

耐热中性蛋白酶产生条件及酶的亲和层析纯化

金城 杨寿钧 刘宏迪 张树政

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 从云南西双版纳分离的耐热菌株中筛选到菌号为 HY-69 的菌株,经鉴定为嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)。该菌产中性蛋白酶。对该菌株的产酶条件进行了研究,酶的产量和耐热性均优于其它菌株。发酵液经超滤浓缩、硫酸铵沉淀后以亲和层析纯化。粗酶分别以 Cbz-L-phe-T-sepharose 4B 和 Cbz-D-phe-T-sepharose 4B 纯化,并对两种材料的纯化效果进行了比较,得到了 PAGE 和 SDS-PAGE 均一的酶。

关键词 嗜热脂肪芽孢杆菌,耐热中性蛋白酶,亲和层析

耐热蛋白酶被广泛应用于皮毛、食品、酿造和医药等工业中,是一种应用广泛的工业酶制剂^[1]。近年来耐热蛋白酶引起了研究者的关注,其显著的耐热性为蛋白酶的应用提供了一个很有希望的前景。这方面的研究的进行,不仅具有应用价值,而且对从理论上阐明酶的耐热机制具有现实意义。

多种耐热菌产生的耐热蛋白酶已有报道,其中最著名的是由 *Bacillus thermoproteolyticus* 产生的 Thermolysin^[2-4],和由 *Thermus T-351* 产生的 Caldolysin^[5];由 *Bacillus stearothermophilus* 产生的耐热中性蛋白酶亦已见报道^[6,7]。

我们从云南西双版纳的温泉群中分离了 220 株耐热菌,并从中筛选到一株产耐热中性蛋白酶的菌株嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)HY-69,对其产酶条件进行了研究;而且以两种不同的亲和层析材料对该酶进行了纯化,并对它们的纯化效果作了比较。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

1.1.1 试剂: N-Carbobenzoxy-L-phenylalanine (Aldrich 公司), N-Carbobenzoxy-D-phenylalanine (Sigma 公司), CNBr 活化的 Sepharose 4B (Pharmacia 公司), 碳化二亚胺 (Sigma 公司), N,N-二甲基甲酰胺 (Fluka 公司), 三亚乙基四胺 (Fluka 公司)。

1.1.2 仪器: 高温摇床 (NBS 公司), 层析紫外检测记录仪 (LKB 公司), 721 型分光光度计。

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 PYG 培养基(%): 蛋白胨 0.5, 酵母浸膏 0.3, 葡萄糖 0.1, 氯化钠 0.2, pH7.0—

• 本课题由国家自然科学基金资助。

本文于 1993 年 1 月 19 日收到。

7.2。

1.2.2 PYG 斜面:在 PYG 培养基中加入 2% 琼脂粉。

1.2.3 PYM 培养基(%):蛋白胨 0.1, 酵母浸膏 0.1, 硫酸镁 0.01, 氯化钙 0.05, 氯化钠 0.01, 琼脂粉 2, pH7.2; 灭菌后加入无菌脱脂牛奶 3%(V/V)。

1.2.4 产酶培养基(%):硫酸铵 0.2, 酵母浸膏 0.3, 葡萄糖 0.1, 氯化钠 0.1, 硫酸镁 0.05, 氯化锌 0.005, 氯化锰 0.005, 酪素 0.01, 氯化钙 0.2, pH7.0—7.5。

1.2.5 培养条件:将 HY-69 的 PYG 斜面菌种接种于 PYG 培养基中(40ml/250ml 三角瓶), 60℃ 静止培养 12 小时, 以 10% 接种量接入 400ml 产酶培养基中(2000ml 三角瓶), 于 65℃ (250r/min) 培养 24 小时, 然后于室温静置 4—6 小时; 4000r/min 离心 20 分钟(4℃), 上清液于 4℃ 保存备用; 在此条件下酶产量达 14400U/g 湿菌体。

1.3 菌株

从云南西双版纳的温泉中采样 103 个, 以 PYG 培养基 70℃ 培养 24—48 小时富集, 然后在 PYG 平板上分离单菌落(60℃ 培养 24 小时), 共分离了 220 株菌, 接种于 PYG 斜面, 并冻干保存; 斜面菌种接种于 PYM 平板, 60℃ 培养 24—48 小时后挑选出能分解牛奶而产生透明圈的菌株。菌号为 HY-69 菌株在 PYM 平板上可产生较大的透明圈, 经鉴定 HY-69 为嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)。

