

文章编号: 1674 - 5566(2014)05 - 0741 - 07

## 南极磷虾体内胰蛋白酶的纯化及性质研究

田 鑫, 汪之和, 施文正, 李 燕

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

**摘 要:** 以南极磷虾(*Euphausia superb*)为研究对象,通过硫酸铵分级沉淀、Phenyl-Sepharose 疏水层析、DEAE-Sepharose FF 离子交换层析等方法,从南极磷虾体内分离纯化出胰蛋白酶。其纯化倍数为 5.44 倍,比活力为 38.3 U/mg,得率为 26%。SDS-PAGE 电泳结果显示,该酶的分子质量为 28 ku。蛋白酶最适温度为 37 ℃、最适 pH 为 7.5,  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  对南极磷虾蛋白酶具有激活活性, $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  具有酶活抑制性,其中  $Cu^{2+}$  的抑制性最强。酶的动力学实验结果表明,以 BApNA 为底物测得  $K_m$  为 0.073 mmol/L,  $V_{max}$  为  $1.44 \times 10^{-2}$  mmol/L · s,  $k_{cat}$  为 0.6  $S^{-1}$ ,  $k_{cat}/K_m$  为  $8.22 \times 10^3$ , PMSF 作为蛋白酶抑制剂,对南极磷虾蛋白酶作用机制为不可逆抑制。

**研究亮点:** 首次利用疏水层析和离子交换层析结合的纯化手段从南极磷虾体内分离出电泳纯蛋白酶,并对其酶学性质及酶学动力学和抑制动力学进行研究。

**关键词:** 南极磷虾; 蛋白酶; 纯化; 酶学性质

**中图分类号:** S 965.11

**文献标志码:** A

南极磷虾是地球上资源量最大的单种生物之一,据估算,其生物量为  $6.5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$  t,保守估计总量可达  $2.5 \times 10^8 \sim 6 \times 10^8$  t<sup>[1]</sup>。南极磷虾生长于南极极端环境,体内蛋白质降解系统非常独特,且蛋白酶具有活性高,低温适应性等特点<sup>[2]</sup>。南极磷虾蛋白酶制剂已应用于医学领域,具有清除坏死组织、加速伤口愈合的作用<sup>[3]</sup>,同时在食品加工以及洗涤业也利用其高效的蛋白降解功能开发出了相应产品。南极磷虾资源开发利用日益受到世界各国关注,我国是人口大国,自然资源相对贫乏,南极磷虾综合开发与应用,对我国具有极其重要的战略意义<sup>[4-5]</sup>。

利用毛细管电泳的方法已证实南极磷虾蛋白酶系中包含有 8 种蛋白水解酶:两种丝氨酸类胰蛋白酶,两种丝氨酸类胰凝乳蛋白酶,以及两种羧肽酶 A,两种羧肽酶 B<sup>[6]</sup>。本文以南极磷虾为研究对象,利用层析等分离纯化手段从南极磷虾体内分离纯化出一种蛋白酶,并对其酶学性质以及酶学动力学和抑制动力学进行研究,旨在为

南极磷虾蛋白酶的开发和利用提供理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 原料与试剂

实验用南极磷虾于 2012 年 3 月在南极 FAO 48.2 区捕捞, -20 ℃ 冷冻条件下于 2012 年 4 月运到实验室, -80 ℃ 条件下冷冻保存。

主要试剂为: Phenyl-Sepharose 1 mL、DEAE-Sepharose FF 1 mL 预装柱为 GE 公司产品;蛋白酶抑制剂 PMSF 为 Sigma 公司产品; BApNA 为 Sigma 公司产品; SDS-PAGE 用标准蛋白为上海升正生物技术公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

#### 1.2 仪器设备

主要设备有 SevenEasy pH 酸度计 (Mettler Toledo 公司); 凝胶成像仪 (Bio-Rad 公司); SS250-E 组织捣碎机 (方胜电器实业有限公司); DW-86L626 立式超低温冰箱 (海尔集团有限公司); GL-20G-II 冷冻离心机 (上海安亭科学仪器

收稿日期: 2014-03-14 修回日期: 2014-05-03

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2011AA090801)

作者简介: 田 鑫(1988—),男,硕士研究生,研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: tianxin8023@gmail.com

