

草鱼肠道胰蛋白酶同工酶 GT-A 的动力学和热力学性质

刘忠义

(湘潭大学 生物与食品工程系,湖南 湘潭 411105)

【摘 要】 【目的】研究草鱼肠道胰蛋白酶的化学组成和酶学性质,以便深入了解该酶的特性并探讨其工业应用潜力。【方法】用生物化学方法结合仪器分析,测定了草鱼消化道胰蛋白酶同工酶 GT-A 的氨基酸组成,分析了其动力学和热力学性质。【结果】GT-A 的最大反应速度($V_{\max}$)和米氏常数(K_m)值分别为 $2\,000\text{ min}^{-1}$ 和 $21.21\text{ }\mu\text{mol}$,生理转化效率($V_{\max}/K_m$)较高,为 $94.3\text{ min}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$;其 Arrhenius 活化能很低,为 17.22 kJ/mol 。差示扫描量热分析(DSC)表明,其热变性温度为 $66.3\text{ }^{\circ}\text{C}$, Ca^{2+} 的存在可将该酶的热变性温度提高到 $73.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。氨基酸分析表明,草鱼胰蛋白酶 GT-A 的芳香族氨基酸含量很低,形成二硫键的潜力极低。紫外扫描发现,GT-A 在 205 nm 附近有最大紫外吸收,而在 280 nm 附近的吸收很微弱。【结论】GT-A 具有冷水性鱼消化蛋白酶的部分特性,且其生理转化效率高而活化能低,具有很好的利用前景。

【关键词】 草鱼;胰蛋白酶;同工酶;动力学性质;热力学性质;活化能;氨基酸组成

【中图分类号】 Q176;Q556+.9 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)01-0211-07

Kinetic and thermodynamic properties of a trypsin isoform GT-A from the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) intestines

LIU Zhong-yi

(Department of Food and Biotechnology of Xiangtan University,Xiangtan,Hunan 411105,China)

Abstract: 【Objective】 Investigating the chemical composition and enzymological properties of trypsin from the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) intestine is helpful to intensively understand its property and to probe into its potential industrial and commercial application. 【Method】 By biochemical and instrumental analysis, amino acid composition as well as kinetic and thermodynamic properties of the grass carp trypsin isozyme GT-A were determined. 【Result】 $V_{\max}$ and K_m values were determined to be $2\,000\text{ min}^{-1}$ and $21.21\text{ }\mu\text{mol}$, respectively. And its physiological efficiency ($V_{\max}/K_m$) was calculated to be $94.3\text{ min}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$. GT-A had a low Arrhenius activation energy of 17.22 kJ/mol . By differential scanning calorimetry (DSC), the thermo denaturation temperature of GT-A was determined to be $66.3\text{ }^{\circ}\text{C}$. And in the presence of Ca^{2+} , the thermo denaturation temperature of GT-A was increased by $72.9\text{ }^{\circ}\text{C}$. The amino acid composition analysis result showed that the content of both aroma amino acid and cysteine of GT-A was low. GT-A had the strongest absorbance near 205 nm , but weak absorbance near 280 nm . 【Conclusion】 These results showed that GT-A possessed some properties of the digestive proteinases from cold-adapted fish, such as high physiological efficiency and low Arrhenius activation energy, and exhibited potential in-

* 【收稿日期】 2006-12-27
【基金项目】 湖南省教育厅中青年骨干教师计划项目(02C580)
【作者简介】 刘忠义(1964—),男,湖南涟源人,副教授,硕士,主要从事生物技术在食品科学与工程中的应用研究。
E-mail: lzyly@xtu.edu.cn

dustrial and commercial applications.

Key words: Grass carp; trypsin; isozyme; kinetics property; thermodynamics property; activity energy; amino acid composition

蛋白酶是重要的工业用酶,大约占工业酶制剂市场份额的 50%^[1]。鱼类的生活环境分布极广,从热带到极地的冰层下均有生长,而且种类繁多,仅海洋中就有 300 万~50 000 万种生物,约占地球总物种数的一半^[1]。因此,鱼消化蛋白酶是一个潜在的重要的蛋白酶源,一些来自海鱼中的消化蛋白酶已经在商业上得到应用^[1]。

