

文章编号: 1000-0615(2005)04-0502-05

大豆胰蛋白酶抑制剂对鲢丝氨酸蛋白酶的作用

蒋欣静^{1,2}, 王锡昌², 周常义¹, 翁凌¹, 曹敏杰¹

(1. 集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘要: 研究了大豆胰蛋白酶抑制剂(STI)对鲢肌肉中肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶(MBSP)引起的肌原纤维蛋白降解作用的影响。大豆胰蛋白酶抑制剂经高度纯化后加入肌原纤维中以判断它对 MBSP 的抑制效果。在不添加 STI 的情况下, 55 °C 加热 30 min 即可观察到肌球蛋白重链的分解, 延长加热时间则可检测到肌动蛋白及原肌球蛋白的降解。相反, 在终浓度为 0.75 μg·mL⁻¹ 的 STI 存在下, 包括肌球蛋白重链在内的肌原纤维蛋白降解均能得到有效抑制, 表明 STI 是 MBSP 的特异性抑制剂。由于肌球蛋白重链及肌动蛋白的完整性是构成鱼糜制品凝胶强度的主要因素, 因此, STI 的添加有可能提高鲢鱼糜制品的凝胶强度。

关键词: 鲢; 大豆胰蛋白酶抑制剂; 肌原纤维; 丝氨酸蛋白酶

中图分类号: Q946.1 文献标识码: A

The inhibitory effect of soybean trypsin inhibitor on an endogenous serine proteinase of silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*

JIANG Xin-jing^{1,2}, WANG Xi-chang², ZHOU Chang-yi¹, WENG Ling¹, CAO Min-jie¹

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

2. College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The effect of soybean trypsin inhibitor (STI) on the degradation of silver carp myofibrillar proteins caused by an endogenous myofibril-bound serine proteinase (MBSP) was studied. Soybean trypsin inhibitor was purified to homogeneity and added to myofibril to investigate its effect on preventing myofibrillar protein degradation. In the absence of STI, incubation at 55 °C for 30 min caused the degradation of myosin heavy chain. The degradation of actin and tropomyosin could also be detected after prolonged incubation. Compared with control, in the presence of STI, with final concentration of 0.75 μg·mL⁻¹, proteolysis of myofibrillar proteins was greatly suppressed, the result showed that STI was an effective inhibitor in preventing degradation caused by MBSP. As the integrity of myosin heavy chain (MHC) and actin was the most important factor forming the elasticity of surimi, this result suggested the possibility that STI is applicable in surimi production in order to enhance the elasticity that is the quality of the final products.

Key words: silver carp; soybean trypsin inhibitor; myofibril; serine proteinase

鱼类肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶(myofibril-bound serine proteinase, MBSP)在上世纪 70 年代被发现, 但是直到近年才被分离纯化。近年的研究中, 作者等已分别从狗母鱼^[1]和鲤^[2]肌肉中获得 MBSP 高纯度蛋白并对它们的 N 端氨基酸序列进行了测定^[1,3]。MBSP 在 55 °C 下能

强烈分解鲢肉中肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC), 并能在一定程度上引起其它肌原纤维蛋白如 α 辅肌动蛋白(α-actinin)、肌动蛋白(actin)、原肌球蛋白(tropomyosin)等的降解^[1,4]。

我国是淡水鱼养殖大国, 制作鱼糜制品是淡水鱼加工利用的一个主要方向。而凝胶劣化现象

收稿日期: 2004-08-30

资助项目: 教育部回国留学人员科研启动基金; 福建省自然科学基金(C0410036)

作者简介: 蒋欣静(1981-), 女, 福建厦门人, 硕士研究生, 主要从事食品生物化学与营养卫生等研究

通讯作者: 曹敏杰, Tel: 0592-6180378, Fax: 0592-6180470, E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

