

胞外弹性蛋白酶产生菌的筛选及酶的纯化

颜子颖* 关国雄** 张维钦 林哲甫

(中山大学生物化学系 广州 510275)

摘要 从土壤中筛选到 132 株能分泌胞外弹性蛋白酶的细菌,经复筛得 5 株产酶在 100u/ml 以上,其中 No. 17-87 菌每毫升发酵液含酶 120 单位,经鉴定为芳香黄杆菌。该菌在 26℃ 发酵 21 小时酶产量即达峰值。从发酵液中分离纯化得到聚丙烯酰胺凝胶电泳均一的酶制品。SDS-PAGE 测得分子量为 21300,最适作用温度为 50℃,最适作用 pH 为 7.4,在 pH4.5—9.5 范围内稳定,重金属离子 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Hg^{2+} 和 Ag^{+} 等严重抑制酶活性。

关键词 芳香黄杆菌,胞外弹性蛋白酶,产酶条件,酶提纯和性质

弹性蛋白酶 (elastase) 是一种以水解不溶性弹性硬蛋白 (elastin) 为特征的蛋白水解酶,现主要用作治疗高脂血症、防治动脉粥样硬化的生化药物^[1],同时由于其广谱蛋白水解酶的性质,它不仅在医疗上有其药用价值,而且在食品工业上也有广阔的应用前景,具有较高的商业价值。目前国内该酶的生产来源于动物胰脏,为解决脏器资源对大量生产该酶的限制,作者从土壤中筛选出弹性蛋白酶的产生菌株,以探讨应用工业化发酵大规模生产该酶的可能。尽管利用微生物生产弹性蛋白酶国外也有研究^[2],但在国内尚属空白。本文首次报道在国内筛选到的一株高产弹性蛋白酶的芳香黄杆菌,并就产酶条件、酶的提纯及性质进行研究,为应用微生物生产弹性蛋白酶奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试剂

地衣红-弹性蛋白 (orcein-elastin) 及弹性蛋白-(elastin), Sigma 公司产品。DEAE-纤维素 (DE32), Whatman 公司产品。Sephadex G-75, Pharmacia 产品。低分子量蛋白质标准,上海东风生化试剂厂产品。

1.2 培养基及培养方法

1.2.1 菌种分离平板及斜面培养基 (%): 牛肉膏 0.4, 蛋白胨 0.6, 酵母膏 0.2, NaCl 0.5, 琼脂 2.0, pH7.0。

1.2.2 初筛弹性蛋白平板培养基 (%): 弹性蛋白 0.8, 酵母膏 0.1, 葡萄糖 0.1, K_2HPO_4 0.1, KH_2PO_4 0.05, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, 琼脂 2.0, pH7.0。

* 现在工作单位: 中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100052。

** 现在工作单位: 广州白云山制药总厂生化研究所, 广州 510515。

本文于 1993 年 8 月 3 日收到。

1.2.3 富集培养基(%):弹性蛋白 0.5, 酵母膏 0.01, 葡萄糖 0.1, K_2HPO_4 0.1, KH_2PO_4 0.05, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, pH7.0。

1.2.4 发酵培养基 A(%):干酪素 3, 葡萄糖 4, 玉米提取液 0.2, K_2HPO_4 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, pH6.0。

1.2.5 斜面及平板培养:30℃恒温培养 24 小时。

1.2.6 复筛发酵培养:发酵培养基 A 10ml 盛于 50ml 三角瓶中,接种后在回转式振荡器 30℃, 180r/min 振荡培养 24 小时。

1.2.7 发酵条件研究:发酵培养基 A 30ml 盛于 250ml 三角瓶中,接种后在回转式振荡器 30℃, 180r/min 振荡培养 24 小时。

1.3 测定方法

1.3.1 弹性蛋白酶活性测定方法:接 Sacher^[3]方法并参照我国现行药用弹性蛋白酶测定方法^[4]进行。该法以与染料偶联的不溶性底物被酶作用而溶解至水相,反应上清液的光密度反映底物被酶消化的程度。具体如下:2% (w/v) orcein-elastin 混悬液 1 ml, pH7.4、0.2mol/L 硼酸缓冲液 1 ml, 适当稀释的酶液 1 ml, 37℃振荡反应 20 分钟,加入 pH6.0、0.7mol/L 磷酸钠缓冲液 3 ml 终止反应,离心后上清液测 590nm 光密度,以 1 ml 无离子水替代酶液的反应系统为空白。在此反应条件下溶解 1.0mg orcein-elastin 底物所需的酶量定义为 1 个弹性蛋白酶活性单位 (u)。

