

南极磷虾胰蛋白酶的结构分析及适冷性机制研究

周婷婷, 王锡昌, 李燕

(上海海洋大学食品科学与工程学院, 上海 201306)

摘要: 本文基于酶的纯化鉴定、动力学分析、序列比对和结构预测, 对南极磷虾胰蛋白酶的结构及适冷性进行研究, 通过与其他几种适冷、中温胰蛋白酶进行差异性分析, 探讨南极磷虾胰蛋白酶等适冷酶在催化反应过程中应对低温环境的机制。结果显示适冷胰蛋白酶和中温胰蛋白酶的催化中心严格保守, 遵循一致的催化机制; 但南极磷虾胰蛋白酶等适冷酶为了适应低温环境, 各级结构都表现出一定的应对机制: 疏水性残基含量偏高、带正电荷残基含量偏低, 分子内部疏水作用增强、盐桥减少, 这些因素致使适冷胰蛋白酶蛋白质分子内的相互作用减弱, 分子柔性增强。适冷胰蛋白酶具有更高比例的呈松散状的无规卷曲结构, 一定程度提高了其柔性; 底物专一性口袋周围空间位阻更小, 底物更容易接近活性中心, 这也是加快催化反应的关键因素。

关键词: 胰蛋白酶; 适冷性; 酶动力学参数; 南极磷虾; 结构预测

文章编号: 1673-9078(2016)5-27-33

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.5.05

Structure and Cold-adaptation Mechanism of Trypsin Purified from the Krill (*Euphausia superba* Dana, 1852)

ZHOU Ting-ting, WANG Xi-chang, LI Yan

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The molecular characterization of trypsin purified from *Euphausia superba* (Dana, 1852) was investigated in this research. Aspects such as thermodynamic activation parameters, sequence alignment, and molecular model allowed an in-depth understanding of its activity at low temperatures. Conserved residues were compared between cold-adapted trypsin and its warm-adapted counterparts, and the results showed that their active cores were almost identical. Strategies adopted by trypsin for molecular adaptation to low temperatures may be as follows. A higher proportion of hydrophobic residues and lower proportion of charged residues in the enzyme probably diminish the number of intramolecular interactions, resulting in improved structural flexibility. Increased number of loose random coils may also contribute to improve structural flexibility. Reduced steric hindrance is also a key factor that allows the substrate to easily access the active site, thus promoting the catalytic reaction.

Key words: trypsin; cold-adapted; enzyme kinetic parameters; *Euphausia superba*; molecular modeling

南极磷虾生活于南极冰下, 资源丰富, 我国于20世纪80年代中期开始对南极磷虾进行调查和研究, 于2009年开始进行大规模的商业捕捞。南极磷虾生活的水域温度一般维持在-1.7℃至-3℃, 属于嗜冷水性动物, 体内的酶普遍具有适冷性, 在催化反应过程可能遵循着一定的应对低温环境的机制。其体内高效的蛋白质降解酶系统主要分布于南极磷虾的胃和肝脏中, 在较低温度下仍具有活性, 能够迅速降解各种蛋白质,

收稿日期: 2015-05-03

基金项目: 国家高新技术研究发展(863)计划海洋技术领域主题项目(2011AA090801)

作者简介: 周婷婷(1985-), 女, 博士研究生在读, 研究方向: 食品科学与工程

通讯作者: 王锡昌(1964-), 男, 教授, 博士研究生, 研究方向: 食品科学与工程

对复杂蛋白质的降解活性比所有的商品酶均高^[1]; 南极磷虾死亡后, 即使在低温环境保存, 虾体也易于自溶、变质、腐败, 这些现象可能都与南极磷虾体内蛋白酶的适冷性有着密切的关系。胰蛋白酶是甲壳动物体内主要的蛋白酶之一, 能够专一性地切断多肽链中赖氨酸和精氨酸残基羧基端的肽键, Osnes等^[2]的研究表明, 南极磷虾蛋白酶具有的高效催化性, 大约40%来源于胰蛋白酶的作用。

适冷酶通过特殊的应对机制能够在低温环境下保持一定的活性, 相对中温酶表现出了更加优越的催化性能, 已被广泛地应用于食品加工和化工领域。有研究表明适冷酶的某些氨基酸含有比例与其适冷性有着密切的关系; 适冷酶关键氨基酸残基的取代可能会改变其局部区域分子间的作用力, 使分子结构的紧密程度发生变化, 从而影响到其在低温环境中的催化能力

