冲液pH9.5, 2.5×10^{-3} mol/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 梯度洗脱, 20mL/h。见图1。

图1中可见DE52柱层析酶能分离出8个在280nm处有吸收的蛋白峰, 其中2、4、5峰有活性, 第5蛋白峰为主要活性成分。从表4中可见DE52分离的第5成分回收率为63.7%, 从原料到成品的回收率为47.5%。虽然我们也曾用CM32、22, QAE25、50等柱进行分

表3 硫酸法桃榔酶制取回收率

项 目	果 肉	汁 液	粗 酶
活力 (紫外单位/克)	60000	83800	117.2万
重 量 (克)	1000	580	38.15
总活力 (紫外万单位)	6000	4860	4471
以果肉为基数的活力回收百分率	100	81.0	74.5

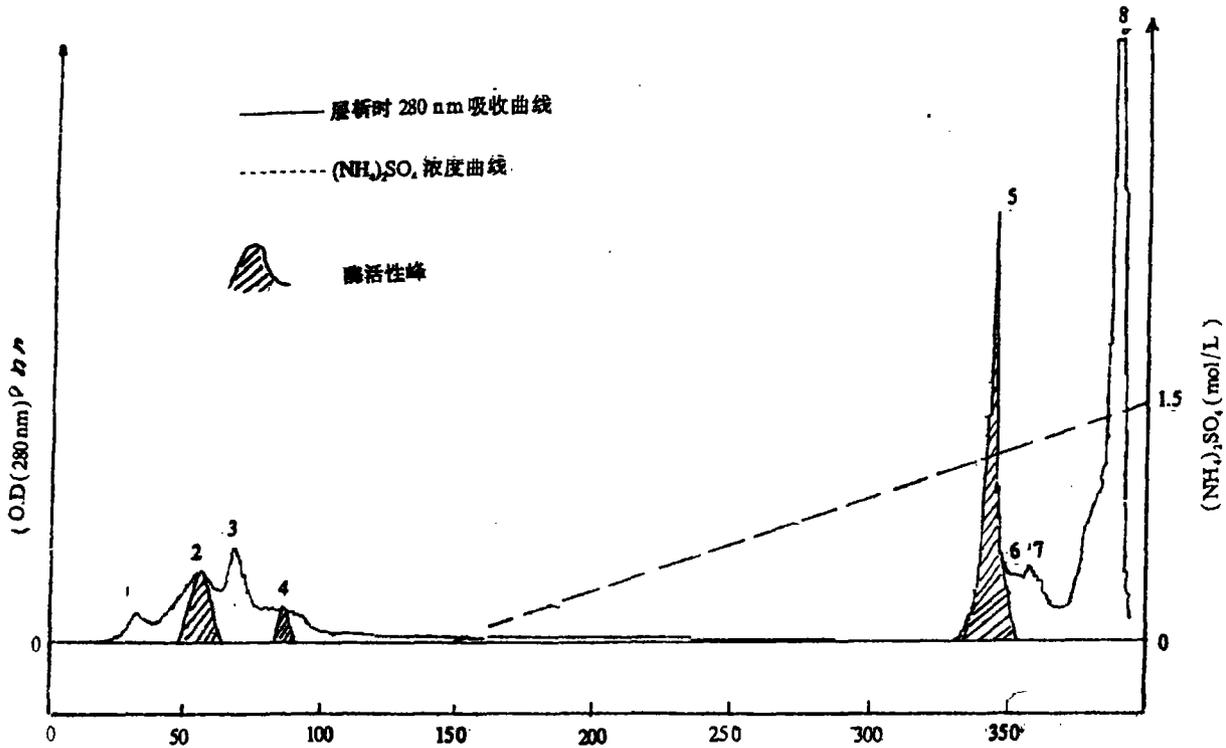


图1 DES2层析图

高, 离子浓度均超过 1.2mol/L, 分离效果都不如 DE52, 而 DE52 分离时的 pH 和离子强度也都不是常规范围了。

表4 DES2层析桃榔酶回收率

项目	总量 (mg)	蛋白量 (mg)	活性 (万u)	总活性 (u/mg 蛋白)	回收率 %	纯化倍数
上样情况	100	16.0	5.95	372		
层析成分 5	9.8	9.7	3.79	391	63.7	10.2

