

Bacillus sp. EL31410 产弹性蛋白酶水解丝素蛋白特性的研究

徐莹^{1,2}, 何国庆¹

1(浙江大学生工食品学院食品科学与营养系, 浙江 杭州, 310029) 2(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛, 266003)

摘要 研究了 *Bacillus sp.* EL31410 发酵生产的弹性蛋白酶粗酶水解可溶性丝素蛋白的特性, 并采用凝胶过滤色谱(SEC)方法分析了丝素蛋白弹性蛋白酶解物的相对分子质量分布情况。结果表明, 该弹性蛋白酶水解丝素能力强于胰蛋白酶、木瓜蛋白酶以及 Alcalase 等几种蛋白酶。弹性蛋白酶水解丝素蛋白的米氏常数 $K_m = 2.473 \text{ mg/mL}$, 最大初速度 $V_m = 0.367 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$, 最适作用温度是 $45 \sim 55 \text{ }^\circ\text{C}$, 最适作用 pH 是 9.0。凝胶过滤色谱结果显示水解产物的相对分子质量主要在 1 000 以下(90%以上), 主要组分的相对分子质量为 565、134, 二组分所占比例分别为 7.60% 和 81.80%。

关键词 *Bacillus sp.* EL31410, 弹性蛋白酶, 可溶性丝素蛋白, 水解

蚕茧蛋白包括丝素蛋白和丝胶蛋白, 其中丝素蛋白占 65% 左右。丝素蛋白由 18 种氨基酸组成, 甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸和酪氨酸含量占 85% 左右。丝素蛋白复合氨基酸所具有的营养及保健功效, 是单一氨基酸所不能比拟的。研究发现, 丝素肽具有诸多活性, 如: 控制血液中胆固醇含量、抑制血糖的量、促进酒精分解代谢、抗基因突变^[1] 和对血管紧张素转化酶的抑制作用^[2] 等。因此说, 丝素蛋白作为功能性食品材料的潜在价值巨大。

蚕茧精练后得到丝素蛋白, 不溶于水。可溶性丝素蛋白的制备方法有酸解法、盐解法和酶解法。酶解法具有独特优势, 氨基酸不会被破坏, 而且专一性强, 容易控制水解程度而得到预期产品。日本学者研究了 2 种微生物蛋白酶 Actinase、Pronase-E 和弹性蛋白酶对丝素蛋白的水解, 指出它们的水解能力明显高于胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶^[3]。周凤娟^[4] 等认为 Alcalase 优于 AS1398 中性蛋白酶和木瓜蛋白酶, 并研究了 Alcalase 水解丝素蛋白的特性。程万里等^[5] 研究表明, 弹性蛋白酶的水解能力明显高于胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和胶原酶。然而, 关于微生物源弹性蛋白酶对丝素蛋白水解研究报道罕见, 本文对 *Bacillus sp.* EL31410 发酵生产的弹性蛋白酶粗酶水解丝素蛋白水解特性进行了初步研究, 并采用凝胶过滤色谱测定了丝素蛋白酶解物相对分子质量分布情况。

1 材料和方法

1.1 可溶性丝素粉末的制备^[6]

第一作者: 博士, 讲师。
收稿日期: 2007-12-14

称取适量蚕茧加入 5% Na_2CO_3 溶液中(固液比 1:100), 保持微沸 0.5 h, 温水洗涤至中性。重复上述操作一次。取出处理物置于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱中干燥, 获得精练丝素。

称取适量精练丝素, 放入 50% CaCl_2 溶液中, 固液比 1:25, 微沸腾 2~5 min。冷却后放入蒸馏水中透析脱盐至彻底(透析袋截留分子质量为 6 000~10 000)。采用真空旋转蒸发仪将透析液浓缩, 经真空冷冻干燥后, 于常温干燥器保藏备用。

1.2 微生物产弹性蛋白酶的制备

弹性蛋白酶由本实验室保藏菌株 *Bacillus sp.* EL31410 经发酵 24 h^[7], 再将发酵液经盐析沉淀, 透析后, 进行真空冷冻干燥, 所得弹性蛋白酶粗酶粉末, 低温干燥保藏。

