

文章编号:1673-1689(2005)03-0084-03

蛋白酶 A 抑制剂 GLPAI 动力学性质的研究

李屹松, 田亚平

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要:对一种从灵芝发酵液中提取得到的蛋白酶 A 抑制剂 GLPAI(*Ganoderma Lucidum* proteinase A inhibitor)的动力学性质进行了研究,分别以胃蛋白酶、胰蛋白酶和蛋白酶 A 为底物考察了 GLPAI 的动力学性质,实验结果:GLPAI 对上述 3 种蛋白酶的抑制类型均属于混合型抑制模式,对胃蛋白酶的 $K_i=4.64(\mu\text{mol/L})$;对胰蛋白酶的 $K_i=33.5(\mu\text{mol/L})$;对蛋白酶 A 的 $K_i=2.7(\mu\text{mol/L})$.

关键词:蛋白酶 A 抑制剂;胃蛋白酶;胰蛋白酶;动力学; K_i

中图分类号:Q 55

文献标识码: A

The Kinetic Characteristics of Proteinase A Inhibitor GLPAI

LI Yi-song, TIAN Ya-ping

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract: The kinetic characteristics of proteinase A inhibitor GLPAI, separated and purified from the broth of *Ganoderma Lucidum*, was discussed in this paper. The results were shown as follows: the inhibition patterns of GLPAI to pepsin, trypsin and proteinase A were all mixed inhibiting type; the kinetic parameters (K_i) of pepsin, trypsin and proteinase A were $4.64(\mu\text{mol/L})$, $33.5(\mu\text{mol/L})$, $2.7(\mu\text{mol/L})$, respectively.

Key words: proteinase A inhibitor; pepsin; trypsin; kinetics; K_i

纯生啤酒在包装前未经过巴氏灭菌,因而由酵母分泌的少量蛋白酶活性得以存留下来,继而在啤酒储存及货架寿命中对泡持性蛋白进行降解,从而使纯生啤酒的泡沫变得较差.许多实验研究已证实其中起主要作用的是蛋白酶 A(Proteinase A,简称 PrA)^[1].为了提高啤酒泡沫的稳定性,人们对蛋白酶 A 及其抑制剂进行了大量的研究.目前对蛋白酶 A 的结构和特性的了解越来越深入,已经进入到分子水平,推测蛋白酶 A 的活性中心与天冬氨酸族氨基酸相似^[2].对蛋白酶 A 抑制剂的研究,特别是提取的天然生物抑制剂的研究,国内鲜有报导.国外

学者已经从西红柿和马铃薯提取出蛋白酶 A 抑制剂^[3].作者对一种从灵芝发酵全粉中提取的蛋白酶 A 抑制剂(GLPAI)的动力学性质进行了研究,为进一步深入了解其抑制特性及其应用打下一定的基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 胃蛋白酶:中国医药集团上海化学总公司,国产分装;胰蛋白酶:上海伯奥科技有限公司,国产分装;血红蛋白:上海丽珠东风生物技术有

收稿日期:2004-09-22; 修回日期:2005-03-14.

作者简介:李屹松(1977-),男,湖北荆州人,发酵工程硕士研究生.

万方数据

限公司;灵芝发酵全粉:实验室自制;蛋白酶 A:实验室自制;其余试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器 高速冷冻离心机 himac CR22G;日本日立 HITACHI 公司;其余均为国产常规设备。

1.2 试验方法

1.2.1 蛋白酶 A 提取工艺(经改良) 500 g 活性干酵母中加入 1 000 mL 蒸馏水搅拌溶解,静置 2 h,加入 220 mL 三氯甲烷,静置 0.5 h,然后调 pH 值 7.0,加入少许甲苯覆盖,30 ℃ 静置过夜;混合液离心,收集上清液,调 pH 值 5.0,加入少量甲苯覆盖,30 ℃ 静置过夜;混合液离心,收集上清液,然后向上清液中加入固体硫酸氨,使盐质量浓度达 70 g/dL,混合液离心,收集沉淀;沉淀用 0.01 mol/L pH 值 6.0 的磷酸钠缓冲液溶解,离心,上清即为蛋白酶 A 粗酶液;粗酶液经 DEAE 离子交换层析,用氯化钠进行不连续梯度浓度洗脱,收集 0.35 mol/L 洗脱部分,经冷冻干燥即得所需的蛋白酶 A^[1]。

1.2.2 抑制剂的提取 灵芝发酵全粉与水按 1 g : 10 mL 混合,于 40 ℃ 下保温 0.5 h,过滤后收集滤液,加入无水乙醇,使醇沉饱和度达 50%,离心,收集上清液,继续滴加无水乙醇,使醇沉饱和度达 60%,离心,收集沉淀,沉淀用 0.01 mol/L, pH 值 7.0 的磷酸钠缓冲液溶解,离心,收集上清液,反复醇沉脱色后即粗抑制剂;粗抑制剂经 Ultrogel AcA44 分子筛层析,收集相对分子质量 38 000 的部分即为 GLPAI。