是影响鱼糜制品弹性及其商品价值的主要原因^[5-8]。国内外的研究普遍认为内在性蛋白酶分解MHC等肌原纤维蛋白是引起凝胶劣化的根本原因^[5-9]。由于鱼糜制品加工过程中需经反复漂洗、脱水等工艺,因此推断制品中可溶性蛋白酶类(如组织蛋白酶)的残留量极低,对肌原纤维蛋白的分解作用影响不大。目前,越来越多的研究表明无论是以淡水鱼或海水鱼为原料,肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶(MBSP)对肌原纤维蛋白,尤其是对MHC的分解作用是导致凝胶劣化的根源^[1,2,4-8]。因此,如果能找到一种有效抑制MBSP活性的蛋白酶抑制剂抑制其对肌原纤维蛋白的分解则有可能提高鱼糜制品的凝胶强度,改善其品质。作为MBSP抑制剂加入鱼糜制品中的添加剂必须是食用安全的。天然植物中含有丰富的蛋白酶抑制剂,从大豆中纯化而得的大豆胰蛋白酶抑制剂(soybean trypsin inhibitor, STI)已被证明是一种对热稳定的蛋白酶抑制剂,且可添加于食品^[10]。

本文的目的旨在研究STI对引起鲢肌原纤维蛋白降解的内在性丝氨酸蛋白酶(MBSP)的抑制效果,进而探讨STI应用于淡水鱼糜制品加工的可行性。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

原料鱼 从厦门集美市场购买活的鲢(体重约1500g),急杀采肉后的试样鱼肉立即使用或置于-80℃冰箱保藏。

试剂 SDS-PAGE及Western blot所用的标准蛋白样液从Bio-Rad公司购得。大鼠抗真鲷原肌球蛋白多克隆抗体由本研究室保存。大鼠抗真鲷 α 辅肌动蛋白、肌动蛋白多克隆抗体由日本长崎大学水产学部橘胜康教授提供。兔抗大鼠IgG-HRP由DAKO公司购得。猪胰蛋白酶来自Sigma公司,荧光合成底物t-Butyloxycarbonyl-Phe-Ser-Arg-4-methylcoumaryl-7-amide (Boc-Phe-Ser-Arg-MCA)由Peptide Institute购得。

仪器设备 高速冷冻离心机(Avanti, Beckman, 美国)荧光分光光度计(FP-6200, Jasco, 日本),凝胶成像仪(VILBER LOURMAT, 法国),组织捣碎机(PT2100, 瑞士),恒温水浴(MEMMERT, 德国),电泳槽及电转移装置(Bio-

Rad, 美国)等。

1.2 大豆胰蛋白酶抑制剂的制备

大豆浸泡于20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0)的缓冲液中,过夜后用组织捣碎机捣碎。在60℃下加热90 min即得大豆胰蛋白酶抑制剂粗提液。15 000×g下离心15 min,上清液上样于DEAE-Sephrose层析柱。用0~0.5 mol·L⁻¹ NaCl梯度洗脱,收集活性部分并用YM-10超滤膜浓缩。浓缩液上样于Sephacryl S-200层析柱(1.64 cm×98 cm),用含0.2 mol·L⁻¹ NaCl的20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0)洗柱。收集活性部分即为高度纯化的大豆胰蛋白酶抑制剂。

1.3 肌原纤维的制备

新鲜鲢背肌(重约20g)用组织捣碎机以四倍体积的冰冷20 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液(I=0.24)(pH 7.5)捣碎。重复两次(每次不超过30s,中间间隔1min),将悬浮液于9 000×g离心15 min,弃上清,得沉淀。将沉淀重新悬浮于4倍体积的去离子水中并捣碎,再以同样的条件离心,再次取用沉淀,如此重复4次。将最后一次离心得到的沉淀溶解在含有0.5 mol·L⁻¹ NaCl的0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.5缓冲液中,得到的溶液即为鲢肌原纤维。

