

## 固相酶法分离大豆胰蛋白酶抑制剂研究

陈 滴, 刘银燕, 杨锦竹, 王广树, 杨晓虹

(吉林大学 药学院, 吉林 长春 130021)

**摘 要:**以硅胶-壳聚糖为载体,通过戊二醛偶联胰蛋白酶,制备固定化酶,分离纯化大豆中胰蛋白酶抑制剂。对戊二醛浓度、反应温度、酶浓度等影响固定化酶制备的因素进行了研究。戊二醛的浓度为2.0%,反应温度为20℃,胰蛋白酶与载体比为15:1 000时,分离纯化的大豆胰蛋白酶抑制剂活性最高,达 $1872.51 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,比粗品高46.22倍。结果表明通过该法能够获得较高活性大豆胰蛋白酶抑制剂,为大豆胰蛋白酶抑制剂的开发利用提供了依据。

**关键词:**固相酶法;大豆;胰蛋白酶抑制剂

中图分类号:TQ646.5

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2010)06-1056-03

## Separating Soybean Trypsin Inhibitors with Solid-Phase Enzyme Method

CHEN Di, LIU Yin-yan, YANG Jin-zhu, WANG Guang-shu, YANG Xiao-hong

(School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, Jilin, China)

**Abstract:** In order to separate and purify the soybean trypsin inhibitors, immobilized trypsin was prepared by coupling silicone-chitosan activated carriers with trypsin using glutaraldehyde as coupling agents. The influence factors of coupling reaction including glutaraldehyde concentration, reaction temperature and trypsin concentration were investigated and the results showed that the best conditions were as follow: the concentration of glutaraldehyde was 2.0%, the temperature was 20℃, and the ratio of trypsin with silicone-chitosan was 15: 1 000. The activity of soybean trypsin inhibitors isolated by the above immobilized trypsin was  $1872.51 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , and the purified degree increased 46.22 times. The results suggested that soybean trypsin inhibitors with higher activity can be obtained by this method and it is a better way to exploit the soybean trypsin inhibitors.

**Key words:** Solid-Phase enzyme method; Soybean; Trypsin Inhibitors

大豆胰蛋白酶抑制剂(Soybean trypsin inhibitor, SBTI)主要有2种抑制胰蛋白活力的抑制剂。Kunitz首次从大豆中分离出Kunitz型胰蛋白酶抑制剂,其分子量约为25000,在大豆中的含量为1.4%。Bowman从大豆中丙酮不溶因子中分离出另一种胰蛋白酶抑制剂BBI,分子量6000~10000,含有较多半胱氨酸,在大豆中的含量约为0.6%<sup>[1]</sup>。大豆胰蛋白酶抑制剂药效研究较为深入,SBTI除能抑制胰蛋白酶活性,还能治疗急性胰腺炎,防治脑血管疾病,抑制肿瘤细胞浸润和转移等<sup>[2]</sup>。SBTI分离纯化方法主要有树脂、葡聚糖凝胶、纤维素等吸附层析法、固定化酶法等。酶固定化载体主要有硅胶、树脂、壳聚糖、纤维素等。该研究优选出载体制备条件、酶固定化条件及SBTI分离纯化条件,先用壳聚糖涂布硅胶表面,再用戊二醛偶联胰蛋白酶与壳聚糖载体使胰蛋白酶固定化,然后用固定化酶分离纯化大豆胰蛋白酶抑制剂,该法所得产品纯度高,收率高,为其新药研究开发提供分离方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与药品

岛津-1240紫外可见分光光度计:岛津公司;FD-1冷冻干燥机:北京博医康公司;8823A-UV紫外检测仪:北京市新技术应用研究所;200A高速低温离心机:日本久保田公司;大豆:长春市售;苯甲酰-L-精氨酸乙酯(BAEE):Sigma公司;胰蛋白酶:北京格源天润生物技术有限公司,活性比2450  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ;胰蛋白酶抑制剂(SBTI):Sigma公司;壳聚糖:山东青岛东奥康生物科技有限公司;戊二醛:上海化学试剂公司,浓度25%;戊二醛标准品:中国药品生物制品检定所;透析袋:mwco-5000,上海绿鸟科技发展有限公司;硅胶:青岛海洋化工厂,化学纯;其它试剂均为分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 固定化胰蛋白酶制备 称取壳聚糖4 g,加去离子水100 mL,冰醋酸80 mL,在50℃水浴中搅