1.3.2 菌生长浓度的计算:取 1ml 发酵液加水稀释 20 倍,测 600nm 处光密度。

1.3.3 蛋白浓度的测定:按 Bradford^[5]法进行。

1.3.4 分子量的测定:按 Weber-Osborn^[6]的 SDS-PAGE 方法进行。

1.4 胞外弹性蛋白酶产生菌的筛选

采集到的土样先经富集培养液培养 48 小时,稀释涂布于牛肉膏平板形成单菌落,再点种于弹性蛋白平板进行初筛。选择细菌水解弹性蛋白所形成的透明圈直径与菌径之比比较大的进行摇瓶发酵复筛,测定发酵液弹性蛋白酶活力。

1.5 酶的分离纯化

将发酵液离心弃菌体,上清液以硫酸铵分段盐析,沉淀溶解并对 pH8.5、0.05 mol/L Tris-Cl 缓冲液透析后上以同样缓冲液平衡的 DEAE-纤维素柱并洗涤,然后改以 pH8.0、0.1mol/L Tris-Cl 洗脱,收集活性部分,浓缩后在 Sephadex G-75 柱上凝胶过滤,收集活性峰,冰冻干燥得弹性蛋白酶制品。该制品在胶浓度 7%、 β -丙氨酸-乙酸系统 (pH4.3) 垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳进行纯度分析,考马斯亮蓝法显迹。

2 结果

2.1 产胞外弹性蛋白酶菌株的筛选

作者从中山大学校园等处采集到 30 份土样先经液体富集培养 24 小时,稀释涂布于牛肉汤平板形成单菌落。再点种于弹性蛋白平板进行初筛。选择细菌水解弹性蛋白所形成的透明圈直径与菌径之比比较大的进行摇瓶发酵复筛,发酵液测定弹性蛋白酶活力。实验结果表明弹性蛋白水解所形成的透明圈的大小与细菌产弹性蛋白酶的能力具正相关性。经富集培养分离出的 1290 株细菌通过初筛、复筛,检出能分泌胞外弹性蛋白酶的菌

株有132株,占10.3%,其中有五株产酶能力均在100u/ml以上。有一株编号为17-87的细菌每毫升发酵液含弹性蛋白酶活力达120u,经单株分离且连续传代产酶能力无明显下降。

2.2 No. 17-87 菌株鉴定及生理生化性质

2.2.1 形态及生长特征:牛肉汤平板上生长良好,菌落黄色,圆形,凸起;在弹性蛋白平板上生长24小时形成蛋白水解透明圈。可在麦康凯氏培养基上生长,血平板溶血,SS琼脂平板不生长,生长菌产果汁香味,革兰氏阴性菌,两端钝圆,无芽孢、鞭毛、荚膜,无动力。

2.2.2 生理生化性质:氧化酶、过氧化氢酶阳性;O/F葡萄糖培养基、克氏双糖培养基阴性;非发酵菌,对麦芽糖、蔗糖、乳糖、木糖、阿拉伯糖、果糖、棉子糖、鼠梨糖、半乳糖、甘露糖、山梨糖、肌醇、侧金盏花醇不产酸;吲哚试验、硫化氢试验、V-P试验阴性;硝酸盐还原试验阴性;Simmon's柠檬酸盐利用阴性;液化明胶;不水解淀粉;脲酶阴性;精氨酸双水解酶、 β -半乳糖苷酶阴性;赖氨酸、鸟氨酸、精氨酸、苯丙氨酸脱羧酶均为阴性;乙酰胺酶阳性。

根据17-87菌的生长特征及生理生化反应经广东省人民医院细菌室协助,鉴定为芳香黄杆菌(*Flavobacterium odoratum*)。

2.3 产酶条件的研究

2.3.1 碳源对产酶的影响:以折算纯碳量相当的不同碳源替代发酵培养基A中的葡萄糖进行发酵,测定发酵液弹性蛋白酶活性,结果见表1。

表1 不同碳源对产酶的影响

Table 1 Effect of various carbohydrate on enzyme production

碳源 Carbohydrate	起始 pH Initial pH	最终 pH Final pH	生物量 Biomass (OD ₆₀₀ × 20)	酶产量 Enzyme production (u/ml)
葡萄糖 Glucose	6.0	7.5	0.59	130
麦芽糖 Maltose	6.0	7.0	0.47	94
蔗糖 Sucrose	6.0	7.7	0.57	97
果糖 Fructose	6.0	7.0	0.37	77
乳糖 Lactose	6.0	7.7	0.35	69
阿拉伯糖 Arabinose	6.0	6.0	0.055	7
糊精 Dexrin	6.0	7.7	0.62	125
麸皮 Wheat bran	6.0	7.7	0.8	130
玉米粉 Corn meal	6.0	7.0	0.8	113
马铃薯淀粉 Potato starch	6.6	7.7	0.8	91

