

中华管鞭虾 (*Solenocera crassicornis*) 蛋白酶的纯化及其生化特性研究*

杨文鸽 薛长湖¹⁾ 徐大伦 何 雄 潘云娣 陈士国

(宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211; 中国海洋大学生命科学与技术学部 青岛 266003)

(中国海洋大学生命科学与技术学部 青岛 266003)

(宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

(浙江医药高等专科学校 宁波 315100)

提要 采用 Tris-HCl 缓冲液 (50mmol/L, pH 7.5) 抽提、Q-sepharose F.F. 阴离子交换层析、Sephacryl S-300 凝胶过滤层析、SDS-PAGE 等方法, 进行中华管鞭虾虾头蛋白酶的分离纯化、酶学性质及其动力学特性的研究。结果表明, 中华管鞭虾虾头蛋白酶粗提物经层析后, 得到聚丙烯酰胺凝胶电泳纯的一酶组分。该蛋白酶的比活力从 359.39U/mg 增加到 8277.83U/mg 提高了 23.03 倍, 回收率达 37.69%, SDS-PAGE 显示该蛋白酶只含一条谱带, 相对分子量为 24.50kDa。以偶氮酪蛋白作为底物, 该酶的米氏常数 K_m 值为 0.28mg/ml, 最适温度为 55°C, 最适 pH 为 7.5。蛋白酶在 60°C 以下比较稳定, 放置 1h 后活性仍保持在 60% 以上, 而在 60°C 以上时蛋白酶活性急剧下降, 80°C 放置 1h 后, 酶活性只残留 21.32%。10mmol/L Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 EDTA 对该蛋白酶有较强的抑制作用, 抑制率分别约为 97%、96% 和 53%, 10mmol/L Mg^{2+} 能显著促进蛋白酶活性, 而 10mmol/L Fe^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 对蛋白酶活性的影响不大。推测中华管鞭虾蛋白酶可能为一种金属蛋白酶。

关键词 中华管鞭虾, 蛋白酶, 纯化, 生化特性

中图分类号 Q55

中华管鞭虾 (*Solenocera crassicornis*) 是一种体长为 5.0—10.0cm 的中型虾类, 分布较广, 是桁杆拖虾作业及沿海定置张网的重要捕捞对象, 其冻虾仁是出口创汇的重要水产品 (宋海棠等, 2003)。蛋白酶不仅在生物体内发挥重要生理功能 (陈师勇等, 2004), 而且在许多领域得到广泛应用。目前提取蛋白酶的原料也不仅仅局限于陆地动物的脏器和植物的种子, 开发利用海洋生物蛋白酶已成为蛋白酶工业的研究热点。有关虾蛋白酶的研究, 国内外的报道主要集中在对中国对虾 (*Penaeus orientalis*)、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、日本对虾 (*Penaeus japonicus*)、南美白

对虾 (*Penaeus vannamei*) 等养殖虾上, 试图通过对其消化酶的研究工作, 促进其在饵料利用率、生长率、环境适应性等的提高 (魏华等, 1996; Jiang *et al.*, 1991; Paul *et al.*, 1982; 沈文英等, 2004), 而对中华管鞭虾蛋白酶的分离纯化及其生化特性的研究国内外未见报道。中华管鞭虾除鲜食外主要作为虾仁原料, 加工时占虾体 40% 左右的虾头常常被弃掉, 从而降低了虾头的利用价值。本文中作者分离纯化中华管鞭虾虾头中的蛋白酶, 并对其生化特性进行研究, 旨在为开发海洋生物蛋白酶、综合利用中华管鞭虾提供理论依据。

* 国家科技部十五攻关项目, 2001BA501A-25 号。杨文鸽, 副教授, 博士生, E-mail yangweng@nbu.edu.cn

1) 通讯作者: 薛长湖, 教授, 博士生导师, E-mail xuedh@mail.ouc.edu.cn

收稿日期: 2005-03-22 收修改稿日期: 2005-07-27

1 材料与设备

1.1 原料与主要试剂

中华管鞭虾 (*Solenocera crassicornis*): 长 8cm 左右, 2004年 4月从舟山渔场获得, 于 -20°C 下冻藏。Q Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech AB); Sephacryl S-300HR (Amersham Pharmacia Biotech AB); 标准蛋白质 (Sigma公司, 分子量范围为 19.0—118.0kDa), 包括 Lysozyme 19.0kDa, β -lactoglobulin 26.0kDa, Carbonic anhydrase 34.0kDa, Ovalbumin 47.0kDa, Bovine serum albumin 86.0kDa, β -galactosidase 118.0kDa 结晶牛血清白蛋白和偶氮酪蛋白 (Azocasein) 为 Sigma公司产品; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

