

Rhizopus sp. 052 凝乳酶的部分酶学性质

滕国新¹ 李里特²

1(北京三元食品股份有限公司, 北京, 100085)

2(中国农业大学食品科学和营养工程学院, 北京, 100083)

摘要 *Rhizopus* sp. 052 在 pH 1~7 范围内, 4℃ 条件下稳定。凝乳酶的最适作用温度为 40℃, 55℃ 保持 20 min 完全失去活性, 与小牛凝乳酶性质相似, 而热失活的温度低于小牛凝乳酶。*Rhizopus* sp. 052 凝乳酶对热不稳定的特性有利于干酪副产品乳清的加工处理。*Rhizopus* sp. 052 凝乳酶对酪蛋白的水解能力比蛋白酶低, 比小牛凝乳酶高, 可以用于干酪的生产。对 N-末端 15 个氨基酸序列 GTGSVPVDYQNDVE 进行检索, 结果表明, *Rhizopus* sp. 052 凝乳酶与其他菌株相比不完全相同, 尚未见有研究者对其进行研究和报道。

关键词 微生物凝乳酶, 根霉, 热稳定性, 酶学性质, N-末端蛋白序列分析

牛乳凝乳是干酪生产的基本工艺步骤, 可以采用许多途径来达到, 但是以凝乳酶凝乳的效果最好^[1]。随着干酪市场需求的日益增加, 通过宰杀小牛来获得凝乳酶不能完全满足干酪的生产需要, 因此, 很多研究者在不断地寻找其代用品^[2]。许多具有凝乳性质的植物、微生物、动物来源的蛋白酶已经被用于牛乳凝固剂^[1,3~5]。尽管微生物凝乳酶在价格、生产成本上有明显的优势, 但也会产生其他非酶类代谢产物, 因此微生物酶在成为商品时, 都要进行毒性、致癌性以及皮肤过敏性测试^[6], 正因为如此, 在进行产凝乳酶微生物的筛选时, 研究者通常选择文献报道中没有毒性的菌株。本研究中所筛选的根霉 *Rhizopus* sp. 052 来源于中国酒曲, 被长期用在制酒糖化与发酵工艺中, 具有较高的食品安全性。

文中通过分析 *Rhizopus* sp. 052 凝乳酶的酶学性质, 来验证该酶是否能够作为干酪凝乳酶的替代品。并通过 N-末端 15 个氨基酸蛋白序列的比对, 验证是否获得了新的凝乳酶。

1 实验方法

1.1 凝乳酶的测定方法

12% 脱脂还原乳 (NZMP 脱脂乳粉, 蛋白质含量为 34%) 10 mL 放置在 35℃ 水浴锅中预热 10 min 后, 每 10 mL 脱脂乳中加入 1.0 mL 酶液, 开始计时, 当脱脂乳表面出现絮凝时, 记录时间作为凝乳时间, 以秒计。凝乳酶活力采用下列计算公式:

$$\text{凝乳酶活力}(u) = \frac{2400}{\text{凝乳时间}(s)} \times \text{酶的稀释倍数} \times$$

$$\frac{\text{脱脂乳的量}(mL)}{\text{凝乳酶添加量}(mL)}$$

1.2 pH 对凝乳酶活力的影响以及对凝乳酶稳定性的影响

称取纯化的凝乳酶样品 0.03 g, 用 1 mL 5 mmol/L 的 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液溶解。用 1 mol/L 的 HCl 调整脱脂乳的 pH 为 6.52、6.46、6.32、6.21、6.09、5.98、5.85、5.67、5.57。测定凝乳时间。

pH 稳定性实验采用广范围的缓冲液 pH 溶解纯化的凝乳酶样品, 使凝乳酶分别保持在 pH 1.0~12.0 的范围。选择不同 pH 值的样品点分别放置在 30℃ 下 1 h 和 4℃ 下 24 h, 测定凝乳酶的残余活力。

1.3 温度对凝乳酶活力的影响以及对凝乳酶热稳定性的影响

选择 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70℃ 作为凝乳的温度, 按照方法 1.1 测定凝乳酶活力。

凝乳酶的热稳定性实验选择 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70℃ 九个温度梯度, 水浴加热 60 min, 每 10 min 取样, 在 35℃ 条件下测定残余凝乳酶活力。

