

雅致放射毛霉 AS3.2778 酸性蛋白酶的 纯化及性质研究

潘进权

(湛江师范学院生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

摘要: 毛霉蛋白酶对大豆蛋白有较高的水解效率以及对蛋白水解物具有良好的脱苦效果, 因此在大豆多肽的制备方面显示出很好的应用前景。为了开发这一蛋白酶系, 采用硫酸铵盐析、羧甲基琼脂糖凝胶阳离子交换层析及苯基琼脂糖凝胶疏水层析对其进行分离纯化, 从雅致放射毛霉 AS3.2778 的发酵麸曲中纯化得到两个酸性蛋白酶组分 Pa1 和 Pa2。电泳分析并结合凝胶色谱确定纯化的两个组分均是单体酶, 其分子质量分别在 35ku 和 33ku。对其性质研究发现: Pa1 在 pH5.5、50℃ 有最大催化活性, Pa2 在 pH4.5、50℃ 有最大催化活性; 两者在温度低于 40℃, 酸性的环境(pH4.0~7.0)中有很好的稳定性; 浓度 10 μmol/L 的 Pepstatin A 可以完全抑制这两种蛋白酶的活性, 表明 Pa1 和 Pa2 属于天冬氨酸蛋白酶家族; 金属离子对两者的活性影响不显著, 其中仅 Cu²⁺、Zn²⁺ 对 Pa1 有弱的抑制作用, 而 Mn²⁺、Co²⁺、Cu²⁺ 对 Pa2 有弱的抑制作用; Pa1 和 Pa2 具有相同的肽键选择性, 并且与雅致放射毛霉碱性蛋白酶 Pb1 存在一定的肽键选择互补性; Pa2 的 N 端氨基酸序列为: GTGTVPVTDY, 这与来源于根霉属微生物的酸性蛋白酶有很高的同源性。

关键词: 雅致放射毛霉; 酸性蛋白酶; 纯化; 性质

Purification and Properties of Acidic Proteases from *Actinomucor elegans* AS3.2778

PAN Jin-quan

(School of Life Science and Technology, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang 524048, China)

Abstract: Proteases from *Mucor* have a good market prospect in the production of soybean polypeptides for their high effectiveness in hydrolyzing soy protein and debittering hydrolyzed soy protein. In this work, we isolated and purified two acid proteases, Pa1 and Pa2 from *Actinomucor elegans* AS3.2778-fermented wheat bran by ammonium sulfate fractional precipitation, CM-Sephadex cation-exchange chromatography and phenyl-Sephadex hydrophobic chromatography. Pa1 and Pa2 were identified by SDS-PAGE analysis as monomeric enzymes with respective molecular weight of 35 ku and 33 ku. Pa1 had the highest activity at pH 5.5 and 50 °C, and Pa2 at pH 4.5 and 50 °C. Both enzymes showed good stability at temperatures below 40 °C and in acidic environment (pH 4.0—7.0) and were entirely inhibited by 10 μmol/L Pepstatin A, indicating that they belong to the aspartic protease family. Pa1 and Pa2 were weakly inhibited by Cu²⁺ and Zn²⁺ and Mn²⁺, Co²⁺ and Cu²⁺, respectively. The two enzymes had the same peptide bond selectivity complementary to that of alkaline protease Pb1 from *Actinomucor elegans* AS3.2778. The N-terminal amino acid sequence of Pa2 was GTGTVPVTDY, which was highly homologous to that of acid proteases from *Rhizopus* published in the NCBI database.

Key words: *Actinomucor elegans*; acidic proteases; purification; properties

中图分类号: Q814.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)13-0264-06

毛霉是腐乳发酵生产的主要菌种之一, 在腐乳生产工艺中其主要作用是分泌蛋白酶水解豆腐胚内的大豆蛋白。已有的研究发现: 腐乳成品中的蛋白质主要是以多

肽形式存在的, 具有相当高的水解程度, 并且已经从中分离出多种具有生理活性的多肽^[1-2]; 而对众多腐乳产品的感官分析也表明, 腐乳产品通常不具有一般蛋白水

收稿日期: 2010-10-30

基金项目: 广东省自然科学基金项目(9452404801001943); 湛江师范学院博士专项基金项目(ZL0912)

作者简介: 潘进权(1978—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为酶与发酵工程。E-mail: pjq78@tom.com

