

降解大豆胰蛋白酶抑制剂的短小芽孢杆菌菌株及其胞外蛋白的鉴定

刘家维, 黄昆仑, 梁志宏

(中国农业大学北京食品营养与人类健康高精尖创新中心, 食品科学与营养工程学院, 北京 100048)

摘要: 本研究以大豆胰蛋白酶抑制剂为唯一碳源, 从豆类内部筛选获得 3 株具有降解大豆胰蛋白酶抑制剂的细菌。通过对菌株的 16S rDNA 基因的分析, 3 株细菌分别被鉴定为枯草芽孢杆菌 LZ013-1、短小芽孢杆菌 LZ013-2 和类芽孢杆菌 LZ013-3。进一步研究发现 LZ013-2 菌株的上清液具有高效降解大豆胰蛋白酶抑制剂的活性, 2 h 可将胰蛋白酶抑制剂抑制率降低 73.60%。将 LZ013-1 和 LZ013-2 菌株应用于豆粕发酵中, 两株芽孢杆菌均能高效降解胰蛋白酶抑制剂。原始豆粕的胰蛋白酶抑制剂活性为 22.26 mg/g, 经过 LZ013-1 和 LZ013-2 菌株的液态发酵后分别降低为 0.50 mg/g 和 0.63 mg/g, 经过固态发酵后分别降低为 1.06 mg/g 和 1.03 mg/g。通过硫酸铵分级沉淀和凝胶柱层析, 分离 LZ013-2 菌株发酵上清液中具有降解活性的蛋白质, 并采用质谱鉴定分离得到的蛋白质, 筛选并鉴定出 2 种活性蛋白, 分别为肽酶 S8 (Uniprot ID: A0A2T0DB16) 和肽酶 M84 (Uniprot ID: A8FIH7)。

关键词: 大豆胰蛋白酶抑制剂; 芽孢杆菌; 筛选; 纯化

文章编号: 1673-9078(2020)02-129-136

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.2.019

Identification of Soybean Trypsin Inhibitor-degrading *Bacillus pumilus* Strains and Their Extracellular Proteins

LIU Jia-wei, HUANG Kun-lun, LIANG Zhi-hong

(Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100048, China)

Abstract: Soybean trypsin inhibitor (STI) was used as the sole carbon source, three strains of bacteria capable of degrading soybean trypsin inhibitors were isolated from the interior of soybeans. The 16S rDNA sequence analysis revealed that the strains were *Bacillus subtilis* LZ013-1, *Bacillus pumilus* LZ013-2 and *Paenibacillus* sp. 013-3. Further studies showed that the supernatant of LZ013-2 exhibited a high activity for degrading soybean trypsin inhibitors, and the rate of trypsin inhibitor inhibition was reduced by 73.60% in 2 h. LZ013-1 and LZ013-2 were used in the fermentation of soybean meal, and were found to degrade trypsin inhibitors efficiently. The trypsin inhibitor activity of the untreated soybean meal was 22.26 mg/g, which was reduced to 0.50 mg/g and 0.63 mg/g, respectively, after liquid fermentation with LZ013-1 and LZ013-2 strains, and decreased to 1.06 mg/g and 1.03 mg/g, respectively, after solid-state fermentation with LZ013-1 and LZ013-2 strains. The proteins with degrading activity were separated from the supernatant of the sample obtained via fermentation with LZ013-2 strain by ammonium sulfate fractionation and gel column chromatography. The separated proteins were identified by mass spectrometry. Two kinds of active proteins were screened and identified as peptidase S8 (Uniprot ID: A0A2T0DB16) and peptidase M84 (Uniprot ID: A8FIH7).

Key words: soybean trypsin inhibitor; *bacillus* spp; screen; purification

大豆 (学名: *Glycine max* (Linn.) Merr.) 通称黄豆, 原产于中国。大豆中含有丰富营养成分, 包括优质蛋白质、脂肪、无机盐、亚油酸、维生素 E 和卵磷脂等多种有效生理活性成分。大豆和豆粕中同样存在

收稿日期: 2019-07-15

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1600901)

作者简介: 刘家维 (1993-), 男, 硕士, 研究方向: 食品微生物

通讯作者: 梁志宏 (1969-) 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物

许多对蛋白质的营养质量产生负面影响的组分, 这些降低大豆营养价值的组分统称为抗营养因子 (Antinutritional factors, ANFs)^[1]。大豆中胰蛋白酶抑制剂 (Soybean trypsin inhibitor, STI) 是大豆中的主要抗营养因子, 大豆是蛋白酶抑制剂含量最高的豆类之一, 约占豆粕的 2% 或大豆蛋白的 2%~6%^[2,3]。

Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂 (Kunitz-type trypsin inhibitor, KTI) 是大豆中的主要抑制剂类型, 在大豆

中含量约为 1.6%，属于丝氨酸蛋白酶抑制剂家族^[4]。

KTI 相对分子质量为 21 ku，与胰蛋白酶的结合位点是 Arg63 和 Ile64，能够专一对胰蛋白酶产生抑制的抑制活性中心环能够插入到蛋白酶的活性中心，该分子以化学计量的方式与胰蛋白酶结合，即一分子的抑制剂使一分子胰蛋白酶失活^[5,6]。形成的复合物类似于酶-底物复合物，由于抑制剂与酶的非常紧密的结合，抑制剂与酶反应的米氏常数很低，并且酶对抑制剂的反应位点的肽键并不能作用，故该复合物与通常易于解离成产物和酶的酶-底物复合物不同，不会明显解离，十分稳定^[3,7]。