1.3 丝素酶解物的制备

可溶性丝素蛋白液 1.5 mL(浓度 10 mg/mL) 与 pH 7.4 硼酸缓冲液 2.5 mL 混合后, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温反应 10 min, 加入经预热 5 min、浓度 2.5 mg/mL 酶液 90 μL , 迅速混匀并开始计时, 反应至预定时间后, 迅速煮沸 15 min, 终止反应。冷却后, 6000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 待测。同时, 做空白实验, 即反应混合液中不加酶, 其他条件一致。

1.4 氨基含量及水解度的测定

采用 TNBS 法^[8] 测定氨基含量。

水解度的计算: $DH/\% = \frac{c \cdot v}{h_{\text{tot}} \cdot a \cdot b} \times 100$

a : 加入丝素溶液的体积 (mL); b : 蛋白浓度 (mg/mL); c : 氨基含量 (mmol/L); v : 体系总体积。
 h_{tot} : 底物蛋白质中肽键总数 (mmol/g 蛋白质)。对丝素蛋白而言, $h_{\text{tot}} = 12.4$ 。

1.5 酶解物的分子质量分布分析方法

仪器: Waters 600 高效液相色谱仪(配 2487 紫外检测器和 M32 工作站)。色谱条件如下: 色谱柱: TSK gel 2000 SWXL 300 mm×7.8 mm; 流动相: 乙腈/水/三氟乙酸, 体积比为 45/55/0.1; 检测: UV 220 nm; 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 30 °C。相对分子质量校正曲线所用标准品: 细胞色素 C (MW 12 500)、胰岛素 (MW 5 800)、杆菌酶 (MW 1 450)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 (MW 451)、乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (MW 189)。

仪器操作方法参照中华人民共和国药典 2000 版, 第二部附录 VD; 数据处理及计算由 Waters M32 GPC 软件自动进行。

2 结果和讨论

2.1 几种蛋白酶对丝素的水解作用

比较了 *Bacillus* sp. EL31410 产粗弹性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶以及 Alcalase 等蛋白酶对丝素蛋白的水解能力。从水解进程曲线(图 1), 可以比较出在试验条件下, 不同蛋白酶对丝素蛋白水解能力的大小。弹性蛋白酶对丝素的水解能力最强, 其次是 Alcalase, 和胰蛋白酶和木瓜蛋白酶。

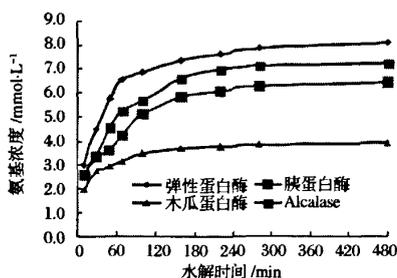


图 1 不同酶水解丝素蛋白比较

(水解条件如下: 弹性蛋白酶: 37°C、pH 7.4、E/S=4%; 胰蛋白酶: 37°C、pH 7、E/S=2%; 木瓜蛋白酶: 60°C、pH 5、E/S=10%; Alcalase: 60°C、pH 8、E/S=4%。实验重复 3 次, 取平均值。)

Bacillus sp. EL31410 产弹性蛋白酶对丝素蛋白的水解能力明显高于其他几种蛋白酶。这与不同酶的催化水解的专一性是分不开的。弹性蛋白酶优先水解羧基端结合着中性非芳香基团的氨基酸残基, 如丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸、缬氨酸, 而这些氨基酸在丝蛋白分子中占有很大比例, 因而弹性蛋白酶在水解丝素时, 水解位点较多, 相对水解能力较大^[9]。本研究结果与程万里等^[5]得到的结论一致。倪莉等^[10]认为 Alcalase 水解丝素能力强于木瓜蛋白酶、AS1398