1.4 几种蛋白酶水解酪蛋白能力的比较

酪蛋白凝块的水解能力检测参照文献[7]。

1.5 N-末端蛋白质的序列分析

Rhizopus sp. 052 凝乳酶的 15 个 N-末端氨基酸序列测定参照文献[8]。

1.6 统计分析方法

实验数据采用 SAS 软件 (8.12 版) 处理, 方差分析采用 ANOVA 程序。

2 结果与讨论

2.1 变性与非变性条件下测定 *Rhizopus* sp. 052 凝乳酶分子质量

第一作者: 博士, 高级工程师。

收稿日期: 2005-06-23

对凝乳酶的不同提纯过程的产物在变性与非变性条件下进行电泳。比较 SDS-PAGE 变性条件处理(巯基乙醇处理)与非变性条件 SDS-PAGE(图 1)的实验结果,采用巯基乙醇变性处理的蛋白带(泳道 5、6、7)与非变性处理的蛋白带(泳道 1,2,3)相比,蛋白带 5、6 在分子质量 66 000 u 处增加了 1 条带,在泳道 2 中小分子的蛋白片段在泳道 6 中浓度减弱,估计是部分蛋白片段在巯基乙醇存在条件下,重新结合在一起,分子质量变大。分子质量在 31 000~43 000 u 的蛋白带没有明显的变化。泳道 3 与泳道 7 中只有纯的单一蛋白样品,该蛋白的分子质量为 36.6 ku。比较泳道 3 与泳道 7 中的蛋白样品,采用巯基乙醇变性与非变性处理,没有发现新的蛋白带出现,说明该蛋白具有单亚基结构。

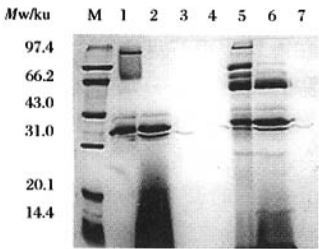


图 1 变性与非变性 SDS-PAGE 蛋白分离效果的对比

M-低分子质量标准蛋白,1,5-60%乙醇沉淀蛋白;

2,6-71%乙醇沉淀蛋白;3,7-DE-52 cellulose 分离纯化蛋白。

泳道 1,2,3:非变性条件电泳;泳道 5,6,7:变性条件电泳。

2.2 N-末端氨基酸的比较

10 个或更多的 N-末端氨基酸序列分析能够为蛋白质的初步鉴定提供充足的数据,通过数据库检索而确定所研究的蛋白质是否曾经被克隆或已经被测定序列。通过 NCBI-BLAST 数据库对 *Rhizopus* sp. 052 凝乳酶蛋白序列 N-末端 15 个氨基酸序列进行比对,检索发现,所检索到的具有高同一性序列的菌株都是根霉,没有发现其他类型的菌株,序列比对的结果显示了预期的同一性(表 1)。*Rhizopus* sp. 052 与 *Rhizopus niveus* 相比表现了较高度度的同一性(86%),而 *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* 只有 73% 的同一性。表 1 结果显示,尽管 *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* 2 表现了 66% 的同一性,但是序列比较的位置是从蛋白序列中第 2 个氨基酸到第 16 个氨基酸,可能这 2 个菌株具有更近的同源性。

2.3 pH 对凝乳酶(MCE)活力的影响和稳定作用

Rhizopus sp.052 产生的凝乳酶在酸性范围内,随着 pH 的降低,凝乳酶的活力逐渐升高(图 2)。实

表 1 根霉 *Rhizopus* sp.052 凝乳酶的 N 末端氨基酸比较

菌株	酶蛋白氨基酸序列的总长度 AA's	N-末端 15 个氨基酸序列	同一性	正确率
<i>Rhizopus</i> sp.052		1 GTGSPVPTDYQNDVE 15		
<i>Rhizopus niveus</i>	160	69 GTGSPVPTDYYNDIE 83	13/15 (86%)	14/15 (93%)
<i>Rhizopus niveus</i>	391	69 GTGSPVPTDYYNDIE 83	13/15 (86%)	14/15 (93%)
<i>Rhizopus niveus</i>	392	70 GIGRVPVTDYYNDIE 84	11/15 (73%)	12/15 (80%)
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i> 1	393	70 GVGTVPMTDYGNDE 84	11/15 (73%)	13/15 (86%)
<i>Rhizopus niveus</i>	391	69 GIGYVPVTDYYNDIE 83	11/15 (73%)	12/15 (80%)
<i>Rhizopus niveus</i>	389	68 SGSPVMVDYENDVE 81	10/14 (71%)	13/14 (92%)
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i> 2	325	2 GVGTVPMTDYGNDE 16	10/15 (66%)	13/15 (86%)

