

# 微生物产生的弹性蛋白酶研究现状\*

柯娜 肖昌松\*\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘要:**介绍了微生物产生的弹性蛋白酶的来源、性质结构、克隆表达、蛋白质工程改造及其应用方面的研究进展,并展望其在生产开发方面的前景。

**关键词:**弹性蛋白酶,微生物

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2002) 04-0091-04

微生物产生的弹性蛋白酶 (Elastase) 是一种肽链内切酶,以分解不溶性弹性蛋白为特征,同时还可以水解血红蛋白、酪蛋白及胶原蛋白等,但不分解毛发角蛋白。弹性蛋白 (Elastin) 是一种不溶的纤维状蛋白,其基本亚基是弹性蛋白原 (Tropoelastin),富含甘氨酸 (Glycine, Gly)、丙氨酸 (Alanine, Ala)、缬氨酸 (Valine, Val) 和脯氨酸 (Proline, Pro)。非极性氨基酸和独特的被修饰的赖氨酸 (Lysine, Lys) 残基在弹性蛋白多肽链间形成交联结构,这使得弹性蛋白极为稳定,耐一般蛋白酶的水解。弹性蛋白唯有弹性蛋白酶才能水解。弹性蛋白是结缔组织中的蛋白成份,在动物的血管和韧带中特别丰富。

目前对弹性蛋白酶应用研究比较多,它可作为治疗心血管疾病的生化药物,并在食品加工、日用化学工业中广泛应用。用该酶处理污水,治理环境也倍受注目。但该酶产品的生产仅局限于由猪胰脏提取,受动物脏器资源的限制,弹性蛋白酶作为生化药物已供不应求。微生物产生的弹性蛋白酶可为其在食品工业、日用化工方面的开发利用提供廉价充足的酶源。故研究微生物产生的弹性蛋白酶从 70 年代以来倍受各国科学家的重视,他们对酶催化特性、结构特征、基因的表达调控都做了一些深入研究<sup>[1-4]</sup>。

## 1 微生物产的弹性蛋白酶

弹性蛋白酶主要存在于动物胰脏中,在皮肤、主动脉、血小板、白血球中也都有存在。同时,在微生物类群中也广有分布,细菌、放线菌、真菌中都有分泌胞外弹性蛋白酶的报道。1949 年 Balo 和 Banga 从胰脏分离纯化出弹性蛋白酶<sup>[5]</sup>,并提出其含量水平与动脉粥样硬化症有关;1962 年 I. Mandl 和 B. Cohen 从牙周病患者的送检样品中首次分离出产胞外弹性蛋白酶的微生物 *Flavobacterium elastyticum*<sup>[6]</sup>,并从它的培养液中分离纯化出专一降解弹性蛋白的弹性蛋白酶,开辟了微生物来源弹性蛋白酶研究的先河。1974 年,Isamu<sup>[1]</sup>等从自然界分离出 4000 株细菌,其中 16% 的菌株产酶具有弹性蛋白的特征,1.2% 的菌株产弹性蛋白酶的量达到 100U/mL。1983 年, Tsai. Y. Ch. 首次报道的由嗜碱芽孢杆菌 Ya-B 产生的碱性弹性蛋白酶 (Alkaline elastase)<sup>[7]</sup>。1994 年, Laurence D 报道了一株新的产碱性弹性蛋白酶的菌株,黄色粘球菌 (*Myxococcus xan-*

\* 国家科技部九五攻关项目 (96-003-02-04)

\*\* 联系人

收稿日期: 2001-05-30, 修回日期: 2001-07-25

thus)<sup>[8]</sup>, 该菌株产生两种具有弹性蛋白酶活力的酶(MAP1和MAP2)。最近关于碱性弹性蛋白酶的报道, 来自于 Deborah J. Clark 关于藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)的研究<sup>[4]</sup>。*Micrococcus luteus* 分离自人体的皮肤上, 产生一种碱性弹性蛋白酶, 其等电点为9.3, 最适作用 pH 为9.0, 最适作用温度为59℃。中国科学院微生物研究所从西藏天然碱湖中筛选到一株产生胞外碱性弹性蛋白酶的嗜碱菌 *Bacillus* sp. XE22-4-1, 酶活力达300U/mL, 是目前报道的产弹性蛋白酶最高的菌株。

