

# 葵花籽粗油体中内源性蛋白酶系的性质探究以及鉴定

单秀民, 彭 姣, 陈业明

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:**通过电泳探究葵花籽粗油体中内源性蛋白酶系的水解性质,以及用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)鉴定内源性蛋白酶的种类。结果表明,油质蛋白在 pH 4~8 水解速度相对较快,22 kDa 球蛋白在 pH 3~5 水解速度相对较快,35 kDa 球蛋白在 pH 4~8 水解速度相对较快。葵花籽粗油体中内源性蛋白酶系在 pH 4、50℃ 水解速度相对最快。通过抑制剂实验发现,在 pH 4 下,葵花籽粗油体中有金属蛋白酶类、天冬氨酸蛋白酶类、丝氨酸蛋白酶类的酶活表征,几乎无半胱氨酸蛋白酶酶活的存在。通过 LC-MS/MS 分析发现,葵花籽粗油体中存在金属蛋白酶类、天冬氨酸蛋白酶类和丝氨酸蛋白酶类和天冬氨酸蛋白酶类抑制剂、丝氨酸蛋白酶类抑制剂以及半胱氨酸蛋白酶类抑制剂。研究结果为利用内源性蛋白酶类进行水相加工提供了理论基础。

**关键词:**葵花籽;粗油体;内源性蛋白酶系

中图分类号:TS225;TS201.2 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2020)11-0068-05

## Properties and identification of endogenous proteases in crude sunflower seed oil body

SHAN Xiumin, PENG Jiao, CHEN Yeming

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:** The hydrolytic properties of endogenous proteases in crude sunflower seed oil body were analyzed by Tricine-SDS-PAGE, and the types of endogenous proteases were identified by LC-MS/MS. The results showed that the hydrolysis rate of oleosins was relatively faster at pH 4-8. 22 kDa globulin was rapidly hydrolyzed at pH 3-5, and 35 kDa globulin was rapidly hydrolyzed at pH 4-8. The hydrolysis rates of endogenous proteases in crude sunflower seed oil body were relatively the fastest at pH 4 and 50℃. The results of inhibitor experiments showed that at pH 4, the activities of metalloproteinases, aspartic protease and serine proteases were characterized in crude sunflower seed oil body, and there was almost no cysteine protease activity. LC-MS/MS analysis revealed that the metalloproteinases, aspartic protease and serine proteases, and aspartic proteases inhibitor, serine proteases inhibitor and cysteine protease inhibitor were presented in crude sunflower seed oil body. The research results provided a theoretical basis for the use of endogenous proteases for aqueous processing.

**Key words:** sunflower seed; crude oil body; endogenous protease

收稿日期:2020-02-12;修回日期:2020-06-20

基金项目:国家自然科学基金青年基金(31301496)

作者简介:单秀明(1991),男,在读硕士,研究方向为油脂及植物蛋白工程(E-mail)Bruceshan2014@163.com。

通信作者:陈业明,副教授(E-mail)chenyeming@jiangnan.edu.cn。

近年来有学者在对植物油料种子水相加工过程中发现了内源性蛋白酶,且发现这些内源性蛋白酶可以在特定的条件下水解自身的蛋白质,还发现水解油质蛋白的程度越大,破乳率越高<sup>[1-2]</sup>。油质蛋白是稳定油体结构(脂肪贮存的细胞器)的重要蛋白质<sup>[3]</sup>。组成油体结构的蛋白质包括油质蛋白、油体钙蛋白和油体固醇蛋白<sup>[4]</sup>。赵路莘<sup>[1]</sup>在大豆粗

