

# 罗汉果蛋白酶的化学修饰

梁成钦<sup>1</sup>, 周先丽<sup>1</sup>, 徐庆<sup>1</sup>, 段小群<sup>1</sup>, 刘国雄<sup>2</sup>, 苏小建<sup>\*2</sup>

(1. 广西桂林医学院, 广西 桂林 541004; 2. 广西师范大学 环境与资源学院, 广西 桂林 541004)

**摘要:** 通过对罗汉果蛋白酶进行化学修饰, 分析该酶结构与功能的关系。利用 8 种化学修饰剂对罗汉果蛋白酶进行修饰, 并测定修饰后该酶的酶活的变化。结果显示: 苯甲基磺酰氟 (PMSF)、N-溴代琥珀酰亚胺 (NBS) 和焦碳酸二乙酯 (DEPC) 对该酶的抑制作用很强, 而其它修饰剂对酶活性影响不大, 说明羟基、吲哚基和咪唑基可能为蛋白酶活性的必需基团, 而巯基、氨基、羧基、胍基和二硫键可能并不是酶活性的必需基团。

**关键词:** 罗汉果; 蛋白酶; 化学修饰; 功能基团

中图分类号: Q 556 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2012)02-206-05

## Study on the Separation, Purification and Some Properties of the Protease from the Fruits of *Siraitia grosvenorii*

LIANG Cheng-qin<sup>1</sup>, ZHOU Xian-li<sup>1</sup>, XU Qing<sup>1</sup>, DUAN Xiao-qun<sup>1</sup>,  
LIU Guo-xiong<sup>2</sup>, SU Xiao-jian<sup>\*2</sup>

(1. Guilin Medical College, Guilin 541004, China; 2. College of Environment and Resources of Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

**Abstract:** The structure-function relationship of the protease from the fruits of *siraitia grosvenorii* was studied by analyzing the effects of modification on the protease activity. The activities were detected after the protease was modified by 8 kinds of protein modification reagents, respectively. And the results showed that the enzyme activity was significantly decreased after modified by PMSF, NBS and DEPC, but the others did not had obviously effected. So the hydroxyl group, indolyl group and imidazole group were demonstrated to be essential to the enzyme's function probably, but the sulfhydryl group, amino group, garboxyl group, guanidino group and disulfide may not be essential for the activity of the enzyme.

**Key words:** *Siraitia grosvenorii*, protease, chemical modification, functional group

蛋白酶是催化肽键水解的一群酶类, 它广泛存在于动物内脏、植物茎叶、果实和微生物中。蛋白酶在食品、化工、医疗、制药等方面应用广泛<sup>[1]</sup>, 不同来源的蛋白酶在工业上有不同的用途, 如用于洗

涤剂、嫩化肉类、改良面团、制造蛋白水解物<sup>[2]</sup>, 以及在制革、毛皮工业上用作为脱毛和软化剂等。目前生产最多的来自植物的蛋白酶是木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶<sup>[3]</sup>。

收稿日期: 2011-04-23

基金项目: 广西教育厅专利资助项目(桂教科研[2008]27号)。

作者简介: 梁成钦(1977-), 男, 广西平南人, 助理研究员, 主要从事药化学研究。E-mail: 63775661@163.com

\* 通信作者: 苏小建(1957-), 男, 广西桂林人, 教授级高级工程师, 硕士研究生导师, 主要从事天然产物化学研究。

E-mail: lichqixing@163.com

罗汉果蛋白酶是作者从鲜罗汉果中发现一种新植物蛋白酶,其对酪蛋白的水解活性高<sup>[4]</sup>。而罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)是葫芦科(*Cucurbitaceae*)罗汉果属植物的成熟果实,其性凉味甘,无毒,有润肺止咳、凉血、润肠通便的功效,盛产于广西桂林地区<sup>[5]</sup>。作者已经从该酶的提取分离工艺、酶起活性作用的最适条件和贮存稳定性的最佳条件<sup>[4,6]</sup>及该酶对大豆蛋白的水解条件等方面进行了初步研究和探讨<sup>[7]</sup>。由于某种化学修饰法是探明酶活性部位功能基团的常用方法之一,为了加深对罗汉果蛋白酶的认识,为开发利用该酶提供实验依据,作者采用苯甲基磺酰氟(PMSF)、N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)、焦碳酸二乙酯(DEPC)等8种不同的化学修饰剂对罗汉果蛋白酶的不同氨基酸残基进行化学修饰,以通过考察不同修饰剂对酶活力的影响,初步分析罗汉果蛋白酶的结构与功能关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