1.4 酶活力测定

将 0.5ml 0.6% 酪素(pH7.5)于 80℃ 水浴中保温 5 分钟, 然后加入以蒸馏水作适当稀释之酶液 0.5ml, 反应 10 分钟, 以 1ml 0.4mol/L 三氯乙酸终止反应; 离心后取 1ml 上清液于新管中, 加入 5ml 0.4mol/L 碳酸钠和 0.5ml 福林-酚工作液, 于 40℃ 保温发色 20 分钟, 用 721 分光光度计测定 680nm 吸光度。对照在反应前加三氯乙酸, 其余条件相同。在上述条件下, 每分钟水解酪素释放 1 μ g 酪氨酸的酶量定为一个酶活单位。

1.5 蛋白质测定

用 Lowry 法^[8]; 1—100 μ g 蛋白按 Bradford 法测定^[11]。均以牛血清白蛋白作标准。

1.6 Cbz-L-phe-T-sepharose 4B 的制备

参照 K. Fujiwara 等的方法^[9], 将 8g CNBr-activated sepharose 4B 浸泡于 40ml 0.01 mol/L pH9.5 碳酸缓冲液中(4℃), 加入 4℃ 预冷的 40ml 2mol/L 三亚乙基四胺(pH 9.5), 于 4℃ 温和搅拌过夜; 搅拌结束后以 4℃ 冷水反复洗涤, 加冷水至 40ml, 与 40ml 40% 二甲基甲酰胺(DMF)和 1g L-phe 混合(pH6.0—6.5), 室温搅拌 12 小时, 然后加入 20ml 2.5% 碳化二亚胺继续室温搅拌 12 小时; 装柱, 分别以 100ml 0.1mol/L NaHCO₃ 和 100ml 0.1 mol/L 冰醋酸洗脱, 最后以蒸馏水洗脱, 即得亲和柱。

1.7 Cbz-D-phe-T-sepharose 4B 的制备

参照 K. Fujiwara 等的方法^[10], 将 1.25g CNBr-activated sepharose 4B 浸泡于 10ml 0.01mol/L pH9.5 碳酸缓冲液中(4℃), 加入 4℃ 预冷的 10ml 2mol/L 三亚乙基四胺(pH9.5), 于 4℃ 温和搅拌过夜; 搅拌结束后以 4℃ 冷水反复洗涤, 加入等体积之含 0.15g Z-D-phe 的 40% 二甲基甲酰胺(DMF)(pH6.0), 室温搅拌 12 小时, 然后加入 0.075g 碳化二亚胺继续室温搅拌 12 小时, 装柱, 分别以 100ml 0.1mol/L NaHCO₃ 和 100ml 0.1mol/L 冰醋酸洗脱, 最后以蒸馏水洗脱, 即得亲和柱。

2 结果

2.1 菌株 HY-69 的产酶条件

2.1.1 不同碳源对产酶的影响:改变产酶培养基中碳源的种类,除乳糖和木糖外,均可作为产酶培养基的碳源,其中葡萄糖效果最好(表 1)。

表 1 不同碳源对产酶的影响

Table 1 Effect of carbon sources on the enzyme production

碳 源 Carbon source (0.2%)	酶 活 Activity (U/ml)
空 白 Control	4.16
阿 拉 伯 糖 Arabinose	36.23
玉 米 粉 Corn flour	20.78
果 糖 Fructose	29.92
半 乳 糖 Galactose	17.78
葡 萄 糖 Glucose	42.05
乳 糖 Lactose	0
麦 芽 糖 Maltose	20.78
甘 露 糖 Mannose	32.74
淀 粉 Starch	22.94
蔗 糖 Sucrose	23.92
木 糖 Xylose	0

2.1.2 不同氮源对产酶的影响:改变产酶培养基中氮源种类,除无机氮源硫酸铵和硝酸铵外,其余的均可作为产酶培养基的氮源,其中以硫酸铵与酵母浸膏同时使用效果最好(表 2)。

2.1.3 碳源与氮源的对比对产酶的影响:通过对葡萄糖、硫酸铵、酵母浸膏不同浓度配比的实验,可知在产酶培养基中加入葡萄糖 0.1%,硫酸铵 0.2%和酵母浸膏 0.3%时产酶最高(表 3)。

