

## 骆驼凝乳酶的分子结构与制备干酪的研究现状

普燕,马晓林,张富春\*,李轶杰

(新疆大学生命科学与技术学院,新疆生物资源基因工程重点实验室,新疆 乌鲁木齐,830046)

**摘要** 骆驼凝乳酶与牛凝乳酶有着相似的一级结构和三级结构,但二者对牛乳的亲合力、催化速率却有着较大的差异,研究其分子水平上的不同,对今后凝乳酶的蛋白质工程改造有着重要意义。同时骆驼凝乳酶制备干酪苦味少,联合骆驼凝乳酶与改良发酵剂制备新型低质、低盐干酪也成为干酪研发的方向之一。该文综述了骆驼凝乳酶的结构、酶学特性、与底物结合的分子研究以及制备干酪等方面的内容。

**关键词** 凝乳酶;骆驼;底物亲和力;晶体结构;干酪

凝乳酶(EC3.4.23.4)是一种酸性蛋白酶<sup>[1]</sup>,广泛存在于新生哺乳动物的胃中。凝乳酶能凝固乳液,延长母乳在新生动物消化道中的存留时间,从而使母乳的营养能充分被小动物吸收<sup>[2]</sup>。利用凝乳酶凝固乳液这一特性,人们从未断奶小动物(小牛、羔羊等)胃中提取凝乳酶并广泛用于干酪制作。不同动物来源的凝乳酶特性不同,即使干酪制备工艺完全相同,制备的干酪质地与风味也不尽相同。其中小牛凝乳酶凝乳活力高,对乳中 $\kappa$ -酪蛋白水解快速而专一,同时对乳中其它蛋白的水解活性低,即 $c/p$ 值高,这一特性能使凝乳过程中使更多乳蛋白存留在凝块中,在干酪成熟过程中,其对凝乳中蛋白水解少,从而干酪的出品率高,产生的苦味肽少,口味好,故小牛凝乳酶一直被认为是最佳的制备干酪的凝乳酶。

2006年,KAPPELER等人<sup>[3]</sup>首次从单峰驼(*Camelus dromedarius*)体内克隆了凝乳酶基因,在黑曲霉(*Aspergillus niger*)中成功表达,并检测了其酶学特性。与小牛凝乳酶比较,发现骆驼凝乳酶对牛乳的凝乳活力比小牛凝乳酶高70%,但非特异蛋白水解活力才相当小牛凝乳酶的20%,这使得骆驼凝乳酶的 $c/p$ 值是小牛凝乳酶的7倍。在理论上, $c/p$ 值是评判凝乳酶制备干酪性能优劣的一个重要标志。高 $c/p$ 凝乳酶制备干酪可能会得到更高的出品率和更好的风味。

2009年,BANSAL等人<sup>[4]</sup>用骆驼凝乳酶制备cheddar干酪,并以小牛凝乳酶制备的干酪作为对照。

2种干酪均在相同的条件下制备,但是由于骆驼凝乳酶的凝乳活力比小牛凝乳酶高,故为保证添加的凝乳酶量使乳液在相同的时间和条件下,达到相同的切割硬度,则骆驼凝乳酶的用量比小牛凝乳酶用量少。制备出的两种干酪在组分和pH没有任何差异;但是初级水解程度(以pH4.6可溶性氮表示),骆驼凝乳酶要比小牛凝乳酶低。SDS-PAGE分析乳蛋白被水解的情况,两种干酪中的 $\beta$ -酪蛋白都被乳液中固有存在的血纤维蛋白溶酶(plasmin)水解成 $\beta$ -CN(f29-209), $\beta$ -CN(f106-209)和 $\beta$ -CN(f108-209),但小牛凝乳酶在干酪成熟过程中产生了 $\beta$ -CN(f1-189/192)肽,此肽在骆驼凝乳酶制备的干酪中没有检测到,这或许是骆驼凝乳酶的用量少,或许是骆驼凝乳酶的非特异水解活性更低,也或许是二者的综合作用结果。而 $\beta$ 酪蛋白水解产生的 $\beta$ -CN(f1-189/192), $\beta$ -CN(f193-209)和 $\beta$ -CN(f190-209)小肽会造成干酪的苦味。以上结果也暗示骆驼凝乳酶制备的干酪苦味更低。2种酶对 $\alpha$ s1-酪蛋白的水解产物基本相同,但骆驼凝乳酶制备的干酪在成熟180d时对其水解量才相当于牛凝乳酶制备干酪30d水解量,这与骆驼凝乳酶的用量低和非特异水解活力较低均有关。2种干酪中游离氨基酸的含量没有显著差异,这也许是因为游离氨基酸主要是乳酸菌(发酵剂和非发酵剂)的肽酶产生之故。比较干酪成熟的质地,成熟30d时2种干酪的硬度和咀嚼性没有显著差别,成熟150d时骆驼制备干酪硬度和咀嚼性测定值均高于小牛凝乳酶制备干酪,180d时2种干酪的总体感官相似,但是骆驼凝乳酶制备干酪疏强度、肉汤味和苦味均较低。

骆驼凝乳酶比小牛凝乳酶有更高的 $c/p$ 以及更优越的制备干酪的性能。丹麦科汉森公司就通过黑

第一作者:博士,讲师(张富春为通讯作者,E-mail:zfcxju@gmail.com)。

基金项目:新疆大学博士启动基金(BS150237);国家自然科学基金(31560440)

收稿日期:2016-03-19,改回日期:2016-04-27

曲霉大量发酵骆驼凝乳酶并上市,与此同时,骆驼凝乳酶的基因和蛋白序列<sup>[5]</sup>、用骆驼凝乳酶制备干酪<sup>[6]</sup>已被申请国际专利。如今骆驼凝乳酶已经成功地成为了小牛凝乳酶的替代品,人们不但没有因此止步,反而对骆驼凝乳酶的研究变得更为积极和深入,为了更好地了解骆驼凝乳酶对牛乳的高凝乳活力、高催化效率的机制,从酶的晶体结构、酶对牛乳中 $\alpha$ -