1.4 鲢MBSP粗酶液的提取及活性测定

取鲢肌肉(约200g),参考文献[1]的方法进行提取鲢MBSP粗蛋白酶液。

酶活力测定依照Osatomi的方法^[2]修改。即用Boc-Phe-Ser-Arg-MCA为底物。反应体系包括850 μ L的20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0; 50 μ L的MBSP酶溶液以及100 μ L的底物(10 μ mol·L⁻¹)使总体积为1 mL。反应在55℃下进行20 min。反应后,立即加入1.5 mL终止液(甲醇:异丙醇:水=35:30:30, v/v)以终止反应。然后通过荧光分光光度计在激发波长(Ex)380 nm以及发射波长(Em)450 nm条件下测得所释放的7-氨基-4-甲基香豆素(7-amino-4-methylcoumarin, AMC)的荧光强度以推测酶活力。

1.5 STI对MBSP的抑制效果

将不同浓度的STI(0~0.75 μ g·mL⁻¹)加入920 μ L 20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0)中,同时加入20 μ L的粗MBSP酶液。室温放置20 min后加入10 μ mol·L⁻¹ Boc-Phe-Ser-Arg-MCA底物50 μ L在55℃下加热20 min,加入终止液1.5 mL后测定

酶活性。

1.6 STI对肌原纤维降解作用的影响

由于MBSP的天然底物是肌原纤维蛋白,因此,除了合成底物(MCA底物)外,更有必要研究STI对由MBSP引起的肌原纤维蛋白分解的抑制作用。方法如下:取100 μL 肌原纤维,加入STI使其终浓度为 $0.75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。对照样用缓冲液代替STI。反应液首先在室温下放置30 min以保证STI与MBSP充分作用,后置于 55°C 加热不同时间(0, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h)。加热后样品即进行SDS化以用于SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)及蛋白质印迹(Western Blot)分析。蛋白浓度由Lowry^[11]的方法而定,标准蛋白为牛血清白蛋白。

1.7 SDS-PAGE及Western Blot

SDS-PAGE参照Laemmli法^[12]进行以考马氏亮蓝染色;Western blot依照Towbin法^[13]进行以二氨基联苯胺(3, 3'-diaminobenzidine, DAB)显色。

2 结果

2.1 大豆胰蛋白酶抑制剂的纯化及性质

通过加热处理,DEAE-Sepharose离子交换层析及Sephacryl S-200凝胶过滤,获得高度纯化的大豆胰蛋白酶抑制剂(图1)。纯化蛋白的分子量为21.5 kD,性质分析的结果为Kunitz型抑制剂。

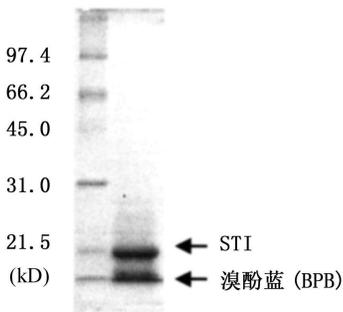


图1 纯化后的大豆胰蛋白酶抑制剂 SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE of purified STI

2.2 STI对MBSP的抑制作用

图2表示STI对MBSP的抑制作用。由图可知,随着STI添加量的增加,MBSP的活性也相应下降,表明STI对MBSP有良好的抑制效果。即使STI终浓度为 $75 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的情况下,对MBSP的抑制活性仍可达60%。