1.2.3 抑制剂动力学性质研究 以质量浓度分别为 1.2, 0.6, 0.4, 0.3, 0.25, 0.2 g/dL 的血红蛋白为底物,分别考察 GLPAI 对胃蛋白酶,胰蛋白酶和蛋白酶 A 的动力学性质^[4,5]。

酶活力定义:40 ℃ 时,每分钟分解血红蛋白产生 1 μmol 酪氨酸所需酶量即为一个酶活单位。

2 结果与讨论

2.1 GLPAI 对胃蛋白酶的动力学分析

以不同浓度的血红蛋白为底物,分别在无 GLPAI,有 GLPAI 的情况下,测定胃蛋白酶的酶反应曲线,结果见图 1、图 2。

由图 2 可得出, $K_m = 146.4$ (μmol/L), $V_m = 1.44 \times 10^4$ (μ/L · min), $K_m' = 80$ (μmol/L), $V_m' = 1.38 \times 10^3$ (μ/L · min)。GLPAI 对胃蛋白酶的作用:一方面,在抑制剂存在下, V_m 和 K_m 都下降了,类似于反竞争性抑制作用(反竞争性抑制类型的特点是抑制剂的条件下, V_m 和 K_m 都同等程度的下

降)^[6];另一方面, V_m 下降的幅度比 K_m 大得多,这类类似于非竞争性抑制作用,因此将这类混合型抑制称为非竞争和反竞争性混合抑制作用^[6,7]。 $K_m/V_m \times (1 + [c_i]/K_i) = 0.582$, 其中 $[c_i]$ 为抑制剂浓度 = 2.2 (μmol/L)。

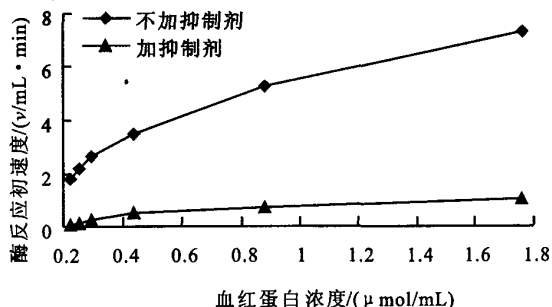


图 1 GLPAI 对胃蛋白酶的 V-S 图

Fig. 1 Reaction curves of GLPAI on pepsin

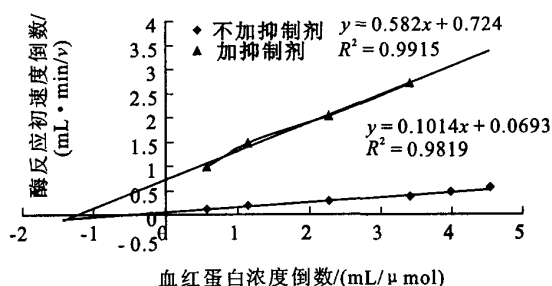


图 2 GLPAI 对胃蛋白酶的双倒数图

Fig. 2 L-B plot of GLPAI on pepsin

计算可得 GLPAI 对胃蛋白酶的 $K_i = 4.64$ (μmol/L), 抑制类型为非竞争和反竞争性混合抑制作用。

2.2 GLPAI 对胰蛋白酶的动力学分析

分别在无 GLPAI 与有 GLPAI 的情况下,测定胰蛋白酶的酶反应曲线,结果见图 3、4。

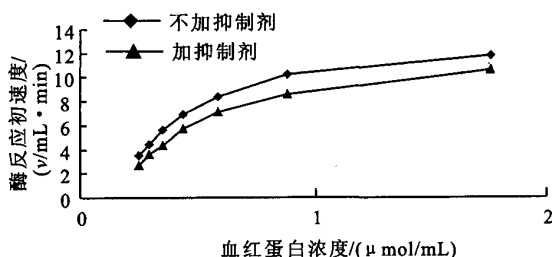


图 3 GLPAI 对胰蛋白酶的 V-S 图

Fig. 3 Reaction curves of GLPAI on trypsin

由图 4 可得出, $K_m = 50$ (μmol/L), $V_m = 1.61 \times 10^4$ (μ/L · min), $K_m' = 70$ (μmol/L), $V_m' = 1.51 \times 10^4$ (μ/L · min)。GLPAI 对胰蛋白酶的作用:一方面不改变最大反应速度(从图 3 可以看出),类似

于非竞争性抑制作用;另一方面,抑制剂结合以后, K_m 增大,这又类似于竞争性抑制作用,因此称这种抑制类型为竞争与非竞争性混合抑制作用^[6]. $K_m/V_m \times (1 + [c_1]/K_i) = 0.0465$, 其中 $[c_1] = 1.1$ ($\mu\text{mol/L}$).

