

# 不同蛋白酶突变子对鲢鱼蛋白 酶解及产物抗氧化性的影响

田宝玉, 郑汉坤, 黄薇, 蓝灿华, 黄建忠, 蔡婉玲, 郭菁

(福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心, 生命科学学院, 福建福州 350108)

**摘要:** 本实验采用芽孢杆菌丝氨酸蛋白酶及其突变产物对淡水鱼类白鲢鱼肉蛋白进行酶解, 对比分析了酶的不同突变产物对水解过程水解度的影响及其酶解产物的抗氧化活性变化。大部分蛋白酶在水解反应前40 min内反应速率较高, 水解度迅速增加, 40 min~120 min之间水解曲线变得平缓甚至下降。其中细菌丝氨酸蛋白酶突变子239对白鲢鱼肉蛋白的水解能力最强, 其2 h水解产物水解度最大, 为11.51%; 突变蛋白酶33的水解能力最差, 最终水解产物的水解度只有3.08%。细菌丝氨酸蛋白酶及其突变酶的酶解产物均具有较高的抗氧化性, 其中蛋白酶突变子166的酶解产物抗氧化活性最强, 经测定其DPPH清除能力为91.02%, 蛋白酶突变子169的酶解产物抗氧化活性最弱, DPPH清除能力为61.41%。结果表明, 与三联体催化活性中心相关的突变对丝氨酸蛋白酶的水解能力和水产品蛋白的水解度影响较大, 而酶底物特异性方面的改变则影响酶解产物的抗氧化活性。

**关键词:** 酶工程; 白鲢鱼蛋白; 水解度; 酶解产物; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2012)10-1336-1339

## Effect of Bacterial Serine Protease Mutants on Antioxidant Properties of Enzymatic Hydrolyzed Fish Protein

TIAN Bao-yu, ZHENG Han-kun, HUANG Wei, LAN Can-hua, HUANG Jian-zhong, CAI Wan-ling, GUO Jing  
(Engineering Research Center of Industrial Microbiology of Ministry of Education, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China)

**Abstract:** In this study, hydrolysis ability of bacterial serine protease and its mutants on silver carp protein was analyzed and antioxidant activities of protein hydrolysates were evaluated. Majority of the proteases in the hydrolysis reaction within the first 40 min was severe and the degree of hydrolysis increased rapidly. Then hydrolysis curves become flat or even decline from 40 min to 120 min. Bacterial serine protease mutant 239 showed the strongest hydrolysis ability on silver carp fish protein, which the maximum hydrolysis degree was 11.51% after 2 hours, whereas mutant 33 showed less degree of hydrolysis with only final 3.08%. The results showed that the bacterial serine protease and its mutant enzymes have high antioxidant activity. Protein hydrolysates of silver carp protein from mutant 166 have a strongest antioxidant activity by the DPPH scavenging was 91.02% with weak 61.41% DPPH scavenging ability for protease mutant 169. The result indicated that mutant in the domain related to active center will change the hydrolysis ability of protease. The mutant in substrate specificity domains will affect antioxidant activity of protein hydrolysates.

**Key words:** protein engineering; silver carp protein; degree of hydrolysis; protein hydrolysates; antioxidant activity

水产品蛋白酶解产物含有丰富的生物活性肽、氨基酸、牛磺酸以及高度不饱和脂肪酸等保健成分, 由于其较高的营养价值和功能特性, 近年来被广泛应用于饲料、食品加工、医药化工等各个领域<sup>[1-3]</sup>。国内已有报道利用蛋白酶对水产品及其加工过程中产生的下脚料进行水解来生产高附加值的产品, 如利用蛋白酶

收稿日期: 2012-06-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(30800735); 福建省自然科学基金项目(2009J06014)

通讯作者: 田宝玉(1973-), 男, 副教授, 主要从事微生物酶学研究

水解水产蛋白生产生物活性肽、鱼露、鱼鳔胶等<sup>[4-6]</sup>。

在生物体生命活动的氧化代谢过程中, 会不断地产生各种自由基。这些自由基可以攻击细胞膜、线粒体膜, 与膜中的不饱和脂肪酸反应, 破坏膜结构的完整性而引起各种疾病, 如扩张性心肌病、老年性白内障、哮喘、衰老等<sup>[7]</sup>。因而具有清除自由基能力的保健食品受到人们的重视, 而各种各样的天然抗氧化物质更是得到国内外学者的研究和推崇, 其中利用蛋白质多肽作为自由基清除剂是当前的研究热点之一<sup>[8]</sup>。