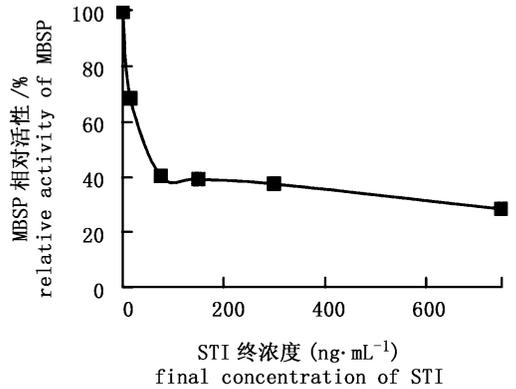


图2 STI对鲢MBSP的抑制作用

Fig.2 Inhibitory effect of STI on the proteolytic activity of silver cap MBSP

2.3 STI对由MBSP引起的鲢肌原纤维降解的影响

动物肌原纤维包含多种结构蛋白,主要有肌球蛋白, α 辅肌动蛋白,肌动蛋白,原肌球蛋白,肌钙蛋白等。图3A表示鲢肌原纤维在不添加STI的情况下于 55°C 加热不同时间的结果。由图可知,加热30 min后肌球蛋白重链(MHC)已有较大程度的分解(50%以上),2 h后这种分解已达80%,4 h后MHC几乎完全分解。相反,在STI存在下(图3B),加热1 h对MHC的分解并不明显。即使加热8 h,仍有30%的MHC残留。此结果表明STI对由肌原纤维内在蛋白酶引起的MHC的分解具有良好抑制效果。由于鲢肌原纤维在调制过程中经反复组织捣碎及离心弃上清等操作,可溶性蛋白酶已充分去除,而STI又是丝氨酸蛋白酶抑制剂,由此推断,肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶(MBSP)是引起MHC分解的主要原因。

2.4 STI对肌原纤维中其它结构蛋白的分解作用

MHC因分子量大(200 kD)、含量高等特点,其分解情况可直接在SDS-PAGE上观察到。而其它结构蛋白则因含量低以及分子量小等原因易受到大分子量蛋白(如MHC)分解产物的影响而难于在SDS-PAGE上直接观察它们的分解情况。在本研究中我们采用针对主要结构蛋白 α 辅肌动蛋白、肌动蛋白及原肌球蛋白的特异性多克隆抗体以Western-blot法检察这些蛋白的分解从而判断STI的抑制效果。

α 辅肌动蛋白的分解 图4为 α 辅肌动蛋白在不添加(A)及添加(B)STI情况下加热不同

间的 Western blot 结果。由图可知, 与 MHC 不同, 两种条件下蛋白都不发生分解, 提示 MBSP 对 α -辅肌动蛋白的分解能力较弱。

肌动蛋白的分解 图 5 为肌动蛋白在不添加(A) 及添加(B) STI 情况下加热不同时间的 Western blot 结果。由图可见在不添加 STI 时 2 h 加热即产生分解, 4 h 后有明显的分解产物产生。在添加 STI 情况下, 即使加热 8 h 仍只有少量分解现象产生, 表明 STI 对由 MBSP 引起的肌动蛋

白的分解有良好的抑制作用。

原肌球蛋白的分解 图 6 为原肌球蛋白在不添加(A) 及添加(B) STI 情况下加热不同时间的 Western blot 结果。由图可见在不添加 STI 时 1 h 加热即产生明显分解, 8 h 后 70% 以上的蛋白即被分解。相反, 在添加 STI 情况下, 4 h 加热仍无明显分解现象产生, 同样表明 STI 对由 MBSP 引起的原肌球蛋白的分解有良好的抑制作用。

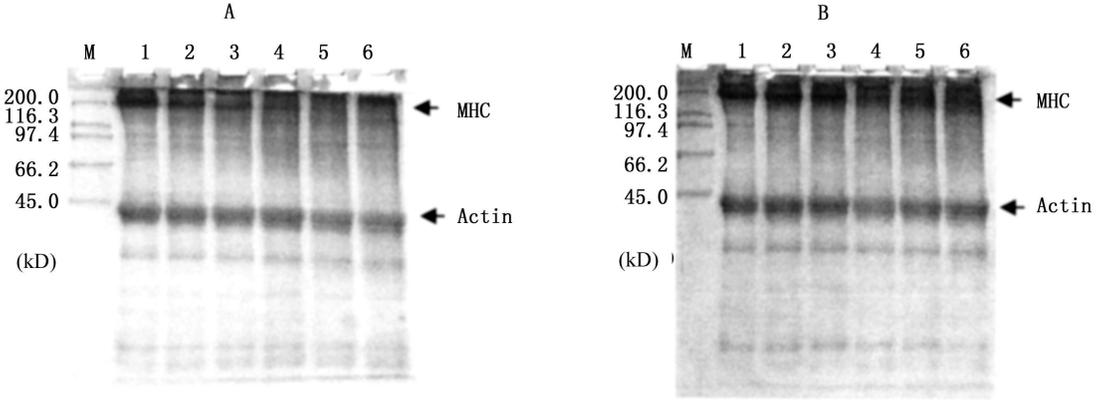


图 3 不添加(A) 或添加(B) STI 下由 MBSP 引起的肌原纤维的分解情况

Fig. 3 Degradation of myofibrillar proteins by MBSP in the absence (A) and presence (B) of STI

