

微小毛霉凝乳酶的纯化和性质

钱世钧 张纯青 矫庆华 田开荣 孟广震

(中国科学院微生物研究所, 北京)

微小毛霉 (*Mucor pusillus*) 凝乳酶经乙醇分步沉淀、CM-纤维素、DEAE-Sephadex A-25 和 Sepharose 2B 柱层析提纯后, 酶的比活由 296 提高到 3429 u/mg, 蛋白质收率为 17.9%。经聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫扩散法证明酶的纯度达到均一。酶的分子量为 41800 道尔顿。酶对血红蛋白的 K_m 值为 0.019 mmol/L。酶的等电点为 pH4.3。对酶的氨基酸组成和含糖量也进行了测定。酶的化学修饰表明: 酪氨酸、组氨酸、色氨酸、精氨酸以及巯基与酶的活性无关, 天冬氨酸的羧基是酶的必需基团, 故此酶是一种典型的天冬氨酸蛋白酶。

关键词 凝乳酶; 干酪; 微小毛霉; 提纯和性质

凝乳酶是干酪生产的关键酶。传统的凝乳酶是从小公牛的第四胃提取, 随着对干酪需求的增加及全球性小牛的短缺, 杀牛提取酶已远远不能满足需要, 很多牛凝乳酶的代用品应运而生^[1]。

微生物凝乳酶在干酪生产中具有很大实用价值。它具有培养方法简单、酶提取方便、成本较低、保持干酪风味等优点。目前, 世界上干酪生产所用的酶三分之一以上来自微生物凝乳酶^[2]。通常商业上所用的仅有三种, 即米黑毛霉 (*Mucor miehei*), 微小毛霉 (*Mucor pusillus*) 和栗疫菌 (*Endothia parasitica*) 的凝乳酶。

我们从19株毛霉中筛选出一株高产凝乳酶的微小毛霉菌株, 并完成了菌种培养, 酶的提取等试验, 本文着重介绍酶的纯化和性质。

材料和方法

(一) 化学试剂

PCMB 为 Hopkin & Williams 公司产品, DTNB 为 Merck 公司产品, DEP 为 Aldrich 公司产品, N-AI 为 Serva 公司产品, CMC 为 Whatman 公司产品, Koshland 试剂、EPNP 为

Sigma 公司产品, 乙二醛为 Carl Roth 公司产品。

(二) 菌种、培养基和培养条件

见作者前报^[3]。

(三) 粗酶的提取

加水于固体培养物中, 浸泡过夜, 挤出浸提液, 离心去渣, 所得清液用于酶的纯化。

(四) 凝乳酶、蛋白水解酶和纤维素酶的活性测定

凝乳酶、蛋白水解酶活性按 Arima^[4] 所述方法测定。纤维素酶活性按崔福绵^[5] 所述方法测定。

本文于 1988 年 2 月 15 日收到。

本文采用的缩写名词:

PCMB: P-chloromercuribenzoic acid
对-氯汞苯甲酸;

DTNB: 2, 2-Dinitro-5, 5-dithio-dibenzoic acid 二硝基二巯基二苯甲酸;

Koshland 试剂: 2-羟基-5-硝基溴苯;

DEP: Diethyl pyrocarbonate 二乙基焦碳酸盐;

N-AI: N-Acetylimidazole N-乙酰咪唑;

DNM: Diazoacetyl-norleucine Methyl Ester 重氮乙酰-己氨酸甲酯;

EPNP: 1,2-Epoxy-3-(p-nitrophenoxy) propane 1,2-环氧-3-(对硝基苯氧基)丙烷;

CMC: 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-4-ethyl) carbodiimide metho-p-toluenesulfonate

