



## 产大米蛋白水解酶的菌株筛选、酶学性质及制备大米寡肽

唐诚业<sup>1,2,3</sup>, 秦琴<sup>1,2,3</sup>, 颜正飞<sup>1,2,3</sup>, 吴敬<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

<sup>2</sup>江南大学生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

<sup>3</sup>江南大学教育部食品安全国际合作联合实验室, 江苏 无锡 214122

**摘要:**【目的】旨在分离、筛选并鉴定具有大米蛋白降解作用的菌株及其关键蛋白酶, 为高效制备大米寡肽提供制备酶及最优制备条件。【方法】以“水解圈”为评价指标, 从粮食仓库附近土壤筛选获得具有降解大米蛋白能力的菌株; 通过16S rRNA序列分析确定菌株归属; 利用单因素实验获得最佳氮源并初步分析酶学性质; 利用HPLC检测寡肽得率, 并对制备条件进一步优化。【结果】经鉴定具有大米蛋白降解作用的菌株为沙雷氏菌(*Serratia* sp. JWG-D15), 以大米蛋白为氮源培养菌株JWG-D15, 蛋白酶SoPRO产量最高, 其最适温度40 °C, 最适pH 8.0; 在加酶量20 U/mg, 大米蛋白浓度40 mg/mL, 40 °C, 4 h条件下寡肽得率最高72.38%。【结论】以大米蛋白为氮源培养菌株JWG-D15, 蛋白酶SoPRO产量最高; 蛋白酶SoPRO制得的大米寡肽, 其得率是目前行业最高。本研究既丰富了大米寡肽的制备用酶的种类, 又为深入大米寡肽产业化提供一定理论基础。

**关键词:** 大米蛋白, 寡肽, 蛋白酶, 沙雷氏菌

大米蛋白是公认的优质食品蛋白之一, 符合WHO/FAO 推荐的理想模式<sup>[1]</sup>。其合理的氨基酸组成及高生物价可以和牛奶、鸡蛋相媲美<sup>[2]</sup>。同时, 大米蛋白具有低抗原性, 是唯一免于过敏测试的植物蛋白<sup>[3-4]</sup>。相比于其他植物蛋白, 大米蛋白既具备优质蛋白的特性又不含任何抗性因子、毒性物质及酶阻物质。故大米蛋白作为添加剂广

泛应用于婴幼儿配方食品行业。

相对于大米蛋白的低溶解度、强聚集性, 大米肽不仅保留大米蛋白本来的营养价值, 而且溶解性、乳化性、起泡性和表面疏水性等性质均得到显著改善<sup>[5]</sup>。其中氨基酸残基数目在10个以内, 分子量180–1000 Da的大米肽, 统称“大米寡肽”。普遍具有特殊生物活性, 例如寡肽 Oryzatensin

基金项目: 江南大学基本科研计划(青年基金)(JUSRP11968); 江苏省基础研究计划(青年基金)(BK20200599)

\*通信作者。E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2020-05-27; 修回日期: 2020-07-28; 网络出版日期: 2020-08-11

(GYPMYPLPR)能够引起豚鼠回肠收缩、抗吗啡和提高免疫活性<sup>[6]</sup>。寡肽易被肠道吸收,其吸收速率大于游离氨基酸,且不受氨基酸的影响,具有不易饱和的特点。这种独特的吸收优势赋予了大米寡肽潜在的营养价值<sup>[7]</sup>。

目前制备大米寡肽主要有分离提取法、化学法、酶法。其中,酶法安全性高、生产条件温和、易控制、成本低,是制备大米寡肽的最优方法。寡肽的酶法制备用酶以商业蛋白酶为主,如碱性蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶和酸性蛋白酶等。目前用于大米寡肽制备的特异性蛋白酶挖掘研究鲜有报道,仅 Schmidt 等报道利用微生物发酵液制备大米寡肽,得率仅约 16%<sup>[8]</sup>。研究者曾尝试从天然微生物中分离纯化蛋白酶制备大米寡肽,然而得率却不尽人意,如从 *Aspergillus melleus* 分离纯化出具有大米蛋白水解活性的蛋白酶 P,制备的寡肽得率约 24%<sup>[9]</sup>。

本研究兼顾大米寡肽的优异营养价值以及酶法制备大米寡肽的低成本、高可控性等优势,旨在分离、筛选获得具有大米蛋白降解活性的菌株及其关键蛋白水解酶,并为大米寡肽提供制备酶及最优制备条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和仪器

福林酚购于索莱宝公司;琼脂粉购于 Sigma 公司;三氯乙酸购于国药;商业蛋白酶(中性蛋白酶、风味酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、酸性蛋白酶)购于博美公司;大米蛋白购于无锡金农生物科技有限公司;1100 型高效液相色谱购于安捷伦公司;Waters 2695 高效液相色谱仪(配 2487 紫外检测器和 Empower 工作站 GPC 软件)。

### 1.2 培养基

**1.2.1 种子培养基(g/L):** MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, NaCl 5.0, CaCl<sub>2</sub> 0.1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.0, 大米蛋白粉 10.0, pH 7.0。

**1.2.2 发酵培养基(g/L):** MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, NaCl 5.0, CaCl<sub>2</sub> 0.1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.0, 大米蛋白粉 15.0, pH 7.0。

**1.2.3 大米蛋白筛选平板(g/L):** MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, NaCl 5.0, CaCl<sub>2</sub> 0.1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.0, 大米蛋白粉 10.0, 琼脂粉 20.0, pH 7.0。

**1.2.4 基础培养基(g/L):** MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, NaCl 5.0, CaCl<sub>2</sub> 0.1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.0, pH 7.0。