快速蛋白液相色谱系统 (ÄKTA[®]apl System with Frac 900 Amersham Bioscience); 真空冷冻干燥机 (Freezone 12L, 美国 Labconco); 台式高速冷冻离心机 (TGL-16G型); 电子天平 (BP221D型, 德国 Sartorius公司); 数控层析冷柜 (SL-2型); 电泳仪 (EPS 301 Amersham Bioscience); 凝胶成像系统 (TANON GS-2008); 转移脱色摇床 (TS-9型)。

2 实验方法

2.1 中华管鞭虾蛋白酶的分离与纯化

所有操作未经特殊说明, 均在 4°C 下进行。

2.1.1 粗酶液的制备 取新鲜的中华管鞭虾头与 Tris-HCl (50mmol/L , $\text{pH}7.5$) 缓冲液 1:3 (W/V) 混合 \rightarrow 高速匀浆 \rightarrow 10000r/min 冷冻离心 20min \rightarrow 上清液过微孔滤膜 ($\phi 0.22\mu\text{m}$) 以除去一些不溶性杂质和脂类, 滤液透析后用聚乙二醇浓缩得粗酶液 A, 冷藏待用。

2.1.2 Q-Sepharose F. F. 离子交换层析 先以 20mmol/L Tris-HCl (含有 5mmol/L Ca^{2+} , $\text{pH}7.5$) 平衡色谱柱, 4ml 粗酶液 A 上样后, 用含 $0-1.0\text{mol/L}$ NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液线性梯度洗脱, 流速 1.0ml/min , 6.0ml/管 分步收集, 280nm 检测, 绘制洗脱曲线并检测蛋白酶活性, 合并蛋白酶活性峰, 透析后超滤浓缩, 进一步用聚乙二醇浓缩到 2ml (样品 B), 冷藏待用。

2.1.3 Sephacryl S-300 HR 凝胶过滤层析 20mmol/L Tris-HCl (含有 5mmol/L Ca^{2+} , $\text{pH}7.5$) 平衡色谱柱, 样品 B 上柱后控制洗脱液流速 0.5ml/min , 2.5ml/管 分步收集, 280nm 检测, 绘制洗脱曲线并检测蛋白酶活性, 合并蛋白酶活性峰, 透析后用超滤、聚乙二醇法浓缩, 冻干得到样

品 C, 冷藏用于电泳分析及蛋白酶性质研究。

2.1.4 SDS-PAGE 按 Laemmli 方法 (Laemmli 1970) 对样品 C 进行电泳, 分离胶浓度为 12% , 考马斯亮蓝 R-250 染色, 测定其纯度及相对分子量。

2.2 蛋白含量测定

以结晶牛血清白蛋白作为标准蛋白, 采用 Lowry 法 (Lowry *et al.* 1951) 测定。

2.3 酶活测定

参照魏玉西等 (2002)。以偶氮酪蛋白 (Azocasein) 作底物, 三氯醋酸为酶促反应终止剂。加 2ml 偶氮酪蛋白 (1mg/ml) 和 $320\mu\text{l}$ 的 Tris-HCl ($\text{pH}7.0$) 缓冲液, 样品组加 $240\mu\text{l}$ 稀释一定倍数后的酶液, 37°C 反应 1h 后加 12% 的三氯乙酸 0.5ml 对照组则先加三氯乙酸, 37°C 反应 1h 后加酶液。室温放置 30min , 离心并取上清液 2ml 于试管中, 加 0.4ml 10mol/L NaOH, 室温下放置 15min 后测 $OD_{450\text{nm}}$ 。在此测定条件下, $OD_{450\text{nm}}$ 每增加 0.001 即为一个蛋白酶活力单位 (U)。

2.4 中华管鞭虾蛋白酶性质研究

测定时样本数 $n=5$ 以平均值 \pm 标准误差表示。

2.4.1 pH 值对蛋白酶活的影响 临用前称取 50mg 偶氮酪蛋白分别溶于 50ml 不同 pH 的缓冲液中, 包括 $\text{pH}6.0$ 的 100mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液体系和 pH 为 7.0 、 7.5 、 8.0 的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 为 9.0 、 10.0 的 100mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液体系, 按 2.3 方法测不同 pH 下的蛋白酶活力变化情况。