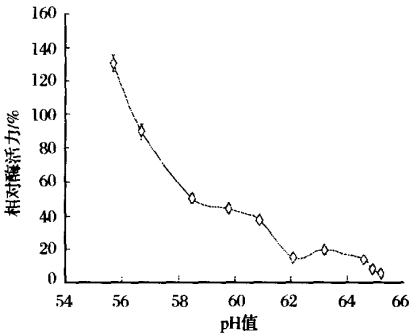


图 2 pH 对凝乳酶酶活的影响

验结果表明,酸有利于凝乳酶作用。所有的商品凝乳酶都表现了相同的变化趋势,即随着 pH 从 7 下降到 pH 4~5,凝乳酶的活力增大^[9]。*Rhizopus* sp.052 凝乳酶作用的最适 pH 与 *Penicillium oxalicum* 凝乳酶相似^[5]。同样 *Mucor bacilliformis* 在 pH 5.5 时表现出最大的凝乳酶活力^[10]。图 3 结果表明,*Rhizopus* sp.052 凝乳酶在 pH 1.0~3.37、30℃ 保持 60 min 时,能够保持 50%~100% 的活性;在 pH 1.0~3.37 之外,凝乳酶活力迅速降低,最终失去活性。然而,*Rhizopus* sp.052 凝乳酶在 pH 1.0~7.0 范围内,4℃ 条件下保持 24 h,凝乳酶活性保持稳定。这与 Sternberg (1972)所发现的 *M. miehei* 凝乳酶在宽 pH 范围内,40℃ 保持 24 h 还保持非常稳定的凝乳酶活力有不同之处。同样,Ottesen 和 Rickert (1970)发现,*M. miehei* 凝乳酶在 38℃、pH 3.0~6.0 之间的条件下保持 8 d 凝乳酶的活性保持稳定^[11]。Tubesh 和 AL-Deiaimy 发现,*Mucor* J20 凝乳酶在 pH 3.5~4.0

下 30℃ 保持 30 min, 凝乳酶活力保持 100%^[12]。这个结果与本文的研究结果类似, 但是在高温的情况下, *Mucor J20* 凝乳酶比 *Rhizopus sp.052* 凝乳酶表现了较高的 pH 稳定性。

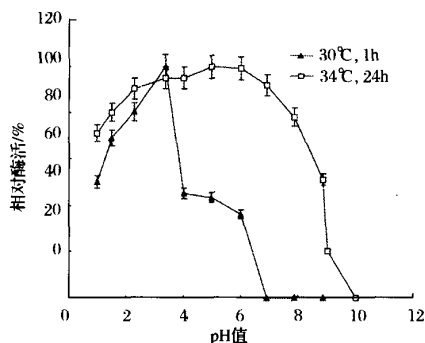


图3 *Rhizopus sp.025* 凝乳酶的 pH 稳定性

2.4 温度对凝乳酶活力的影响以及凝乳酶的热稳定性

Rhizopus sp.052 凝乳酶作用的最适温度是 40℃, 相对酶活达到 115.73% (图 4)。这个结果与 *M. pusillus* 和 *M. miehei* 菌株的凝乳酶的最适温度不同, 它们的最适凝乳作用温度分别是 55℃ 和 60℃^[4]。*Penicillium oxalicum* 凝乳酶的最适温度是 65℃^[5]。Fox 报道了小牛凝乳酶在 pH 6.6 下表现的最适温度是 40~52℃^[13]。*Rhizopus sp.052* 凝乳酶热稳定性实验结果表明(图 5), 在 45℃ 60 min 条件下凝乳活酶力保持了 78.2%; 在 40℃, 60 min 条件下, 凝乳酶活力保持稳定。在 55℃, 10 min 条件下, 凝乳酶活力下降到原来的 9.5%。

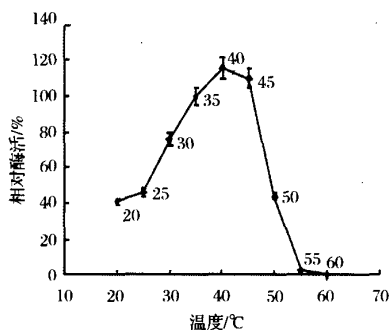


图4 温度对凝乳酶活力的影响

Rhizopus sp.052 凝乳酶在 55℃, 20 min 条件下完全失活。大部分凝乳酶在 30~50℃ 表现出最适凝乳活力, 但是在较高的温度下才能失去酶活性^[14]。*M. pusillus* 完全失去活性是在 60℃, 20 min, *Rhizopus pusillus* 在 65℃, 5 min 条件下失去 90% 的酶活

