

发酵乳杆菌细胞壁蛋白酶的分离纯化及酶学性质研究

朱 娟¹, 潘道东^{1,2,*}

(1. 南京师范大学 国家乳品加工技术研发分中心, 江苏 南京 210097;

2. 宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘 要: 研究分离纯化发酵乳杆菌细胞壁蛋白酶(cell envelope proteinase, CEP)的方法及其酶学性质。用 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.8)悬浮菌体, 进行超声波破碎, 细胞质量浓度为 0.06g/mL, 破碎功率 330W, 工作 220 次(工作时间 3s, 间隔时间 5s), 离心取上清液即为粗酶液。60% 硫酸铵沉淀, Sephacryl S-300 HR 凝胶层析, Native-PAGE 割胶回收纯化发酵乳杆菌的 CEP。用纯化的 CEP 酶解脱脂乳, 酶解液 ACE(angiotensin I-converting enzyme)抑制率为 50%。SDS-PAGE 检测 CEP 分子质量为 32.5kD, 最适酶反应温度为 41℃, 最适酶反应 pH 值为 8.0。Mg²⁺、Co²⁺、Ca²⁺ 对 CEP 活性有激活作用; Zn²⁺、Ni²⁺、PMSF、EDTA 对 CEP 活性有抑制作用, 说明 CEP 为丝氨酸蛋白酶且酶的活性中心结构的维持与金属离子有关。

关键词: 发酵乳杆菌; 细胞壁蛋白酶; 纯化; 酶学性质

Purification and Enzymatic Properties of Cell Envelope Protease from *Lactobacillus fermentum*

ZHU Xu¹, PAN Dao-dong^{1,2,*}

(1. Branch of National Dairy Processing Technology Developing Center, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China;

2. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The purification process of cell envelope protease (CEP) from *Lactobacillus fermentum* was explored in this paper. Cells were suspended in 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8) and subjected to ultrasonication (cell concentration of 0.06 g/mL, ultrasonic power of 330 W, ultrasonic treatment time of 3 s with intermission of 5 s, and repeated ultrasonic treatment number of 220). The supernatant was collected, precipitated with 60% saturated (NH₄)₂SO₄ solution and separated by Sephacryl S-300 HR chromatography. The active protease was recovered from Native-PAGE gel. The ACE inhibitory rate of purified CEP was 50%. The molecular mass of purified CEP estimated by SDS-PAGE was approximately 32.5 kD. Maximum activity was reached at pH 8.0 and 41℃. The activity of CEP could be activated by Mg²⁺, Co²⁺ and Ca²⁺ and inhibited by Zn²⁺, Ni²⁺ and PMSF, suggesting that CEP belongs to serine protease. On the other hand, its activity could also be inhibited by EDTA, suggesting that CEP is a metalloprotease.

Key words: *Lactobacillus fermentum*; cell envelope protease; purification; enzymatic properties

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0262-07

发酵乳杆菌作为异型发酵乳酸菌, 传统上多用于谷物发酵。通过对不同的发酵乳杆菌菌株生理特征的研究发现, 发酵乳杆菌具有很多乳酸菌优良的特性, 在国外发酵乳杆菌早已经列入益生菌类^[1]。近期研究发现, 采用乳酸菌制作的酸乳有较高的降血压活性, 主要是因为乳酸菌的蛋白酶对乳蛋白进行水解, 产生了血管紧张素转移酶(ACE)抑制肽^[2]。有文献显示发酵乳杆菌产蛋白

酶的能力是几种常见乳酸菌中最强的^[3], 因此对发酵乳杆菌蛋白酶的研究就更有意义了。细胞壁蛋白酶(CEP)是乳酸菌蛋白水解过程中的关键酶, 有研究发现一些 CEP 可以单独水解乳蛋白产生 ACE 抑制肽。所以, 对于 CEP 的研究至关重要。本实验采用超声波破碎细胞壁法提取发酵乳杆菌 CEP, 并对其进行分离纯化, 研究其酶学性质以及其水解乳蛋白产生 ACE 抑制肽的能力。

收稿日期: 2011-02-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972130); 江苏省科技支撑计划项目(BE2009366); 浙江省重大科技专项(2010C12015)

作者简介: 朱娟(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为乳品科学。E-mail: jsdfzhuxu@hotmail.com

* 通信作者: 潘道东(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品科学。E-mail: daodongpan@163.com

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*) 南京师范大学国家乳品加工技术研发分中心分离保藏。

MRS 液体培养基 上海生工生物工程技术有限公司; 考马斯亮蓝 G-250 国药集团化学试剂有限公司; 牛血清白蛋白 南京赛吉科技有限公司; MeOsuc-Arg-Pro-Tyr-pNA (MS-Arg) 北京赛百盛基因技术有限公司; Sephacryl S-300 HR 凝胶 意大利 Pharmacia 公司; Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucine (HHL)、Angiotensin I-converting enzyme (ACE) 美国 Sigma 公司; 茚三酮显色剂 南京奥多福尼有限公司; 其他试剂购于上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 仪器与设备