(五) 蛋白质和含糖量的测定

用酚-硫酸比色法测定酶中含糖量^[6], 蛋白质按 Lowry^[7] 方法测定。

(六) 酶的分子量测定及等电点聚焦电泳

分子量测定参照 Laemmli^[8] 方法, 等电点聚焦按杨寿钧^[9] 所述的方法进行。

(七) 免疫扩散

抗血清的制备及免疫扩散方法参照孟广震^[10] 所述方法进行。

(八) 酶的化学修饰

PCMB、DTNB、N-Al、DEP、CMC、Koshland 试剂及乙二醛对酶修饰反应条件见作者以前报道^[11]。

EPNP 与酶的作用参照 Tang^[12] 的方法。取 3ml 酶液 (1mg/ml pH4.6 0.1mol/L 柠檬酸钠缓冲液), 加入 15mg 固体粉末 EPNP (对照液不加 EPNP), 在室温下磁力搅拌, 每隔一段时间, 取出 100 μ l 测酶活。

DNM 与酶的作用参照 Raragopalan^[13] 方法。1ml 透析过的酶液 (1mg/ml), 加入 10 μ l 0.1mol/L 乙酸铜, 10 μ l 4mol/L 乙酸缓冲液 (pH5.0), 在室温放置 10min, 分别加入各种浓度的 DNM 甲醇液 10 μ l, 放置 15min 后测酶活。

结 果

(一) 酶的纯化

350ml 粗酶液在 0 $^{\circ}$ C (除特别说明外, 所有操作都在 4 $^{\circ}$ C 进行), 按 1:1(V/V) 加入乙醇, 放置过夜。离心去沉淀, 向上清液里按 1:0.5(V/V) 加入乙醇, 放置过夜, 离心所得沉淀用少量 pH3.5 0.1mol/L 乙酸缓冲液溶解。再次离心, 去渣, 上清液加入已用 pH3.5 0.1mol/L 乙酸缓冲液平衡好的 CM-纤维素柱 (2 $\times$ 45cm)。用 350ml 上述缓冲液洗脱, 再用 200ml 上述缓冲液与 200ml pH5.4 0.1mol/L 乙酸缓冲液作梯度洗脱, 收集活力峰部分, 并用乙醇沉淀进行浓缩。

将上述经浓缩过的酶液加入用 0.02

mol/L 的 pH5.4 乙酸缓冲液平衡过的 DEAE-Sephadex A-25 柱 (1 $\times$ 38cm)。用 100ml 平衡缓冲液洗脱, 再用 150ml 平衡缓冲液及 150ml 含 0.8mol/L 氯化钾的平衡缓冲液作线性梯度洗脱。收集活力峰部分并用硫酸铵沉淀加以浓缩, 浓缩液对 0.02mol/L pH5.4 乙酸缓冲液透析。

将浓缩酶液上 Sepharose 2B 柱 (1 $\times$ 38cm), 用 250ml 0.02mol/L 乙酸缓冲液 (pH5.4) 洗脱, 收集有活力峰管。

经纯化后, 酶的比活提高 11 倍多 (表 1)。而蛋白水解酶活性大大下降, 从而使纯酶的凝乳酶/蛋白水解酶活性的比值大大提高。经纯化的酶已完全没有纤维素活性。

(二) 酶纯度鉴定

酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳显示一个区带 (图 1)。

按“材料和方法”所制得的家兔抗血清滴度在 100—1000 之间。免疫扩散在室温下进行, 抗原抗体仅有一条沉淀弧 (图 2)。以上实验证明酶的纯度达到了均一。

(三) 酶的生化性质

1. 酶的 K_m 值: 酶对血红蛋白的 K_m 值为 0.019mmol/L (图 3)。

2. 酶的等电点: 用薄层聚丙烯酰胺等电聚焦板电泳, 以甲基红作为指示前沿, 测得酶的等电点为 pH4.2。

3. 酶的含糖量: 用硫酸-酚法测得凝乳酶含糖约 5.15%。

4. 酶的分子量测定: 用 SDS 电泳测得该酶分子量为 41800 (图 4)。

5. 酶的氨基酸组成: 按常规法将酶样品于 110 $^{\circ}$ C 水解 24h, 然后在 Beckman 121MB 氨基酸自动分析仪上测定组成 (表 2)。