研究表明，用生豆粕喂养动物会引发胰腺肥大的反应，这种现象是由于 STI 结合胰蛋白酶，降低了小肠中胰酶水平，引起了肠壁中激素胆囊收缩素（Cho-lecystokinin, CCK）的过量产生，导致胰腺肥大增生，进而引发生长抑制^[8-10]。因此，生大豆不能用作人类食物或动物饲料，只有经过一定加工，将 STI 等抗营养因子进行失活或降解，改善大豆蛋白质量，才能作为食品原料或商业化食品而食用。目前对于 STI 失活主要包括物理失活，化学失活以及生物降解三类方法，已达到降低胰蛋白酶抑制剂活性（Trypsin inhibitor activity, TIA）的目的^[11]。其中，生物法降解 STI，具有绿色环保，安全高效，操作简单等优点，同时对大豆中的其他抗营养因子同样具有不同程度的降解作用，对营养吸收率及消化率也有提高作用^[12-15]。

本研究通过唯一碳源法筛选豆类内部具有降解大豆胰蛋白酶抑制剂的细菌，将其应用于豆粕发酵中；并通过硫酸铵分级沉淀，凝胶柱层析等方法，分离上清液具有降解活性的短小芽孢杆菌 LZ013-2 的活性蛋白，并使用质谱法对分离得到的蛋白进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与培养基

大豆、赤小豆、红豆，原产地黑龙江伊春；KTI 标准品（T9128）、胰蛋白酶、N α -苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基酰胺盐酸盐（N α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride, L-BAPA）购买自 Sigma-Aldrich 公司；胰蛋白胨、酵母提取物，购买自北京奥博星生物技术有限公司；细菌基因组 DNA 提取试剂盒购买自全式金生物技术有限公司。

筛选培养基：磷酸二氢钾 0.025%，硝酸铵 0.1%，七水合硫酸镁 0.025%，硫酸亚铁 0.0001%，琼脂 2%，pH 调节至 7.0，121 °C 灭菌 20 min。取出后温度降至 65 °C 左右时，向培养基中补充 KTI 标准品至终浓度为

0.5 mg/mL。

LB 培养基：胰蛋白胨 1%，酵母浸粉 0.5%，氯化钠 1%，调节 pH 至 7.0，固体培养基加入 2% 琼脂，LB-KTI 在灭菌后温度降低 65 °C 左右时，加入 KTI 标准品，终浓度为 0.5 mg/mL。

1.2 仪器与设备

低温高速离心机，美国 Beckman 公司；pH 计，美国 Orion 公司；JB5374-91 电子天平，常熟市金羊砝码仪器有限公司；台式离心机，德国 Eppendorf 公司；CC-K6 恒温水浴锅，德国 Huber 公司；HZQ-X160 恒温震荡培养箱，江苏太仓市实验设备厂；超净工作台，北京半导体设备一厂；灭菌锅，日本 SANYO 公司；紫外可见分光光度计。

1.3 方法

1.3.1 降解 KTI 活性菌株的筛选

1.3.1.1 发酵过程降解 KTI 菌株的筛选

取 1 g 豆子样品（大豆、红豆、赤小豆）用 75% 乙醇溶液清洗表面，待乙醇挥发后，用 10% 次氯酸钠溶液清洗表面，并擦干表面。将豆子样品用进过乙醇擦洗的研钵捣碎，悬浮在 10 mL 生理盐水溶液中，震荡 1 min。取 100 μ L 菌悬液梯度稀释，涂布到筛选培养基，培养 48 h。取在筛选培养基上生长的形态不同的单菌落划线至 LB 固体培养基，培养 24 h；将划线后的单菌落接种至 10 mL LB-KTI 培养基中进行传代培养，在 37 °C 下培养 48 h；取 1 mL 发酵液，4 °C，8000 r/min 离心 10 min；使用聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析上清液的残留 KTI 含量。

1.3.1.2 发酵上清液降解 KTI 能力验证

挑取发酵过程中 KTI 降解的活性菌株单菌落加入到 10 mL LB 液体培养基中，37 °C 培养 48 h。取 1 mL 发酵菌液于 1.5 mL 离心管中，4 °C 8000 r/min 离心 10 min，保留上清液。使用 SDS-PAGE 验证 KTI 残留情况，使用比色法测定 KTI 抑制率变化。

1.3.2 降解 KTI 活性菌株的鉴定

使用全式金细菌基因组 DNA 提取试剂盒，参照试剂盒所附的说明书进行操作。使用 16S rDNA 保守区域序列构建引物（F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3', R: 5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'），PCR 扩增采用 25 μ L 反应体系，包括：10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L、dNTP Mixture（10 mM each）2 μ L、上游引物 F（10 μ mol/L）1 μ L、下游引物 R（10 μ mol/L）1 μ L、细菌基因组 DNA 2 μ L、rTaq 酶 0.2 μ L、无菌双蒸水 16.3 μ L。混匀瞬时离心后，按如下 PCR

条件进行扩增反应: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s; 55 °C 退火 1 min; 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 然后 72 °C 完全延伸 7 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。将 PCR 产物送北京睿博兴科生物技术有限公司测序分析, 测序结果与测序序列在美国国家生物技术信息中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI) 中使用 BLAST 程序比对^[16,17], 与 Genbank 数据库现有基因序列进行同源性比较分析, 并利用 MEGA 7.0 进行系统发育树的构建。