LRH-250A 生化培养箱 广东省医疗器械厂; 超净工作台 上海上净净化食品有限公司; PHS-3C 精密 pH 计 上海雷磁仪器厂; 722-可见分光光度计 上海棱光技术有限公司; CL-22M 高速冷冻离心机 赛特湘仪离心机仪器有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; DYY-12 型电泳仪 北京市六一仪器厂; 分离层析装置 上海沪西分析仪器厂有限公司; HH-S11-2 电热恒温水浴锅 北京长安科学仪器厂; MCFD5005A 冷冻干燥机 上海虹益仪器仪表有限公司; 超声波细胞破碎仪 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌体制备

菌体在固体培养基上连续活化 3 代, 再接入液体培养基中, 按体积分数 3% 接种量, 37℃ 扩大培养至生长对数期(16h)取出, 4℃、4500r/min 离心 20min 收集菌体沉淀。用含有 Ca^{2+} (30mmol/L)的 50mmol/L Tris-HCl(pH7.8)缓冲液洗涤菌体, 4℃、4500r/min 离心 20min, 弃上清液, 重复洗涤 3 次, 收集菌体备用。

1.3.2 酶液提取^[2]

用 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.8)重新悬浮菌体, 振荡均匀, 进行超声波破碎, 整个过程为了防止局部过热使酶失活, 采用冰浴快速散热。取破碎液于 4℃、4500r/min 离心 20min, 上清液即为粗酶液。

1.3.3 酶活力测定^[4]

取 0.02mL 底物 MeOsuc-Arg-Pro-Tyr-pNA(MS-Arg)(16.4mmol/L), 酶液 0.04mL, 1.14mL Tris-HCl 缓冲液(50mmol/L, pH7.8)混合, 在 37℃ 保温 60min。用 0.5mL 30% 乙酸终止反应, 在波长 410nm 处测定吸光度(测定时补充 2.3mL 蒸馏水)。空白对照管, 以蒸馏水代替酶液同样条件操作。酶活力单位定义: 37℃, 每小时 $A_{410\text{nm}}$ 增加 0.10 定义为一个酶活力单位(U)。酶活力以单位质量菌体计。

1.3.4 蛋白含量测定^[5]

采用考马斯亮蓝法。取 0.1mL 酶液, 0.9mL 蒸馏水, 5mL 蛋白试剂(100mg 考马斯亮蓝 G-250 溶于 50mL 95% 乙醇中, 再加 100mL 85% 磷酸, 用双蒸水补至 1000mL), 充分振荡混匀 5min 后于波长 595nm 处测定吸光度, 以 1mL 重蒸水作为空白对照。蛋白含量以单位质量菌体计。

1.3.5 细胞质量浓度对提取发酵乳杆菌 CEP 的影响

选取不同细胞质量浓度的发酵乳杆菌菌体悬液进行破碎, 采用的超声波破碎条件为功率 300W, 时间 26min(工作时间 3s, 间隔时间 5s)。以酶活力和蛋白质含量为指标, 分析细胞质量浓度对提取发酵乳杆菌 CEP 的影响。

1.3.6 超声波功率对提取发酵乳杆菌 CEP 的影响

选取不同超声波功率进行破碎, 细胞质量浓度为 0.05mg/mL, 超声波破碎时间 26min(工作时间 3s, 间隔时间 5s)。以酶活力和蛋白质含量为指标, 分析超声波功率对提取发酵乳杆菌 CEP 的影响。

1.3.7 超声波破碎时间对提取发酵乳杆菌 CEP 的影响

选取不同的超声波破碎时间进行破碎, 细胞质量浓度为 0.05mg/mL, 破碎功率为 300W(工作时间 3s, 间隔时间 5s)。以酶活力和蛋白质含量为指标, 分析超声波破碎时间对提取发酵乳杆菌 CEP 的影响。

1.3.8 响应曲面法对超声波破碎条件的优化

采用三因素三水平 Box-Behnken 试验设计对超声波破碎条件进行优化, 以细胞质量浓度(A)、超声波破碎功率(B)、超声波破碎时间(C)为响应变量, 以 CEP 酶活力作为响应值。试验设计见表 1, 采用 Design-Expert 7.1.3 分析实验数据。

表 1 响应面分析因素水平表

Table 1 Factors and their coded levels in response surface analysis

因素	编码		
	-1	0	1
A 细胞质量浓度/(g/mL)	0.03	0.07	0.10
B 破碎功率/W	200	300	400
C 破碎时间/s	800	1600	2400