2.4.2 温度对蛋白酶活的影响 按 2.3 方法在不同的反应温度下测定酶活, 具体温度包括 20°C 、 30°C 、 37°C 、 40°C 、 45°C 、 50°C 、 55°C 、 60°C 、 70°C 、 80°C , 以确定蛋白酶的最适温度。此外将酶液在 30°C 、 37°C 、 40°C 、 50°C 、 60°C 、 70°C 、 80°C 放置 0.5h 和 1h 后按 2.3 方法分别测定蛋白酶的残留活性, 进行酶的热稳定性研究。

2.4.3 EDTA 和金属离子对蛋白酶活的影响

EDTA: 在酶液中加入 10mmol/L 的 EDTA, 水浴 37°C 放置 0.5h 后测残留酶活。金属离子: 在酶液中分别加入 10mmol/L 的氯化钡、乙酸锌、氯化钙、硫酸亚铁、硫酸铜、硫酸镁, 室温放置 15min 后测残留活性。

2.4.4 米氏常数 (K_m) 的测定 以偶氮酪蛋白为底物, 浓度范围为 $0.2-6.0\text{mg/ml}$, 37°C 下保温

40m l 三氯醋酸沉淀除去未水解蛋白, 测定 OD_{450nm} , 以测得的吸光值表示反应速度 v 。以 $1/v$ 为纵坐标, $1/[S]$ 为横坐标, 双倒数作图法求 K_m (陈毓荃, 2002)。

3 结果与分析

3.1 中华管鞭虾蛋白酶的分离纯化

利用 Tris-HCl 缓冲液抽提, 滤液透析浓缩, 约 4m l 的粗酶液 A 上样于 Q-Sepharose F. F. 柱进行层析, 结果发现, 离子交换层析过程中得到两个蛋

白质洗脱峰, 但只有第 2 个峰显示较高的酶活, 洗脱该蛋白酶需要浓度较高的 NaCl。该步相对纯化倍数为 5.17, 得率为 67.6%。合并蛋白酶活性峰组分, 共 18m l 透析后超滤浓缩, 进一步用聚乙二醇浓缩到 2m l 上样于 sephacryl S-300 凝胶过滤柱并洗脱, 结果发现, 该纯化过程得到两个蛋白质洗脱峰, 但从蛋白酶活力曲线看, 只有第 1 个峰具有酶活。该步相对纯化倍数为 23.03 得率为 37.6%。纯化过程的酶活及蛋白含量变化见表 1。

表 1 中华管鞭虾蛋白酶的纯化结果

Tab. 1 Purification of the protease from *S. crassicomis*

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总活力 (U)	比活力 (U/mg)	得率 (%)	纯化倍数
粗酶液	22.00	7906.67	359.39	100.00	1.00
Q-sepharose F. F.	2.88	5346.00	1856.25	67.61	5.17
Sephacryl S-300HR	0.36	2980.02	8277.83	37.69	23.03

许多学者曾利用电泳分析虾蛋白酶的分子组成, Fem ndez-G inenez 等 (2001) 研究野生红虾 *Pleoticus muelleri* 时, 发现其肝胰腺蛋白酶 SDS-PAGE 图谱中有 12 条不同分子量的活性谱带, 分子量范围为 17.4—66.0kDa Tsai 等 (1991) 分离到分子量分别为 26.0kDa 和 27.0kDa 的斑节对虾胰凝乳蛋白酶; Van 等 (1992) 对南美白对虾蛋白酶进行 SDS-PAGE 分析, 得到分子量为 25.0kDa 的一条谱带。本实验对纯化得到的样品 C 进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色显示一条蛋白带, 其相对分子量 24.50kDa 结果见图 1。说明中华管鞭虾蛋白酶粗提物经 Q-sepharose F. F. 阴离子交换层析、Sephacryl S-300 凝胶过滤层析后所得到的蛋白酶达到电泳纯, 推测该酶只有一条肽链或由均一的亚基组成, 亚基的分子量与斑节对虾胰凝乳蛋白酶及南美白对虾蛋白酶亚基分子量接近。