收稿日期:2010-06-01

第一作者简介:陈滴(1957-),男,高级工程师,研究方向为药物化学教学与科研工作。E-mail:chendi@jlu.edu.cn。

通讯作者:杨晓虹,教授,博士生导师。E-mail:yangxiaoh@jlu.edu.cn。

拌溶解,加入 100 目硅胶 60 g,室温下搅拌 12 h。过滤,沉淀用去离子水洗至中性,干燥,得活化载体 I。称取活化载体 I 2.0 g,加 2.0% 的戊二醛溶液 20 mL,在 20℃ 下搅拌活化 4 h,离心,沉淀用去离子水洗,干燥,得戊二醛修饰活化载体 II;称取戊二醛修饰活化载体 II 2.0 g,加入浓度为  $1.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的胰蛋白酶 0.1 mol 磷酸缓冲液 (pH8.0) 20 mL,在 10℃ 下搅拌 12 h,过滤,用 0.1 mol 磷酸缓冲液 (pH8.0) 充分洗涤,干燥即得浅黄色的固定化胰蛋白酶载体 III<sup>[3]</sup>,测定胰蛋白酶活性<sup>[4]</sup>。并于 4℃ 的冰箱中保存备用。

**1.2.2 大豆胰蛋白酶抑制剂 (SBTI) 分离纯化** 大豆粉碎、筛分 80 ~ 120 目大豆粉,称取 300 g 大豆粉,加  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-Cl 缓冲液 1500 mL,搅拌 2 h,放置 12 h,过滤,提取 2 次,滤液加入饱和硫酸铝钾沉淀杂蛋白,  $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,离心 20 min,分出上清液,调 pH 至 4.5,放置 12 h,沉淀,过滤,滤饼溶解于  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaHCO}_3$  溶液中 (pH = 8.2),在  $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,离心 20 min,上清溶液透析 48 h,减压浓缩,冷冻干燥,即得 SBTI 粗品,测定其活力为  $40.51 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。将制得的固定化酶 30 g 装柱,用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液 (pH8.0) 平衡 1 h,称取 SBTI 粗品 0.866 g 溶于 20 mL  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液 (pH8.0) 上样。用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液 (pH8.0) 洗脱杂蛋白,分别用  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  醋酸钠-醋酸缓冲液 (pH4.0) 和  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  醋酸钠-盐酸 (pH1.5) 溶液洗脱,流速  $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,在 280 nm 波长测定蛋白吸收值,收集含蛋白组分,分别测定胰蛋白酶抑制剂活性,合并有活性部分,浓缩至 1/3 体积,透析,冷冻干燥得白色粉末状 SBTI  $18.54 \text{ mg}^{[5]}$ ,测定其抑制胰蛋白酶活力。

### 1.3 固定化胰蛋白酶制备条件的考察

**1.3.1 戊二醛浓度对戊二醛修饰固定化载体的影响** 分别量取 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 的戊二醛溶液 20 mL,加 2 g 活化载体 I,按 1.2.1 所述试验方法制备固定化胰蛋白酶。

**1.3.2 温度对戊二醛修饰固定化载体的影响** 配制 2.0% 戊二醛溶液 20 mL,加 2.0 g 活化载体 I,分别在 10℃、20℃、30℃、40℃、50℃ 下,按 1.2.1 所述试验方法制备固定化胰蛋白酶。

**1.3.3 胰蛋白酶浓度对酶与载体结合的影响** 称取活化载体 II 2.0 g,分别加入 1.00、1.25、1.50、1.75、2.00  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的胰蛋白酶 20 mL,按 1.2.1 所述试验方法制备固定化胰蛋白酶。

