

文章编号:1673-1689(2005)02-0018-04

雅致放射毛霉蛋白酶

鲁 绯, 窦 珺, 刘 萍, 孙君社*

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 借助超声波、电泳和高压液相色谱技术对雅致放射毛霉胞外和胞内蛋白酶进行了研究. 结果表明:腐乳前期培菌时,雅致放射毛霉同时分泌胞外及胞内蛋白酶,两者酶活力变化趋势基本相同,在培菌 45 h 时,达到最大酶活力;胞外和胞内蛋白酶均为蛋白酶系,相对分子质量组成相同;以大豆蛋白为底物时,主要水解产物相同.

关键词: 蛋白酶;电泳;水解产物

中图分类号:Q 556

文献标识码: A

Research on Protease Produced by *Actinomucor elegans* AS 3.227

LU Fei, DOU Jun, LIU Ping, SUN Jun-she*

(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: This paper investigated the protease of *Actinomucor elegans* AS3.227 with the help of ultrasonic, electrophoresis and high pressure liquid chromatography technology. The result showed that the mucor could produce both intracellular and extra-cellular protease. The trends of the activity changes, the molecular weights, and the proteolysis products of the two protease were similar. The highest protease activities appeared at 45 h of the cultivations.

Key words: protease; electrophoresis; proteolysis product

腐乳与奶酪有着极其相似的生产过程. 对奶酪的研究表明,在奶酪发酵的前期,奶酪生产菌株产生的胞外蛋白酶(以内肽酶为主)起主要水解作用. 随着发酵的进行,菌体溶解,胞内蛋白酶释放出来,由于胞内蛋白酶主要是肽酶和氨肽酶,因此,奶酪风味的形成主要在发酵的后期,即菌体溶解后,也就是胞外和胞内蛋白酶在奶酪的发酵过程中分别发挥着不同的作用^[1]. HWA L WANG、鲍松林及李理等人用不同的盐溶液对腐乳生产菌株冻土毛霉(*Mucor hiemalis* NRRL 3103)^[2]、布氏毛霉(*M. prainii*)^[3]和梨形毛霉(*M₂₆₃₋₃*)^[4]分泌蛋白酶的释

放进行了研究,结果表明这些毛霉蛋白酶主要是以离子键松散结合在菌丝表面的胞外蛋白酶,而对毛霉是否存在胞内蛋白酶未见研究报道. 雅致放射毛霉(*Actinomucor elegans* AS3.227),异名匍匐放射毛霉,是我国传统腐乳酿造中常用的优良菌种之一,对其蛋白酶的研究主要集中在胞外蛋白酶的生产条件^[5]及特性^[6]方面. 为了更好的开发利用雅致放射毛霉蛋白酶,作者借助超声波破碎、蛋白质电泳和高压液相色谱(HPLC)等技术对雅致放射毛霉的胞外和胞内蛋白酶进行了比较.

收稿日期:2004-09-06; 修回日期:2004-12-11.

基金项目:安徽省青年教师基金项目(安徽省教育厅教人[02]2003jq161)资助课题.

作者简介:鲁绯(1968-),女,安徽蚌埠人,食品生物技术博士研究生;* 通讯作者.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌种: 雅致放射毛霉 (*Actinomucor elegans* AS3.227), 由北京王致和腐乳厂提供; 豆腐坯: 由北京王致和腐乳厂提供, 切成 2.5 cm×2.5 cm×2.4 cm 的方块; 试剂: 所用 Tris, TEMED, β -巯基乙醇, Tricine, SDS, 尿素, 甘油, 过硫酸铵, 丙稀酰胺, N,N'-甲叉双丙稀酰胺等电泳试剂, 乙腈, 三氟乙酸等色谱试剂均购于北京试剂公司; 大豆分离蛋白为日本不二制油提供。

1.2 仪器

JY92-II 超声波细胞破碎机: 上海新芝生物技术研究所制造; GL-20B 冷冻离心机: 上海安亭科学仪器厂生产; ECP3000 三恒电泳仪及垂直式小型电泳槽: 北京六一仪器公司产品; Agilent 1100 高压液相色谱仪: ODS 柱 (250 mm×4.6 mm), 二极管阵列检测器, Agilent 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 胞外及胞内蛋白酶的生产 将 4 °C 保存的菌种在 PDA 斜面培养基上活化、培养后, 加入灭菌后的蒸馏水, 震荡 1 min, 制取孢子悬浮液, 接在豆腐坯表面, 25 °C 下培养 48 h, 凉花后, 得到腐乳毛坯, 蛋白酶即附着在毛坯表面菌丝上。

