

蓝圆鲂分离蛋白水溶性蛋白酶的鉴定及性质

林怡晨¹, 刘伟峰¹, 孙小舒¹, 张凌晶¹, 翁 凌^{1,2}, 曹敏杰^{1,2}, 孙乐常^{1,2,3}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心, 福建 厦门 361021; 3. 福建省海洋功能食品工程技术研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 以蓝圆鲂(*Decapterus maruadsi*)为研究对象, 采用酸/碱溶解-等电点沉淀法制备蓝圆鲂肌肉分离蛋白(acid/alkaline aided protein isolate, API/KPI), 分析比较不同分离蛋白与肌肉全蛋白(total protein, TP)的自身降解规律, 并对其水溶性蛋白酶的酶学性质展开研究。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)结果显示, TP与KPI均会发生强烈的自身降解现象, API则无明显的自身降解。酶谱与酶活力测定结果表明, KPI保留了TP超过80%的酶活性, 而API则仅剩10%的水解活性。酶学性质结果表明, TP的内源酶具有两个最适pH值, 分别为3.0与9.0, 而KPI的最适pH值为9.0; TP与KPI内源酶的最适温度均为60℃。荧光底物结果表明, TP与KPI的最适荧光底物为Boc-Gln-Arg-Arg-MCA, 且对羧基端为Arg的底物均具有较高的水解活性。抑制剂结果显示, TP和KPI水溶性蛋白酶都能被丝氨酸蛋白酶抑制剂强烈抑制, 暗示水溶性丝氨酸蛋白酶在碱法等电点制备的分离蛋白凝胶劣化中起关键作用。

[关键词] 蓝圆鲂; 等电点沉淀法; 凝胶劣化; 丝氨酸蛋白酶

[中图分类号] TS 254.1

Identification and Characterization of Endogenous Proteinase from Protein Isolate of Blue Round Scads(*Decapterus maruadsi*)

LIN Yichen¹, LIU Weifeng¹, SUN Xiaoshu¹, ZHANG Lingjing¹, WENG Ling^{1,2}, CAO Minjie^{1,2}, SUN Lechang^{1,2,3}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. National & Local Joint Engineering Research Center of Processing Technology for Aquatic Products, Xiamen 361021, China;

3. Fujian Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China)

Abstract: Protein isolate was prepared from the skeletal muscle of blue round scads by acid or alkaline aided isoelectric solubilization/precipitation, respectively. The autolysis of total protein from skeletal muscle(TP) and protein isolates(acid or alkaline aided protein isolate, API or KPI), as well as their endogenous proteinase, were comparatively studied. The results showed that endogenous proteinase had a strong autolysis capacity for TP and KPI incubated at 50℃ for 120 min, while no significant auto-degradation was detected in API. KPI remained more than 80% proteolytic activity toward casein, while API remained about 10% of total proteinase activity from TP. A similar result was found in myofibrillar based zymography. Endogenous proteinase from TP and KPI had the same optimal temperature of 60℃. TP had two optimal activity at pH 3.0 and 9.0, while KPI

[收稿日期] 2019-04-20

[基金项目] 福建省自然科学基金项目(2017J05053); 集美大学黄慧贞基金项目(ZC2014009); 国家级大学生创新创业项目(201810390023)

[作者简介] 林怡晨(1993—), 女, 硕士生, 从事蛋白质与酶学方向研究。通信作者: 孙乐常(1985—), 男, 讲师, 博士, 从事蛋白质化学及水产品深加工研究。E-mail:sunlechang@163.com

exhibited a single activity peak at pH 9.0. Fluorescent substrate specificity analysis showed that the endogenous proteinase in both TP and KPI had highest activity toward Boc-Gln-Arg-Arg-MCA, and released highly hydrolytic active to substrates with Arg residue in the carboxyl side. Serine proteinase inhibitors strongly suppressed the degradation of myofibrillar protein, indicating that the major endogenous proteinase from TP and KPI was serine type proteinase, which might play a key role in modori phenomenon of KPI.

Keywords: blue round scads; isoelectric solubilization/precipitation; modori; serine proteinase

0 引言

蓝圆鲹 (*Decapterus maruadsi*) 隶属鲈形目 (Perciformes)、鲹科 (Carangidae), 属于暖水性中上层鱼类, 是我国重要的低值海洋经济鱼类之一。据统计, 2017 年, 全国蓝圆鲹捕捞量总计达 53.5 万 t, 其中福建省捕捞量为 24.3 万 t, 居全国首位, 具有巨大的开发价值^[1]。目前, 蓝圆鲹主要被加工成鱼干、鱼露或腌制品等低值产品, 精深加工程度较低。随着海洋渔业资源的日益缩减, 蓝圆鲹逐渐取代传统的鱼糜原料鱼被应用于鱼糜制品的加工。

