

刺孢小克银汉霉菌体氨基酰化酶的性质研究*

高大响 李兆兰 郭丽芸 焦庆才

(南京大学医药生物技术国家重点实验室 南京 210093)

摘要: 首次选育出有较高氨基酰化酶活性的菌株刺孢小克银汉霉 (*Cunninghamella echinulata*) 9980, 并进行液体培养, 比较了 3 种不同培养基中菌体细胞氨基酰化酶活性, 考察了几种因素对菌体细胞酶活的影响。结果表明: 蛋白胨培养基中菌体细胞酶活最高, 达 680U/g。菌体细胞酶活最适温度 55℃, 最适 pH7.0, 最佳底物浓度为 0.2mol/L, 缓冲液中的无机离子对酶活有抑制作用, $10^{-3} \sim 10^{-4}$ mol/L 的 Co^{2+} 对酶活有激活作用。

关键词: 刺孢小克银汉霉 9980, 液体培养, 氨基酰化酶, 酶法拆分

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0116-04

Characterization of Aminoacylase in the Mycelial Cell of *Cunninghamella echinulata**

GAO Da-Xiang LI Zhao-Lan GUO Li-Yun JIAO Qing-Cai

(State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract: The strain of *Cunninghamella echinulata* 9980 was first selected with high aminoacylase activity. In three submerged cultures, the aminoacylase activity in the mycelial cell was compared. A number of factors have effects on the resolution reaction. The results showed that, peptone culture gave the highest aminoacylase activity with 680U/g. The optimum temperature, pH, and substrate concentration were 55℃, 7.0, and 0.2mol/L, respectively. The ions in the buffer lowered the activity, but the Co^{2+} in $10^{-4} \sim 10^{-3}$ mol/L was necessary for its activity.

Key words: *Cunninghamella echinulata* 9980, Submerged culture, Aminoacylase, Resolution

氨基酸在医药、食品等方面有广泛的应用。氨基酸的生产一般采用蛋白水解法、发酵法和化学合成法^[1]。化学合成法的产物皆为 DL-丙氨酸, 必须进行光学拆分, 其中利用氨基酰化酶进行的光学拆分, 是生产 L-型或 D-型氨基酸的一种可行而有效的方法。

氨基酰化酶 (E. C. 3. 5. 1. 14) 可以将化学合成的 N-乙酰-DL-氨基酸不对称水解, 获得 L-氨基酸和 N-乙酰-D-氨基酸, N-乙酰-D-氨基酸去乙酰化得到 D-氨基酸。氨基酰化酶最初从自动物肾脏。Chibata 等人^[2]首先发现了米曲霉氨基酰化酶具很好的专一性, 从而替代了由动物肾脏提取氨基酰化酶。目前氨基酰化酶的研究主要集中在米曲霉方面, 研究热点是米曲霉氨基酰化酶的提取、固定化及光学拆分等方面^[3,4]。

我们首次从土壤中分离出一种有较高氨基酰化酶活性的菌株, 即刺孢小克银汉霉 (*Cunninghamella echinulata*) 9980, 该菌株比米曲霉的菌丝体产量高, 发酵周期短, 酶活比米曲霉的初发菌株高^[5], 稳定性好, 是一种较有开发前景的优良菌种。

* 国家技术创新基金 (No. 02CJ-13-01-16)

通讯作者 Tel: (0) 13186433301, E-mail: gaodaxiang1969@sina.com

收稿日期: 2004-10-25, 修回日期: 2004-12-20

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种来源: 从南京东郊采集土壤样品, 稀释分离法分离到该菌株, 转管纯化, 经鉴定^[6]为刺孢小克银汉霉 (*Cunninghamella echinulata*) 9980。

1.1.2 液体发酵培养基: (1) 察氏培养基^[7]; (2) 豆汁培养基^[7]; (3) 蛋白胨培养基: 蛋白胨 10g, 酵母膏 1g, MgSO_4 0.5g, K_2HPO_4 2g, 葡萄糖 20, 定容至 1L。