通信作者: 李 燕, E-mail: liyan@shou.edu.cn

厂);UNICO UV-2000 紫外可见分光光度计(北京谱析通用仪器有限责任公司);真空冷冻干燥器 CHRIST ALPHA1-2(北京博励行仪器有限公司);DYCZ-24D 垂直板电泳槽(北京市六一仪器厂);DYY-III 稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 酶的分离纯化

取解冻后完整南极磷虾,加入 2 倍体积的 50 mmol/L、pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液,利用组织捣碎机进行捣碎后,12 000 r/min、4 °C 离心 15 min。取上清液为粗酶液。取粗酶液加入硫酸铵至 30% 饱和度,静置 2 h 后,12 000 r/min、4 °C 离心 15 min,取上清液后继续加入硫酸铵至 70% 饱和度,静置 2 h,12 000 r/min、4 °C 离心 15 min 后保留沉淀。将沉淀加入 1 倍体积 50 mmol/L、pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液溶解并透析。将透析后样品加入硫酸铵至浓度为 1 mol/L,样品用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取 1 mL 上样于 AKTA Purifier 层析系统,Phenyl -Sephrose 疏水层析柱用含 1 mol/L 硫酸铵的 50 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液平衡,检测波长为 280 nm。洗脱速度为 1.0 mL/min,先用含 1 mol/L 硫酸铵的 50 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液洗脱出未结合蛋白。后用阶段式洗脱:10 CV (50% 含 1 mol/L 硫酸铵的 50 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl + 50% 50 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl) 洗脱,然后 10 倍柱体积(50 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl)洗脱,分部收集器收集洗脱液并检测蛋白酶活力。将疏水层析洗脱样品收集充分透析 12 h 后,样品于 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取 1 mL 上样,HiTrap DEAE-Sephrose FF 阴离子交换柱用 50 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液平衡,检测波长为 280 nm。洗脱速度为 1.0 mL/min。将未结合蛋白洗脱出后,采用梯度洗脱,10 倍柱体积通过盐浓度梯度变化(0 ~ 1.0 mol/L NaCl)将结合蛋白洗脱出来,分部收集器收集洗脱液并检测蛋白酶活力。

#### 1.3.2 蛋白浓度的测定

层析过程中蛋白含量用紫外检测器检测,检测波长为 280 nm。其他步骤中蛋白浓度用 Lowry 法<sup>[7]</sup>测定。

#### 1.3.3 蛋白酶活力测定

以 BApNA 为底物,测定胰蛋白酶活力。反应温度为 37 °C,反应体系为 1.8 mL 缓冲液(50

mmol/L pH 7.5 Tris-HCl) + 0.1 mL 酶液 + 0.1 mL BApNA(10 μmol/L)。410 nm 条件下测定反应 1 min 吸光度差值<sup>[8]</sup>。胰蛋白酶的活力单位(U)定义为每分钟转换 1 μmol 底物所需的酶量。空白管酶液以缓冲液代替。

#### 1.3.4 SDS-PAGE 电泳检测纯化效果及蛋白酶分子量的测定

各阶段的纯化效果及纯化蛋白酶的分子质量用 SDS-PAGE 电泳进行分析,电泳条件选择 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,以广谱蛋白质分子质量标准为对照,以考马斯亮蓝 R-250 进行染色。

#### 1.3.5 酶的性质分析

##### (1) 酶的最适作用温度及热稳定性

选择 4、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70 和 80 °C 测定蛋白酶活力。热稳定性实验将酶液于 4、10、20、30、40、50 和 60 °C 分别放置 15、30 和 60 min 后测定酶活力。

##### (2) 酶的最适 pH 和 pH 稳定性

向 pH 3、4、5、6、7、7.5、8、8.5、9、10、11、12、13 的缓冲液体系中分别加入酶液,测定不同 pH 条件下蛋白酶活力。pH 稳定性实验为将酶液置于不同的 pH(3 ~ 13)环境下处理 60 min 后,测定酶液残余酶活力。

##### (3) 金属离子对南极磷虾蛋白酶活性的影响

用 Tris-HCl 缓冲溶液(0.05 mol/L pH 7.5)配置 10 mmol/L Mg<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、K<sup>+</sup>、Al<sup>3+</sup> 离子溶液。测定在不同离子溶液条件下蛋白酶活力。