1.3.3 芽孢杆菌发酵豆粕研究

1.3.3.1 原始豆粕的制备

使用粉碎机将大豆粉碎, 过 40 目筛除去为粉碎杂质, 取 100 g 豆粉置于烧杯中, 加入 200 mL 正己烷, 搅拌均匀; 倒出上清液, 在通风橱内烘干。加入正己烷脱脂 3 次, 烘干后存放于 4 °C 冰箱备用。

1.3.3.2 豆粕的液态发酵

取 10 g 豆粕置于锥形瓶中, 添加 100 mL 蒸馏水, 100 °C 灭菌 30 min。冷却后以 2% 接种量接种芽孢杆菌, 在 37 °C, 160 r/min 摇床培养 48 h。培养后发酵液在 4 °C, 10000 r/min 条件下离心 10 min, 保留上清液测定 TIA。

1.3.3.3 豆粕的固态发酵

取 30 g 豆粕置于锥形瓶中, 添加 30 mL 蒸馏水, 100 °C 灭菌 30 min。冷却后以 10% 接种量接种芽孢杆菌, 在 37 °C, 160 r/min 摇床培养 48 h。培养后取 1 g 豆粕加入 100 mL pH=8.2 的 Tris-HCl, 震荡均匀, 4 °C 静置 12 h。静置后在 4 °C, 8000 r/min 条件下离心 10 min, 保留上清液测定 TIA。

1.3.4 比色法测定胰蛋白酶抑制剂抑制率及活性

根据国家标准《大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性的测定》(GB 5009.224-2016) 测定大豆中胰蛋白酶抑制剂的抑制率 (i) 及 TIA 值。

1.3.5 硫酸铵分级沉淀 *B. pumilus* LZ013-2 的发酵上清液

在固体琼脂平板上挑取 *B. pumilus* LZ013-2 单菌落与 LB 液体培养基中, 37 °C, 180 r/min 培养 48 h; 将发酵液在 4 °C, 8000×g 离心 10 min, 保留上清液; 在磁力搅拌器上不断搅拌, 分别缓慢加入硫酸铵固体, 至溶液硫酸铵终浓度为 20%、40%、60%、80% 和 100%。置于 4 °C 环境下静置 4 h 以上, 在 4 °C, 10000 r/min 离心 20 min, 用 0.02 mol/L pH=8.0 的 Tris-HCl 重悬沉淀, 过 0.22 μm 滤膜除去杂质; 向各沉淀重悬组分加入溶于 0.05 mol/L, pH=8.2 的 Tris-HCl 的 KTI, 使 KTI 终浓度为 1 mg/mL, 在 37 °C 水浴 2 h; 分别将对

照组和实验组置于 90 °C 水浴 10 min, 使上清液蛋白失活, 使用比色法测定 KTI 抑制率变化。

1.3.6 沉淀活性组分凝胶柱分离纯化

使用丙烯葡聚糖凝胶 Sephacryl S-300 HR 对硫酸铵沉淀组分进行分离和纯化, 获得目的蛋白。使用 0.02 mol/L pH=8.0 Tris-HCl 以 1.0 mL/min 速度冲洗柱子 3 h, 吸取样品, 并用少量蒸馏水冲洗原来盛样品的容器 2~3 次, 待全部进入层析柱后, 即可进行洗脱; 使用 0.02 mol/L pH=8.0 Tris-HCl 以 0.6 mL/min 速度洗脱柱子, 洗脱液的收集采用分管连续顺序收集, 每管收集 3.0 mL, 共收集 60 管, 持续 5 h。使用 10 ku 的超滤管将洗脱峰对应的离心管溶液进行超滤, 并与等体积 2 mg/mL 的 KTI 溶液混和, 在 37 °C 水浴 2 h, 用 SDS-PAGE 验证各洗脱峰降解效果。

1.3.7 质谱分析活性组分

将具有降解 KTI 能力的上清液及收集到经过凝胶柱纯化后的具有降解能力的组分送至上海中科新生命生物技术有限公司进行质谱分析。

1.3.8 数据分析

试验数据用 SPSS 19.0 统计软件处理, 组间比较采用单因素 ANOVA 分析, 两两比较采用 t 检验, 以 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义, 所得结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。本试验均设 3 组平行。

2 结果与分析

2.1 降解 KTI 活性菌株的筛选

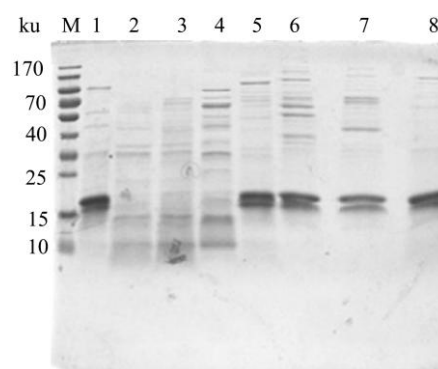


图 1 筛选菌株发酵液 KTI 降解的蛋白凝胶电泳图

Fig.1 protein gel electrophoresis of KTI degradation in fermentation broth

注: 1: KTI 标准品; 2、3、4、5、6、7、8: 筛选菌株的发酵液上清。

使用添加 KTI 作为唯一碳源的无机培养基对红豆、赤小豆、大豆内生菌株进行筛选, 经过 48 h 培养, 得到 7 株形态不同菌株, 均来源于赤小豆。将这 7 株菌株接种到 LB-KTI 培养基中筛选验证, 通过聚丙烯