$\beta$ -、 $\kappa$ -酪蛋白的水解肽谱、酶与 $\kappa$ -酪蛋白结合的分子水平等方面进行深入研究。由于牛凝乳酶的相关研究非常多,故在研究骆驼凝乳酶的过程中,也总是伴随着与牛凝乳酶研究结果比较。同时,为了便于描述,我们将骆驼凝乳酶 camel chymosin 缩写为 CC,牛凝乳酶 bovine chymosin 缩写为 BC,酪蛋白 casein 缩写为 CN。

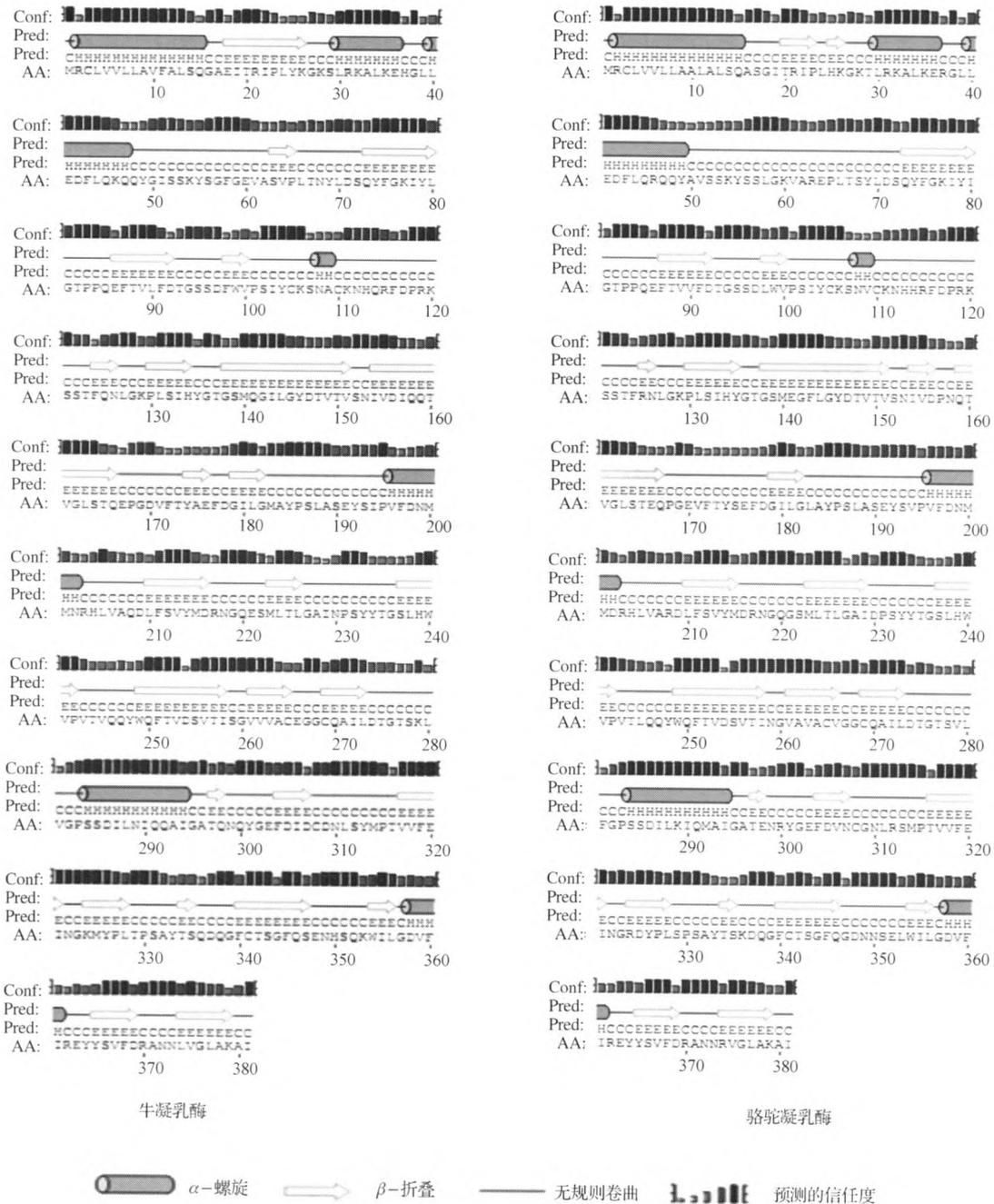


图1 预测骆驼凝乳酶的二级结构

Fig. 1 The secondary structure prediction of the camel chymosin

预测网址 (the structure prediction URL) <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=pps&group=programs&subgroup=propt>

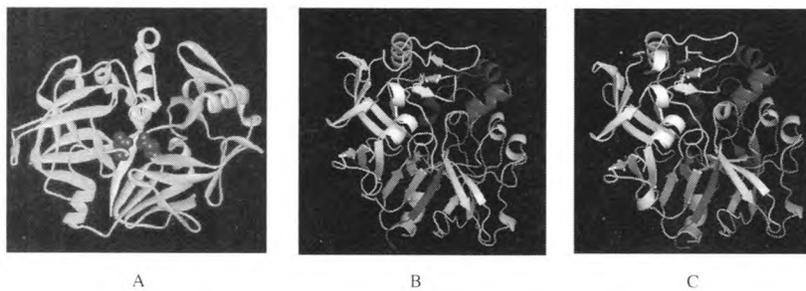
## 1 骆驼凝乳酶的基因与结构

### 1.1 骆驼凝乳酶的基因

骆驼凝乳酶原前体 (pre-prochymosin) 基因含有 9 个外显子<sup>[3]</sup>, 开放阅读框含有 1146 个核苷酸, 编码 381 个 AA, N-端前 16 个 AA 为信号肽 (pre-peptide), 中间 42 个 AA 为激活片段 (activation segment 或 propeptide), C-端 323 个 AA 为成熟凝乳酶 (chymosin)。酶信号肽剪切位点、酶原激活位点以及成熟酶的氨基酸数等信息完全与牛凝乳酶相同, 同时骆驼凝乳酶氨基酸序列与牛凝乳酶氨基酸序列相似度 (sequence identity) 和序列相似性 (sequence similarity) 分别为 85% 和 94%, 但 48 个不同 AA 散布于整个酶, 而不是集中在某个区域<sup>[2]</sup>。