#### 1.3.6 酶的动力学和抑制动力学

##### (1) 南极磷虾蛋白酶水解 BApNA 反应的动力学

以浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1 mmol/L 的 BApNA 溶液为底物,在 37 °C、pH 7.5 反应条件下测定蛋白酶活力,Lineweaver-Buck 双倒数法计算 K<sub>m</sub> 和 V<sub>max</sub> 值。

##### (2) PMSF 对南极磷虾蛋白酶活力的影响

在底物浓度为 0.5 mmol/L 的反应体系中加入 0 ~ 70 μg/mL 的 PMSF 溶液,测定剩余酶活力,酶失活程度以使酶活性降低 50% 的抑制剂浓度来衡量(IC<sub>50</sub>)。

##### (3) PMSF 对南极磷虾蛋白酶的抑制动力学

向酶活力测定体系中加入 0、20、30 和 40 μg

的 PMSF 抑制剂,测定不同酶浓度的反应初速度。判断 PMSF 对南极磷虾蛋白酶的抑制类型。

## 2 结果与讨论

### 2.1 南极磷虾蛋白酶的分离纯化

#### 2.1.1 Phenyl-Sepharose 疏水层析

疏水层析是基于蛋白质的疏水差异,在高盐溶液中,蛋白质会与疏水配基相结合,而其他的杂蛋白则没有此种性质,利用此特性,可以将蛋白质初步分离,用于盐析之后的蛋白质进一步提纯。图 1 为南极磷虾蛋白酶 Phenyl-Sepharose 疏水层析结果。通过降低盐浓度的洗脱方法,将吸附于疏水层析柱的蛋白洗脱下来。在 280 nm 检测出现 3 个蛋白峰,第 3 个蛋白峰酶活力较高。从图中可知,经过疏水层析作用后,酶液中大量杂蛋白去除,活性峰部分蛋白含量较低。收集活性峰充分透析后,准备下一步纯化,并将收集组分通过 SDS-PAGE 检测纯化效果。

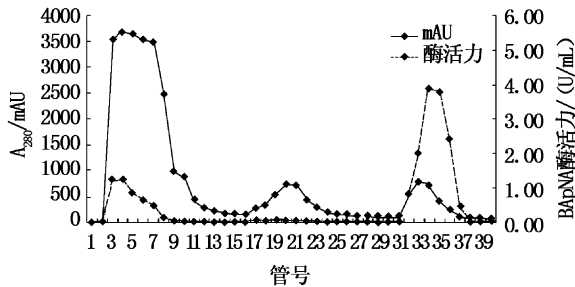


图 1 Phenyl-Sepharose 柱层析结果

Fig. 1 Phenyl-Sepharose column chromatography

#### 2.1.2 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析

离子交换层析是利用物质的酸碱性、极性,也就是所带阴阳离子的不同而对物质进行分离。电荷不同的物质,对离子交换剂有不同的亲和力,改变冲洗液的离子强度和 pH,物质能依次从层析柱中分离出来。图 2 为 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析结果,通过改变洗脱液中离子浓度的方法,将结合在离子交换柱上的蛋白质洗脱下来。洗脱过程中出现两个蛋白峰,对各个组分进行酶活检测,第二个检测峰酶活活性大,蛋白含量少。收集第二个蛋白峰组分,SDS-PAGE 电泳检测结果为单一条带,完成纯化过程。

#### 2.1.3 SDS-PAGE 电泳结果分析

从电泳图谱(图 3)可以看出,硫酸铵分级沉

淀后主要去除了大分子量杂蛋白,样品经过 Phenyl-Sepharose 疏水层析柱后,小分子量杂蛋白得以去除。通过 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析后,得到单一电泳条带,计算得该酶的分子质量约为 28 ku。ANHELLER 等<sup>[8]</sup>从南极磷虾的提取物中得到 3 种丝氨酸胰蛋白酶(TL I、II、III),相对分子质量为 24 ~ 33 ku。杭虞杰等<sup>[9]</sup>通过 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析与 Sephacryl S-200HR 凝胶层析结合的层析路线,从南极磷虾体内分离纯化出一种蛋白酶,分子质量约为 28 ku,与本文分离出的蛋白酶分子质量一致。