[3]。在本研究中,基于酶的动力学分析、序列比对和二级、三级结构预测,对南极磷虾胰蛋白酶的结构及适冷性进行研究,通过与其他几种适冷、中温胰蛋白酶进行差异性分析,探讨南极磷虾胰蛋白酶等适冷酶在催化反应过程中应对低温环境的机制,以期为其分子修饰及在食品和生物工程等领域的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 原料

南极磷虾(2014年2月捕获于南极渔场48.1区),实验室-80℃低温保藏。

1.2 主要材料及仪器设备

Superdex-75(GE); Sepharose 4B(GE); BApNA(SIGMA-Aldrich); DEAE-Sepharose F. F. 预装柱(GE); 蛋白浓缩管(Millipore); DW-86L626 立式超低温冰箱(海尔集团有限公司); SS250-E 组织捣碎机(方胜电器实业有限公司); 冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂 GL-20G-II); 电泳槽、电泳仪(北京市六一仪器厂); 凝胶成像仪(Bio-Rad 公司); MALDI-TOF/TOF 质谱分析仪(Bruker Corporation)。

1.3 试验方法

1.3.1 酶活及蛋白质含量的测定

酶活的测定以 BApNA 为底物。将 50 μ L 的酶溶液(浓度为 0.1 mM)与 50 μ L 的 10 mM BApNA 溶液(50 mM Tris-HCl, pH 8.07)混合,37℃反应 3 分钟,410 nm 处测定吸光度值,每分钟记录 1 次,即测定产物对硝基苯胺在 1 分钟内的吸光度值变化量。

酶活力单位(U(BApNA Unit))= $\Delta A_{410\text{nm}}/(10^{-6} \times 8800)$

其中 $\Delta A_{410\text{nm}}$ 表示样品 1 分钟吸光度值的变化量。8800 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 表示产物对硝基苯胺的摩尔消光系数。 10^{-6} 表示单位 mol 与 μmol 之间的转换值。

蛋白质含量测定方法参考福林酚法。

1.3.2 纯化和鉴定

由 30~70% 硫酸铵分级沉淀获取的南极磷虾胰蛋白酶粗酶,经 DEAE-sepharose Fast Flow 离子交换层析(1 M NaCl 0~100% 梯度洗脱, pH 8.07, 1.0 mL/min)、Superdex-75 凝胶层析(50 mM Tris-HCl, pH 8.07, 0.8 mL/min)和 Benzamidine Sepharose 4B 亲和层析(50 mM HCl, 0.5 mL/min)进行分离纯化,纯化样品收集保存于 -80℃ 待用,取少量上 SDS-PAGE 凝胶电泳进行纯度检测及分子量测定[4]。

纯化的南极磷虾胰蛋白酶在 SDS-PAGE 凝胶电泳

胶条上显示为一条带,切取并用 50% 乙腈和 100 mM 碳酸氢铵漂洗直至蓝色褪尽。加入 50 μ L DTT 对样品进行还原,加入 100 μ L 乙腈脱水 5~10 min; 加入 50 μ L 碘乙酰胺进行烷基化,以便使酶切位点完全暴露。利用测序级牛胰蛋白酶对处理后的样品进行消化,加入 1% 三氟乙酸(TFA)提取肽片段。取 2 μ L 样品溶液加入 2 μ L 10 mg/mL α -氰基-4-羟基肉桂酸溶液混匀,取上述混合液 1 μ L 点靶。在室温条件下待样品干燥,500~1800 m/z 的条件下进行质谱检测,方法参照 Arvizu-Flores [3]。

1.3.3 动力学分析

在 37℃, pH 8.07 反应条件下,选取浓度范围为 0.05~1.00 mM 的 BApNA 溶液为底物,每增加 0.05 mM 底物浓度平行测定 3 次对应浓度的酶促反应速率,方法参照 1.2.1。基于 Lineweaver-Buck 双倒数法作图得出样品 K_m 和 V_{max} 值,并以此计算 K_{cat} , K_{cat}/K_m 。

1.3.4 序列比对及结构预测

从 NCBI 数据中检索南极磷虾、温热带甲壳动物、寒带鱼类、温热带鱼类胰蛋白酶的由基因序列推测得出的蛋白质一级序列信息,通过 ClustalX 2.0.12、DNAMAN 进行序列比对分析;基于 NCBI-Conserved Domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)对各序列的保守结构域进行分析,即对酶切位点、催化中心的活性位点及底物结合位点进行分析、对比。基于 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)对各序列的氨基酸组成及相应蛋白质的理化参数进行检索、预测;通过 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)对蛋白质的二级结构进行预测并作差异性分析。选取高分值模版,基于 Swiss-Model (<http://www.swissmodel.expasy.org/>)对胰蛋白酶进行建模,通过 Swiss-PdbViewer 软件展示其三维立体结构,并对适冷和中温胰蛋白酶的三维结构进行差异性分析。