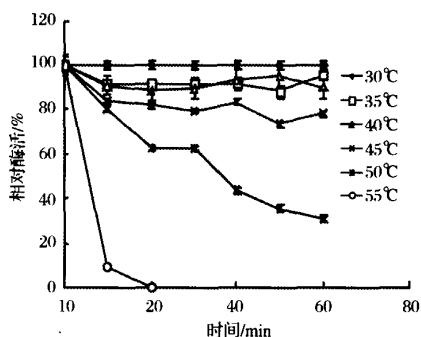


图5 *Rhizopus sp.052* 凝乳酶的热稳定性

力^[3]。

凝乳酶具有较高的热稳定性对于干酪加工后乳清的处理工艺是一个不利因素。应用凝乳酶生产干酪时, 会有 90% 的凝乳酶流失在乳清中^[15]。乳清中残余凝乳酶如果还保持活性, 酶将会继续水解乳清蛋白, 所以在对乳清进行处理前, 要将残余的凝乳酶失活。乳清通常含有 6g/kg 的蛋白质, 乳清蛋白具有许多工艺特性与营养价值, 很多食品工艺中能够应用乳清蛋白^[16]。但它对热不稳定, 因此必须采用低温处理, 来灭活残余的凝乳酶, 保持乳清蛋白的功能性^[17]。文献报道的微生物凝乳酶的热稳定性通常高于小牛凝乳酶, 需要采用较高的热处理温度来灭活, 而使用小牛凝乳酶来制作干酪时, 巴氏灭菌温度即可将残余的凝乳酶灭活, 以上提到的乳清变性问题就可以克服。因此, *Rhizopus sp.052* 凝乳酶对热不稳定的特性在干酪乳清的处理过程的应用是非常有价值的。

2.5 三种蛋白酶水解酪蛋白能力的比较

方差分析与多重比较结果显示, *Rhizopus sp.052* 凝乳酶和商业凝乳酶 (CHR HANSAN Stamix 1150) 在 24 h 保温之前沉淀蛋白的量差异不显著 (表 2)。

表明在沉淀酪蛋白的能力上它们是相似的, 二者凝固酪蛋白的能力要优于蛋白酶 (Novozyme Neutrase 1.5 MG) 沉淀酪蛋白的能力 (0.372 g)。*Rhizopus sp.052* 凝乳酶有较低的酪蛋白水解能力 (27.0%), 优于蛋白酶 (Novozyme Neutrase 1.5 MG) 的 35.25%。Bailey 和 Matti 比较了 12 个真菌菌株, 发现被观察的菌株的凝乳酶和蛋白水解能力变化范围大。*R. miehei* VTT-D-82193 和 *R. oligosporus* VTT-D-70022 的凝乳能力较高, 蛋白的水解能力较低。*R. miehei* 能够产生高凝乳酶活力 (55 U/mL), *R. oligosporus* VTT-D-70022 的凝乳酶活力是 35

U/mL,这2个菌株的蛋白水解能力分别是5%~10%和15%~25%。*Aspergillus fumigatus*和*Tri-*

*choderma reesei*表现出的酪蛋白凝块的水解能力分别是85%和80%。

表2 小牛凝乳酶、蛋白酶与微生物凝乳酶水解酪蛋白能力比较

酶来源	原始酪蛋白的质量	24 h, 30 ℃水解后的质量	CH/%
<i>Rhizopus</i> sp.052 凝乳酶	0.431(±0.0104) ^A	0.314(±0.0051) ^A	27.00(±0.598) ^b
小牛凝乳酶(CHR HANSEN, Stamix 1150)	0.433(±0.0085) ^A	0.362(±0.0112) ^B	16.33(±3.75) ^C
蛋白酶(Novozyme A/S <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Neutrase 1.5 MG)	0.372(±0.015) ^B	0.240(±0.003) ^C	35.25(±3.08) ^A