中性蛋白酶等; 但也认为来自胰脏的胰酶中含有的弹性蛋白酶对于丝素的水解具有一定贡献。胰蛋白酶仅能作用于由精氨酸或赖氨酸参与形成的肽键, 而这两种氨基酸在丝素中含量很少, 且集中在丝素的非结晶区, 因而胰蛋白酶仅能水解非结晶区, 结晶区未被水解而与非结晶区分离产生沉淀。日本学者研究了 2 种微生物蛋白酶 Actinase、Pronase-E 和弹性蛋白酶对丝素蛋白的水解, 指出它们的水解能力明显高于胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶, 丝素的非结晶区被水解, 而结晶区未能被水解, 产生沉淀^[3]。

2.2 来源于 *Bacillus* sp. EL31410 的弹性蛋白酶水解丝素条件的确定

2.2.1 底物浓度对酶促反应的影响——动力学常数的测定

根据试验方法^[11], 在 pH 为 7.4, 反应温度 37 °C 条件下测定底物浓度对酶促反应的影响, 结果如图 2。Lineweaver-Burk 双倒数作图法得到 1/[S] 和 1/V 的关系, 见图 3。计算出弹性蛋白酶水解丝素蛋白的米氏常数 $K_m=2.473$ mg/mL。最大初速度 $V_m=0.367$ $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 。从图 2 所示的 V 对 [S] 关系曲线上可以看出, 在底物浓度 < 4.2 mg/mL 的区域, 曲线呈局部直线性 ($R^2=0.9842$), 说明这是一级反应动力学区。当底物逐渐增加到一定浓度时 (> 4.233 mg/mL) 时, 酶活性中心更多地被底物结合, 当底物浓度约 10.6 mg/mL 时, 反应速度 $V=0.301$ $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 几乎不再随底物增加而增加了, 在这一段, 反应表现为混合级反应。如果继续增加底物浓度, 酶活性中心被完全饱和, 曲线表现为零级反应。从 10.60 mg/mL 开始, V 增长已相当缓慢, 根据米氏方程, 此时的速度为最大反应速度 V_m 的 81%。

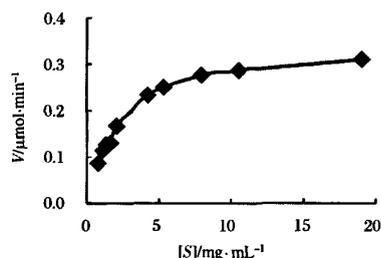


图 2 酶反应速度和底物浓度关系图

2.2.2 温度对酶促反应的影响

为了考察温度对弹性蛋白酶水解丝素的影响, 反应条件为 E/S=0.5%, pH 7.4, 加入的底物浓度 10 mg/mL, 水解时间 1 h, 结果见图 5。低于 50 °C 时,

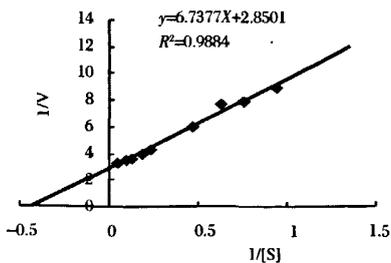


图3 Lineweaver-Burk 作图求米氏常数

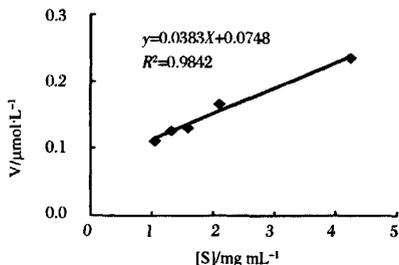


图4 低底物浓度与反应速度的线性关系

随着温度上升,弹性蛋白酶水解丝素的能力增大($P < 0.01$)。超过 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,随着温度升高,水解能力开始下降($P < 0.01$)。温度升高,催化反应速度增加的同时又伴随着酶的变性。以获得最大活性的温度下的氨基浓度为 100% 计, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下水解 1 h 后,氨基浓度为最大值的 85% ; 而 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,氨基浓度为最大值的 95% 。结果表明,弹性蛋白酶水解丝素的最适反应温度为 $45\sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