解物所特有的苦味^[3]。综合以上结果来看,毛霉蛋白酶在解决植物蛋白水解方面存在的难题,如水解率低、水解产物具有强烈的苦味等方面具有很大的应用潜力^[3]。

已有的报道显示,多数真核微生物胞外都含有由多种蛋白酶所构成的复杂蛋白水解酶系^[4-5]。毛霉蛋白酶对大豆蛋白有很强的水解能力,可以实现大豆蛋白的深度水解^[6],这与毛霉胞外复杂的蛋白酶系有密切的关系^[7]。因此,对这一蛋白酶系的研究有望为开发新型高效的复合蛋白酶制剂奠定基础。在前期研究工作中,已经从雅致放射毛霉 AS3.2778 的发酵麸曲中纯化出一个碱性蛋白酶组分,并对其水解特性进行了分析^[8]。为了更全面的探讨雅致毛霉 AS3.2778 的胞外蛋白酶系,本实验对其胞外的酸性蛋白酶组分进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

雅致放射毛霉 AS3.2778 湛江师范学院生命科学与技术学院微生物实验室保藏菌种。

羧甲基琼脂糖凝胶(CM-Sepharose)、苯基琼脂糖凝胶(Phenyl-Sepharose) 美国 Pharmacia 公司; Phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)、Leupeptin、Aprotinin、E-64、Pepstatin A、Insulin Chain B Oxidized 美国 Sigma 公司;其他试剂均为分析纯或生化试剂。

1.2 方法

1.2.1 蛋白酶活力测定

采用 Folin 酚法^[9]。1.5mL 离心管中加入 0.3mL 适当稀释的酶液及 0.3mL 1.5% 酪蛋白(溶于 0.05mol/L pH5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液),40℃反应 10min,再加 0.6mL 0.4mol/L 的三氯乙酸终止反应,静置 15min 后于 14000 × g 离心 10min,取上清液 0.6mL,加入 3mL 0.4mol/L 碳酸钠溶液及 0.6mL 福林酚试剂,于 40℃显色 20min,于波长 680nm 处测其吸光度,根据标准曲线计算酶活力。酶活力单位定义:实验条件下,每分钟水解酪蛋白释放出 1 μg 当量酪氨酸所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.2 粗酶液的提取

称取一定量的干麸曲(发酵方法见文献[10])加入 10 倍体积的 0.3mol/L 氯化钠溶液,混匀后于 40℃水浴中抽提 1.5h,纱布过滤后在 4℃、7000 × g 离心 10min,取上清液即得到粗酶液。

1.2.3 雅致放射毛霉酸性蛋白酶的纯化

1.2.3.1 硫酸铵分段盐析

取一定体积的粗酶液,在冰水浴上缓慢加入固体硫酸铵至 40% 饱和度,充分溶解后在 4℃冰箱中静置 3h,于 4℃、12000 × g 离心 20min,取上清液继续加入固体硫酸铵至 85% 饱和度,4℃冰箱中静置过夜,然后于 4℃、

12000 × g 离心 20min,蛋白沉淀用 0.05mol/L pH5.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液溶解,并透析脱盐。

1.2.3.2 羧甲基琼脂糖凝胶阳离子交换层析

用 0.05mol/L pH5.0 醋酸盐缓冲液平衡羧甲基琼脂糖凝胶阳离子交换柱,取一定量盐析后的酶液加样于阳离子交换柱。用平衡缓冲液充分洗柱后,用 0.5mol/L 的 NaCl 溶液(溶于 0.05mol/L pH5.0 醋酸缓冲液)进行梯度洗脱,流速 1.0mL/min。分别收集活性洗脱峰 1(即 Pa1 蛋白峰)和峰 2(即 Pa2 蛋白峰),然后分别用超滤离心管浓缩收集的酶液。

1.2.3.3 苯基琼脂糖凝胶疏水层析

用 1.2mol/L 硫酸铵溶液(溶于 0.05mol/L, pH5.0 的醋酸盐缓冲液)平衡苯基琼脂糖凝胶疏水层析柱。分别将上一步的浓缩酶液与 2.4mol/L 硫酸铵溶液(溶于 0.1mol/L pH5.0 的醋酸盐缓冲液)等体积混和后加样于苯基琼脂糖凝胶疏水层析柱,用平衡缓冲液充分冲洗疏水柱,然后用 A 液(0.05mol/L pH5.0 的醋酸盐缓冲液)和 B 液[1.2mol/L 硫酸铵溶液(溶于 0.05mol/L pH5.0 的醋酸盐缓冲液)]进行梯度洗脱,流速 1.0mL/min。收集梯度洗脱的目标蛋白峰。用超滤离心管浓缩收集的酶液,并进行脱盐处理。