油体中发现一种内源性蛋白酶——半胱氨酸蛋白酶,可以水解油质蛋白。陈雅静<sup>[2]</sup>在对花生进行湿法磨浆后离心分离,对获得的上浮层(即粗油体,富含油脂和少量的蛋白质)进行研究,发现其中存在一种天冬氨酸蛋白酶,可以在一定条件下水解油体外源性蛋白(不组成油体结构的蛋白质)和油体内源性蛋白,在温度和酶的共同作用下,使得粗油体破乳率高达94.73%。研究<sup>[1,5]</sup>报道,葵花籽粗油体在35℃、pH 6.5时14.1~19.2 kDa油质蛋白会被水解,水浴9 h后17.3~19.2 kDa油质蛋白水解了34.89%,14.1 kDa油质蛋白水解了29.07%;葵花籽粗油体在70℃和pH 5下反应2 h,破乳率可达到90%以上。这些研究表明植物油料种子中的内源性蛋白酶具有一定的差异和较好的应用前景。

目前,对葵花籽粗油体中内源性蛋白酶的种类及其性质的探究未见报道。因此,本文对葵花籽粗油体中内源性蛋白酶系的性质进行探究及鉴定。通过湿法打浆,对葵花籽浆液进行离心分离,获得上浮层(即粗油体)和其他部分,其他部分可以进一步加工处理制备蛋白粉。研究葵花籽粗油体中内源性蛋白酶的最适水解pH、水解温度和蛋白酶的鉴定,为葵花籽粗油体利用内源性蛋白酶破乳提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

葵花籽,购于内蒙古巴彦淖尔;氢氧化钠、盐酸,分析纯,购于国药集团;10~250 kDa标准蛋白,购于美国Bio-Rad公司;其他试剂,购于美国Sigma公司。

上海泸西90型磁力搅拌器,梅特勒台式pH计,九阳JYL-Y5破壁料理机,日本Himac CR-21G II冷冻离心机,Mini-PROTEAN型垂直电泳仪,ChemiDoc XRS+凝胶成像仪,Q Exactive质谱仪(Thermo Fisher)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 粗油体的制备

将葵花籽去壳后加5倍的去离子水浸泡,置于4℃放置18 h,然后加入其原始质量9倍的去离子水,使用九阳破壁料理机以18 000 r/min的速度打浆2 min,后用四层纱布过滤将滤渣除去,滤液为葵花籽浆。将葵花籽浆置于冷冻离心机,保持4℃,4 000 r/min离心15 min,收集上浮层。上浮层即为葵花籽粗油体。

#### 1.2.2 粗油体中内源性蛋白酶系作用的最适pH和温度的探究

将葵花籽粗油体用去离子水稀释使其蛋白质质

量浓度为4 mg/mL,分为9份,分别调节pH至3、4、5、6、7、8、9、10、11后,置于50℃水浴2 h,取样进行Tricine-SDS-PAGE分析。

将葵花籽粗油体用去离子水稀释使其蛋白质质量浓度为4 mg/mL,调节至作用的最适pH,分为6份,分别置于30、40、50、60、70、80℃水浴2 h,取样进行Tricine-SDS-PAGE分析。

#### 1.2.3 抑制剂对于粗油体中内源性蛋白酶系的影响

参考Wilson等<sup>[6]</sup>的方法并作一定修改。向稀释至4 mg/mL的粗油体中分别添加0、0.5、1 mmol/L AEBSF(丝氨酸蛋白酶抑制剂),0、2、4 μmol/L Pepstatin-A(天冬氨酸蛋白酶抑制剂),0、0.25、0.5 mmol/L E-64(半胱氨酸蛋白酶抑制剂),0、5、10 mmol/L EDTA-2Na(金属蛋白酶抑制剂)后,调至pH 4,置于50℃进行水浴,在0、2、4 h取样,进行Tricine-SDS-PAGE分析。

#### 1.2.4 Tricine-SDS-PAGE分析

用去离子水将粗油体稀释至蛋白质质量浓度为4 mg/mL。取稀释后的样品0.5 mL与0.5 mL Tricine-SDS-PAGE样品缓冲液(0.25 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 6.8),1% SDS,2% 巯基乙醇和0.02% 溴酚蓝)混合<sup>[7]</sup>。置于沸水浴中煮3 min,冷却后作为还原性Tricine-SDS-PAGE的上样样品。根据Schagger<sup>[8]</sup>的方法,使用16%的丙烯酰胺分离胶和4%的丙烯酰胺浓缩胶进行。加入10 μL样品于电泳道中,并以30 V、45 mA进行电泳约1 h,直到蓝色线(蛋白质被溴酚蓝染成蓝色)进入分离胶,然后再以100 V、45 mA进行电泳,直至电泳结束。后经过固定,考马斯亮蓝G-520染色,脱色干净后使用Image Lab 3.0软件分析条带强度。