3.2 中华管鞭虾蛋白酶的性质研究

3.2.1 pH 对酶活性的影响 甲壳动物蛋白酶的最适 pH 差异较脊椎动物大, 一般在 5.5—9.0 之间 (Fem ndez-G inenez *et al.* 2001)。由表 2 可以看出, 从 pH 6.0—7.5 范围内随 pH 值上升中华管鞭虾蛋白酶活性明显上升, 而 pH 大于 7.5 以后随 pH 增加活性逐渐降低, 可见中华管鞭虾蛋白酶的最适 pH 为 7.5 偏弱碱性。这一数值与 *Pleoticus muelleri* 肝胰腺蛋白酶最适 pH 7.5—8.0 (Fem ndez-G inenez *et al.* 2001)、斑节对虾蛋白

酶的最适 pH 7.0—8.0 (Jiang *et al.* 1991)、加州对虾 *Penaeus californiensis* 消化道蛋白酶最适 pH 8.0 接近。

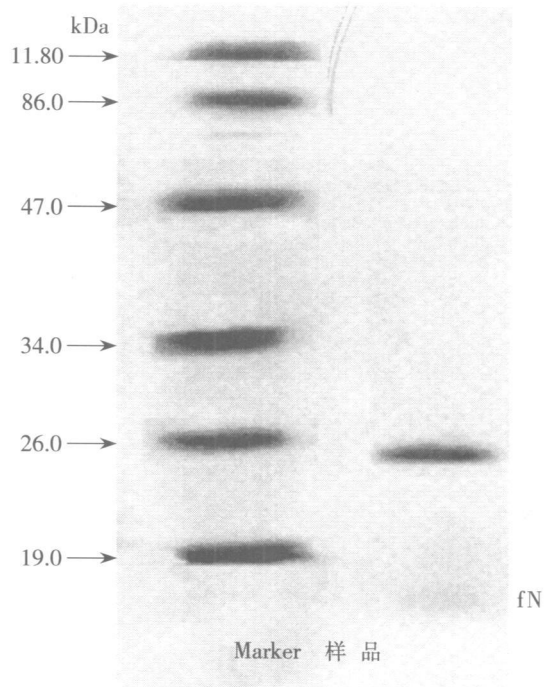


图 1 中华管鞭虾蛋白酶的 SDS-PAGE 图

Fig. 1 SDS-PAGE of the protease from *S. crassicomis*

3.2.2 温度对酶活性的影响 温度对中华管鞭虾蛋白酶活性的影响见表 3。可以看出蛋白酶

在 55℃以前随着温度的升高,蛋白酶活性逐步升高,55℃后随着温度的升高,酶活性显著下降,酶的最适作用温度为 55℃,与中国对虾中内源蛋白酶、*Penaeus californiensis*消化道蛋白酶的最适温度 50℃相近,但比一般海洋生物蛋白酶的最适温度(37℃左右)要高,这可能与中华管鞭虾为亚热带、热带暖水产品种(宋海棠等,2003)有关。

将酶液在不同温度下保温不同时间,然后测定酶活力,结果见表 4。蛋白酶在 30—40℃分别放置 0.5h 和 1h 后,蛋白酶的活性基本没有损失,在 50℃放置 0.5h 和 1h 后,蛋白酶剩余

活力在 70% 以上,60℃放置 0.5h 和 1h 后蛋白酶活性仍能保持在 60% 以上,而在 60℃以后,蛋白酶的活性急剧下降。80℃放置 1h 后,蛋白酶活性只残留 21.32%。说明该蛋白酶有较高的热稳定性,但 80℃以上的高温将使之变性失活。Jiang 等(1991)发现斑节对虾蛋白酶 55℃左右放置 5min 活力损失一半。可见中华管鞭虾蛋白酶的热稳定性明显高于斑节对虾蛋白酶的热稳定性。

3.2.3 金属离子和 EDTA 对酶活性的影响

10mmol/L EDTA 和各种金属离子对蛋白酶活性的影响见表 5。

表 2 pH 对中华管鞭虾蛋白酶活性的影响

Tab. 2 Effect of pH on the activity of the protease from *S. crassicornis*

pH	6.0	7.0	7.5	8.0	9.0	10.0	11.0
蛋白酶相对活力(%)	55.72±3.18	92.59±4.06	100.00	90.32±3.13	87.53±3.17	80.72±4.89	69.2±5.36

表 3 温度对中华管鞭虾蛋白酶活性的影响

Tab. 3 Effect of temperature on the activity of the protease from *S. crassicornis*

