

深层培养黑曲霉生产酸性蛋白酶的研究

II. 黑曲霉 3.350 酸性蛋白酶的一些特性

上海市工业微生物研究所 上海酒精厂

(上海)

黑曲霉 3.350 酸性蛋白酶, 通过离子交换树脂脱色、透析脱盐, 冷冻干燥, 获得初步纯制品。其最适 pH 为 2.5—3.0, pH 2.5 酶活性稳定, pH 小于 1 或超过 5 时, 酶失活。适宜作用温度为 40—47℃, 在 40℃ 以下稳定, 超过 50℃ 则严重失活。

微量 Cu^{++} 、 Mn^{++} 、 Al^{+++} 对 3.350 酸性蛋白酶有明显的激活作用, EDTA 对酶活无明显影响。十二烷基磺酸钠、十二烷基苯磺酸钠对酶有抑制作用。

本文研究了黑曲霉 3.350 酸性蛋白酶初步纯制品的若干性质, 并同其他酸性蛋白酶作了比较。实验方法同前报。

实验结果

一、酶的部分提纯*

将粗酶盐析物悬浮于 5 倍水中, 过滤除去不溶物, 清液加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 70% 饱和度, 用 HCl 调节 pH 2.5—3.0, 静置 1 夜。收集沉淀, 用 0.05 M pH 2.5 乳酸缓冲液溶解, 离心除去不溶物。取上清液经通用 2 号两性树脂柱脱色去杂蛋白 (树脂先用 0.05 M pH 2.5 乳酸缓冲液平衡), 收集流出液用 pH 2.5 蒸馏水透析, 以去除 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 再用冰冻升华法干燥, 得米白色片状固形物, 即为 3.350 酸性蛋白酶初步提纯制品, 其酶活为 60 万单位/克左右 (约为发酵液的 200 倍), 总回收率约 70%。制品可用于啤酒澄清及医药临床。

二、酶活力测定

用 Folin 法。酶活以 OD_{660 毫微米} 表示。

三、酶的特性

(一) pH 对酶反应的影响

将酶液用不同 pH 的 0.05 M 乳酸缓冲液稀释后, 用 2% 酪蛋白作底物测定酶活, 结果如图 1 所示。酸性蛋白酶的适宜 pH 为 2.0—4.0, 以 pH 2.5—3.0 为最适。

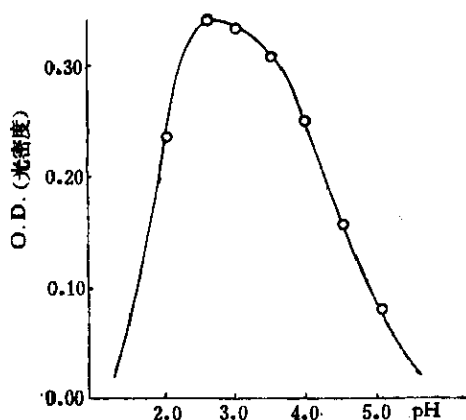


图 1 pH 对酶反应的影响

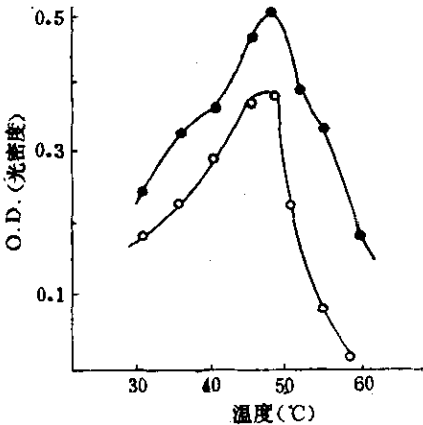
注: 因酪蛋白在 pH 4 左右为等电点, 产生沉淀妨碍测定。故本实验中采用粟山氏方法, 各 pH 酪蛋白一律加入 1% 淀粉, 在匀浆器中乳化后进行测定。

本文于 1975 年 6 月 10 日收到。

* 上海医药工业研究院参加了部分工作。

(二) 温度对酶反应的影响

将 pH2.5 的 2% 酪蛋白于水浴中测定不同温度下酶的活力。结果(图 2)说明, 反应温度以 45—47℃ 为宜。



—○—○—柠檬酸缓冲液; —●—●—乳酸缓冲液
图 2 温度对酶反应的影响

(三) 酶的热稳定性

将 pH2.5 酶液置于不同温度水浴保温处理不同时间,立即冷却,测定酶活力。结果(图 3)说明,本蛋白酶在 40℃ 内稳定,超过 50℃ 迅速失活。如有底物(酪蛋白)存在时,50℃ 处理 1 小时以上,酶活损失也不超过 50%。