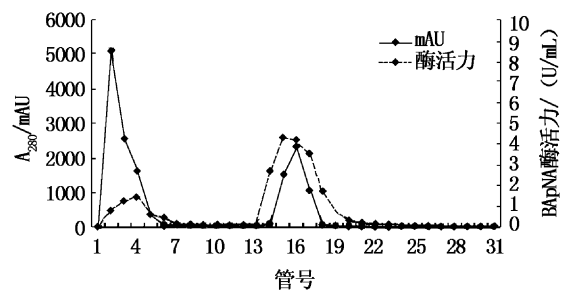


图 2 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析结果

Fig. 2 DEAE-Sepharose FF ion-exchange chromatography

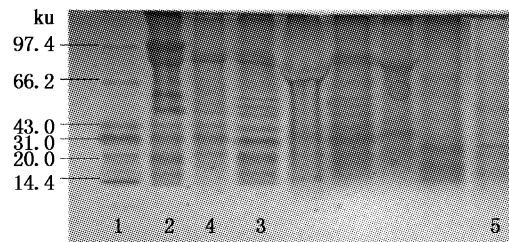


图 3 南极磷虾蛋白酶分离纯化结果电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE of the purification of *Euphausia superba* protease

1. Mark; 2. 粗酶液; 3. 盐析; 4. Phenyl-Sepharose 疏水层析; 5. DEAE-Sepharose 阴离子交换层析。

#### 2.1.4 南极磷虾蛋白酶的纯化结果

本研究对南极磷虾蛋白酶进行了 3 步纯化:硫酸铵分级沉淀、疏水层析、阴离子交换层析,最终南极磷虾蛋白酶的纯化倍数为 5.44 倍,回收率为 26%,纯化过程的酶活及蛋白含量变化见表 1。

表 1 南极磷虾蛋白酶纯化结果  
Tab. 1 Purification of a protease from *Euphausia superba*

纯化步骤	总蛋白/mg	总酶活/U	比活力/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
粗酶液	1071.2	7541.3	7.04	100	1
30% ~70% 硫酸铵分级沉淀	778.1	6410.1	8.24	84	1.17
Phenyl-Sepharose	125.8	3831.4	30.4	51	4.31
DEAE-Sepharose FF	50.6	1938.5	38.3	26	5.44

## 2.2 南极磷虾蛋白酶性质

### 2.2.1 南极磷虾蛋白酶最适温度

由于虾类生存环境及种属特性,酶反应的最适温度同样存在差异,虾类胰蛋白酶最适反应温度范围主要为 30 ~ 60 °C<sup>[10]</sup>。在 pH 7.5, 4 ~ 80 °C 反应温度范围内,南极磷虾蛋白酶具有酶活力。37 °C 为蛋白酶的最适反应温度;在 4 ~ 37 °C 范围内,随着温度上升,南极磷虾蛋白酶反应速率升高;37 ~ 80 °C 范围内,随着温度的逐渐升高,蛋白酶活力下降。南极磷虾蛋白酶在不同温度,相同的时间放置下,随着温度的增加,酶活损失增大(图 4)。相同温度放置下,随着温度的增加酶活损失增大。4 ~ 30 °C 保存南极磷虾蛋白酶,酶活力随时间的增加,有所下降,但损失较小。当温度为 30 °C 以上时,蛋白酶损失增大,40 °C 保温 15、30、60 min 酶活力损失分别为 20.13%、28.20% 和 43.12%。60 °C 保温 15、30、60 min 酶活力损失分别为 47.3%、76.4% 和 95.4%。60 °C 保温 60 min 后,剩余酶活力几乎为零(图 5)。研究表明南极磷虾蛋白酶的热稳定性相对较差。

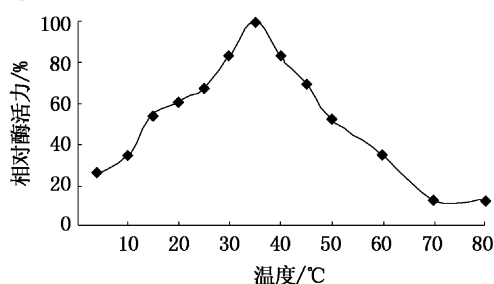


图 4 酶的最适温度

Fig. 4 Optimum temperature of the enzyme

### 2.2.2 南极磷虾蛋白酶最适 pH 及 pH 稳定性

海洋鱼类胰蛋白酶适宜 pH 一般为 7.0 ~ 9.0,在碱性条件下酶的稳定性高于酸性条件<sup>[11]</sup>。如图 6 所示,反应温度为 37 °C, pH 在 3.0 ~ 13 的反应体系中,南极磷虾蛋白酶具有酶活性。酶的