#### 1.2.5 LC-MS/MS分析

将粗油体加入TCA使其质量分数为15%,静置4 h后,于8 000 r/min离心20 min,取沉淀进行冻干,取适量的冻干粉加入40 μL胰蛋白酶缓冲液,37℃孵育16~18 h。取水解液过0.22 μm水膜,然后经毛细管高效液相色谱分离后用Q Exactive质谱仪进行质谱分析,用MaxQuant1.5.5.1检索。

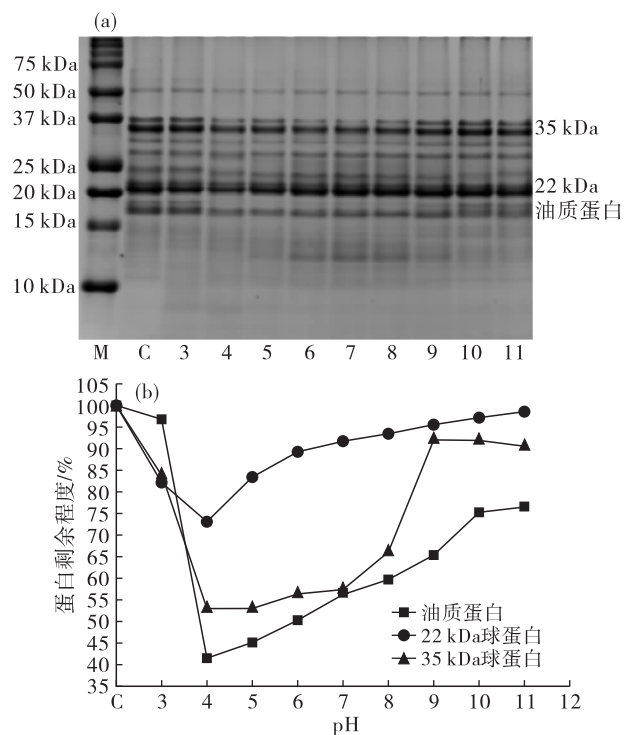
## 2 结果与讨论

### 2.1 pH对内源性蛋白酶活性的影响(见图1)

葵花籽粗油体中含有多种油质蛋白,相对分子质量分别是14.1、17.3、18.1、19.2 kDa,油体钙蛋白相对分子质量分别是25 kDa和28 kDa,油体固醇蛋白相对分子质量是37 kDa<sup>[9-10]</sup>。葵花籽粗油体中还含有大量外源性蛋白,分别是11S球蛋白和2S清

蛋白。11S 球蛋白的酸性肽链(11S - A)相对分子质量在 26 ~ 36 kDa,碱性肽链(11S - B)相对分子质量在 17 ~ 24 kDa<sup>[11]</sup>;2S 清蛋白相对分子质量在 4 ~ 20 kDa<sup>[12]</sup>。

通过对图 1(a)的电泳图进行灰度分析得到图 1(b),发现在 pH 4,50 °C 下油质蛋白水解速度最快,水浴 2 h 后相对于空白被水解 59%。油质蛋白在 pH 3 时水解速度较慢,2 h 水解不到 4%,在 pH 5 ~ pH 8,油质蛋白水解相对较快。这说明葵花籽粗油体中的内源性蛋白酶系偏向于中酸性环境下水解油质蛋白,且水解油质蛋白的最佳 pH 是 4。因为 11S 球蛋白在所提取的葵花籽粗油体中的占比在 80% 以上,因此对占比较大的 22 kDa(11S - B)球蛋白和 35 kDa(11S - A)球蛋白进行分析。发现 22 kDa 球蛋白与油质蛋白有着类似的水解规律,也是在 pH 4 的水解速度最快,但 pH 3 时的水解速度较快,当 pH 大于 5 时,越往碱性方向偏移,水解速度越慢。而 35 kDa 球蛋白在 pH 4 ~ 8 水解速度较快,pH 3 和 pH 9 ~ 11 均水解较慢。因此,pH 4 是粗油体中绝大部分蛋白质的最佳水解 pH。