等电点沉淀法 (isoelectric solubilization/precipitation, ISP) 是一种利用蛋白质在不同 pH 值下的溶解度不同的原理, 对蛋白质进行溶解、沉淀从而实现蛋白质分离的技术。近年来, 有研究者开始尝试利用 ISP 代替传统鱼糜加工中的漂洗工序制备鱼类肌肉分离蛋白, 结果发现, ISP 不仅可以分离油脂、色素以及鱼鳞等其他杂质, 还可有效回收水溶性蛋白质, 从而显著提高蛋白质的回收率, 避免优质蛋白质的浪费^[2-3]。课题组在前期研究中利用酸/碱 ISP 法从蓝圆鲹肌肉中制备获得分离蛋白, 证实 ISP 法不仅能极大提高肌肉中蛋白质的回收率, 其制备得到的分离蛋白还具有更好的消化性^[4]。

进一步的研究发现, 蓝圆鲹分离蛋白在加热凝胶化过程中也会出现类似凝胶劣化的现象。前期研究中, 通过观察肌球蛋白在 ISP 法 pH 值调节过程中的构象变化规律, 发现酸法 ISP 分离蛋白的弱凝胶是由于肌球蛋白变性导致, 而碱法 ISP 制备得到的肌球蛋白能基本保持天然肌球蛋白的构象与凝胶化能力^[5]。由此可见, 碱法 ISP 分离蛋白的凝胶劣化极可能是由其内源性蛋白酶的水解作用导致。目前, 关于诱导传统鱼糜凝胶劣化内源性蛋白酶的研究在白姑鱼 (*Pennahia argentata*)^[6]、马鲛鱼 (*Scomberomorus niphonius*)^[7]、白鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)^[8] 等鱼类已有较多报道。这些结果普遍表明, 组织蛋白酶 L 和肌原纤维结合型的丝氨酸蛋白酶 (myofibril-bound serine proteinase, MBSP) 是诱导鱼糜凝胶劣化的主要内源性蛋白酶。对于蓝圆鲹, 文献 [9-10] 纯化得到肌肉中的 MBSP 和组织蛋白酶 L, 通过对比二者对肌原纤维蛋白的降解情况, 发现 MBSP 具有更高的肌原纤维蛋白水解活性, 推测其在传统鱼糜制品的凝胶劣化中起更重要的作用。值得注意的是, ISP 法能够同时有效回收肌原纤维蛋白与水溶性蛋白, 水溶性蛋白往往含有高活性的水溶性蛋白酶。考虑到 ISP 法制备分离蛋白过程中 pH 值的变化也会对内源性蛋白酶的活性产生重要影响, 笔者推测, ISP 分离蛋白的凝胶劣化机制可能不同于传统的鱼糜制品。然而, 目前针对因酶诱导的 ISP 分离蛋白凝胶劣化作用机理的研究至今还未见报道。本研究以蓝圆鲹肌肉分离蛋白为对象, 分析比较不同分离蛋白的自身降解规律, 结合特异性荧光底物与肌原纤维酶谱对内源性蛋白酶进行研究, 以期为鱼类 ISP 分离蛋白的凝胶劣化机制研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蓝圆鲹, 每尾约 150 g, 购于厦门市集美菜市场。

绿豆胰蛋白酶抑制剂 (mung bean trypsin inhibitor, MBTI) 是本实验室分离纯化得到的。SDS-PAGE 用标准蛋白购于 Thermo Fisher Scientific 公司 (美国); Boc-Phe-Ser-Arg-MCA 等 MCA 荧光合成底物购于 Peptide Institute 公司 (日本); 十二烷基磺酸钠 (SDS), 乙二醇双 (2-氨基乙基醚) 四乙

酸(EGTA),乙二胺四乙酸(EDTA),Trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane(E-64),Leupeptin, Bestatin, 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-hydrochloride(AEBSF),Pepstatin, 购于Sigma公司(美国);其他试剂均为国产化学分析纯。

PT-2100组织捣碎机(Kinematica公司,瑞士);UB-7型pH计(梅特勒公司,瑞士);Avanti J-25高速冷冻离心机(Beckman公司,美国);Mini-PROTEAN蛋白质电泳装置(Bio-Rad公司,美国);G:BOX凝胶成像仪(Syngene公司,英国);FR-8200荧光分光光度计(JASCO公司,日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 分离蛋白制备

以下操作若无特殊说明,所有操作均在4℃下进行。本实验采用酸、碱ISP法制备分离蛋白,并同时以肌肉中全蛋白(total protein, TP)作为对照进行比较。其中,蓝圆鲈肌肉TP是直接采取新鲜蓝圆鲈的骨骼肌,并用绞肉机搅碎,其中的蛋白质即为全蛋白组;蓝圆鲈骨骼肌酸/碱溶解-等电点沉淀的分离蛋白(acid/alkaline aided solubilized-isoelectric solubilization/precipitation, API/KPI)则参考前期研究已报道的方法^[4]制备,具体操作过程为:蓝圆鲈肌肉与冰水以1:8的质量比混合并组织捣碎,分别用1 mol/L HCl或1 mol/L NaOH调节pH值分别为2.0和11.0进行溶解,离心后收集上清液部分,并调节pH值至5.5,经离心后收集沉淀部分蛋白质,加入适量的碳酸氢钠调pH值至中性,即为API与KPI。