表中各氨基酸残基数是以组氨酸为 4 而推算出来, 但无半胱氨酸、色氨酸及游离

表 1 微小毛霉凝乳酶的纯化

Table 1 Purification of rennet from *Mucor pusillus*

提纯步骤 Step	总活力 Total unit (u)	收率 Recovery (%)	总蛋白 Total protein(mg)	比活 Specific activity (u/mg)	蛋白水解 酶活性 Proteolytic activity(OD)	纤维素酶活性 Cellulase activity(u)
粗 酶 Crude enzyme	1069817	100	3612	296	1410.5	1750
乙醇分步沉淀 Ethanol Fractionation	700730	65.5	624	1123	208.4	29.4
CM-纤维素层析 CM-cellulose Chroma- tography	432495	40.4	338.6	1277	200.6	1.8
DEAE-Sephadex A-25 Chromatography	414058	38.7	181.4	2283	135.5	0.0
Sepharose 2B Chromatography	192000	17.9	56	3429	38.2	0.0



图 1 纯酶的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis pattern of purified rennet

氨的数据。以氨基酸组成推算出酶分子量约为 40000，这与用电泳法测得的分子量值极为相近。

6. 沉降系数的测定：酶液浓度为 7.8 mg/ml，采用 Hitachi 282 分析超离心机，测得酶的沉降系数为 3.2S (图 5)。沉降图谱呈现一个峰，同样证明酶是均一的。

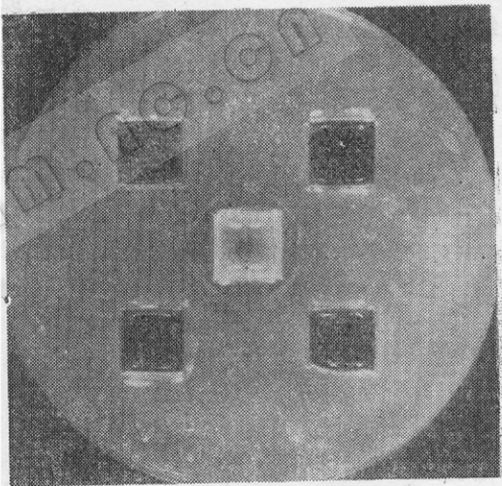


图 2 纯酶的免疫扩散图谱

Fig. 2 Immunodiffusion pattern of purified rennet

(四) 酶的化学修饰

几种化学修饰试剂对酶的作用见表 3。酪氨酸、色氨酸、精氨酸、组氨酸及巯基与酶的活性无关。

羧基的专一性修饰剂水溶性碳化二亚胺试剂 (CMC) 对酶作用见表 4，它们的作用产物再经 1mol/L 羟胺 (pH7.5) 在 30℃，处理 5h，透析后测定，酶活力基本不变，这说明 CMC 与酶的酪氨酸残基作用可以忽

表 2 酶的氨基酸组成分析
Table 2 Amino acid composition of the enzyme

氨基酸 Amino acid	残 基 数 Number of Residues	氨 基 酸 Amino Acid	残 基 数 Number of Residues
Asp	52	Ile	17
Thr	28	Leu	23
Ser	32	Tyr	17
Glu	29	Phe	26
Pro	18	Lys	16
Gly	45	His	4
Ala	23	Arg	7
Val	28	Cys	
Met	8	Trp	

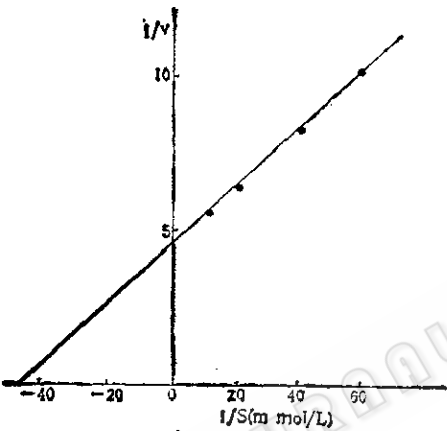


图 3 凝乳酶对血红蛋白的 Lineweaver-Burk 作图
Fig. 3 Lineweaver-Burk plot of rennet for heamoglobin