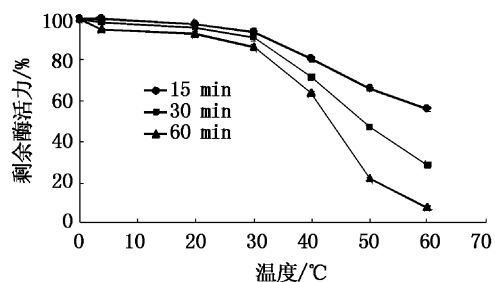


图 5 酶的热稳定性

Fig. 5 Thermo stability of the enzyme

最适 pH 为 7.5,在 pH 3.0 ~ 7.5 范围内,南极磷虾蛋白酶反应速率随 pH 增大逐渐升高,在 pH 7.5 ~ 13 范围内, pH 升高,酶活下降迅速。酶液在 pH 7.5 条件下保存 60 min 后,酶活力基本不变。在 pH 9 条件下,保存 60 min,剩余酶活力为 72%。pH 12 条件下保存 60 min,剩余酶活力仅为 20%。在 pH 7.0 ~ 9.0 范围内,蛋白酶较稳定,均保持 70% 以上的活力。在 pH 3.0 以下和 pH 12.0 以上时,蛋白酶不稳定,剩余酶活力在 20% 以下。

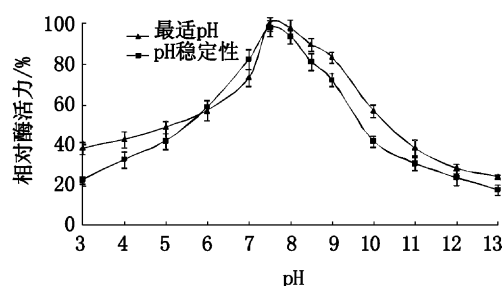


图 6 酶最适 pH 及 pH 稳定性

Fig. 6 Optimum pH and stability of the enzyme at different pH

### 2.2.3 金属离子对南极磷虾蛋白酶活性的影响

从表 2 看出,  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  能够一定程度地提高南极磷虾蛋白酶的活性;  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  对南极磷虾蛋白酶活性有较强抑制作用,为抑制剂,其中  $Cu^{2+}$  对南极磷虾蛋白酶的抑制率最强。

这可能是  $\text{Cu}^{2+}$  占据了酶的结合位点并同时改变了酶的构象,从而使酶活性受到明显抑制<sup>[12]</sup>。

表 2 金属离子对南极磷虾蛋白酶活性的影响  
Tab.2 Effect of metal ions on the activity of the protease from *Euphausia superba*

金属离子	相对酶活力/%
空白	100.00
$\text{Mg}^{2+}$	110.53
$\text{Ba}^{2+}$	72.30
$\text{Ca}^{2+}$	113.16
$\text{Zn}^{2+}$	68.42
$\text{Mn}^{2+}$	115.79
$\text{Cu}^{2+}$	23.68
$\text{Fe}^{3+}$	47.37
$\text{K}^{+}$	97.37
$\text{Al}^{3+}$	94.74

### 2.3 南极磷虾蛋白酶动力学及抑制动力学

#### 2.3.1 南极磷虾蛋白酶测定 BApNA 水解反应的动力学

米氏常数  $K_m$  反映了酶和底物的亲和力,实验根据 Lineweaver-Buck 双倒数图计算得到  $K_m$  为  $0.073 \text{ mmol/L}$ ,  $V_{\max}$  为  $1.44 \times 10^{-2} \text{ mmol/L} \cdot \text{s}$ ,  $k_{\text{cat}}$  为  $0.6 \text{ S}^{-1}$ ,  $k_{\text{cat}}/K_m$  为  $8.22 \times 10^3$ ,以 BApNA 为底物,南美白对虾蛋白酶  $K_m$  为  $0.00342$ <sup>[13]</sup>; 印度对虾  $K_m$  为  $0.249$ ,  $k_{\text{cat}}$  为  $0.91$ <sup>[14]</sup>;  $K_m$  较低说明南极磷虾蛋白酶与底物 BApNA 亲和力较强,且催化速率较高。