2.2.3 等电聚焦鉴定层析成分 5

等电聚焦电泳采用 L.K.B 公司 Multiphor II 的 pH3.5 ~ 10 Ampholin 系统。将单丙烯酰胺配成 29.1% 溶液, 取 3.5mL; 甲叉双丙烯酰胺 0.9% 液取 1mL, 加水 7.5mL, 加入 pH3.5 ~ 10 的两性电解质 Ampholin 1mL, 抽气 15 分钟, 再加入过硫酸铵 0.5mL 制成 10.3cm 长, 25cm 宽的胶板, 正极为 1mol/L 磷酸, 负极为 1mol/L NaOH。以浓缩的层析成分 5 加 10^{-4} mol/L HgCl_2 透析上样, 预电泳 100 伏, 30 分钟升至 800 伏, 1 小时后再升至 1000 伏, 电泳 2 小时当电流降至 4 毫安左右不能再降时停止。电泳后胶板的 1/4 用考马斯亮兰染色处理并作光谱扫描, 以观察酶制剂的纯度, 计量其等电点及对应的含量。结果如图 2。

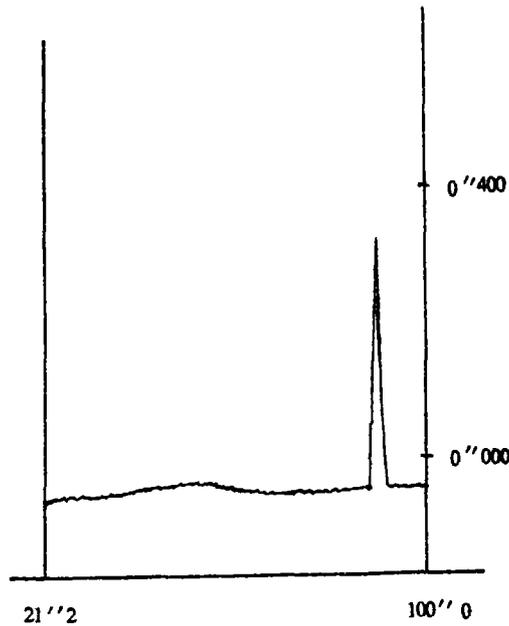


图 2 桃椰酶等电聚焦电泳扫描图

由图 2 可见, 经 DE52 层析的酶制剂较纯, 等电点在 pH3.99 左右。余下的胶板在对应等电点为 pH3.99 的位置上切下胶体, 用浓度为 5×10^{-2} mol/L 的 EDTA—半胱氨酸溶液处理后进入系统测定活性。结果显示该蛋白带有活性, 证明该蛋白带确是蛋白酶。

2.2.4 桃椰蛋白酶的 SDS-PAGE 电泳测定分子量

采用 L.K.B 的 Multiphor II 电泳仪, SDS-PAGE 法。做 3 段胶, 聚丙烯酰胺凝胶浓度分别为 3.75%、7.5%、12%。胶尺寸分别是 2.1cm、0.9cm、6cm。以 L.K.B. 的标准蛋白试剂 (分子量分别是 13200、17200、30000、45000、66000、78000) 做对照与桃椰蛋白酶共电泳, 条件为先用 10 毫安、133 伏电泳 2 小时 12 分钟, 然后升到 13 毫安、205 伏电泳 4 小时 50 分钟, 取出胶固定, 用考马斯 R250 染色。用相对迁移率及其分子量对数作半对数图 (见图 3), 测算得桃椰蛋白酶的分子量约是 44000。