肽类的结构特点和性质决定了其为蛋白质类物质

中最有前途的抗氧化物质, 通过蛋白质的可控酶解技术制备天然的抗氧化肽将能很好地解决以上需求。近来, 关于蛋白酶解物抗氧化性的研究已有许多, 如来源于水产品的鲑鱼鱼皮、沙丁鱼副产物、罗非鱼、黄斑纹鱼、大马哈鱼等<sup>[9,10]</sup>。但是不同的蛋白酶由于酶切作用方式及酶切位点的不同, 获得的酶解产物中肽段的分子量大小和游离氨基酸的组成上也不同。通常细菌蛋白酶的酶解产物分子量小于 2500 Da 的肽段较多, 而来自动物(猪、鳕鱼)胰脏的蛋白酶酶解产物中分子量较大的肽段较多<sup>[9,11]</sup>。不同蛋白酶酶切得到的酶解多肽产物的活性成分和营养特性存在明显差异, 而且活性肽成分通常比例很低, 活性不高, 例如蛋白酶解产物的抗氧化活性远不如人工合成的抗氧化剂 BHA 等等。因此在蛋白水解获得活性肽的工艺中, 合适工具蛋白酶的选择对于蛋白资源酶解产物的营养价值非常重要。另外, 酶的水解效率也在很大程度上影响水产品蛋白加工的经济效益。

本文拟在前期通过蛋白质工程对蛋白酶进行分子改造的基础上, 以白鲢鱼肉蛋白为材料, 对比分析细菌丝氨酸蛋白酶不同位点的氨基酸残基突变对蛋白酶水解能力及其产物活性的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

白鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*), 购于福州闽侯县上街镇永辉超市, 新鲜。细菌丝氨酸蛋白酶(原液), 突变酶166, 突变酶169, 突变酶159, 突变酶239, 突变酶33, 突变酶1012均来自本实验室。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 原材料的预处理

(1) 将买来的新鲜白鲢鱼去头尾、内脏, 清洗干净, 去皮、去骨、去红肉, 然后采白肉;

(2) 加适量水, 将鱼肉绞碎成绞肉(以匀浆糜状为最佳);

(3) 将鱼绞肉用10 mL离心管分装, 每个离心管分装5 g, 置于-20 °C冰箱内保存备用。

#### 1.2.2 酶解液的制备及酶解条件

(1) 将鱼绞肉加水制成一定的底物浓度, 并在涡流震荡器中混匀, 用切去枪尖的1 mL移液枪将混合物从10 mL离心管中转移至100 mL锥形瓶中;

(2) 用3 mol/L NaOH调节至pH8, 按顺序在8个锥形瓶中分别加入5000 U细菌丝氨酸蛋白酶原液、突变酶166、突变酶169、突变酶159、突变酶239、突变酶33、突变酶1012及水(阴性对照), 混匀, 放入60 °C水浴摇床中水解;

(3) 分别在酶解 20 min、40 min、60 min、80 min、100 min、120 min 时取样, 酶解液置于 85 °C水浴锅中灭活 10 min 终止反应。取出的酶解液 8000 r/min 离心 5 min, 上清液及时置 4 冰箱保存。收集的样品用于水解度和 DPPH 自由基清除能力, 即抗氧化性的测定。

#### 1.2.3 OPA 法测水解度<sup>[12,13]</sup>

##### 1.2.3.1 试剂配制

A. OPA 试剂(现配现用)。

A1: 完全溶解7.620 g四硼酸钠和200 mg十二烷基硫酸钠SDS至150 mL蒸馏水中;

A2: 溶解 160 mg 97% 邻苯二甲醛OPA至4 mL乙醇中, 将溶解后的 OPA 溶液移至 A1中;

A3: 向A1中加入176 mg 99% DTT;

A4: 用蒸馏水定容至200 mL;