罗汉果蛋白酶:凝胶电泳均一纯酶,作者所在实验室制备;2-巯基乙醇(2-ME)、苯甲基磺酰氟(PMSF)和 Amresco 焦碳酸二乙酯(DEPC);Amresco 公司产品,N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)和 N-乙基马来酰亚胺(NEM);国药集团化学试剂有限公司产品;二乙酰(DIC,又称丁二酮)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)和 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS);Fluka 公司产品;其他试剂均为分析纯试剂。

精密 pH 计:pHS-3C,上海精密科学仪器有限公司产品;UV2401 紫外分光光度计;Shimadzu 公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 蛋白酶的活性测定** 罗汉果蛋白酶酶活力的测定方法见参考文献<sup>[8]</sup>。酶的活力单位定义:在规定条件下,1 min 内酶水解酪蛋白释放出相当于 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  酪氨酸在 275 nm 波长处的吸收度为 1 个活力单位。

**1.2.2 蛋白质的含量测定** 采用 Bradford 检测法,参考文献<sup>[9]</sup>进行。

**1.2.3 罗汉果蛋白酶的化学修饰** 8 种化学修饰剂(CM)修饰蛋白酶的方法按文献<sup>[10]</sup>进行,修饰

条件如表 1 所示。将酶液 50  $\mu\text{L}$  加入 20  $\mu\text{L}$  终浓度如表 1 的 CM 中,用不同的缓冲液(PMSF 先用二甲基亚砷配成 100 mmol/L)稀释到 5 mL,然后分别在反应 20 min 和 40 min 后取出 1 mL 反应液,测定各自的相对蛋白酶活力(以不加修饰剂而用不同缓冲液代替的酶液的蛋白酶活力为 100%)。

表 1 罗汉果蛋白酶的化学修饰反应条件

Tab. 1 Chemical modified reaction conditions of protease

化学修饰	修饰基因	化学修饰剂/ (mmol/L)	缓冲液/ (mmol/L)	pH
NEM	Sulfhydryl	10.0	0.1 phosphate	7.4
TNBS	Amino	2.0	0.1 phosphate	8.0
PMSF	Hydroxyl	10.0	0.1 phosphate	7.4
DIC	Guanidino	20.0	0.05 boronate	8.5
EDC	Carboxyl	100.0	0.05 acetic	4.8
NBS	Indolyl	0.1	0.1 phosphate	5.8
DEPC	Imidazolyl	50.0	0.1 phosphate	7.0
2-ME	-S-S-	100.0	0.1 phosphate	8.0

## 2 结果与分析

### 2.1 巯基的化学修饰

巯基存在于半胱氨酸残基中,是巯基蛋白所必需的侧链基团,在木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶等的蛋白中心都发现存在巯基基团。N-乙基马来酰亚胺(NEM)是一种有效的巯基修饰试剂。作者在 pH 7.4 条件下用不同浓度的 NEM 对蛋白酶进行化学修饰,结果如图 1。

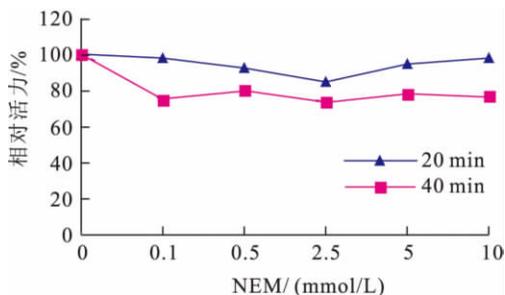


图 1 NEM 对酶活性的影响

Fig. 1 The effect of NEM on protease activity

从图可以看出,当 NEM 的浓度为 10 mmol/L 时,蛋白酶的活性还保留 80% 以上,因此基本可以认为半胱氨酸残基并不位于该酶的活性中心。

### 2.2 氨基的化学修饰

三硝基苯磺酸 (TNBS) 常用来修饰赖氨酸残基。作者在 pH 8.0 的条件下用 10 mmol/L 的 TNBS 与蛋白酶作用,结果如图 2。从图看出,蛋白酶的活性基本保留 100% 左右,说明氨基并不是罗汉果蛋白酶的必需基团。