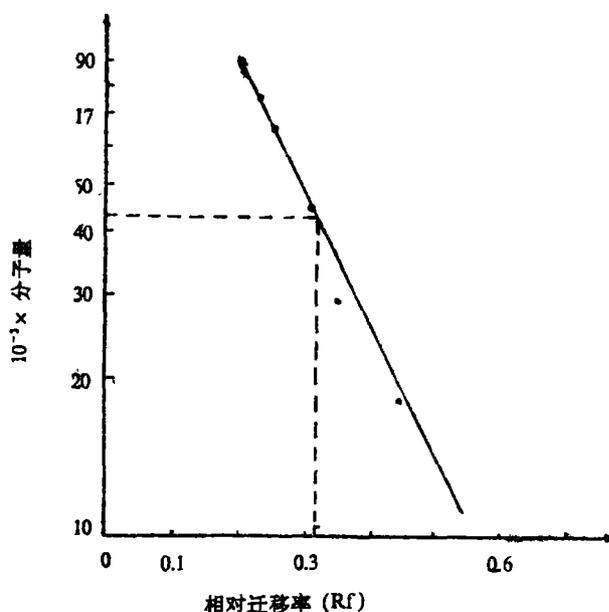


图3 SDS-PAGE电泳中各蛋白质分子量对数与相对迁移率图

2.3 梳椰酶活性中心的鉴定

2.3.1 按方法所示, 将专一性巯基试剂: 碘乙酸 (IAA)、对氯汞苯甲酸 (PCMB)、 HgCl_2 、连四硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$)、5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸) (DTNB)、巯基乙醇、半胱氨酸 (CYSH); 羟基试剂: 二异丙基氟磷酸 (DFP)、对甲基苯磺酰氟 (PMSF); 金属试剂: 乙二胺四乙酸 (EDTA) 分别作用于梳椰酶, 终浓度和结果如表 5。

从表 5 看到, 梳椰酶似可为典型的巯基试剂 10^{-3} mol/L 的 IAA、 HgCl_2 、PCMB 抑制, 且抑制情况随试剂量增加而增加, 抑制后的酶不为 1.5×10^{-2} mol/L 的 CYSH 激活, 10^{-2} mol/L 的 EDTA 可基本恢复 HgCl_2 、PCMB 抑制的酶活性, 单独使用 10^{-1} mol/L 的 CYSH、巯基乙醇、EDTA, 看不出酶活性有大变化, 可见它似依赖于巯基。但与木瓜酶、菠萝酶、剑麻酶等典型的巯基酶比较, 梳椰酶对巯基试剂的敏感性差了二个数量级。

梳椰酶不受 10^{-3} mol/L 的 $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ 的影响 (这大概是位置效应等因素影响所致); 而受 DFP、PMSF 之类羟基试剂的抑制, 那么此酶会不会含活性 OH 基? 由于 PMSF、PCMB、DTNB 等不溶于水故用了高浓度乙醇配制, 它们的抑制又会不会是乙醇抑制的假象? EDTA 能除去汞盐对酶的抑制, 这否定了酶活性对金属的可能依赖。为了确定或排除酶活性中心含 SH 基、OH 基或是有酸性蛋白酶的可能, 且由于目前普遍把蛋白酶按活性中心分为四类: OH 酶、SH 酶、金属酶、酸性蛋白酶^[2], 故研究采用排除法来确定酶的活性中心, 并进一步设计了如下实验。

2.3.2 桃椰酶对乙醇的耐受性

用不同浓度的乙醇配制酶液,并以木瓜酶作对照 40℃ 预热 15 分钟后进入测定系统,结果如表 6。

表 6 桃椰酶对乙醇的耐受性

乙醇浓度 O.D 值 酶名称 作用时间(分)	0		25%		50%		75%	
	木瓜酶	桃椰酶	木瓜酶	桃椰酶	木瓜酶	桃椰酶	木瓜酶	桃椰酶
0	0.340	0.242	0.164	0.314	0.084	0.326	0.083	0.294
120	0.335	0.236	0.150	0.310	0.069	0.315	0.065	0.309
120	0.328	0.237	0.137	0.301	0.012	0.293	0.008	0.239
1200	0	0.237	0	0.245	0	0.226	0	0.226

从表 6 中可见桃椰酶对乙醇的耐受性极强。于 50% 乙醇和 75% 乙醇中 O.D 值各为 0.326 和 0.294, 分别比在水中的 O.D 值 0.242 高 34.71% 和 21.1%。同时,于 50% 乙醇中 120 分钟桃椰酶仍与水中的始活性相当,可见桃椰酶确是为 PCMB、PMSF、DTNB 所抑制的。

2.3.3 半胱氨酸对酶的保护作用

由表 5 中看出, DFP 对桃椰酶的抑制浓度偏高,故本试验中酶量降至原设定方法的 1/4,并在加入 DFP 前后 15 分钟各加入 0.1mol/L 的半胱氨酸,观察酶活性变化,结果如表 7。