2.1.4 葡萄糖浓度对产酶的影响:产酶培养基中葡萄糖浓度为 0.1%时产酶效果最好;低于 0.1%时,产酶量随葡萄糖浓度的增大而增高;当葡萄糖浓度高于 0.1%时,产酶受抑制(图 1)。

2.1.5 起始 pH 对产酶的影响:产酶培养基的起始 pH 在 7.5 左右时产酶最高(图 2)。

表 2 不同氮源对产酶的影响

Table 2 Effect of nitrogen sources on the enzyme production

氮 源 Nitrogen source	浓 度 Concentration (%)	酶 活 Activity (U/ml)
对 照 Control		10.30
蛋白胨 Polypeptone	0.5	34.90
酵母浸膏 Yeast extract	0.5	18.61
蛋白胨+酵母浸膏 Polypeptone+Yeast extract	0.3+0.2	37.40
硫 酸 铵+酵母浸膏 (NH ₄) ₂ SO ₄ +Yeast extract	0.3+0.2	68.14
尿 素+酵母浸膏 Urea+Yeast extract	0.3+0.2	46.20
硝 酸 铵+酵母浸膏 NH ₄ NO ₃ +Yeast extract	0.3+0.2	42.71
硫 酸 铵 (NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	0
尿 素 Urea	0.5	14.46
硝 酸 铵 NH ₄ NO ₃	0.5	0

表 3 碳/氮比对产酶的影响

Table 3 Effect of carbon/nitrogen ratio on the enzyme production

葡萄糖浓度 Conc. of glucose (%)	硫酸铵浓度 Conc. of (NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	酵母浸膏浓度 Conc. of extract (%)	酶活 Activity (U/ml)
0.1	0.30	0.20	78.45
0.1	0.25	0.25	61.81
0.1	0.20	0.30	89.75
0.1	0.10	0.40	43.88
0.1	0.40	0.10	54.51
0.2	0.30	0.20	63.16
0.2	0.25	0.25	63.49
0.2	0.20	0.30	73.13
0.2	0.10	0.40	57.84
0.2	0.40	0.10	10.47
0.3	0.30	0.20	11.30
0.4	0.30	0.20	5.32

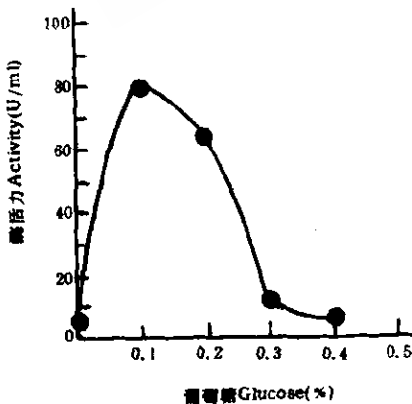


图 1 葡萄糖浓度对产酶的影响

Fig. 1 Effect of conc. of glucose on the enzyme production

2.1.6 通气量对产酶的影响:在 2000ml 的三角瓶中加 250—500ml 产酶培养基,接种后于 65 C, 250r/min 培养 24 小时,结果发现 350—400ml/flask 的通气量,在本实验条件下产酶最高。

2.1.7 菌体生长与产酶的关系:HY-69 菌株培养 15 小时即达到菌体生长的对数期末期并进入生长后期,菌体生长后期为产酶高峰期(15—26 小时)(图 3)。

2.2 酶的亲和层析纯化

2.2.1 粗酶的制备:发酵液于 4000r/min 离心 20 分钟(4 C),将上清液用中空纤维柱(孔径 6000)超滤浓缩 15—20 倍,浓缩液以硫酸铵沉淀,取 30—60% 段之沉淀溶于 0.01mol/L pH7.5 Tris-HCl 缓冲液(含 0.01mol/L Ca²⁺)中,并对相同缓冲液充分透析至无 NH₄⁺,即得粗制酶液(表 4),4 C 保