草鱼是我国最重要的淡水养殖鱼,为了充分研究草鱼消化道蛋白酶的生物学特性并探讨其可利用前景,刘忠义^[2]已完成了草鱼胰蛋白酶 GT-A 的分离、纯化及电泳性质、抑制性质、最适作用温度、热稳定性、最适作用 pH 以及 pH 稳定性等的研究,表明草鱼胰蛋白酶 GT-A 的这些性质与大多数来源于其他鱼虾的胰蛋白酶相似。

酶的动力学和热力学性质对酶特性的理解很重要^[3-4],同时,酶的性质和功能主要取决于其氨基酸组成和结构^[5]。已有广泛关于高等哺乳动物和不同海洋环境水生动物消化蛋白酶的动力学和热力学性质的研究^[1,3-6],然而鲜有关于淡水鱼类蛋白酶的同类研究报道。此外,很多研究报道了哺乳动物和海洋生物体内蛋白酶的热稳定性^[1,3-6],却很少研究报道这些酶的热变性温度。目前,差示扫描量热分析(DSC)已被广泛使用,其基本原理^[7]是通过测定不同温度下物质结构变化或者物态变化时热焐值的变化,进而准确确定物质结构变化或者物态变化时的临界温度,如物质相变温度、玻璃化转变温度、溶液冰点降低温度、蛋白质热变性温度、淀粉糊化温度以及晶体晶形变化的临界温度等等,因而利用 DSC 可以实现酶热变性温度的准确测定。为此,本研究试图在前人研究^[2]的基础上,进一步对草鱼胰蛋白酶 GT-A 的氨基酸组成及其动力学和热力学性质进行研究,分析该酶的氨基酸组成、动力学参数、Arrhenius 活化能、紫外吸收特性以及变性温度等性质,从而为草鱼胰蛋白酶的研究应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用草鱼购自湘潭市鱼市场,为本地渔场养殖的成年鱼,平均质量 2.0~2.5 kg,平均体长 35.5~38.25 cm。鱼购回后在清水中养殖 24 h,然

后宰杀取出内脏,清理出鱼肠并将其清洗干净。用剪刀剖开鱼肠,用去离子水反复清洗,尽量洗净肠内壁,并立即用于胰蛋白酶的提取、分离和纯化。

纯草鱼胰蛋白酶 GT-A 在实验室从洁净草鱼肠道中分离纯化^[2],纯酶在 SDS-PAGE 电泳胶片上以单带迁移,高效液相色谱表明其纯度达到 94%以上,比活力为 102.18 U/mg(以酪蛋白为底物)。

N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐(BAEE)购自 Sigma 化学试剂公司(美国)。所用其他试剂均为分析纯级或者生化专用试剂。

1.2 胰蛋白酶活力的测定

按照《中华人民共和国药典》^[8]所载胰蛋白酶测定方法进行,以 BAEE 为底物。

1.3 蛋白质含量的测定

参照文献[9-10]的方法进行。

1.4 金属离子对 GT-A 活性的影响

将 100 $\mu\text{g/mL}$ GT-A 溶液与不同金属的氯化物溶液混合,室温放置 30 min。然后测定酶的残余活力,分析 Ca^{2+} (CaCl_2 5 mmol/L)、 Mg^{2+} (MgCl_2 5 mmol/L)、 Cu^{2+} (CuCl_2 2 mmol/L)、 Zn^{2+} (ZnCl_2 5 mmol/L)、 Hg^{2+} (HgCl_2 2 mmol/L)和 Al^{3+} (AlCl_3 2 mmol/L)等金属离子对酶活性的影响。

1.5 钙离子对 GT-A 热稳定性的影响

将 10 μL CaCl_2 (5 mmol/L)溶液与 1 mL GT-A 溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)混合后,室温放置 30 min,然后分别测定 GT-A 在 55,60,65 和 70 $^{\circ}\text{C}$ 处理 20 min 后的残余活性。

1.6 GT-A 的 $V_{\max}$ 和 K_m 以及生理效率

以 BAEE 为底物,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下测定不同底物(BAEE)浓度(0.625,0.313,0.156,0.078 mmol/L)时,100 $\mu\text{g/mL}$ GT-A 水解底物时的初速度(即转化数),然后按 Lineweaver-Burk 方法作出回归直线,以此推算酶的最大反应速度($V_{\max}$)和米氏常数(K_m), $V_{\max}/K_m$ 值即为酶的生理效率。