表 7 半胱氨酸对酶与 DFP 作用时的保护

O.D 值 酶名称	试剂	DFP	先加 (5 × 10 ⁻⁴ mol/L)	先加 0.1mol/L	0
		(5 × 10 ⁻⁴ mol/L)	DFP 后加 CYSH	CYSH 后加 DFP	
桃椰酶		0.013	0.025	0.101	0.101
枯草杆菌蛋白酶		0	0	0	0.311

表 7 中可见在使用 DFP 时,不论加与不加半胱氨酸,典型的丝氨酸 OH 基酶、枯草杆菌蛋白酶活性均为 0。而对于桃椰酶来说,0.1mol/L CYSH 虽不能恢复 DFP 抑制了的活性,但在先加入足量的巯基试剂 CYSH 时,酶活性中心不受 DFP 影响。这一试验证实了桃椰酶活性中心不含 OH 基,因为巯基试剂对 OH 基是不应有保护作用的。也提示了巯基作为此酶催化基团的可能。为了证实酶是否为酸性蛋白酶,又设计了如下试验。

2.3.4 pH 对桃椰酶的影响

将酪蛋白用几组缓冲液配成 pH3 ~ 13 的底物系列,并将酶用缓冲液调成相应的 pH,40℃ 保温 30 分钟后进入测定系统,结果如图 4。另将酶置于室温、pH11 中,在不同时间测定活性(测定活性时调回 pH7)。结果如表 8。

图 4 中可见桃椰酶在 pH7 以下活性急骤降低,至 pH3 时活性近为 0,于 pH5 以上时活性上升加快,在 pH9.6 ~ 11 之间有最高活性。于 pH13 时酶活性还有 pH7 时的 1/4。可见此酶极耐碱。由于酸性蛋白酶最适催化条件在 pH2 ~ 4,且往往对 EDTA 抑制敏感,

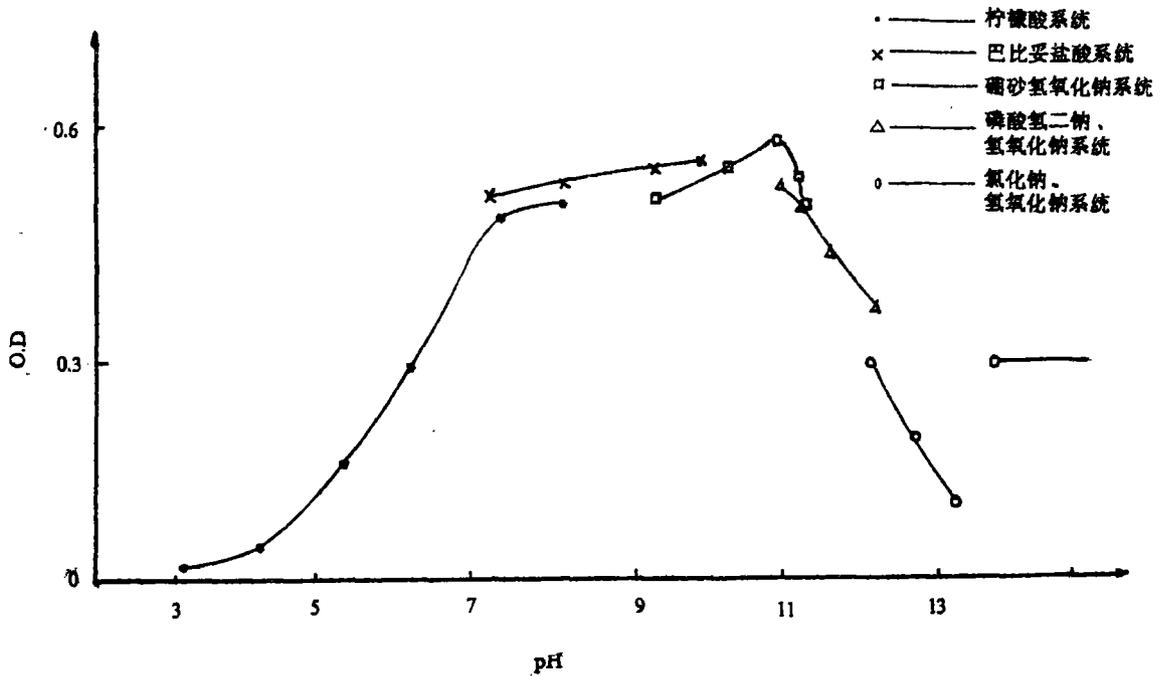


图4 桃椰酶的pH影响图

表8 桃椰酶于pH11的室温保存情况

时间	0	2	24	48	96
O.D(pH11)	0.428	0.422	0.420	0.374	0.294
活性 %	100	98.6	98.1	87.3	69.1
水 O.D	0.452	0.455	0.443	0.420	0.401
水 (活性 %)	100	100.6	98	92.9	88.7