## 2 结果与分析

### 2.1 戊二醛浓度对戊二醛修饰固定化载体的影响

通过选择不同浓度的戊二醛,按 1.2.1 所述方法制备固定化胰蛋白酶,研究戊二醛浓度对制备固定化胰蛋白酶的影响。结果表明戊二醛浓度在 1.5% ~ 3.0% 范围内,固定化胰蛋白酶活性呈先升高后降低的趋势,2.0% 戊二醛浓度所得固定化胰蛋白酶活性较高,因此确定戊二醛最佳浓度为 2.0% (图 1)。

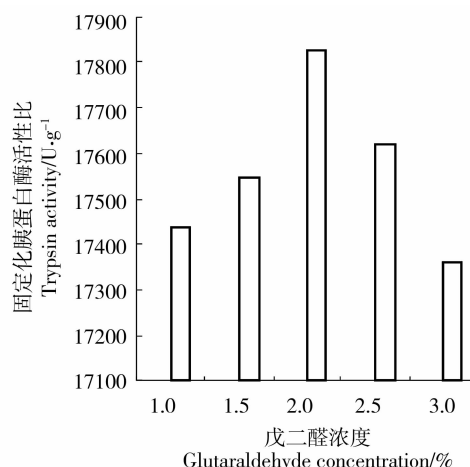


图 1 戊二醛浓度对载体修饰的影响

Fig. 1 Influence of glutaraldehyde concentration on the modification of vector

### 2.2 温度对戊二醛修饰固定化载体的影响

选择不同的温度,按 1.2.1 所述方法制备固定化胰蛋白酶,研究温度对制备固定化胰蛋白酶的影响。结果表明温度在 10 ~ 50℃ 范围,对戊二醛修饰固定化载体反应影响较小,因此为了使反应容易控制,温度选择为 20℃ (图 2)。

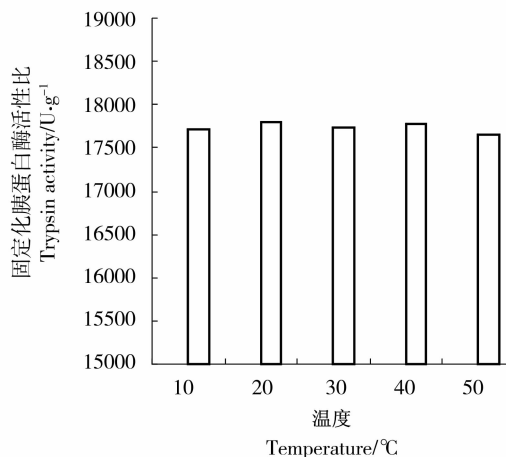


图 2 温度对戊二醛修饰固定化载体的影响

Fig. 2 Influence of temperature on the modification of vector with modification glutaraldehyde

2.3 胰蛋白酶与载体的影响

通过选择不同浓度的胰蛋白酶,按 1.2.1 所述方法制备固定化胰蛋白酶,研究胰蛋白酶浓度对制备固定化胰蛋白酶的影响。结果表明固定化酶活力随胰蛋白酶浓度的增加而增加,当胰蛋白酶浓度超过 1.50 mg · mL<sup>-1</sup>时,固定化酶活力的增加不明

显;固定化酶活力回收率随胰蛋白酶浓度的增加而降低。当胰蛋白酶浓度为 1.50 mg · mL<sup>-1</sup>,胰蛋白酶与载体比率为 15:1 000 时,固定化酶活力高,固定化酶活力回收率降低不明显。因此胰蛋白酶的最佳浓度为 1.50 mg · mL<sup>-1</sup>,折合成胰蛋白酶与载体比率为 15:1 000。

表 1 胰蛋白酶浓度对酶与载体结合的影响

Table 1 Influence of enzyme concentration on enzyme binding with vector

测定指标 Index	胰蛋白酶浓度 Trypsin concentration/mg · mL <sup>-1</sup>				
	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00
胰蛋白酶量 Amount of trypsin/mg	20	25	30	35	40
胰蛋白酶与载体比率 Ratio of trypsin with silicone-chitosan	10:1000	12.5:1000	15:1000	17.5:1000	20:1000
固定化酶活力 Activity of immobilized enzyme/U	27950	31075	35480	36175	36240
固定化酶活力比 Ratio of immobilized enzyme activity/U · g <sup>-1</sup>	13975	15537	17740	18087	18120
固定化酶活力回收率 Recovery of immobilized enzyme activity/%	57.15	50.73	48.27	42.18	36.97