### 1.2 骆驼凝乳酶的结构

#### 1.2.1 预测骆驼凝乳酶原的二级结构与三级结构



A 猪胃蛋白酶原 A 晶体结构<sup>[7]</sup>; B 和 C 分别表示预测的骆驼凝乳酶原和牛凝乳酶原三级结构

图 2 猪胃蛋白酶原 A 晶体结构<sup>[7]</sup>和预测骆驼与牛凝乳酶原三级结构

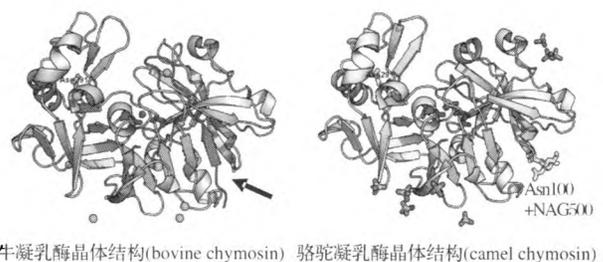
Fig. 2 The crystal structure of swine pepsin A and the tertiary structure prediction of the bovine and camel chymosin (预测结构网址: <http://zhanglab.ccm.med.umich.edu/I-TASSER/>)

成熟凝乳酶的序列从第 59 位开始, 在预测的二级结构图中, 连接 propeptide 和成熟凝乳酶之间是无规则卷曲, 这也方便酶活化时的构象改变。目前认为天冬氨酸蛋白酶原的活化过程为: propeptide 与酶的活性位点以静电作用结合, propeptide 的存在阻止了底物进入酶活性中心, 故酶原在中性环境里不具有催化作用; 当 pH 降低, propeptide 与酶活性中心的静电作用被破坏, 此时 propeptide 的构象发生改变, 酶原的自剪切位点暴露并与酶活性中心结合, 酶对该位点进行切割, propeptide 从酶活性中心解离, 酶的 N 端发生构象改变, 形成一个反式  $\beta$  折叠位于底物与酶结合的裂隙处<sup>[8]</sup> (见图 3 箭头所指)。

#### 1.2.2 骆驼凝乳酶的晶体结构

牛凝乳酶的晶体结构模型已见多次报道<sup>[9-10]</sup>, 但是骆驼凝乳酶的晶体结构直到 2013 年才由 JENSEN

通过预测网站对 CC 酶原与 BC 酶原的二级结构和三级结构进行预测, 发现 CC 与 BC 在一级结构上的高相似度, 使得其也具有相似的二级结构和三级结构 (见图 1 和图 2), 包括  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠形成的位置、个数等。二级结构预测中, N 端都有一个  $\alpha$ -螺旋, 这是两个酶原前体的信号肽, 随后 propeptide 的 N 端是  $\beta$ -折叠, 后面接着 3 个  $\alpha$ -螺旋, 这个预测结构与已经报道的猪胃蛋白酶原和网站预测的骆驼凝乳酶原和牛凝乳酶原的三维结构中 propeptide 结构吻合。同时在猪胃蛋白酶原中, N 端的  $\beta$ -片层位于酶的活性中心, 防止底物进入, 在 pH 中性环境中, 酶原不具催化活性<sup>[7-8]</sup>, 而预测的骆驼和牛凝乳酶原的 propeptide 结构环绕在凝乳酶 2 个结构域中间裂隙的周围, 2 个催化 Asp 位于裂隙中间, 故酶活性中心同样被 propeptide 结构封闭而不表现出活性。



牛凝乳酶晶体结构 (bovine chymosin) 骆驼凝乳酶晶体结构 (camel chymosin)

图 3 牛凝乳酶和骆驼凝乳酶的晶体结构<sup>[11]</sup>

Fig. 3 The crystal structure of the bovine and camel chymosin<sup>[11]</sup>

等人<sup>[11]</sup>首次报道 (见图 3)。为了便于将 BC 和 CC 结构进行比较, 其也同时获得了 BC 晶体结构, 该结构与以前研究报道的牛凝乳酶晶体结构完全相同。CC 与 BC 晶体结构上最大的不同之处在于其 N 端, BC

晶体显示其 N 端形成了一个反平行式  $\beta$ -折叠(见图 3 箭头所指)。而 CC 的晶体结构其 N 端少了 10 个 AA。将 CC 晶体复水溶解,对其进行 N-末端分析、质谱分析和检测凝乳活力,发现其活力下降,且其活力与 N 端缺失了 3 个 AA 的凝乳酶变体<sup>[11]</sup>相似(见表 1)。

## 2 骆驼凝乳酶的理化特性与酶学特性

### 2.1 骆驼凝乳酶的理化特性

表 1 黑曲霉表达的重组骆驼凝乳酶分离出的不同变体<sup>[11]</sup>

Table 1 The different variants of the camel chymosin expressed in *Aspergillus niger*

变体	1		2		3	4	5	6
序列	4-323		1-323		1-323	1-323	1-323	1-323
分子量	40.2		40.3		37.7	37.7	35.6	35.6
糖基化位点	Asn100	Asn291	Asn100	Asn291	Asn100	Asn100		
凝乳活力/(IMCU · mg <sup>-1</sup> )	123 ± 2		289 ± 1		396 ± 1	467 ± 1	474 ± 5	426 ± 8
T <sub>m</sub> /K	333.0		333.6		334.4	334.4	332.5	332.2