1.7 GT-A 的 Arrhenius 活化能分析

用所测定的 GT-A(100 $\mu\text{g/mL}$)在 15~60 $^{\circ}\text{C}$ 时水解 BAEE 的初反应速度,计算得到摩尔比活力(V_{si}),以其对数值($\log V_{\text{si}}$)对绝对温度的倒数作图,进行线性回归分析,依据该直线的斜率计算酶的反应活化能(E_a)。

1.8 GT-A 的紫外吸收

用 UV-1100(北京瑞利)紫外分光光度计扫描 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 GT-A 溶液,得到该酶的紫外吸收光谱。

1.9 GT-A 的氨基酸组成

GT-A(300 μg)经 6 mol/L 的盐酸 110 $^{\circ}\text{C}$ 水解 24 h 后,用“Agilent HP1100”氨基酸分析仪(美国)分析其除色氨酸外的氨基酸组成。GT-A(100 μg)经 4.2 mol/L 的 NaOH 溶液真空 110 $^{\circ}\text{C}$ 水解 98 h 后,用“Agilent HP1100”氨基酸分析仪(美国)分析其色氨酸组成。氨基酸组成用每摩尔酶蛋白中所含氨基酸残基的摩尔数来表示(圆整到整数)。

1.10 GT-A 的热变性温度

用 0.2 mol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液将

GT-A(140 μg)配制成 280 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,然后用 PYRIS-1(JAC 7/DX)型差示扫描量热仪(DSC,美国)测定酶的热变性温度。用 CaCl_2 调整酶溶液中的钙离子浓度为 5 mmol/L,放置 20 min,然后同样用 DSC 测定酶的变性温度。DSC 扫描温度范围为 25~100 $^{\circ}\text{C}$,升温速率 10 $^{\circ}\text{C/min}$ 。

2 结果与分析

2.1 金属离子对 GT-A 活性和热稳定性的影响

表 1 结果表明, CaCl_2 和 MgCl_2 对 GT-A 的活性基本无影响。但 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 和 Al^{3+} 等的存在,将使 GT-A 活性的 63%~73%被抑制。

表 1 金属氯化物对 GT-A 活性的影响

Table 1 Effect of metal chlorides on the GT-A activity

金属氯化物 Metal chlorides	浓度/(mmol·L ⁻¹) Conc.	相对酶活性/% Relative activities	金属氯化物 Metal chlorides	浓度/(mmol·L ⁻¹) Conc.	相对酶活性/% Relative activities
CaCl_2	5	99±1.20	ZnCl_2	5	37±1.95
MgCl_2	5	97±1.05	HgCl_2	2	31±1.56
CuCl_2	2	29±2.10	AlCl_3	2	27±2.12

注:数据来源于 3 个平行试验的平均值。下表同。

Note: Data were mean from triplicated assays. The following table is the same.

由表 2 可以看出,虽然 CaCl_2 不影响酶的活性,但是却能较大幅度地提高酶的热稳定性。例如,在没有 Ca^{2+} 存在时,65 $^{\circ}\text{C}$ 加热 20 min 后酶几乎失去

其全部活性;而在加入 Ca^{2+} (5 mmol/L)后,经过同样的热处理,酶仍可以保留其活性的 66.50%。

表 2 Ca^{2+} 对 GT-A 热稳定性的影响

Table 2 Effect of Ca^{2+} on thermostability of the GT-A

温度/ $^{\circ}\text{C}$ Temperature	加热时间/min Heating time	GT-A 残余活性/% Relative activity		温度/ $^{\circ}\text{C}$ Temperature	加热时间/min Heating time	GT-A 残余活性/% Relative activity	
		无 Ca^{2+} No Ca^{2+}	加 5 mmol/L Ca^{2+} Add 5 mmol/L Ca^{2+}			无 Ca^{2+} No Ca^{2+}	加 5 mmol/L Ca^{2+} Add 5 mmol/L Ca^{2+}
55	20	88.29	97.58	65	20	4.03	66.50
60	20	82.36	95.86	70	20	0	3.76