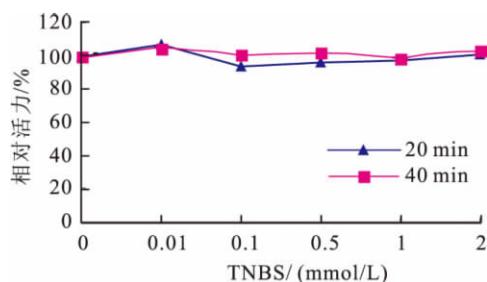


图 2 TNBS 对酶活性的影响

Fig. 2 Effect of TNBS on protease activity

### 2.3 羧基的化学修饰

羧基存在于谷氨酸和天门冬氨酸中,水溶性的碳化二亚胺类能特定修饰蛋白质分子的羧基基团。作者在 pH 5 的条件下用 0.1 mol/L EDC 与蛋白酶作用 40 min 后,该酶的活力还保留率高达 100.5%,因此可以确定羧基也不是该酶的活性必需基团(图 3)。

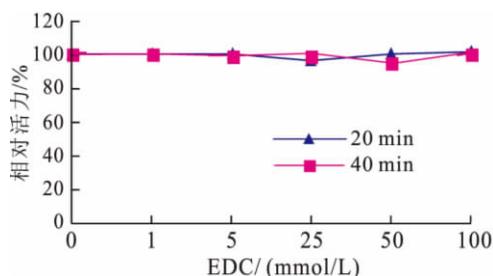


图 3 EDC 对酶活性的影响

Fig. 3 Effect of 2-ME on protease activity

### 2.4 咪唑基的化学修饰

组氨酸残基的咪唑基可以通过氮原子的烷基化或碳原子的亲核取代来进行化学修饰,而常用来修饰咪唑基的是焦碳酸二乙脂 (DEPC),该试剂在接近中性的条件下反应出很好的专一性,与组氨酸残基反应使咪唑基上的一个氮羧乙基化,并在 240 nm 处有光吸收<sup>[11]</sup>。作者在 pH 7.0 的条件下用不

同浓度的 DEPC 与蛋白酶作用,结果在 DEPC 浓度为 50 mmol/L 时,蛋白酶的活性仅为 7%,蛋白酶被严重抑制,因此可以认为咪唑基可能存在于该酶的活性中心(图 4)。

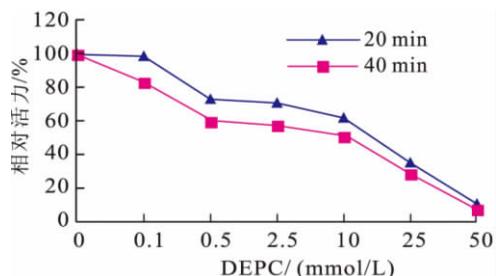


图 4 DEPC 对酶活性的影响

Fig. 4 Effect of DEPC on protease activity

### 2.5 羟基的化学修饰

在酪氨酸、苏氨酸和丝氨酸残基中都存在羟基,而丝氨酸残基是参与蛋白中心较多的一种残基,羟基常见的化学修饰方法有脂化、碘化、硝化和酰反应等,作者用不同浓度的苯甲酰基磺酰氟 (PMSF),在 pH 7.5 的条件下与蛋白酶作用。

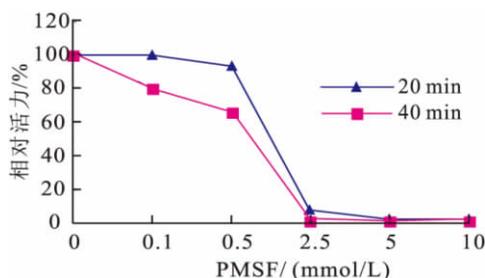


图 5 PMSF 对蛋白酶活性的影响

Fig. 5 Effect of PMSF on protease activity

结果如图 5,当 PMSF 的浓度为 2.5 mmol/L 时,蛋白酶的活性几乎为 0,说明 PMSF 能很好地抑制该酶的活性,因此推测羟基可能是该的必需基团。

### 2.6 胍基的化学修饰

精氨酸残基含有 1 个强碱性的胍基,在结合带有阴离子底物的酶的活性部位中起着重要作用。丁二酮和 1,2-环己二酮与胍基反应可逆地生成精氨酸-丁二酮复合物,该产物可以与硼酸结合而形成稳定的化合物,但反应须在黑暗中进行,因为丁二酮可以作为反应试剂破坏其它残基如色氨酸、组氨酸、酪氨酸残基等。作者采用丁二酮 (DIC) 做修饰剂在 pH 8.5 的硼酸盐缓冲溶液中与蛋白酶作用,

研究不同浓度的 DIC 对蛋白质的影响。见光下反应(图 6),当 DIC 的浓度为 20 mmol/L,蛋白酶的活性 45%。而在黑暗中反应时保持 72.6%,这可能是由于 DIC 可以作为光敏性反应试剂见光时容易破坏其它残基,特别是色氨酸、组氨酸和酪氨酸残基,从而影响酶的活性<sup>[12]</sup>。因此,推测胍基可能不存在于该蛋白酶的活性中心。