1.3.5 数据处理

酶活、蛋白质含量和动力学分析中酶促反应速率的测定每次做三个平行,结果取其平均值,并进行标准偏差分析。不同来源胰蛋白酶的氨基酸比例对比结果是基于 ProtParam 对各胰蛋白酶的氨基酸比例进行自动分析,将获取的值根据胰蛋白酶来源分为适冷酶和中温酶两组,各组数值取其平均值,并进行标准偏差分析。

2 结果与讨论

2.1 纯化与鉴定

经纯化的南极磷虾胰蛋白酶比活力为 300.76±71.73 U/mg, 纯化倍数为 45.02±9.82 倍, 在 SDS-PAGE 凝胶电泳上显示为一条带, 分子量为 31.1 ku。与 Salamanca 等^[5]的研究结果相近, 得到的南极磷虾胰蛋白酶分子量为 30 ku。将纯化的南极磷虾胰蛋白酶电泳条带切割、处理, 进行质谱分析。结果显示, 检测到的两条肽段 IIQHEDYNGFTI (1453.8749 m/z) 和 DAYGQNDVD (1411.9070 m/z) 与 NCBI 数据库中的南极磷虾胰蛋白酶的片段序列 (GenBank accession number: gi|146150468|gb|ABQ02523.1|) 匹配, 如图 1。同时将上述两条肽段与凡纳滨对虾胰蛋白酶序列 (gi|785035|emb|CAA60129.1|) 进行了比对, 只有 DAYGQNDVD 肽段 C 端的两个残基没有得到匹配, 因此可以得出本研究中纯化所得的样品为南极磷虾的胰蛋白酶。

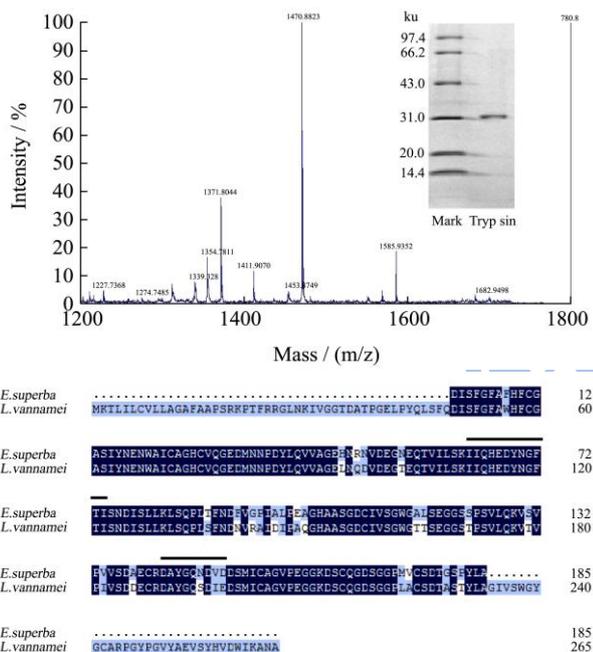


图1 南极磷虾胰蛋白酶质谱分析结果

Fig.1 MALDI-TOF/TOF results for trypsin purified from *E. superba*

2.2 动力学分析

米氏常数 K_m 反应了酶与底物的亲和性, 亲和性越强, K_m 值越小; K_{cat} 反应了酶的活性中心单位时间内转化底物的能力; K_{cat}/K_m 被称为酶的专一性常数 (specificity constant), 是表征底物总体转换为产物的速度常数, 被广泛接受为评价酶的催化能力的指标, 催化能力越强, 参数值越高^[6]。在本研究中, 基于 Lineweaver-Buck 作图法 (图 2) 得到南极磷虾胰蛋白酶的动力学参数, 如表 1 所示。与表 1 中其他甲壳动

物、鱼类和牛的胰蛋白酶的动力学参数进行比较, 发现南极磷虾胰蛋白酶的活性中心单位时间内转化底物的能力与温热带动物胰蛋白酶相比并没有显著的提高, 但在酶活性中心与底物的亲和能力上具有明显优势, 推测南极磷虾胰蛋白酶较高的催化能力可能源于活性中心对底物的亲和能力更强、或是底物在接近活性中心的过程受到的位阻效应更小等原因造成的。