1.2.4 蛋白酶纯度测定^[11]

利用 SDS-PAGE 检测纯化后的蛋白酶纯度,采用 14% 分离胶,5% 浓缩胶。

1.2.5 雅致放射毛霉酸性蛋白酶的催化性质

1.2.5.1 pH 值对雅致放射毛霉酸性蛋白酶活性及稳定性的影响

分别于不同 pH 值的缓冲体系(0.05mol/L 乙酸盐缓冲液 pH3.0~5.0; 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液 pH6.0~8.0; 0.02mol/L Tris-HCl pH7.5~9.0)中测定纯化后的酸性蛋白酶组分 Pa1 和 Pa2 的活性,以最大酶活力为 100%,计算其他条件下的相对酶活力,探讨 pH 值对毛霉蛋白酶活性的影响。

将纯化后的酸性蛋白酶组分 Pa1 和 Pa2 置于以上不同的 pH 值缓冲体系中,于室温放置 2h。测定保温放置前后蛋白酶活力,计算保温放置后的酶活力相对于保温前酶活力的百分数。

1.2.5.2 温度对雅致放射毛霉酸性蛋白酶活性及稳定性的影响

分别于不同的温度条件下测定纯化后的酸性蛋白酶组分 Pa1 和 Pa2 的酶活力,以最大酶活力为 100%,计算其他条件下的相对酶活力,考察温度对酸性蛋白酶活性的影响。

将纯化后的酸性蛋白酶组分 Pa1 和 Pa2 分别在不同温度(30、40、45、50、55、60℃)条件下保温 30min,测定保温放置前后蛋白酶活性,计算保温放置后的酶活

力相对于保温前酶活力的百分数。

1.2.5.3 抑制剂对雅致放射毛霉酸性蛋白酶活性的影响

在纯化的酸性蛋白酶 Pa1 和 Pa2 酶液中加入各种抑制剂, 然后于室温中放置约 30min, 测定蛋白酶活性, 计算加入抑制剂的蛋白酶活力相对于空白对照酶活力的百分数。

1.2.5.4 金属离子对雅致放射毛霉酸性蛋白酶活性的影响

为了考察金属离子对酸性蛋白酶 Pa1 和 Pa2 活性的影响, 在纯化后的酸性蛋白酶 Pa1 和 Pa2 酶液中加入 5mmol/L 的不同金属离子, 然后于室温放置约 30min, 测定蛋白酶活性, 计算加入金属离子的蛋白酶活力相对于空白对照酶活力的百分数。

1.2.6 雅致放射毛霉酸性蛋白酶肽键选择性的分析^[12-13]

取牛胰岛素氧化 B 链(insulin chain B oxidized from bovine pancreas)100 μ g, 用 1mL 0.02mol/L pH5.0 乙酸-乙酸铵缓冲液溶解, 加入一定量酶液(约 30U), 混和后放置于 40℃ 水浴酶解 1h, 然后将水解液在沸水浴中灭活 5min。用 0.1% 甲酸溶液 10 倍稀释上述水解液, 然后利用质谱(ABI 4800 MALDI-TOF/TOF Analyzer, 美国应用生物系统公司)测定稀释水解液中小肽片段的分子质量分布, 将所得的结果与胰岛素 B 链随机片段的分子质量比对, 据此确定酸性蛋白酶在胰岛素 B 链上的酶切位点。

1.2.7 雅致放射毛霉酸性蛋白酶的 N 端测序分析

将纯化后的 Pa2 样品以溶液的形式送中国科学院上海生命科学研究院蛋白质组学研究分析中心, 经电泳及转膜后对目标蛋白条带进行 N 端测序分析。

2 结果与分析

2.1 雅致放射毛霉酸性蛋白酶的纯化及电泳检测

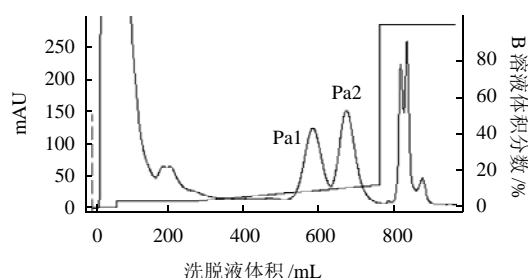


图1 硫酸铵盐析后酶液的羧甲基琼脂糖凝胶阳离子交换层析洗脱图
Fig.1 Elution profile of acidic proteases on CM-Sepharose column