1.3.9 硫酸铵分级沉淀

用聚乙二醇法浓缩粗酶液, 使其蛋白质量浓度在 15~20mg/mL 范围内, 将浓缩后的粗酶液预冷至 0~4℃, 按调整硫酸铵溶液饱和度计算表向溶液中缓慢加入每次分级所需硫酸铵, 硫酸铵要尽量碾细, 加入时置于磁力搅拌器上搅拌, 使硫酸铵充分溶解, 不可一次加入量太多。先加入 40% 硫酸铵, 4℃ 静置过夜, 4℃、6000r/min 离心 20min, 收集沉淀, 取上清液。再加入 60% 硫酸铵, 同上操作。再加入 80% 硫酸铵, 同上操作。再加入 100% 硫酸铵, 同上操作。

所有的沉淀用 50mmol/L Tris-HCl(pH7.8)缓冲液溶解, 装入透析袋(截留分子量 8~14kD), 在 50mmol/L Tris-

HCl(pH7.8)缓冲液中透析,透析应在4℃进行,每2~3h更换一次透析液,直至用10g/100mL BaCl₂检测无沉淀后取出。测定每级硫酸铵沉淀的蛋白含量和酶活力,确定硫酸铵沉淀范围。透析后的样品采用聚乙二醇浓缩。

1.3.10 Sephacryl-S-300 HR 凝胶层析

Sephacryl-S-300 HR 预处理后装柱(1.6cm × 50cm),用50mmol/L Tris-HCl(pH7.8)缓冲液平衡充分,将硫酸铵沉淀后透析浓缩的样品4℃、4500r/min离心20min,取上清液缓慢地加在装好的胶上,上样量为2mL,加的时候用滴管沿层析柱缓慢绕圈滴加,防止将上层介质冲散。采用50mmol/L Tris-HCl(pH7.8)缓冲液洗脱,流速18mL/h,洗脱组分分管收集,5min收集一管。紫外检测器波长为280nm,根据计算机蛋白图谱收集组分,每个样品的分离经多次重复,合并每次分离时相同位置的组分峰,测定其酶活力及蛋白含量,选择合适的组分峰用聚乙二醇浓缩。

1.3.11 酶谱法确定 CEP 条带

用酪蛋白酶谱法确定目的条带,具体操作如下。

a板:在10%分离胶中加入1g/100mL的酪蛋白,5%浓缩胶,Native-PAGE电泳完毕后,在50mmol/L Tris-HCl(pH7.8)缓冲液中37℃保温过夜,让蛋白酶充分水解酪蛋白。保温完毕后用考马斯亮蓝G-250染色1h,充分脱色后可见透明条带即为蛋白酶条带。b板:不加酪蛋白,电泳条件同上。

通过对比两板的条带,切下b板上相应的蛋白酶条带。把胶充分碾碎后加入50mmol/L Tris-HCl(pH7.8)缓冲液过夜后4℃、4500r/min离心20min,取上清液测定蛋白酶活力。其中Native-PAGE操作参照SDS-PAGE方法进行,在凝胶的配制中不加入SDS,样品处理液中不加SDS和巯基乙醇,电泳缓冲液中不加SDS,且样品不加热处理,其余操作方法同SDS-PAGE。

1.3.12 CEP 的制备^[6]

经1.3.11节确定CEP条带后,就可以大量收集纯化条带,电泳条件为分离胶10%,浓缩胶5%的Native-PAGE,电泳完毕后剥下胶板,切下一条胶带用考马斯亮蓝G-250染色后充分脱色,通过染色胶的蛋白条带对比切下未染色板相对应的酶带,把胶充分碾碎后加入50mmol/L Tris-HCl(pH7.8)缓冲液,过夜后4℃、4500r/min离心20min,洗涤3次,收集上清液冷冻干燥。重复制备至后续实验所需的酶量。

1.3.13 SDS-PAGE 测定酶分子质量

蛋白质的分子质量与它的电泳迁移有一定关系,经37种蛋白的测定得到以下关系式:

$$\lg M_w = \lg K - b m_R = K_1 - b m_R \quad (1)$$

式中: M_w 是蛋白质分子质量; K 和 K_1 为常数, b 为斜率, m_R 为相对迁移率。

$$m_R = d_{pr} / d_{BPB} \quad (2)$$

式中: d_{pr} 、 d_{BPB} 分别为样品和溴酚蓝(BPB)以分离胶表面为起点迁移的距离。

用标准蛋白质分子质量的对数作纵坐标,用各自的相对迁移率作横坐标,即可画出一条斜率为负的标准曲线。然后从标准曲线上就可求出未知蛋白的分子质量。

1.3.14 CEP 的酶学性质研究

CEP 最适 pH 值测定:把酶溶解于 pH 值为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液,测定其酶活力,计算相对酶活力。

CEP 最适温度测定:把酶溶解于 50mmol/L Tris-HCl (pH7.8)的缓冲液,然后在 29、33、37、41、45℃测定其酶活力,计算相对酶活力。

CEP 的 pH 值稳定性测定:把酶溶解于 pH 值为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0 的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液,然后保温 30min,测定其酶活力,计算相对酶活力。