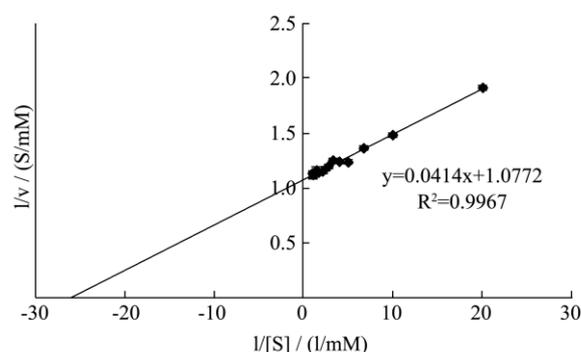


图2 南极磷虾胰蛋白酶 Lineweaver-Buck 图

Fig.2 Lineweaver-Burk plot for trypsin purified from *E. superba*

表 1 不同来源的胰蛋白酶动力学参数比较

Table 1 Comparison of kinetic parameters of trypsins from different species

生活环境	物种	K_{cat} /s ⁻¹	K_m /mM	K_{cat}/K_m /(S ⁻¹ mM ⁻¹)
寒带	北鱒鱼 ^[7]	4.06	0.030	135.33
寒带	大西洋鳕 ^[8]	3.44	0.034	101.18
寒带	远东拟沙丁鱼 ^[3]	5.50	0.13	42.31
寒带	南极磷虾	0.70	0.040	17.50
温带、热带	太平洋蓝鳍金枪鱼 ^[9]	0.91	0.093	9.78
温热、热带	东方扁虾 ^[9]	0.91	0.094	9.68
温带、热带	欧洲鳎 ^[10]	3.20	0.66	4.85
温带、热带	凡纳滨对虾 ^[11]	0.33	0.069	4.78
温带	鳊鱼 ^[12]	0.82	0.22	3.73
温带	牛 ^[13]	0.94	0.26	3.62

注: 底物: BapNA。

2.3 序列比对及结构预测

2.3.1 胰蛋白酶保守区域分析

将由 NCBI 数据库检索得到的南极磷虾及其他物种的胰蛋白酶序列, 根据来源分为适冷酶和中温酶两组, 如表 2, 通过蛋白质序列比对、氨基酸比例分析、二维及三维结构模拟探讨适冷与中温胰蛋白酶分子之间的保守性及差异性。

表2 基于NCBI检索的不同来源的胰蛋白酶序列信息

Table 2 List of sequences for trypsin from different species, as derived from NCBI database

Table with 2 columns: 编号 (Accession Number) and NCBI 检索号 (NCBI Accession Number). Rows include TRY-E1 to TRY-T6, categorized into 适冷酶 (Cold-adapted) and 中温酶 (Mesophilic).

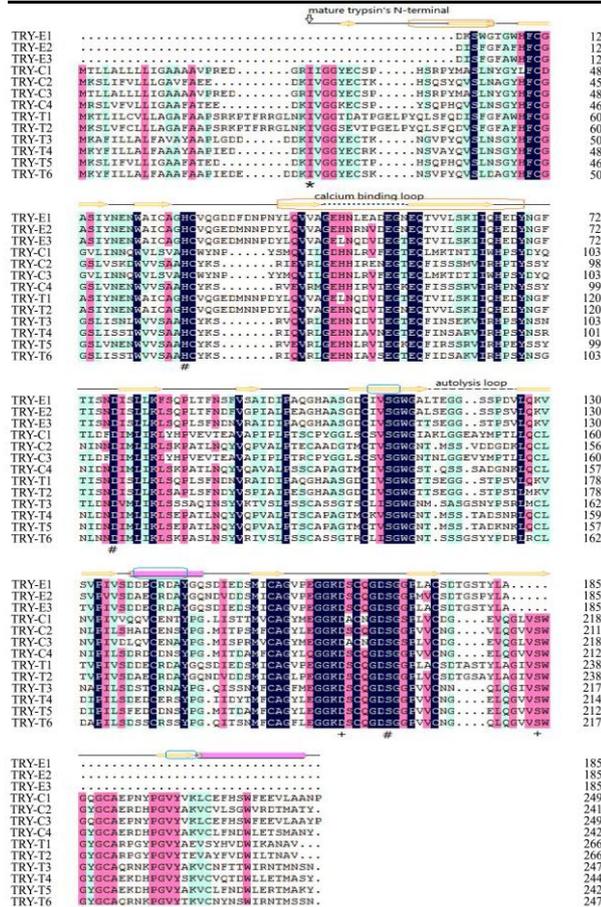


图3 适冷胰蛋白酶和中温胰蛋白酶序列比对示意图

Fig.3 Sequence alignment of trypsin from cold- and warm-adapted species

注: 切割位点(*), 活性位点(#), 底物结合位点(+).