如图1所示, 雅致放射毛霉酸性蛋白酶在经过硫酸铵盐析及离子交换层析之后可以从分离纯化出两个不同的组分 Pa1 和 Pa2。两者的等电点存在很小的差异, 因此在离子交换过程中 Pa1 和 Pa2 的活性峰并没有达到基线分离。图4的电泳结果显示, 层析之后的两个蛋白酶

组分均已达到电泳纯。结合凝胶色谱的结果确定纯化的两组分均是由单一亚基构成的单体酶, 其分子质量分别为 35ku 和 33ku。

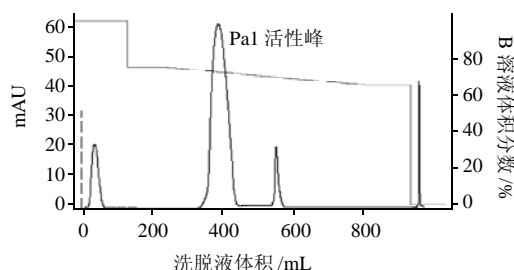


图2 Pa1 苯基琼脂糖凝胶疏水层析洗脱曲线
Fig.2 Elution profile of Pa1 on phenyl-Sepharose column

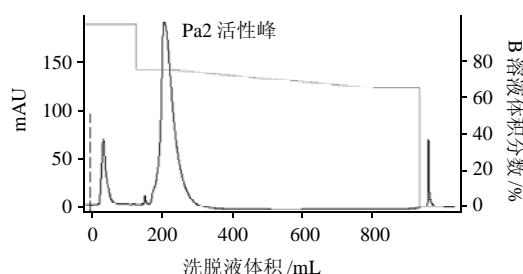
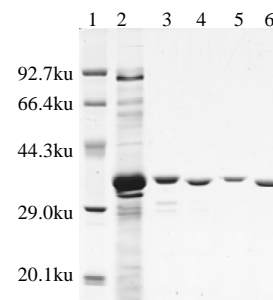


图3 Pa2 苯基琼脂糖凝胶疏水层析洗脱曲线
Fig.3 Elution profile of Pa2 on phenyl-Sepharose



Lane1. 蛋白质 Marker; Lane2. 盐析后酶液; Lane3. CM-Sepharose 收集样 Pa1; Lane4. CM-Sepharose 收集样 Pa2; Lane5. 纯化后的 Pa1 样品; Lane6. 纯化后的 Pa2 样品。

图4 酸性蛋白酶的 SDS-PAGE 电泳分析
Fig.4 SDS-PAGE of purified Pa1 and Pa2

2.2 雅致放射毛霉酸性蛋白酶的催化特性

2.2.1 pH 值对雅致放射毛霉酸性蛋白酶活性及稳定性的影响

与雅致放射毛霉碱性蛋白酶相比^[8], 雅致放射毛霉酸性蛋白酶的作用 pH 值范围相对较窄, 两组分仅在偏酸性的环境中具有相对较强的催化活性, 而在中性及偏碱性环境中活性极弱。与其他微生物源酸性蛋白酶相比^[14-15], Pa1 与 Pa2 的最适作用 pH 值相对较高, 其最适作用 pH

值分别在 pH5.5 和 pH4.5(图 5A), 这一特点与微小毛霉酸性蛋白酶的催化特性较一致^[15]。

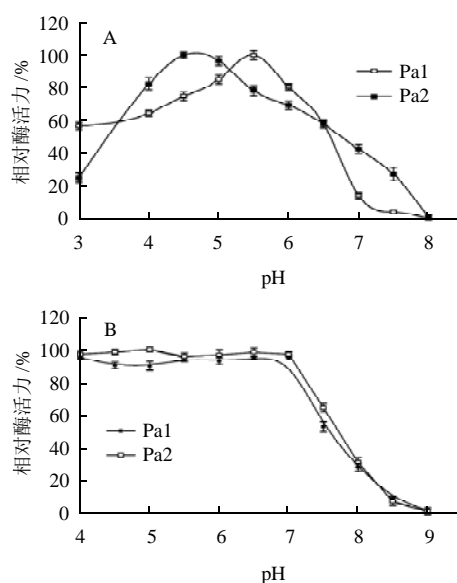


图 5 pH 值对雅致放射毛霉酸性蛋白酶活性(A)及稳定性(B)的影响
Fig.5 Effect of pH on the activity and stability of Pa1 and Pa2