2.2 GT-A 的 V_{max} 、 K_m 以及生理效率

将 GT-A 水解不同浓度 BAEE 时的初速度(即水解 BAEE 的转化数,实际上就是酶的摩尔比活力)的倒数 $(1/v)$ 对相应的浓度倒数 $(1/[S])$ 作图(即 Lineweaver-Burk 直线),其结果如图 1 所示。以酶的摩尔比活力的倒数值为 y ,以浓度的倒数值为 x 进行回归分析,得到的回归关系式为 $y = 0.106x + 5.3327 \times 10^{-4}$,其相关系数为 0.999 9,吻合较好。

依据直线的斜率和截距计算 V_{max} 和 K_m 值,其结果如表 3 所示。表 3 还列出了 GT-A 的生理转化效率 V_{max}/K_m 值及螯虾的 4 种碱性蛋白酶和大西洋鳕鱼胰蛋白酶的同类数值。由表 3 可见,GT-A 的 V_{max} 和 K_m 值分别是 $(2\,000 \pm 82.1) \text{ min}^{-1}$ 和

$(21.21 \pm 1.98) \mu\text{mol}$,生理转化效是为 $94.30 \text{ min}^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ 。这些值与螯虾^[5]和大西洋鳕鱼胰蛋白酶^[6]的同类参数值基本相似。

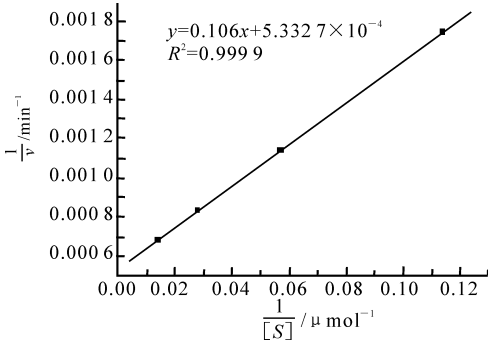


图 1 GT-A 水解 BAEE 的 Lineweaver-Burk 回归直线
Fig. 1 Lineweaver-Burk plots for hydrolysis of BAEE by GT-A

表 3 GT-A 与其他水产生物蛋白酶动力学参数的比较

酶 Enzyme		$V_{\max}/\text{min}^{-1}$	$K_m/\mu\text{mol}$	$V_{\max}/K_m/(\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1})$
GT-A		$2\,000\pm8.21$	21.21 ± 1.98	94.30
螯虾胰蛋白酶 ^[11] Crayfish proteinases	I	$9\,110\pm745$	37.40 ± 2.44	243.58
	II	$15\,400\pm1\,020$	35.70 ± 2.10	431.37
	III	$13\,400\pm821$	43.20 ± 2.46	310.19
	IV	$13\,500\pm875$	34.90 ± 2.20	386.82
鳕鱼胰蛋白酶 ^[12] Cod trypsin		18 200	220	82.73

注:(1)GT-A 的参数值为 3 个平行试验的平均值;(2) $V_{\max}$ 的转化数以每 μmol 酶的 BAEE 活力单位表示。
Note:(1) Data of GT-A are mean from triplicated assays;(2) $V_{\max}$ value is BAEE units for GT-A.

2.3 GT-A 的 Arrhenius 活化能

用测得的酶在 15~60 ℃ 时水解 BAEE 的初反应速度计算摩尔比活力,用所得的摩尔比活力的对数值($\log V_{sa}$)对绝对温度的倒数($1/T$)作图,并进行回归分析,其结果如图 2 所示。

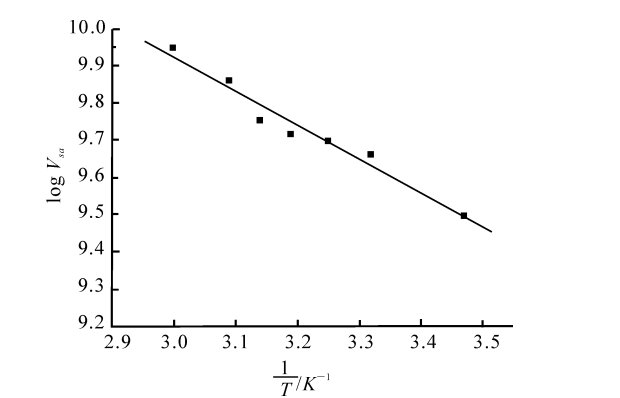


图 2 GT-A 水解 BAEE 时的 Arrhenius 回归直线
Fig. 2 Arrhenius plots for hydrolysis of BAEE by GT-A