1.3.2 胞外及胞内蛋白酶的提取

1) 胞外蛋白酶的提取: 剥取毛坯表面菌丝, 加入 10 倍重量 0.3 mol/L 的 NaCl 溶液, 4 °C 冰箱中过夜提取, 4 °C 下冷冻离心 (10 000 g), 上清液即为胞外蛋白酶粗液。

2) 胞内蛋白酶的提取: 将上述离心后的沉淀, 用 0.3 mol/L 的 NaCl 溶液反复清洗以除去残留的胞外酶, 压滤后, 加入与胞外蛋白酶制备时同样质量的 0.3 mol/L 的 NaCl 溶液, 冰浴中超声波破碎 (800 W, 15 min, 每次 4 s, 间隔 4 s), 4 °C 冰箱中过夜提取, 4 °C 下冷冻离心 (10 000 g), 上清液即为胞内蛋白酶粗液。

在上述蛋白酶提取液中加入硫酸铵, 收集 30~70% 饱和度, 4 °C 过夜沉淀部分, 冷冻离心 (10 000 g) 后, 用少量缓冲溶液溶解, 4 °C 下透析脱盐, 聚乙二醇浓缩, 得到胞外及胞内蛋白酶。

1.3.3 胞外及胞内蛋白酶水解液的制备 以质量分数 2% 2 mL 的大豆分离蛋白为底物, 分别用 2 mL 胞外蛋白酶和胞内蛋白酶水解 (40 °C) 2 h, 用 4 mL 4 mol/L 的三氟乙酸终止反应, 静置 10 min 后过滤, 滤液即为胞外和胞内蛋白酶的水解液。空白

液为 4 mL 4 mol/L 的三氟乙酸先与 2 mL 的酶液作用后, 再加入 2 mL 的底物溶液, 其余操作相同。所有水解液及空白液均经过 0.45 μ m 滤膜过滤^[7]。

1.3.4 电泳 对胞外及胞内蛋白酶提取液分别进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和添加底物明胶的底物凝胶电泳 (Gel-PAGE), 分离胶质量浓度为 12.5 g/dL, 浓缩胶质量浓度为 3 g/dL, 30 mA 稳流, 上样量为 20 μ L。Gel-PAGE 不连续凝胶电泳在 4 °C 下进行^[8]。

SDS-PAGE 电泳为考马斯亮兰 R-250 染色, 体积分数 30% 甲醇脱色; Gel-PAGE 电泳结束后, 用含 Triton X-100 (5%), pH 7.5 的磷酸缓冲液漂洗后放入 pH 7.5 磷酸缓冲液中, 在 37 °C 下过夜反应后, 再氨基黑染色、蒸馏水脱色。

1.3.5 蛋白酶水解产物的高压液相色谱分析 进样量: 10 μ L; 检测波长: 214 nm; 洗脱液: 溶剂 A 为水 (含体积分数 0.1% 的三氟乙酸); 溶剂 B 为体积分数 40% 的乙腈水溶液 (含体积分数 0.08% 的三氟乙酸); 洗脱条件: 梯度洗脱。溶剂 B 体积分数从 10~40%, 体积流量为 0.7 mL/min, 14 min; 从体积分数 40~60%, 体积流量 0.5 mL/min, 40 min; 从体积分数 60~90%, 体积流量 0.7 mL/min, 10 min^[9]。