黑曲霉中的蛋白,若存在 Asn-X-Thr/Ser(X 为谷氨酸或脯氨酸)序列时,黑曲霉将会对该序列中 Asn 的 N $\delta$ 2 原子进行糖基化,骆驼凝乳酶存在 2 个糖基化位点:Asn100 和 Asn290,其中 Asn100 更易被糖基化<sup>[11]</sup>。由表 1 看出,1 和 2 中双位点被双糖基化,3 和 4 是单位点被糖基化,同时其差异性可能是糖基化差异产生的,而 5 和 6 没有被糖基化,其差异产生原因还需研究。值得注意的是,N 端缺失 3 个 AA 的变体 1,凝乳活力很低。JENSEN 等人<sup>[11]</sup>选取凝乳酶变体 2 进行了晶体结构研究(见图 3)。

### 2.2 骆驼凝乳酶的酶学特性

早在 1993 年,WANGO<sup>[12]</sup>就用骆驼 rennet 和牛 rennet 对驼乳和牛乳进行凝乳研究,发现牛 rennet 对驼乳凝固主要是牛胃蛋白酶组分的作用,而牛凝乳酶

在黑曲霉中表达获得的骆驼凝乳酶分子质量为 35.6 k ~ 40.3 kDa(糖基化不同)<sup>[3,11]</sup>;等电点理论值为 4.85,但实测值为 5.5。

JENSEN 等<sup>[11]</sup>人对黑曲霉表达的骆驼凝乳酶进行层析分离,根据洗脱的先后顺序分离出 6 个凝乳酶变体(variant),其疏水性和等电点均不同,研究者又通过 N-末端分析、质谱和差示扫描量热法对每个凝乳酶变体进行分析,得出表 1 数据。

几乎不凝驼乳。2006 年,KAPPELER 等也发现重组骆驼凝乳酶不能凝固牛乳<sup>[3]</sup>。

SALIHA 等<sup>[13]</sup>用来自不同年龄(1、3、9 年)的骆驼胃粘膜粗提物 GEC1、3、9 对驼乳和牛乳进行凝乳实验,同时用商品化的牛 rennet(80% 凝乳酶、20% 胃蛋白酶)和商品化牛胃蛋白酶作对照,结果发现 GEC9 骆驼胃蛋白酶的粗提物对驼乳和牛乳的凝乳效果最好,GEC9 凝乳活力为牛 rennet 的 2 倍,但对牛乳的蛋白水解活力才是其 58.3%。对重组骆驼凝乳酶的蛋白水解活力检测也证实了其蛋白水解活力低于牛凝乳酶<sup>[2,14]</sup>。

关于黑曲霉表达的重组骆驼凝乳酶的最适作用温度和 pH、热稳定性、pH 稳定性、c/p 值等情况见表 2。

表 2 几种重组凝乳酶的酶学特性

Table 2 The enzymatic properties of the several recombinant chymosins

凝乳酶	最适作用温度/℃	最适作用 pH 值	热稳定性/℃	pH 稳定性	c/p 值	参考文献
重组骆驼凝乳酶	40	5.7	<60	2.0~6.5	7	[3]
重组牛凝乳酶	35	5.5	<55	2.0~6.5	1	[3]
重组骆驼凝乳酶	40	6.0	<40	4.5~6.5	17.9	[14]
重组牛凝乳酶	40	5.0~6.0	<35	2.5~6.5	16.39	[14]
重组水牛凝乳酶	37	4.5	<30	2.0~6.5	15.4	[14]
重组山羊凝乳酶	45	3.5~5.5	<35	2.0~9.0	16.88	[14]

注:重组骆驼凝乳酶和牛凝乳酶由黑曲霉表达,重组水牛凝乳酶和山羊凝乳酶由毕赤酵母表达。

从表 2 看出,骆驼凝乳酶的热稳定性和 c/p 值高于牛凝乳酶。但关于骆驼凝乳酶的催化效率,有不同的报道。VALLEJO 等人<sup>[14]</sup>比较了 4 种重组凝乳酶

催化效率,底物为牛  $\kappa$  酪蛋白,结果山羊凝乳酶最高,而骆驼凝乳酶最低。KAPPELER 等人<sup>[3]</sup>以合成的牛和骆驼  $\kappa$  酪蛋白 P8-P3 的 11 个氨基酸多肽为

底物,检测骆驼凝乳酶和牛凝乳酶的催化效率为  $152 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  和  $268 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。MØLLER 等人<sup>[15]</sup>以牛  $\kappa$ -酪蛋白为底物,通过计算凝乳酶切割牛乳  $\kappa$ -酪蛋白产生的副- $\kappa$ -酪蛋白和糖巨肽的产生量,得出骆驼凝乳酶催化效率比牛凝乳酶高 15%。

### 3 骆驼凝乳酶对牛乳中主要乳蛋白水解的肽谱分析

#### 3.1 $\kappa$ -CN 水解肽谱

MØLLER 等人<sup>[15]</sup>用毛细管电泳和反相液相色谱-质谱技术分析了 CC 和 BC 作用于牛乳  $\kappa$ -CN 的最初水解位点(pH6.5, 32 °C)。结果显示 2 种酶均对  $\kappa$ -CN 进行特异性剪切,即切割  $\kappa$ -CN 的 Phe105-Met106 之间的肽键,产生副- $\kappa$ -CN 和糖巨肽。

#### 3.2 $\alpha$ s1-CN 水解肽谱

MØLLER 等人<sup>[16]</sup>采用 CC 和 BC 水解  $\alpha$ s1-CN 24 h(pH6.5, 30 °C),将 pH4.6-可溶性氮进行毛细管电泳和反相高效液相色谱分析,结果见表 3。

表 3 CC 和 BC 水解  $\alpha$ s1-CN 24 h 的水解肽数<sup>[16]</sup>

Table 3 The hydrolyzed peptide numbers of  $\alpha$ s1-CN which are catalyzed by the camel and bovine chymosin for 24 h