酰胺凝胶电 (SDS-PAGE) 验证 KTI 残留量, 发现 3 株菌株具有高效降解 KTI 活性, 结果如图 1 所示。发现 2、3、4 泳道中的 KTI 条带几乎被完全降解, 同时无明显的降解产物, 对这 3 株菌分别命名为 LZ013-1、LZ013-2 和 LZ013-3。而 5、6、7、8 泳道上的 KTI 仍清晰可见, 可以表明这 4 种细菌对 KTI 无明显的降解效果。

将上述 3 株发酵液 KTI 出现降解的菌株的上清液, 与 KTI 标准品混合孵育 2 h 降解情况如图 2。图 2A 表明菌株 LZ013-1 的发酵上清液有部分降解活性, 但在 20 ku 处仍存在 KTI 条带; LZ013-2 的发酵上清液具有高效降解 KTI 的活性, 20 ku 处的 KTI 蛋白印记完全消失, 并产生了 13 ku 左右及某些更小分子量的降解产物; LZ013-3 的上清液无降解 KTI 能力。图 2B 通过比色法测定了 LZ013-2 上清液与 KTI 混合后的抑制率变化情况, 表明发现经过 LZ013-2 上清液处理的 KTI 抑制率降低 73.60%, 表明 LZ013-2 上清液中存在高效活性物质, 能够将 KTI 降解为较小分子的肽端, 并破坏 KTI 活性, 使得其无法与胰蛋白酶形成复合物, 从而无法抑制胰蛋白酶的活性。

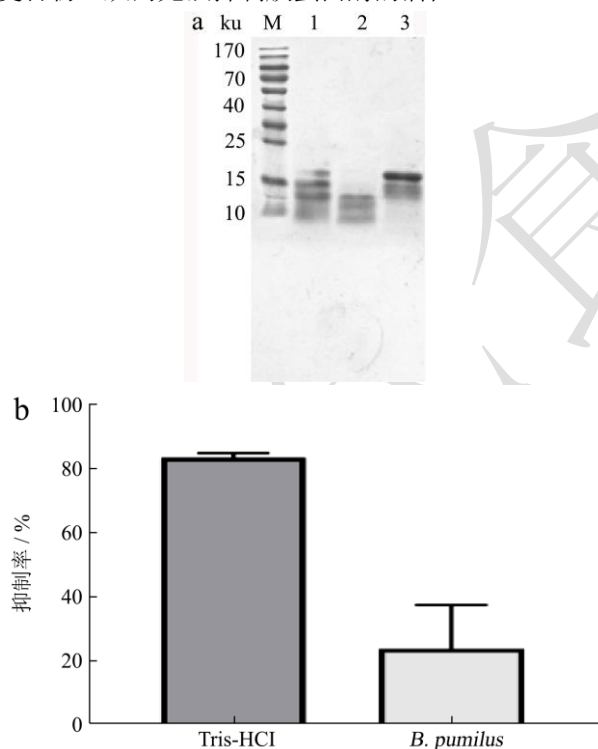


图 2 上清液降解 KTI 活性的 (a) SDS-PAGE 及 (b) 比色法验证
Fig.2 Superficial degradation of KTI activity by (a) SDS-PAGE and (b) colorimetric verification

注: 1: LZ013-1; 2: LZ013-2; 3: LZ013-3。

2.2 降解 KTI 菌株的 16S rDNA 鉴定

利用分子生物学方法鉴定 LZ013-1、LZ013-2 和

LZ013-3, 基因组 DNA 在 15000 bp 左右, 16S rDNA 条带处在 1400 bp 左右。将测序结果与 NCBI Genbank 数据库已有数据比对, 并上传至 Genbank 数据库。测序结果显示, LZ013-1 含有 1430 bp, 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), NCBI 登录号为 MK 368723; LZ013-2 含有 1425 bp 碱基, 为短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*), NCBI 登录号为; MK368722; LZ013-3 含有 1431 bp 碱基, 与 *PaeniBacillus* sp. TSWCW18 相似度为 99%, 为类芽孢杆菌属 (*PaeniBacillus* sp.), NCBI 登录号为 MK368724。通过分子生物学的方法测定了三种细菌的 16S rDNA, 得到了得到了 *B. subtilis* LZ013-1、*B. pumilus* LZ013-2 和 *PaeniBacillus* sp. LZ013-3 三株菌的种属信息, 为后面的降解研究建立基础。

本研究筛选得到的 3 种细菌中, *B. subtilis* 和 *B. pumilus* 被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 认定为通常安全菌种 (Generally Regarded As Safe, GRAS), 并被允许添加到动物饲料中^[18]。农业农村部在 2013 年发布公告(第 1126 号)的《饲料添加剂品种目录》中, 允许添加在养殖动物中的芽孢杆菌属包括地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短小芽孢杆菌。*B. subtilis* LZ013-1、*B. pumilus* LZ013-2 均在饲料添加范围内。