1.2 实验方法

1.2.1 拆分底物 N-Ac-D, L-Ala 的制备: 见文献 [8]。

1.2.2 液体培养方法: 250mL 三角瓶装培养基 50mL, 接入孢子悬液 (孢子浓度为 1×10^6 个/mL), 接种量 5%, 在温度 $28^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$, 转速 120r/min 的摇床上振荡培养。

1.2.3 菌体酶活的测定: 取经抽滤的湿菌体 0.5g 用无菌水洗涤数次, 放入 250 mL 三角瓶中, 加入用无菌水配成的底物浓度为 0.2 mol/L (含 CoCl_2 5×10^{-4} mol/L) 的溶液 50mL。于 37°C 水浴中振荡 30min, 取 1mL 反应液立即用茚三酮显色法显色^[9], 并于 570nm 处测吸光值, 其吸光值与 L-丙氨酸溶液的浓度之间的回归方程为 $Y = 1.0233X - 0.00402$ $R^2 = 0.9949$, X 为 L-丙氨酸溶液的浓度, Y 为 570nm 处测得的 OD 值, 由标准曲线得反应液 L-Ala 浓度。菌体酶活定义: 37°C , pH7.0, 1h 由 1g 湿菌体催化拆分产生的 L-Ala 的 μmol 数为一个酶活力单位 U, $1\text{U} = 1\mu\text{mol/g} \cdot \text{h}$ 。

2 实验结果

2.1 菌株的形态学特征

菌落初呈白色, 后灰白色。培养 60h, 直径约 7cm, 大量分生孢子形成时, 表面呈粉末状。生长最适温度 $28^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$, 40°C 仍能生长。菌丝分枝繁茂, 直径 $12 \sim 20\mu\text{m}$, 可形成假根 (图 1)。分生孢子梗聚伞状或拟双叉分枝, 每一分枝长 $30\mu\text{m} \sim 50\mu\text{m}$, 顶端膨大成一泡囊, 广棒形至近球形, 直径 $30\mu\text{m} \sim 65\mu\text{m}$, 主枝与分枝的泡囊形状相同, 但主枝泡囊较大, 泡囊表面着生小梗, 小梗上形成单细胞球形或拟卵形 $7 \sim 13 \times 5 \sim 11\mu\text{m}$ 的分生孢子, 分生孢子上密生长约 $4\mu\text{m}$ 的小刺, 无色 (图 2)。



图 1 菌丝体分枝 (100 ×)

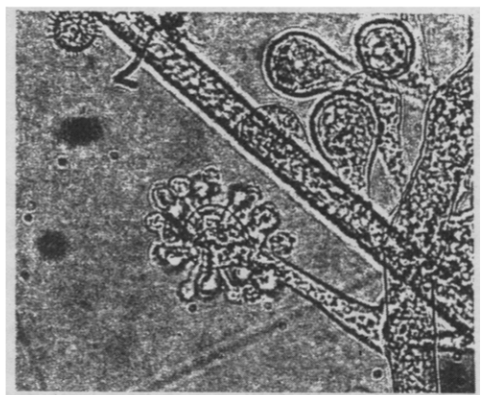


图 2 泡囊及分生孢子 (400 ×)

2.2 不同培养基中菌体酶活进程曲线

用不同的培养基分别培养小克银汉霉菌株, 每 12h 测一次菌体酶活, 其结果见图

3. 实验表明: 蛋白胨培养基中菌体酶活最高, 36h 酶活达 680u/g, 豆汁培养基之发酵 48h, 酶活达 515u/g。察氏培养基最低, 发酵 60h, 酶活达 460u/g。

2.3 不同条件对菌体酶活的影响

2.3.1 温度的影响: 在 pH7.0, 底物浓度 0.2 mol/L 下, 分别在不同温度下测菌体细胞的酶活, 以最高活力为 100%, 其相对酶活力如图 4。图 4 表明, 菌体细胞拆分反应最适温度为 55℃, 该温度下酶活最高。低于 55℃, 随温度升高, 酶活力也逐渐升高。当温度高于 55℃时, 酶活力很快降低。

