

研究报告

一种米曲霉蛋白酶的酶学性质及其在酪蛋白磷酸肽制备中的应用

冯颖杰¹ 宗红¹ 诸葛斌¹ 方慧英^{1*} 陆信曜¹ 孙进² 冯倩² 丁凤姣¹

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 工业微生物研究中心 江苏 无锡 214122)

(2. 浙江正味食品有限公司 浙江省调味食品制造工程技术研究中心 浙江 义乌 322000)

摘要:【目的】分离纯化米曲霉蛋白酶的主要组分, 分析其酶学特性, 并应用于酪蛋白磷酸肽(Casein phosphopeptides, CPPs)的制备。【方法】采用硫酸铵盐析、DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析和 Butyl-sepharose HP 疏水层析对米曲霉蛋白酶进行分离纯化, SDS-PAGE 检测分子量与纯度, MALDI-TOF-MS 检测酶切位点。【结果】得到一种蛋白酶组分(命名为 PE), 分子量大小为 58 kD 左右。该酶最适反应条件为 55 °C, pH 8.0, 酶活被 Fe³⁺抑制, 被 Mn²⁺激活。以酪蛋白为底物时, K_m=0.36 g/L, 最大反应速率 V_m=18.18 mg/(L·min)。蛋白酶 PE 对牛胰胰岛素 B 链上 -Leu-Cys-、-Val-Glu-、-Tyr-Leu-和-Arg-Gly-组成的肽键有较高的切割能力, 酶切位点较多。利用其水解酪蛋白, 通过钡-乙醇沉淀法得到 CPPs, 产率为 15.87%, 摩尔氮磷比 *r* (N/P)为 6.17, 得到的 CPPs 可以使钙沉淀推迟 35 min。【结论】利用米曲霉蛋白酶水解酪蛋白产生 CPPs, 为在功能性食品加工方面的应用提供有利的参考。

关键词: 米曲霉, 蛋白酶, 分离纯化, 酶学性质, 酶切位点, 酪蛋白磷酸肽

Characterization of a protease from *Aspergillus oryzae* and application in casein phosphopeptides preparation

FENG Ying-Jie¹ ZONG Hong¹ ZHUGE Bin¹ FANG Hui-Ying^{1*} LU Xin-Yao¹
SUN Jin² FENG Qian² DING Feng-Jiao¹

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, the Research Centre of Industrial Microbiology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Research Center of Seasoning Food Processing of Zhejiang, Zhejiang Zhengwei Food Co. Ltd. Yiwu, Zhejiang 322000, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to purify and characterize protease from *Aspergillus oryzae*, and to apply in casein phosphopeptides (CPPs) preparation. [Methods] Ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sepharose FF anion exchange chromatography and Butyl-Sepharose HP hydrophobic chromatography were performed to purify the enzyme. The molecular weight and purity were determined by SDS-PAGE, and cleavage sites were detected by MALDI-TOF-MS. [Results] A

基金项目: 浙江省重大科技专项计划项目(No. 2012C12004-3)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918106; 信箱: fanghuiying@126.com

收稿日期: 2015-01-09; 接受日期: 2015-03-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-06-02

protease named PE with the weight about 58 kD was obtained from *Aspergillus oryzae*. Protease PE shows maximal activity at pH 8.0 and 55 °C. It was inhibited by Fe^{3+} , and activated by Mn^{2+} . With casein as the substrate, K_m and V_m of the protease were 0.36 g/L and 18.18 mg/(L·min), respectively. Protease PE has cleavage ability in -Leu-Cys-, -Val-Glu-, -Tyr-Leu- and -Arg-Gly- residues of bovine insulin chain B, showing a wide range of residue specificity. CPPs were obtained after proteolysis of casein using PE by barium-ethanol precipitation. Yield and r (N/P) of the CPPs were 15.87% and 6.17, respectively, and delayed calcium deposit for 35 min. **[Conclusion]** The research provided a reference for *Aspergillus oryzae* protease using in the functional food industry.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, Protease, Purification, Enzymatic properties, Cleavage site, Casein phosphopeptides

食品工业中常用的蛋白酶如胃蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶等,大多为动植物来源。而利用微生物法生产蛋白酶具有生产周期短、条件简单、成本低廉以及便于调控等优势,逐渐成为了蛋白酶制剂生产的主要方式。米曲霉蛋白酶以其丰富的酶系一直被应用于食品加工行业,经过基因及蛋白序列分析发现,米曲霉蛋白酶的种类有上百种^[1],具有广泛的应用范围。