2 结果与讨论

2.1 培菌时胞外及胞内蛋白酶活力的变化

前期培菌时, 毛霉胞外及胞内蛋白酶 (粗酶液中) 活力的变化见图 1。

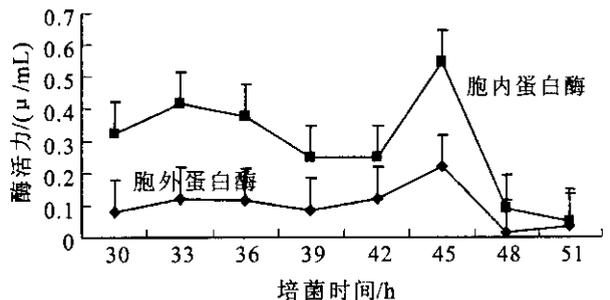


图 1 毛霉胞外及胞内蛋白酶活力的变化

Fig. 1 Activity changes of the intracellular and extracellular

注: 培菌前 30 h 时, 毛霉处于快速生长期, 无菌丝或量很少, 而蛋白酶的产生略滞后于菌丝的生长, 故从培菌 30 h 开始考察蛋白酶活力的变化。

图 1 表明, 前期培菌时, 毛霉产生的胞外及胞内蛋白酶活力变化趋势基本相同。在培菌 45 h 以内时, 毛霉分泌蛋白酶, 水解基质中的蛋白质, 作为毛霉生长的氮源, 此时, 胞外及胞内蛋白酶活力变化

较稳定; 培菌 45 h 时, 开始凉花, 毛霉大量分泌蛋白酶, 并达到最大酶活, 这与生产实践经验是相吻合的; 凉花后, 可能由于毛霉停止生长, 并不再分泌蛋白酶, 但蛋白酶向豆腐坯体的渗透还在进行, 因此, 菌丝附着的蛋白酶活力显著降低。

2.2 胞外及胞内蛋白酶 SDS-PAGE 电泳分析

电泳技术是鉴定蛋白质并分析其纯度的基本工具。20 世纪 60 年代 Shapiro 建立了 SDS-PAGE 方法之后, Weber、Gloss-mann 和 Douglas 等人对其进行了多次改进, 使 SDS-PAGE 方法在分离、鉴定和纯化蛋白质方面显示出了优越性^[10]。胞外及胞内蛋白酶 SDS-PAGE 电泳图谱见图 2。

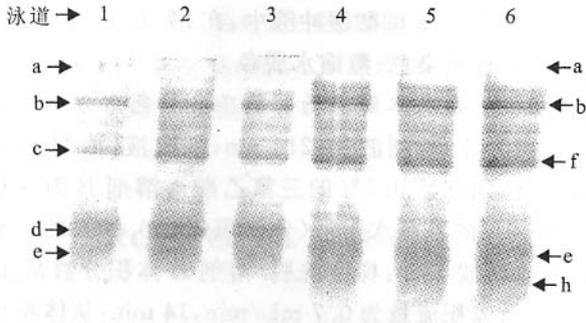


图 2 胞内与胞外蛋白酶提取液的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 The SDS-PAGE of the extraded intra-and extra-cellular protease

注: 泳道 1, 2, 3 为胞外蛋白酶提取液; 4, 5, 6 为胞内蛋白酶提取液

图 2 表明: 胞外及胞内蛋白酶中均含有若干种蛋白质组分, 其中, 胞内蛋白质组分显现的谱带略多于胞外蛋白质; 同时, 胞外和胞内蛋白酶提取液中含有相同位置的谱带, 如谱带 a、b 和 e, 说明两者中含有相同的蛋白质组分或亚基, 也含有不同位置的谱带, 如谱带 c 和 d, 说明两者中也含有不同的蛋白质组分或亚基。

2.3 胞外及胞内蛋白酶 Gel-PAGE 活性电泳分析

在 2.1 结论的基础上, 实验对胞外及胞内蛋白酶进行了 Gel-PAGE 活性电泳分析, 图谱见图 3。

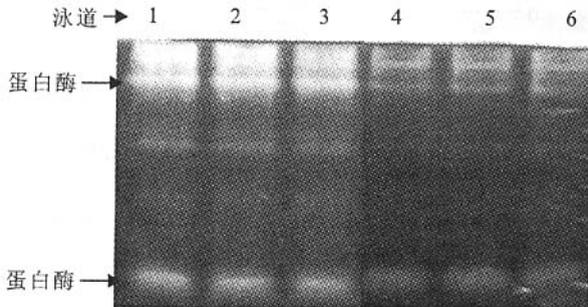


图 3 胞外及胞内蛋白酶提取液的 Gel-PAGE 电泳图谱

Fig. 3 The Gel-PAGE of the extracted intra-and extra-cellular protease

注: 泳道 1, 2, 3 为胞外蛋白酶; 4, 5, 6 为胞内蛋白酶

图 3 表明: 胞外和胞内蛋白酶都是由几种蛋白酶组成的蛋白酶系, 这与人们从生产实践中获得的信息相吻合^[11]。以明胶为底物时, 二者表现出的活性谱带基本相同, 说明胞外及胞内蛋白酶系的相对分子质量组成基本相同。