存备用。

2.2.2 不同亲和层析的纯化效果比较: Cbz-L-phe-T-sepharose 4B: 以起始缓冲液 0.01mol/L pH7.5 Tris-HCl(含 10mmol/L Ca^{2+})预平衡柱(1×10cm),加入 50mg 粗酶,加样后以起始缓冲液洗脱未吸附蛋白,然后依次以 1mol/L NaCl-起始缓冲液和 10%乙二醇-起始缓冲液洗脱杂蛋白,最后以 30%乙二醇-起始缓冲液洗脱,流速为 5ml/h(图 4),经测定此时洗下的蛋白峰即为酶峰,收集蛋白峰并对起始缓冲液透析除去乙二醇。酶纯化后比活为 32600U/mg,酶回收率为 80.3%。Cbz-D-phe-T-sepharose 4B:以起始缓冲液 0.01mol/L pH9.0 Tris-HCl(含 10mmol/L Ca^{2+})预平衡柱(1×5cm),10mg 粗酶样品对起始缓冲液透析平衡后加样,再以起始缓冲液洗脱未吸附蛋白,然后以 0.01mol/L pH7.5 Tris-HCl 缓冲液(含 10mmol/L Ca^{2+})洗脱,流速 10—15ml/h,收集蛋白峰,经测定即为酶峰(图 5)。纯化后的酶比活为 19200U/mg,酶回收率为 80.7%。

纯化效果比较,两种亲和层析纯化结果见表 4。从酶的比活可知 Cbz-L-phe-T-sepharose 4B 的纯化效果优于 Cbz-D-phe-T-sepharose 4B。两种柱分离的酶均能达到 PAGE 和 SDS-PAGE 均一。

3 讨论

目前普通蛋白酶酶单位的测定都是规定在 37℃ 反应,但耐热蛋白酶在常温下测定酶活都很低^[12],难以正确反映耐热蛋白酶的酶活水平,如 caldolyisin 的酶活测定就在 75℃ 下反应^[5]。我们曾做过比较,同一酶样品,测定时在 80℃ 反应 10 分钟酶活为 100%,而在 37℃ 反应 10 分钟酶活只有 8%;同时根据粗酶的测定该酶的最适反应温度为 85℃ 左右,因此我们将该蛋白酶单位的测定选定在 80℃ 下反应 10 分钟。

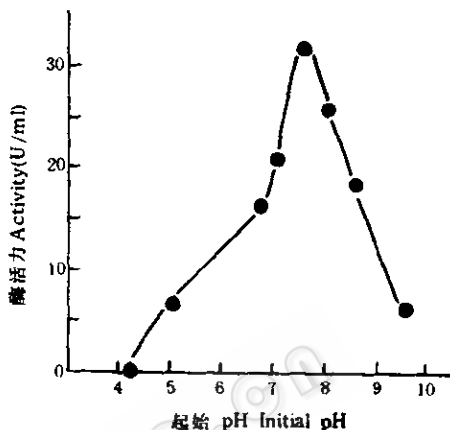


图 2 起始 pH 值对产酶的影响

Fig. 2 Effect of initial pH on the enzyme production

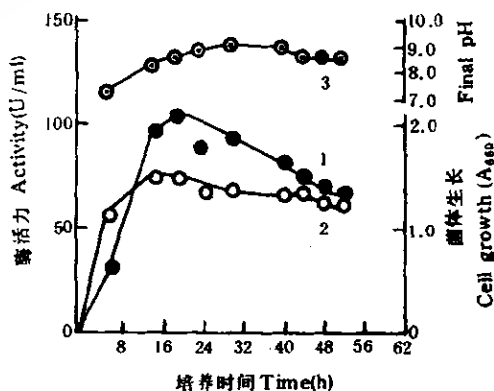


图 3 菌体生长与产酶的关系

Fig. 3 Time course of the enzyme production

1. 酶活 Activity;
2. 菌体 Cell growth;
3. 培养液 pH 值 Final pH.

表 4 酶的纯化

Table 4 Purification of the enzyme

处理步骤 Step	体 积 Volume (ml)	总酶活 Total activity (U/ml)	总蛋白 Total protein (mg)	比 活 Specific activity (U/mg)	酶回收率 Recovery of enzyme (%)	纯化倍数 Purification
发酵上清液 Supernatant	4800	518000	3290	157	100	1.0
超滤浓缩 Ultrafiltration concentration	350	361000	490	736	69.7	4.7
硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate fractionation (30-60%)	17.5	203000	59.3	3420	39.2	21.8
Cbz-L-phe- T-sepharose 4B*	53	106000	3.25	32600	80.3	
Cbz-D-phe- T-sepharose 4B**	13.5	3620	0.189	19200	80.7	

* 上样量为粗酶(硫酸铵沉淀后的酶液)14ml Crude enzyme((NH₄)₂SO₄ fractionation)14ml.