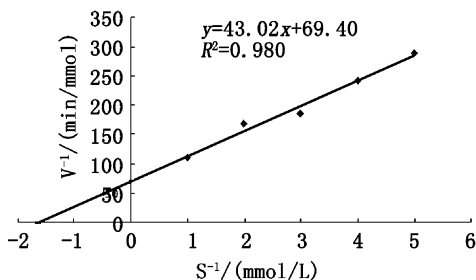


图 7 南极磷虾蛋白酶 Lineweaver-Buck 图  
Fig.7 Lineweaver-Buck plot of the protease from *Euphausia superba*

#### 2.3.2 PMSF 对南极磷虾蛋白酶活力的影响

PMSF 为胰蛋白酶抑制剂,对胰蛋白酶酶活具有抑制作用。JOHNSTON 等<sup>[16]</sup> 研究得到 PMSF、TLCK 和 SBTI 抑制剂对东方扁虾的胰蛋白酶反应活性抑制效果分别高达 97%、90% 和 92%。图 8 为不同浓度 PMSF 对南极磷虾蛋白酶

活力的影响,根据图中曲线可得  $\text{IC}_{50} = 30.2 \mu\text{g/mL}$ 。

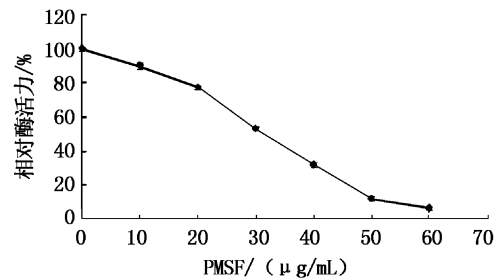


图 8 PMSF 对酶活力的影响  
Fig.8 Effect of PMSF on the activity of the protease

#### 2.3.3 PMSF 对南极磷虾蛋白酶抑制动力学

BUSTOS 等<sup>[17]</sup> 研究认为纯化后的南极磷虾胰蛋白酶活性受 PMSF、TLCK、Benzamidine 和 p-Amino benzamidine 的抑制,TPCK 对其活性无影响,推测为一种丝氨酸蛋白酶。从图中看出,在测定酶活系统中不加抑制剂时,初速度对酶浓度作图,为过原点直线。随着抑制剂的 PMSF 加入量的增大,酶的初速度曲线向右移动,判断 PMSF 对南极磷虾蛋白酶抑制作用为不可逆抑制。

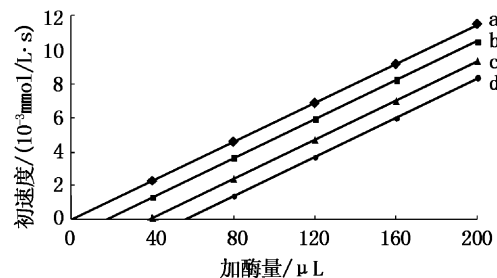


图 9 不同浓度 PMSF 对酶的反应初速度的影响  
Fig.9 Effect of PMSF with different concentrations on the initial velocity of the protease  
PMSF 加入量: a. 0; b. 20  $\mu\text{g}$ ; c. 30  $\mu\text{g}$ ; d. 40  $\mu\text{g}$ 。

## 3 结论

实验通过以疏水层析和离子交换层析结合的层析纯化手段得到电泳纯南极磷虾蛋白酶,酶的最适 pH 为 7.5,最适温度为  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,在 pH 为 7.0~9.0 时具有较好稳定性,30~60  $^\circ\text{C}$  为南极磷虾蛋白酶的适合温度。 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  能促进蛋白酶活性, $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  对南极磷虾蛋白酶活性有较强抑制作用,其中  $\text{Cu}^{2+}$  抑制性最强。以 BApNA 为底物,该酶的  $K_m$  为  $0.073$

mmol/L,  $V_{\max}$  为  $1.44 \times 10^{-2}$  mmol/L · s,  $k_{\text{cat}}$  为  $0.6 \text{ S}^{-1}$ ,  $k_{\text{cat}}/K_m$  为  $8.22 \times 10^3$ 。PMSF 对南极磷虾蛋白酶作用为不可逆抑制。