可见桃椰酶不是酸性蛋白酶。

由于酶的活性巯基在碱性条件下极易氧化成双硫键，而此酶于室温中 pH11 置 24 小时仍无明显变化，至 96 小时仍保存了原活性的 69%，这样的稳定性在巯基蛋白酶中是未见报道的，即是说对酶的活性中心是否为巯基提出了疑问。按陈惠黎先生指出的：“二硫键可作为活性中心”^[1]的说法，桃椰酶又会不会是含“二硫键的催化中心”呢？为此我们设计了如下试验。

2.3.5 DTT、巯基乙醇和酶作用试验

若酶活性中心含二硫键，那么二硫键一断裂，酶即失活。为此设计了在高 pH(pH8.7) 条件下，用传统的 -S-S- 拆分试剂^[4,5] DTT 和巯基乙醇对桃椰酶进行处理，以观察它们对桃椰酶的影响。为了增加试剂与酶接触，还加进了尿素 (4mol/L 或 8mol/L)。结果如表 9、10。

表9 桃椰酶于 35℃ 4mol/L 尿素中与巯醇的作用

试剂 内容	0			4mol/L 尿素	
	0	10 ⁻¹ mol/L DTT	3 × 10 ⁻¹ mol/L 巯基乙醇	10 ⁻¹ mol/L DTT	3 × 10 ⁻¹ mol/L 巯基乙醇
活性 %	100	92.0	105.5	91.7	158

表10 桃椰酶于 40℃ 8mol/L 尿素中与巯醇的反应

试剂内容 活性 %	无 尿 素			8mol/L 尿素			
	0	10 ⁻¹ mol/L DTT	3 × 10 ⁻¹ mol/L 巯基乙醇	10 ⁻¹ mol/L DTT	3 × 10 ⁻¹ mol/L 巯基乙醇	0 尿素对照	
反	25	100	92.5	109.0	42	110.8	101.7
应	60	100	51.5	106.0			
时	90	101.7	47.5	106.3	40.6	95	107.0
间	300	101.5	40.2	103.0	12.3	37.6	97.1
(分)	1440	95	36	95.1	0	28.2	91.5

从表9和表10看出, pH8.7时加入 3×10^{-1} mol/L 的巯基乙醇, 无论是在 35℃ 或 40℃ 短时间内桃椰酶活性都略有提高, 特别是再加入 4mol/L 尿素, 酶活性高达 158%。由于巯基乙醇是温和的二硫键拆分试剂, 它可将二硫键还原而增加巯基酶的活性。而 DTT 作用更激烈, 较少的量即可令蛋白质的结构二硫键断裂。Cleland^[4] 指出, 二巯苏糖醇和二巯赤鲜糖醇将蛋白二硫键还原拆分只需 0.1mol/L 浓度就够了, 长时间的巯基乙醇作用也一样, 它最终也会将蛋白质结构二硫键断裂而令酶失活。巯基乙醇在碱性 (pH8.9) 且有尿素存在时使桃椰酶活性显著增加, 只能说明酶巯基被还原而被巯醇激活, 这当然只能证实桃椰酶是一个巯基酶, 而否定了此酶活性中心含二硫键。(除陈惠黎先生文提及, 我们没有查到过蛋白水解酶, 甚至酶有以二硫键这种无解离基团的组分做为活性中心的。)

2.4 金属离子对桃椰酶的影响

将各种金属离子分别加入酶液中, 使离子的最终浓度为 10^{-3} mol/L, 40℃ 保温 30 分钟即进入 DHT 测定系统。

表11 金属离子对桃椰酶活性的影响

名称	Ca ²⁺	Ag ⁺	Ba ²⁺	Hg ⁺	Fe ³⁺	Fe ²⁺	Mg ²⁺	Mo ²⁺	Cr ²⁺	Sn ²⁺	Bi ²⁺	Mn ²⁺	Co ²⁺	Sb ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	Cu ²⁺	对照
活性 (O.D 值)	0.364	0.005	0.0358	0.038	0.022	0.086	0.0378	0.042	0.20	0.117	0.258	0.036	0.339	0.33	0.084	0.207	0.138	0.36