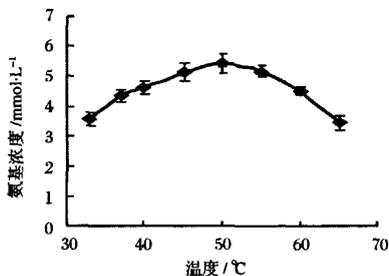


图5 温度对弹性蛋白酶水解丝素的影响

2.2.3 pH 对酶促反应的影响

在反应温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $E/S = 0.5\%$, 加入底物浓度 10 mg/mL , 水解时间 1 h 的条件下, 考察 pH 对弹性蛋白酶水解丝素的影响, 结果如图 6 所示, 不同 pH 条件下, 活性曲线呈现钟罩型变化趋势。在 pH 9.0 的时候, 达到最大值, 认为是其最适作用 pH。而以弹性蛋白为底物时, 弹性蛋白酶的最适作用 pH 是 7.4 (硼酸缓冲液)。不同 pH 下水解丝素的能力相差

较大($P < 0.001$)。当以最适 pH 9.0 时的活性为 100% 计算, 当 pH 7.4 时, 相对活力 79.3% ; 而 pH $8.0\sim 9.4$ 之间的相对酶活力都在 90% 以上。

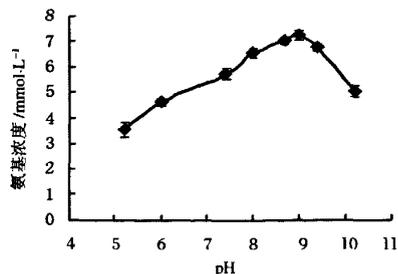


图6 pH 对弹性蛋白酶水解丝素的影响

2.2.4 E/S 对酶促反应的影响

在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 7.4 , 加入的底物浓度 10 mg/mL , 改变 E/S 的比例, 水解 1 h , 考察 E/S 比值对弹性蛋白酶水解丝素的影响, 结果如图 7 所示。在决定酶用量时, 相对于酶浓度而言, 酶-底物比 (E/S) 可以更准确地表征酶反应速率。随着 E/S 升高, 酶反应能力增强($P < 0.01$)。 E/S 值增大到 2% 以后, 再增高 E/S 比值, 氨基浓度提高幅度减缓。酶在弹性蛋白酶与一般酶促反应一样, 催化反应速度主要决定于酶的用量。从成本上考虑, 可以选择 $E/S = 2\%$ 为宜。

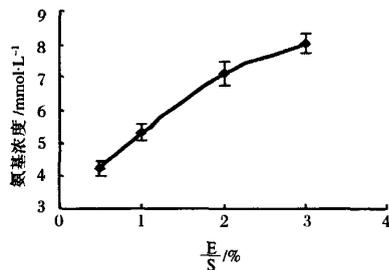


图7 E/S 比值对弹性蛋白酶水解丝素的影响

2.3 酶解产物的相对分子质量分布

弹性蛋白酶催化水解丝素蛋白在 $E/S = 2\%$, 温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 9.0 条件下, 反应时间 4 h 时, 水解度为 15.8% 。酶解物经旋转蒸发仪适度浓缩, 利用高效凝胶过滤色谱法测定其相对分子质量分布, 结果如图 8。图谱分析表明, 水解产物的相对分子质量主要在 1000 以下 (90% 以上), 主要组分的相对分子质量为 565 和 134 , 2 组分所占比例分别为 7.60% 和 81.80% 。其中相对分子质量为 134 的组分所占比例最高。峰 1 和峰 2 的相对分子质量在 $1000\sim 3000$, 共占 5.04% 。在主峰后出现的各个峰的相对分子质量较低, 估计是一些游离的氨基酸, 从峰 5 到峰 10 总

共所占比例为 5.55%。

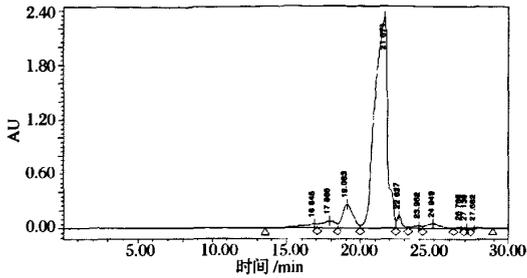


图 8 丝素的弹性蛋白酶酶解物的凝胶过滤图谱

据报道,相对分子质量 $<1\ 000\ u$ 的丝素肽味道可口,可以直接制成胶囊、片剂或作为食品配料添加在普通食品中。采用弹性蛋白酶水解丝素蛋白,控制合适的水解度,得到适宜分子量范围的产品,有利于复合氨基酸、功能性活性肽等的生产和开发。