检测方法	检测 CC 水解肽数	检测 BC 水解肽数	共有肽数
毛细管电泳	4	5	4
反相高效液相色谱	14	22	11

分析水解肽段序列得出,CC 和 BC 都优先水解  $\alpha$ s1-CN 的 Phe23-Phe24 肽键,继而水解 Leu101-Lys102 肽键,产生的 f102-199,经 BC 继续水解最终检测到 14 条肽,而 CC 只检测到 4 条,二者共有肽 3 条。即 CC 和 BC 对  $\alpha$ s1-CN 的水解位点开始保持一致,只在水解后期出现各自水解特异性。

#### 3.3 $\beta$ -CN 水解肽谱

CC 和 BC 优先水解  $\beta$ -CN 中的 Leu192-Tyr193,从而导致疏水性 f193-209 肽的大量积累。BC 在水解进行的 12 h 内即可完全水解  $\beta$ -CN,但 CC 对该肽的水解速率只有 BC 的 7%。接下来,CC 水解的肽键是 Leu165-Ser166 和 Phe190-Leu191,对 BC 来说,其后续水解的肽键是 Leu165-Ser166、Gln167-Ser168 和 Ala189-Phe190。最后, f1-192 会被 CC 和 BC 在 Ser57-Leu58、Leu163-Ser164 和 Trp143-Met144 处切割,而 BC 还会在 Ser142-Typ143 位点切割,得到最终的水解肽谱。

### 3.4 骆驼凝乳酶制备干酪苦味较低的原因分析

干酪制备时,极少量存留于凝块中的凝乳酶会在干酪成熟过程中水解凝乳里  $\alpha$ s1-CN 和  $\beta$ -CN。已知这些蛋白水解肽中有些肽会造成干酪的苦味,影响干酪的口感。已报道用 CC 制备的干酪比 BC 制备的干酪,苦味少、硬度高,结合上述 CC 和 BC 对乳蛋白的水解肽谱分析,解释如下:

(1)在相同的酶浓度下(IMCU),比较 CC 和 BC 水解  $\alpha$ s1-CN 和  $\beta$ -CN 最初位点的水解速率,CC 水解速率只相当于 BC 的 36% 和 7%,这样,经历相同的干酪成熟时间,CC 可能水解产生的苦味肽数量少;

(2)BC 水解  $\beta$ -CN 的肽谱中存在 f168-189 和 f190-192,而 CC 的水解肽谱中没有这两个肽,MØLLER 等人认为这 2 种疏水肽增加了干酪的苦味;

(3)在 pH5.2 的条件下,BC 对  $\beta$ -CN 深度广泛水解,切割  $\beta$ -CN 中的 93-94 和 127-128 之间的肽键,这可能是干酪苦味增加的重要因素,若使用 CC 则可能不会切割这 2 个位点<sup>[16]</sup>。

### 4 骆驼凝乳酶与 $\kappa$ -CN 底物特异结合的分子研究

#### 4.1 结合位点的命名

为方便而清楚描述酶的活性位点与  $\kappa$ -CN 结合情况,SCHECHTER 和 BERGER 对酶与底物结合的 AA 进行了命名。从  $\kappa$ -CN 剪切位点算起,往  $\kappa$ -CN N-端方向,依次 AA 命名为 P1、P2、P3……Pn,往  $\kappa$ -CN C-端方向,依次 AA 命名为 P1'、P2'、P3'……Pn'。举例:骆驼  $\kappa$ -CN 的剪切位点为 Phe97-Ile98,那么 Ser96、Phe97、Ile98 和 Ala99 就命名为 SerP2、PheP1、IleP1' 和 Ala P2'。同理与  $\kappa$ -CN P1、P2、P3……Pn 相互作用的酶活性裂隙中的亚位点结构(subsite)依次命名为 S1、S2、S3……Sn 和 S1'、S2'、S3'……Sn'。由于酶对底物的特异性结合与酶的亚位点结构有关,故这些亚位点结构又被称为“特异性口袋”(specificity pocket)<sup>[2,11]</sup>。

#### 4.2 骆驼凝乳酶与 $\kappa$ -CN 的亲合力

MØLLER 等人<sup>[15]</sup>根据凝乳酶切割牛乳  $\kappa$ -CN 产生的副- $\kappa$ -CN 和糖巨肽的产生量,计算出 CC 和 BC 的  $K_m$  和  $K_{cat}$ 。结果显示 CC 与牛  $\kappa$ -CN 结合的亲合力比 BC 与牛  $\kappa$ -CN 结合的亲合力( $K_m$ )低约 30%,但结合的结合数( $K_{cat}$ )却高出 60%,这样,计算酶的催化效率( $K_{cat}/K_m$ ),CC 高出约 15%。在局部,CC 表面负电荷丛(cluster)的电子密度低,可能减弱了与牛  $\kappa$ -酪

蛋白 C 端的 His-Pro 正电荷丛的静电作用,这样降低了 CC 对底物的亲和力,加速了酶与底物的解离。

### 4.3 骆驼凝乳酶的表面静电荷

JENSEN 等人<sup>[11]</sup>在 pH6.65(牛乳的生理 pH)条件下计算 CC 和 BC 的表面静电荷总值和 pI 值,CC 为 -9ec 和 4.8,BC 为 -15ec 和 5.4。CC 的表面正电荷区域比 BC 更大,其原因可能是:在凝乳酶的 C 端,CC 的 56 位为 His,而 BC 是 Gln,即此处 CC 多了 1 个带正电荷的 AA;在凝乳酶的 N 端,CC 的 249 和 251 位分别为不带电的 Asn 和 Gly,而 BC 此处为两个 Asp,带负电荷;同时,BC 中 242、254、278 的这 3 个位点都不带电荷,而 CC 中为 3 个带正电的 AA(Arg、Arg 和 Lys),由此形成了 1 个新的正电荷区域;在凝乳酶的底部,BC 中的 150 和 316 位分别是 2 个不带电荷的 AA,而 CC 为 2 个 Arg,又形成了 1 个正电荷区域<sup>[11]</sup>。