2.3.2 氮源对产酶的影响:以折算纯氮相当的不同氮源替代发酵培养基A中的干酪素进行发酵,测定发酵液弹性蛋白酶活性,结果见表2。铵盐、硝酸盐、亚硝酸盐等无机氮源均不能支持该菌的生长及产酶。

表 2 氮源对产酶的影响

Table 2 Effect of various nitrogen compounds on enzyme production

氮源 Nitrogen source	起始 pH Initial pH	最终 pH Final pH	生物量 Biomass (OD ₆₀₀ × 20)	酶产量 Enzyme production (u/ml)
干酪素 Casein	6.0	7.6	0.64	130
羽毛粉 Fowlfeather meal	6.0	7.0	0.69	94
蛋白胨 Peptone	6.0	7.7	0.66	58
黄豆饼粉 Soy bead meal	6.0	6.4	0.55	56
牛肉膏 Beef extract	6.0	8.5	0.34	50
酵母粉 Yeast extract	6.0	6.4	0.62	43
猪血粉 Pig blood powder	6.0	8.5	0.58	23

2.3.3 利用廉价原料的发酵培养基 B 的构建: 从研究 *Flavobacterium odoratum* 17-87 生长和产酶对各种碳、氮源的要求得知, 葡萄糖、干酪素分别是产酶的最适碳、氮源, 但也能利用廉价的原料如麸皮、羽毛粉等发酵且生长良好, 并有较高的相对酶产量, 从经济的角度考虑, 利用这些原料发酵更符合工业化生产的要求。作者通过正交试验考察其组成比例对产酶的影响, 构建了发酵培养基, 其配方如下: 羽毛粉 3%, 麸皮 6%, 玉米提取液 0.2%, K₂HPO₄ 0.2%, MgSO₄ · 7H₂O 0.01%, pH7.0。 *Flavobacterium odoratum* 17-87 在其中发酵 18 小时, 酶产量相当于培养基 A 的 80%。

2.3.4 培养时间对产酶的影响: 在发酵培养基 A 和 B 中, 28℃ 振荡培养不同时间, 酶产量的变化见表 3。可见在 21 小时酶产量已达峰值, 继续至 40 小时, 酶活力开始有所下降。

表 3 产酶时间过程

Table 3 The time course of enzyme production

培养时间 Cultural time (h)	培养基 A Medium A			培养基 B Medium B		
	发酵液 pH Broth pH	生物量 Biomass (OD ₆₀₀ × 20)	酶产量 Enzyme production (u/ml)	发酵液 pH Broth pH	生物量 Biomass (OD ₆₀₀ × 20)	酶产量 Enzyme production (u/ml)
6	6.2	0.057	0	6.2	0.097	0
9	6.4	0.257	2	6.2	0.249	16
12	6.7	0.380	71	6.6	0.437	55
15	7.0	0.45	93	6.8	0.627	74
18	7.2	0.580	120	7.0	0.688	95
21	7.5	0.580	128	7.0	0.717	95
24	7.5	0.580	126	7.0	0.862	100
32	7.8	0.580	126	7.8	0.880	100
40	8.4	0.580	113	9.0	0.702	81
46	8.8	0.560	104	9.0	0.689	78

2.3.5 通气对产酶的影响: 250ml 三角瓶装入不同量的培养基, 按 1% 接种菌悬液, 培养后测发酵液酶活, 结果见图 1。增加通气有利于酶的高产。

2.3.6 培养温度对产酶的影响: 在不同温度下振荡培养后测酶活, 结果见图 2。在 26°C 酶产量最高。

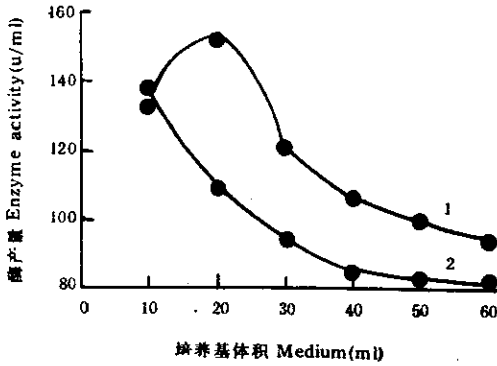


图 1 通气量对产酶的影响

Fig. 1 Effect of aeration rate on the enzyme production

1. 培养基 A Medium A;
2. 培养基 B Medium B.