3 结 论

(1) 弹性蛋白酶对丝素的水解能力最强,其次是 Alcalase,和胰蛋白酶和木瓜蛋白酶。

(2) 弹性蛋白酶水解丝素蛋白的米氏常数 $K_m = 2.473\ \text{mg/mL}$,最大初速度 $V_m = 0.367\ \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$,最适作用温度 $45\sim 55\ ^\circ\text{C}$,最适作用 pH 9.0。

(3) 利用弹性蛋白酶水解丝素蛋白,对水解度为 15.8%的酶解物经高效凝胶过滤色谱法测定其相对分子质量分布,相对分子质量在 $1\ 000\sim 3\ 000$ 的峰,占 5.04%;相对分子质量主要在 $1\ 000$ 以下(90%以上),主要组分的相对分子质量为 565 和 134,2 组分

所占比例分别为 7.60%和 81.80%。

参 考 文 献

- 1 Park K J, Jin H H, Hyun C K. Antigenotoxicity of peptides produced from silk fibroin[J]. Proc Biochem, 2002, 38: 411~418
- 2 倪莉,陶冠军,戴军,等. 血管紧张素转化酶活性抑制剂——丝素肽的分离、纯化和结构鉴定[J]. 色谱, 2001, 19(3):222~225
- 3 Minoura N, Tsukadam M. Physico-chemical properties of silk fibroin membranes as a biomaterial[J]. Biomaterials, 1991, 11: 430~434
- 4 周凤娟,许时婴,杨瑞金,等. Alcalase 水解丝素蛋白的特性[J]. 纺织学报, 2007, 28(5):13~17
- 5 程万里,陈杰,张雨清. 不同蛋白酶对丝素水解作用的比较[J]. 丝绸, 2003, (4):30~32
- 6 孔祥东,朱良均,陶思佳. 丝素蛋白的营养保健作用[J]. 中国食物与营养, 2005, (5):42~43
- 7 He G Q, Xu Y, Chen Q H. Effect of temperature on batch elastase production by *Bacillus* sp. EL 31410[J]. J Zhejiang Univ Sci, 2004, 5(12): 1 583~1 589
- 8 Jens, A-N. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic acid[J]. J Agric Food Chem, 1979, 27(6): 1 256~1 262
- 9 张道藩. 生物化学(第二版)[M]. 北京:北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社,1999
- 10 倪莉,戴军,王璋,等. 酶法水解丝素的研究[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(1):20~23, 28
- 11 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京:高教出版社,1997. 104~105

Properties of Elastase from *Bacillus* sp. EL31410 Hydrolyzing Soluble Silk Fibroin

Xu Ying^{1, 2}, He Guoqing¹

1(Department of Food Science and Nutrition, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

2(School of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

ABSTRACT Using soluble silk fibroin as substrate, the properties of elastase from *Bacillus* sp. EL31410 was investigated and the relative molecular weigh distribution of the hydrolysate was studied by gel filtration chromatography method. The results indicated that the elastase catalyzing on soluble silk fibroin was more powerful than other proteases under tested conditions. The traits of elastase enzymatic action on silk fibroin were defined as the following: K_m was $2.473\ \text{mg/mL}$ and V_m was $0.367\ \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ according to Lineweaver-Burk method. The optimum temperature and the optimum pH were $45\sim 55\ ^\circ\text{C}$ and pH 9.0, respectively. The graph of gel filtration chromatography of fibroin hydrolysate by the elastase indicated that the relative molecular weight distribution profile and its relative molecular weight was lower than 1 000 (above 90%), and its main ingredients were 565 and 134, accounted for 7.60 % and 81.80%, respectively.

Key words *Bacillus* sp. EL31410, elastase, silk fibroin, hydrolysis