### 1.3 产大米蛋白水解酶菌株的筛选

在无锡市各地粮食仓库附近土壤取得 10 份土样,经生理盐水溶解成 1 g/mL 溶液,于 30 °C、180 r/min 培养 30 min。分别取 200 μL 的 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup> 和 10<sup>-6</sup> 稀释液均匀涂布到大米蛋白筛选平板,在 37 °C 培养箱培养 7 d,挑取有明显透明圈的菌株继续在大米蛋白筛选平板上划线纯化。将单菌落接种到种子培养基培养 24 h,取 2 mL 种子液接入发酵培养基同样条件培养 48 h。10000 r/min 离心 5 min 获得发酵上清液,于 4 °C 保存备用。用打孔器在大米蛋白筛选平板上打孔(孔径 0.4 cm, 3 个孔/平板),将 200 μL 上清液注入孔内,以无菌水为空白对照<sup>[10]</sup>。培养 24 h,测量水解圈直径,其中菌株 JWG-D15 的水解圈直径最大。

### 1.4 菌株 JWG-D15 的鉴定

参照细菌基因组抽提试剂盒提取 DNA。采用细菌通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增 16S rRNA<sup>[11]</sup>。扩增产物经过 1%琼脂糖凝胶电泳检测后,送至苏州金维智生物科技有限公司测序。在

NCBI 数据库 Blast 进行同源性分析, 并选取同源性较高菌株的 16S rRNA 序列构建系统进化树<sup>[12]</sup>。

## 1.5 酶活力测定

采用轻工业部颁布的标准 QB/T1803-93, Folin-酚试剂比色法测定蛋白酶的酶活力。

## 1.6 产大米蛋白水解酶 *SoPRO* 的摇瓶发酵优化

挑取菌株 JWG-D15 的单菌落, 接种于种子培养基中, 于 37 °C 培养 24 h。10000 r/min 离心 10 min 获得菌体, 利用无菌水重悬菌体至菌液  $OD_{600}$  值为 1.0。以此为菌株 JWG-D15 种子液, 并采取 1% 的接种量用于后续实验中。

**1.6.1 氮源对 *SoPRO* 酶活的影响:** 分别将大米蛋白、酵母粉、胰蛋白胨、大豆蛋白、牛肉粉和脱脂奶粉按 1.5% (*W/V*) 加到基础培养基中。将菌株 JWG-D15 接种于上述培养基中, 于 37 °C、180 r/min 培养 48 h 取上清液测酶活并进行 SDS-PAGE 分析。

**1.6.2 发酵时间对 *SoPRO* 酶活的影响:** 将菌株 JWG-D15 接种于最适氮源的基础培养基中, 于 37 °C、180 r/min 培养 84 h。每 12 h 取上清液测酶活。

## 1.7 *SoPRO* 酶学性质

**1.7.1 最适 pH 及稳定性:** 配制不同 pH 值(pH 6.0–12.0)的缓冲液, 代替 1.5 蛋白酶酶活测定方法中的缓冲液, 40 °C 测定 *SoPRO* 活力, 考察最适 pH。将 *SoPRO* 在 pH 7.0–9.0 缓冲液中 40 °C 保温 0、2、4、6、8、12、24、36、48、60、72 h, 测定 *SoPRO* 残留酶活。所用的缓冲体系分别为: 醋酸缓冲体系(pH 4.0–6.0); 磷酸缓冲体系(pH 6.0–7.0); Tris-HCl 缓冲体系(pH 7.0–9.0); 甘氨酸-NaOH 缓冲体系(pH 9.0–12.0)。

**1.7.2 最适温度及热稳定性:** 在 25–60 °C 温度

下, 测定 *SoPRO* 酶活以确定其最适反应温度。为研究 *SoPRO* 的热稳定性, 将 *SoPRO* 于 40、50、55 °C 保温, 每隔一段时间取出部分酶液于冰浴中冷却后, 测定 *SoPRO* 残留酶活。

**1.7.3 底物特异性研究:** 用 1% 偶氮酪蛋白、血红蛋白、牛血清蛋白、大米蛋白、胶原蛋白和纤维蛋白代替 1.4 中酪蛋白底物, 测定 *SoPRO* 残留酶活。

**1.7.4 金属离子对 *SoPRO* 酶活的影响:** 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0 的 *SoPRO* 酶液分别加入 1 mmol/L 不同的金属离子(CaCl<sub>2</sub>、CuSO<sub>4</sub>、MgCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub>、ZnSO<sub>4</sub>、CoCl<sub>2</sub>、NiCl<sub>2</sub>、BaCl<sub>2</sub>、KCl 和 FeCl<sub>3</sub>), 40 °C 保温 5 min 后, 测定 *SoPRO* 酶活力。以无金属离子的酶活为 100%。

**1.7.5 化学物质对 *SoPRO* 酶活的影响:** 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0 的 *SoPRO* 酶液中加入化学物质(SDS、EDTA、DTT、甘油和乙醇), 40 °C 保温 5 min 后, 测定 *SoPRO* 酶活力。以无表面活性剂的酶活为 100%。

## 1.8 *SoPRO* 制备大米寡肽的条件优化

**1.8.1 加酶量对寡肽得率的影响:** 将 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0 的 *SoPRO* 酶液, 按照 2、3、12、20、32 U/mg 的添加量加入到 40 mg/mL 大米蛋白溶液中, 总反应体系 4 mL。在 40 °C、180 r/min 水浴摇床中反应 4 h, 反应结束立即取出沸水灭活 5 min。于 8000 r/min 离心 10 min, 上清液放 4 °C 保存待测寡肽得率。