M, 标准蛋白; 1. 0 min; 2. 30 min; 3. 1 h; 4. 2 h; 5. 4 h; 6. 8 h

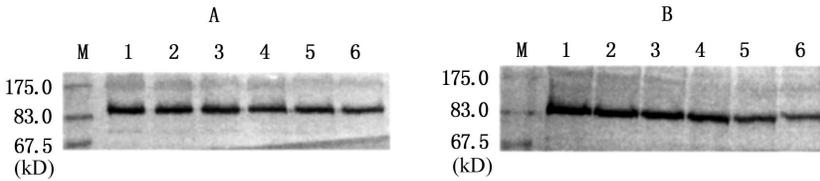


图 4 不添加(A) 或添加(B) STI 下由 MBSP 引起的肌原纤维 α 辅肌动蛋白的分解情况

Fig. 4 Degradation of α -actinin by MBSP in the absence (A) or presence (B) of STI

M, 标准蛋白; 1. 0 min; 2. 30 min; 3. 1 h; 4. 2 h; 5. 4 h; 6. 8 h

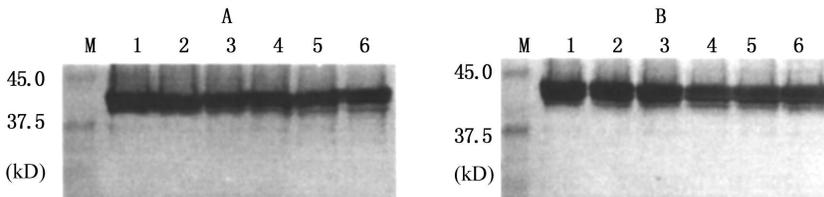


图 5 不添加(A) 或添加(B) STI 下由 MBSP 引起的肌动蛋白的分解情况

Fig. 5 Degradation of actin by MBSP in the absence (A) or presence (B) of STI

M, 标准蛋白; 1. 0 min; 2. 30 min; 3. 1 h; 4. 2 h; 5. 4 h; 6. 8 h

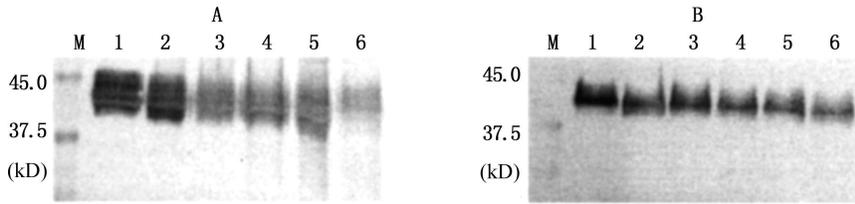


图6 不添加(A)或添加(B)STI下由MBSP引起的原肌球蛋白的分解情况

Fig. 6 Degradation of tropomyosin by MBSP in the absence (A) or presence (B) of STI