凝乳酶在  $\kappa$ -CN 的 Phe105-Met106 位点进行切割,研究显示  $\kappa$ -CN 酶切位点附近有几个带正电荷的 AA,而 pH6.65 环境下凝乳酶表面总体静电荷为负,这样有利于二者相互作用。但  $\kappa$ -CN 的 C 端由于存在几个 Asp 和 Glu 而表现出带负电荷特性,可能因此会出现与凝乳酶的相互排斥。因 CC 表面负电荷较少,该排斥会明显小些。然而,从 CC 和 BC 表面带正电荷区域来看,正电荷区域可能正好位于底物结合裂隙外部,这也许能帮助酶调整方向使得酶表面的正电荷与  $\kappa$ -CN 的 C 端负电荷作用。一般认为凝乳酶 C 端区域的负电荷丛与  $\kappa$ -酪蛋白 His98-His102 正电荷丛之间的静电吸引,对酶与底物的特异结合有重大作用。SAFRO 等<sup>[17]</sup>提出, $\kappa$ -CN His98-His102 正电荷丛接近凝乳酶的 Gln240-Cys250,从而定置在酶表面活性位点裂隙的附近,因为 Gln240-Cys250 酸性残基电子密度的明显改变,造成酶伸展,似乎更适合底物在活性位点靠静电作用定位。JENSEN 等人<sup>[11]</sup>还强调了 Glu245、Asp247、Asp249 和 Asp251 对吸引  $\kappa$ -CN His-Pro 正电荷丛的作用。综上, $\kappa$ -CN 带负电荷的 C 端,其既被凝乳酶表面的正电荷吸引,又被负电荷排斥,这样有利于  $\kappa$ -CN 结合到酶的活性位点的 C 端。CC 底部的带正电荷区域对吸引  $\kappa$ -CN 负电荷的 C 端可能也很重要。故 CC 表面存在更多的正电荷区域,这似乎对 CC 较 BC 高的凝乳活力做了一些解释<sup>[11]</sup>。还有,CC 表面的负电荷丛比较 BC 不是很适合与  $\kappa$ -CN His98-His102 正电荷丛相互作用,这样可能使酶与底物亲和力( $K_m$ )弱,同时可能造成水解完成后酶

与底物的更快解离( $K_{cat}$ ),这也给我们改进酶的凝乳活力提供了一条新思路。

BØRSTING 等人<sup>[18]</sup>研究不同乳液 pH 对存留在凝乳中骆驼凝乳酶酶量影响,以 BC 为对照。乳液设定不同 pH,用相同凝乳酶活力的 CC 和 BC 凝乳后离心,检测乳清中的凝乳酶活力(以合成肽 Pro-Thr-Glu-Phe-(NO<sub>2</sub>-Phe)-Arg-Leu 为底物,HPLC 检测催化产物的量),结果发现乳液 pH 为 6.00~6.65 时,CC 存留在凝乳中的量非常恒定,约 20%,而牛凝乳酶的残留量却几乎呈线性上升,从 2% 增至 21%。作者分析,CC 对 pH 的低依赖性可能是由于 CC 分子带负电荷的量少于 BC 之故。

### 4.4 凝乳酶/ $\kappa$ -CN 片段复合物模型

PALMER 等人<sup>[19]</sup>先前建立了牛凝乳酶和牛  $\kappa$ -CN 片段复合物的模型,该模型符合已有的牛凝乳酶实验数据。SØRENSEN 等<sup>[2]</sup>人采用同源模型和分子动力模拟技术,对 CC、BC 分别与牛、骆驼  $\kappa$ -CN 片段形成的复合物进行分析。 $\kappa$ -CN 片段选取切割位点附近的 16AA 肽,序列见图 4。复合物表示形式为:凝乳酶/ $\kappa$ -CN,则 4 种复合物分别是 BOV/BOV、BOV/CAM、CAM/CAM 和 CAM/BOV(BOV 代表牛凝乳酶和牛酪蛋白片段,CAM 代表骆驼凝乳酶和骆驼酪蛋白片段)。建立的同源模型将 BOV/BOV 当作比对模板。

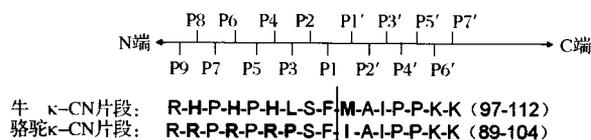


图 4  $\kappa$ -CN 片段的序列

Fig. 4 The AA sequence of the  $\kappa$ -CN

图中箭头处为酶的切割位点

分析复合物中酶的波动性,发现波动大的区域为 loop 和转角。总体上,酶的动力学非常相似,只有在酶的 C 端波动存在较明显差异。同时复合物中的 P3-P2' 残基都很稳定,但结合裂隙靠外部的残基波动大,这也说明底物与酶的结合并不是非常坚固,BOV/CAM 和 CAM/BOV 都是在酶的 C 端、 $\kappa$ -CN 片段 N 端显现出较大波动。通过模型分析,4 种酶与底物复合物结构相似,BOV/BOV、CAM/CAM 和 CAM/BOV 复合物结合稳定,BOV/CAM 在结合亚位点比较其它模型较不稳定,原因可能是由于牛凝乳酶 221 位的 Lys 残基与骆驼  $\kappa$ -CN P4 位上的 Arg 残基之间存在电荷

