

宇佐美曲霉酸性蛋白酶的研究

II. 537 酸性蛋白酶提纯及性质

关桂兰 董文彩 陈菊英
潘慧霞 孔爱琴 侯博

(中国科学院新疆生物土壤沙漠研究所, 乌鲁木齐)

由宇佐美曲霉 (*Aspergillus usami*) 537 产生的酸性蛋白酶粗酶制剂, 通过硫酸铵饱和度为 45—65% 的分部沉淀、离子交换树脂脱色、Sephadex G 25 脱盐、DEAE-Sephadex A-25 层析可得到比活为 2037u/mg 的纯酶, 为原粗酶比活的 12 倍, 在 Davis 凝胶电泳中得到一条带。

宇佐美曲霉 537 的代谢产物中, 除了酸性蛋白酶外, 还伴随产生较多的糖化酶。该酶只有在 DEAE-Sephadex A-25 层析时才与 537 酸性蛋白酶分开。

用 SDS 凝胶电泳测得 537 酸性蛋白酶的分子量为 54000。537 酸性蛋白酶的 pH 酶活曲线的主要 pH 峰为 2—3.5。该酶在 pH 2.5—3.5 下活性稳定。

537 酸性蛋白酶最适作用温度为 50—60°C。在 50°C 以下稳定, 55°C 以上不稳定, 63°C 以上严重失活。EDTA 对 537 酸性蛋白酶活力没有影响, 大多数金属离子也无影响。Cu²⁺、Mn²⁺ 对该酶有轻度激活作用。十二烷基硫酸钠、十二烷基苯磺酸钠、溴代琥珀酰亚胺对酶活有抑制作用。

关键词 宇佐美曲霉; 酸性蛋白酶

继酸性蛋白酶 537 菌株的选育及其发酵条件的研究之后^[1], 我们对 537 酸性蛋白酶的提纯和应用进行了研究。537 酸性蛋白酶的粗酶粉可做优良的皮毛软化剂。该酶的初步提纯制品有抗炎治疗气管炎的作用, 治愈率达 85%, 显效率占 42%。该酶制品可代替菠萝蛋白酶作啤酒澄清剂, 还可代替木瓜蛋白酶作粮食中色氨酸分析的蛋白质水解剂^[2]。本文报道 537 酸性蛋白酶的提纯和某些酶学性质。

材料与方 法

(一) 酶制剂

利用无锡酶制剂厂生产的宇佐美曲霉 537 酸性蛋白酶酶制剂, 活力为 4.0 万 (u/g)。

(二) 主要化学试剂及仪器

DEAE-Sephadex A-25 (中国科学院上海生化所生化试剂厂产品); Sephadex G-25 (上海长征制药厂产品); 72 型分光光度计 (上海分析仪器厂产品); 紫外检测仪 (北京科仪厂产品); 冷冻离心机 K₂ 型 (东德 Janeshi)。

(三) 测定方法

537 酸性蛋白酶活力测定同前报^[1]; 糖化酶活力测定采用红曲霉葡萄糖淀粉酶的测定方法^[3]; 蛋白质测定采用 Folin-酚试剂显色法^[4]; 硫酸铵测定按奈氏 (Nessler) 试剂比色法; 柱层析方法主要参考 Sodek 和 Hofmann^[5] 法; 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳为不连续系统, 分离胶浓度

本文于 1984 年 5 月 30 日收到。

本工作曾得到中国科学院微生物所邱秀宝同志的指导, 并对本文进行修改, 在此表示感谢。

7.5%；分子量测定采用 SDS-不连续系统，分离胶浓度为 8.5%^[6]。

结 果

(一) 酶的提纯

粗酶粉以 1:20 (W/V) 用水抽提，抽提液蛋白质含量 10—15 mg/ml。用 HCl (0.5 N) 调 pH 至 3.5，进行饱和度为 45—65% 硫酸铵的分级沉淀。比活由 160 提高到 360，得率 75% 以上。分级沉淀物溶于 0.05 M pH 3 的乳酸-乳酸钠缓冲液中，经通用 2 号两性树脂脱色后为淡黄色溶液，比活提高到 415。脱色酶液再通过 Sephadex G 25 柱脱盐，比活提高至 433。脱盐

酶液加酒精使其饱和度达 70% 以上，酶蛋白沉淀析出。沉淀物溶于 0.05 N 乳酸-乳酸钠缓冲液 (pH 3) 中待层析。

粗酶粉含有 43300 u/g 的 537 酸性蛋白酶，同时含有 4800 u/g 糖化酶。两种酶均集中于硫酸铵饱和度 45—65% 的分级沉淀中，该沉淀物含有 403420 u/g 的酸性蛋白酶，同时含有 38400 u/g 糖化酶。待层析样品中含有 12990 u/ml 酸性蛋白酶，仍含有 1515 u/ml 糖化酶。