当前,对米曲霉蛋白酶的研究主要集中在分离纯化以及基础酶学性质等方面,而对其酶切位点分析及相应的酶解应用研究较少。酪蛋白磷酸肽(CPPs)是利用特定酶切位点的蛋白酶切割酪蛋白产生的一种功能性短肽,其核心结构-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-可以作为离子载体促进肠膜对钙铁等元素的吸收,目前已成功应用于功能性食品的商业开发^[2]。现阶段 CPPs 的生产通常采用价格较高的胰蛋白酶^[3],一定程度上限制了其在食品领域的应用,因此选择较为廉价的微生物蛋白酶制备 CPPs 具有重要的商业价值。除了 CPPs 生产常用的蛋白酶,很多学者致力于寻找更多用于 CPPs 制备的微生物酶源,其中 McDonagh 等^[4]用几种微生物来源的商品蛋白酶水解酪蛋白得到 CPPs,产率在 3.4%–16.0%之间。但到目前为止,鲜有米曲霉蛋白酶制备 CPPs 的研究报道。

本研究对米曲霉固态发酵产蛋白酶进行分离纯化,分析其酶学性质和酶切位点,并水解酪蛋白得到 CPPs,为米曲霉蛋白酶在功能性食品加工方面的研究和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:米曲霉(*Aspergillus oryzae*)为本研究中心筛选和保藏。

1.1.2 主要原料与试剂:麸皮、豆粕和马铃薯,市售;酪蛋白和牛血清白蛋白,购自国药集团化学试剂公司;牛胰岛素氧化 B 链,购自美国 Sigma-Aldrich 公司;胰蛋白酶,购自上海生工生物工程有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.1.3 培养基:斜面种子培养基(g/L):马铃薯 200,葡萄糖 20,琼脂 15;固态发酵培养基:麸皮:豆粕:水=4:1:3,搅拌混匀, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.1.4 主要仪器:AKTA 蛋白纯化仪(Avant 系统),购自美国通用电气医疗集团;分光光度计 UV2600(A),购自尤尼柯(上海)仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 粗酶液的制备:将已制备的孢子悬浮液接种于固态培养基中,30 °C 静置培养 36 h,每隔 6 h 翻曲一次。发酵结束后加入灭菌生理盐水,40 °C 浸提 1 h,过滤、离心后得到粗酶液。

1.2.2 蛋白酶酶活测定:采用 Folin-酚法^[5],以 2% 的酪蛋白为底物。

1.2.3 蛋白含量测定:采用 Brad-Ford 法^[6],以牛血清白蛋白为标准。

1.2.4 蛋白酶的分离纯化:粗酶液加入硫酸铵至 70%饱和度,8 000 r/min 离心 30 min,沉淀用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5)缓冲液复溶,经过透析后上样于预先用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5)缓冲

液平衡过的 DEAE-FF 层析柱, 含 0.5 mol/L NaCl 的缓冲液线性洗脱; 收集酶活组分并等体积加入 3 mol/L 硫酸铵溶液, 上样于预先用 1.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液平衡过的 Butyl-HP 疏水层析柱, 不含硫酸铵的缓冲液线性洗脱。收集蛋白酶活性组分, 透析、浓缩后备用。

蛋白酶纯度与相对分子量大小检测采用 SDS-PAGE 法; 蛋白酶酶谱检测采用 Native-PAGE 法^[7], 其中酶解底物为 2% 酪蛋白溶液。

1.2.5 酶学性质测定: 在不同的温度(30–70 °C)下测定蛋白酶的活性, 确定最适温度; 把蛋白酶分别放置于不同温度(37、40、55 和 60 °C)保温 120 min, 每隔 30 min 在 40 °C 下测定酶活, 考察酶的温度稳定性。用不同的缓冲系统(pH 4.0–11.0)配制酪蛋白溶液, 测定蛋白酶的最适 pH; 用不同 pH 的缓冲液调节酶液 pH 在 3.0–10.0 之间, 40 °C 保持 60 min, 调节到最适 pH 测定酶活, 考察酶的 pH 稳定性。向酶液中分别加入不同的金属离子(Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 和 Co^{2+}), 使金属离子终浓度达到 10 mmol/L, 40 °C 放置 60 min, 测定金属离子对酶活的影响。在蛋白酶的最适酶解条件下, 以不同浓度的酪蛋白溶液(1、2、5、10、15 和 20 g/L)为底物测定酶活, 以浓度的倒数 $1/S$ 为横坐标, 反应速率的倒数 $1/V$ 为纵坐标, 利用双倒数作图确定 K_m 与 V_m 。