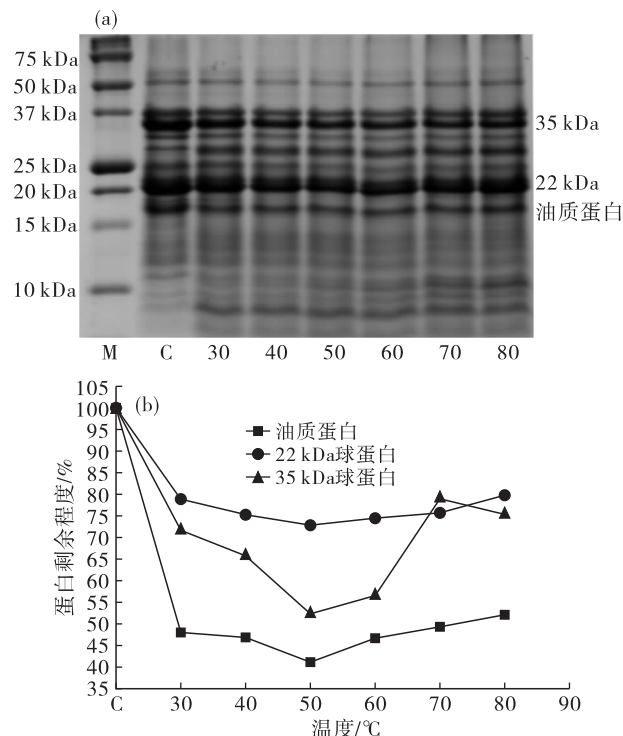
注:M 代表 Marker;C 代表空白(未置于 50 °C 进行水解的原始粗油体稀释样品)。

图 1 不同 pH 下水解 2 h 后粗油体还原性 Tricine - SDS - PAGE(a) 及油质蛋白、22 kDa 球蛋白和 35 kDa 球蛋白条带灰度分析(b)

## 2.2 温度对内源性蛋白酶活性的影响

将稀释后的粗油体调 pH 至 4,置于 30 ~ 80 °C

水解 2 h,取样进行 Tricine - SDS - PAGE 分析,结果见图 2。由图 2b 可见,在 pH 4 时,油质蛋白在 50 °C 时水解速度最快,2 h 可以水解 59% 左右。22 kDa 球蛋白也在 50 °C 水解程度最大,2 h 可以水解 28%,35 kDa 球蛋白也有着相同的水解规律。



注:M 代表 Marker;C 代表空白(未置于 50 °C 进行水解的原始粗油体稀释样品)。

图 2 不同温度下水解 2 h 后粗油体还原性 Tricine - SDS - PAGE(a) 及油质蛋白、22 kDa 球蛋白和 35 kDa 球蛋白条带灰度分析(b)

## 2.3 抑制剂对于内源性蛋白酶活性的影响(见图 3)

从图 3 和添加不同抑制剂后对应实验的电泳图以及 22 kDa 球蛋白与 35 kDa 球蛋白灰度分析结果(图略)可知,Pepstatin - A 的添加对于油质蛋白、22 kDa 和 35 kDa 球蛋白的水解均有一定的抑制效果,AEBSF 对葵花籽粗油体中的蛋白也有微弱的抑制效果,而 E - 64 的添加对粗油体中的蛋白水解并无影响,EDTA - 2Na 的抑制效果最为明显,当 EDTA - 2Na 的浓度为 5 mmol/L 时,4 h 后油质蛋白剩余 73% 左右,22 kDa 和 35 kDa 几乎不水解,不添加抑制剂水解 4 h 油质蛋白可以被完全水解,22 kDa 被水解 43%,35 kDa 被水解 69% 左右,因此表明在 pH 4 时,金属蛋白酶能水解葵花籽粗油体中的大部分蛋白质。添加 EDTA - 2Na 抑制剂后,很多条带浓度均变深,原因有待进一步研究。但抑制剂实验结果显示不添加抑制剂水解 4 h 油质蛋白可以被完全水解,当 Pepstatin - A 浓度为 4 μmol/L 时,