** 上样量为粗酶 0.4ml Crude enzyme 0.4ml.

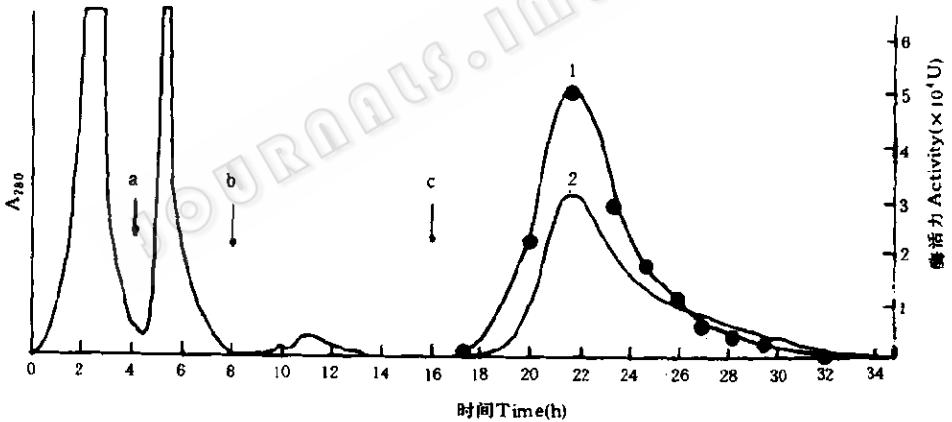


图 4 Cbz-L-phe-T-sepharose 4B 的亲和层析图

Fig. 4 Affinity chromatography with Cbz-L-phe-T-sepharose 4B

层析柱 Column: 1 × 10cm; 洗脱流速 Elution rate: 5ml/h;

1. 酶活 Activity; 2. A₂₈₀

a: 1mol/L NaCl-initial buffer; b: 10% ethyleneglycol-initial buffer; c: 30% ethyleneglycol-initial buffer;

Initial buffer: 0.01mol/L pH7.5 Tris-HCl(10mmol/L Ca²⁺).

在 *Bacillus stearothermophilus* HY-69 的产酶培养基中,需加入钙离子,因为钙离子是酶的重要稳定剂^[12],可能还有助于酶的外泌。菌体经 65℃, 250r/min 培养 24 小时后,于室温下静置 4—6 小时,亦有助于酶的外泌。耐热菌的酶产量一般都较低,作为生产菌显

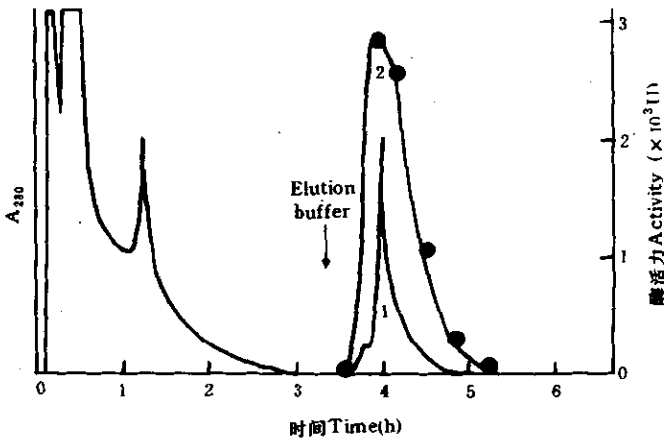


图 5 Cbz-D-phe-T-sepharose 4B 亲和层析图

Fig. 5 Affinity chromatography with Cbz-D-phe-T-sepharose 4B

层析柱 Column: 1 × 5cm; 洗脱流速 Elution rate: 10–15ml/h;

1. A_{280} ; 2. 酶活力 Activity.

Initial buffer: 0.01mol/L pH9.0 Tris-HCl(10mmol/L Ca^{2+});

Elution buffer: 0.01mol/L pH7.5 Tris-HCl(10mmol/L Ca^{2+}).