对表2中的胰蛋白酶进行序列对比, 结果如图3所示, 13条比对序列多区域存在保守性(E1、E2、E3序列不完整), 同源性达到74.77%。比对序列的切

割位点(cleavage site)I、催化中心的活性位点(active sites)H-D-S以及底物结合位点(substrate binding sites)D-S-G存在严格的保守性。有研究表明胰蛋白酶的反应是由酶的活性中心优先选择能与底物专一性口袋底部的带负电荷侧链的Asp结合的底物开启的, 而残基侧链具有正电荷的Lys和Arg是被优先与底部Asp结合的残基[14], 这与胰蛋白酶总是专一性酶切Lys和Arg羧基端肽键的现象吻合; 另三联体H-D-S是丝氨酸蛋白酶完成酶切反应所具有的共同催化中心, 遵循一致的催化机制。由此得出适冷胰蛋白酶和中温胰蛋白酶的底物结合位点和遵循的催化机制并无异处。这也印证了Arvizu-Flores等[3]的研究, 即大部分保守性残基与酶的基本功能和特性有着直接的关系。

2.3.2 适冷和中温胰蛋白酶的一级结构差异

针对适冷酶和中温酶的酶催反应速率表现不同, 本研究推测其原因可能如下: 底物对活性中心的可及性可能不同, 即适冷酶底物专一性口袋周围结构可能更松散、空间位阻更小, 更利于反应的进行; 蛋白质柔性可能不同, 即酶的结合位点与底物靠近、结合的过程中, 蛋白质进行异构的能量阈值可能更低, 更利于反应的进行。

在本研究中对适冷和中温胰蛋白酶的疏水性残基、带电残基、芳香族残基和极性残基等所占比例进行对比分析。有研究表明蛋白质中芳香环的相互作用、离子间的相互作用、疏水作用等分子内部的作用力, 直接影响了蛋白结构的稳定性, 稳定性越差, 柔性越强, 而柔韧性降低了酶与底物结合的诱导契合过程中的能量消耗, 使别构调控易于实现[15]。疏水性残基与水接触的过程会引起蛋白构象的不稳定[14], 由表3可

得, 适冷酶的疏水性残基比例为 $38.48 \pm 4.04\%$, 相对中温酶 $35.87 \pm 2.42\%$ 明显偏高; 利用 ProtParam 对各胰蛋白酶进行疏水性打分, 结果显示适冷酶的疏水性分值偏高, 推测其可能更趋于不稳定, 柔性更好。蛋白质中盐桥虽少, 但对蛋白质的结构稳定起到显著作用^[14], 对比结果显示适冷胰蛋白酶较中温酶胰蛋白酶所含的正电荷残基和负电荷残基比例偏低, 即形成盐

桥的概率更小, 分子内部的作用相对更小, 即整个蛋白分子可能具有更强的柔性。结果印证了 Stefansson 等^[8]的观点, 即酶的热适应性主要取决于影响多肽链结构稳定性的氨基酸残基。本研究结果显示芳香族残基在适冷胰蛋白酶中的含量反而更高, 推测芳香环的相互作用可能不是影响蛋白柔性的关键因素。

表 3 不同来源胰蛋白酶的氨基酸比例对比结果

Table 3 Proportions of amino acids in trypsins from different species

	TRY -E1	TRY -C1	TRY -C2	TRY -C3	TRY -C4	TRY -T1	TRY -T2	TRY -T3	TRY -T4	TRY -T5	TRY -T6
HR%	35.7	43.1	35.7	42.7	35.2	37.9	39.0	33.6	35.8	36.2	32.7
均值			38.48 ± 4.04					35.87 ± 2.42			
GRAVY	-0.247	0.110	-0.154	0.029	-0.263	-0.146	-0.039	-0.204	-0.182	-0.271	-0.219
均值			-0.105 ± 0.167					-0.177 ± 0.079			
PR%	52.4	46.6	53.7	46.7	54.8	50.2	48.9	56.0	54.7	54.3	56.5
均值			50.84 ± 3.92					53.43 ± 3.14			
NCR%	9.4	9.2	9.5	9.7	9.1	13.5	12.7	5.4	10.0	10.9	5.8
均值			9.38 ± 0.24					9.72 ± 3.43			
PCR%	5.9	5.7	9.9	6.7	10.0	5.5	4.6	8.5	9.1	10.5	9.9
均值			7.64 ± 2.14					8.02 ± 2.41			
AR %	8.1	11.4	8.6	12.3	8.6	8.8	9.7	8.5	8.6	9.1	9.0
均值			9.80 ± 1.91					8.95 ± 0.43			