从表11 我们可看出大部分金属离子对桃椰酶影响不明显, 但 Ag⁺、Hg²⁺、Fe³⁺、Mo²⁺、Mn²⁺ 对酶影响较大, 浓度 10^{-3} mol/L 就已使酶基本失活了, 这也正是和巯基酶的性质相符合的。

2.5 桃椰酶对一些主要蛋白变性剂的耐受性

用不同浓度的盐酸胍、十二烷基肌酸钠 (Sarkosyl)、曲拉通 (Triton 100) 和酚等主要的蛋白变性剂配制酶液在室温放置 30 分钟后进入测定系统。结果见表 12、13、14。

表 12 不同浓度盐酸胍对桃椰酶的影响

盐酸胍 (mol/L)	0 水对照	0.1	1	2	3
O.D	0.360	0.360	0.391	0.408	0.454

注: 加 4mol/L 以上盐酸胍时反应液不能过滤, 故没做。

表 13 曲拉通和 Sarkosyl 对桃椰酶的影响

试剂浓度 % O.D 值 试剂	0(水溶液)	0.5	1	4	5	10	50
Triton100	0.255		0.305		0.326	0.285	0.250
Sarkosyl	0.377	0.182	0.056	0.000			

表 14 不同浓度酚对 Arenga 果蛋白酶活性的影响

酚浓度 (%)	0 (水溶液)	5	10	20	30
O.D 值	0.326	0.000	0.000	0.000	0.000

盐酸胍、十二烷基肌酸钠、Triton 100 都是破坏蛋白质高级结构的蛋白变性剂, 它们常用于核酸或膜物质提取。从表 12 中可见盐酸胍能令酶活性增加到 124% (0.450/0.360) 低浓度 (1% ~ 10%) 的 Triton 100 也令酶活性增加, 于 0.5% 的 Sarkosyl 中酶活性尚能保存一半以上。可见此酶的稳定性是很好的。但从表 14 中可看出它对酚的耐受性极差, 这又提示在工作中能用酚来除去桃椰酶。

2.6 桃椰酶的最适作用温度及在一些温度下的稳定性。

在不同的反应温度下测定桃椰酶的活性, 结果如表 15、图 5。在 37℃ 下放置不同时间, 然后测定活性, 结果如表 16。在 60℃ 下放置不同时间, 然后测定活性, 结果如表 17。室温下 (试验时为 6 月份, 气温为 27 ~ 32℃) 放置不同时间后测定活性, 结果见表 18。

表 15 桃椰酶的活性与温度关系

温度 (℃)	20	30	40	50	55	60	65	70	80	90
O.D. (275nm)	0.214	0.342	0.526	0.801	0.931	1.120	0.734	0.540	0.065	0.019

表 16 在 37℃ 下时间对桃椰酶活性的影响

时间 (分)	10	15	20	30	60	120	180	240
O.D. (275nm)	0.523	0.520	0.511	0.495	0.426	0.383	0.348	0.315

表 17 在 60℃ 下时间对桃椰酶活性的影响

时间 (分)	10	15	20	30	60	120	180	240
O.D. (275nm)	0.730	0.727	0.620	0.582	0.290	0.151	0.140	0.078

表 18 室温下时间对桃椰酶活性的影响

时间 (小时)	0	24	48	72
O.D.(275nm)	0.354	0.360	0.324	0.285

结果表明桃椰酶在 60℃ 下显示出最高活性; 在温度 30℃ 左右 24 小时活性不变, 72 小时下降不到 20%; 在 37℃ 和 60℃, 活性稳定时间分别为 30 分钟和大于 20 分钟, 可见该酶的稳定性极好。

3 结论和讨论

从实验结果看出, 桃椰酶分布于桃椰植物茎干、果柄等组织中, 但主要含酶部位仍在果肉。每千克果肉含酶高达 6 千万单位, 比菠萝的 1 千万 u/ 千克高, 而与番木瓜的相近。若要生产桃椰酶宜从果肉提取。