1.2.2 分离蛋白自身降解规律研究

在得到的三组蛋白质样品中加入7.5倍体积的缓冲液A(20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, pH=8.0)组织捣碎,取100 μL分装于1.5 mL的离心管中,在50℃分别孵育0, 15, 30, 60, 120 min。孵育结束后,立即加入2倍体积的蛋白质溶解液(20 mmol/L Tris-HCl, pH=8.0, 质量分数1% SDS, 8 mol/L 尿素, 质量分数2% β-巯基乙醇),并于95℃加热20 min,完全溶解后的样品参照Laemmli等^[11]方法进行SDS-PAGE分析。

1.2.3 水溶性蛋白酶的提取

取TP、API和KPI各100 g,分别加入4倍体积的缓冲液B(20 mmol/L Tris-HCl, pH=8.0)中组织捣碎,捣碎后匀浆,12 000g离心取上清,即为粗酶液,分别命名为WTP、WAPI和WKPI。

1.2.4 酶活力测定

酪蛋白TCA可溶性肽含量测定法^[12]:取100 μL适当稀释的酶液加入至900 μL的含质量分数1%酪蛋白的缓冲液B中,40℃孵育30 min,立即加入300 μL质量分数30% TCA终止反应,得到的反应液经8 000g离心10 min后收集上清液。通过Lowry法^[13]测定上清液的可溶性肽含量,并用酪氨酸为标准。活力单位(U)定义为每分钟释放1 μmol酪氨酸所需要的酶量。

肌原纤维酶谱法^[12]:为避免蓝圆鲈肌肉肌原纤维蛋白中结合型丝氨酸蛋白酶(MBSP)^[9]对肌原纤维蛋白的降解干扰,本实验以不易发生自身降解的罗非鱼肌原纤维蛋白为底物进行肌原纤维蛋白酶谱检测。具体步骤为:添加罗非鱼肌肉肌原纤维蛋白到SDS-PAGE凝胶中使其终质量浓度为1.0 g/L。将酶与SDS上样缓冲液混匀后,直接上样,并在低温条件下进行电泳。结束后,将胶取出,放入含质量分数2.5% Triton X-100的冰水中振荡孵育以去除SDS使酶复性,随后将凝胶置入缓冲液B中,在37℃下孵育24 h,用考马斯亮蓝法进行染色。罗非鱼肌原纤维蛋白参考Rawdkuen等^[14]的方法进行制备。

1.2.5 温度和pH值对蛋白酶的影响

1) 最适温度:取100 μL适当稀释的酶液加入至900 μL含质量分数1%酪蛋白的缓冲液B中,分别在20~70℃下孵育,通过1.2.4方法测定酶活力。

2) 最适pH值:取100 μL适当稀释的酶液加入至900 μL含质量分数1%酪蛋白的不同pH值缓冲液中,通过1.2.4方法测定酶活力。其中不同pH值的缓冲溶液分别为:NaCl-HCl缓冲液(pH=2.0),甘氨酸-HCl缓冲液(pH=3.0),乙酸钠缓冲液(pH=4.0~5.0),磷酸缓冲液(pH=6.0~

7.0), Tris-HCl (pH = 8.0), 甘氨酸 - NaOH (pH = 9.0 ~ 10.0), 磷酸氢二钠 - NaOH (pH = 11.0)。
3) pH 值稳定性: 取 20 μ L 酶液与 80 μ L 100 mmol/L 的不同 pH 值缓冲液 (pH = 2.0 ~ 11.0) 混合, 在室温下放置 30 min 后加入至 900 μ L 含质量分数 1% 酪蛋白的 50 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.0) 缓冲液中, 按 1.2.4 的方法测定酶活力。

1.2.6 蛋白酶对肌原纤维的降解以及蛋白酶抑制剂的影响测定

将蛋白酶与不同类型抑制剂混匀, 于冰上放置 30 min 充分反应后, 按照体积比 1:2 与含罗非鱼肌原纤维 (6 g/L) 的缓冲液 A 混匀, 置于 50 $^{\circ}$ C 孵育 120 min, 随后进行 SDS-PAGE 分析。所加入抑制剂及其在体系终浓度为: MBTI, 0.02 g/L; AEBSF, 1 mmol/L; Leupeptin, 100 μ mol/L; E-64, 10 μ mol/L; EDTA, 10 mmol/L; EGTA, 10 mmol/L; Bestatin, 10 μ mol/L; Pepstain A, 1 μ mol/L。