从图 2 的直线斜率可推算出,GT-A 的 Arrhenius 活化能(E_a)为 17.22 kJ/mol。据报道,螯虾的 4 种碱性蛋白酶水解 TAME 的活化能为 24.29~25.92 kJ/mol^[11];Greenland 鳕鱼胰蛋白酶水解 N-苯甲酰-L-精氨酸甲酯(TAME)的活化能为 27.59 kJ/mol^[12];鳀鱼胰蛋白酶水解 N-苯甲酰-L-精氨酸- ρ -硝基苯胺(BANPA)的活化能为 25.49 kJ/mol^[13]。一般情况下,依据 Arrhenius 方程,酶的活化能越低,说明酶催化反应需要越过的能垒越低,酶在低温下有更好的催化效率^[3]。GT-A 具有比其

他鱼酶更低的活化能,表明该酶在低温下能更有效地催化反应。这就印证了以前的研究结果,即与其他鱼酶相比,GT-A 可在 15~20 ℃ 的较低温度下保留很高的反应速度^[2]。

2.4 GT-A 的氨基酸组成

草鱼胰蛋白酶 GT-A 的氨基酸组成如表 4 所示。由表 4 可知,GT-A 总芳香族氨基酸残基(Tyr + Phe + Trp)的含量约为总氨基酸残基量的 4.68%。与一些哺乳动物胰蛋白酶芳香族氨基酸含量(例如猪胰蛋白酶约为 6.81%^[12],牛胰蛋白酶约为 7.93%^[12-13])及一些蛋白质芳香族氨基酸的含量(例如牛肉约为 11.12%,猪肉约为 10.51%,酪蛋白约为 11.63%等^[14])相比,该酶的芳香族氨基酸含量很低,即使与一些鱼胰蛋白酶芳香族氨基酸的含量(例如鳕鱼胰蛋白酶为 6.27%^[12],鳀鱼胰蛋白酶约为 6.38%^[13],鳀鱼胰凝乳蛋白酶约为 5.56%^[13])相比,其芳香族氨基酸含量也较低。GT-A 半胱氨酸的含量很低,分子中大约只有 4 个半胱氨酸残基,所以形成分子内二硫键的潜力很低(最多可能有 2 对-S-S-)。GT-A 有很大的酸性氨基酸潜力(Asp + Asn + Glu + Gln),其比例远较碱性氨基酸(Lys + Arg)高。此外,GT-A 的疏水性氨基酸含量远低于亲水性氨基酸含量,依据氨基酸组成以及氨基酸的疏水性值^[14]计算可知,GT-A 酶蛋白的平均疏水性大约只有 3.49 kJ/mol,这说明 GT-A 具有非常好的亲水性。

表 4 GT-A 与其他水产生物蛋白酶氨基酸组成的比较

氨基酸 Amino acid	含量/% Contents			
	草鱼胰蛋白酶 Grass carp trypsin GT-A	鳕鱼胰蛋白酶 ^[12] Greenlan cod trypsin	鳀鱼胰蛋白酶 ^[13] Anchovy trypsin	鳀鱼胰凝乳蛋白酶 ^[13] Anchovy chymotrypsin
Asp + Asn	50	27	32	25
Glu + Gln	39	25	24	21
Ser	27	37	30	21
His	9	8	9	10
Gly	31	33	28	17

续表 4 Continued of table 4

氨基酸 Amino acid	含量/% Contents			
	草鱼胰蛋白酶 Grass carp trypsin GT-A	鳕鱼胰蛋白酶 ^[12] Greenlan cod trypsin	鲱鱼胰蛋白酶 ^[13] Anchovy trypsin	鲱鱼胰凝乳蛋白酶 ^[13] Anchovy chymotrypsin
Thr	10	12	14	21
Arg	5	6	6	9
Ala	16	19	11	12
Tyr	3	8	8	3
Cys-s	5	8	5	9
Val	13	19	16	19
Met	2	4	3	2
Phe	8	5	5	4
Ile	13	9	10	10
Leu	22	16	15	14
Lys	6	7	6	6
Pro	20	12	11	15
Trp	2	3	2	6
总氨基酸残基数 Number of residues	278	254	235	234
平均疏水性/(kJ·mol ⁻¹) Mean hydrophobicity	3.49	3.60	3.60	4.06