**1.8.2 大米蛋白底物浓度对寡肽得率的影响:** 按最适加酶量将 *SoPRO* 酶液分别加入 10、20、40、50、80 mg/mL 的大米蛋白底物中, 反应总体系 4 mL, 其余操作同 1.8.1。

**1.8.3 酶解时间对寡肽得率的影响:** 按 1.8.1 和 1.8.2 中最适条件, 在 40 °C、180 r/min 水浴摇床中反应 5 h, 每 1 h 取 1 次样, 其余操作同 1.8.1。

**1.8.4 酶反应温度对寡肽得率的影响:** 选择适合的酶与底物比和底物浓度, 分别在 30、40、50、60、70 °C、180 r/min 水浴摇床中反应 4 h, 其余操作同 1.8.1。

### 1.9 蛋白酶种类对大米寡肽得率的影响

除了 *SoPRO*, 选取中性蛋白酶、酸性蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶、风味酶、胃蛋白酶等 6 种商业蛋白酶在相同加酶量、底物浓度、酶解时间的条件下, 分别在各自最适 pH, 最适温度下 180 r/min 水浴摇床中反应, 其余操作同 1.8.1。

### 1.10 大米寡肽得率的测定

上清液和标准品过 0.22 μmol/L 滤膜, 滤液进行高效液相(HPLC)分析。

色谱条件: 色谱柱: TSKgel 2000 SWXL 300 mm×7.8 mm, 流动相: 乙腈/水/三氟乙酸, 40/60/0.1 (V/V), 检测: UV 220 nm, 流速:

0.5 mL/min, 柱温: 30 °C。

分子量校正曲线所用标准品: (1) 细胞色素 C (MW12384), (2) 杆菌酶(MW1422), (3) 乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(MW451), (4) 乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(MW189), (5) 抑肽酶(MW6500)。

## 2 结果和分析

### 2.1 产大米蛋白水解酶菌株的筛选与鉴定

从大米蛋白筛选平板上共挑取 50 株有明显水解圈的单菌落并继续划线纯化。上述菌株经水解圈直径测定发现, 菌株 JWG-D15 的水解圈直径最大。菌株 JWG-D15 的 16S rDNA 序列与沙雷氏菌属同源性大于 99%, 其中与 *Serratia marcescens* ATCC 274 [AP021873.1]的相似率达 99.79%。系统进化树中, 菌株 JWG-D15 与 *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* ATCC13880 [JMPQ01000005]处于同一支, 具有高同源性(图 1), 故菌株 JWG-D15 鉴定为 *Serratia* sp. JWG-D15。

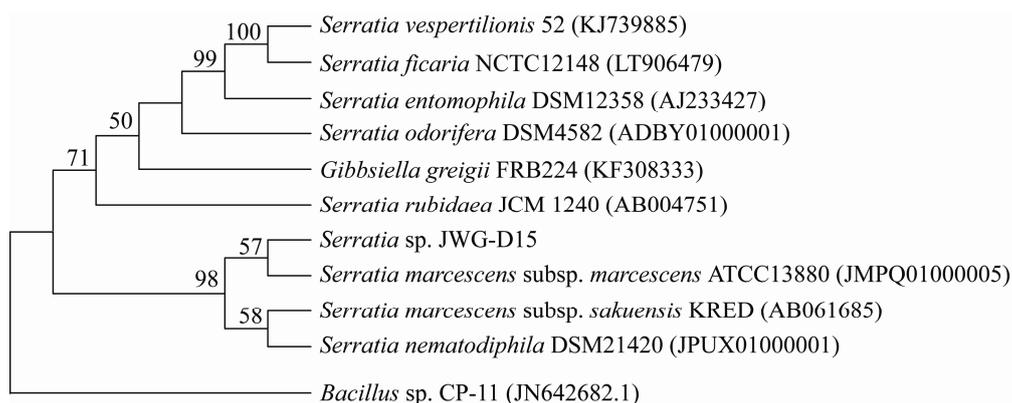


图 1. 基于 16S rRNA 系列的系统进化树

Figure 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences. Establishment of phylogenetic tree of different gene sequences of strain JWG-D15 and other strains. Numbers in parentheses represent accession number of the sequences in GenBank. Numbers on the branches are bootstrap values based on 1000 replicates. Only the bootstrap values greater than 50% are shown.

## 2.2 产大米蛋白水解酶 *SoPRO* 的摇瓶发酵优化

将菌株 JWG-D15 种子液接种到不同氮源的发酵培养基中培养 48 h, 结果表明以大米蛋白作为氮源时, 上清液酶活最高, 477.3 U/mL (表 1)。SDS-PAGE 分析表明, *SoPRO* 分子量在 50 kDa 左右, 其中大米蛋白为氮源的条带较其他氮源的更为清晰, 粗大(图 2)。将其条带切割后经肽指纹图谱鉴定, 与 *Serratia marcescens* 来源蛋白酶的 同源性最高, 即 50 kDa 处清晰条带为 *SoPRO*。以大米蛋白为氮源进行发酵时间的优化, 每 12 h 取样测上清液酶活(图 3), 培养 48 h 后的 *SoPRO* 酶活最高。

表 1. 不同氮源对酶活的影响

Table 1. Effects of different nitrogen sources on enzyme activity

Nitrogen sources	Enzyme activity/(U/mL)
Rice protein	477.3±6.1
Tryptone	237.5±3.3
Yeast	139.1±4.4
Beef powder	119.8±1.3
Non-fat milk	104.3±6.5
Soybean protein	73.3±3.2

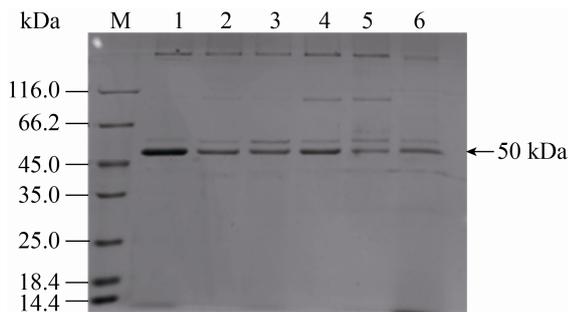


图 2. 不同氮源进行发酵后的上清液 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

Figure 2. SDS-PAGE gel electrophoresis analysis of supernatant by different nitrogen sources. M: standard molecular weight protein; lane 1: rice protein; lane 2: tryptone; lane 3: yeast powder; lane 4: beef powder; lane 5: skim milk powder; lane 6: soy protein.