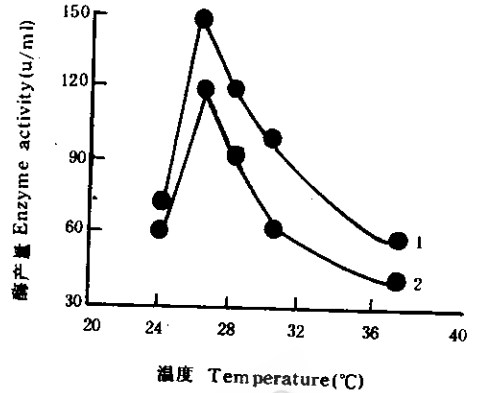


图 2 培养温度对产酶的影响

Fig. 2 Effect of cultural temperature on the enzyme production

1. 培养基 A Medium A;
2. 培养基 B Medium B.

2.4 酶的提纯和性质

2.4.1 酶的提纯: 采用硫酸铵分级沉淀, DEAE-纤维素离子交换层析及 Sephadex G-75 凝胶过滤对 *Flavobacterium odoratum* 17-87 发酵液中的弹性蛋白酶进行分离纯化, 结果见表 4。所得酶制品达聚丙烯酰胺凝胶电泳均一。

表 4 黄杆菌弹性蛋白酶的纯化

Table 4 Purification of the elastase from *F. odoratum* 17-87

提纯步骤 Step	体积 Volume (ml)	蛋白浓度 Protein conc. (mg/ml)	总活力 Total activity (u)	比活力 Specific activity (u/mg)	回收率 Recovery (%)	提纯倍数 Purification fold
发酵液 Fermentation liquor	380	8.2	37314	12.0	100	1
离心弃菌体 Centrifugation	317	3.5	37310	33.6	100	2.8
分级盐析 (NH ₄) ₂ SO ₄ fraction	26	10.6	33214	118.8	89	9.9
DEAE-纤维素柱 DEAE-cellulose column	61	0.53	12910	390.0	34.6	32.5
G-75 凝胶过滤 Sephadex G-75 gel filtration	36	0.21	4478	572	12	47.7

2.4.2 分子量的测定:在胶浓度10%的SDS-PAGE垂直板上进行,染色后根据标准蛋白质样品的 R_f 值和分子量的对数绘制标准曲线,再由弹性蛋白酶的 R_f 值在标准曲线上求得其分子量为21380(图3)。

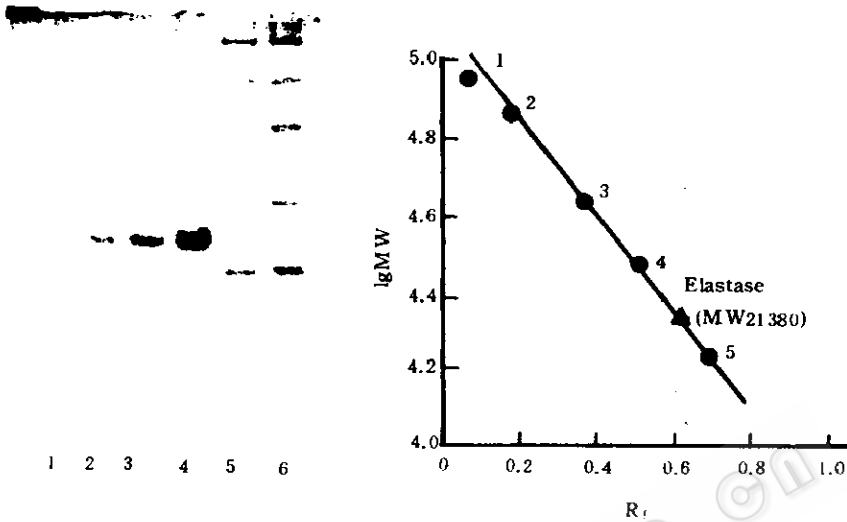


图3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测弹性蛋白酶分子量

Fig. 3 Molecular weight of elastase by SDS-PAGE

泳道1—4: 弹性蛋白酶(6 μ g, 10 μ g, 20 μ g, 40 μ g)

Lane 1—4: Elastase (6 μ g, 10 μ g, 20 μ g, 40 μ g);

泳道5—6: 标准蛋白分子量

Lane 5—6: The molecular weight of standard proteins.