CEP 热稳定性测定:把酶溶解于 50mmol/L Tris-HCl (pH7.8)的缓冲液,然后在 30、40、50、60、70、80℃保温 30min,测定其酶活力,计算相对酶活力。

抑制剂和金属离子对酶活力的影响:把酶溶解于 50mmol/L Tris-HCl(pH7.8)缓冲液,按 1mmol/L 和 10mmol/L 的浓度分别加入 Ba²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、Co²⁺、Mg²⁺、Ni²⁺、Ca²⁺、EDTA、苯甲基磺酰氟(PMSF),测定其酶活力,计算相对酶活力。

1.3.15 乳蛋白的水解

称取一定量的脱脂奶粉按 11g/100mL 溶解于 50mmol/L Tris-HCl(pH7.0)中,65℃加热 10min,降至 37℃,在 1.5mL 离心管中加入 100 μL 脱脂奶粉溶液,再加入 66 μL 酶液(纯化冷冻干燥后的酶按 1mg/mL 的质量浓度溶解于 50mmol/L Tris-HCl(pH7.0)中,即按[E]/[S]质量比为 0.006 的量加入酶)。在恒温水浴振荡器中进行,水解过程中用微量注射器加入浓度为 0.1mol/L 的 NaOH 维持 pH 值在 7.0。水解 8h 后将反应体系在 100℃加热 20min 灭酶,4500r/min 离心 20min 后取上清液进行 ACE 抑制率的测定。

1.3.16 ACE 抑制活性测定

采用 Cushman 等^[7]的方法做适当改进。用含有 0.3mol/L NaCl 的 0.1mol/L 硼酸盐缓冲液(pH8.3)将 Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucine (HHL)配成 5.0mmol/L 的溶液。在 10mL 试管中加入 200 μL 的 HHL 溶液和 80 μL 1.3.15 节制备的水解样品,于 37℃保温 3min 后,再加入 20 μL ACE 溶液(溶解于蒸馏水中,酶活力为 0.1U/mL),混匀后在 37℃保温 30min,再加入 250 μL 的 1.0mol/L 的 HCl 溶液以终止反应,再加入 1.7mL 醋酸乙酯,经 15s 振荡混匀后,静置 5min,用移液管吸取 1.0mL 的醋酸乙酯层,120℃烘箱烘干,加入 1.0mL 蒸馏水,混匀后在波长 228nm 处测定吸光度。

$$\text{ACE抑制率}/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

式中： A_1 为添加ACE抑制肽时，ACE和HHL反应的吸光度； A_0 为不添加ACE抑制肽时，ACE和HHL反应的吸光度。

2 结果与分析

2.1 超声波破碎法提取发酵乳杆菌 CEP 条件的研究

2.1.1 细胞质量浓度对提取发酵乳杆菌 CEP 的影响

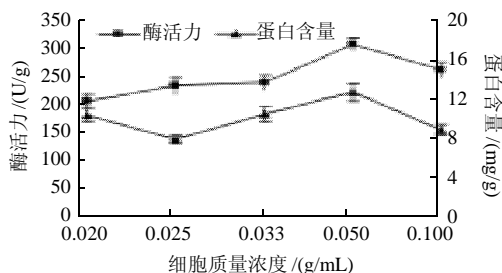


图1 细胞质量浓度对提取 CEP 的影响

Fig.1 Effect of cell concentration on the purification of CEP

从图1可以看出，当细胞质量浓度为0.05g/mL的时候，蛋白释放量和酶活力都达到最高。超声波通过“空化效应”破碎细胞的过程实际就是空化泡形成、振动、膨胀、压缩和崩溃闭合的过程，细胞质量浓度越高，液体的黏稠度越大，可能不利于空化泡的形成及其膨胀和爆炸^[8]，而能量大多被转换为热量，不但不能破碎，反而破坏样品中的酶活性，所以蛋白释放量和酶活力都会降低。

2.1.2 破碎功率对提取发酵乳杆菌 CEP 的影响

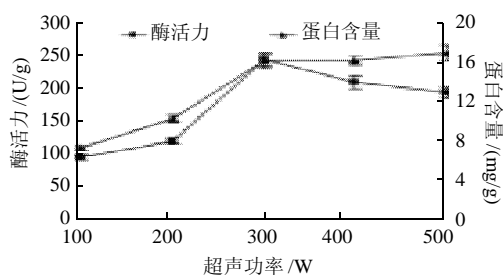


图2 超声波功率对提取 CEP 的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic power on the purification of CEP

从图2可以看出，当超声波破碎功率为300W的时间，酶活力达到最高。之后随着超声波破碎功率的上升，酶活力减小，蛋白释放量继续增大。输出功率过小，细胞破碎不完全，CEP释放不充分；输出功率的增加有利于液体中空穴的形成，从而产生更多的空化泡，使破碎作用增强，但输出功率超过300W后，由于超声波处理的空化作用引起细胞液局部的高温高压^[9]，使酶变性，破坏了酶活性。