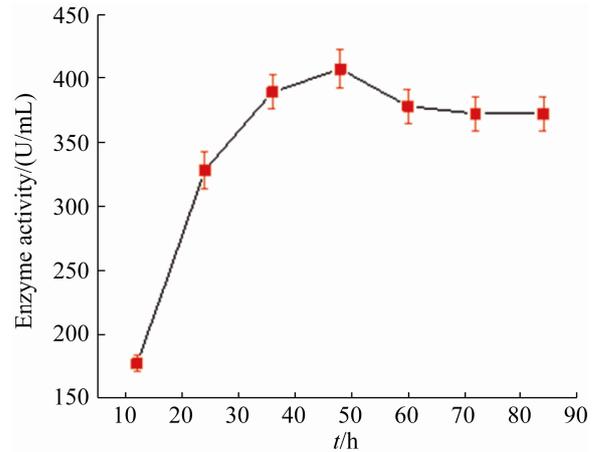


图 3. 发酵时间对 *SoPRO* 酶活的影响

Figure 3. Effect of fermentation time on *SoPRO* activity. Each test was repeated three times in parallel, and the results were expressed as “mean standard deviation”.

## 2.3 *SoPRO* 酶学性质

**2.3.1 最适 pH 及稳定性:** *SoPRO* 在 pH 7.0–9.0 的缓冲液中酶活较接近, 在 pH 8 条件下 *SoPRO* 酶活最高 498.6 U/mL (图 4-A), 表明 *SoPRO* 在中性、弱碱性环境下酶活较高; 在 pH 7.0–9.0 下的半衰期分别是 60、58、1 h (图 4-B), 表明在 pH 7.0 和 8.0 条件下, 其半衰期接近。

**2.3.2 最适温度及热稳定性:** 在 40–55 °C, *SoPRO* 的相对酶活均能达到最大酶活的 92% 以上, 说明 *SoPRO* 能在中温环境下很好生存。温度超过 55 °C 时, *SoPRO* 酶活急剧下降(图 5)。40 °C 下保温 48 h, 其 *SoPRO* 酶活保持在 50% 以上, 具有较好的热稳定性(图 6)。50 °C 和 55 °C 条件下, *SoPRO* 热稳定性较差, 仅保温 20 min 后, *SoPRO* 酶活为 0 U/mL。综合考虑选择 40 °C 作为 *SoPRO* 最适温度。

**2.3.3 底物特异性研究:** 以不同类型蛋白为底物验证了 *SoPRO* 的底物特异性, 如表 2 所示, *SoPRO*

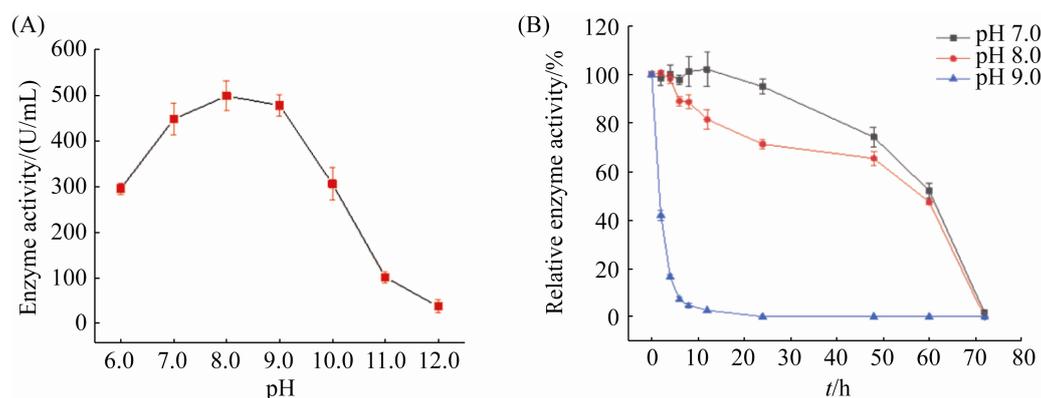


图 4. *SoPRO* 最适 pH 和 pH 稳定性

Figure 4. Optimal pH of *SoPRO* and pH stability of *SoPRO*. A: Optimal pH of *SoPRO*; B: pH stability of *SoPRO*. Each test was repeated three times in parallel, and the results were expressed as “mean standard deviation”.

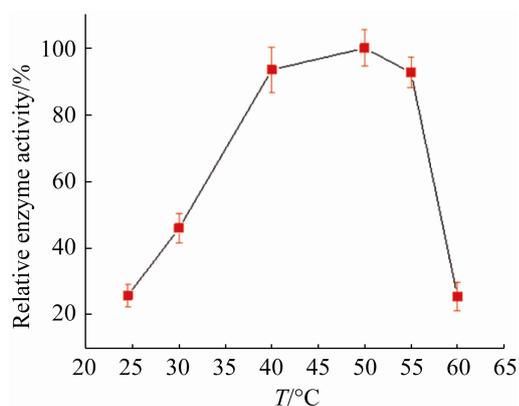


图 5. *SoPRO* 最适温度

Figure 5. Optimum temperature of *SoPRO*. Each test was repeated three times in parallel, and the results were expressed as “mean standard deviation”.