M, 标准蛋白; 1. 0 min; 2. 30 min; 3. 1 h; 4. 2 h; 5. 4 h; 6. 8 h

3 讨论

本研究纯化得到的STI分子量为21.5 kD,属Kunitz型抑制剂。STI对热稳定,即使在100℃下加热30 min仍能保持55%以上的活性。体外研究表明STI对MBSP有很强的抑制效果。迄今为止的研究已证明肌球蛋白重链(MHC)的分解是鱼糜制品网状结构破坏的主要原因,而且凝胶劣化产生的温度区域是50~60℃^[1,2,4-9]。因此,鱼糜制品制作过程中必须快速通过此温度带。已知的引起鱼类肌原纤维蛋白分解的结合型丝氨酸蛋白酶的最适温度均为55℃^[1,2,4],此结果与凝胶劣化产生的温度区域相吻合。MBSP对MHC及原肌球蛋白的分解作用强烈而对 α -辅肌动蛋白及肌动蛋白的作用不明显。推断这与底物蛋白质的结构有直接关系。肌球蛋白及原肌球蛋白为线型结构而肌动蛋白为球型结构,前者易受蛋白酶攻击而后者则不易。此结果与Cao等^[1,4]的研究结果相似。由于MBSP是具有胰蛋白酶性质的丝氨酸蛋白酶,对胰蛋白酶抑制剂敏感。本研究中SDS-PAGE及Western blot的结果均表明添加STI可有效抑制由MBSP引起的肌原纤维蛋白,尤其是MHC的分解。

Osman等^[10]认为STI是一种抗营养因子。因此,作为食品添加剂有必要对其作加热灭活处理,但少量添加并无不良影响^[14]。本研究在肌原纤维中所加入的STI量为 $0.75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,属低浓度。最近,有报道用来自豆类的蛋白酶抑制剂来改善大西洋白姑鱼(*Atlantic croaker*)及墨西哥鲆(*Mexico flounder*)鱼糜制品品质的研究^[15]。尽管他们对引起肌原纤维蛋白分解的蛋白酶未作深入研究,但此酶为丝氨酸蛋白酶,基本性质与MBSP相似,提示了MBSP在不同鱼种间广泛存在的可能性。以鲢为主的淡水鱼糜制品的品质改善一直是水产品加工中有待解决的问题,本研究结果提示了STI在鱼糜制品生产中应用的可行性。

参考文献:

- [1] Cao M J, Osatomi K, Hara K, *et al.* Identification of a myofibril-bound serine proteinase (MBSP) in the skeletal muscle of lizard fish *Saurida wanieso* which specifically cleaves the arginine site [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2000, 125(B): 255-264.
- [2] Osatomi K, Sasai H, Cao M J, *et al.* Purification and characterization of myofibril-bound serine proteinase from carp *Cyprinus carpio* ordinary muscle [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1997, 116(B): 183-190.
- [3] Cao M J, Osatomi K, Pennkey H, *et al.* Cleavage specificity of a myofibril-bound serine proteinase from carp (*Cyprinus carpio*) muscle [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1999, 123(B): 399-405.
- [4] Cao M J, Hara K, Osatomi K, *et al.* Myofibril-bound serine proteinase (MBP) and its degradation of myofibrillar proteins [J]. *J Food Sci*, 64: 644-647.
- [5] Toyohara H, Shimizu Y. Relation between the Modori phenomenon and myosin heavy chain breakdown in thread-bream gel [J]. *Agri Biol Chem*, 1988, 52: 255-257.
- [6] Toyohara H, Sakata T, Yamashita K, *et al.* Degradation of oval-filefish meat gel caused by myofibrillar proteinase(s) [J]. *J Food Sci*, 1996, 52: 364-368.
- [7] Shimizu Y, Machida R, Takenami S. Species variations in the gel-forming characteristics of fish meat paste [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1981, 47: 95-104.
- [8] Shimizu Y, Nomura A, Nishioka F. Modori (fish gel degradation occurring at around 60℃)-inducing property of croaker myosin preparation [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1986, 52: 2027-2032.
- [9] 王锡昌,汪之和. 鱼糜制品加工技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,1997.
- [10] Osman M A, Reid P M, Weber C W. Thermal inactivation of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*), soybean and lima bean protease inhibitors: effect of acidic and basic pH [J]. *Food Chem*, 2002, 78: 419-423.
- [11] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A J, *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265-275.
- [12] Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [13] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 4350-4354.
- [14] Friedman M, Brandon D L. Nutritional and health benefits of soy proteins [J]. *J Agri Food Chem*, 2001, 49: 1069-86.
- [15] Ramirez J A, Garcia-Carreño E L, Morales O G, *et al.* Inhibition of modori-associated proteinases by legume seed extracts in surimi production [J]. *J Food Sci*, 2002, 67: 578-581.