4 h 后油质蛋白还能被水解 60% ;当 AEBSF 浓度为 1 mmol/L 时,4 h 后油质蛋白还能被水解 90% ,这表明还有其他酶类对油质蛋白进行水解。综合 4 个电

泳图结果可知,在 pH 4 时,水解葵花籽粗油体中的蛋白质的是金属蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶。

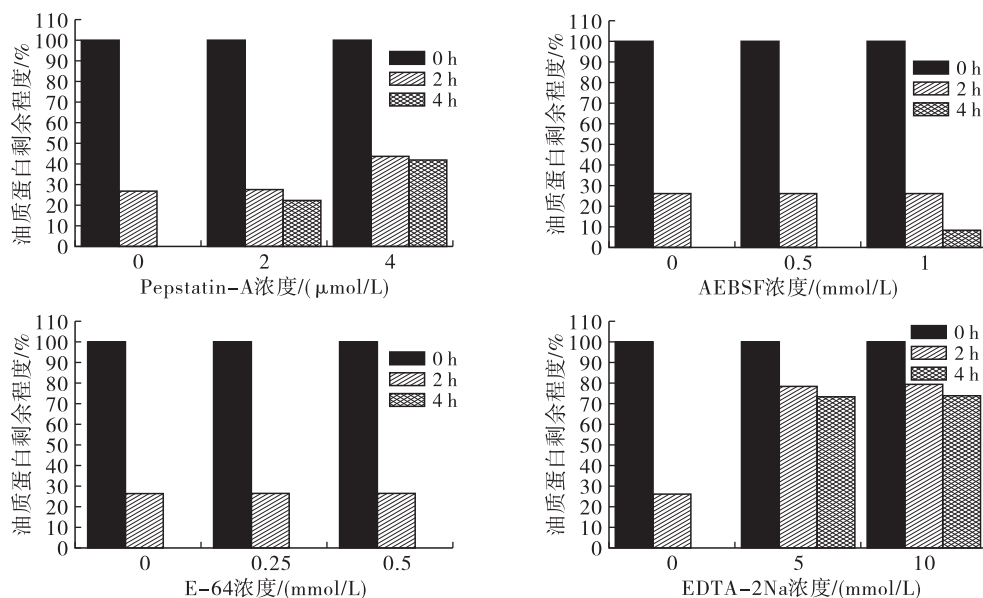


图3 添加不同抑制剂后油质蛋白灰度分析

## 2.4 内源性蛋白酶系以及蛋白酶抑制剂的鉴定 (见表1)

表1 蛋白酶与蛋白酶抑制剂 LC/MS-MS 鉴定结果

序号	蛋白酶和蛋白酶抑制剂	NCBI 登记编号	相对分子质量/kDa	序列长度	丰度
1	CAAX prenyl protease 1 homolog isoform X 2	XP_022017351.1	48.081	423	0.000 004 28
2	Amino peptidase M 1	XP_021981455.1	98.373	873	0.000 001 97
3	Leucine amino peptidase 1 - like	XP_021981455.1	62.136	584	0.000 000 96
4	Probable mitochondrial - processing peptidase subunit beta, mitochondrial	XP_021997291.1	58.190	523	0.000 066 43
5	Mitochondrial - processing peptidase subunit alpha - like	XP_021990517.1	53.797	503	0.000 014 66
6	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC 11 A - like	XP_021999842.1	23.241	205	0
7	Mitochondrial - processing peptidase subunit alpha - like	XP_021996586.1	54.230	503	0
8	Putative signal peptidase complex subunit 2	OTG18360.1	13.103	116	0.000 007 59
9	Probable mitochondrial - processing peptidase subunit beta, mitochondrial	XP_021976362.1	58.676	526	0.000 002 47
10	Aspartic proteinase Asp 1 - like	XP_021982842.1	47.357	431	0
11	Aspartyl protease AED3 - like	XP_022041997.1	45.138	425	0.000 266 09
12	Aspartyl protease family protein 2 - like	XP_021994853.1	50.130	471	0.000 022 14
13	Protein ASPARTIC PROTEASEIN GUARDCELL 1 - like	XP_022008854.1	51.212	479	0.000 007 90
14	Tripeptidyl - peptidase 2	XP_021989224.1	149.380	1 360	0.000 037 01
15	Serine carboxy peptidase - like	XP_021998492.1	56.062	500	0.000 080 33
16	Miraculin - like	XP_022006990.1	21.337	21.337	0.000 064 77
17	Miraculin - like	XP_022009992.1	21.828	21.828	0.000 376 46
18	Serpin - Z X - like	XP_022002213.1	42.620	42.620	0.000 016 35