1.2.7 荧光底物分析

1) 荧光底物特异性分析: 参考游银川的方法^[15], 在 900 μ L 20 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.0) 中加入 50 μ L 的酶样和 50 μ L 10 μ mol/L 的荧光底物, 振荡混匀。50 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 加入 1.5 mL 终止液 (V(水):V(甲醇):V(异丙醇) = 35:35:30) 终止反应。采用荧光分光光度计测定反应液在激发波长 380 nm 和发射波长 450 nm 的荧光度值, 对照组用缓冲液代替荧光底物。酶活力单位 (U) 定义为每分钟释放 1 nmol 7-氨基-4-甲基香豆素 (7-amino-4-methylcoumarin, AMC) 所需酶量。不同类型荧光底物有: Boc-Phe-Ser-Arg-MCA, Boc-Gln-Arg-Arg-MCA, Boc-Gln-Ala-Arg-MCA, Boc-Ala-Gly-Pro-Arg-MCA, Boc-Arg-Val-Arg-Arg-MCA, Boc-Leu-Gly-Arg-MCA, Boc-Val-Leu-Lys-MCA, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA, Suc-Glu-Pro-MCA, Z-Arg-Arg-MCA, Z-Leu-Arg-MCA, Leu-MCA, Lys-MCA。

2) 抑制剂对蛋白酶分解荧光底物的影响: 在 20 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.0) 的缓冲液中, 将蛋白酶与不同的抑制剂相混合, 以 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA 作为荧光底物, 在 50 $^{\circ}$ C 水浴锅中进行孵育, 测定酶活力。

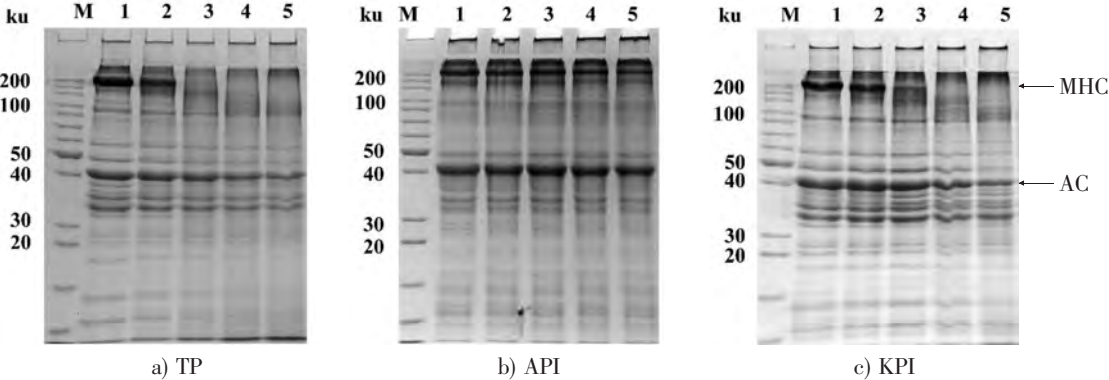
1.3 数据分析

所有的实验均至少重复 3 次以上, 用 Microsoft Excel 2013 进行数据处理, 求平均值、偏差。

2 结果与讨论

2.1 蓝圆鲈分离蛋白的自身降解

将 3 组蛋白质样品置于 50 $^{\circ}$ C 孵育不同时间观察自身降解情况, 结果如图 1 所示。可见, 3 组蛋白质均可观察到明显的肌球蛋白与肌动蛋白条带 (图 1 箭头标记)。此外, ISP 法制备得到的 KPI 蛋



说明:泳道 M—标准蛋白;泳道 1~5—50 $^{\circ}$ C 孵育 0, 15, 30, 60, 120 min;MHC—肌球蛋白重链;AC—肌动蛋白。
Notes:Lane M—Standard protein marker;lane 1~5—incubated at 50 $^{\circ}$ C for 0,15,30,60,120 min,respectively;MHC—myosin heavy chain;AC—actin.

图 1 蓝圆鲈分离蛋白自身降解的 SDS-PAGE 分析
Fig.1 SDS-PAGE autolysis of blue round scads protein isolate

白条带组成上与 TP 组相似, 这说明碱法 ISP 能有效回收水溶性蛋白质组分。前期研究^[4]发现, 通过酸、碱 ISP 法可以分别回收 65.0% 与 84.6% 的肌肉总蛋白, 这与图 1 的结果相一致。随着孵育时间的延长, 3 组蛋白质发生不同程度的自身降解现象, 其中, TP 的分解最强烈, 反应 30 min 其 MHC 条带几乎完全分解。相比于 TP 组, KPI 组的自身降解相对较弱, 但明显强于 API 组。前期研究的流变学结果发现, TP 与 KPI 均能在 50 ~ 60 °C 升温过程中发生凝胶劣化^[4]。本结果进一步证实, 此凝胶劣化现象是由于蛋白质发生自身降解导致的。