稳定性实验结果显示, 雅致放射毛霉酸性蛋白酶在弱酸性环境(pH4.0~7.0)能保持很好的稳定性, 在室温放置 2h 后仍有 90% 以上的酶活力残留; 当环境的 pH 值高于 7.0 时, 它们非常不稳定, 会迅速失活。如, 在 pH8.0、室温放置仅 2h, 其活性损失高达 70% 以上; 另外, 雅致放射毛霉酸性蛋白酶在碱性条件下的变性失活速度随着 pH 值的升高呈现不断加快的变化趋势(图 5B)。为了探寻碱性条件下的失活原因, 利用电泳分析了失活前后蛋白条带的变化(图片未列出), 结果发现: 失活前纯化的样品仅有单一电泳条带; 在碱性条件下失活后, 原先的单一电泳条带就消失了, 继而多出了一些相对分子质量较小的蛋白条带。这表明纯化后的样品在碱性条件下放置时其中的 Pa1(或 Pa2)被水解掉了, 这是其失活的主要原因。由于样品是纯化后的纯品, 其中就只有一种蛋白酶(Pa1 或 Pa2), 所以不存在其他蛋白酶对 Pa1(或 Pa2)的水解作用。由此来看, Pa1(或 Pa2)在碱性条件下是发生了分子内的“自催化水解”, 从而导致其失活。这种分子内的“自水解”失活现象目前还没有见到有类似的文献报道, 其作用机制将在后续的研究进一步探讨。

2.2.2 温度对雅致放射毛霉酸性蛋白酶活性及稳定性的影响

已有的研究表明, 微生物源酸性蛋白酶的最适作用温度较碱性蛋白酶低, 通常在 40℃ 左右^[16]。然而, 本实验中纯化的酸性蛋白酶却具有相对较高的最适作用温

度。如图 6A 所示, 纯化的 Pa1 和 Pa2 组分的最适作用温度均在 50℃ 左右。另外, 酸性蛋白酶 Pa1 和 Pa2 也具有相对较好的热稳定性, 在温度低于 40℃ 时, Pa1 和 Pa2 有很好的热稳定性, 几乎无失活现象; 在 45~50℃ 时, 表现出较缓慢的失活现象; 当温度高于 55℃ 时, 两组分迅速失活(图 6B)。这一特性与来源于 *Penicillium duponti* K1010 的酸性蛋白酶较为相似^[17]。

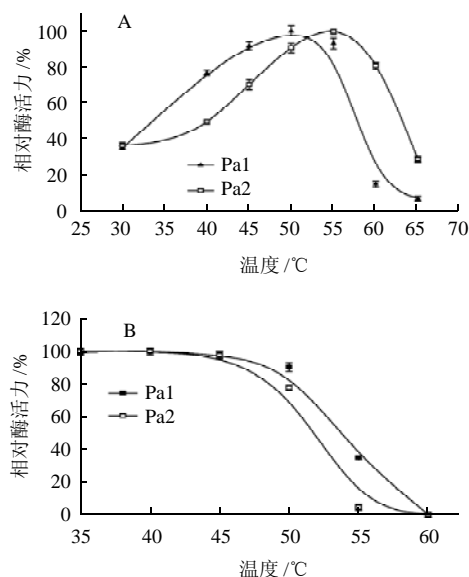


图 6 温度对雅致放射毛霉酸性蛋白酶活性(A)及稳定性(B)的影响
Fig.6 Effect of temperature on the activity and stability of Pa1 and Pa2

2.2.3 抑制剂及金属离子对雅致放射毛霉酸性蛋白酶活性的影响

表 1 抑制剂及金属离子对雅致放射毛霉酸性蛋白酶活性的影响
Table 1 Effects of inhibitors and metal ions on the activity of Pa1 and Pa2

抑制剂类型及浓度	Pa1 相对酶活力 /%	Pa2 相对酶活力 /%
对照	100	100
E-64(10μmol/L)	98.1 ± 0.8	110.7 ± 0.4
EDTA(10mmol/L)	100.9 ± 1.1	102.7 ± 1.4
PMSF(1mmol/L)	97.9 ± 0.7	110.7 ± 0.3
Leupeptin(1mmol/L)	51.3 ± 1.7	51.0 ± 1.0
Pepstatin A(10μmol/L)	0 ± 0.3	0 ± 0.1
DTT(10mmol/L)	92.4 ± 0.8	100 ± 0.3
5%Triton	47.1 ± 0.9	43.1 ± 0.7
0.1%SDS	0 ± 0.1	0 ± 0.2
Ca ²⁺ (5mmol/L)	100.0 ± 0.8	91.48 ± 2.1
Mg ²⁺ (5mmol/L)	93.9 ± 3.1	96.67 ± 2.4
Zn ²⁺ (5mmol/L)	79.3 ± 1.3	93.76 ± 1.2
Fe ²⁺ (5mmol/L)	91.5 ± 2.1	93.97 ± 3.3
Mn ²⁺ (5mmol/L)	105.2 ± 1.5	89.17 ± 0.7
Cu ²⁺ (5mmol/L)	82.0 ± 2.0	87.99 ± 1.7
Co ²⁺ (5mmol/L)	99.1 ± 1.6	90.75 ± 2.5