2.1.3 破碎时间对提取发酵乳杆菌 CEP 的影响

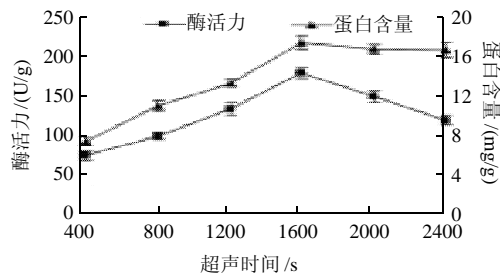


图3 超声波时间对提取 CEP 的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic treatment time on the purification of CEP

从图3可以看出，当超声时间为1600s时，酶活力达到最高。随超声波工作总时间的延长，蛋白含量先是增长然后趋于平衡，酶活力先是增长然后下降。说明延长超声波工作总时间有利于细胞破碎，但是破碎时间过长会导致热量增加而致使酶活力受损。

2.2 超声波破碎法提取发酵乳杆菌 CEP 条件的响应面优化

采用三因素三水平 Box-Behnken 试验设计对破碎条件进行优化，以细胞质量浓度(A)，破碎功率(B)，破碎时间(C)为响应变量，以 CEP 酶活力作为响应值。试验设计及结果见表2。

表2 Design-Expert 7.1.3.1 软件试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	因素编码值			酶活力/(U/g)
	A	B	C	
1	1	0	1	220.0
2	0	-1	1	225.0
3	0	1	-1	207.1
4	0	0	0	303.6
5	-1	0	-1	183.3
6	1	-1	0	232.5
7	0	0	0	296.4
8	-1	1	0	275.0
9	0	0	0	303.6
10	0	1	1	260.7
11	1	0	-1	157.5
12	1	1	0	247.5
13	0	-1	-1	192.9
14	-1	0	1	241.7
15	0	0	0	317.9
16	-1	-1	0	250.0
17	0	0	0	314.3

根据表2的结果，利用 Design-Expert 7.1.3.1 软件进行非线性回归的二次多项式拟合，得到的预测模型如下： $Y=307.16-11.56A+11.24B+25.83C-2.50AB+1.02AC+5.37BC-38.36A^2-17.56B^2-68.18C^2$ 。

表3 二次多项模型方差分析表

Table 3 Variance analysis of the fitted model for CEP activity

变异源	平方和	自由度	均方	F值	Prob > F
总模型	36894.31	9	4099.37	60.37	< 0.0001
失拟项	167.91	3	55.97	0.73	0.5864
误差项	307.45	4	76.86		
总和	37369.68	16	$R^2=0.9873$		$R^2_{Adj}=0.9709$

从该模型的方差分析(表3)可见,本试验所选用的二次多项模型具有高度显著性($P < 0.0001$)^[10]。失拟项不显著($P=0.5864 > 0.05$),其校正决定系数为0.9709,说明该模型能解释97.09%响应值的变化,仅有总变异的2.93%不能用此模型来解释,决定系数为0.9873,说明该模型拟合程度良好。

表4 回归方程系数显著性检验

Table 4 Significant testing of each regression coefficient in the fitted model for CEP activity

系数来源	回归系数	标准差	F值	Prob > F
总模型	307.16	3.69	60.37	< 0.0001
A	-11.56	2.91	15.75	0.0054
B	11.24	2.91	14.88	0.0062
C	25.83	2.91	78.57	< 0.0001
AB	-2.50	4.12	0.37	0.5632
AC	1.02	4.12	0.06	0.8107
BC	5.37	4.12	1.70	0.2333
A ²	-38.36	4.02	91.21	< 0.0001
B ²	-17.56	4.02	19.11	0.0033
C ²	-68.18	4.02	288.22	< 0.0001

对上述方程的回归系数显著性检验(表4)表明,试验中A、B、C这几个因素对水解度的影响显著($P \leq 0.05$ 时水平显著),C影响程度最为显著,其次是A,最后是B。方程二次项影响是显著的,交互项影响不显著。

如图4所示,每个等高线图中都含有一个中心点,说明在试验设计时所选的因素水平较合理。此外,图4等高线的形状反映出交互效应的强弱大小,圆形表示两因素交互作用不显著,而椭圆形则与之相反,所以从图4也可以看出,这几个因素之间的交互作用不太显著。

用Design-Expert 7.1.3.1软件进行分析,可以求得最适的提取条件为:细胞质量浓度0.06g/mL、破碎功率330W、破碎总时间1762s,即工作220次(工作时间3s,间隔时间5s)。在此条件下破碎细胞,可得预测值酶活力为312.735U/g菌体。在此条件下进行验证实验,得到酶活力为315.826U/g菌体,证明预测值与实验值基本相一致。