计算可得 GLPAI 对胰蛋白酶的 $K_i = 33.5$ ($\mu\text{mol/L}$),抑制类型属于竞争与非竞争性混合抑制作用.

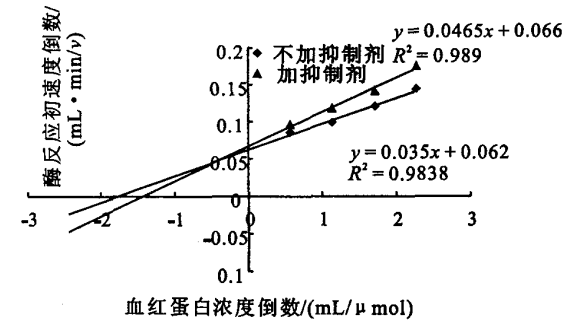


图 4 GLPAI 对胰蛋白酶的双倒数图
Fig. 4 L-B plot of GLPAI on trypsin

2.3 GLPAI 对蛋白酶 A 的动力学分析

以不同浓度的血红蛋白为底物,分别在无 GLPAI 与有 GLPAI 的情况下测定蛋白酶 A 的酶反应曲线,结果如图 5 和图 6.

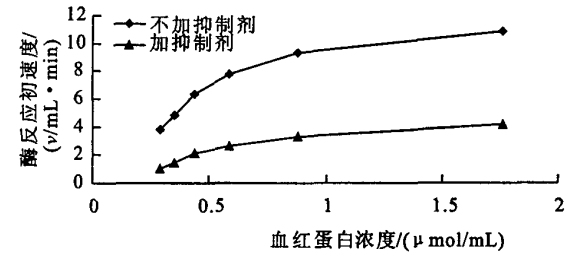


图 5 GLPAI 对蛋白酶 A 的 V-S 图
Fig. 5 Reaction curves of GLPAI on proteinase A

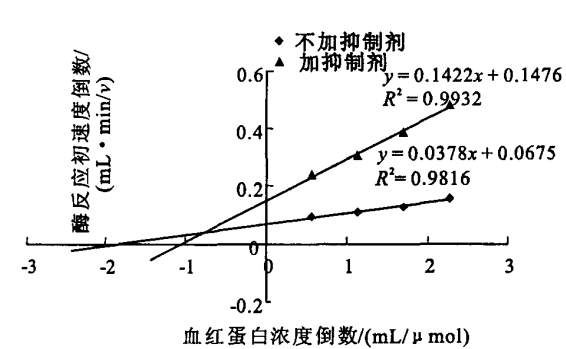


图 6 GLPAI 对蛋白酶 A 的双倒数图
Fig. 6 L-B plot of GLPAI on proteinase A

由图 6 可得出, $K_m = 56$ ($\mu\text{mol/L}$), $V_m = 1.48 \times 10^4$ ($\mu\text{mol/L} \cdot \text{min}$), $K_m' = 96$ ($\mu\text{mol/L}$), $V_m' = 0.67 \times 10^4$ ($\mu\text{mol/L} \cdot \text{min}$), GLPAI 对蛋白酶 A 的作用,一方面 V_m 下降,类似于反竞争性抑制作用;另一方面, K_m 增大,类似于竞争性抑制作用,因此称这种抑制类型为反竞争与非竞争性混合抑制作用^[6].

$K_m/V_m \times (1 + [c_1]/K_i) = 0.1422$, 其中 $[c_1] = 7.47$ ($\mu\text{mol/L}$), 计算可得 GLPAI 对蛋白酶 A 的 $K_i = 2.7$ ($\mu\text{mol/L}$).

表 1 GLPAI 对三种蛋白酶的作用

GLPAI	$K_i/(\mu\text{mol/L})$	$Ic_{50}/(\text{g/L})$
胃蛋白酶	4.64	0.182
胰蛋白酶	33.5	0.283*
蛋白酶 A	2.7	0.161

注:表中 Ic_{50} 是指抑制率达到 50% 时所需的抑制剂的浓度;
* 为由于 GLPIA 对胰蛋白酶的抑制作用较弱,0.283(蛋白质 g/L)为抑制率达到 20% 时所需的抑制剂的浓度 Ic_{20} .

实验结果表明, GLPAI 对蛋白酶 A 的 K_i 比胃蛋白酶的小,对蛋白酶 A 的 Ic_{50} 也较小,说明 GLPAI 对蛋白酶 A 的抑制作用较强.