## 2 微生物产生的弹性蛋白酶的结构特性

弹性蛋白酶具有两个标志性特征: 其一, 与弹性蛋白有高亲和力; 其二, 酶切位点在脂肪族氨基酸羧基参与形成的肽键上。

虽然不同来源的弹性蛋白酶的特点、性质、分子量不尽相同, 但是迄今为止, 所有分离的弹性蛋白酶其最适作用 pH 均在7.0以上, 即属于碱性弹性蛋白酶。酸性弹性蛋白酶尚未见报道。

碱性弹性蛋白酶与其它的碱性蛋白酶不同, 它对甘氨酸(Glycine, Gly)、丙氨酸(Alanine, Ala) 残基有很高的水解特异性。弹性蛋白中 Ala、Gly 含量高达55%。这也解释了弹性蛋白酶能高效降解弹性蛋白的原因。

弹性蛋白酶水解弹性蛋白首先将弹性蛋白的结构变疏松使之溶解, 然后将已溶解的弹性蛋白降解成可溶的多肽及氨基酸。弹性蛋白在碱性环境下易变性, 结构疏松, 有利于弹性蛋白酶对其水解。从嗜碱菌中筛选得到的产酶菌株, 所产的弹性蛋白酶有较高的最适反应 pH, 其降解弹性蛋白的酶活力也高。

从等电点来看, 现已发现的微生物产生的弹性蛋白酶可分为两类: 等电点在碱性的弹性蛋白酶, 其与底物弹性蛋白之间的结合力主要为静电作用力, 如芽孢杆菌属(*Bacillus*)、放线菌属(*Actinomyces*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*) 产的弹性蛋白酶。嗜碱芽孢杆菌 Ya-B 产的弹性蛋白酶几乎所有正电荷残基都集中在分子的表面, 这有利于该酶与弹性蛋白结合<sup>[7]</sup>。当 pH 高于弹性蛋白酶的等电点时, 弹性蛋白酶失去表面正电荷, 与弹性蛋白的结合率显著下降。同时, NaCl 可抑制酶活, 这是因为钠离子电中和了弹性蛋白的羧化基团。

而等电点在酸性的弹性蛋白酶, 其与底物弹性蛋白之间的结合力则主要为疏水作用力, NaCl 不能抑制该酶的活力。如: 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)<sup>[9]</sup> 产的弹性蛋白酶、人胰腺中的弹性蛋白酶<sup>[5]</sup>、*Myxococcus xanthus*<sup>[7]</sup> 产的 MAP1。

Ca<sup>2+</sup> 对保持酶活力, 防止酶自身降解必不可少。*Micrococcus luteus*<sup>[8]</sup> 产生的碱性弹性蛋白酶在 Ca<sup>2+</sup> 存在下, 在 pH6.0~10.5 之间及57℃以下稳定; EDTA 可通过与 Ca<sup>2+</sup> 结合完全抑制酶活力并导致酶的自溶。

## 3 弹性蛋白酶的基因克隆和表达

采用分子生物学技术克隆目的基因, 构建工程菌株是各国微生物学家的研究热点。弹性蛋白酶基因的克隆和表达, 一方面可从理论上解释弹性蛋白酶的转录表达及酶学反应机制, 另一方面为该酶高表达实现工业化生产打下基础。

1987年, 胰弹性蛋白酶的基因首次被克隆, 并在 *E. coli* IE392 中表达成功<sup>[2]</sup>。

Yoda 等在 *E. coli*-*B. subtilis* 的穿梭载体 pHY300pLK 的基础上, 构建含 elastase 基因的质粒, 将 *Bacillus* 的碱性弹性蛋白酶的基因克隆到 *B. subtilis* 中得以表达。表达菌产酶