2.3 芽孢杆菌发酵豆粕研究

分别使用两株芽孢杆菌 *B. subtilis* LZ013-1, *B. pumilus* LZ013-2 对经过灭菌的豆粕进行发酵, 包括固态发酵及液态发酵两种方法, 同时对未经过灭菌的豆粕进行液态发酵。通过 L-BAPA 比色法测定抑制剂的残留情况, 以未发酵的豆粕作为对照, 结果如表 1。通过计算 STI 活性 TIA 发现, 未经 100 °C 灭菌 30min 的豆粕在经过 LZ013-1 和 LZ013-2 发酵 48h 后, TIA 分别降低为 0.66 mg/g, 1.51 mg/g, 表明在降解未做加热处理的豆粉时, *B. subtilis* LZ013-1 具有更强的降解能力。豆粕在液态发酵前经过 100 °C 灭菌 30 min 后, TIA 降低为 2.08 mg/g, 经过 LZ013-1 和 LZ013-2 液态发酵 48 h 后, TIA 分别降低为 0.50 mg/g 和 0.64 mg/g, LZ013-1 发酵后 TIA 低于 LZ013-2, 但无显著差异。固态发酵豆粕在 100 °C 灭菌 30 min 后, TIA 降低为 1.85 mg/g, 经过 LZ013-1 和 LZ013-2 固态发酵 48 h 后, TIA 分别降低为 1.06 mg/g 和 1.03 mg/g, 两者发酵 TIA 降低至相同水平, 无显著差异。

由于 STI 在加热状态下是不稳定的^[19], 前期的灭菌作用会对 STI 的结构与生物功能具有破坏作用, 而对于未经加热的生豆粉, TIA 较高, 若作为动物饲

料, 会严重影响动物生长^[1,20]。本节研究也表明, 不论是否进行灭菌处理, 两种芽孢杆菌对豆粉进行发酵均可以将 TIA 降低至很低水平, 而相比较而言, *B. subtilis* LZ013-1 的发酵豆粕降解 STI 的能力要略强于 *B. pumilus* LZ013-2。

表 1 不同处理豆粕 TIA 变化情况

Table 1 Changes in TIA of different processed soybean meal

处理方法	TIA/(mg/g)	
原始豆粕	22.26±0.41	
液态发酵 (未灭菌)	CK (未灭菌豆粕)	22.26±0.41
	<i>B. subtilis</i> LZ013-1	0.66±0.11
	<i>B. pumilus</i> LZ013-2	1.51±0.08
液态发酵 (灭菌)	CK (灭菌豆粕)	2.07±0.01
	<i>B. subtilis</i> LZ013-1	0.50±0.06
	<i>B. pumilus</i> LZ013-2	0.63±0.01
固态发酵 (灭菌)	CK (灭菌豆粕)	1.85±0.08
	<i>B. subtilis</i> LZ013-1	1.06±0.15
	<i>B. pumilus</i> LZ013-2	1.03±0.10

2.4 液态发酵豆粕可溶蛋白分子量分析

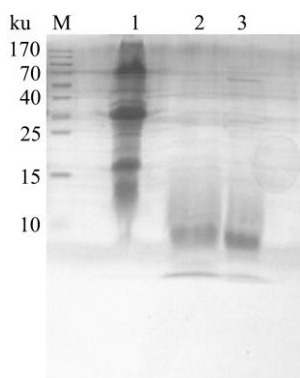


图 3 液态发酵 48 h 大豆蛋白分子量变化分析

Fig.3 Analysis of molecular weight change of soy protein in liquid fermentation for 48 h

注: 1: 大豆蛋白; 2: LZ013-1 发酵 48 h 后大豆蛋白; 3: LZ013-2 发酵 48 h 后大豆蛋白。

通过 SDS-PAGE 分析经过 LZ013-1, LZ013-2 菌株发酵后的豆粕可溶蛋白的分子量变化, 如图 4~5。可发现大豆蛋白在 100 ku 内各个分子量梯度蛋白量均较多, 通过两株芽孢杆菌发酵后, 可以将 15 ku 以上的大部分蛋白分解为低于 10 ku 的小分子量肽段, 仅有少部分条带残留, 其中, 处于 20 ku 处的 KTI 在 CK 组 (条带 1) 存在十分明显的条带, 而在实验组 (条带 2,3) 中, 抑制剂的条带几乎完全消失, 表明了 KTI 已经被降解为小分子量肽段。Yang 等^[21]使用 *B. amyloliquefaciens* SWJS22 通过凝胶排阻色谱测定液态发酵 48 h 后的豆粕分子量, 发现分子主要集中在

1~3 ku, 而大于 10 ku 的蛋白几乎完全被降解, 表明豆粕中大分子量蛋白能够被芽孢杆菌中的蛋白酶和肽酶降解为小分子量肽段, 应用与饲料中也更容易被吸收。

2.5 硫酸铵分级沉淀 *B. pumilus* LZ013-2 上清液

通过 0~20%、20%~40%、40%~60%、60%~80% 硫酸铵分级沉淀 *B. pumilus* LZ013-2 的发酵上清液, 并用各个沉淀组分降解 KTI, 通过比色法验证降解活性, 结果如图 4。发现 20%~40% 硫酸铵沉淀组分具有降解 KTI 的活性, 表明 20%~40% 沉淀活性蛋白与 KTI 互作后, 使 KTI 活性降低。表明该组分有 1 种或多种的蛋白酶或肽酶具有降解 KTI 能力。