对多种底物均具有活性, 其底物谱较广泛。*SoPRO* 对酪蛋白的酶活最高, 其次纤维蛋白、血红蛋白、偶氮酪蛋白。但 *SoPRO* 对大米底物的酶活较低。

**2.3.4 金属离子对 *SoPRO* 酶活的影响:** 将多种金属离子分别加到 *SoPRO* 酶液中保温 5 min, 考察其 *SoPRO* 酶活(表 3)。其中  $\text{Co}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  能够提高 *SoPRO* 酶活, 说明  $\text{Co}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  能够稳定 *SoPRO* 的结构有助于提升酶活;  $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  对 *SoPRO* 活力无明显作用;  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Ni}^{2+}$  对 *SoPRO* 活力有显著抑制作用。

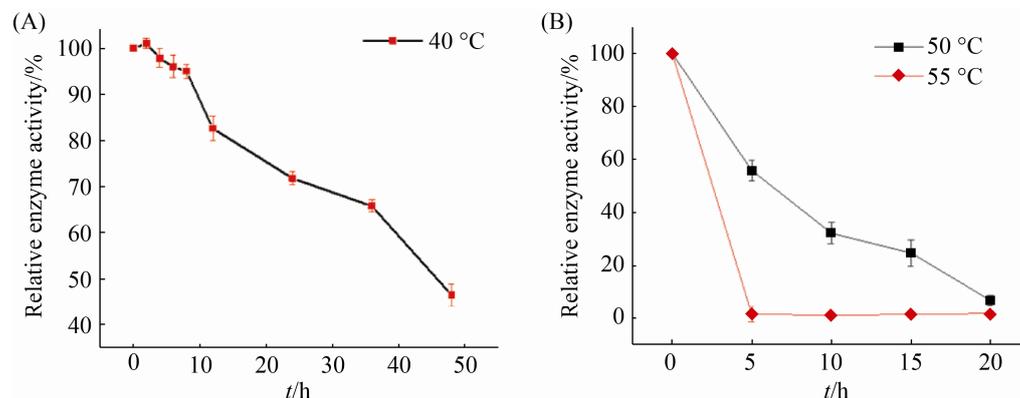


图 6. *SoPRO* 温度稳定性

Figure 6. Temperature stability of *SoPRO*. A: Temperature stability at 40 °C; B: Temperature stability at 50 °C and 55 °C. Each test was repeated three times in parallel, and the results were expressed as “mean standard deviation”.

表 2. 不同蛋白酶底物下 *SoPRO* 的酶活Table 2. *SoPRO* activity under different protease substrates

Substrates (1%)	Relative enzyme activity ( $\pm$ SD%)
Casein	100 $\pm$ 0
Collagen	0.5 $\pm$ 0.1
Fibrin	9.5 $\pm$ 1.2
BSA	0.3 $\pm$ 0.1
Hemoglobin	6.9 $\pm$ 1.0
Rice protein	0.4 $\pm$ 0.1
Azo casein	24.8 $\pm$ 1.4

表 3. 金属离子对 *SoPRO* 的影响Table 3. Effect of metal ions on *SoPRO*

Metal ions	Relative enzyme activity ( $\pm$ SD%)
Control	100 $\pm$ 0
Ba <sup>2+</sup> (BaCl <sub>2</sub> )	106.8 $\pm$ 12.3
K <sup>+</sup> (KCl)	100.2 $\pm$ 12.2
Fe <sup>3+</sup> (FeCl <sub>3</sub> )	90.9 $\pm$ 4.1
Mg <sup>2+</sup> (MgCl <sub>2</sub> )	102.1 $\pm$ 12.4
Ca <sup>2+</sup> (CaCl <sub>2</sub> )	114.0 $\pm$ 2.1
Zn <sup>2+</sup> (ZnCl <sub>2</sub> )	98.5 $\pm$ 5.1
Cu <sup>2+</sup> (CuCl <sub>2</sub> )	23.6 $\pm$ 1.1
Ni <sup>2+</sup> (NiCl <sub>2</sub> )	0.0 $\pm$ 0
Co <sup>2+</sup> (CoCl <sub>2</sub> )	149.1 $\pm$ 21.1
Mn <sup>2+</sup> (MnCl <sub>2</sub> )	93.0 $\pm$ 12.1

**2.3.5 化学物质对 *SoPRO* 酶活的影响:** 如表 4 所示, 1 mmol/L 浓度下 DTT, EDTA 对 *SoPRO* 有激活作用提高了酶活。甘油对 *SoPRO* 酶活无显著作用, 故甘油可以作为 *SoPRO* 保存剂。阴离子表面活性剂 SDS 对 *SoPRO* 有较强的抑制作用; 另外 5%乙醇几乎完全抑制 *SoPRO* 活性。

## 2.4 *SoPRO* 制备大米寡肽的条件优化

**2.4.1 加酶量对寡肽得率的影响:** *SoPRO* 按照 2、3、12、20、32 U/mg 添加到 40 mg/mL 大米蛋白溶液中, 40 °C 水解 4 h 后。寡肽得率如图 7 所示。加酶量 20 U/mg 大米蛋白时, 寡肽达到最高占比 70.38%, 并随加酶量增大出现减小趋势。

表 4. 化学物质对 *SoPRO* 的影响Table 4. Effect of chemicals on *SoPRO*

Chemical materials (1 mmol/L)	Relative enzyme activity ( $\pm$ SD%)
Control	100 $\pm$ 0.1
SDS	3.2 $\pm$ 0.2
EDTA	211.3 $\pm$ 21.2
DTT	340.3 $\pm$ 34.1
Glycerin	109.7 $\pm$ 12.3
Ethanol	0.0 $\pm$ 0

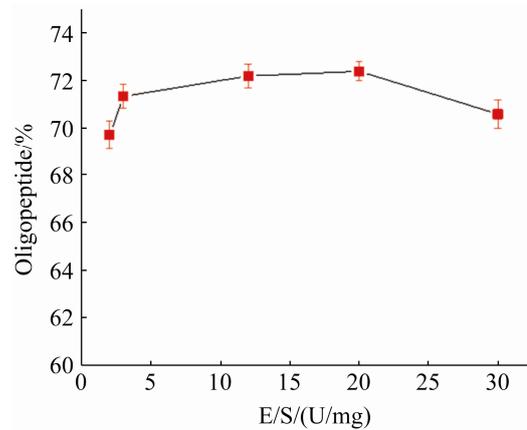


图 7. 加酶量对寡肽得率的影响

Figure 7. Effect of enzyme addition on yield of oligopeptides. Each test was repeated three times in parallel, and the results were expressed as “mean standard deviation”.