单位为 73U/mL<sup>[10]</sup>。

Ryuta K 等人于 1989 年克隆了嗜碱芽孢杆菌 Ya-B 的碱性弹性蛋白酶基因 (ale) 并测得其核苷酸序列, 推出其氨基酸序列, 从分子机制解释弹性蛋白酶具有高的最适反应 pH 及高酶活力的原因<sup>[3]</sup>。该基因共编码 378 个氨基酸, 其中包含 27 个氨基酸的信号肽及 83 个氨基酸的前导序列, 成熟酶蛋白由 268 个氨基酸组成。他们将该基因克隆到表达载体, 分别转化到 *E. coli* K-12 和 *B. subtilis* DB104 中进行表达, 在后者中检测到了弱表达。

Young-Cha Chang 和 Hiroshi Kadokura<sup>[11]</sup> 深入研究了该酶的信号肽及前导序列的功能。将 ale 基因的信号肽及前导序列分别克隆表达。结果表明弹性蛋白酶 Ya-B 的正确折叠形成有活力的蛋白酶的过程发生在细胞外, 此过程需要分泌于胞外的前导序列的协助。

如何实现弹性蛋白酶的高表达深受人们关注。ale 基因含有强的 SD 序列 (AGGAG) 而且 SD 序列与起始序列的间距为 9bp 在 *Bacillus* 中认为是最有效的翻译起始序列。但 ale 基因的起始密码子 UUG 是少见的起始效率低的起始子。C.M.Yeh<sup>[4]</sup> 等将其突变为 GUG、AUG, 则提高了 ale 在 *B. subtilis* DB104 及 ale 基因缺陷型突变株 YaB-DEC 中的表达。

#### 4 蛋白质工程改造弹性蛋白酶

蛋白质工程指通过天然蛋白或蛋白衍生物的结构分析, 确定其三级结构模型, 然后通过分子设计合成突变基因, 经筛选突变体 DNA, 合成相应蛋白的方法。弹性蛋白酶作为肉类嫩化剂优于木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶等非特异性蛋白酶, 但它仍可结合、切割具有长侧链的氨基酸底物, 尤其是色氨酸 (Tryptophan, Try)、苯丙氨酸 (Phenylalanine, Phe)。这意味着弹性蛋白酶的底物特异性不是完全严格的, 可通过蛋白质工程的方法进行改造。

Hui-Ching Mei<sup>[12]</sup> 等, 以枯草杆菌蛋白酶 BPN'、枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 为模板, 用电子计算机构建了 elastase YaB 的三维结构模型。对位于 S1 底物结合口袋两侧的甘氨酸-124 (Gly124)、甘氨酸-151 (Gly151) 定点突变, 用带有较大侧链的碱基取代之, 这样可将底物结合口袋分为两半, 抑制弹性蛋白酶对带有长侧链的碱基的结合切割。突变蛋白基因在 *Bacillus subtilis* DB104 中表达, 突变蛋白 G124A、G124V、G151A 对于相应作用底物表现出比野生型高 3~10 倍的催化能力。同时, 突变蛋白 G124A、G124V 的作用底物仅限于丙氨酸 (Ala)、甘氨酸 (Gly)。G151A 仅限于丙氨酸 (Ala)、甘氨酸 (Gly)、亮氨酸 (Leucine, Leu)。

#### 5 弹性蛋白酶的应用

弹性蛋白酶可应用于医疗卫生及食品加工及日用化学业。在环境保护方面也将展示其诱人前景。

在医药产品方面, 该酶参与血管壁弹性纤维蛋白的代谢, 具有维持纤维血管正常弹性的独特功能, 对治疗高血脂症, 防治动脉粥样硬化症疗效显著; 对于治疗和预防老年心血管病、增进中老年人身体健康水平具有重要意义。除此之外, 该酶外用还可用于消除皮肤碎屑、治疗烧伤病患及皮肤溃疡等症。