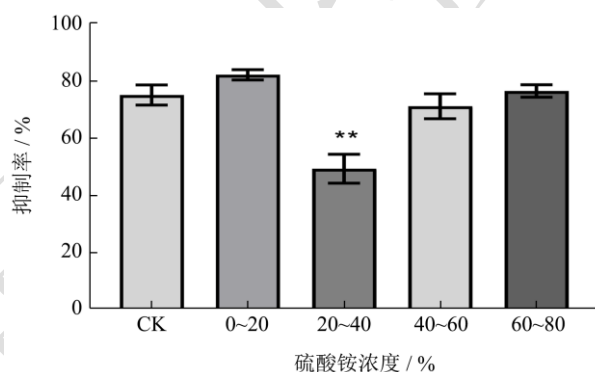


图 4 硫酸铵分级沉淀组分降解 KTI 活性

Fig.4 Degradation of KTI activity by ammonium sulfate fractionation

2.6 凝胶柱分离硫酸铵沉淀组分

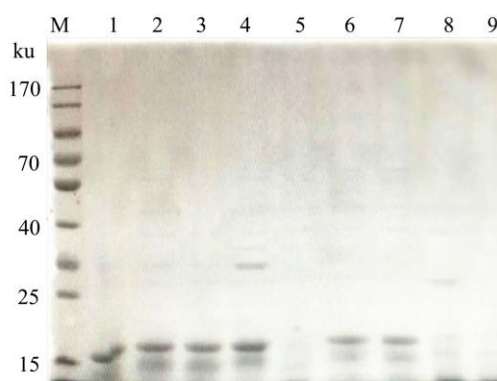


图 5 凝胶柱分离硫酸铵沉淀蛋白活性验证结果

Fig.5 Verification of the activity of ammonium sulfate precipitated protein by gel column separation

注: 1: KTI 标准品; 2、3: 20~30 min 洗脱液; 4、5: 55~65 min 洗脱液; 6、7: 90~100 min 洗脱液; 8、9: 150~160 min 洗脱液。

使用丙烯葡聚糖凝胶 Sephacryl S-300 HR 对硫酸铵沉淀组分进行分离和纯化, 共在 20~25 min、

55~60 min、90~95 min、150~160 min 出现 4 个吸收峰。取吸收峰对应的及下一个离心管的收集液，使用 10 ku 超滤管超滤并加入 KTI，SDS-PAGE 结果如图 5。5、8、9 号泳道中的洗脱液具有降解 KTI 的能

力，表明 55~60 min 和 150~160 min 两个峰具有降解 KTI 活性。

2.7 质谱鉴定

表 2 *B. pumilus* LZ013-2 发酵上清液质谱鉴定肽酶和蛋白酶信息

Table 2 *B. pumilus* LZ013-2 fermentation supernatant mass spectrometry identification of peptidase and protease information

蛋白分类	蛋白质 ID (Uniprot)	肽段数	唯一肽段数	肽段覆盖率/%	分子量/ku	蛋白质表达量强度值×10 ⁵
Peptidase S8	A0A0H1RRS9	7	7	22.7	38.92	2670.70
	A0A0H1RU97	19	2	29.8	86.37	456.77
	A0A2G8IXS1	2	2	3.5	58.71	3.77
	A0A2P1F1W0	1	1	1.1	96.55	1.04
	A0A0H1S1G4	19	5	17.5	156.96	566.66
	A0A2P1F3R9	4	1	20.4	39.51	185.98
	A0A2P1F592	14	1	12.3	157.36	54.16
	A0A2P1FB89	19	0	27.8	86.49	3724.60
	A0A2T0CD24	10	1	9.9	126.68	119.81
	B9VNT4	7	1	31.9	39.31	13875.00
Peptidase M14	A0A0H1RWD1	11	2	18.2	60.52	566.94
	A0A2T0C565	10	0	17.5	60.40	9.77
	W8QKT1	11	0	19.8	60.61	110.82
Peptidase M28	A0A0H1RUD8	3	3	7.6	39.19	23.66
	A0A0H1RY19	7	1	27.3	39.40	196.92
	A0A2A5IT51	6	0	21.8	39.40	17.21
Peptidase M42	A0A2T0CBE6	4	1	13.5	38.61	22.87
Peptidase M84	A0A2P1FB40	3	3	12.2	29.20	6140.2
Peptidase S41	A0A2A5IV94	1	1	1.5	50.37	19.15
cytosol aminopeptidase	A0A0H1RW24	6	6	13.1	54.18	64.30
D-aminopeptidase	A0A0H1RWG5	1	1	4	30.25	26.18
Peptidase T	A0A0H1RY15	3	3	7.6	45.73	13.59
Gamma-glutamyltranspeptidase	A0A0H1S1F9	27	2	46.5	63.17	12293.00
Oligopeptidase	A0A0H1S9E4	2	2	4.1	79.70	13.93
cysteine protease	A0A0H1RSL3	2	2	10.9	19.24	10.65
Protease	A0A0H1RU67	12	4	17	87.29	361.84
Serine protease	A0A0H1RVX9	6	6	27.2	32.32	4586.40
Major intracellular serine protease	A0A1Q9B866	3	1	11.9	33.99	9.537
Minor extracellular protease	A0A1Q9BDT2	15	2	20.9	86.70	642.41
Protease	A0A2G8IU99	11	1	15.3	87.29	135.42
Serine protease	A0A2P1F4N7	6	4	26.3	34.00	105.45
Protease	A8FJ07	10	1	13.4	87.45	51.37
Alkaline serine protease	B9VNT4	7	1	31.9	39.31	13875.00
Keratinase	D9IXA7	7	1	33.9	39.44	29846.00