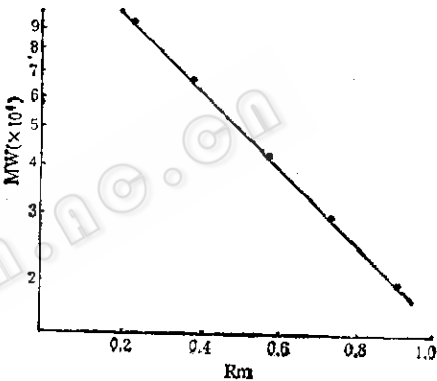


图 4 SDS 凝胶电泳测分子量
Fig 4 Determination of molecular weight of rennet by polyacrylamide gel electrophoresis

表 3 一些蛋白质侧链修饰剂对凝乳酶活性的影响
Table 3 The effects of some reagents for modification of protein side-chains on rennet activity

试 剂 Reagents	终 浓 度 Final concentration (mol/L)		残余活力 Residual activity (%)
	Reagents 试 剂	Enzyme 酶	
N-Al	9×10^{-4}	2.5×10^{-3}	98.8
Koshland reagent	8×10^{-3}	2.5×10^{-3}	92.3
DEP	6×10^{-3}	4.8×10^{-3}	95.0
PCMB	2×10^{-3}	2.0×10^{-3}	99.6
DTNB	1.2×10^{-3}	2.0×10^{-3}	94.6
CMC	2×10^{-3}	5.0×10^{-3}	6.5
CMC	4×10^{-3}	5.0×10^{-3}	4.2
Glyoxal	2×10^{-3}	5.0×10^{-3}	96.3

表 4 CMC 对凝乳酶活力的影响

Table 4 The effects of CMC on rennet activity

浓 度 Concentration (mmol/L)		残 余 活 力 Residual activity (%)	
试 剂 Reagent	酶 Enzyme	未经羟胺处理 Without hydroxylamine treatment	用羟胺处理 With hydroxylamine treatment
2×10^{-2}	5.0×10^{-3}	6.5	9.9
4×10^{-2}	5.0×10^{-3}	4.2	7.5