然不行,况且高温发酵利用现有设备是不行的。可用基因工程的方法提高酶产量,耐热酶基因在常温菌中表达后不必更换设备即可进行生产。Sidler 等(1980)报道在 330 升的 *B. stearothermophilus* 发酵液中只得到 54mg 纯中性蛋白酶^[13];杨庆云等(1991)报道的 *B. stearothermophilus* 313-1 的发酵液酶产量为 4.88U/ml(60℃测定)^[14]。我们从 4.8L 的发酵液中得到 3.66mg 的纯酶,发酵液酶产量在 60℃测定为 24.0U/ml;酶的性质研究亦表明我们报道的酶耐热性高于其它耐热中性金属蛋白酶(有关文章另发)。因此以 *B. stearothermophilus* HY-69 作为研究的出发菌是比较理想的。

酶的亲和层析纯化样品为经超滤浓缩和硫酸铵沉淀处理的粗酶样,而不用发酵上清液,这主要是因为发酵上清液中酶的浓度低,不利于与亲和层析配体的吸附;使用浓缩后的样品,酶浓度大,酶就能与配体充分作用并结合。

两种材料的亲和层析中,Cbz-L-phe-T-sepharose 4B 的效果比 Cbz-D-phe-T-sepharose 4B 好,前者由于与蛋白酶的疏水作用较强,故而需用乙二醇破坏其疏水作用区才能将酶洗脱下来,后者只需改变 pH 即可使酶解吸附。这可能是 L-phe 为天然构型,与酶底物的空间结构更为近似,所以酶与配体作用较强,而非天然构型的 D-phe 与酶的结合较弱。

已经报道的耐热中性蛋白酶的分离纯化都是用常规方法,如离子交换层析,凝胶过滤层析等,Fujiwara 等用亲和层析纯化 Thermolysin 获得成功^[9,10],并认为他们所用的亲和层析适用于纯化中性蛋白酶。实验结果表明,Fujiwara 等的方法适用于纯化 *B. stearothermophilus* HY-69 的耐热中性蛋白酶。此方法快速简便,一次柱层析便可达到纯化目的,而且特异性强,是一种极有效的纯化方法。

参 考 文 献

- [1] 胡学智, 蛋白酶. 见: 张树政主编: 酶制剂工业(下册). 北京: 科学出版社, 1984. 421—431.
- [2] Endo S. *J Ferment Technol*, 1962, 40: 346.
- [3] Ohta Y. *J Biol Chem*, 1967, 242 (3): 509.
- [4] Ohta Y, Ogura Y, Wada A. *Biol Chem*, 1966, 241 (24): 5919.
- [5] Cowan D A, Daniel R M. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1982, 705: 293—305.
- [6] Feder J, Kuo M J Wildi B S. *Develop Ind Microbiol*, 1977, 18: 267.
- [7] Kubo M. *J Ferment Technol*, 1988, 66: 13—17.
- [8] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L et al. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265—275.
- [9] Fujiwara K, Osue K, Tsuru D. *J Biochem*, 1975, 77: 739—743.
- [10] Fujiwara K, Tsuru D. *Int J Peptide Protein Res*, 1977, 9: 18—26.
- [11] Bradford M M. *Anal Biochem*. 1976, 72: 248—254.
- [12] Sonnleitner B. *Adv Biochem Eng/Biotechnol*, 1983, 28: 69—138.
- [13] Sidler W, Zuber H. *Eur J Appl Microbiol biotechnol*. 1980, 10: 197—209.
- [14] 杨庆云, 江行娟, 吴琳, 等. 生物工程学报, 1991, 7 (3): 207—212.

**PRODUCTION CONDITIONS AND AFFINITY
CHROMATOGRAPHY OF THERMOSTABLE NEUTRAL
PROTEASE FROM *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* HY-69**

Jin Cheng Yang Shoujun Liu Hongdi Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Strain HY-69, isolated from the springs of Xishuangbanna Autonomy, Yunnan Province, can produce thermostable neutral protease. The strain is *Bacillus stearothermophilus*. The production conditions of strain HY-69 have been studied. The crude enzyme, treated with ultrafiltration concentration and ammonium sulfate fractionation, was purified with Carbobenzoxy-L-phenylalanine-triethylenetetramine-sepharose 4B and Carbobenzoxy-D-phenylalanine-triethylenetetramine-sepharose 4B, respectively. Differences between two kinds of affinity chromatography have been compared. The purified enzyme appears homologueous on PAGE and SDS-PAGE.

Key words *Bacillus stearothermophilus*, Thermostable neutral protease, Affinity chromatography