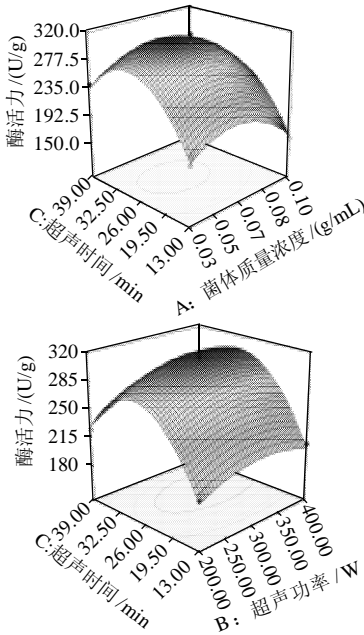
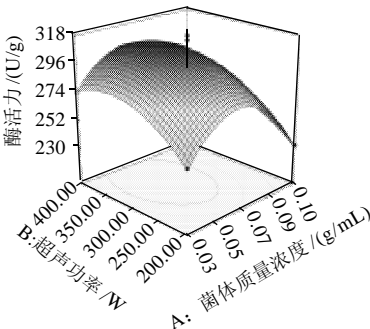


图4 各变量对 CEP 活性影响的响应曲面图

Fig.4 Response surface plots showing the effects of three variables on CEP activity

2.3 CEP 的分离纯化

2.3.1 硫酸铵分级沉淀

本实验采用硫酸铵分级沉淀的方法作为提纯 CEP 的第一步,纯化结果见表5。CEP 在硫酸铵饱和度为0~40%、40%~60%时,蛋白酶活力较高,酶比活力也较高,所以选择0~60%为合适的硫酸铵盐析饱和度。经聚乙二醇浓缩后,酶活力为1440U,蛋白含量为191.16mg,酶比活力为7.533U/mg。

表5 (NH₄)₂SO₄ 饱和度对 CEP 提取的影响

Table 5 Effect of (NH₄)₂SO₄ saturation degree on the purification of CEP

(NH ₄) ₂ SO ₄ 饱和度	0~40%	40%~60%	60%~80%	80%~100%
酶活力/U	1050.5	1150.5	431.25	314.5
蛋白含量/mg	93.5	106.47	83.927	64.94
酶比活力/(U/mg)	11.235	10.806	5.138	4.843

2.3.2 Sephacryl S-300 HR 凝胶层析

凝胶层析是根据蛋白质大小不同,通过分子筛效应达到分离各种蛋白的目的。为了使凝胶层析达到最好的效果,应选用合适的凝胶层析填料和柱子。Sephacryl HR 介质的颗粒尺寸分布较窄,如果填充良好,层析柱的柱效能够达到每米9000个以上的理论塔板数。而本实验研究的 CEP,分子质量在40~200kD^[11-16],故选择了分离范围在10~1000kD的Sephacryl S-300 HR 填料,同时选择了较长的层析柱1.6cm × 50cm。

从图5可以看出,经过硫酸铵盐析后的粗酶液经过 Sephacryl-S-300 HR 分离后有3个组分,各组分的酶活力及酶比活力见表6,可以看出第1个组分酶活力和酶比活力都是最高的,所以选择第1个组分进行下一步分离纯化。

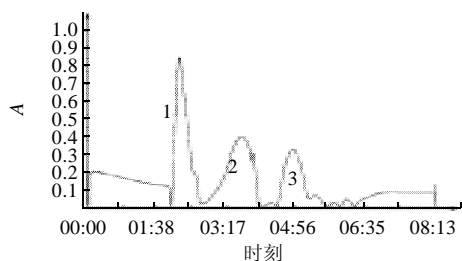


图5 CEP的Sephacryl S-300 HR层析图

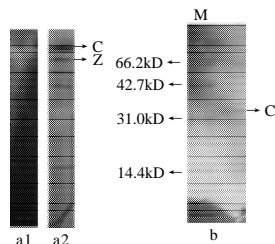
Fig.5 Chromatographic profile of CEP on Sephacryl S-300 HR column

表6 Sephacryl-S-300 HR各峰的CEP活性

组分	1	2	3
酶活力/U	644.4	279.3	111.1
蛋白含量/mg	62	42.41	62.59
酶比活力/(U/mg)	10.39	6.59	1.78