1.2.6 酶切位点测定^[8]: 用蛋白酶水解牛胰胰岛素氧化 B 链, 利用 MALDI-TOF-MS 检测水解液中肽段分子量, 与牛胰胰岛素氧化 B 链的随机片段比对, 得到酶解肽段的氨基酸序列, 与牛胰胰岛素氧化 B 链氨基酸序列对比, 确定蛋白酶的酶切位点。

1.2.7 水解酪蛋白制备 CPPs: 配制浓度为 20 g/L 的酪蛋白溶液(pH 8.0), 按照 1 000 U/g 底物分别加入 PE 蛋白酶和胰蛋白酶, 40 °C 保温 3 h, 80 °C 热处理 10 min, 终止反应。CPPs 提取采用钡-乙醇沉淀法^[9]; 总氮测定采用凯氏定氮法; 总磷测定采用钼蓝比色法^[10]。设定 CPPs 与酪蛋白溶液的总氮含

量分别为 N_1 和 N_2 , CPPs 的总磷含量为 P_1 。CPPs 得率和摩尔氮磷比 r (N/P) 计算公式为:

$$\text{CPPs 得率} = \frac{N_1}{N_2} \times 100\% \quad (1)$$

$$r \text{ (N/P)} = \frac{N_1}{P_2} \times \frac{31}{14} \quad (2)$$

另取不加蛋白酶的酪蛋白溶液测定酪蛋白内源 CPPs 的含量及其 r (N/P)。

1.2.8 CPPs 持钙能力测定: 采用 pH-stat 法测定 CPPs 的持钙能力^[11], 反应条件为 37 °C, pH 8.0, 与人体小肠末端环境一致。加入 CPPs 的终浓度为 0.1 g/L, 以不加 CPPs 为对照。

2 结果与分析

2.1 米曲霉蛋白酶的分离纯化

米曲霉粗酶液经过硫酸铵盐析、透析后上样于 DEAE-FF 层析柱和 Butyl-HP 层析柱, 最后经过透析、超滤, 得到电泳纯的蛋白酶 PE (图 1)。经过纯化, PE 比酶活达到了 5 859 U/mg, 纯化倍数 5.69 倍, 回收率 7.18% (表 1)。

SDS-PAGE 结果如图 2 所示, 纯化得到的蛋白酶 PE 只有一条带, 条带清晰, 纯度达到电泳纯, 分子量约为 58 kD。相应的酶谱显示只有一条酶解条带, 亮度较高, 说明纯化的蛋白具有较高的蛋白酶活性。

2.2 蛋白酶 PE 的酶学性质

蛋白酶 PE 的最适反应温度为 55 °C, 最适 pH 8.0。在 pH 5.0–10.0 范围内, 40 °C 放置 60 min, PE 的相对酶活均维持在 90% 以上。在中性条件下, 40 °C 放置 120 min, PE 的相对酶活保持在 95% 以上; 55 °C 放置 30 min, PE 的相对酶活为 50%, 60 °C 放置 30 min 已完全失活。金属离子对酶活影响的测定表明, Fe^{3+} 对 PE 有一定的抑制作用, Mn^{2+} 对 PE 有激活作用。以酪蛋白为底物时, PE 的表观米氏常数 $K_m = 0.36$ g/L, 最大反应速率 $V_m = 18.18$ mg/(L·min)。 K_m 值反映了酶与底物的亲和力, 较低的 K_m 值说明蛋白酶 PE 与酪蛋白较高的亲