温度(℃)	20	30	37	40	45
蛋白酶相对活力(%)	18.90±3.76	26.81±4.89	50.01±2.78	54.20±3.16	69.31±4.36
温度(℃)	50	55	60	70	80
蛋白酶相对活力(%)	94.04±3.79	100.00	93.72±4.21	35.57±3.87	25.22±4.18

表 4 中华管鞭虾蛋白酶的热稳定性

Tab. 4 Thermal stability of the protease from *S. crassicornis*

温度(℃)	蛋白酶相对活力(%)		温度(℃)	蛋白酶相对活力(%)	
	处理时间 0.5h	处理时间 1h		处理时间 0.5h	处理时间 1h
30	100.00	100.00	60	68.73±4.12	62.80±3.50
37	95.93±1.62	95.67±0.71	70	49.44±2.78	37.81±2.72
40	97.12±0.89	96.32±0.92	80	37.63±1.92	21.32±2.10
50	74.63±2.12	70.78±3.11			

表 5 EDTA 和金属离子对中华管鞭虾蛋白酶活性的影响

Tab. 5 Effect of EDTA and metal ions on the activity of the protease from *S. crassicornis*

EDTA 和金属离子	Mg ²⁺	Fe ²⁺	Zn ²⁺	Ca ²⁺	Ba ²⁺	Cu ²⁺	EDTA	None
蛋白酶相对活力(%)	225.32±8.68	105.87±4.21	4.00±0.12	103.90±3.41	93.06±2.39	3.05±0.13	45.03±2.85	100.00

可以看出, 10mmol/L EDTA 对蛋白酶有较强的抑制效果, 抑制率约为 55%; 10mmol/L Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对蛋白酶的活性有很强的抑制效果, 抑制率分别约为 97% 和 96%; 10mmol/L Mg^{2+} 能显著促进蛋白酶活性, 10mmol/L Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 对蛋白酶活性有轻微的激活作用, 10mmol/L Ba^{2+} 则产生轻微的抑制作用。另外在酶纯化过程中发现, 洗脱液含有 5mmol/L Ca^{2+} 时蛋白酶的稳定性提高。推测该蛋白酶可能是一种金属蛋白酶 (metalloenzyme), 需要一定的辅助因子如 Mg^{2+} 或 Ca^{2+} 。 Mg^{2+} 能较大幅度地提高蛋白酶的活性, 可能是通过促进底物与酶活性中心的亲和力从而提高酶活 (朱春华等, 2003)。

3.2.4 中华管鞭虾蛋白酶米氏常数 (K_m) 的测定

使用不同浓度的偶氮酪蛋白底物, 研究中华管鞭虾蛋白酶的动力学特性。采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 测得中华管鞭虾蛋白酶的 K_m 值为 0.28mg/ml 这一数值低于 *Yersinia ruckeri* 胞外蛋白酶的 1.68mg/ml 和黑曲霉 *Aspergillus niger* HU53 菌株产酸性蛋白酶的 2.80mg/ml (Secades et al 1999)。 K_m 的大小可近似地反应出酶与底物亲和力的强弱, K_m 值越小, 则酶与底物分子的亲和力就越强, 中华管鞭虾蛋白酶对底物偶氮酪蛋白有很强的亲和力。

4 结语

从海洋动物内脏中提取的蛋白酶活性较高, 可广泛地应用于鱼类加工以生产蛋白胨和用于鲑鱼脱皮等。虾肝胰腺蛋白酶含量高, 而肝胰腺存在于虾的头胸部, 因此可直接利用鲜虾的加工废弃物虾头捣碎抽提, 取材十分经济而方便。

实验得到的电泳纯中华管鞭虾蛋白酶最适 pH 为 7.5 最适温度为 55°C, 60°C 以下比较稳定。以偶氮酪蛋白作为底物, 该酶的 K_m 值为 0.28mg/ml 10mmol/L Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 EDTA 对该酶有较强的抑制作用, 10mmol/L Mg^{2+} 能显著促进蛋白酶活性, 而 10mmol/L Fe^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 对蛋白酶活性影响不大。

参 考 文 献

朱春华, 李广丽, 文海翔, 2003. 南美白对虾早期幼体消化酶活力的研究. 海洋科学, 27(5): 54—57
陈师勇, 张培军, 莫照兰等, 2004. 鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) M3 菌株生长条件及其对蛋白酶产量的影响.