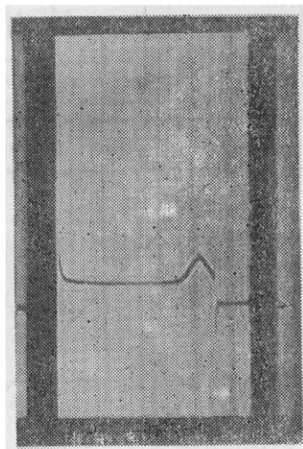


图 5 凝乳酶的分析超离心图谱

Fig. 5 Analytic ultracentrifuge Pattern of rennet

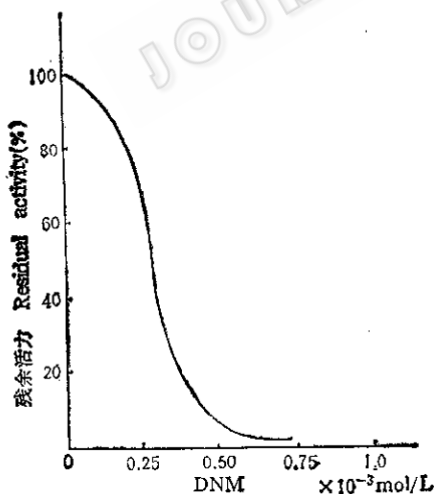


图 6 DNM 对酶的修饰

Fig. 6 Modification of rennet by DNM

略,它的主要作用目标是酶的羧基。

DNM 与 EPNP 对酶的修饰结果分别

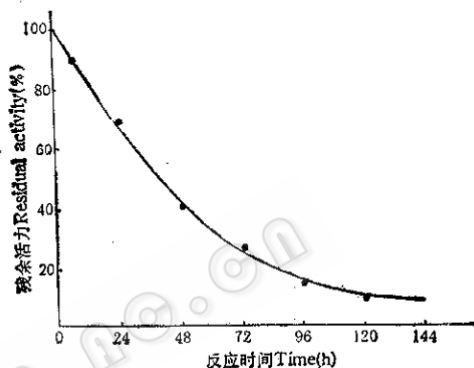


图 7 EPNP 对酶的修饰

Fig. 7 Modification of rennet by EPNP

见图 6 和图 7。

讨 论

胃蛋白酶在与其底物类似物 EPNP 反应时,酶分子的二个羧基被 EPNP 中环氧基产生的羟基所酯化,酶失去活性。在有合成底物存在时,EPNP 对酶的失活作用变慢。实验证明,被作用的羧基中有一个处于酶的活性部位^[12]。另一个胃蛋白酶底物类似物 DNM 在有铜离子存在下,也能迅速使胃蛋白酶失活。究其原因,也是处于酶活性部位的羧基被 DNM 酯化^[13]。这种通过酯化酶活性部位的羧基使酶失去活性的反应在其他天冬氨酸蛋白酶里也同样出现,如牛凝乳酶^[12],这可以作为鉴别天冬氨酸蛋白酶的一个标志,有助于了解这一类酶的活性部位的本质。微生物凝乳酶与 EPNP、DNM 的反应结果也恰是如此,可

以推断,它也是一种典型的天冬氨酸蛋白酶,在酶分子结构和催化机制上也都与胃蛋白酶极其相似,即天冬氨酸的残基参与酶的催化作用。

天冬氨酸蛋白酶的分子量一般为30000—40000,当然也有例外。如啤酒酵母酸性蛋白酶的分子量仅是6000^[14],而脾组织蛋白酶D的分子量却是50000—58000^[15]。微小毛霉凝乳酶的分子量为41800,这与Juhyun^[16]报导的微小毛霉凝乳酶分子量30000有较大差别。这种差别可能由两种原因引起:一是酶分子本身结构上差别,包括氨基酸组成、酶分子中糖的含量等;另一是测定方法差别。我们用SDS电泳方法及从氨基酸组成推算测得酶的分子量均在41000左右,所以还是可信的。

参 考 文 献

- [1] Sardinas, J. L.: *Process Biochem.*, 11(4): 10—

- 17, 1976.
[2] Adler-Nissen, J.: *TIBTECH.*, 5: 170, 1987.
[3] 矫庆华等:北京生化学会学术会议论文汇编, p. 37, 北京, 1986.
[4] Arima, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 31(5): 540—545, 1967.
[5] 崔福锦等:真菌学报, 3(1): 59—64, 1983.
[6] Hodge, J. E.: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1: 338, 1968.
[7] Lowroy, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265—275, 1951.
[8] Laemmli, U. K.: *Nature*, 227: 680—685, 1970.
[9] 杨寿钧:酶制剂工业(上册), (张树政主编), 科学出版社, 北京, p. 307, 1984.
[10] 孟广震:同上, p. 326.
[11] 钱世钧等:微生物学报, 24(4): 335—344, 1984.
[12] Tang, J.: *J. Biol. Chem.*, 246(14): 4510, 1971.
[13] Rajagopalan, T. G.: *J. Biol. Chem.*, 241(18): 4295, 1966.
[14] Kress, L. F. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 113: 375—389, 1966.
[15] Mycek, M. J.: *Methods in Enzymol.*, 19: 285—314, 1971.
[16] Juhyun, Yu et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 32(8): 1051—1053, 1968.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF MILK CLOTTING ENZYME FROM *MUCOR PUSILLUS*

Qian Shijun Zhang Chunqing Jiao Qinghua Tian Kairong Meng Guangzhen

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The purification of the milk clotting enzyme from *Mucor pusillus* was achieved by precipitation with ethanol, column chromatographs on CM-cellulose, DEAE-Sephadex A-25 and Sepharose 2B. The specific activity of the enzyme was enhanced from 296 to 3429 (u/mg), and about 17.9% of the activity was recovered. The purity of the enzyme was judged to be homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis and immunodiffusion analysis. The molecular weight, Michaelis constant for hemoglobin, isoelectric point and sedimentation coefficient were 41800 dalton,

0.019 mmol/L, pH4.3 and 3.2S respectively. Amino acid composition and sugar content of the enzyme were also determined. The results of chemical modification showed that tyrosine, histidine, sulfhydryl group, tryptophane and arginine had no relation to the enzyme activity at all, but carboxyl groups of aspartic acid were essential for the enzyme activity.

Key words

Rennet; Cheese; *Mucor pusillus*; Purification and properties