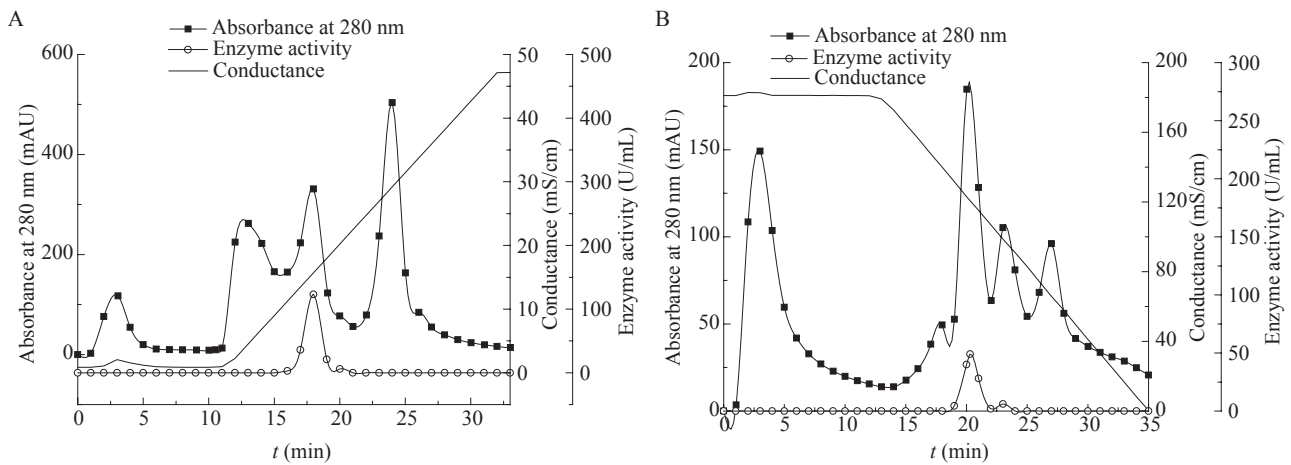


图1 米曲霉蛋白酶的层析洗脱曲线

Figure 1 Elution profile of protease from *Aspergillus oryzae*

注: A: 蛋白酶的 DEAE-FF 洗脱曲线; B: 蛋白酶的 Butyl-HP 洗脱曲线。

Note: A: Elution profile of protease on DEAE-FF; B: Elution profile of protease on Butyl-HP.

表1 蛋白酶 PE 纯化结果

Table 1 Purification of protease PE from *Aspergillus oryzae*

纯化步骤 Purification step	总酶活 Total activity (U)	总蛋白 Total protein (mg)	比酶活 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Purification (Fold)	回收率 Yield (%)
Crude extracts	1 713.00	1.663	1 030	1.00	100.00
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate	1 491.83	1.334	1 118	1.08	87.00
DEAE-Sepharose FF	179.88	0.034	5 290	5.20	10.50
Butyl-Sepharose HP	123.03	0.021	5 859	5.69	7.18

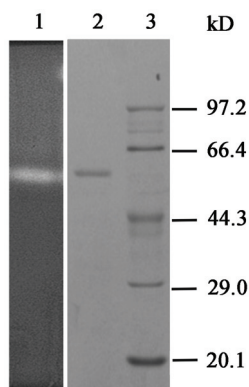


图2 蛋白酶 PE 的 SDS-PAGE 与酶谱分析

Figure 2 SDS-PAGE and zymography analysis of the purified enzyme PE

注: 1: PE 的酶谱; 2: PE 的 SDS-PAGE 条带; 3: 蛋白 Marker.

Note: 1: Zymography of PE; 2: SDS-PAGE of PE; 3: Protein marker.

和力。

2.3 蛋白酶 PE 的酶切位点

酶解得到的肽段与胰岛素 B 链序列作比对发现, 蛋白酶 PE 对牛胰岛素 B 链的-Leu⁶-Cys⁷-、-Val¹²-Glu¹³-、-Tyr¹⁶-Leu¹⁷-和-Arg²²-Gly²³-组成的肽键有较强的切割能力, 对 Val、Leu 及 Gly 等脂肪族氨基酸组成的肽键选择性较强(图 3)。在酪蛋白的氨基酸序列中, 磷酸丝氨酸基团附近存在很多 Val 和 Gly 组成的肽键^[12], 容易被 PE 切割而形成纯度较高的 CPPs。另外, 相比胰蛋白酶、胃蛋白酶等专一性较高的蛋白酶, 纯化到的米曲霉蛋白酶 PE 具有较多的切割位点。

2.4 蛋白酶 PE 水解酪蛋白生成 CPPs 及其持钙能力测定

用蛋白酶水解酪蛋白, 通过钡-乙醇沉淀法提取



图3 蛋白酶 PE 在胰岛素 B 链上的酶切位点

Figure 3 Cleavage sites of PE on the oxidized insulin chain B

注: 图中箭头和竖线表示酶切位点, 箭头指示的水解强度大于竖线。

Notes: The arrows and the vertical lines indicate the cleavage sites, the arrow indicated the greater hydrolysis strength.