用 0.25 N NaOH 和 0.25 N HCl 交替浸泡 DEAE-Sephadex A-25 半小时，酸碱更换之间及最后均用蒸馏水洗至中性。装柱 (1.5 × 20 cm)。用 0.02 N 乳酸-乳酸

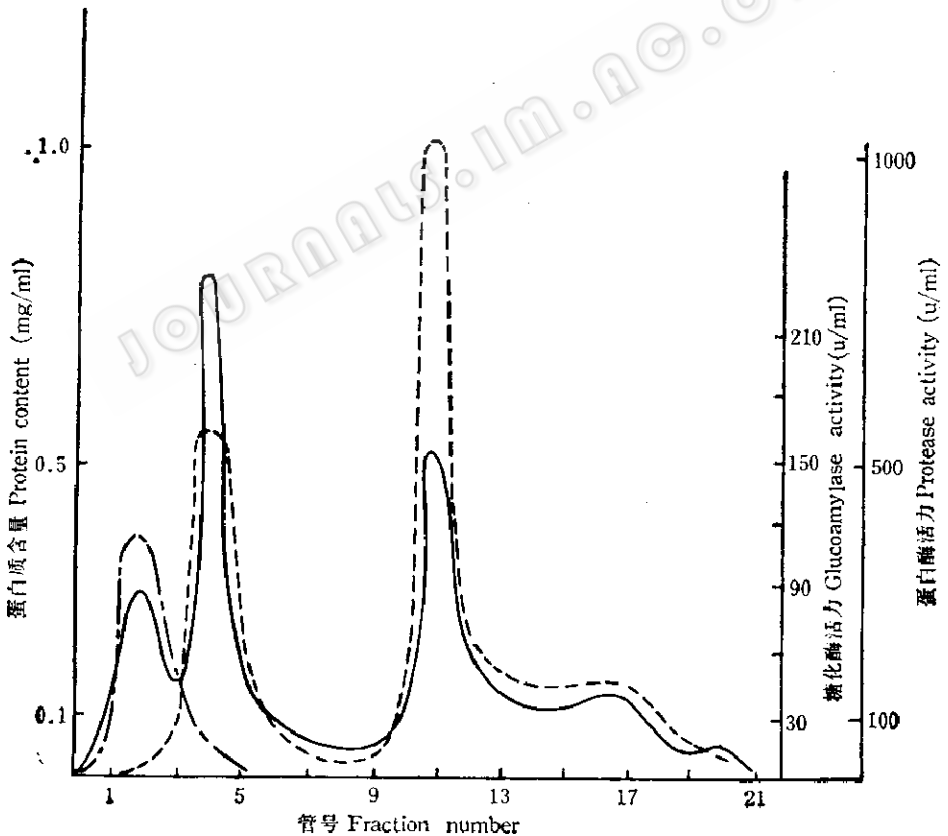


图 1 DEAE-Sephadex A-25 柱层析图

Fig. 1 DEAE-Sephadex A-25 column chromatography

- 蛋白质含量 Protein content
- - - 537 酶活力 537 proteinase activity
- · - 糖化酶活力 Glucoamylase activity

钠缓冲液 (pH 3.5) 平衡。上样后, 仍用平衡液洗脱, 出现第一个蛋白峰后, 改用乳酸-乳酸钠缓冲液和氯化钠进行线性梯度洗脱, 其上限浓度为 0.02 N (pH 3.5) 下限浓度为 0.3 N (pH 2.2) 并加入 0.3 N NaCl。流速为 30 ml/h, 层析温度为 12°C, 每管收集 6 ml, 当洗脱液 pH 2.5, 盐浓度 0.12 N 时出现第三个蛋白峰, 即 537 酸性蛋白酶被洗脱下来, 结果见图 1。从第 10 管至 16 管总酶活得率 52%, 平均比活 1072 (u/mg), 为未纯化酶粉比活的 6.38 倍, 其中第十一管 537 酶比活 2037 (u/mg), 为原粗酶粉比活的 12.13 倍。该酶液在不连续盘状电泳高 pH 系统中可得到一条带 (图 2)。