2.2 水溶性蛋白酶酶活力

为了进一步阐明图 1 中不同组分离蛋白自身降解速度的差异, 对其水溶性蛋白酶的酶活力进行测定, 结果如图 2a 所示。与对照组 (WTP) 相比, API 上清液的蛋白酶相对酶活力 (以下简称 WAPI) 仅为 10%, 而 KPI 的上清液 (以下简称 WKPI) 则保留了 80% 以上的蛋白酶活性。通过肌原纤维酶谱 (图 2b) 可以看出, TP 与 KPI 中主要存在 3 种能特异性分解肌原纤维蛋白的蛋白酶, 其分子质量分别约为 120, 110 与 70 ku。相对于 TP 与 KPI, API 则没有检测到能降解肌原纤维蛋白的亮带, 表明 API 中相关内源性蛋白酶的活性极低, 这与图 2a 的结果一致。此外, Sun 等^[12]利用 ISP 法从太平洋磷虾中制备得到分离蛋白, 并在酶谱与酪蛋白水解活力测定中也发现了类似规律。这也暗示了相对于酸性 pH 值, 水溶性蛋白酶在碱性条件下具有更好的稳定性。

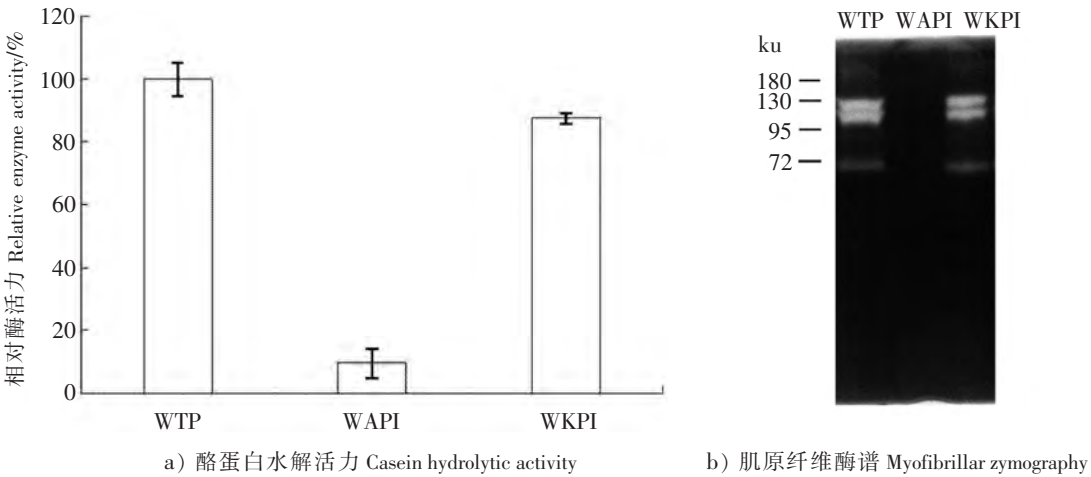
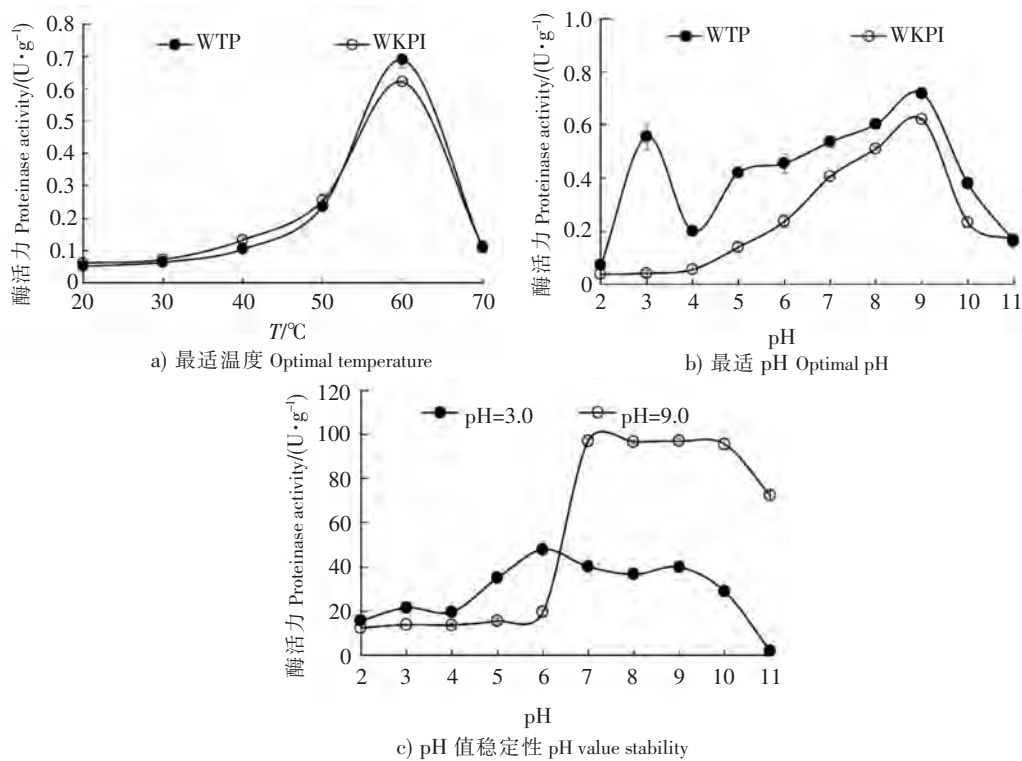