到白色的 CPPs 粉末。经测定, 酪蛋白内源性 CPPs 含量为 4.62%, $r(N/P)$ 为 16.35; 经过蛋白酶 PE 水解后, CPPs 含量为 15.87%, 净产率为 11.25%, 水解后得到 CPPs 的 $r(N/P)$ 为 6.17。而在相同的条件下, 利用胰蛋白酶获得的 CPPs 产率为 18.46%, 净产率 14.84, $r(N/P)$ 为 7.35。相比之下, 虽然蛋白酶 PE 制备的 CPPs 产率低于胰蛋白酶制备的 CPPs, 但其具有更低的氮磷比, 磷酸丝氨酸基团更容易得到富集。

持钙能力是 CPPs 的功能性指标, 是检测 CPPs 品质的有效手段, pH-stat 法是测定 CPPs 持钙能力普遍采用的方法。在弱碱性条件下, NaH_2PO_4 与 CaCl_2 形成 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 会释放 H^+ , 在维持体系 pH 不变的同时, NaOH 溶液的加入量与 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 形成量一致。如图 4 所示, 未加 CPPs 时磷酸钙沉淀迅速形成; 加入蛋白酶 PE 制备的 CPPs 后, CPPs 与溶液中的钙离子结合形成较稳定的络合物, 在碱性条

件下缓慢形成沉淀, 于 35 min 沉淀完全。在人体消化系统中, CPPs 推迟钙离子沉淀的效果, 有利于钙离子被肠道有效吸收^[13]。在同等条件下, 陈雪香等^[14]研究了 8 种商品 CPPs 的持钙能力, 其中 7 种 CPPs 延缓钙离子沉淀的时间在 18–29 min 之间, 从一定程度上反映出本研究获得的 CPPs 具有较好的品质。

3 讨论

米曲霉蛋白酶以酶系丰富和安全性高等优点广泛应用于食品加工行业, 然而很少有关于其酶切位点分析及酶解应用研究, 未能给米曲霉蛋白酶在实际应用中带来具体的指导。本研究对米曲霉所产蛋白酶的主要组分进行分离纯化, 研究了酶学性质、酶切位点及其在 CPPs 制备中的应用。

经过纯化得到的蛋白酶 PE 分子量大小约 58 kD, 最适反应条件为 55 °C 和 pH 8.0, 与 Vishwanatha 等^[8]得到的酸性蛋白酶(47 kD)和马俊阳等^[15]纯化出的中性蛋白酶(分子量为 37 kD 和 45 kD)均不相同, 并且对酪蛋白具有更高的亲和力。对 PE 的酶切位点研究发现, 该酶对 Val、Leu 及 Gly 等氨基酸组成的肽键有较高的选择性, 切割位点较多。在功能性食品生产中, 专一性高的蛋白酶切割位点较少导致水解产物单一, 为了尽可能多的释放功能性小肽, 一般选择用多种不同酶切位点的蛋白酶复合的方式进行加工, 但由于各种酶的最适反应条件不同, 很难发挥酶的最佳效果。而酶切位点较多的蛋白酶 PE, 无疑为功能性食品加工提供了一个更好的选择。在 CPPs 的制备中, 使用蛋白酶 PE 有利于切除更多 CPPs 核心序列之外的氨基酸, 得到纯度较高的产品。