对南极磷虾蛋白酶理化性质的探讨,有助于加深对抗极磷虾生理的了解,为磷虾的捕捞和加工提供理论依据,也为该酶的应用提供一定的理论基础。

#### 参考文献:

- [1] 黄洪亮,陈雪忠,冯春雷. 南极磷虾资源开发现状分析[J]. 渔业现代化,2007, 34(1): 48-51.
- [2] 孙松,严小军. 南极大磷虾的生物活性物质及其用途研究进展[J]. 极地研究,2011, 13(3):412-414.
- [3] 谢营梁. 南极大磷虾开发利用的现状和趋势[J]. 现代渔业信息,2004,19(4):18-20.
- [4] 陈雪忠,徐兆礼,黄洪亮. 南极磷虾资源利用现状与中国的发策略分析[J]. 中国水产科学,2009,16(3):451-458.
- [5] SJODSAHL J,EMMER A,VINCENT J,et al. Characterization of proteinases from Antarctic krill (*Euphausia superba*) [J]. Protein Expression and Purification, 2002, 26(1): 153-161.
- [6] OSNER K K,MOHR V. On the purification and characterization of exopeptidases from antarctic krill, (*Euphausia superba*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry,1986,83(2):445-458.
- [7] 向宇,南极大磷虾(*Euphausia superba*)胰蛋白酶样酶分离纯化、酶学性质探索及其生物学活性研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2011.
- [8] ANHELLER J E,HELLGREMN L,KARLSTAM B, et al. Biochemical and biological profile of a new enzyme preparation from Antarctic krill (*E. superba*) suitable for debridement of ulcerative lesions [J]. Archives of Dermatological Research, 1989,281(2): 105-110.
- [9] 杭虞杰,李学英,杨宪时,等. 南极磷虾蛋白酶分离纯化及部分性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(10): 92-95.
- [10] 王萍,吴燕燕,李来好. 虾类胰蛋白酶的研究进展[J]. 生物技术通报,2011(2):43-47.
- [11] 张美红,胡重江,李英文. 国内外关于鱼类胰蛋白酶的研究进展[J]. 饲料工业,2006,27(2):20-22.
- [12] 洪法水,王玲,吴康.  $\text{Pb}^{2+}$  对胰蛋白酶活性影响的作用机理研究[J]. 无机化学学报,2003,2(2):129-132.
- [13] CARLOS S J,GARCIA C F L,HERNANDEZ C P. isotrypsins: purification and characterization [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology,2004,138(2):155-162.
- [14] HONJO L, KIMURA S, NONAKA M. Purification and characterization of trypsin-like enzyme from shrimp *Penaeus indicus*[J]. Nippon Suisan Gakkaishi,1990,56(10):1627-1634.
- [15] JOHAN S,ASA E,JAN V,et al. Characterization of proteinases from Antarctic krill (*Euphausia superba*) [J]. Protein Expression and Purification,2002(26):153-161.
- [16] JOHNSTON D, HENMANS M, YELLOWLEES D. Isolation and Characterization of a Trypsin from the Slipper Lobster, (*Thenus orientalis* Lund) [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics,1995, 324(1):35-40.
- [17] BUSTOS R O,ROMO C R,HEALY M. Purification of trypsin-like enzymes from Antarctic krill processing wastewater[J]. Process Biochemistry,1999,35(3):327-333.

## Purification and characterization of serine proteinase from *Euphausia superba*

TIAN Xin, WANG Zhi-he, SHI Wen-zheng, LI Yan

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** A serine protease from *Euphausia superba* was purified by a series of procedures, including ammonium sulfate precipitation, column chromatographies on DEAE-Sepharose and Phenyl-Sepharose. The purification multiple of the protease was 5.44 times, and the yield of the protease was 26%, with specific activity of 38.3 U/mg. As shown in the result of SDS-PAGE electrophoresis, the molecular weight of this protease is 28 ku. The optimum temperature of protease was 37 °C and the most suitable pH was 7.5.  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  were activated to protease from *Euphausia superba*. However,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Fe^{3+}$  were inhibited to the enzyme activity, and the inhibition ability of  $Cu^{2+}$  was the strongest. The enzyme kinetics experiments were performed by using BApNA as substrate. The results showed that the  $K_m$  value was 0.073 mmol/L,  $V_{max}$  value was  $1.44 \times 10^{-2}$  mmol/L · s,  $k_{cat}$  value was  $0.6 S^{-1}$  and  $k_{cat}/K_m$  value was  $8.22 \times 10^3$ . PMSF was a protease inhibitor, and its mechanism of action was irreversible inhibition.

**Key words:** *Euphausia superba*; protease; purification; enzymatic properties