2.4 大豆胰蛋白酶抑制剂(SBTI)分离纯化

大豆胰蛋白酶抑制剂粗品经固定化酶亲和层析纯化,获得活性较高的胰蛋白酶抑制剂,试验结果表明经醋酸盐洗脱所得纯化大豆胰蛋白酶抑制剂组分活力较粗品提高 46.22 倍(结果未显示)。

40.51 U · mg<sup>-1</sup>提高到 1872.54 U · mg<sup>-1</sup>,抑制活性提高 46.22 倍。该方法是在实验室条件下建立的,应用于工业化生产还需进一步研究。

3 讨论

固定化载体选择壳聚糖是由于壳聚糖具有许多优点,壳聚糖分子中有许多游离氨基,可以和戊二醛等双功能试剂发生交联,其活性基团能连接多种酶;壳聚糖分子之间的交联形成立体网络结构易成膜,韧性好,亲水性大,对酶有较好相容性并具有良好的金属螯合性,能防止酶金属中毒<sup>[6]</sup>。选择硅胶为支持载体,硅胶具有机械强度高,颗粒匀一,表面孔隙多,表面积大的优点,将壳聚糖溶解固定于硅胶表面制成复合载体,是优化的选择。戊二醛修饰壳聚糖的浓度对交联后载体活性影响较大,不同类型载体及试验条件都有其最佳反应浓度。研究表明戊二醛浓度在 2.0% 时结合率较高。最适浓度戊二醛与壳聚糖氨基形成最多活性基团,戊二醛浓度过高,发生壳聚糖与戊二醛分子内或分子间交联,降低载体与酶结合率,温度对戊二醛修饰壳聚糖反应影响较小。胰蛋白酶与固定化载体最佳结合比为 15:1 000,活力比达 17 740 U · g<sup>-1</sup>,回收率可达 48.27%。该试验固定化胰蛋白酶载体的制备是分步进行的,每一步的产物都经过纯化,再进行下一步反应,缺点是反应步骤增多,但分离胰蛋白酶抑制剂活性高,纯化程度高,SBTI 的抑制活性从

参考文献

[1] Brik Y. The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin and chymotrypsin inhibitor from soybeans[J]. International Journal of Peptide Protein Research 1985, 25(2): 113-131.

[2] 蔡祖花,王凤山,张天民. 胰蛋白酶抑制剂临床研究概况[J]. 中国生化药物杂志 2000, 21(3):157-159. (Cai Z H, Wang F S, Zang T M. Clinical reseach status of trypsinInhibitors[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics 2000, 21(3): 157-159.)

[3] 孙晓丰,余蓉,曾蓉等. 固定化胰蛋白酶的制备[J]. 华西药理学杂志, 2003, 18(3): 176-178. (Sun X F, Yu R, Zeng R, et al. Preparation of immobilized trypsin[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2003, 18(3): 176-178.)

[4] 王英男,修建成,富校轶,等. 豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性测定方法研究[J]. 大豆通报, 2006(2): 31-32. (Wang Y N, Xiu J C, Fu X Y, et al. Measurement of trypsin inhibitor activities in soybean product [J]. Soybean Bulletin, 2006(2): 31-32.)

[5] 宋杨,侯司,赵辉,等. 壳聚糖固定化酶一步纯化抑肽酶研究[J]. 生物学杂志, 2000, 17(1):18-21. (Song Y, Hou S, Zhao H, et al. A new method of preparation of high-purity aprotininum-by chemical1 modiefied trypsin of chitosan[J]. Journal of Biology, 2000, 17(1): 18-21.)

[6] 曹维强,王静,陈鹏. 壳聚糖的构效关系及其在食品中的应用[J]食品研究与开发,2006,27(5):165-168. (Cao W Q, Wang J, Chen P. The relationship of chitosan structure and functional properties and its application food industry[J]. Food research and development, 2006,27(5):165-168.)