排斥而导致<sup>[2]</sup>。

#### 4.5 凝乳酶/ $\kappa$ -CN 复合物的结合自由能研究

SØRENSEN 等人<sup>[20]</sup>使用分子力学 Poisson-Boltzmann 表面积法 (molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area, MM-PBSA) 计算 BOV/BOV 和 CAM/BOV 复合物中酶与底物结合的自由能 ( $\Delta G$ )。BOV/BOV 的  $\Delta G$  为  $-42.8$  kcal/mol, CAM/BOV 的  $\Delta G$  为  $-33.4$  kcal/mol, 表明 BOV/BOV 结合力更强。其又用丙氨酸扫描计算 (alanine scanning calculations) 方法来分析 BOV/BOV 和 CAM/BOV 复合物中各个残基对结合自由能的贡献。丙氨酸扫描计算结果用  $\Delta\Delta G$  表示, 描述将复合物中的残基突变为 Ala 后结合自由能的改变。 $\Delta\Delta G$  为负数时, 表示突变结果能增强酶与底物的结合,  $\Delta\Delta G$  为正数时, 表示突变结果减弱酶与底物的结合。复合物中的牛  $\kappa$ -CN 片段为 97-112 肽, 序列为 R-H-P-H-P-H-L-S-F-M-A-I-P-P-K-K, 将其中的 7 个 AA 残基突变为 Ala 来计算自由能的变化 (突变残基见图 5), 这相当于把 CC 和 BC 的一级结构的差异通过能量学进行近似的量化。

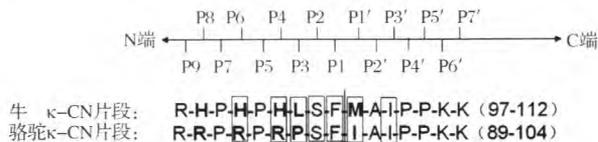


图 5 突变  $\kappa$ -CN 残基

Fig. 5 The mutated residues in the  $\kappa$ -CN

(框内的残基为突变残基, 箭头处表示酶的切割位点)

在所有替换中, 只有 BOV/BOV 中 HisP4Ala 突变的  $\Delta\Delta G$  为负, 其它均为正。将极性和非极性能分开比较, 单看极性能 ( $\Delta E_{\text{polar}}$ ) 发现 HisP4、LeuP3、PheP1 和 MetP1' 突变为 Ala 时能量变化对结合有利。这暗示运用突变去除不利的极性作用, 而保留非极性作用, 将有望提高结合自由能。比如说, 将一个极性 AA 用一个大小相同的非极性 AA 替换, 对凝乳酶分子进行蛋白质改造。

#### 5 骆驼凝乳制备干酪的研究

随着人们对健康和安全要求的提高, CC 运用到低脂、低盐干酪制备工艺中, 并与改进发酵剂共同促进干酪优良质地与风味的形成。

BØRSTING 等<sup>[21]</sup>用 CC 加工的低脂切达干酪, 蛋白酶解程度较低, 苦味少, 但断裂应力较高, 表现为较硬的干酪质地。然而用 BC 加工的低脂切达干酪, 由

凝乳酶催化作用释放的苦味肽  $\beta$ -CN (f193-209), 或者由发酵剂蛋白酶产生的  $\alpha$ S1-CN (f1-23) 肽含量都较高, 干酪的质地较软。

GOVINDASAMY-LUCEY 等<sup>[22]</sup>用 CC 制备低脂 cheddar 干酪 (牛乳中脂肪含量 0.5%, 酪蛋白和脂肪比例为 5:1), 用 BC 作为对照, 结果显示干酪的成分与 pH 值二者无差异, 质地分析数据显示, 两种干酪的硬度和咀嚼性随着干酪成熟不断下降, 但 CC 制备干酪的这两个参数均高于 BC 制备干酪。感官分析, CC 制备干酪苦味少, 并且更耐嚼, BC 制备干酪质地软些。CC 制备干酪中苦味虽然降低了, 但没有完全消除。

MOYNIHAN 等<sup>[23]</sup>用 CC 制作低水分-部分脱脂 (LMPS) Mozzarella 干酪, 成熟期间的总钙和可溶性钙、pH、水分均无差别。成熟 84 d, 二者的熔化特性相似, 制作披萨时, CC 制备干酪起泡少, 坚固并耐嚼。同时 CC 制备干酪在烘烤披萨表现出的特性, 包括起泡性、干酪丝的厚度、硬度和咀嚼性均可以在更长的成熟期得以维持, 故延长了干酪的货架期。

为了抵消低盐 (0.85% w/w, 正常为 1.8% w/w) 契达干酪的负面感官, MBØLLER 等<sup>[24]</sup>使用不含谷氨酰胺脱羧酶的发酵剂与骆驼凝乳酶, 并联合使用瑞士乳杆菌 *Lactobacillus helveticus* CHCC 4481 和戊糖乳杆菌 *Lactobacillus pentosus* CHCC 13992 制备干酪。结果骆驼凝乳酶能大大降低苦味肽  $\beta$ -CN (f193-209) 和  $\alpha$ S1-CN (f1-9) 的形成, 同时瑞士乳杆菌提高了对这些苦味肽的降解, 增加了风味氨基酸的释放量, 因为使用的发酵剂不含谷氨酰胺脱羧酶, 从而积累了更多的游离谷氨酸。戊糖乳杆菌在成熟的 150 d 内成功地将柠檬酸全部转化为风味增强物质——琥珀酸盐。作者认为运用上述的发酵剂、辅助发酵剂和凝乳酶, 其相互补充、联合作用具备改进低盐干酪质地的潜力。

#### 6 展望

重组骆驼凝乳酶的克隆与纯化开辟了凝乳酶研究的新方向, 它目前成功地成为了小牛凝乳酶的替代品并已用来工业化制备干酪。对其高凝乳活力和高催化效率的探索可以让人们对现有的凝乳酶进行蛋白质工程改造, 创造出具有更高凝乳活力、更低非特异蛋白水解活力、加工特性稳定以及能作用不同底物 (如驼乳  $\kappa$ -酪蛋白等) 的新型酶。