- 右图
1. 磷酸化酶 A phosphorylase A (94 000);
 2. 牛血清白蛋白 Bovine serum albumin (68 000);
 3. 肌动蛋白 Actin (43 000);
 4. 碳酸酐酶 Carbonic anhydrase (30 000);
 5. 烟草花叶病毒衣壳蛋白 TMV capsid protein (17 500).

2.4.3 酶作用最适温度:在不同温度下测定酶活力,结果见图4-A。酶作用的最适温度为50 $^{\circ}$ C。

2.4.4 酶作用最适pH:在不同pH环境下测定酶活力,结果见图4-B。酶作用的最适pH为7.4。

2.4.5 酶的热稳定性:将酶液和0.2 mol/L 硼酸缓冲液(pH7.4)在不同温度下保温不同时间后在37 $^{\circ}$ C测定酶活性,以未经保温的酶液100%计,结果见图5。该酶在40 $^{\circ}$ C以下稳定性良好,50 $^{\circ}$ C以下1小时严重失活,60 $^{\circ}$ C活力全部丧失。

2.4.6 酶的酸碱稳定性:将已对无离子水透析的酶液稀释于0.02 mol/L的不同pH的缓冲液(pH3.6—5.6为乙酸-乙酸钠,pH5.6—7.4为磷酸钠,pH7.4—9.0为硼酸-硼酸钠,pH9.5—10.6为碳酸钠),于室温(18 $^{\circ}$ C)放置16小时,取出立即放置冰浴,用0.2 mol/L的硼酸缓冲液调pH到7.4,再测定酶活性(图6),可见该酶的pH稳定范围较宽。