通过对 *B. pumilus* LZ013-2 上清液进行质谱鉴定，共鉴定出 3824 种肽段，通过 Uniprot 数据库对蛋白质进行检索，共检索出 346 种蛋白质，结合 GO 分

析对蛋白质功能进行注释，共有 273 种蛋白质进行了注释。

结合 Uniprot 数据库命名的蛋白质与 GO 分析的

蛋白注释, 筛选出注释含有肽酶 (Peptidase) 和蛋白酶 (Protease) 的蛋白质。蛋白质表达量强度值是指基于 iBAQ 算法得到的样品 X 中的蛋白质表达量强度值, 近似等于该样品中的蛋白质绝对浓度。其中蛋白表达量较高的肽酶主要有: 肽酶 S8 和肽酶 M84, 通过对分类中各肽酶家族进行 GO 聚类分析, 发现肽酶 S8 是一类丝氨酸蛋白酶, 肽酶 M84 具有金属蛋白酶的活性; 蛋白酶主要有丝氨酸蛋白酶、碱性丝氨酸蛋白酶以及角蛋白酶, 通过对分类中蛋白酶家族进行 GO 聚类分析, 发现角蛋白酶同样属于丝氨酸蛋白酶类。结合质谱结果与 GO 分析注释, 发现 *B. pumilus* LZ013-2 发酵上清液中的肽酶、蛋白酶大部分具有丝氨酸蛋白酶, 主要包括肽酶 S8 家族、丝氨酸蛋白酶和角蛋白酶类; 小部分为金属蛋白酶活性, 主要蛋白为肽酶 M84 家族蛋白。有关 *B. pumilus* LZ013-2 发酵

上清液具体蛋白质 ID (Uniprot)、鉴定肽段数、鉴定唯一肽段数、鉴定肽段覆盖率 (%)、蛋白分子量 (ku)、蛋白质表达量强度值等信息见表 2。

对 2.6 中凝胶柱层析后分离纯化得到的具有降解 KTI 能力的 3 个组分进行质谱分析, 主要蛋白质谱结果如表 3。其中泳道 5 洗脱液主要肽酶/蛋白酶为肽酶 S8 (Uniprot ID: A0A2T0DB16)、小胞外蛋白酶 (Uniprot ID: A0A1Q9BDT2), 而该种蛋白酶与肽酶具有 94.06% 的相似度, 是同源蛋白质, 故该洗脱峰主要肽酶为肽酶 S8, 该结果的肽酶/蛋白酶也是 20%~40% 硫酸铵沉淀组分中的主要肽酶/蛋白酶, 具体质谱鉴定结果肽酶/蛋白酶种类及表达量强度见附表 4。8、9 号泳道主要肽酶均为肽酶 M84 (Uniprot ID: A8FIH7), 表明该肽酶为该吸收峰主要肽酶, 为活性蛋白, 明确降解 KTI 的能力的酶。

表 3 *B. pumilus* LZ013-2 发酵上清液凝胶柱层析得到具有降解活性组分质谱分析

Table 3 *B. pumilus* LZ013-2 fermentation supernatant mass spectrometry identification of degradation active components obtained by gel column chromatography

蛋白分类	蛋白质 ID	60~65 min 蛋白质 表达量强度值 ($\times 10^5$)	150~155 min 蛋白质 表达量强度值 ($\times 10^5$)	155~160 min 蛋白质 表达量强度值 ($\times 10^5$)
A0A2T0DB16	Peptidase S8	3372.10	74.32	980.28
A8FIH7	Peptidase M84	599.03	2799.00	1997.00
A0A0H1S1G4	Peptidase S8	771.06	10.12	207.56
A0A0H1RWD1	Peptidase M14	606.47	695.27	296.07
A0A2P1F325	Peptidase M14	401.71	404.23	176.66
A0A2T0CD24	Peptidase S8	310.47	3.43	89.16
A0A0H1RU97	Peptidase S8	260.44	5.74	146.04
A0A2A5IZ35	Peptidase M14	217.28	216.36	87.15
A0A2G8IVL3	Peptidase M28	174.63	0.54	181.25
A0A2T0CG82	M42 family peptidase	56.92	0.26	29.01

肽酶 S8 (Peptidase S8, Uniprot ID 登录号: A0A2T0DB16) NCBI 登录号为: WP_106035723.1, 小胞外蛋白酶 (Minor extracellular protease vpr, Uniprot ID: A0A1Q9BDT2) NCBI 登录号为: OLP66896.1, 这 2 种蛋白均为枯草杆菌蛋白酶 (Subtilisin, EC 3.4.21.62), GO 注释为一种具有丝氨酸型肽链内切酶活性 (serine-type endopeptidase activity, GO:0004252)。该蛋白由 808 个氨基酸组成, 其中 1-30 位氨基酸为信号肽区域, 57-143 位氨基酸为一段抑制结构域 (Inhibitor_I9), 该结构域负责调节前酶或酶原的折叠和活性。前段对接到保护底物结合位点的酶部分, 从而促进酶的抑制。180-590 位氨基酸为肽酶 S8 超家族结构域 (Peptidases_S8_subtilisin_Vpr-like)。该酶的活性位点为: Asp189, His233 和 Ser534。而目前唯一报道通过筛选方法发现的具有具有降解 KTI 活性的蛋白

酶是来源于 *B. subtilis* CFR5 的一种钙离子依赖的枯草杆菌蛋白酶 (NCBI 登录号: ARF02373.1), 该蛋白酶在 219-483 位点同样含有肽酶 S8 结构域, 表明了肽酶 S8 结构域具有降解 KTI 的潜在能力^[22]。