注: HR, 疏水性残基 (Hydrophobic Residues, 包括 A, I, L, V, F, W, P, M); GRAVY, 平均亲水性 (Grand Average of Hydro-pathicity); PR, 极性残基 (Polar Residues, 包括 S, T, N, Q, Y, C, D, E, H, K, R); NCR, 带负电荷残基 (Negatively Charged Residues, 包括 D, E); PCR, 带正电荷残基 (Positively Charged Residues, 包括 H, K, R); AR, 芳香族残基 (Aromatic Residues, 包括 Y, F, W)。

2.3.3 适冷和中温胰蛋白酶的二级结构差异

对表 2 中的胰蛋白酶进行二级结构预测, 结果如图 3 所示。各序列的折叠、螺旋、无规则卷曲结构及特殊位点分布基本相似, 个别折叠和卷曲在某些位点有前移现象, 在图中用黄色框标记。对适冷和中温胰蛋白酶分两组进行二级结构差异性分析, 发现适冷胰蛋白酶某些位点的折叠和螺旋结构较中温胰蛋白酶更短, 在图中用蓝色框标记显示。推测适冷胰蛋白酶可能具有更高比例的呈松散状的无规则卷曲结构, 一定程度提高了胰蛋白酶的柔韧性或可塑性, 与底物有效结合过程能量消耗更低, 与结构更加紧密的中温酶相比显示出更强的催化能力。这也印证了 Siddiqui 等^[16]的研究, 即同源酶结构的不同之处大部分分布在酶的表面和环区, 结构的灵活性可能源于接触溶剂的特定区域更松散、分子内部之间的作用力更小的原因, 此结论也在远东拟沙丁鱼胰蛋白酶适冷性的研究中得到印证^[3]。

2.3.4 适冷和中温胰蛋白酶的三级结构差异

选取南极磷虾胰蛋白酶 (TRY-E1) 和凡纳滨对虾

胰蛋白酶 (TRY-T1), 分别以 2f9l.1.A 和 4bnr.1.A 为模板进行三维结构建模, 结果如图 4 和图 5 所示。在本研究中检索获取的南极磷虾胰蛋白酶序列不完整, 但基本可以显示催化三联体的位置及周围残基的分布情况。结果显示两种胰蛋白酶的蛋白核心区和活性中心结构一致; 分子内部为稳定的由螺旋和折叠元件组成的紧密性较高的疏水核心区, 环区则大部分分布在分子表面。有研究表明, 水溶性球状蛋白质分子折叠的主要驱动力是将疏水侧链包裹到分子内部, 而主链在配合完成这一过程中将 C=O 和 NH 形成氢键中和亲水性, 即形成了具有规则的螺旋或是折叠; 环区则大部分分布在分子表面, 与水分子形成氢键^[14,17]。对两种胰蛋白酶三维结构进行差异性分析, 发现凡纳滨对虾胰蛋白酶的活性中心被一个无规则卷曲包裹在口袋中, 活性中心趋于口袋的底部, 而南极磷虾胰蛋白酶的活性中心相对邻近口袋口部, 底物在接近后者活性中心的过程可能受到的空间位阻更小, 即溶液对于活性中心的可及性更强。有研究表明, 底物与酶结合部位、催化部位邻近时有严格的定向和正确的立体化学

排列,空间位阻变小也可提高底物在活性部位的有效浓度,对分子轨道交叉提供了有利条件,使底物进入过渡态时的熵变负值减小,反应活化能降低,从而增加了酶和底物中间产物进入过渡态的几率^[14,17],这个理论在 Lian 等^[18]对适冷性病原菌的研究中得到了验证;因此,适冷胰蛋白酶活性中心周围空间位阻的减小对加速酶促反应不仅在立体化学上具有直接意义,即增强了溶液对于核心区的可及性,并体现在酶催反应的动力学意义上,即减小了底物熵变负值,降低了反应活化能。为了进一步验证上述理论,另选取适冷酶北鳕(TRY-C2)的胰蛋白酶和中温酶鳊鱼(TRY-T6)的胰蛋白,分别以 1utk.1.A 和 1tgs.1.A 为模板进行建模比对,结果如图 6 和图 7 所示。结果显示,两种胰蛋白酶活性中心周围的结构差异非常明显,北鳕胰蛋白酶活性中心呈暴露状态,底物在接近活性中心的过程不受空间阻效应的影响;而鳊鱼胰蛋白酶活性中心的上方明显多了一个折叠结构,与突出的底物结合位点形成一个腔体,活性三联体 H₆₄-D₁₀₈-S₂₀₁ 被包埋在腔体中,致使酶催反应速率受到影响。通过对两组胰蛋白酶的三维结构对比分析,得到较低的空间位阻效应是加快适冷胰蛋白酶反应速率的关键因素。