B. 丝氨酸标准液: 将50 mg丝氨酸加入到500 mL去离子水中。

C. 样品溶液: 溶解X g样品至100 mL去离子水中(0.1~1.0 g样品含蛋白约为80~8%)。

##### 1.2.3.2 操作步骤

A. 标准品检测: 400  $\mu$ L serine standard加入3 mL OPA试剂, 反应2 min, 340 nm处测定吸光度。测4次标准样结果取4次数据的平均值;(Standard OD $\approx$ 0.8)

B. 空白检测: 400  $\mu$ L蒸馏水加入3 mL OPA试剂, 反应2 min, 340 nm处测定吸光度。测4次空白样, 结果取4次数据的平均值;(Blank OD $\approx$ 0.07)

C. 样品检测: 400  $\mu$ L水解液加入3 mL OPA试剂, 反应2 min, 340 nm处测定吸光度。3个平行样, 取3次结果的平均值。

水解度(DH)的计算根据文献描述方法计算<sup>[12]</sup>。

#### 1.2.4 DPPH 自由基清除能力的测定<sup>[14,15]</sup>

表 1 DPPH 试验加样表

Table 1 The method of DPPH addition

No.	DPPH 添加量
A1	2 mL DPPH- 无水甲醇液+2 mL 无水甲醇液
A2	2 mL DPPH- 无水甲醇液+2 mL 样品溶液
A3	2 mL 样品溶液+2 mL 无水甲醇液

准确称取 DPPH 标准样 2.56 mg, 用无水甲醇定容至 100 mL 量瓶中, 使终浓度为  $6.5 \times 10^{-2}$  mol/L。利用 DPPH 的溶液特征紫红色团的吸收峰, 用分光光度计测白鲢蛋白质提取液在波长 517nm 处后吸收值的降低表示其对有机自由基消除能力。按下表 2 添加反应液, 用力摇匀, 将 A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 所表示的样品在室温黑暗处静置 30 min 后, 加入比色皿中进行吸光度的测定, 测出 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub> 所表示样品的吸光度值, 清除率按下面的公式计算:

$$SA(\%) = [1 - (A_2 - A_3) / A_1] \times 100$$

## 2 结果与分析

### 2.1 突变酶对鲢鱼蛋白的水解

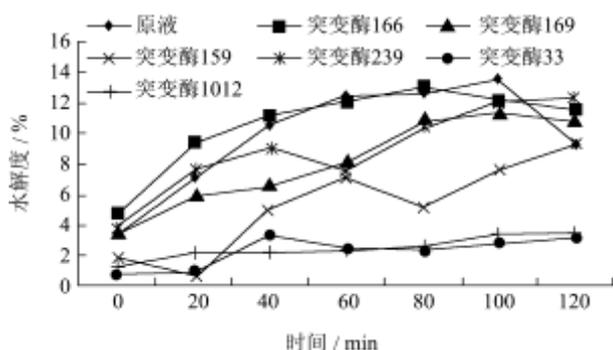


图1 蛋白酶不同突变产物水解白鲢鱼肉蛋白的水解度曲线

Fig.1 Degree of hydrolysis curves of silver carp protein by using different protease mutants

如图1所示,不同的蛋白酶的水解度曲线基本保持一致的趋势,水解度随着时间的进行逐渐增加,反应的前80 min反应比较剧烈,水解度增加比较快。随后,反应趋于缓慢,水解曲线变得平缓,一般在2 h左右水解度的变化相对变小,或者略有下降。这说明各蛋白酶在反应开始的时候水解效率很高,随着反应的进行,酶活力慢慢下降,水解效率变低。因此利用蛋白酶水解鱼肉蛋白时,从时间上考虑一般采用80 min左右就可能充分发挥酶的作用。

从单个突变蛋白酶对水产品蛋白的水解效率上来看,在2 h反应结束后,细菌丝氨酸突变239蛋白酶的水解效率最高,达到了12.23%;接下来依次为突变酶166的11.64%和突变酶169的11.04%,较原液的9.32%的水解度分别提高了31.22%,24.89%和18.45%;突变酶159最终水解度基本没有变化,但其在2 h以内的水解度远小于原液。而细菌丝氨酸突变33蛋白酶和阴性对照突变酶1012的水解效率最低,一直保持在3%。