图 2 蓝圆鲂分离蛋白水溶性蛋白酶酶活力分析
Fig.2 Proteolytic activity of blue round scads protein isolate

2.3 温度和 pH 值对水溶性蛋白酶活力的影响

以酪蛋白为底物, 测定 WTP 与 WKPI 中蛋白酶的最适温度、最适 pH 值与 pH 值稳定性, 结果如图 3 所示。可见, WTP 与 WKPI 最适温度均为 60 °C, 且温度上升至 70 °C 时, 酶活力快速下降。WTP 的 pH = 9.0 与 pH = 3.0 均表现出最高的水解酪蛋白活性, 且在 pH = 5.0 处出现一个峰肩, 表明 TP 中存在碱性蛋白酶 (如丝氨酸类蛋白酶)、酸性蛋白酶 (如组织蛋白酶 D) 以及组织蛋白酶 B/L^[9]。此结果与文献 [16 - 18] 报道的鲭鱼和虱目鱼的组织蛋白酶 D (最适 pH = 3.0)、鲭鱼的组织蛋白酶 B (最适 = 5.5)、鲢鱼组织蛋白酶 L (最适 pH = 5.0 ~ 5.5), 以及蓝圆鲂肌肉丝氨酸蛋白酶 (最适 pH = 9.0)^[19]等鱼类内源性蛋白酶的最适 pH 值结果相似。

另一方面, WKPI 则仅在 pH = 9.0 具有最高的酪蛋白水解活力。通过对 WTP 内源酶在不同 pH 值下的稳定性, 可以看出酸性蛋白酶类在碱性 pH 值范围并不稳定, 特别在 pH = 11.0 时, 基本丧失全部水解活力。相比之下, WTP 中的碱性蛋白酶在碱性 pH 值下具有良好的稳定性, 当 pH = 11.0 时, 依然能保留 70% 的活力, 该结果进一步证实了图 3b 中 WKPI 的最适 pH 值结果。



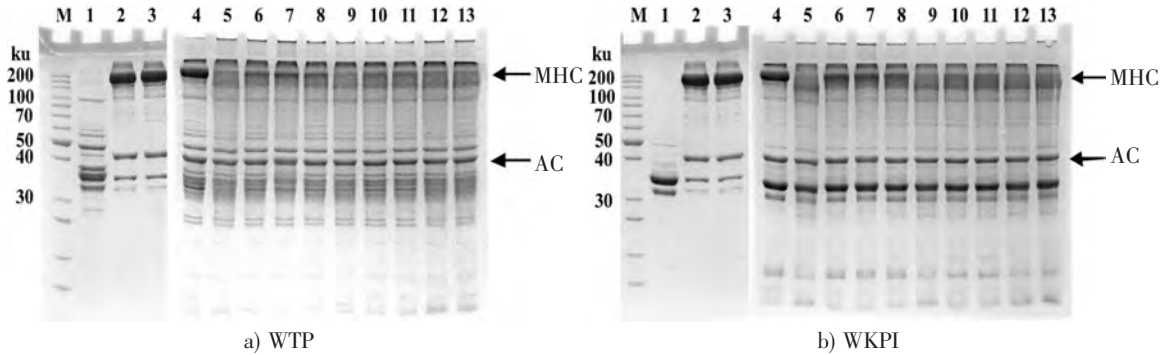
说明:WTP—全蛋白的水溶性蛋白酶;WKPI—碱溶解-等电点沉淀的分离蛋白的水溶性蛋白酶。
Notes:WTP—endogenous proteinase of TP;WKPI—endogenous proteinase of protein isolated by alkali dissolution-isoelectric point precipitation.

图 3 温度和 pH 值对蓝圆鲷水溶性蛋白酶酶活力的影响

Fig.3 Effect of temperature and pH on endogenous proteinase activity from blue round scad

2.4 水溶性蛋白酶对罗非鱼肌原纤维的降解

将 WTP 和 WKPI 加入至罗非鱼的肌原纤维中，并加入不同的蛋白酶抑制剂观察降解情况，结果如图 4 所示。图 4 的 SDS-PAGE 结果发现，WKPI 的蛋白质条带要明显少于全蛋白，推测在 pH 值调节过程中，部分肌浆蛋白发生变性进而产生沉淀。