**2.4.2 底物浓度对寡肽得率的影响:** 为了研究底物浓度对 *SoPRO* 水解大米蛋白得到寡肽得率的影响, 在 10–80 mg/mL 的底物中加入 *SoPRO* (20 U/mg 大米蛋白), 40 °C 水解 4 h。寡肽得率如图 8 示。底物浓度 40 mg/mL 时, 寡肽得率达到最高 71.93%。

**2.4.3 反应时间对寡肽得率的影响:** 为研究反应时间对 *SoPRO* 水解底物后的寡肽得率的影响, 在 40 mg/mL 底物中加入 *SoPRO* (20 U/mg 大米蛋白) 在 40 °C 分别水解 1、2、3、4、5 h。寡肽得率如图 9 所示, 水解 4 h 时寡肽得率达到最高 72.08%, 之后开始降低。

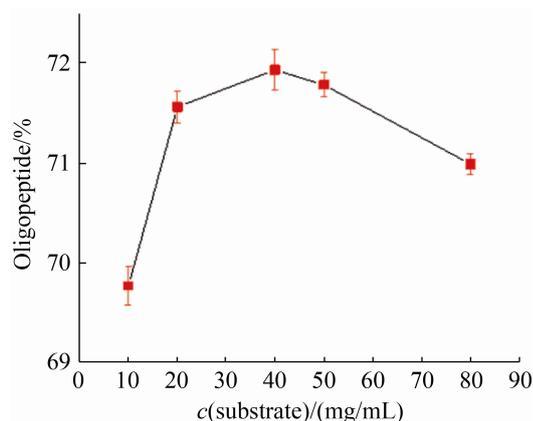


图 8. 底物浓度对寡肽得率的影响

Figure 8. Effect of substrate concentration on yield of oligopeptides. Each test was repeated three times in parallel, and the results were expressed as “mean standard deviation”.

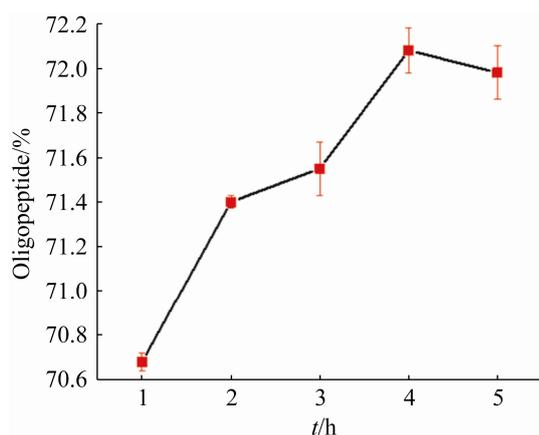


图 9. 反应时间对寡肽得率的影响

Figure 9. Effect of reaction time on yield of oligopeptides. Each test was repeated three times in parallel, and the results were expressed as “mean standard deviation”.

**2.4.4 反应温度对寡肽得率的影响:** 为研究反应温度对 *SoPRO* 水解底物后的寡肽得率的影响, 分别在 30–70 °C, 40 mg/mL 底物中加入 *SoPRO* (20 U/mg 大米蛋白) 反应 4 h。寡肽得率如图 10 所示, 反应温度为 40 °C 时, 寡肽得率最高为 72.38%, 随着温度升高酶渐渐失活, 寡肽得率也随之降低。

**2.4.5 *SoPRO* 与商业蛋白酶的比较:** 为了考察商业蛋白酶与 *SoPRO* 对制备寡肽的情况, 在 20 U/mg 加酶量、40 mg/mL 底物、反应 4 h 条件下各自最适温、最适 pH 水解大米蛋白, 寡肽得率如图 11 所示, *SoPRO* 制备的寡肽得率为 72.38%,

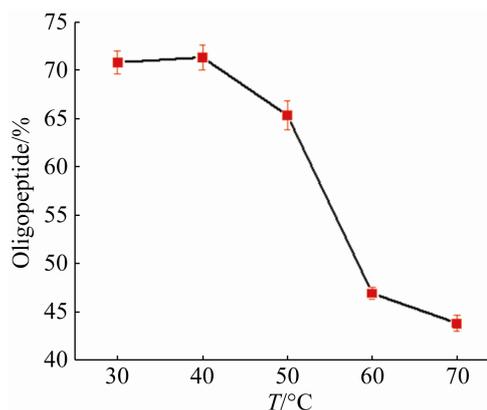


图 10. 反应温度对寡肽得率的影响

Figure 10. Effect of reaction temperature on yield of oligopeptides. Each test was repeated three times in parallel, and the results were expressed as “mean standard deviation”.