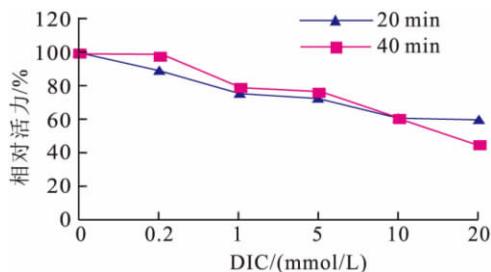


图 6 DIC 对酶活性的影响

Fig. 6 Effect of DIC on protease activity

### 2.7 吡啶基的化学修饰

一种常用来修饰色氨酸吡啶基的试剂是 N-溴代琥珀酰亚胺(NBS),可以使吡啶基团氧化成羟吡啶衍生物。NBS 可以和半胱氨酸残基作用,但实验测得巯基不是该酶活性中心所必需基团,所以不需要先对巯基进行保护<sup>[13]</sup>。作者用 NBS 与蛋白酶作用来研究色氨酸对罗汉果蛋白的影响。

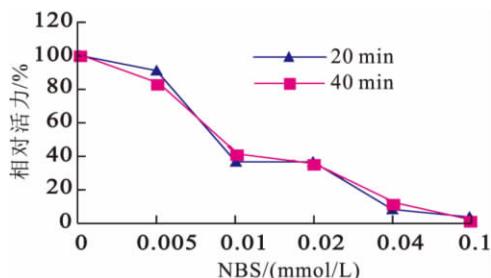


图 7 NBS 对酶活性的影响

Fig. 7 Effect of NBS on protease activity

图 7 表明:NBS 的浓度为 0.1 mmol/L 时,作用 20 min,蛋白酶的活性降低到 3%,由此得出,吡啶基存在于该蛋白酶的活性中心。

### 2.8 二硫键的化学修饰

用 2-巯基乙醇(2-ME)将二硫键还原成游离巯基是一种常用的二硫键的修饰方法,反应具有高度的选择性和长的半衰期。由于反应的平衡常数接近于 1,为使二硫键充分还原,反应时必须使用大大过量的巯基乙醇。作者在 pH 8.0 的条件下,用 2-

ME 浓度为 0.1 mmol/L 2-ME 作用于罗汉果蛋白酶,40 min 后结果显示该酶的活性仍保持 76%,可初步推测该酶的活性中心不含二硫键(图 8)。

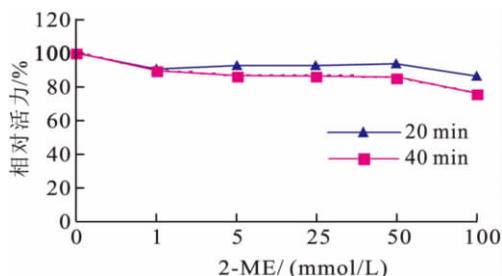


图 8 2-ME 对酶活性的影响

Fig. 8 Effect of 2-ME on protease activity

### 2.9 底物保护化学修饰剂对酶活力的影响

为了进一步探讨修饰剂 PMSF、NBS、DEPC 所修饰的氨基酸残基是否参与罗汉果蛋白酶的活性中心,作者用不同质量分数的酪蛋白溶液作底物对蛋白酶液进行保护,结果如图 9。

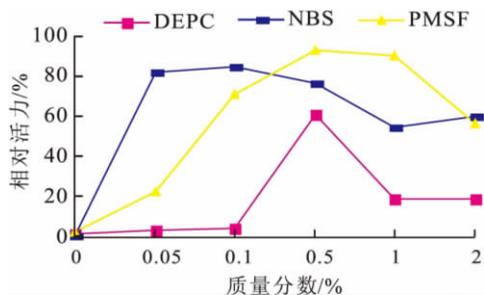


图 9 底物(酪蛋白)质量分数对 DEPC、PMSF 和 NBS 修饰酶活性的影响

Fig. 9 Effects of different percent concentration of casein on the protease which modified by DEPC, PMSF and NBS respectively

3 种修饰剂所修饰的罗汉果蛋白酶的活性随底物质量分数的增加均呈先增加后降低的趋势。当酪蛋白的质量分数分别为 0.5%、0.1%和 0.5%时,分别用 PMSF、NBS 和 DEPC 修饰的罗汉果蛋白酶的活性为最高,分别保持原来酶活的 93%、77%和 61%,与不加底物相比,活性明显保持。这是因为蛋白酶的必需基团在同化学修饰剂相结合之前先和底物结合,从而有效阻止必需基团与化学修饰剂的反应,使 PMSF、NBS、DEPC 对蛋白酶的抑制作用大大降低。因此可以进一步确定羟基、吡啶基和咪唑基可能参与了罗汉果蛋白酶和酪蛋白底物的结合,可能存在于该酶的活性中心。