海洋与湖沼, 35(1): 55—63

- 陈毓荃, 2002. 生物化学实验方法和技术. 北京: 科学出版社, 164—168
宋海棠, 姚光展, 俞存根等, 2003. 东海中华管鞭虾的数量分布和生物学特性. 浙江海洋学院学报, 22(4): 305—308
沈文英, 胡洪国, 潘雅娟, 2004. 温度和 pH 值对南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 消化酶活性的影响. 海洋与湖沼, 35(6): 543—548
魏 华, 赵维信, 1996. 罗氏沼虾幼体及成虾消化酶活性. 水产学报, 20(1): 61—64
魏玉西, 汪靖超, 程殿林等, 2002. 鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 胞外产物中蛋白酶的纯化及其性质. 应用与环境生物学报, 8(4): 414—418
Fem ndez-G inenez A V, García-Carréño F L, Navarrete del Toro M A et al. 2001. Digestive proteinases of red shrimp *Penaeus muelleri* (Decapoda Penaeoidea): partial characterization and relationship with molting. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 130: 331—338
Jiang S T, Moody M W, Chen H C, 1991. Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). J Food Sci 56(2): 322—326
Laemmli U K, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature, 227: 680—685
Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L et al. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem, 193: 265—275
Paul D M, Osamu D C, 1982. Characteristics of amylases and protease of the shrimp *Penaeus japonicus*. Bull Japan Soc Sci Fish, 48(12): 1153—1157
Secades P, Guijarro JA, 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. Appl Environ Microbiol, 65(9): 3969—3975
T sai IH, Lu P J, Chuang JL, 1991. The midgut chymotrypsins of shrimps *Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus indicus*. Biochim Biophys Acta, 1080: 59—67
Van W A, Chevalier P, Sellos D, 1992. Purification, biochemical characterization and N-terminal sequence of a serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities of a tropical shrimp *Penaeus vannamei*. Comp Biochem Physiol, 103B: 675—680

PURIFICATION AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF PROTEASE IN *SOLENOCERA CRASSICORNIS*

YANG Wen-Ge, XUE Chang-Hu, XU Da-Lun, HE Xing,

PAN Yun-Di, CHEN Shi-Guo

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211; Division of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

(Division of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211)

(Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo, 315100)

Abstract *Solenocera crassicornis* is an important shrimp species in fishery resource and widely distributed in the East China Sea. *S. crassicornis* are usually frozen for worldwide trade. However, the shrimp head that takes 40% of the body weight is often discarded during the process. In order to fully utilize the discarded, a purification procedure for protease from *S. crassicornis* heads was developed. To our best knowledge, it is the first trial to study the protease in detail from *S. crassicornis* to abstract and use the marine proteases.

The procedures of extracting and purifying protease from *S. crassicornis* heads include three steps: preparing crude protease with Tris-HCl buffer solution (50 mmol/L, pH 7.5), ion-exchanging with Q-sepharose F.F., and gel filtering with sephacryl S-300HR. The enzymology nature and dynamics characteristics were studied with biochemical and electrophoretic techniques.

The enzyme was purified to an electrophoretically homogenous state, reaching 23.03-fold purification with a yield of 37.69%. The abstracted protease showed a single band in its relative molecular weight at 24.5 kDa based on sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Calculated from Lineweaver-Burk plot of $1/v$ versus $1/[S]$, the apparent K_m value of the enzyme was 0.28 mg/ml. Using azo-casein as the substrate, the optimum temperature was 55°C and the optimum pH of the enzyme reaction was 7.5. This protease shows a good thermal stability below 60°C. More than 60% of protease activity still remained after incubation at 60°C for 1h. But the enzyme became inactivated rapidly when temperature rose above 60°C, and only 21.32% of protease activity remained at 80°C for 1h.

Effects of some metal ions and EDTA on the protease activity were also investigated. The results indicated that the protease activity could be inhibited by 10 mmol/L of Cu^{2+} , Zn^{2+} and EDTA, with their inhibitory ratios at 97%, 96% and 55%, respectively. 10 mmol/L of Mg^{2+} could obviously increase the enzyme activity while 10 mmol/L of Ca^{2+} , Ba^{2+} and Fe^{2+} had no significant effect on the protease activity. It is speculated that the protease from *S. crassicornis* should be a type of metalloenzyme.

Key words *Solenocera crassicornis*; Protease; Purification; Biochemical properties