19	Kunitz trypsin inhibitor 2 - like	XP_022039671.1	21.412	21.412	0.000 029 03
20	Trypsin inhibitor DE - 3 - like	XP_022026172.1	23.892	23.892	0.000 011 69
21	21 kDa protein - like	XP_022006627.1	21.282	21.282	0.000 047 92
22	Cysteine proteinase inhibitor 12 - like isoform X 2	XP_022035573.1	25.148	25.148	0.000 009 59
23	Cysteine proteinase inhibitor B	sp1Q10993.1	11.186	11.186	0.000 092 70
24	UPF0 664 stress - induced protein C 29B 12	XP_021989943.1	22.462	22.462	0.000 008 20

从表 1 可知,所提取得粗油体中 1~9 属于金属蛋白酶类,有 CAAX prenyl protease 1 homolog isoform X 2(金属肽酶 M 48 家族)、Amino peptidase M 1(氨基肽酶 M 1:金属肽酶 M 1 家族)、Leucine amino peptidase 1-like(亮氨酸氨基肽酶:金属肽酶)、Probable mitochondrial-processing peptidase subunit *beta*, mitochondrial、Mitochondrial-processing peptidase subunit *alpha*-like、Signal peptidase complex catalytic subunit SEC 11 A-like、Mitochondrial-processing peptidase subunit *alpha*-like、Putative signal peptidase complex subunit 2、Probable mitochondrial-processing peptidase subunit *beta*, mitochondrial。说明体系中金属蛋白酶主要是肽酶,且总的丰度在 0.000 098 36。10~13 是天冬氨酸蛋白酶类,有 Aspartic proteinase Asp 1-like、Aspartyl protease AED3-like、Aspartyl protease family protein 2-like、Protein ASPARTIC PROTEASE IN GUARDCELL 1-like,且总丰度为 0.000 296 13。14~15 是丝氨酸蛋白酶,有 Tripeptidyl-peptidase 2(三肽基肽酶)、Serine carboxy peptidase-like(丝氨酸羧基肽酶),且总丰度为 0.000 117 34。没有检测到半胱氨酸蛋白酶类,这与抑制剂实验结果一致。在粗油体体系中天冬氨酸蛋白酶类的丰度大于丝氨酸蛋白酶类,丝氨酸蛋白酶类大于金属蛋白酶类。但是抑制剂实验结果显示金属蛋白酶类对粗油体中蛋白水解抑制程度最大,这可能是由于表 1 中序号为 16~24 等抑制剂存在的原因<sup>[13]</sup>。16~17 是 Kunitz 抑制剂,其可以抑制丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶与天冬氨酸蛋白酶<sup>[14]</sup>。18~20 是丝氨酸蛋白酶类抑制剂。21~24 是半胱氨酸蛋白酶类抑制剂。在粗油体体系中并未鉴定出金属蛋白酶类抑制剂。抑制丝氨酸蛋白酶类的抑制剂丰度可达到 0.000 498 30,抑制天冬氨酸蛋白酶类的抑制剂丰度为 0.000 441 23,这些抑制剂使得丰度较高的天冬氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶作用弱于金属蛋白酶。