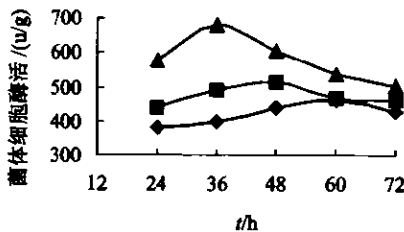


图3 3种培养基中菌体细胞的酶活进程

◆ 察氏培养基, ■ 豆汁培养基, ▲ 蛋白胨培养基

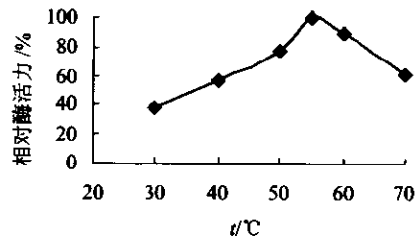


图4 最适应温度

2.3.2 菌体酶的热稳定性: 将湿菌体分别置于 50℃, 55℃, 60℃ 的水中, 于不同时间取样, 在 37℃ 下测菌体的剩余酶活, 结果见图 5。由图 5 知, 在 60℃ 时酶活损失很快, 2h 后, 剩余酶活不到 40%, 在酶活最适温度 55℃ 下, 反应进行到 6h, 剩余酶活达 62%, 稳定性较好; 而在 50℃, 反应进行 12h, 剩余酶活仍达 54%。所以在实际拆分反应时, 在比酶活最适温度 55℃ 略低的 50℃ 下进行为宜。

2.3.3 pH 的影响: 将湿菌体分别置于 pH5 ~ 10 的底物溶液中反应, 其相对酶活见图 6。由图 6 可知, 该菌体细胞酶活最适 pH 为 7.0 左右, 稳定范围为 6.5 ~ 7.5。

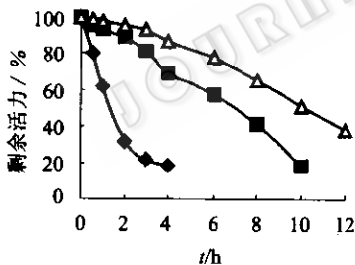


图5 菌体细胞酶的热稳定性

◆ 60℃, ■ 55℃, ▲ 50℃

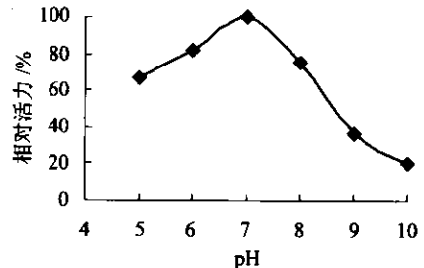


图6 最适反应 pH

2.3.4 底物浓度的影响: 在 pH7.0, 温度 37℃ 下, 改变底物浓度, 拆分反应进行 15min 时, 测定不同反应液中 L-丙氨酸的量, 其反应速率与底物浓度的关系见图 7。实验表明, 在相同温度和 pH 条件下, 随着底物浓度的增加, 拆分反应速率逐渐加快, 在底物浓度为 0.2 mol/L 时, 反应速率最大; 当底物浓度高于 0.2 mol/L 后, 反应速率很快下降, 说明该酶促拆分反应体系存在高浓度抑制现象。

2.3.5 缓冲液浓度影响: 选择不同浓度磷酸缓冲液, 以水代替磷酸缓冲液作对照。分别测菌体在不同浓度的磷酸缓冲液中的酶活, 其相对活力见图 8。由图 8 知, 缓冲液浓度影响酶的活性。反应 30min 时, 由于反应时间短, 初始 pH 改变不大, 直接用水时, 酶活最高。用磷酸缓冲液时, 随着磷酸缓冲液浓度的增加, 酶活逐渐降低, 浓度在 0.2