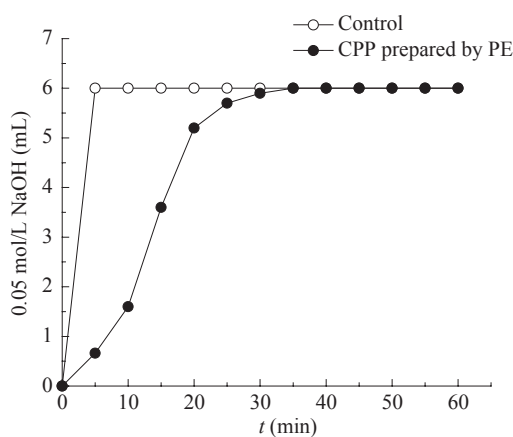


图4 pH-stat 法测定 CPPs 持钙能力

Figure 4 The ability to maintain calcium of CPPs by pH-stat

用纯化到的米曲霉蛋白酶 PE 水解酪蛋白, 得到的 CPPs 与胰蛋白酶所制备的 CPPs 相比虽然产率稍低, 但具有较低的 $r(N/P)$, 反应出较高的纯度, 因此具备很大的开发潜力。可以进一步通过酶解条件的优化获得更高产率和纯度的产品。在模拟与人体消化系统相同的条件下, 得到的 CPPs 持钙能力优于一些商品 CPPs, 证明得到的 CPPs 具有较好的品质。同时, 考虑到米曲霉可以利用麸皮豆粕等廉价原料高效生产蛋白酶, 极大降低了生产成本, 因此可以预见米曲霉蛋白酶在功能性食品行业具有广阔的发展前景。

与此同时, 我们注意到, 在 CPPs 的商业化生产过程中会产生含量近 80% 的蛋白副产物, 其中包含的多种功能性物质往往被丢弃, 造成了严重的浪费。在研究过程中我们发现, 酪蛋白经过蛋白酶 PE 水解后, 水解液具有一定的抗氧化和抑菌活性, 相关工作仍在研究中。

参 考 文 献

- [1] Sun JL. Enzyme Production Technology[M]. Wuhan: Science Press, 2004: 218-225 (in Chinese)
孙俊良. 酶制剂生产技术[M]. 武汉: 科学出版社, 2004: 218-225
- [2] Tang T, Ma L. Nutritional effects of casein phosphopeptides and its application[J]. Food and Nutrition in China, 2008(3): 28-30 (in Chinese)
唐婷, 马力. 酪蛋白磷酸肽的营养作用及其应用[J]. 中国食物与营养, 2008(3): 28-30
- [3] Hannu K, Anne P. Bioactive peptides: production and functionality[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(9): 945-960
- [4] McDonagh D, FitzGerald RJ. Production of casein phosphopeptides (CPPs) from sodium caseinate using a range of commercial protease preparations[J]. International Dairy Journal, 1998, 8(1): 39-45
- [5] Kembhavi AA, Kulkarni A, Pant A. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No.64[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1993, 38(1): 83-92
- [6] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [7] Garcia-Carreño FL, Dimes LF, Haard NF. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of protease and proteinaceous[J]. Analytical Biochemistry, 1993, 214(1): 65-69
- [8] Vishwanatha KS, AppuRao AG, Singh SA. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341[J]. Food Chemistry, 2009, 114(2): 402-407
- [9] Reynolds EC, Riley PF, Adamson NJ. A selective precipitation purification procedure for multiple phosphoserine-containing peptides and methods for their identification[J]. Analytical Biochemistry, 1994, 217(2): 277-284
- [10] Hirayama M, Toyota K, Yamaguchi G, et al. HPLC analysis of commercial casein phosphopeptides (CPPs)[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1992, 56(7): 1126-1127
- [11] Berrocal R, Chanton S, Juillerat MA, et al. Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium[J]. Journal of Dairy Research, 1989, 56(3): 335-341
- [12] Kitts DD, Yuan YV. Caseinophosphopeptides and calcium bioavailability[J]. Trends in Food Science and Technology, 1992, 3(92): 31-35
- [13] Reynolds EC. Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: a review[J]. Special Care in Dentistry, 1998, 18(1): 8-16
- [14] Chen XX, Luo Z, Liu F, et al. Study on the quality evaluation method on casein phosphopeptide (CPP) products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(8): 75-82 (in Chinese)
陈雪香, 罗珍, 刘飞, 等. 酪蛋白磷酸肽的质量评价方法研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(8): 75-82
- [15] Ma JY, Zhuge B, Fang HY, et al. Purification and characterization of proteases from *Aspergillus oryzae*[J]. Microbiology China, 2014, 41(1): 83-89 (in Chinese)
马俊阳, 诸葛斌, 方慧英, 等. 米曲霉蛋白酶的分离纯化及酶学性质研究[J]. 微生物学通报, 2014, 41(1): 83-89