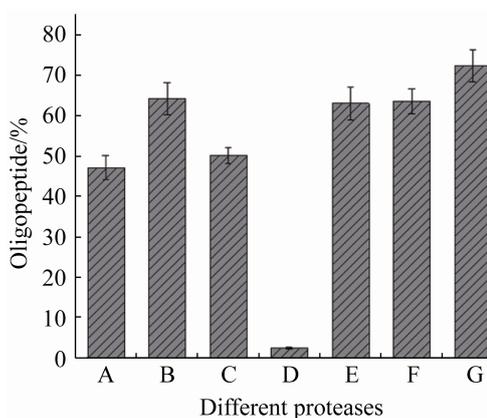


图 11. *SoPRO* 与商业蛋白酶制备大米寡肽

Figure 11. Preparation of oligopeptide by *SoPRO* and commercial proteases. A: Flavor enzyme; B: Neutral protease; C: Trypsin; D: Pepsin; E: Alkaline protease; F: Acid protease; G: *SoPRO*. Each test was repeated three times in parallel, and the results were expressed as “mean standard deviation”.

高于中性蛋白酶(64.13%)、酸性蛋白酶(63.55%)、碱性蛋白酶(63.05%)、胰蛋白酶(50.2%)、风味酶(47.13%)和胃蛋白酶(2.41%)。经分子量分布检测发现, SoPRO 和商业蛋白酶制得的寡肽分子量分布并无显著差异, 即 180–500 Da 的寡肽得率均高于 500–1000 Da 部分。

### 3 讨论

沙雷氏菌属广泛存在于土壤、水体和植物体内, 李志琳获得的 1 株具有柴油降解活性的 *Serratia* sp. J-3, 对柴油降解率可达到 62.0%<sup>[13]</sup>。Manas 等发酵 *Serratia nematodiphila* 获得大量色素, 将其用于染料敏化太阳能电池<sup>[14]</sup>。随后陆续发现 *Serratia* sp. 具有丰富的酶系, 如几丁质酶、胶原蛋白酶等。目前, 也有报道将野生型菌株 *Serratia marcescens* 作为生产菌株, 大规模工业化生产医药行业广泛应用的灵菌红素<sup>[15]</sup>。正常情况下, 沙雷氏菌不具有致病性, 其与大肠杆菌类似。本研究首次报道了 *Serratia* sp. 具有高效降解大米蛋白的活性。大米蛋白作为氮源培养 *Serratia* sp. JWG-D15, 其 SoPRO 产量及酶活明显高于胰蛋白胨、酵母粉、牛肉粉、脱脂奶粉和大豆蛋白培养基。可见, 大米蛋白能够促进 *Serratia* sp. JWG-D15 高效分泌 SoPRO, 是最适氮源。

*Serratia* sp. JWG-D15 来源的 SoPRO 与其他文献报道的 *Serratia* sp. 蛋白酶有相近的最适温度, 最适 pH, 在 40 °C 保温 40 h, 残留酶活均在 50% 以上, 且 pH 通过改变酶的空间结构, 影响酶分子活性中心基团的解离来调节酶活性。Co<sup>2+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 能提高 SoPRO 的酶活, 与 Nadeem 等<sup>[16]</sup> 的研究结果一致(Ca<sup>2+</sup> 能够增加碱性蛋白酶的稳定性)。Cu<sup>2+</sup> 和 Ni<sup>2+</sup> 抑制 SoPRO 活性, 可能的原

因是 Cu<sup>2+</sup> 和 Ni<sup>2+</sup> 属于重金属能够使蛋白变性, 从而导致酶变性失活。EDTA 和 DTT 能够提升 SoPRO 活性, 其核心在于两者都属于还原剂, 通过防止 SoPRO 的活性中心-SH 键之间的交联, 促使其活性中心处于激活状态。

目前市面常见的大米寡肽制品多用胰蛋白酶, 碱性蛋白酶等商业蛋白酶制剂, 但寡肽得率普遍偏低。如徐敏等利用胰蛋白酶水解米渣制备的寡肽, 其得率为 60.7%<sup>[17]</sup>; 吕志佳通过双酶分步法制得的寡肽得率为 48.8%<sup>[18]</sup>; 玄国东利用胰蛋白酶水解米渣蛋白得到的寡肽得率为 50.9%<sup>[19]</sup>。本文筛选获得 1 株高效水解大米蛋白, 且高产 SoPRO 的菌株 *Serratia* sp. JWG-D15, 优化 SoPRO 制备寡肽的条件, 其得率 72.38% 远高于目前报道的商业酶制备大米寡肽得率。综合 *Serratia* sp. JWG-D15 来源的 SoPRO 在制备大米寡肽上拥有的众多优势, 能够更好地应用到其他蛋白肽工业生产中, 为今后蛋白肽工业化生产提供了理论依据。

### 参考文献

- [1] Chen JW, Yao HY. Rice protein: its development and applications. *Science and Technology of Food Industry*, 2002, 23(6): 87–89. (in Chinese)  
陈季旺, 姚惠源. 大米蛋白的开发利用. *食品工业科技*, 2002, 23(6): 87–89.
- [2] Fiocchi A, Travaini M, D'Auria E, Banderali G, Bernardo L, Riva E. Tolerance to a rice hydrolysate formula in children allergic to cow's milk and soy. *Clinical & Experimental Allergy*, 2003, 33(11): 1576–1580.
- [3] Morita T, Kiriya S. Mass production method for rice protein isolate and nutritional evaluation. *Journal of Food Science*, 1993, 58(6): 1393–1396.
- [4] Morita T, Oh-hashii A, Takei K, Ikai M, Kasaoka S, Kiriya S. Cholesterol-lowering effects of soybean, potato and rice proteins depend on their low methionine contents in rats fed a