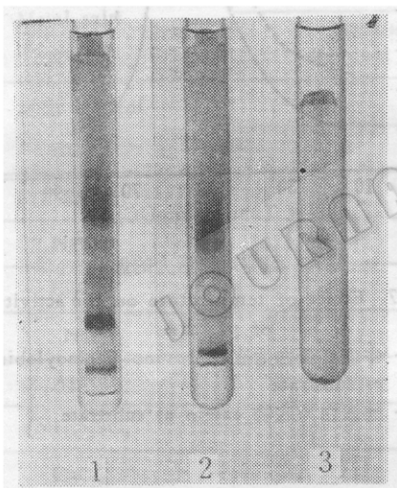


图 2 凝胶电泳图谱

Fig. 2 Acrylamide gel electrophoresis of 537 protease preparations

1. 537 粗酶 Crude extracts
2. 537 初步提纯酶 Crude protease
3. DEAE-sephadex A-25 层析第 11 管 537 酶 Pure protease

(二) 537 酸性蛋白酶的某些特性

1. 分子量测定:

利用垂直管型盘状 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测得 537 酸性蛋白酶的分子量为 54000。见图 3 和图 4。

2. pH 对酶反应的影响:

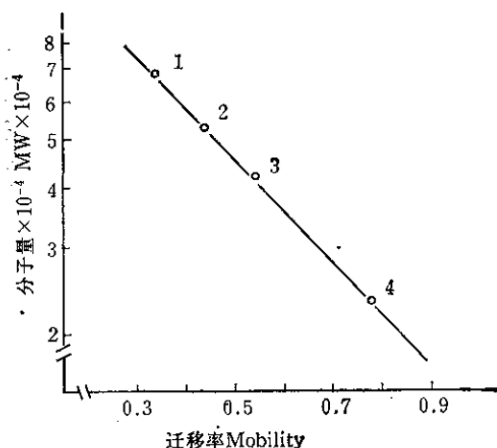


图 3 用 SDS 凝胶电泳测定 537 酸性蛋白酶分子量

Fig. 3 Estimation of the molecular weight of 537 enzyme by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

1. 牛血清蛋白 Bovine serum albumin (68000)
2. 537 酶 537 Acid protease (54000)
3. 卵清蛋白 Egg albumin (43000)
4. 胰蛋白酶 Trypsin (23300)

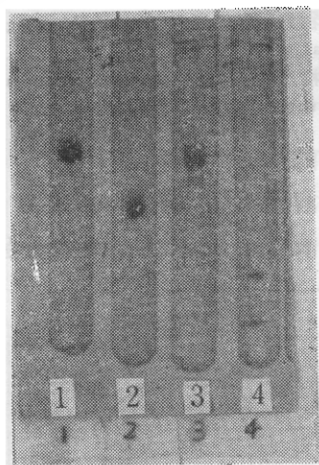


图 4 537 酶的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 4 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pattern of 537 acid protease

1. 牛血清蛋白 Bovine serum albumin
2. 卵清蛋白 Egg albumin
3. 537 酸性蛋白酶 Acid protease
4. 胰蛋白酶 Trypsin

将酶液用不同 pH 的 0.029 M 广范围的缓冲液稀释, 使其 pH 值分别为 1、1.5、2、……10, 以 1.5% 的酪蛋白、牛血清蛋白

和牛血红蛋白分别为底物进行酶活力测定,结果如图 5 所示。当底物为酪蛋白时, pH 2.5 时的酶活力最高, 底物为牛血清蛋白和牛血红蛋白时, pH 3 时酶活最高。三条 pH 曲线表明, 不论使用那种蛋白质为底物, 其酶反应的最适 pH 都是 2—3.5。

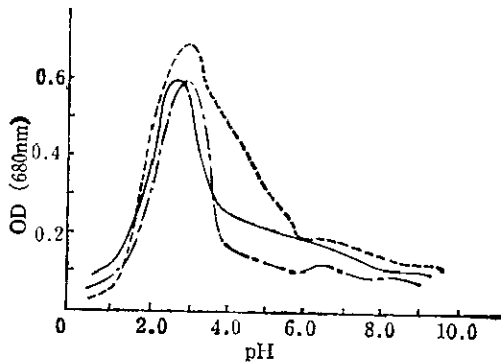


图 5 pH 对酸性蛋白酶活力的影响

Fig. 5 Effect of pH on the activity of acid protease

- 底物为酪蛋白 Casein as substrate
- - - 底物为牛血红蛋白 Bovine haemoglobin as substrate
- · - 底物为牛血清蛋白 Bovine serum albumin as substrate

3. 酶的 pH 稳定性:

使酶溶于不同 pH 的 0.029 M 的广范围的缓冲液中。酶液的 pH 值分别为 1、

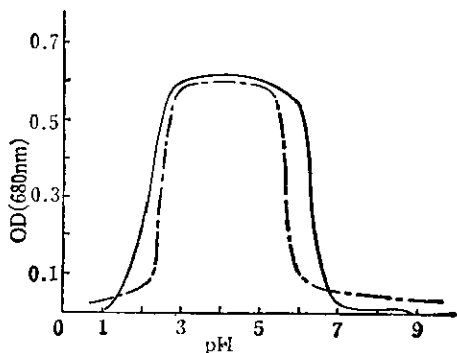


图 6 pH 稳定曲线

Fig. 6 pH-stability of the enzyme

- - - 底物酪蛋白 Casein as substrate
- 底物牛血红蛋白 Bovine haemoglobin as substrate

2、3……10, 酶液于 40℃ 保温 30 分钟, 然后用 pH 3 的乳酸-乳酸钠缓冲液稀释 20 倍, 最终 pH 为 3, 测定酶活力, 结果见图 6。537 酸性蛋白酶 pH 稳定范围是 2.5—5.5。

4. 温度对酶反应的影响:

以 2% 的酪蛋白、牛血红蛋白为底物, 测定不同温度下的酶活力。图 7 表明用两种蛋白为底物, 其反应的最适温度均为 50—60℃。而且 537 酸性蛋白酶对牛血

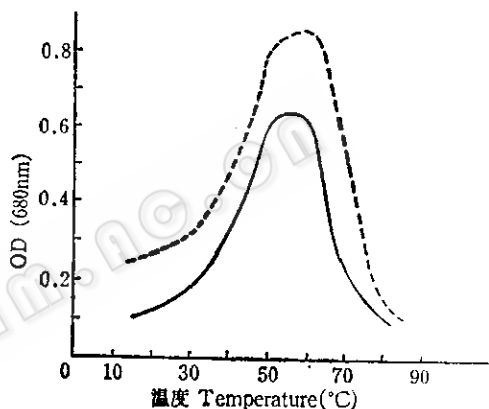


图 7 温度对酶活力的影响

Fig. 7 Effect of temperature on the activity of protease

- - - 牛血红蛋白为底物 bovine haemoglobin as substrate
- 酪蛋白为底物 casein as substrate

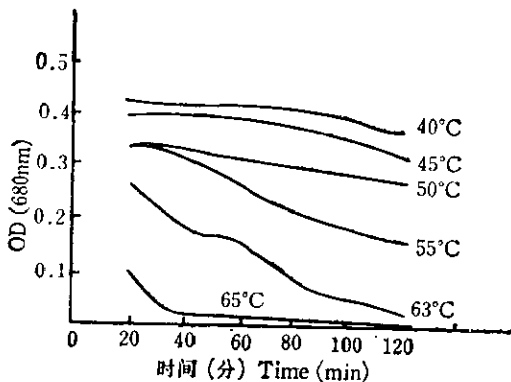


图 8 温度对酶稳定性的影响

Fig. 8 Effect of temperature on the stability of the enzyme

蛋白的分解能力高于酪蛋白。

5. 热处理对酶活力的影响:

将 pH 3 的 537 酶液置于不同温度 (40—65°C) 水浴中保温处理, 每隔 20 分钟取 1ml 酶液进行酶活测定。图 8 表明在 50°C 以下该酶稳定, 55°C 以上失活较多, 63°C 以上严重失活。

6. 金属离子和 EDTA 对酶活力的影响:

在酶液中分别添加各种金属离子和 EDTA, 其最终浓度分别为 $5 \times 10^{-3} M$ 和

$5 \times 10^{-4} M$, 酶液 pH 3, 20°C 处理 30 分钟后, 用 Folin 法测剩余活力。结果(表 1)表明: EDTA 和大部分金属离子对 537 酸性蛋白酶活力没有影响。Cu²⁺、Mn²⁺ 有轻度激活作用。Hg²⁺、Ag⁺ 在 $5 \times 10^{-3} M$ 时对酶有轻度抑制作用, 但在 $5 \times 10^{-4} M$ 浓度时, 对酶活没有影响。

用 Folin 法测剩余酶活时, 有些变价离子如铜、镁等与 Folin 试剂起反应产生干扰。但在金属离子浓度 $5 \times 10^{-4} M$ 时与 Folin 试剂反应很弱, 干扰可忽略不计。