2.3.3 酪蛋白酶谱法

根据图6a1的酪蛋白酶谱图,割下图6a2上与之相对应的位置的一条颜色较深的蛋白带C和下面一条较浅的蛋白带Z。将胶切碎回收蛋白后测定CEP酶活力,C条带酶比活为16.601U/mg,Z条带没有酶活性,视为杂带。从图6b的标准蛋白条带M可画出一条斜率为负的标准曲线,然后从标准曲线上就可求出此发酵乳杆菌CEP的分子质量为32.5kD。



a1. 酪蛋白酶谱图; a2. Sephacryl S-300 HR分离后第1组分; b. SDS-PAGE的CEP; M. 标准蛋白分子质量。

图6 CEP的PAGE (a)和SDS-PAGE (b)电泳图

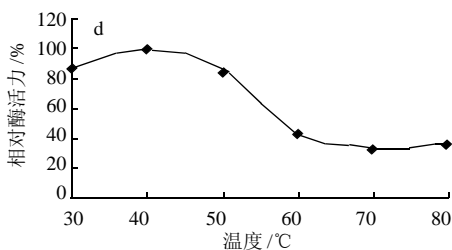
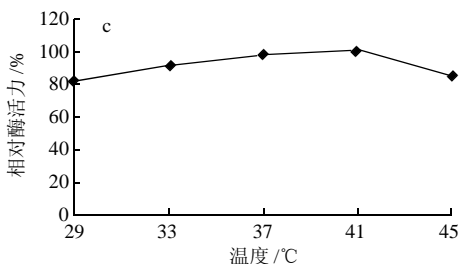
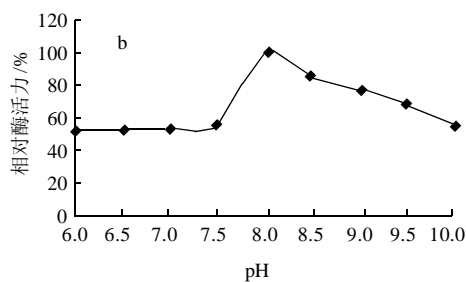
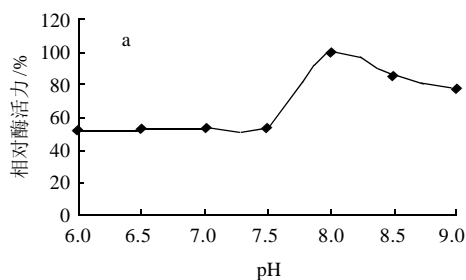
Fig.6 Native PAGE (a) and SDS-PAGE (b) of CEP

2.4 CEP水解乳蛋白对ACE的抑制作用

用CEP水解乳蛋白后,其水解产物的ACE抑制活性能达到50%,说明CEP具有独立的蛋白水解能力,是发酵乳杆菌水解乳蛋白产生ACE抑制肽的很重要的一种酶。

2.5 CEP性质研究

2.5.1 最适酶反应pH值



a. CEP的最适pH值; b. pH值对CEP稳定性的影响; c. CEP的最适温度; d. 温度对CEP稳定性的影响。

图7 pH值和温度对CEP活性的影响

Fig.7 Effects of pH and temperature on CEP activity

从图7a可以看出,CEP的最适反应pH值为8.0,当pH8.0时,酶活力最高,将其作为相对酶活力100%。当pH7.5时,相对酶活力突然下降到55%,pH值在7.5~6.0期间酶活力变动不大,相对酶活力保持在50%。pH值在8.0~9.0时相对酶活力缓慢下降至78%。

2.5.2 pH值对酶稳定性的影响

当以不同pH值的缓冲液处理CEP 30min时,酶的活力会受到一定影响。由图7b可以看出,当pH7.5时,相对酶活力突然下降到55%。pH值在8.0~10.0时相对酶活力缓慢下降至56%。这说明CEP在碱性条件下较之在酸性条件下稳定。

2.5.3 最适酶反应温度

从图7c可以看出,CEP的最适反应温度为41℃,将其作为相对酶活力100%,温度在29~45℃范围内,相对酶活力都较高,可以维持在80%以上。

2.5.4 温度对酶稳定性的影响

从图7d可以看出,温度对CEP活力的稳定性是有一定影响的。当CEP在60℃保温30min时,相对酶活力突然下降到42%,但是当酶在80℃保温30min时,相对酶活力下降到36%,这说明CEP耐热性比较强。

2.5.5 抑制剂和金属离子对酶活力的影响

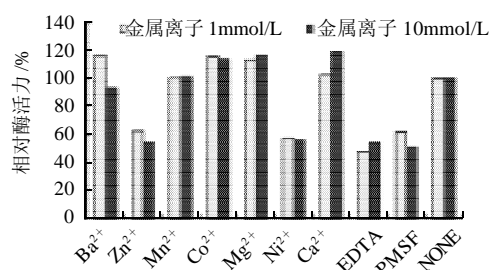


图8 金属离子及抑制剂对 CEP 活性的影响

Fig.8 Effects of metal ions and inhibitors on CEP activity

从图8可以看出,各种金属离子对 CEP 的酶活力影响不同, Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 对 CEP 活性有激活作用; Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 对 CEP 活性有强烈的抑制作用;少量的 Ba^{2+} 对 CEP 活性有激活作用,随着添加量的增加反而对 CEP 活性有略微的抑制作用; Mn^{2+} 对蛋白酶活性影响不大。此外丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 强烈抑制蛋白酶的活性,在 PMSF 浓度为 1mmol/L 和 10mmol/L 时,相对酶活力分别为 62% 和 52%,说明 CEP 是一种丝氨酸蛋白酶。金属蛋白酶抑制剂 EDTA 对 CEP 活力有更强的抑制作用,在 EDTA 浓度为 1mmol/L 和 10mmol/L 时,相对酶活力分别为 48% 和 54%,这可以说明酶的活性中心结构的维持与金属离子有关。