### 3 结论

葵花籽粗油体中存在内源性蛋白酶系,此蛋白酶系在 pH 4 时油质蛋白和 11S 球蛋白水解速度最快。油质蛋白在 pH 4~8 水解速度相对较快,22 kDa 球蛋白在 pH 3~5 水解速度相对较快,35 kDa 球蛋白在 pH 4~8 水解速度相对较快。在 pH 4 条件下该蛋白酶系的最佳水解温度是 50℃。通过抑制剂添加实验和 LC-MS/MS 鉴定发现粗油体中存在金属蛋白酶类、天冬氨酸蛋白酶类和丝氨酸蛋白酶类,且天冬氨酸蛋白酶类的丰度大于丝氨酸蛋白酶类,

丝氨酸蛋白酶类大于金属蛋白酶类。

### 参考文献:

- [1] 赵路苹. 大豆油体富集物的蛋白质组成及其对油体乳液性质的影响研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学,2017.
- [2] 陈雅静. 花生水相加工过程中内源性蛋白酶的作用机制研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学,2018.
- [3] HUANG A H C. Oil bodies and oleosins in seeds[J]. Annual Rev Plant Physiol Mol Biol, 1992, 43(1): 177-200.
- [4] LIN L J, LIAO P C, YANG H H, et al. Determination and analyses of the N-termini of oil-body proteins, steroleosin, caleosin and oleosin[J]. Plant Physiol Biol (Paris), 2005, 43(8): 770-776.
- [5] ZHAO L P, CHEN Y M, CHEN Y J, et al. Effects of pH on protein components of extracted oil bodies from diverse plant seeds and endogenous protease-induced oleosin hydrolysis[J]. Food Chem, 2006, 200: 125-133.
- [6] WILSON K A, TAN-WILSON A. Proteolysis of the peanut allergen Ara h 1 by an endogenous aspartic proteinase[J]. Plant Physiol Biochem, 2015, 96: 301-310.
- [7] YING Y, ZHAO L, KONG L, et al. Solubilization of proteins in extracted oil bodies by SDS: a simple and efficient protein sample preparation method for Tricine-SDS-PAGE[J]. Food Chem, 2015, 181: 179-185.
- [8] SCHAGGER H. Tricine-SDS-PAGE[J]. Nat Protoc, 2006, 1: 16-22.
- [9] VANDANA S, BHATLA S C. Evidence for the probable oil body association of a thiol-protease, leading to oleosin degradation in sunflower seedling cotyledons[J]. Plant Physiol Biochem, 2006, 44(11/12): 714-723.
- [10] FURSE S, LIDDELL S, ORTORI C A, et al. The lipidome and proteome of oil bodies from *Helianthus annuus* (common sunflower)[J]. J Chem Biol, 2013, 6(2): 63-76.
- [11] LIETZ P, DAMASCHUN G, MULLER J J, et al. The structure of 11-S globulins from sunflower and rape seed. A small-angle X-ray scattering study[J]. Eur J Biochem, 1983, 130(2): 315-320.
- [12] BERECZ B, MILLS E N C, PARADI L, et al. Stability of sunflower 2S albumins and LTP to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion[J]. Food Chem, 2013, 138(4): 2374-2381.
- [13] IWASAKI T, KIYOHARA T, YOSHIKAWA M. Identification of the reactive site of potato proteinase inhibitor II-b for bovine chymotrypsin and a bacterial proteinase[J]. J Biochem, 1973, 74(4): 675-682.
- [14] 张娟, 廖东颖, 缙绪卓, 等. 植物 Kunitz 型蛋白酶抑制剂的结构与功能[J]. 植物生理学报, 2018, 54(9): 23-32.