说明:M—标准蛋白;1—粗酶;2~3—肌原纤维蛋白在 50 °C 下分别孵育 0,240 min;4~5—肌原纤维蛋白与酶在 50 °C 下分别孵育 0,240 min;6~13—肌原纤维蛋白与酶、抑制剂共同孵育 240 min,添加的抑制剂分别为 0.02 g/L MBTI,1 mmol/L AEBSF,100 μmol/L Leupeptin,10 μmol/L E-64,10 mmol/L EDTA,10 mmol/L EGTA,10 μmol/L Bestatin,1 μmol/L Pepstatin A。
Notes: M—protein marker; 1—crude enzyme; 2~3—myofibrillar protein after incubation at 50 °C for 0 min and 240 min, respectively; 4~5—myofibrillar protein with the presence of crude enzyme after incubation at 50 °C for 0 min and 240 min, respectively; 6~13—myofibrillar protein with the presence of crude enzyme and inhibitor after incubation at 50 °C for 240 min, inhibitor: 0.02 g/L MBTI, 1 mmol/L AEBSF, 100 μmol/L Leupeptin, 10 μmol/L E-64, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L EGTA, 10 μmol/L Bestatin, 1 μmol/L Pepstatin A.

图 4 抑制剂对 WTP 和 WKPI 水解罗非鱼肌原纤维的影响

Fig.4 Effect of inhibitors on the degradation of tilapia myofibrillar protein by WTP and WKPI

罗非鱼肌原纤维经 50 ℃ 孵育 4 h 后, 空白组没有检测到明显的自身降解, 而加入 WTP 和 WK-PI 的肌原纤维蛋白组可以观察到肌球蛋白重链 (MHC) 被完全降解。为了更好判断水溶性蛋白酶的类型, 孵育过程中加入了不同类型抑制剂, 结果发现, 所有抑制剂均无法完全抑制蓝圆鲈肌浆蛋白酶降解罗非鱼肌原纤维, 说明蓝圆鲈的肌浆蛋白酶包含了多种类型的蛋白酶, 这与 WTP 最适 pH 值的结果一致 (见图 3c)。而对于添加 WKPI 组, 抑制剂的抑制作用则相对更为明显, 其中丝氨酸蛋白酶抑制剂 MBTI、Leupeptin 以及 Antipain 对 MHC 的降解抑制效果最为显著, 而金属蛋白酶抑制剂 EDTA、EGTA, 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 E-64, 天冬氨酸蛋白酶抑制剂 Pepstain A 以及氨肽酶抑制剂 Bestatin 对内源酶的水解具有部分抑制作用。以上结果表明, 在 pH=8.0 条件下, 蓝圆鲈肌肉中分解肌原纤维蛋白的主要内源酶为丝氨酸蛋白酶类型。此外, 相对于分离蛋白组, 肌肉中的内源酶种类更为复杂。

2.5 水溶性蛋白酶对 MCA 底物水解特性

利用荧光底物对 WTP 与 WKPI 中内源酶的种类进行进一步鉴定, 结果如表 1 所示。在反应 pH=8.0 时, WTP 和 WKPI 对羧基端 P1 位为 Arg 残基的多肽具有特异的水解活性, 尤其是 Boc-Gln-Arg-Arg-MCA, 表明在该 pH 值条件下起主要水解活性的是胰蛋白酶类型的丝氨酸蛋白酶。

以通用荧光底物 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA 为对象, 考察不同抑制剂对 WTP 与 WKPI 内源性蛋白酶酶活力的影响, 结果如表 2 所示。MBTI、AEBSF 和 Leupeptin 均对蛋白酶活性有显著抑制作用, 这也进一步证明了分离蛋白中的内源酶属于胰蛋白酶类型。此外, 金属螯合剂 EDTA 对内源酶具有部分抑制作用, 推测可能是由于其活性中心的金属离子被螯合所致。

表 1 蓝圆鲈分离蛋白内源性蛋白酶的底物特异性分析
Tab.1 Substrates specificity analysis of endogenous proteinases from blue round scads protein isolates

底物 Substrates (10 μmol/L)	相对活性 Relative activity/%	
	WTP	WKPI
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	100.0	100.0
Boc-Gln-Arg-Arg-MCA	476.0	358.3
Boc-Gln-Ala-Arg-MCA	187.0	216.4
Boc-Ala-Gly-Pro-Arg-MCA	71.8	83.8
Boc-Leu-Gly-Arg-MCA	37.9	61.1
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	29.7	30.7
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	9.1	4.5
Suc-Glu-Pro-MCA	0.7	0.6
Z-Arg-Arg-MCA	38.4	43.2
Z-Phe-Arg-MCA	23.1	18.7
Leu-MCA	8.6	1.3
Lys-MCA	7.8	0.5

表 2 抑制剂对蓝圆鲈分离蛋白内源性蛋白酶的影响
Tab.2 Effect of inhibitors on endogenous proteinases from blue round scads protein isolates

抑制剂 Inhibitor	抑制剂浓度 Inhibitor concentration	相对活性 Relative activity/%	
		WTP	WKPI
Control	0	100.0	100.0
MBTI	0.01 mg/L	14.8	10.3
AEBSF	1 mmol/L	8.1	7.9
Leupeptin	0.1 mmol/L	9.6	6.1
E-64	0.01 mmol/L	84.6	100.0
EDTA	10 mmol/L	35.3	24.5
EGTA	10 mmol/L	36.6	24.5
Bestatin	0.01 mmol/L	100.0	97.4
Pepstain A	0.001 mmol/L	100.0	92.2