食品工业方面, 弹性蛋白酶可用来进行农副产品的深加工, 制作高蛋白食品。弹性蛋白酶可专一降解坚韧的韧带、大动脉血管、筋腱等的结缔组织, 可作为理想的肉

类嫩化剂,代替目前广泛使用的木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶。Hiroshi<sup>[13]</sup>将来源于一株嗜碱 *Bacillus* 的弹性蛋白酶与牛肉作用,发现弹性蛋白酶可通过选择水解肉类中坚韧的弹性纤维部分,起到使肉类嫩化而不失口味的目的。

日用化学工业方面,将弹性蛋白酶或其水解物添加入化妆品中起到增强皮肤、毛发的弹性、柔性,延缓皮肤老化的作用。弹性蛋白酶可促进头发生长,防止脱发;用弹性蛋白酶、碱性蛋白酶、纤维素酶及淀粉酶等生产的多酶洗涤剂,可有效清除被洗物上的蛋白污渍、血渍等;用作牙膏的添加剂可助于去除牙齿上的食物残渣,并可防治口腔溃疡;还可用作唇膏等美容用品的添加剂。

由于弹性蛋白酶对弹性蛋白有很高的水解专一性,使该酶在环保方面的应用极具潜力。屠宰厂的废水含有大量难以处理的蛋白废料如韧带、大动脉血管、筋腱等,可用弹性蛋白酶来降解。人们正在试图将它与脂肪酶、纤维素酶混合用于城市厕所及屠宰厂废水的处理。

## 6 弹性蛋白酶的生产开发及展望

弹性蛋白酶有广泛的应用前景,但目前该酶产品的生产局限于由鲜猪胰脏提取。受动物脏器资源的限制,弹性蛋白酶作为生化药物已供不应求,限制了该酶的应用。利用微生物发酵生产弹性蛋白酶具有生产成本低、产量大、不受原材料来源的限制的优点。因此筛选高产菌株、探索大规模生产方法成为解决该酶供需矛盾的焦点所在。自80年代以来,日本、俄罗斯等国不断有产生弹性蛋白酶微生物菌株及这种酶的发酵生产方面的报道,但尚未形成工业化生产。

中国科学院微生物研究所在九五期间对 *Bacillus* sp. XE22-4-1 发酵法产弹性蛋白酶进行探索,通过培养基优化、控制发酵条件等方法,提高酶产量,完成小型发酵罐试验和发酵扩大试验,酶制品比活度为4,600U/mL,酶回收率达80%。

除筛选高产菌株探索发酵生产外,运用分子生物学方法克隆该酶的基因,研究其高表达及在中性菌中的异源表达,构建工程菌,无疑是一条行之有效的措施,实现弹性蛋白酶的大规模工业化生产为期不远。

## 参考文献

- [1] Isamu S, Tsuyoshi N, Hachiro O, *et al.* *Agri Biol chem*, 1974, **38**: 1~7.
- [2] 绳口洋. 公开特许公报, 昭 6~124938.
- [3] Ryuta K. *J Bacteriology*, 1989, **171**: 5232~5236.
- [4] Yeh C M, Chang H K, Hsieh H M, *et al.* *J Appl Microbiol*, 1997, **83** (6): 758~763.
- [5] Balo J, Bango I. *Biochem J*, 1950, **46**: 384~387.
- [6] Mandl I. *Arch Biochem Biophys*, 1960, **91**: 47~53.
- [7] Laurence D, Verneuil B, Wallach J, *et al.* *Eur J Biochem*, 1994, **223**: 775~782.
- [8] Deborah J C. *Pro Expr Purf*, 2000, **18**: 46~55.
- [9] Morihara K. *J Biol Chem* 1965, **340**: 3295~3304.
- [10] Yamazaki M, Yoda, Ko S, Eiketsu, Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 02 76, 586 [90 76, 586] 1990.
- [11] Chang Y C, Hiroshi K, Koji Y, *et al.* *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, **219**: 463~468.
- [12] Mei H C, Liaw Y C, Yao - Cheng Li, *et al.* *Protein Engineering*, 1998, **11**: 109~117.
- [13] Hiroshi T. *J Agri Food Chem*, 1992, **40**: 2364~2368.