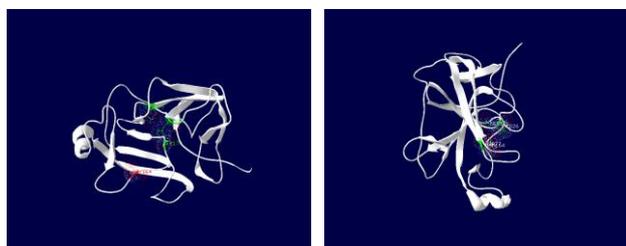


图 4 以 2f91.1.A 为模版预测的南极磷虾胰蛋白酶的三维结构模型(部分)

Fig.4 Ribbon representation of the theoretical model of trypsin from *E. superba*, with 2f91.1.A as a template (partial)

注:活性位点 H₂₆-D₇₇-S₁₇₀ (绿色)、底物结合位点 D1₆₄ (红色)。

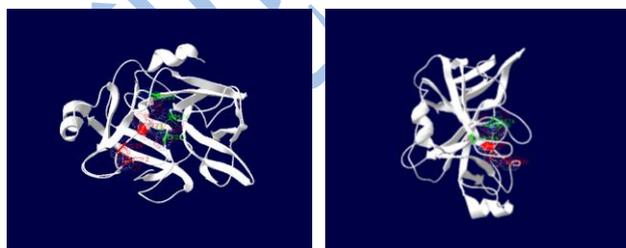


图 5 以 4bnr.1.A 为模版预测的凡纳滨对虾胰蛋白酶的三维结构模型

Fig.5 Ribbon representation of the theoretical model of the trypsin from *Litopenaeus vannamei* with 4bnr.1.A as template

注:活性位点 H74-D125-S218 (绿色)、底物结合位点 D212-S237-G239 (红色)。

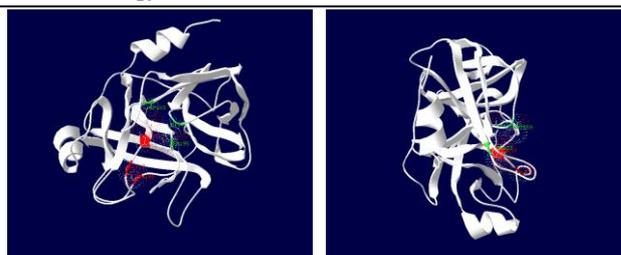


图 6 以 1utk.1.A 为模版预测的北鳕胰蛋白酶的三维结构模型

Fig.6 Ribbon representation of the theoretical model of trypsin from *Boreogadus saida*, with 1utk.1.A as a template

注:活性位点 H59-D103-S195 (绿色)、底物结合位点

D189-S210-G212 (红色)。



图 7 以 1tgs.1.A 模版预测的鳊鱼胰蛋白酶的三维结构模型

Fig.7 Ribbon representation of the theoretical model of trypsin from *Siniperca chuatsi*, with 1utk.1.A as a template

注:活性位点 H64-D108-S201 (绿色)、底物结合位点

D195-S216-G218 (红色)。

3 结论

3.1 对纯化得到的南极磷虾胰蛋白酶进行动力学分析, K_{cat} 值,即活性中心单位时间内转化底物的能力与温热带动物胰蛋白酶相比并没有显著的提高,但其 K_m 值偏低,即活性中心与底物的亲和能力相对具有明显优势,推测南极磷虾胰蛋白酶较高的催化能力可能源于活性中心对底物更强的亲和能力、或是底物在接近活性中心的过程受到的空间位阻效应更小。

3.2 对南极磷虾及其他几种适冷和中温性胰蛋白酶的序列进行比对分析和结构预测,得到适冷胰蛋白酶在低温环境保持一定的催化作用,各级结构都表现出一定的应对机制。氨基酸残基的比例不同导致分子内部作用力不同,适冷胰蛋白酶分子内部盐桥减少、疏水作用增强使蛋白质分子间、分子内的相互作用减弱,分子柔韧性增强;具有更高比例的呈松散状的无规卷曲结构,也一定程度提高了适冷酶的柔性,致使酶活性中心与底物结合的过程中,诱导契合能量消耗更小,别构调控更易于实现。从胰蛋白酶空间结构分析,南极磷虾胰蛋白酶等适冷酶底物专一性口袋周围结构更松散、空间位阻更小更利于反应的进行;空间位阻变小可能导致酶的活性中心周围底物的有效浓度得到提高,对分子轨道交叉提供了有利条件,反应活化能降