如表 1 所示,在选用的几种常用蛋白酶抑制剂中,仅 Pepstatin A 可以完全抑制 Pa1 和 Pa2 的活性,说明蛋白酶 Pa1 和 Pa2 属于天冬氨酸蛋白酶家族。实验结果还显示,纯化后的 Pa1 和 Pa2 组分对离子型表面活性剂 SDS 非常敏感,0.1% 的 SDS 可以完全抑制其活性,而非离子型表面活性剂 Triton 对其抑制作用相对较弱,5% 的 Triton 可以抑制其约 50% 的酶活性。除此外,非专一性的蛋白酶抑制剂 Leupeptin 对酸性蛋白酶也有一定的抑制作用,终浓度 1mmol/L 的 Leupeptin 可以抑制其约 50% 的活性。然而,Leupeptin 通常只是对某些丝氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶起抑制作用,由此初步说明,纯化的 Pa1 和 Pa2 组分在结构上可能与以上两类蛋白酶存在某些相似性。

实验结果表明,常见的金属离子对酸性蛋白酶没有非常显著的抑制或激活作用,仅有几种离子表现出弱的抑制作用效果,如 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 对毛霉酸性蛋白酶组分 Pa1 有弱的抑制作用,终浓度为 5mmol/L 时,可抑制大约 20% 的活性;而终浓度 5mmol/L 的 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Co^{2+} 则对 Pa2 有极弱的抑制作用(约 10% 左右)。

2.3 雅致放射毛霉酸性蛋白酶的肽键选择性

表 2 雅致放射毛霉酸性蛋白酶及其他蛋白酶在牛胰岛素 B 链上的切割位点

Table 2 Cleavage points of Pa1 and Pa2 and other proteases on oxidized insulin B chain

牛胰岛素 B 链序列	F	V	N	Q	H	L	C	G	S	H	L	V	E	A	L	Y	L	V	C	G	E	R	G	F	F	Y	T	P	K	A
Pa1																														
Pa2																														
1																														
2																														
3																														
4																														
5																														
6																														
7																														
8																														
9																														
10																														

注:表中箭头指示酶切位点,其粗细表示水解强度的大小:(↑>↑>↑)其他已报道的天冬氨酸蛋白酶^[19]:1. Aspartic proteinase from *Rhizopus hanochow*; 2. *R. chinensis* aspartic proteinase; 3. *Aspergillus saitoi* aspartic proteinase; 4. *A. sojae* aspartic proteinase; 5. *Penicillium janthinellum* aspartic proteinase; 6. *Cryphonectria parasitica* (*Endothia parasitica*) aspartic proteinase; 7. *Rhizomucor pusillus* (*Mucor pusillus*) aspartic proteinase; 8. human pepsin 3; 9. human pepsin 5; 10. human non-pepsin proteinase。

如表 2 所示,雅致放射毛霉酸性蛋白酶组分 Pa1 和 Pa2 在牛胰岛素 B 链上具有完全相同的酶切位点分布,说明这两种蛋白酶组分具有非常相似的肽键选择性,是一

组同工酶。从酶切位点的分布看,雅致放射毛霉酸性蛋白酶与其他来源的天冬氨酸蛋白酶有相似的地方,均对肽键 15-Leu-|-Tyr-16、16-Tyr-|-Leu-17、24-Phe-|-Phe-25 有非常强的水解活性;与大多数酸性蛋白酶不同的是,雅致放射毛霉酸性蛋白酶对牛胰岛素 B 链上 4-Gln-|-His-5 肽键也有很强的水解活性,这一点与 *Penicillium janthinellum* 天冬氨酸蛋白酶相似^[19]。不同于雅致放射毛霉碱性蛋白酶 Pb1 的肽键选择性^[18],雅致放射毛霉酸性蛋白酶对牛胰岛素 B 链上 15-Leu-|-Tyr-16、16-Tyr-|-Leu-17 肽键有很强水解活性,而且对肽键 5-His-|-Leu-6 和 10-His-|-Leu-11 也有一定的水解活性。由此看来,雅致放射毛霉酸性蛋白酶的肽键选择性确实与雅致放射毛霉碱性蛋白酶 Pb1 有所不同,两者之间存在一定的选择互补性。另外,从酶切位点的特性看,雅致放射毛霉酸性蛋白酶与其他蛋白酶相似,主要是对疏水性肽键显示出相对较强的水解活性。