2.5 GT-A 的紫外吸收

草鱼胰蛋白酶 GT-A 的 UV-可见吸收光谱如图 3 所示。

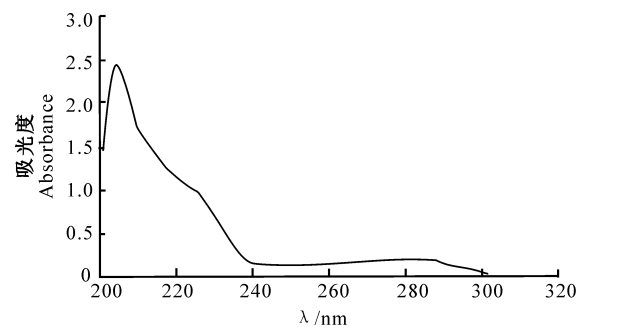


图 3 草鱼胰蛋白酶 GT-A 的紫外吸收光谱
Fig. 3 UV absorbance pattern of the grass carp trypsin-like enzyme isoform GT-A

由图 3 可见,GT-A 酶在 205 nm 附近有最大吸收峰,在 210 nm 处也有非常高的吸光值,而在 280 nm 附近只有很微弱的吸收,这说明 GT-A 在氨基酸的组成及三维构象上有不同的特性。以 280 nm 波长处的吸光度测定蛋白质含量,是由于芳香族氨基酸在 280 nm 附近有特征紫外吸收光谱^[14],而前面对草鱼胰蛋白酶 GT-A 氨基酸组成的分析表明,GT-A 中芳香族氨基酸的含量比较低,因此,低芳香族氨基酸含量是该酶在 280 nm 附近只有微弱吸收的主要原因之一。此外,也有可能是酶蛋白构象上的特殊性导致酶蛋白在 280 nm 附近只有很微弱的吸收(例如,芳香族氨基酸残基侧链被紧密包裹在蛋白质分子构象的内部。在这种情况下,使用蛋白质变性剂如盐酸胍、硫酸铵以及加热等,可以使芳香族氨基酸残基的侧链基团充分暴露于分子表面,因此

会大幅度增加蛋白质或者酶蛋白溶液在 280 nm 处的吸光度^[14-15]),但这个推断还有待进一步的研究证实。

2.6 GT-A 的热变性温度

蛋白质构象的变化可以由热焓值的变化来反映,因此可以用量热的方法测定蛋白质的热变性温度,图 4 即是 GT-A 及其加 Ca²⁺ 后的 DSC 图谱。图 4 的分析结果表明,GT-A 只有 1 个惟一的热变性温度,即为 66.3 °C,这也间接证实了金属离子对该酶热稳定性影响试验的研究结果。

热稳定性试验中还发现,GT-A 酶在 65 °C 开始迅速失活^[2],而在钙离子存在时,其 DSC 图谱显示 GT-A 的热变性温度可提高到 73.0 °C,即钙离子的存在提高了酶的热稳定性。这一结果也与金属离子对该酶热稳定性影响试验的结果相吻合。

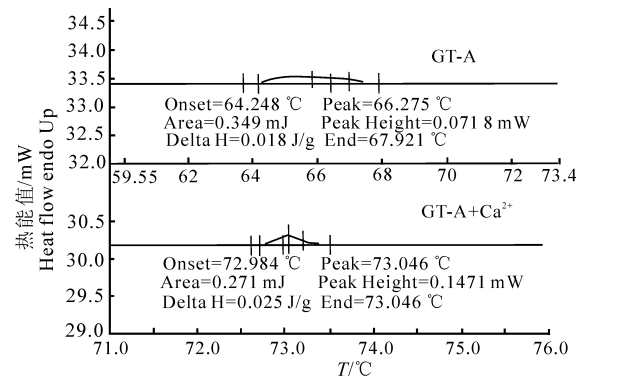


图 4 GT-A 以及 GT-A 酶溶液和 5 mmol/L Ca²⁺ 混合室温下放置 20 min 后的 DSC 图谱

Fig. 4 DSC patterns of GT-A after incubating with 5 mmol/L of Ca²⁺ for 20 min at room temperature