表 1 金属离子与 EDTA 对 537 酶活力的影响

Table 1 Effect of metal ions and EDTA on protease activity

金属盐类 Metal salts	试剂浓度 Concentration of reagents	
	$5 \times 10^{-3} (M)$	$5 \times 10^{-4} (M)$
	剩余相对酶活(%) Residual relative activity	剩余相对酶活(%) Residual relative activity
对照 Control	100.0	100.0
EDTA	100.5	99.4
KCl	101.5	98.4
NaCl	97.5	100.0
Li ₂ SO ₄	90.0	98.9
NaF	100.0	96.2
AgNO ₃	89.0	99.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	100.0	99.1
CaCl ₂	101.4	101.3
BaCl ₂	有沉淀 precipitate	101.6
CoCl ₂	100.0	94.8
HgCl ₂	76.3	98.2
MnCl ₂	有干扰 confusion	112.0
CuSO ₄	174.6	120.0
MgSO ₄	98.9	100.6
ZnSO ₄	93.8	98.1
FeSO ₄	91.1	96.1
AlCl ₃	104.0	104.5
Pb(CH ₃ CO ₂) ₂	有沉淀 precipitate	96.8

7. 表面活性剂对酶活力的影响:

用 pH 3 乳酸-乳酸钠缓冲液配制浓度 1% 的各种表面活性剂。然后加入酶液,使其最终的酶液中含 0.1% 的表面活性剂。在 20°C 保温 30 分钟取 1ml 测酶活。绝大部分非离子型表面活性剂对酶活没有抑制作用。而离子型表面活性剂对酶活有抑制作用,正如其它真菌酸性蛋白酶一样^[7],十二烷基硫酸钠和十二烷基苯磺酸钠对 537 酸性蛋白酶有很大抑制作用。溴代琥珀酰亚胺对酶活也有较大的抑制作用。

讨 论

宇佐美曲霉 (*Asp. usamii*) 537 菌种代谢产物中,除了酸性蛋白酶外,还产生较多的糖化酶。两种酶都集中于硫酸铵分级(45—65%)沉淀中,在凝胶电泳柱上,两条带很接近,因此,给分离带来较大困难,我们曾采用 DE 32、DE 11、CM 32 进行层析,都未得到预期效果。虽然用 DEAE Sephadex A-25 层析得到分离,但得率不十

分理想。根据两种酶功能不同,采用亲和层析方法较为适宜。

参 考 文 献

- [1] 周勤诚等: 微生物学报, 19 (3): 315—320, 1979。
- [2] 胡文梯等: 生物化学与生物物理进展, 44: 74—75, 1982。
- [3] 中国科学院微生物所酶结构与功能研究组: 微生物学报, 16 (3): 200—201, 1976。
- [4] 潘家秀等编著: 蛋白质化学研究技术, 科学出版社, p. 28—29, 1973。
- [5] Sodek, J and T. Hofmann: Method in Enzymology, Academic Press New York and London, 19: 372—394, 1970。
- [6] 莽克强编著: 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 科学出版社, p. 26—43, 88—94, 1975。
- [7] Sawada, J: Agr. Biol. Chem, 28: 248—355, 1964。
- [8] Keleti, G and W. H. Lederr: Handbook Micro-methods For the Biological Sciences, p. 139—142。
- [9] Т. В. Шахова С. А. Коновалов: Прикладная Биохимия Микробиология 6: 256—262, 1970。
- [10] 上海工业微生物研究所、上海酒精厂: 微生物学报, 16 (3): 220—223, 1976。
- [11] Соорор, Т. Г. 著, 徐晓利译: 生物化学工具, 人民卫生出版社, p. 131—147, 1980。

STUDIES ON THE ACID PROTEASE OF *ASPERGILLUS USAMII*

II. PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF THE 537 ACID PROTEASE

Guan Guilan Dong Wencai Chen Juying Pan Huixia
Kong Aiqin Hou Bo

(Xinjiang Institute of Biology, Pedology and Psammology, Academia Sinica, Urumqi)

An acid protease produced by strain 537 was isolated and purified, through a process involving ammonium sulfate precipitation, decolorization with ion-exchange resin, desalination with sephadex G-25 and chromatography on DEAE-Sephadex A-25. The specific activity of enzyme preparation after purification increased 11 times.

After purification, the enzyme preparation showed a single band in Davis polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight was determined to be about 54000 by SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

Except main acid protease 537, more glucoamylase was existed in the metabolite of 537 and was isolated from the acid

protease preparation through chromatography on DEAE-Sephadex A-25.

The optimum pH for the enzyme was 2—3.5, the optimum temperature was 50—60°C and it was found to be stable below 50°C. but inactivated over 55°C and completely inactivated over 63°C.

This protease was not inhibited by metal chelating reagent such as EDTA or most of metal ions but was inhibited by sodium laury sulphate, bromosuccinimide, dodecylbenzenesulphonic acid sodium salt.

This protease was activated by Cu^{2+} , Mn^{2+} .

Key words

Aspergillus usamii; Acid proteinase