2.4 胞外及胞内蛋白酶的水解特性

腐乳生产中, 豆腐白坯除约质量分数 70% 的水分外几乎全是由大豆蛋白质组成的^[11]。将胞外和胞内蛋白酶分别作用于大豆分离蛋白 (SPI), 水解产物的 HPLC 图谱见图 4~7。

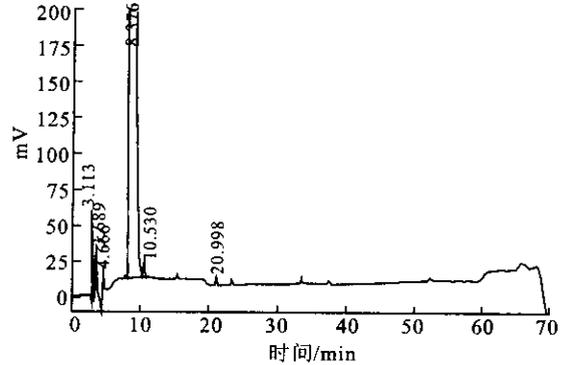


图 4 胞内蛋白酶水解 SPI (空白) 产物图谱

Fig. 4 SPI chromatogram proteolysed by intracellular protease (control)

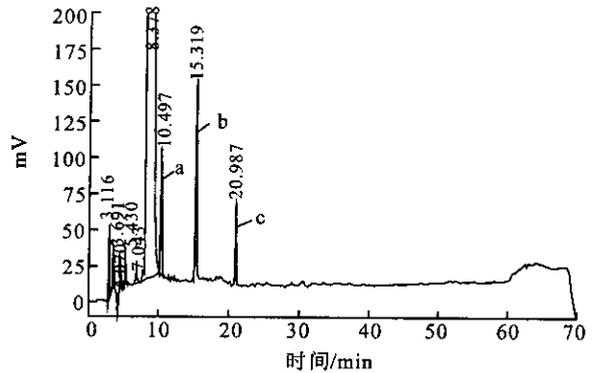


图 5 胞内蛋白酶水解 SPI 产物图谱

Fig. 5 SPI chromatogram proteolysed by intracellular protease

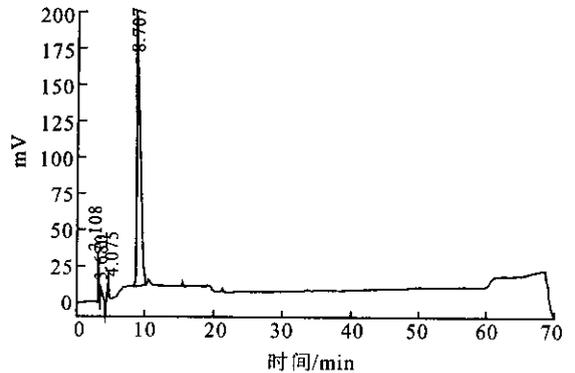


图 6 胞外蛋白酶水解 SPI (空白) 产物图谱

Fig. 6 SPI chromatogram proteolysed by intracellular protease (control)

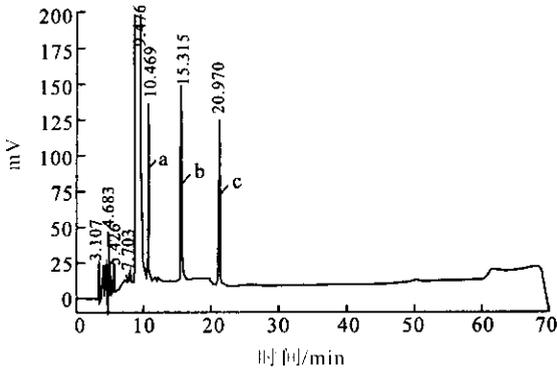


图 7 胞外蛋白酶水解 SPI 产物图谱

Fig. 7 SPI chromatogram proteolysed by intracellular protease

图 4~7 表明:在以大豆分离蛋白为底物时,雅致放射毛霉胞外及胞内蛋白酶的主要水解产物有 3 种,在胞外和胞内蛋白酶总水解产物中分别占到质量分数 83.50% 和 69.39%;3 种水解产物在色谱图中均表现为保留时间在 10.5 min(a),15.3 min(b) 和 20.9 min(c) 的 3 个峰,即胞外和胞内蛋白酶的主要水解产物是相同的,这与 2.2 中胞外和胞内主