3 结论

本实验以蓝圆鲈为对象, 比较分析了肌肉与 ISP 分离蛋白中水溶性蛋白酶的酶学性质, 结果表明, 蓝圆鲈肌肉中存在多种水溶性蛋白酶, 而经过酸法 ISP 制备后分离蛋白中的内源酶酶活性基本丧失。相比之下, 碱法 ISP 制备的分离蛋白中则保留较高活力的水解活性, 且其主要的内源性蛋白酶为胰蛋白酶类型, 提示该酶可能是诱导引起碱法 ISP 分离蛋白鱼糜凝胶劣化的主要原因。

[参考文献]

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴 2018 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2018: 17-46.
- [2] NOLSØE H, UNDELAND I. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: state of the art [J]. Food and Bioprocess Technology, 2009, 2(1): 1-27. DOI:10.1007/S11947-008-0088-4.
- [3] ABDOLLAHI M, MARMON S, CHAIJAN M, et al. Tuning the pH-shift protein-isolation method for maximum hemoglobin-removal from blood rich fish muscle [J]. Food Chemistry, 2016, 212: 213-224. DOI:10.1016/J.FOODCHEM.2016.05.165.
- [4] 孙乐常, 林怡晨, 刘伟锋, 等. 蓝圆鲹酸/碱等电点沉淀法分离蛋白凝胶特性与消化特性 [J]. 食品科学, 2019, 40(12): 22-29.
- [5] SUN L C, LIN Y C, LIU W F, et al. Effect of pH shifting on conformation and gelation properties of myosin from skeletal muscle of blue round scads (*Decapterus maruadsi*) [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 93: 137-145. DOI:10.1016/J.FOODHYD.2019.02.026.
- [6] FOLCO E, BUSCONI L, MARTONE C, et al. Multicatalytic proteinase in fish muscle [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1988, 267(2): 599-605. DOI:10.1016/0003-9861(88)90067-7.
- [7] TOYOHARA H, KINOSHITA M, SHIMIZU Y. Proteolytic degradation of threadfin-bream meat gel [J]. Journal of Food Science, 1990, 55(1): 259-260.
- [8] LIU H, YIN L J, ZHANG N, et al. Isolation of cathepsin B from the muscle of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and comparison of cathepsins B and L actions on surimi gel softening [J]. Food Chemistry, 2008, 110(2): 310-318. DOI:10.1016/J.FOODCHEM.2008.01.068.
- [9] ZHONG C, CAI Q F, LIU G M, et al. Purification and characterisation of cathepsin L from the skeletal muscle of blue scad (*Decapterus maruadsi*) and comparison of its role with myofibril-bound serine proteinase in the degradation of myofibrillar proteins [J]. Food Chemistry, 2012, 133(4): 1560-1568. DOI:10.1016/J.FOODCHEM.2012.02.050.
- [10] SUN L C, YOSHIDA A, CAI Q F, et al. Mung bean trypsin inhibitor is effective in suppressing the degradation of myofibrillar proteins in the skeletal muscle of blue scad (*Decapterus maruadsi*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(24): 12986-12992. DOI:10.1021/JF103526E.
- [11] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.
- [12] SUN L C, CHEN Y L, ZHONG C, et al. Autolysis of krill protein from North Pacific krill *Euphausia pacifica* during protein recovery via isoelectric solubilization/precipitation [J]. Fisheries Science, 2014, 80(4): 839-847. DOI:10.1007/S12562-014-0751-9.
- [13] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265-275.
- [14] RAWDKUEN S, SAI-UT S, KHAMSORN S, et al. Biochemical and gelling properties of tilapia surimi and protein recovered using an acid-alkaline process [J]. Food Chemistry, 2009, 112(1): 112-119. DOI:10.1016/J.FOODCHEM.2008.05.047.
- [15] 游银川. 皱纹盘鲍肌肉质构相关蛋白酶的研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2016.
- [16] JIANG S T, HER Y H, LEE J J, et al. Comparison of the cathepsin D from mackerel (*Scomber australasicus*) and milkfish (*Chanos chanos*) muscle [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1993, 57(4): 571-577.
- [17] AOKI T, YAMASHITA T, UENO R. Purification and characterization of a cathepsin B-like enzyme from mackerel white muscle [J]. Fisheries Science, 1995, 61(1): 121-126.
- [18] OGATA H, ARANISHI F, HARA K, et al. Proteolytic degradation of myofibrillar components by carp cathepsin L [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998, 76(4): 499-504.
- [19] 王梦想, 钟婵, 蔡秋凤, 等. 蓝圆鲹肌肉中丝氨酸蛋白酶的分离纯化及性质研究 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(19): 58-62.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)