低,从而增加了酶和底物中间产物进入过渡态的几率,提高催化效率。

3.3 通过对南极磷虾胰蛋白酶及其他适冷、中温胰蛋白酶的差异性分析,探讨了适冷酶在催化反应过程中应对低温环境的机制,以期为南极磷虾胰蛋白酶等适冷性酶的位点突变、酶活调控奠定一定的理论基础,以便更好地应用在食品、生物工程等领域。

参考文献

- [1] 孙松,严小军.南极磷虾的生物活性物质及其用途研究进展[J].极地研究,2001,13(3):213-216
SUN Song, YAN Xiao-jun. Active substances in the antarctic krill [J]. Chinese Journal of Polar Research, 2001, 13(3): 2013-2016
- [2] Osnes K K, Mohr V. Peptide hydrolases of antarctic krill, *Euphausia superba* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology, 1985, 82(4): 599-606
- [3] Arvizu-Flores A A, Quintero-Reyes E I, Felix-Lopez M, et al. Thermodynamic activation and structural analysis of trypsin I from monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) [J]. Food Chemistry, 2012, 133(3):898-904
- [4] Silva F J, Espósito S T, Marcuschi M, et al. Purification and partial characterization of a trypsin from the processing Waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*) [J]. Food Chemistry, 2011, 129(3): 777-782
- [5] Salamanca M H, Barria C, Asenjo J A, et al. Isolation, purification and preliminary characterization of cryophilic proteases of marine origin [J]. Bioseparation, 2001, 10(45): 237-241
- [6] Sigtryggisdóttir R A, Papaleo E, Sigrður H, et al. Flexibility of cold- and heat-adapted subtilisin-like serine proteinases evaluated with fluorescence quenching and molecular dynamics [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2014, 1844(4): 705-712
- [7] Toyota E, Iyaguchi D, Sekizaki H, et al. Kinetic properties of three isoforms of trypsin isolated from the pyloric caeca of chum salmon [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2007, 30(9): 1648-1652
- [8] Stefansson B, Helgadóttir L, Olafsdóttir S, et al. Characterization of cold-adapted atlantic cod (*Gadus morhua*) trypsin I-kinetic parameters, autolysis and thermal stability [J]. Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 155(2): 186-194
- [9] Johnston D, Hermans J M, Yellowlees D. Isolation and characterization of a trypsin from the slipper lobster, *Thenus orientalis* (Lund) [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1995, 324: 5-40
- [10] Martinez A, Olsen R L, Serra J L. Purification and characterization of two trypsin-like enzymes from the digestive tract of anchovy *Engraulis encrasicolus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 1988, 91: 677-684
- [11] 翁凌,李腾,阴利华,等.南美白对虾丝氨酸蛋白酶的分离纯化及性质研究[J].集美大学学报:自然科学版, 2010, 15(4):32-38
WENG Ling, LI Teng, YIN Li-hua, et al. Purification and characterization of serine proteinase from pacific white shrimp [J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2010, 15(4): 32-38
- [12] 卢宝驹.鳊鱼胰蛋白酶分离纯化性质鉴定及分子克隆 [D].厦门:集美大学,2008
LU Bao-ju. Purification, characterization and molecular cloning of trypsins from mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [D]. Xiamen: Jimei University, 2008
- [13] Sekizaki H, Itoh K, Murakami M, et al. Anionic trypsin from chum salmon activity with p-amidinophenyl ester and comparison with bovine and streptomyces griseus trypsins [J]. Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 127: 337-346
- [14] Branden C, Tooze J.蛋白质结构导论(王克夷等译)[M].上海:上海科学技术出版社,2007
Branden C, Tooze J. Introduction to Protein Structure (Second Edition) (Translated by Wang K. et al) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2007
- [15] Papaleo E, Renzetti G, Invernizzi G, et al. Dynamics fingerprint and inherent asymmetric flexibility of a cold-adapted homodimeric enzyme. a case study of the vibrio alkaline phosphatase [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2013, 1830(4): 2970-2980
- [16] Siddiqui K S, Cavicchioli R. Cold-adapted enzymes [J]. Annual Review of Biochemistry, 2006, 75: 403-433
- [17] Petsko A G, Ringe D. 蛋白质结构与功能(葛晓春等译)[M].北京:科学出版社,2009
Petsko A G, Ringe D. Protein structure and function (Translated by Ge X. et al) [M]. Beijing: Science Press, 2009
- [18] Lian K, Leiros S H, Moe E. MutT from the fish pathogen *Aliivibrio salmonicida* is a cold-active nucleotide-pool sanitization enzyme with unexpectedly high thermo-stability [J]. FEBS Open Bio., 2015, 5: 107-116

现代食品科技