大写字母:差异显著水平在1%;小写字母:差异显著水平在5%。

3 结 论

Rhizopus sp. 052 凝乳酶与其他微生物凝乳酶相比,凝乳能力与小牛凝乳酶相近,酪蛋白水解能力介于商品凝乳酶与蛋白酶之间,可以作为干酪凝乳酶的代用品。与其他微生物凝乳酶相比,*Rhizopus* sp. 052 凝乳酶表现出较高的热不稳定性,这个性质能够满足干酪生产工艺中对乳清处理的要求。N-末端15个氨基酸的序列是:GTGSVPVTDYQNDVE,与来自其他的真菌蛋白酶相比,*Rhizopus* sp.052产生的凝乳酶与根霉菌株具有同源性,但是它本身有不同的氨基酸组成,这为继续研究提供了必要依据,希望通过下一步的蛋白质全序列以及凝乳酶结构性质的研究来阐述该酶耐热性低的原因。

参 考 文 献

- 1 Sternberg M Z. Bond specificity, active site and milke clotting mechanism of the *Mucor miehei* protease[J]. *Biochemical et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 1972,285 (2): 383~392
- 2 Lopes A, Teixeira, G, Liberato M C, et al. New vegetal sources for milk-clotting enzymes[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*,1998,(5): 63~68
- 3 Arima K, Yu J, Iwasaki S. Milk Clotting enzyme from microorganisms purification and Crystallization of *Mucor* rennin from *Mucor Pusillus* var *Lindt*[J]. *Appl Microbiol*, 1968, 16:1 727~1 733
- 4 Martin P, Raymond M N, Bricas E, et al. Kinetic studies on the action of *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* acid protease and chymosins A and B on a synthetic chromophoric hexapeptide[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 1980, 612: 410~420

- 5 Hashem A M. Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Penicillium oxalicum* [J]. *Bioresource Technology*, 2000, 75: 219~222
- 6 Barford H C. Production of enzymes by fermentation[J]. In *Essays in Applied Microbiology*, 1981, 2~31
- 7 Michael J Bailey, Matti Siika-aho. Production of microbial rennin[J]. *Biotechnology Letters*, 1998,10 (3): 161~166
- 8 Marshak D R, Kadonaga J T, Burgess R R,et al. Strategies for Protein purification and characterization[M]. New York: A Laboratory Course Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996. 76~83
- 9 Harboe M, Budtz P. In: Law, B. A. (Ed.). *Technology of Cheesemaking*[M]. Sheffield: Academic Press, 1999.33~65
- 10 Veneral G D, Machalinski C, Zumarraga H, et al. Further characterization and kinetic parameter determination of a milk-clotting protease from *Mucor bacilliformis* [J]. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 1997,68: 207~216
- 11 Ottesen M Rickert W. The acid protease of *Mucor miehei*. In *Method in Enzymology*[M]. Perimann G. E. and Lorand L., eds. New York:Academic Press, 1970. 459~460
- 12 Tubesha Z A, AL-Deiaimy K S. Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolated of *Mucor* [J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2003,56(4):223~234
- 13 Fox P F. Milk clotting and proteolytic activities of rennet and of bovine pepsin and porcine pepsin[J]. *Journal of Dairy Research*, 1969,36: 427~433
- 14 O'Leary P A, Fox P F. The method for the quantitative analysis of the enzyme complement of commercial rennet [J]. *Journal of Dairy Research*, 1974,41: 381~387
- 15 Winwood J. Rennet and rennet substitutes[J]. *Journal of the Society of Dairy Technology*,1989, 42:1~2
- 16 Varnam A H, Sutherland L P. Dairy protein products, In *milk and milk products* [M]. Technology Chemistry and Microbiology, London: Chapman and Hall,1994.159~181
- 17 Walstra P, Noodmen A, Jellems A, et al. Protein preparation In: *Principle of milk properties and proteinases* [M]. New York:Mareel Dekker Inc,1999. 471~483

Characteristics of New Milk-clotting Enzyme Produced by *Rhizopus* sp.052

Teng Guoxin¹ Li Lite²

1(Beijing Sanyuan Foods Co., Ltd., Beijing 100085, China)

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

ABSTRACT The optimum temperature of MCE was 40℃ and the activity of enzyme was stable in pH 1~7 range at 4℃ for 24 h. It was inactivated at 55℃ after 20 min. The lower heat stability that of the thermophilic enzymes currently used in the cheese industry was found. The N-terminal amino acid sequence: GTGSVPVTDYQNDVE was appeared higher identity compared with those from other fungal enzyme.

Key words microbial rennet, *Rhizopus* sp., heat stability, characteristic of enzyme, analysis of N-terminal amino acid