要组成蛋白酶是相同的结论相吻合;除 3 种主要水解产物外,胞外和胞内蛋白酶的其它水解产物出峰的保留时间也相同,仅含量上有差异。

3 结 论

腐乳生产前期培菌时,雅致放射毛霉同时分泌胞外及胞内蛋白酶,两者酶活力变化趋势基本相同,在培菌 45 h 时,达到最大酶活力;胞外和胞内蛋白酶均为蛋白酶系,相对分子质量组成相同,以大豆蛋白为底物时,主要水解产物相同、含量不同。腐乳的风味是在漫长的后酵过程中缓慢形成的。随着后酵的进行,毛霉菌丝体溶解,胞内蛋白酶释放出来,不仅增强了对蛋白质的水解作用,而且使各水解产物在量上达到新的平衡,对腐乳的后熟和圆润风味的形成有一定的促进作用。对毛霉蛋白酶的分离纯化及蛋白酶的进一步定性(如内肽酶、外肽酶),对揭示腐乳的酿造机理有着重要意义,有待于今后深入研究。

参考文献:

- [1] Banks J M. The Technology of Dairy Products[M]. Ralph Early, Blackie Academic professional, 1998.
- [2] HWA L Wang. Release of proteinase from mycelium of mucedora hiemalis[J]. *Journal of Bacteriology*, 1967, 7:1794-1799.
- [3] 鲍松林. 豆腐坯制作及腐乳发酵的研究[D]. 无锡:无锡轻工业学院博士学位论文, 1995.
- [4] 李理. 梨形毛霉蛋白酶的分离纯化及应用研究[D]. 长沙:湖南农业大学博士学位论文, 1999.
- [5] 鲁绯, 孙君社, 王丽英, 等. 雅致放射毛霉液态深层发酵产蛋白酶研究[J]. *食品工业与科技*, 2003, (增刊): 23-26.
- [6] 鲁绯, 孙君社, 王丽英, 等. 雅致放射毛霉胞外蛋白酶特性的研究[J]. *中国食品学报*, 2003, (增刊): 122-125.
- [7] 姜锡瑞, 段刚. 新编酶制剂实用技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2002.
- [8] 姜微波. 凝胶电泳分析蛋白酶活性的技术改进. *植物学通报*[J], 2002, 19(5): 607-610.
- [9] Marie-Claude Jobin, Daniel Grenier. Identification and characterization of four protease produced by *Streptococcus suis*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 220:113-119.
- [10] Schagger H, Jagow G. Tricine-sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for these paration of proteins in the range from 1 to 100 Kda[J]. *Anal Biochem*, 1987, 166 (2): 368-397.
- [11] 李幼筠. 剖析毛霉及特性探索腐乳工艺新途径[J]. *中国调味品*, 1999, (10): 5-9.

(责任编辑:杨 萌)

· 会 讯 ·

中国发酵工业协会关于召开全国淀粉糖及其衍生物生产应用技术交流会的通知

近几年来淀粉糖行业发展迅猛,随着淀粉糖的发展,其深加工也应运而生,淀粉糖的衍生物已达数十种。为了促其向着科技含量高、经济效益好、资源消耗低、环境污染少的目标健康发展,经研究决定:2005 年第三季度召开全国淀粉糖及其衍生物生产应用技术交流会。为使会议开得更有效,会议将出版《全国淀粉糖及其衍生物生产应用》论文集。请中国发酵工业协会会员单位、国内外专家积极提供资料,稿件请用电子邮件于 6 月 30 日前发到中国发酵工业协会(北京阜外大街乙 22 号)余淑敏信箱(E-mail:yu6839@tom.com),电话:(010)68396525,传真:(010)68396574。