2.2.5 毛霉酸性蛋白酶的 N 端序列分析

根据 Pa2 的 N 端测序结果,将 Pa2 的 N 端序列与其他真菌天冬氨酸蛋白酶的 N 端序列进行了比较,结果见表 3。雅致放射毛霉 AS3.2778 的酸性蛋白酶 Pa2 与同属的 *Rhizopus niveus*(得氏根霉)、M.105、*Rhizopus microsporus* var. *chinensis*(小孢根霉)有很高的 N 端同源性;但是与 *Rhizomucor miehei*(米黑根毛霉)、*Rhizomucor pusillus*(微小根毛霉)及来源于其他真菌,如 *P.janthinellum*(微紫青霉菌)、*Aspergillus fumigatus*(烟曲霉)、*Aspergillus oryzae*(米曲霉)、*Aspergillus niger*(黑曲霉)的天冬氨酸蛋白酶的 N 端序列有非常大的差异。

表 3 不同来源天冬氨酸蛋白酶 N 端序列的比较
Table 3 Comparison of N-terminal sequences of Pa2 and aspartic protease from other microbes

天冬氨酸蛋白酶	来源	N端序列
Pa2	<i>Actinomucor elegans</i> AS3.2778	G-T-G-T-V-P-V-T-D-Y
Penicillopepsin	<i>P.janthinellum</i>	A-A-S-G-V-A-I-N-I-P-T-A
Aspartylproteinase	<i>M.pusillus</i>	A-E-G-D-G-S-V-D-I-P-G-L-Y-D
Aspartylproteinase	<i>M.miehei</i>	A-A-A-D-G-S-V-D-I-P-G-Y-Y
Aspartylproteinase	M.105 ^[20]	G-I-G-I-N-V-I-D-D-G
Rhizopuspepsin-1	<i>Rhizopusniveus</i>	A-S-G-S-V-P-M-V-D-Y-E-N
Rhizopuspepsin-2	<i>Rhizopusniveus</i>	G-I-G-S-V-P-I-D-Y-N
Rhizopuspepsin-3	<i>Rhizopusniveus</i>	G-I-G-Y-V-P-I-D-Y-N
Rhizopuspepsin-4	<i>Rhizopusniveus</i>	S-S-G-S-V-P-I-D-D-G-N
Rhizopuspepsin-5	<i>Rhizopusniveus</i>	G-I-G-R-V-P-I-D-Y-N
RhizopuspepsinI.	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i>	A-G-V-G-I-V-P-I-M-I-D-Y
RhizopuspepsinII.	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensi</i>	A-G-V-G-I-V-P-I-M-I-D-Y
asparticprotease	<i>Aspergillus fumigatus</i>	S-R-H-D-V-L-D-N-F-L-N
asparticprotease	<i>Aspergillus oryzae</i>	A-A-T-G-S-V-T-I-N-P-I-S-N
asparticprotease	<i>Aspergillus niger</i>	A-P-A-P-T-R-K-G-F-I-N-Q

注:表中所列其他真菌源天冬氨酸蛋白酶 N 端序列均来源于 NCBI 库。

3 讨论与结论

腐乳酿造是一个相当复杂的生化过程,其中涉及到多种酶,尤其是多种蛋白酶的相互协同作用,对参与这一生化过程蛋白酶的深入探讨将有助于高效复合型蛋白酶制剂的开发及应用。在以往的研究中,从雅致放射毛霉 AS3.2778 的发酵麸曲中纯化出一种碱性蛋白酶,水解实验表明该碱性蛋白酶在偏碱性的条件下(pH8.0~10.0)对大豆分离蛋白具有较强的水解能力^[8]。然而,从腐乳的生产工艺来看,其蛋白水解反应通常是在偏酸性条件下进行的,为了探讨在腐乳酿造中起主要作用的酸性蛋白酶,本实验对雅致放射毛霉 AS3.2778 的胞外酸性蛋白酶组分特性进行了探讨,从其发酵麸曲中分离纯化出两个酸性蛋白酶组分 Pa1 和 Pa2。两个组分具有非常相似的催化特性:最适作用 pH 值分别在 5.5 和 4.5 左右,最适作用温度均在 50℃ 左右;两组分在偏酸性的条件下(4.0~7.0)具有很好的稳定性,室温放置 2h 后仍有 90% 以上的酶活力残留;与其他来源的酸性蛋白酶相比,Pa1 和 Pa2 具有相对较高的热稳定性,在 40℃ 以内保温几乎无失活现象。