## 参 考 文 献

- [1] KAGEYAMA T. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2002, 59(2): 288 - 306.
- [2] SØRENSEN J, PALMER D S, QVIST K B, et al. Initial stage of cheese production: a molecular modeling study of bovine and camel chymosin complexed with peptides from the chymosin-sensitive region of  $\kappa$ -casein [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(10): 5 636 - 5 647.
- [3] KAPPELER S R, van den BRINK H, RAHBK-NIELSEN H, et al. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 342(2): 647 - 654
- [4] BANSAL N, KRAKE M A, PIRAINO P, et al. Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for cheddar cheese [J]. *International Dairy Journal*, 2009, 19: 510 - 517.
- [5] KAPPELER S, FARAH Z, van den BRINK J M, et al. Method of producing non-bovine chymosin and use hereof: U. S. Patent 7,270,989 [P]. 2007 - 9 - 18.
- [6] BROE M L, van den BRINK J, HARBOE M K. Coagulation of Milk; United States, US2011/0008492 A1 [P]. 2011 - 1 - 13.
- [7] HARTSUCK J A, KOELSCH G, REMINGTON S J. The high-resolution crystal structure of porcine pepsinogen [J]. *Proteins*, 1992, 13(1): 1 - 25.
- [8] RICHTER C, TANAKA T, YADA R Y. Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases: pepsinogen, progastricsin and prochymosin [J]. *The Biochemical Journal*, 1998, 335: 481 - 490.
- [9] NEWMAN M, SAFRO M, FRAZAO C, et al. X-ray analyses of aspartic proteinases IV: Structure and refinement at 2.2 Å resolution of bovine chymosin [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1991, 221(4): 1 295 - 1 309.
- [10] GILLILAND G L, WINBOME E L, NACHMAN J, et al. The three - dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution [J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 1990, 8(1): 82 - 101.
- [11] JENSEN J L, MØLGAARD A, POULSEN J N, et al. Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties [J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2013, 69(5): 901 - 913.
- [12] WANGO J, FARAH Z, PUHAN Z. Extraction of camel rennet and its comparison with calf rennet extract [J]. *Milchwissenschaft*, 1993, 48 (6): 322 - 325.
- [13] SALIHA B H, LOUIS L C, FARIDA M M, et al. Comparative study of milk clotting activity of crude gastric enzymes extracted from camels' abomasum at different ages and commercial enzymes (rennet and pepsin) on bovine and camel milk [J]. *Emirates Journal of Food & Agriculture (EJFA)*, 2011, 23(4): 301 - 310.
- [14] VALLEJO J A, AGEITOS J M, POZA M, et al. Short communication: A comparative analysis of recombinant chymosins [J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(2): 609 - 613.
- [15] MØLLER K K, RATTRAY F P, SØRENSEN J C, et al. Comparison of the hydrolysis of bovine K-casein by camel and bovine chymosin: a kinetic and specificity study [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60 (21): 5 454 - 5 460.
- [16] MØLLER K K, RATTRAY F P, ARDÖ Y. Camel and bovine chymosin hydrolysis of bovine  $\alpha$ -SI- and  $\beta$ -caseins studied by comparative peptide mapping [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60: 11 421 - 11 432.
- [17] SAFRO M G, ANDREEVA N S. On the role of peripheral interactions in specificity of chymosin [J]. *Biochemistry International*, 1990, 20(3): 555 - 561.
- [18] BØRSTING M W, QVIST K B, ARDÖ Y. Influence of pH on retention of camel chymosin in curd [J]. *International Dairy Journal*, 2014, 38(2): 133 - 135.
- [19] PALMER D S, CHRISTENSEN A U, SØRENSEN J, et al. Bovine chymosin: a computational study of recognition and binding of bovine  $\kappa$ -casein [J]. *Biochemistry*, 2010, 49(11): 2 563 - 2 573.
- [20] SØRENSEN J, PALMER D S, SCHIØTT B. Hot-spot mapping the interactions between chymosin and bovine kappa-casein [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61: 7 949 - 7 959.
- [21] BØRSTING M W, QVIST K B, RASMUSSEN M, et al. Impact of selected coagulants and starters on primary proteolysis and amino acid release related to bitterness and structure of reduced-fat Cheddar cheese [J]. *Dairy Science & Technology*, 2012, 92(5): 593 - 612.
- [22] GOVINDASAMY-LUCEY S, LU Y, JAECCI J J, et al. Impact of camel chymosin on the texture and sensory properties of low-fat cheddar cheese [J]. *Australian Journal of Dairy Technology*, 2010, 65(3): 139 - 142.
- [23] MOYNIHAN A C, GOVINDASAMY-LUCEY S, JAECCI

J J, et al. Effect of camel chymosin on the texture, functionality, and sensory properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese [J]. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(1): 85–96.

of selected lactic acid bacteria and coagulant for improving the quality of low-salt Cheddar cheese: Chemical, microbiological and rheological evaluation [J]. *International Dairy Journal*, 2013, 33(2): 163–174.

[24] MØLLER K K, RATRAY F P, ARDÖ Y. Application

## Research progress on molecular structure and Cheese-making of the camel chymosin

PU Yan, MA Xiao-lin, ZHANG Fu-chun\*, LI Yi-jie

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology,  
Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

**ABSTRACT** The preliminary structure and three dimensional structure of camel chymosin are similar to that of bovine chymosin, but their affinity and catalytic rate acting on bovine casein are different significantly. Studying the difference between the both chymosins on molecular level has great significance for chymosin protein engineering in future. The cheese made with camel chymosin has less bitter taste. Now combination of camel chymosin and the improved cheese starter to produce new type of low-fat, low salt cheese will be a new way for development of cheese in future. The progress of the structure and enzymatic properties of camel chymosin, the molecular basis of interaction between the substrates and enzyme, as well as the cheese made with the camel chymosin were reviewed in this paper.

**Key words** chymosin; camel; affinity; crystal structure; cheese