3 结 论

本文研究了从灵芝发酵全粉中提取得到的 GLPAI 对胃蛋白酶、胰蛋白酶和蛋白酶 A 的动力学性质,实验结果表明: GLPAI 对胃蛋白酶的抑制类型为非竞争和反竞争性混合抑制作用,对胰蛋白酶和蛋白酶 A 的抑制类型为竞争和非竞争性混合抑制作用;对胃蛋白酶的 K_i 为 $4.64(\mu\text{mol/L})$,对胰蛋白酶的 K_i 为 $33.5(\mu\text{mol/L})$,对蛋白酶 A 的 K_i 为 $2.7(\mu\text{mol/L})$. 因胃蛋白酶和蛋白酶 A 都属于天冬氨酸族蛋白酶^[2],可以推测 GLPAI 对天冬氨酸族蛋白酶有较强的抑制作用. 胃蛋白酶抑制剂有很好的临床应用前景,可以用于治疗胃炎,胃溃疡等疾病^[8];蛋白酶 A 抑制剂在啤酒行业,特别是纯生啤酒中有良好的应用前景. 作者对 GLPAI 动力学常数及抑制类型的研究,可以进一步揭示灵芝发酵全粉中 GLPAI 的生化性质,为其应用开发奠定理论基础.

(下转第 93 页)

3 结 论

在菊花曲奇饼干的烘焙过程中,菊花中部分特有的挥发类物质也有所损失,可能还有一些挥发类

物质改变了其最初的化学组成,转变为新的化合物。菊花的加入赋予了曲奇饼干特殊的风味,在菊花曲奇饼干的香气组成中,菊烯、樟脑、 β -榄香烯、龙脑代表了菊花本身的香气组成。

参考文献:

- [1] 李英霞,彭广芳,王小梅. 菊花的药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 1998, 9(6):6.
- [2] 于善凯,张英,吴晓琴. 杭白菊的营养成分及其生物活性[J]. 中国食物与营养, 2002, 2:50-51.
- [3] 蒋惠娣,夏强,徐万红. 杭白菊的心血管药理作用及其机制研究进展[J]. 世界科学技术-中药现代化, 2002, 4(2):31-34.
- [4] Hill P G, Smith R M. Determination of sulphur compounds in beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis with pulsed flame photometric detection[J]. *J of Chromatography A*, 2000, 872(1-2): 203-209.
- [5] Deng C H. Rapid determination of volatile constituents of *Michelia alba* flowers by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase microextraction[J]. *J of Chromatography A*, 2002, 942(1-2): 283-288.
- [6] Bouaid A, Ramos L, Gonzalez M J. Solid-phase microextraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in soil samples by gas chromatography[J]. *J of Chromatography A*, 2001, 939(1-2): 13-21.
- [7] Cai Jibao, Liu Baizhan, Ling Ping. Analysis of free and bound volatiles by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry in uncured and cured tobaccos[J]. *J of Chromatography A*, 2002, 947(2): 267-275.
- [8] Eisert Ralf, Jackson Scott, Krotzky Arno. Application of on-site solid-phase microextraction in aquatic dissipation studies of profluthrin in rice[J]. *J of Chromatography A*, 2001, 909(1): 29-36.
- [9] Snow, Nicholas H. Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices[J]. *J of Chromatography A*, 2000, 885(1-2): 445-455.

(责任编辑:朱明)

(上接第86页)

- [1] Franz Meussdoerffer, Paolo tortora and helmut holzer. Purification and properties of proteinase A from yeast[J]. *J Biol Chem*, 1980, 25:12087-12093.
- [2] C F Aguilar, N B Cronin, M Badasso, *et al.* The three-dimensional structure of glycosylated proteinase A from the lysosome-like vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *J Mol Biol*, 1997, 267:899-915.
- [3] Simon A Cater, Wendy E Lees, Jeffrey Hill, *et al.* Aspartic proteinase inhibitors from tomato and potato are more potent against yeast proteinase A than cathepsin D[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1596:76-82.
- [4] 施特尔马赫. 酶的测定方法[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1992. 212-218.
- [5] 王琳芳. 蛋白质与核酸[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 316-327.
- [6] 颜思旭. 酶催化动力学原理与方法[M]. 厦门:厦门大学出版社, 1991. 98-148.
- [7] Brett I Plutschke, Joze Brzin, John Kay, *et al.* Ostrich Pepsins I and II: A kinetic and thermodynamic investigation[J]. *J Biochem Cell Biol*, 1995, 27(12):1293-1302.
- [8] 陈伟,赵永芳. 大孔吸附剂提取抑胃酶剂的研究[J]. 福建药学杂志, 1990, (1):19-22.

(责任编辑:杨萌)