- cholesterol-free purified diet. *The Journal of Nutrition*, 1997, 127(3): 470–477.
- [5] Wang ZC, Shen RL, Yao HY. Progress of study on rice protein. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2004, 19(2): 11–15. (in Chinese)  
王章存, 申瑞玲, 姚惠源. 大米蛋白研究进展. 中国粮油学报, 2004, 19(2): 11–15.
- [6] Chen JW, Tao GJ, Yao HY. Isolation and purification of opioid antagonist peptides from rice bran soluble protein. *Food Science*, 2004, 25(12): 47–50. (in Chinese)  
陈季旺, 陶冠军, 姚惠源. 米糠蛋白类阿片拮抗肽的分离纯化. 食品科学, 2004, 25(12): 47–50.
- [7] 张君慧. 大米蛋白抗氧化肽的制备、分离纯化和结构鉴定. 江南大学博士学位论文, 2009.
- [8] Schmidt CG, Gonçalves LM, Prietto L, Hackbart HS, Furlong EB. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. *Food Chemistry*, 2014, 146: 371–377.
- [9] Adebisi AP, Adebisi AO, Yamashita J, Ogawa T, Muramoto K. Purification and characterization of antioxidative peptides derived from rice bran protein hydrolysates. *European Food Research and Technology*, 2009, 228(4): 553–563.
- [10] 薛荣涛. 产米渣蛋白水解酶菌株的筛选、鉴定、发酵条件优化及酶活稳定性研究. 贵州大学硕士学位论文, 2015.
- [11] Nie M, Zhang XD, Wang JQ, Jiang LF, Yang J, Quan ZX, Cui XH, Fang CM, Li B. Rhizosphere effects on soil bacterial abundance and diversity in the Yellow River Deltaic ecosystem as influenced by petroleum contamination and soil salinization. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(12): 2535–2542.
- [12] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(22): 4673–4680.
- [13] Li ZL, Xie YF, Wu J, Xu JY, Wang J, Jiang JY. Isolation and identification of a high efficiency diesel oil degrading strain *Serratia* sp. J-3 and its degradation characteristics. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2019, 42(6): 1098–1107. (in Chinese)  
李志琳, 解宇峰, 吴杰, 徐佳迎, 王珏, 蒋静艳. 一株高效柴油降解菌 *Serratia* sp.J-3 的筛选、鉴定和降解特性. 南京农业大学学报, 2019, 42(6): 1098–1107.
- [14] Manas NHA, Chong L, Tesfamariam YM, Zulkharnain A, Mahmud H, Mahmud DSA, Fuzi SFZM, Azelee NIW. Effects of oil substrate supplementation on production of prodigiosin by *Serratia nematodiphila* for dye sensitized solar cell. *Journal of Biotechnology*, 2020, 317: 16–26.
- [15] Chen XY, Cao LL, Yang PZ, Wang KL, Zhang H, Cao XM, Zheng Z, Jiang ST. Response surface optimization of prodigiosin production of *Serratia marcescens* using rapeseed meal. *Food Science*, 2017, 38(4): 231–236. (in Chinese)  
陈新颜, 操丽丽, 杨培周, 王康林, 章华, 操新民, 郑志, 姜绍通. 响应面试验优化黏质沙雷氏菌利用菜籽饼粕产灵菌红素工艺. 食品科学, 2017, 38(4): 231–236.
- [16] Nadeem M, Qazi JI, Baig S, Syed QUA. Effect of medium composition on commercially important Alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* N-2. *Food Technology and Biotechnology*, 2008, 46(4): 388–394.
- [17] Xu M, Du XF. Optimization of hydrolyzing rice residue for preparing oligopeptide by pancreatin. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2012, 39(5): 714–720. (in Chinese)  
徐敏, 杜先锋. 胰酶水解米渣制备寡肽工艺的优化. 安徽农业大学学报, 2012, 39(5): 714–720.
- [18] 吕志佳. 大米肽酶法制备方法的研究. 天津科技大学硕士学位论文, 2014.
- [19] Xuan GD, He GQ, Xiong HP, Xu Y. Study on the modification of rice by protease and the functional characteristics of enzymatic hydrolysate. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2005, (3): 1–4. (in Chinese)  
玄国东, 何国庆, 熊皓平, 徐莹. 大米蛋白酶法改性及酶解物功能特性研究. 中国粮油学报, 2005, (3): 1–4.

# Screening of rice proteolytic protease-producing strain for preparing rice oligopeptides

Chengye Tang<sup>1,2,3</sup>, Qin Qin<sup>1,2,3</sup>, Zhengfei Yan<sup>1,2,3</sup>, Jing Wu<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

<sup>3</sup> Joint Laboratory of Food Safety International Cooperation, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

**Abstract:** **[Objective]** To isolate, screen and identify strains with rice protein degradation activity and their key proteases, so as to provide ideal enzymes for the preparation of rice oligopeptides. **[Methods]** Strains with the ability to degrade rice protein were screened from the soil near grain warehouse by “hydrolysis circle”, and identified by 16S rRNA analysis. Single factor experiment was done to obtain optimal nitrogen source. Enzymes were then characterized. The yield of rice oligopeptides was detected by HPLC, and the preparation conditions were further optimized. **[Results]** The best strain was identified as *Serratia* sp. JWG-D15. The highest protease *SoPRO* production was achieved by using rice protein as nitrogen source with optimal temperature at 40 °C and optimal pH of 8.0. The highest yield of rice oligopeptides was 72.38%, with 20 U/mg protease *SoPRO*, and 40 mg/mL rice protein at 40 °C for 4 hours. **[Conclusion]** Strain JWG-D15 had highest protease *SoPRO* production by using rice protein as nitrogen source, and the yield of rice oligopeptides was the highest. This study enriched enzyme sources for the preparation of rice oligopeptide.

**Keywords:** rice protein, oligopeptide, protease, *Serratia* sp.

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP11968 ) and by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20200599)

\*Corresponding author. E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

Received: 27 May 2020; Revised: 28 July 2020; Published online: 11 August 2020