只与半胱氨酸巯基结合的对氯汞苯甲酸对酶有计量的抑制; DTNB、IAA 对酶抑制; 先加入半胱氨酸可保护酶不受 DFP 抑制; 巯基乙醇 (于 4mol/L 尿素、pH8.7) 使酶活性增到 158%, 证明桃椰酶是活性依赖于半胱氨酸的巯基酶。但桃椰酶又不同于一般的巯基酶, 它比菠萝酶、木瓜酶对巯基试剂耐受力要高出两个数量级; 5×10^{-3} mol/L 的 $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ 对它无影响; 甚至于 pH13 和在 75% 乙醇中酶都能表现出与对照相近或高于对照 (不加试剂) 的活性, 证明了桃椰酶的结构紧密而特殊, 这在一般的蛋白酶乃至酶体系中也是很少见的。因而提示了桃椰酶在生物工程作为工具的前景, 尤其是在酶促合成新蛋白时, 符合疏水条件提高得率的要求。

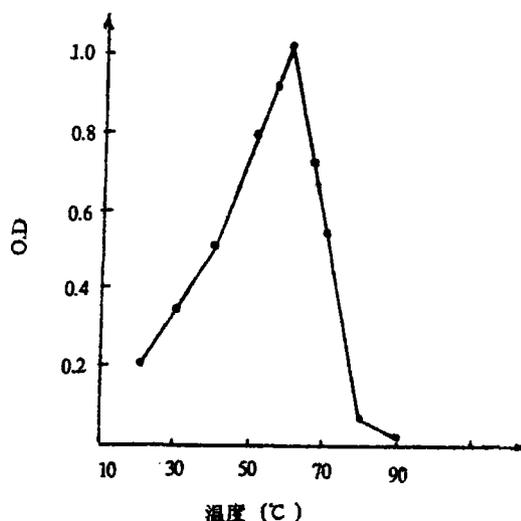


图 5 桃椰酶活性——温度曲线

桃榔酶特殊的稳定性显示了它是研究蛋白质结构和功能关系的一种有价值的材料。即它不但为酶家族增加了新成员, 也为生物工程研究提供了新手段和材料。

参考文献

- 1 中科院上海生化所. 酶制剂的生产和测定方法. 北京: 轻工业出版社, 1971, 85页.
- 2 Beynon R J, Bond J S. *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. New York: IRL Press, Oxford University Press, 1989.
- 3 陈惠黎等. 分子酶学. 北京: 人民卫生出版社, 1985.
- 4 Albert Lühr. 蛋白质的结构和功能. 张维希译. 北京: 科译出版社, 1982.
- 5 阎龙飞. 蛋白质的结构和功能. 北京: 科学出版社, 1988.

Study on the Separation, Purification and Properties of the Arengain

Chen Qiang Ye Qiteng Li Chunxiang
(Guangxi Institute of Subtropical Crop, Nanning)

Mao Soupin
(Guangxi Agricultural University, Nanning)

Abstract Rich protease, named arengain, is discovered from the fruits of *Arenga pinnata*. The crude powder of the arengain is fractionated by ammonium sulfate from the fruit flesh juice of *Arenga pinnata*. Three active compounds of proteolysis are separated out by DE52. The main active compound is the fifth fraction of chromatography. It is proved that the compound is uniform on electrofocusing. Its isoelectric point is about pH3.99 and the molecular weight is 44000 by the method of SDS-PAGE electrophoresis. Hg^{2+} , PCMB, IAA and DTNB can proportionally inhibit the activity of the arengain. EDTA can reactivate the activity which is inhibited by Hg^{2+} and PCMB. The mercaptoethanol in certain time can increase the activity of the arengain. DFP can inhibit the activity, but the activity can be protected if adding cystine firstly than DEP. The facts prove that the arengain is one of the sulfhydryl type. With casein as substrate, it can be used optimally at 60°C and at pH11. The activity of the arengain in aqueous solution of pH6~12 could be kept for 24 hours. It has high activity in 50%~75% ethanol, and also has tolerance to 3mol/L guanidine hydrochloride, 50% Triton 100 and 10⁻¹ mol/L DTT.

Key words *Arenga pinnata*, protease, arengain