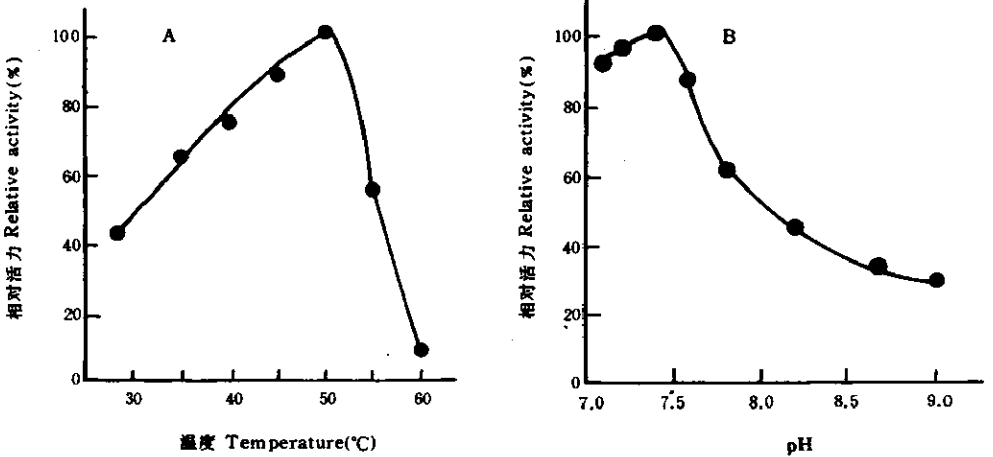


图4 温度 (A) 和 pH (B) 对酶活力的影响

Fig.4 Effect of temperature (A) and pH (B) on the enzyme activity

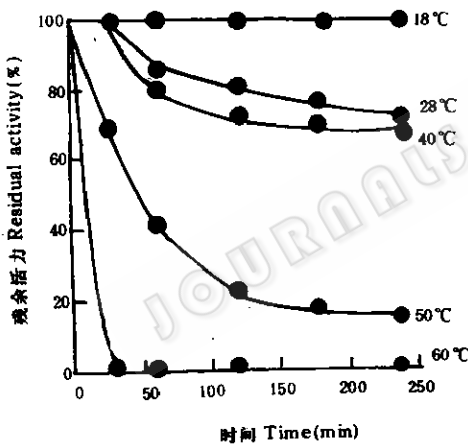


图5 温度对酶稳定性的影响

Fig.5 Effect of temperature on enzyme stability

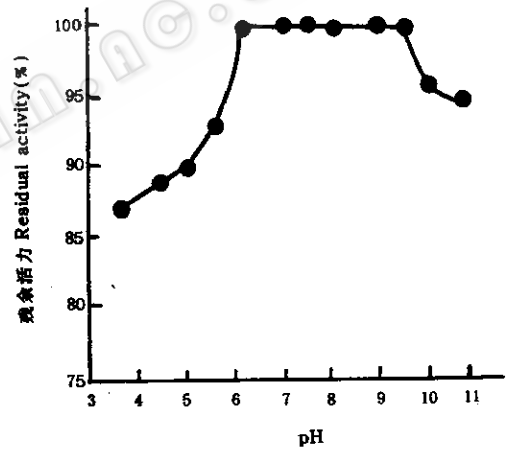


图6 酶的 pH 稳定性

Fig.6 Stability of elastase at different pH values

2.4.7 金属离子对酶活性的影响:在测定酶活的反应体系中添加不同的金属离子至终浓度 0.3 mmol/L,考察它们对酶活性的影响。结果表明重金属离子 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 等严重抑制弹性蛋白酶活性。

3 讨论

本实验进行产弹性蛋白酶的微生物菌种筛选,每升发酵液酶产量相当于 600g 猪胰脏的弹性蛋白酶含量,而且该菌营养要求简单,产酶迅速。

弹性蛋白酶是一经济价值较高的蛋白酶种,除了作为生化药物以外,由于其具有广谱蛋白水解酶的特性,在食品工业有广阔的应用前景。作者曾考察了黄杆菌弹性蛋白酶

对不同蛋白质底物的水解活性，结果表明电泳均一的黄杆菌弹性蛋白酶对干酪素、血纤维蛋白、白蛋白、明胶、血红蛋白等多种蛋白质均能水解，但当这些蛋白质与弹性蛋白共存时，酶对弹性蛋白优先水解，因而在肉类嫩化及食用蛋白深加工等方面很有意义（结果另文报道）。但目前国内仅从脏器来源生产，成本高，产量有限，限制了该酶的应用。本工作为解决大规模工业化生产弹性蛋白酶提供了新的途径。虽然来自菌源的弹性蛋白酶与胰源弹性蛋白酶的性质有所差别，黄杆菌弹性蛋白酶用于医药还需对其药理毒理方面进行必要的工作。但即使作为一新型的工业用广谱蛋白水解酶的生产出发菌，对我国酶制剂工业的发展仍有积极意义。

参 考 文 献

- [1] 陈新谦, 金有豫. 新编药理学 (12 版), 北京: 人民卫生出版社, 1988. 327.
 [2] 椎尾勇. 公开特许公报, 昭 57-107184.
 [3] Sachar L A. *Proc Soc Exptl Biol Med*, 1955, **90**: 323.
 [4] 张天民. 动物生化制药学, 北京: 人民卫生出版社, 1981. 139.
 [5] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248--254.
 [6] Weber K, Osborn M. *J Biol Chem*, 1969, **244**: 4406.

STUDIES ON ELASTASE FROM *FLAVOBACTERIUM* I. STRAIN SCREENING AND ENZYME PURIFICATION

Yan Ziying Guan Guoxiong Zhang Weiqin Lin Zhefu

(Department of biochemistry Zhongshan University Guangzhou 510275)

Abstract 132 strains bacteria secreting extracellular elastase were isolated from soil samples, 5 of them possessed considerably high elastolytic activity of more than 100u/ml. The highest-yield strain No. 17-87 was characterized as *Flavobacterium odoratum*, studies on the condition of elastase production revealed that its optimum carbohydrate and nitrogen source were glucose and casein respectively, and that it could utilize fowl feather meal and wheat bran to give 80% relative yield. The culture exhibited maximum elastase activity at 26°C for 21 hours, the productivity could be increased when the aeration was improved. The PAGE-homogenous elastase preparation was obtained from the culture broth by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation, DEAE-cellulose column chromatography and gel filtration on Sephadex G-75. The molecular weight was determined to be 21380 by SDS-PAGE, the elastolytic activity was optimal at pH7.4 and 50°C, The enzyme was stable over the range of pH4.5—9.5 and below 40°C, but the activity was inhibited completely by Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ .

Key words *Flavobacterium odoratum*, Extracellular elastase, Fermentation condition, Enzyme purification and properties