结合酶突变位点分析,突变酶166和169为底物结合位点突变,而突变酶239和突变酶33突变位点设计在活性中心附近。突变酶166是将166位甘氨酸突变为丙氨酸,突变酶对常规底物酪蛋白的酶活变化不大,为原始未突变酶的109.68%,但突变酶对丝氨酸特异性底物AAPF的活性是原始未突变酶的141.60%,并且该突变株突变酶的耐热性明显提高,在70°还能保持较高的酶活,约达到最高酶活的50%。结构分析表明,丝氨酸蛋白酶P1底物结合侧链可能有两种底物结合模型,一种是P1位点的苯丙氨酸底物,该侧链向内延伸至166位甘氨酸的 $\alpha$ -C原子,位于P1结合位点开口的背面,因此166位的突

变可能是影响其热稳定性的原因之一。而另一种赖氨酸P1底物结合位点,侧链延伸至疏水的P1结合位点的开口和156位点的谷氨酸形成离子对,建立的模型显示谷氨酸侧链取代166位氨基酸也可以和赖氨酸P1底物形成离子对,156位点的突变和166位的突变会影响其底物特异性,这解释了突变后的酶对特异性底物AAPF活性更好。在该酶对鲢鱼蛋白的水解实验中(图1),水解反应前40 min反应比较剧烈,水解度为8.01%,20 min后,反应比较缓慢,水解度增加幅度较平缓,到80 min时,水解度可达9.47%,但是在100 min是水解度略有下降,为8.85%,随后在120 min时,又上升到10.19%。

突变酶169的突变位点的氨基酸也属于P1底物结合的有效范围,该位点由甘氨酸突变为丙氨酸。突变后对AAPF特异性底物和酪蛋白底物的活性均有不同程度的下降。其水解白鲢鱼肉蛋白时(图1),前80 min反应比较剧烈,水解度为8.55%,随后,反应趋于缓慢,水解度基本不再增加,到100 min时,水解度达到最高的9.10%,而在120 min是则下降到8.78%。

突变体159的第159位氨基酸由Ser突变为Phe,由原来的亲水性氨基酸突变为疏水性氨基酸,突变时酶的热稳定提高。由图1可知,在较为适宜的条件下,细菌丝氨酸突变159蛋白酶水解白鲢鱼肉蛋白时情况有些不同,前20 min水解度不升反降,由降1.63%为0.36%,随后,到60 min,反应剧烈进行,水解度到达6.50%,不过随后在80 min时又下降到4.69%。紧接着,反应有剧烈进行,在120 min时,水解度提升到了8.76%。

突变酶239的突变位点位于丝氨酸蛋白酶典型的三联体催化活性中心的 $\alpha$ -螺旋上,239位的脯氨酸突变为丙氨酸后,突变酶对AAPF的底物特异性只有原始未突变酶的79.01%,对酪蛋白底物的水解活性也仅有原始未突变酶的74.78%,热稳定性也有所下降。但是该酶对鲢鱼蛋白的水解能力却是最高,由图1可知,在较为适宜的条件下,239蛋白酶水解白鲢鱼肉蛋白时,100 min时,水解度可以提升到了11.46%,随后,反应趋于缓慢,水解度基本不再增加。

然而,当位于三联体催化活性中心D32附近的33位氨基酸由丝氨酸突变为苏氨酸后,酶活下降至原始酶活的1.37%,基本丧失了酶活。其水解鲢鱼蛋白活性最高也只有3.24%(图1),基本和阴性对照一致。说明不同活性中心位点对水解鱼肉蛋白水解能力的影响有很大的差异。

野生蛋白酶作为阳性对照,其水解度在40 min达到8.47%,而后水解度增幅相对放缓,在100 min是达到了最高的10.99%,在120 min时则下降至7.31%。突变酶