### 3 结 语

通过对罗汉果蛋白酶的化学修饰和酪蛋白底物保护,说明蛋白酶的活性中心可能存在羟基,因为 2.5 mmol/LPMSF 能严重地抑制该酶的活性,而质量分数 0.5% 的酪蛋白能保护 93% 的不被 PMSF 抑制。此外由实验可知咪唑基和咪唑基也

可能是蛋白酶的活性必需基团,而巯基并不存在该酶的活性中心,这与大多数植物蛋白酶属于巯基蛋白酶不同。另外,氨基、羧基、胍基和二硫键可能不是酶起活性作用所必需的基团。至于该酶的活性位区的具体残基数及酶的具体催化反应机理还需进一步研究。

### 参考文献(References):

- [1] Germano S, Pandey A, Osaku C A, et al. Characterization and stability of proteases from *Penicillium sp.* produced by solid-state fermentation[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2003, 32: 246—251.
- [2] 钱飞, 刘海英, 过世东. 瓜蛋白酶水解克氏原螯虾虾壳提取虾青素的研究[J]. **食品与生物技术学报**, 2010, 29(2): 237—243.  
QIAN Fei, LIU Hai-ying, GUO Shi-dong. The application of papain in astaxanthin extraction from crayfish shell[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(2): 237—243. (in Chinese)
- [3] 刘凤瑶, 廖劲松, 齐军茹, 等. 木瓜蛋白酶与菠萝蛋白酶的产业开发[J]. **食品工业科技**, 2008, 29(07): 289—292.  
LIU Feng-yao, LIAO Jin-song, QI Jun-ru, et al. The industry development of papain and bromelain[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2008, 29(07), 289—292. (in Chinese)
- [4] 苏小建, 梁成钦, 何星存, 等. 罗汉果蛋白酶的分离纯化和特性研究[J]. **食品科学**, 2007, 28(5): 249—253.  
SU Xiao-jian, LIANG Cheng-qin, HE Xing-cun. Study on protease separation and purification from *siraitia grosvenorii* fruits and its characteristics[J]. **Food Science**, 2007, 28(5), 249—253. (in Chinese)
- [5] 黎海彬, 王 邕, 李俊芳, 等. 罗汉果的化学成分与应用研究[J]. **食品研究与开发**, 2006, 27(2): 85—87.  
LI Hai-bin, WANG Yong, LI Jun-fang, et al. Chemical constituent of luohanguo and applied studied[J]. **Food Research and Development**, 2006, 27(2), 85—87. (in Chinese)
- [6] 苏小建, 梁成钦, 何星存, 等. 罗汉果蛋白酶的提取方法比较[J]. **食品工业科技**, 2007, 28(2): 157—162.  
SU Xiao-jian, LIANG Cheng-qin, HE Xing-cun, et al. The comparison of extraction methods of protease from *Siraitia grosvenorii* [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2007, 28(2), 157—162. (in Chinese)
- [7] 梁成钦, 苏小建, 徐庆, 等. 罗汉果蛋白酶水解大豆蛋白的研究[J]. **食品工业科技**, 2007, 28(12): 148—152.  
LIANG Cheng-qin, SU Xiao-jian, XU Qin, et al. Study on the hydrolyzing of soybean isolated proteins by using the protease of *Siraitia grosvenorii*[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2007, 28 (12), 148—152. (in Chinese)
- [8] Stellmach B. 酶的测定方法[M]. 钱嘉渊 译. 北京: 中国轻工业出版社, 1992.
- [9] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [10] 郭华北, 姜安丽, 陈惠黎. N-乙酰氨基葡萄糖转移酶的化学修饰[J]. **生物化学与生物物理学报**, 1998, 30(5): 449—453.  
GUO Hua-bei, JIANG An-li, CHEN Hui-Li. Chemical modification of n-acetylglucosaminyltransferases[J]. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, 1998, 30(5), 449—453. (in Chinese)
- [11] 周海梦, 王洪睿. 蛋白质化学修饰[M]. 北京: 清华大学出版社, 1998.
- [12] Gripon J C, Hofmann. Inactivation of aspartyl proteinases by butane-2,3-dione. Modification of tryptophan and tyrosine residues and evidence against reaction of arginine residues[J]. **The Biochemical Journal**, 1981, 193(1): 55—65.
- [13] 罗贵民. 酶工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.