3 讨 论

与来源于温血哺乳动物的同类消化蛋白酶相比,来源于长期生长在低温环境里(4℃以下)的水生冷血动物以及其他水生生物的酶,表现出了一些不同的特性^[1,3,6,11-13,15-18],其中非常重要的 2 个特性是鱼酶具有高生理转化效率($V_{\max}/K_m$)和低 Arrhenius 活化能。首先,有人发现冷鱼胃蛋白酶具有这两个特点,并在低温下表现出高催化活性和对热的不稳定性^[1,3,6,16,18]。后来的研究也表明,很多生活在海洋中的鱼虾,其胰蛋白酶也具有高生理转化效率($V_{\max}/K_m$)和低 Arrhenius 活化能^[11-13,15,17]的特点。然而,关于淡水鱼虾的报道却很少。本研究结果表明,草鱼胰蛋白酶 GT-A 同样具有这两个特性,这也许与草鱼的生活环境有关。在中国的大部分地区,草鱼必须在寒冷气候下过冬;即使在正常情况下,草鱼也生活在 25℃以下的水环境中。

针对鱼酶具有的高生理转化效率($V_{\max}/K_m$)和低 Arrhenius 活化能,人们推测,其与蛋白质的化学组成及更柔性的构象有关。与牛胰蛋白酶有 12 个胱氨酸残基相比,Greenland 鳕鱼^[12]和大西洋鳕鱼^[17]胰蛋白酶分子里只有 8 个半胱氨酸残基,这样鱼胰蛋白酶蛋白分子里最多只有 4 对二硫键,其分子构象显然没有牛胰蛋白酶紧密,即鱼酶分子具有更松弛和柔性的构象。Jeong 等^[11]和 Heu 等^[13]的试验结果也支持了这个观点。本研究对草鱼胰蛋白酶 GT-A 氨基酸组成的测定结果表明,该酶蛋白中半胱氨酸含量很低,最多只有形成 2 对分子间二硫键的能力。所以,草鱼酶也可能具有更松弛和柔性的分子构象。当酶在和底物形成酶-底物络合物并催化底物转变为产物时,更柔性的分子只需要克服更低的能垒,这就表现出更低的 Arrhenius 活化能,并且适合在相对比较低的温度下发挥催化作用^[1,3,6,12,15-18]。

草鱼胰蛋白酶 GT-A 中只有很低的芳香族氨基酸以及含硫氨基酸(Cys+Met)含量,这也可能与草鱼的生活环境以及食性有关。草鱼天然以水草等植物材料作为食物,和动物性来源的蛋白质相比,来自植物性材料的蛋白质中芳香性氨基酸、含硫氨基酸等的含量均比较低^[14]。为了充分利用食物资源,草鱼会采用更合理的氨基酸组成构成其功能性蛋白质。因此,草鱼胰蛋白酶氨基酸组成中的芳香性氨基酸含量比较低,这是该酶在 280 nm 处只有微弱吸光度的主要原因之一。

总的说来,草鱼胰蛋白酶同工酶 GT-A 是一种具有一些特别性质的酶,其热稳定性和大多数生活在海洋、湖泊、江河里的鱼虾胰蛋白酶相当,高于冷水性鱼酶而低于热带鱼酶^[2]。本研究发现,该酶也具有高生理转化效率($V_{\max}/K_m$)和低 Arrhenius 活化能,这一方面与其生活环境有关,另一方面也使得其和其他冷酶一样^[1,3,6],在某些特别的工商行业具有很好的利用前景。

[参考文献]

- [1] Haard N F. Specialty enzymes from marine organisms[J]. Food Technology, 1998, 52: 64-67.
- [2] 刘忠义. 草鱼肠道胰蛋白酶(GT-A)的纯化及其部分理化性质初探[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(10): 189-195.
Liu Z Y. Purification and preliminary research of some properties of a Trypsin (GT-A) from the intestines of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2007, 35(10): 189-195. (in Chinese)
- [3] Feller G, Narinx E, Louis J, et al. Enzymes from psychrotrophic organisms[J]. Fems Microbiol Rev, 1996, 18: 189-202.
- [4] 王 璋. 食品酶学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1991: 52-122.
Wang Z. Food enzymology[M]. Beijing: Chinese Light Industrial Press, 1991: 52-122. (in Chinese)
- [5] Fersht A. Enzyme: structure and catalysis' metabolism[M]. London: Dekker Press, 1991: 1-21.
- [6] Shahidi F, Janak K Y V A. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry [J]. Trends in Food Science and Technology, 2001, 12: 435-564.
- [7] 陆昌伟, 奚同庚. 热分析质谱法[M]. 上海: 上海科技文献出版社, 2002: 108-126.
Lu C W, Xi T G. Thermal analysis mass spectra method[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2002: 108-126. (in Chinese)
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2 版. 北京: 化工出版社, 2005: 624-626.
Chinese Medicine Dictionary Commission. Medicine dictionary of People's Republic of China[M]. 2nd Edition. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 624-626. (in Chinese)
- [9] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 265-275.
- [10] 中山大学生物系生化微生物教研室. 生化技术导论[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
Biochemical and microorganism staff room of biological department of Zhongshan University. Biochemical technology introduction[M]. Beijing: Science Press, 1999. (in Chinese)
- [11] Jeong Y, Wei C, Preston J F, et al. Purification and character-