肽酶 M84 (Uniprot ID: A8FIH7) NCBI 登录号为: WP_012011602.1, GO 注释为金属羧肽酶活性 (metallocarboxypeptidase activity, GO:0004181)。该蛋白由 270 个氨基酸组成, 其中 1~23 位氨基酸为信号肽区域, 101-254 位为 Reprolysin_5 结构域, 具有一个锌离子结合位点。

3 结论

3.1 通过以 KTI 为唯一碳源的方法分离得到 3 株豆类内生菌寻找具有降解 STI 活性的菌株, 经鉴定分别为 *B. subtilis* LZ013-1、*B. pumilus* LZ013-2 以及

PaeniBacillus sp. LZ013-3。通过进一步的研究发现 *B. pumilus* LZ013-2 的上清液具有高效降解 KTI 的活性, 2 h 可将 KTI 抑制率降低 73.60%。

3.2 以 LZ013-1, LZ013-2 为菌种发酵, 发现经过 LZ013-1、LZ013-2 液态发酵后豆粕 TIA 分别降低为 0.50 mg/g、0.63 mg/g, 固态发酵后豆粕 TIA 降低为 1.0 mg/g 左右。表明这两种菌株在固态及液态豆粕发酵中降解 STI 的能力, 同时可以将大豆中大分子量蛋白水解成小分子量肽段。

3.3 对上清液具有降解 KTI 活性的 *B. pumilus* LZ013-2 分泌蛋白质进行鉴定及纯化分析, 发现 20%~40% 硫酸铵沉淀组分具有降解活性, 通过凝胶柱层析获得具有降解能力的洗脱组分。经过质谱鉴定发现主要的肽酶/蛋白酶为肽酶 S8 (Uniprot ID: A0A2T0DB16) 以及肽酶 M84 (Uniprot ID: A8FIH7), 是具有明确降解 KTI 的能力的酶。

参考文献

- [1] Liener I E. Implications of antinutritional components in soybean foods [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1994, 34(1): 31-67
- [2] 金蓓, 田少君. 大豆胰蛋白酶抑制剂研究概况[J]. *粮食与油脂*, 2005, 6: 3-6
JIN Bei, TIAN Shao-jun. Research survey in soybean trypsin inhibitor [J]. *Cereals & Oils*, 2005, 6: 3-6
- [3] 王荣春, 孙建华, 何述栋, 等. 胰蛋白酶抑制剂的结构与功能研究进展[J]. *食品科学*, 2013, 34(9): 364-368
WANG Rong-chun, SUN Jian-hua, HE Shu-dong, et al. Recent advance in research on the structure and function of trypsin inhibitor [J]. *Food Science*, 2013, 34(9): 364-368
- [4] 罗玉娇, 李滨, 舒衡平, 等. Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂的研究进展[J]. *中国生化药物杂志*, 2012, 33(3): 316-319
LUO Yu-jiao, LI Bin, SHU Heng-ping, et al. Research advances in Kunitz trypsin inhibitor [J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2012, 33(3): 316-319
- [5] Ozawa K, Laskowski J M. The reactive site of trypsin inhibitors [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1966, 17(241): 3955-3961
- [6] Bode W, Huber R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1992, 204(2): 433-451
- [7] Pouvreau L, Chobert J M, Briand L, et al. Effect of pea and bovine trypsin inhibitors on wild-type and modified trypsins [J]. *FEBS Letters*, 1998, 423(2): 167-172
- [8] Green G M, Lyman R L. Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for trypsin inhibitor-induced hypersecretion in rats [J]. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1972, 140(1): 6
- [9] Calam J, Bojarski J C, Springer C J. Raw soybean flour increases cholecystokinin release in man [J]. *British Journal of Nutrition*, 1987, 58(2): 175-179
- [10] Isanga J, Zhang G N. Soybean bioactive components and their implications to health: A review [J]. *Food Reviews International*, 2(24): 252-276
- [11] Vagadia B H, Vanga S K, Raghavan V. Inactivation methods of soybean trypsin inhibitor: A review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 64: 115-125
- [12] Chi C, Cho S. Improvement of bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with *Bacillus amyloliquefaciens* versus *Lactobacillus* spp. and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2016, 68: 619-625
- [13] Zheng L, Li D, Li Z L, et al. Effects of *Bacillus* fermentation on the protein microstructure and anti-nutritional factors of soybean meal [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2017, 65: 520-526
- [14] Seo S, Cho S. Changes in allergenic and antinutritional protein profiles of soybean meal during solid-state fermentation with *Bacillus subtilis* [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 70: 208-212
- [15] 吴非, 李红梅. 生物法失活大豆胰蛋白酶抑制剂的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2008, 6: 1-5
WU Fei, LI Hong-mei. Study on inactivating trypsin inhibitor by biological methods [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2008, 6: 1-5
- [16] Mount D W. Using the basic local alignment search tool (BLAST) [J]. *CSH Protocols*, 2007, 17
- [17] Altschul S F, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215(3): 403-410
- [18] Schallmeyer M, Singh A, Ward O P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2003, 50: 1-17
- [19] Roychoudhuri R, Sarath G, Zeece M, et al. Reversible denaturation of the soybean Kunitz trypsin inhibitor [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, 412(1): 20-26

(下转第 84 页)