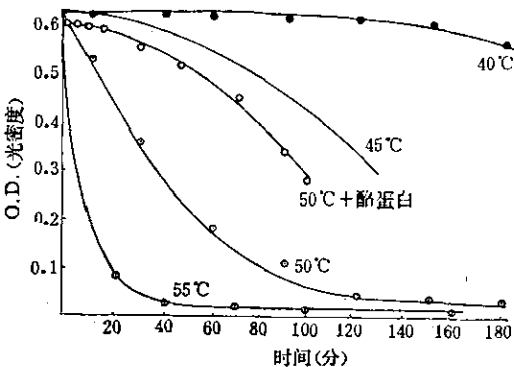


图 3 热处理对酶活力的影响

(四) 酸碱处理对酶活的影响

将酶液用 0.1N HCl 或 0.1N NaOH 分别调节到 pH 1.0—5.0, 置 40℃ 保温处理 15 分钟,再用碱或酸调节到 pH 2.5, 各取

1 毫升酶液测定其酶活力。结果(图 5)说明,本蛋白酶在 pH 2.0—3.0 稳定, pH 大于 4.5 时则迅速失活。

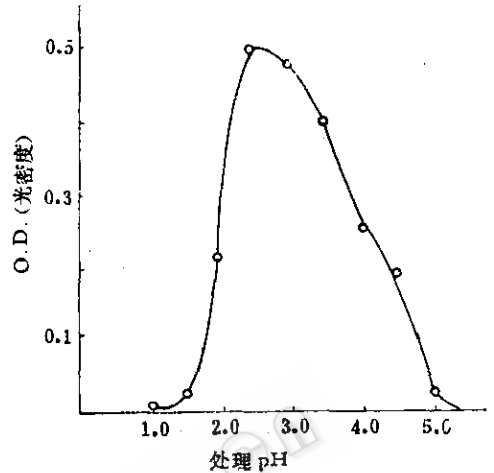


图 4 酸碱处理对酶活力的影响

(五) 表面活性剂对酶活力的影响

于酶液中添加各种表面活性剂(用 pH 2.5 乳酸缓冲液配制),使终浓度为 0.1%, 置 40℃ 处理 1 小时,测定其酶活力。结果(表 1)指出,十二烷基磺酸钠、十二烷基苯

表 1 表面活性剂对黑曲霉 3.350 酸性蛋白酶的影响

表面活性剂	相对酶活力(%)	表面活性剂	相对酶活力(%)
不加表面活性剂(对照)	100	6503	82.1
十二烷基苯磺酸钠	0.4	EL-121	106.1
平平加	99.0	105	98.5
平平加 X-102	99.6	1227	90.8
聚环氧丙烷乙烷甘油醚	102.3	吐温 60	102.2
209 洗涤剂	0	吐温 80	99.8
拉开粉	0	硅油-100	101.0
1631	73.8	雷米邦	99.6
环氧乙烷硬脂酸	99.9	ppz	0
聚乙二醇(MW 6000)	105	SP 169	104.8
EL-124	104.2	0204	0.4
TX-10	97.7	山梨醇	100.4
6501	92.0	新洁尔灭	97.8
十二烷基磺酸钠	0	净洗剂 LS	3.7

磺酸钠、拉开粉、209 洗涤剂、ppz、洗净剂 LS 等各种表面活性剂对本蛋白酶均有强烈的抑制作用,但是一些非离子型的表面活性剂对酶活力无碍。

可利用十二烷基苯磺酸钠与十二烷基磺酸钠终止酶反应。

(六) 金属离子与 EDTA 对酶活性的影响

于酶液中分别添加各种金属离子及 EDTA,使最终浓度为 $2 \times 10^{-3} M$ (pH 2.5), $40^{\circ}C$ 处理半小时后,再用 Folin 法测酶活力。结果(表 2), Cu^{++} 、 Mn^{++} 对本酶具显著激活作用。除 Hg^{++} 、 Ag^{+} 具轻度抑制外,多数金属离子不影响酶活力。在试验浓度下,EDTA 对酶活也无影响。

于酶液中添加不同浓度 Cu^{++} ,试验结果(图 6)浓度以 $1 \times 10^{-3} M$ 激活作用最明显。

将 Cu^{++} 、 Mn^{++} 、 Al^{+++} 同时加入酶液中进行试验,相对酶活力用 O. D. 值表示,结果(表 3)表明, Cu^{++} 、 Mn^{++} 、 Al^{+++} 三者