综合已有的实验结果来看,雅致放射毛霉 AS3.2778 的胞外主要存在 3 种内切型蛋白酶,包括一种碱性蛋白酶和两种酸性蛋白酶。在腐乳的酿造工艺中,起主导作用的是酸性蛋白酶组分。此外,碱性蛋白酶组分对大豆蛋白的水解也有一定的作用。从实验结果来看,雅致放射毛霉酸性蛋白酶与碱性蛋白酶组分的肽键选择性具有一定的互补性,这表明他们在大豆蛋白的水解方面存在一定的协同作用,这可能是导致腐乳中大豆蛋白具有较高水解度的根本原因之一。

参考文献:

- [1] 陈躬瑞,陈儒明,赵晴,等.毛霉红腐乳蛋白质的研究[J].营养学报,1997,19(1):100-103.
- [2] 倪莉,饶平凡,王璋.腐乳中生理活性多肽的分离和表征[J].浙江农业大学学报,1997,23(增刊1):93-97.
- [3] LI Li, YANG Zuoyi, YANG Xiaoquan, et al. Debittering effect of *Actinomucor elegans* peptidases on soybean protein hydrolysates[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2008, 35(1): 41-47.
- [4] ELIZABETH W J. Three proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Biol Chem, 1991, 266: 7963-7966.
- [5] NAKADAI T, NASUNO S, IGUCHI N. Purification and properties of alkaline and neutral proteinases from *Aspergillus oryzae*[J]. Agr Biol Chem, 1972, 36: 261-271.
- [6] 李理,罗泽民,卢向阳.梨形毛霉蛋白酶在大豆多肽制备中的应用[J].中国粮油学报,2001,16(1):55-58.
- [7] 鲁维,孙君社,王丽英.雅致放射毛霉胞外蛋白酶特性的研究[J].中国酿造,2004(12):8-10.
- [8] 潘进权,罗晓春,谢明权.雅致放射毛霉 AS3.2778 碱性蛋白酶的纯化及水解特性[J].华南理工大学学报,2008,36(12):106-111.
- [9] SIERECHEA J K. Purification and partial characterization of a neutral protease from a virulent strain of *Bacillus cereus*[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1998, 30(5): 579-595.
- [10] 潘进权,罗晓春,谢明权.基于序贯设计的毛霉 AS3.2778 发酵产蛋白酶工艺优化[J].食品科学,2008,29(12):481-485.
- [11] LAEMMLI V K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [12] CAPIRALLA H, HIROI T, HIROKAWA T, et al. Purification and characterization of a hydrophobic amino acid-specific endopeptidase from *Halobacterium halobium* S9 with potential application in debittering of protein hydrolysates[J]. Process Biochemistry, 2002, 38: 571-579.
- [13] ROBERT B, JUDITH S B. Proteolytic enzymes: a practical approach [M]. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2001: 97-99.
- [14] PREETHA S, BOOPATHY R. Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1997, 13: 573-578.
- [15] MALAB R, APARNAM T, MOHINIS G, et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(3): 597-635.
- [16] 高维东,甘伯中,丁福军,等.微小毛霉凝乳酶的酶学性质研究[J].食品科学,2010,31(3):185-188.
- [17] HIKOTAKA H, TAKASHI I, TAMOTSU Y. Thermostable acid protease produced by *Penicillium duponti* K1010, a true thermophilic fungus newly isolated from compost[J]. Applied Microbiology, 1972, 24(6): 986-992.
- [18] 潘进权,罗晓春,谢明权.雅致放射毛霉 AS3.2778 碱性蛋白酶的纯化及性质研究[J].中国生物工程杂志,2008,28(9):111-118.
- [19] EIJI I, MAKOTO O, YOUHEI Y, et al. Molecular and enzymatic properties of an aspartic proteinase from *Rhizopus hangchow*[J]. Phytochemistry, 1995, 38(1): 27-30.
- [20] FERNANDEZ-LAHORE H M, AUDAY R M, FRAILE E R, et al. Purification and characterization of an acid proteinase from mesophilic *Mucor* sp. solid-state cultures [J]. J Peptide Res, 1999, 53: 599-605.