3 结 论

本实验利用响应面分析法,借助 Design-Expert 7.1.3.1 数据处理软件对超声波破碎法提取发酵乳杆菌 CEP 条件进行了优化。确定了影响提取 CEP 的因素显著性顺序为破碎时间>细胞质量浓度>破碎功率,以 CEP 活力为评价指标,得到了破壁的最佳条件为:细胞质量浓度 0.06g/mL,破碎功率 330W,破碎时间 1762s,即工作 220 次(工作时间 3s,间隔时间 5s)。

通过硫酸铵分级沉淀纯化实验,选择 0~60% 为合适的硫酸铵盐析饱和度;通过 Sephacryl S-300 HR 凝胶进行了层析分离,确定第 1 峰为目标峰;通过酪蛋白酶谱法确定 CEP 条带;通过 Native-PAGE 凝胶回收蛋白纯化了发酵乳杆菌的 CEP,酶比活力为 16.601U/mg。用纯化的 CEP 水解乳蛋白,证实了 CEP 可以单独水解乳蛋白并产生 ACE 抑制肽,且能达到 50% 的 ACE 抑制率。

纯化后的发酵乳杆菌 CEP 经 SDS-PAGE 检测分子质量为 32.5kD,最适酶反应温度为 41℃,最适酶反应 pH8.0。 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 对 CEP 活性有激活作用; Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、

丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF、金属蛋白酶抑制剂 EDTA 对 CEP 活性有强烈的抑制作用。说明 CEP 为丝氨酸蛋白酶且酶的活性中心结构的维持与金属离子有关。

参考文献:

- [1] 叶雪飞,何国庆. 发酵乳杆菌增殖培养基营养因子优化研究[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 194-196.
- [2] 郭宇星,潘道东. 乳酸乳球菌细胞壁蛋白酶的分离纯化[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 388-391.
- [3] 何煜波. 香肠发酵乳杆菌的基本特性[J]. 肉类工业, 2002(6): 22-26.
- [4] de PALENCIA P F, PELAEZ C, ROMERO C. Purification and characterization of the cell wall proteinase of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL731 isolated from raw goat's milk cheese[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45: 3401-3405.
- [5] 李巧枝,董淑丽. 生物化学实验技术[M]. 北京: 气象出版社, 2002: 43-44.
- [6] 萨姆布鲁克,拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂,译. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [7] CUSHMAN D W, CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochemical Pharmacology, 1971, 20: 1637-1648.
- [8] 傅绍军,李微,朱利民. 瑞士乳杆菌摇瓶发酵条件及产酶条件优化[J]. 药物生物技术, 2005, 12(6): 361-365.
- [9] 欧阳琴,陈兴才,黄亚治. 雨生红球藻提取虾青素不同机械破壁方法的研究[J]. 福州大学学报, 2005, 33 (1): 111-115.
- [10] BOX G P, BEHNKEN D W. Some new three level design for the study of quantitative variables[J]. Technometrics, 1960(2): 456-475.
- [11] LAAN H, KONINGS W N. Autoproteolysis of the extracellular serine proteinase of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 55: 2586-2590.
- [12] COOLBEAR T, REID J R, PRITCHARD G G. Stability and specificity of the cell wall-associated proteinase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H2 released by treatment with lysozyme in the presence of the calcium ions[J]. American Society for Microbiology, 1992, 58(10): 3263-3270.
- [13] NISSEN-MEYER J, SLETTEN K. Purification and characterization of the free form of the lactococcal extracellular proteinase and its autoproteolytic cleavage products[J]. Journal of General Microbiology, 1991, 137: 1611-1618.
- [14] GOVINDASAMY-LUCEY S, GOPAL P K, SULLIVAN P A, et al. Varying influence of the autolysin, N-acetyl muramidase, and the cell envelope proteinase on the rate of autolysis of six commercial *Lactococcus lactis* cheese starter bacteria grown in milk[J]. Dairy Res, 2000, 67: 585-596.
- [15] YAMAMOTO N, AKINO A, TANKANO T, et al. Presence of active and inactive molecules of a cell wall-associated proteinase in *Lactobacillus helveticus* CP790[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(2): 698-701.
- [16] MARTÍN-HERNÁNDEZ M C, ALTING A C, EXTERKATE F A. Purification and characterization of the mature, membrane-associated cell-envelope proteinase of *Lactobacillus helveticus* L89[J]. Applied Microbiol and Biotechnol, 1994, 40: 828-834.