mol/L 时, 酶活最低。在 0.4mol/L 时出现明显的上扬, 但不及用水的酶活。

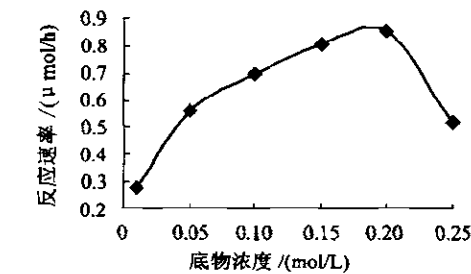


图 7 底物浓度对酶反应速率的影响

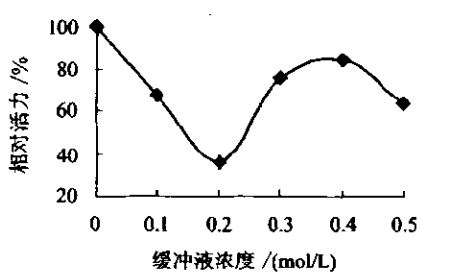


图 8 缓冲液浓度对酶活的影响

图 8 结果表明缓冲液浓度对酶活有明显的抑制作用。因此, 我们在做酶拆分反应时, 直接用水代替缓冲液。但是, 随着反应时间的延长, 若无缓冲溶液, 反应体系的 pH 会有所改变, 需要在酶反应过程中控制 pH 变化。

2.3.6 金属离子对菌体酶活的影响: 选择几种金属离子分别测其在不同浓度下的酶活, 以不加金属离子的酶活定为 100%, 其相对活力见表 1。从表 1 看出, 低浓度的 Co^{2+} 对酶活有明显的激活作用, 其最适浓度范围在 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ 之间。浓度低于 10^{-5} mol/L 时几乎没有激活作用, 当浓度高于 10^{-2} mol/L 时有明显抑制作用。不同浓度的 Zn^{2+} 及 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 对拆分反应均出现不同程度的抑制作用。

表 1 金属离子对酶活的影响

金属离子	金属离子浓度 (mol/L)				
	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}
Co^{2+}	105	119	128	94	70
Zn^{2+}	98	96	71	62	51
Cu^{2+}	89	83	77	54	45
Fe^{2+}	93	87	79	70	62
Mn^{2+}	91	85	74	63	42

3 结论

刺孢小克银汉霉液体培养得到的菌体细胞有较高的氨基酰化酶活性, 经过诱变及培养基的优化, 其酶活有望进一步提高。菌体最适温度 55°C , 最适 pH7.0, 最佳底物浓度 0.2 mol/L 。缓冲液的浓度对酶活有抑制作用。高浓度的 Co^{2+} 对酶活有抑制作用, 而浓度为 $10^{-3} \sim 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的 Co^{2+} 对酶有激活作用。菌体氨基酰化酶热稳定性较好, 可直接或固定化菌体细胞对 DL-丙氨酸进行光学拆分。

参 考 文 献

[1] 张伟国, 钱 和. 氨基酸生产技术及其应用. 北京: 中国轻工业出版社, 1997. 79 ~ 86.
[2] Chibata I, Tosa T, Sato T. Agric Chem Soc Jpn, 1957, 21: 300 ~ 306.
[3] Lee P M, Lee K H, Siaw Y S. J Chem Technol Biotechnol, 1992, 54: 375 ~ 382.
[4] Bodalo-Santoyo B. J Chem Technol Biotechnol, 1999, 74: 403 ~ 408.
[5] 曹军卫, 高春东, 刘志坚. 氨基酸和生物资源, 1999, 21 (3): 20 ~ 22.
[6] Zycha H, Siepmann R. Mucorales, 1969, 24 (5): 264 ~ 268.
[7] 王淑豪, 宋正孝, 马忠海. 食品科学, 2002, 7: 9 ~ 12.
[8] 姚文兵, 吴梧桐, 金建勤, 等. 中国药科大学学报, 1997, 28 (6): 358.
[9] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生物实验方法和技术 (第二版). 北京: 高等教育出版社, 1997. 164 ~ 165.