表 2 金属离子与 EDTA 对酶活力影响

金属盐类	相对酶活力(%)	金属盐类	相对酶活力(%)
KCl	99.9	$Pb(CH_3CO_2)_2$	106.0
NaCl	108.0	$CuSO_4$	153.0
$CaCl_2$	106.0	$AlCl_3$	114.0
$MgSO_4$	105.0	$COCl_2$	108.0
$MnCl_2$	148.0	$BaSO_4$	106.0
$Fe_2(SO_4)_3$	109.0	NaF	107.0
$(NH_4)_2SO_4$	104.0	$AgNO_3$	90.0
$LiSO_4$	101.0	$HgCl_2$	83.8
$ZnSO_4$	103.0	EDTA	110.0
		对 照	100

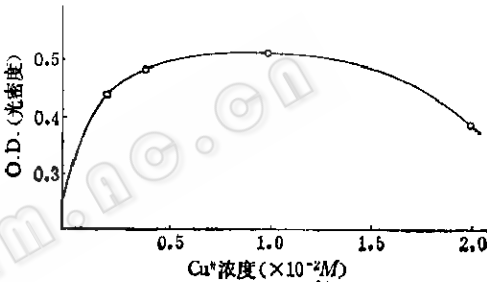


图 5 Cu^{++} 的激活作用

可以产生协同作用,使酶活力增加近 2 倍。

表 3 Cu^{++} 、 Mn^{++} 、 Al^{+++} 三者间的协同作用

金属离子*	Cu^{++}	Al^{+++}	Mn^{++}	$Cu^{++} + Al^{+++}$	$Cu^{++} + Mn^{++}$	$Mn^{++} + Al^{+++}$	$Cu^{++} + Mn^{++} + Al^{+++}$	对 照
浓 度								
相对酶活力	185	112	155	187	218	160	299	100

* 金属离子浓度均为 1×10^{-3} 。

表 4 黑曲霉 3.350 酸性蛋白酶同其他酸性蛋白酶的比较

项 目	<i>A. niger</i> 3.350	<i>A. niger</i> var. <i>macrosporus</i> ^[2] 0406	<i>A. saitoi</i> ^[1]
适宜 pH (对酪蛋白)	2.5—3.0	2.5—3.0	2.5—2.7
稳定 pH (无底物时)	2.0—3.0	—	2.7
适宜温度($^{\circ}C$)	45—47 (pH 2.6)	55 (pH 2.6)	—
10分钟热失活温度($^{\circ}C$)	55	—	55
十二烷基磺酸钠	0.1% 完全失活	完 全 失 活	完 全 失 活
EDTA	不 失 活	不 失 活	失 活 19%
有激活作用金属离子	Cu^{++} 、 Mn^{++} 、 Al^{+++}	无 激 活	Cu^{++} 、 Fe^{++} 引起失活
蛋白质分解	分解血红蛋白强于酪蛋白	同 左	分解酪蛋白强于血红蛋白

四、与其他酸性蛋白酶特性的比较

将黑曲霉 3.350 与文献所报道的 斋藤曲霉 (*A. saitoi*) 酸性蛋白酶(曲肽酶 A)^[1], 和大孢子黑曲霉突变株 (*A. niger* var. *macrosporus* 0406) 酸性蛋白酶 B^[2] 的若干性状相比较证明, 在适宜 pH, 特别是在十二烷基磺酸钠引起的酶失活反应方面是完全

相同的, 对酸碱及热的稳定性与 斋藤曲霉酸性蛋白酶相似。而在金属离子激活作用和适宜温度等方面不同见表 4。

参 考 资 料

- [1] Yoshida, F. et al: *Bull. Agr. Chem.*, Japan, 20: 257, 1956
- [2] Yoshihisa, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 28 (4): 216, 1964
- [3] 栗山一秀: 发酵工学杂志, 34: 473, 1956。

STUDIES ON THE PRODUCTION OF ACID PROTEASE BY *ASPERGILLUS NIGER* IN SUBMERGED CULTURE

II. SOME PROPERTIES OF THE ACID PROTEASE OBTAINED FROM *ASPERGILLUS NIGER* 3.350

SHANGHAI INSTITUTE OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, THE SHANGHAI DISTILLERY
(Shanghai)

Some properties of the acid protease obtained from *Aspergillus niger* 3.350 were investigated with milk casein as a substrate.

The optimum pH for enzyme action was pH 2.5—3.0 and the optimum temperature 45—47°C. This enzyme was stable at pH 2.5 but lost its activity below pH 1.0 and above pH 5.0. The enzyme

was found to be stable below 40°C but lost its activity at 55°C after incubation at different temperatures at pH 2.5 for 120 minutes. This enzyme was activated by Cu⁺⁺, Mn⁺⁺ and Al⁺⁺⁺, but not inhibited by metal chelating reagent such as EDTA, while it was inhibited by sodium lauryl sulfonate.