1012由于其突变后基本丧失了全部蛋白酶活性,在水解实验中作为阴性对照,在整个水解白鲢鱼肉蛋白的过程中,水解度整体增幅缓慢,亦没有超过3.5%(图1)。

## 2.2 DPPH 自由基清除能力的测定

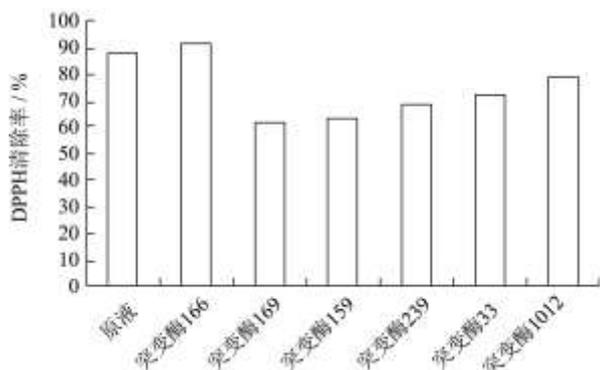


图2 蛋白酶不同突变产物酶解白鲢鱼肉蛋白产物的抗氧化性

Fig.2 Antioxidant analysis of silver carp protein by using different protease mutants

测试的7种蛋白酶2 h水解物对0.0065 mol/L的DPPH的清除能力如图2所示。野生蛋白酶对自由基的清除能力为87.11%，阴性对照1012蛋白酶的清除能力为71.63%。活性位点相关突变的酶自由基清除能力与阴性对照差别不是很大，突变蛋白酶33的清除能力为78.89%，突变蛋白酶239的清除能力为67.72%，突变蛋白酶159的清除能力为62.94%。底物特异性相关位点突变之后的蛋白酶166对自由基清除效果最高，清除率达到91.02%，相反，另一个底物特异性相关位点突变的蛋白的清除能力为最低，只有为61.41%。结果表明蛋白酶底物特异性相关位点的突变位点影响鱼肉蛋白酶解产物的抗氧化活性。

## 3 结论

实验表明，不同位点的突变对蛋白酶水解鱼肉蛋白及其酶解产物的营养价值影响也不同，总的来说，发生在活性位点附近的突变对蛋白酶水解鱼肉蛋白的能力影响较大，而发生在底物结合位点的突变则对酶解产物的抗氧化活性有一定的影响。根据还原力大小与抗氧化性相关特性，比较了细菌丝氨酸蛋白酶及其突变产物酶解白鲢蛋白所得酶解液的还原力，突变蛋白酶166可作为对白鲢鱼肉蛋白进行水解获得活性产物的为最佳用酶，或为将来进一步分子改造的基础。

## 参考文献

- [1] Aspino SI, Horn SJ, Eijsink VGH. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40: 1957-1966
- [2] Guerard F, Guimas L, Binet A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 19-20: 489-498
- [3] Faid M, Zouiten A, Elmarrakchi A, et al. Biotransformation of fish waste into a stable feed ingredient [J]. *Food Chemistry*, 1997, 60: 13-18
- [4] 方佳茂,刘偲琪,庄楚周,等.复合酶水解蚕蛹蛋白制备功能性寡肽的工艺研究[J].*现代食品科技*,2012,3:323-328
- [5] 肖如武,黄骆镰,黄克,等.不同酶水解马氏珍珠贝蛋白的特性研究[J].*现代食品科技*,2009,7:725-730
- [6] 王春华.利用蛋白酶水解水产品加工废弃物的研究进展[J].*山东食品发酵*,2005,3:17-19
- [7] Moskovitz J, Yim KA, Choke PB. Free radicals and disease [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, 397: 354-359
- [8] Peng XA, Xiong YC, Kong BA. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113: 196-201
- [9] 王龙,叶克难.水产蛋白资源的酶解利用研究现状与展望[J].*食品科学*,2006,27:807-811
- [10] 邓敏,朱志伟,欧善堂,等.利用响应面法优化酶解罗非鱼制备抗氧化肽的研究[J].*现代食品科技*,2011,10:1242-1245
- [11] Siemensma A D, Weijer W J, Bak H J. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae [J]. *Trends in Food Science and Technology*, 1993, 4(1): 16-21
- [12] Nielsen PM, Petersen D, Dambmann C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis [J]. *J Food Sci*, 2001, 5:642-643
- [13] 林虬,黄薇,宋永康,等.棉籽蛋白水解物水解度 3 种测定方法的比较[J].*福建农业学报*,2011,26:1076-1080
- [14] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. *Lebensm Wiss Technol*. 1995, 28:415-420
- [15] 许申鸿,杭瑚.一种筛选自由基清除剂的简便方法[J].*中草药*,2000,31(2):96-97