ization of proteases from hepatopancreas of crawfish (*Procambarus clarki*) [J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 24:311-332.

[12] Simpson B K, Haard N F. Purification and characterization of trypsin from the Greenland cod (*Gadus ogac*). I. Kinetic and thermodynamic characteristics [J]. Canada Journal of Biochemistry and Cell Biology, 1984, 62:894-900.

[13] Heu M S, Kim H R, Pyenu J H. Comparion of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-B, 1995, 112:557-567.

[14] Fennema O R. Food Chemistry[M]. 3rd Edition. New York: CRC Press, 1996:415-426.

[15] Outzen H, Berglund G I, Smalås A O, et al. Temperature and pH sensitivity of trypsins from atlantic salmon (*Salmo salar*) in comparison with bovine and porcine trypsin[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-B, 11996, 115:33-45.

[16] Twining S S, Alexander P A, Huiibregtse K, et al. A pepsinogen from rainrow trout [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-B, 1983, 75:109-112.

[17] Simpson B K, Simpson M V, Haard N F. Properties of trypsin from the pyloric ceca of Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. J Food Science, 1990, 55:959-961.

[18] Arunchalam K, Haard N F. Isolation and characterization of pepsin from Polar cod (*Boreogadus saida*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-B, 1985, 80:467-473.

(上接第 210 页)

[3] 李世敏, 乔方. 西式低温肉制品生产中 HACCP 的应用[J]. 食品科学, 2003, 24(8):66-69.
Li S M, Qiao F. Application of HACCP in processing of meat products in western style[J]. Food Science, 2003, 24(8):66-69. (in Chinese)

[4] 吴季红. 国内外防腐剂现状和发展前景[J]. 中国食品用化学品, 1997 (1):9-11.
Wu J H. Current situation on preservation[J]. Chinese Chemistry on Food, 1997(1):9-11. (in Chinese)

[5] 罗爱平, 李昌军, 肖蕾, 等. 可食天然复合保鲜膜对低温肉制品的保质研究[J]. 食品科技, 2004(5):75-78.
Luo A P, Li C J, Xiao L, et al. Effect of natural complex fresh-keeping film on conserving low-temperature meat production [J]. Food Science and Technology, 2004(5):75-78. (in Chinese)

[6] 郝微. 台湾香肠保鲜的研究[D]. 上海:华东师范大学, 2006.
Hao W. Studies on the preservation of Taiwan sausage[D]. Shanghai:East China Normal University, 2006. (in Chinese)

[7] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789.17—1994 中华人民共和国国家标准·食品卫生检验方法微生物部分[S]. 北京:中国标准出版社, 1995.
Ministry of Health of China, the Chinese State Commission for Administration of Standardization. GB/T 4789.17—1994 People’s Republic of China National Standards·Food hygiene inspection methods microbia[S]. Beijing:China Standard Publishing, 1995.

[8] 徐秀兰. 生物化学实验与指导[M]. 北京:中国医药科技出版社, 1994.
Xu X L. Biochemical experiments and guidance[M]. Beijing: Public by China Medical Science and Technology, 1994. (in Chinese)

[9] Williams S K. Sodium lactate affects shelf life and consumer acceptance of fresh catfish fillets under simulated retile conditions [J]. J of Food Science, 1995, 60(3):636-639.

[10] 刘庚寿. 酸化剂的作用机理及发展趋势[EB/OL]. (2005-12-05)[2006-05-21]http://www.mnong.com/js_3.htm
Liu G S. Mechanism development trends of acidifier [EB/OL]. (2005-12-05) [2006-05-21]http://www.mnong.com/js_3.htm.