

# 蛋白酶的研究和应用

邱秀宝 崔福绵

(中国科学院微生物研究所, 北京)

蛋白酶是水解蛋白质的一群酶类。它是生命活动中不可缺少的水解酶之一, 在工、农、医等方面有着重要的应用。

远在三千年前人们对酶的本质还没有了解时, 我们的祖先就已经把它用于制酱等的技术中。1908年德国人 Röhm (雷姆) 开始利用胰酶制剂进行鞣制皮革等。1930年 Northrop 制出胃蛋白酶结晶并阐明了它的化学本质。随着生物化学的迅速发展, 蛋白酶的研究和应用更加广泛深入, 现在已被结晶和纯化的蛋白酶有100种之多, 它的应用已渗入到食品、酿造、纺织、医药、皮革、日用化学、洗涤剂、饲料以及水产加工等许多部门, 在国民经济中起着重要的作用。本文主要介绍蛋白酶一般概貌、应用范围及国内外主要研究方向。

## 蛋白酶的分类和命名

蛋白酶具有水解蛋白质肽链的能力, 所以又称肽酶。蛋白酶的品种很多, 一般按酶的来源和性质进行命名和分类。

### 一、按酶的来源分类

#### (一) 动物来源

动物的胃、胰、肝、肾、尿、血中均有蛋白酶, 它们在血液的凝固、血压的调节及细胞内各种代谢活动等方面均起着极其重要的作用。常见的有胃蛋白酶, 胰蛋白酶,  $\alpha$ -糜蛋白酶等。

#### (二) 植物来源

蛋白酶也广泛地存在于植物果实、汁液、根、茎和种子中, 如: 菠萝蛋白酶, 木瓜蛋白酶, 无花果蛋白酶, 萝摩朊酶等。

#### (三) 微生物来源

几乎所有的微生物类群都能产生蛋白酶, 甚至同一类微生物可以产生不同类型的蛋白酶。微生物蛋白酶可以分为细菌蛋白酶、真菌蛋白酶、放线菌蛋白酶等。

### 二、按酶作用的性质分类

每一种酶都有作用的最适 pH 值, Leonard<sup>[1]</sup> 根据酶作用的最适 pH 将蛋白酶归纳为三种类型。

#### (一) 酸性蛋白酶

作用最适 pH 在酸性范围 (pH 2—5)。除胃蛋白酶外, 多产生于真菌, 如黑曲霉酸性蛋白酶等。一般分子量为 35,000, 酶分子中酸性氨基酸含量低, 在 pH 2—6 最稳定, 它对巯基试剂, 金属螯合剂, 重金属盐和二异丙基氟磷酸不敏感。

#### (二) 碱性蛋白酶

作用最适 pH 为 9.5—10.5, 在 pH 5—10 时较稳定, 其分子量为 26,000—34,000, 酶分子中缺少半胱氨酸形成的二硫键, 被二异丙基氟磷酸和马铃薯蛋白酶抑制剂所抑制, 但不被巯基试剂和金属螯合剂抑制。如胰蛋白酶, 枯草杆菌碱性蛋白酶, 短小芽孢杆菌碱性蛋白酶。

#### (三) 中性蛋白酶

作用最适 pH 7.0 左右, 一般分子量在 35,000—45,000 之间。在 pH 6—9 时最稳定, 对 EDTA 和邻二杂氮菲等金属螯合剂敏感, 但不被二异丙基氟磷酸和巯基试剂所抑制。如菠萝蛋白酶, 枯草杆菌中性蛋白酶, 灰色链霉菌中性蛋白酶。

### 三、按其蛋白酶分子肽链上作用位置分类

Bergman<sup>[2]</sup> 等使用了大量的合成底物研究

蛋白酶对底物作用的专一性,发现决不是所有的蛋白酶都能水解任何肽键。他们根据酶对底物作用的位置不同分为两种:

1. 内肽酶: 只能从蛋白质肽链的中间把肽键切开, 使蛋白质分子水解成为较小的碎片(肽、肽、肽和其他氨基酸)。

表 1 微生物蛋白酶产生菌<sup>[1-12,12]</sup>

编 号	酸性蛋白酶	中性蛋白酶	碱性蛋白酶
1	米曲霉 ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	酱油曲霉 ( <i>Aspergillus sojae</i> )	黄曲霉 ( <i>Aspergillus flavus</i> )
2	黑曲霉 ( <i>Asp. niger</i> )	米曲霉 ( <i>Asp. oryzae</i> )	亮白曲霉 ( <i>Asp. candidus</i> )
3	斋藤曲霉 ( <i>Asp. saitoi</i> )	黄曲霉 ( <i>Asp. flavus</i> )	酱油曲霉 ( <i>Asp. sojae</i> )
4	泡盛曲霉 ( <i>Asp. awamori</i> )	洋葱曲霉 ( <i>Asp. alliaceus</i> )	茵曲霉 ( <i>Asp. ochraceus</i> )
5	金黄曲霉 ( <i>Asp. aureus</i> )	温特曲霉 ( <i>Asp. wentii</i> )	米曲霉 ( <i>Asp. oryzae</i> )
6	栖土曲霉 ( <i>Asp. terricola</i> )	寄生曲霉 ( <i>Asp. parasiticus</i> )	聚多曲霉 ( <i>Asp. sydowii</i> )
7	乾氏曲霉 ( <i>Asp. innitii</i> )	赭曲霉 ( <i>Asp. ochraceus</i> )	流色曲霉 ( <i>Asp. sulphureus</i> )
8	中泽曲霉 ( <i>Asp. nakazawae</i> )	栖土曲霉 ( <i>Asp. terricola</i> )	烟曲霉 ( <i>Asp. fumigatus</i> )
9	宇佐美曲霉 ( <i>Asp. usamii</i> )	萎地青霉 ( <i>Penicillium roqueforti</i> )	蜂蜜曲霉 ( <i>Asp. mellis</i> )
10	白宇佐美曲霉 ( <i>Asp. shirousamii</i> )	巨大芽孢杆菌 ( <i>Bacillus megaterium</i> )	枯草杆菌 ( <i>Bacillus subtilis</i> )
11	白曲霉 ( <i>Asp. candidus</i> )	枯草杆菌 ( <i>B. subtilis</i> )	短小芽孢杆菌 ( <i>B. pumilus</i> )
12	杜勃青霉 ( <i>Penicillium dupontii</i> )	嗜热溶蛋白芽孢杆菌 ( <i>B. thermo- proteolyticus</i> )	地衣形芽孢杆菌 ( <i>B. licheniformis</i> )
13	沙门柏干酪青霉 ( <i>P. camemberti</i> )	短芽孢杆菌 ( <i>B. brevis</i> )	球形芽孢杆菌 ( <i>B. sphaericus</i> )
14	微紫青霉 ( <i>P. zanthinellum</i> )	马铃薯芽孢杆菌 ( <i>B. mesentericus</i> )	赛氏粘质杆菌 ( <i>Serratia marcescens</i> )
15	萎地青霉 ( <i>P. roqueforti</i> )	蕈状芽孢杆菌 ( <i>B. mycoides</i> )	解脂假丝酵母 ( <i>Candida lipolytica</i> )
16	丛簇青霉 ( <i>P. caespitosus</i> )	蜡状芽孢杆菌 ( <i>B. cereus</i> )	灰色链霉菌 ( <i>Streptomyces griseus</i> )
17	拟青霉 ( <i>Paecilomyces variotii</i> )	大肠杆菌 ( <i>E. coli</i> )	直丝放线菌 ( <i>Actinomyces viscosus</i> )
18	米黑毛霉 ( <i>Mucor miehei</i> )	苏芸金杆菌 ( <i>B. thuringiensis</i> )	灰绿放线菌 ( <i>Actinomyces griseo- ovoidis</i> )
19	微小毛霉 ( <i>M. pusillus</i> )	多粘芽孢杆菌 ( <i>B. polymyxa</i> )	弗雷德氏放线菌 ( <i>Actinomyces fradaii</i> )
20	德氏根霉 ( <i>Rhizopus delamar</i> )	肉毒梭状芽孢杆菌 ( <i>B. botulinus</i> )	奈良链霉菌 ( <i>Streptomyces nara- ensis</i> )
21	华氏根霉 ( <i>R. chinensis</i> )	粪链球菌 ( <i>Streptococcus faecalis</i> )	
22	少孢根霉 ( <i>R. oligosporus</i> )	溶血性链球菌 ( <i>Streptococcus he- molyticus</i> )	
23	小孢根霉 ( <i>R. microsporus</i> )	溶组织梭菌 ( <i>Clostridium histol- yticum</i> )	
24	栗疫菌 ( <i>Endothia parasitica</i> )	可可链霉菌 ( <i>Streptomyces cacaoi</i> )	
25	血红栓菌 ( <i>Trametes sanguinea</i> )	灰色链霉菌 ( <i>Streptomyces griseus</i> )	
26	乳白肥菌 ( <i>Irpex lacteus</i> )	丛簇青霉 ( <i>Penicillium caespitosum</i> )	
27	啤酒酵母 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	奈良链霉菌 ( <i>Streptomyces naraensis</i> )	
28	赭红酵母 ( <i>Rhodotorula glutinis</i> )		
29	白假丝酵母 ( <i>Candida albicans</i> )		
30	乳酸杆菌 ( <i>Lacto bacillus</i> )		
31	枯草杆菌 ( <i>Bacillus subtilis</i> )		

2. 外肽酶：只能水解蛋白质肽链末端的肽键产生游离的氨基酸，只能从羧基末端水解肽键的酶为羧基肽酶。从氨基末端水解肽键的酶为氨基肽酶。

#### 四、按蛋白酶作用的活性中心和必须基团分类

1960年 Hartley<sup>[3]</sup>按酶起作用的活性中心和必须基团的不同将蛋白酶分成四种：

1. 活性中心含有巯基 (-SH) 的一类蛋白酶称巯基蛋白酶。

2. 活性中心含有金属离子的称金属蛋白酶。

3. 活性中心含有丝氨酸的称丝氨酸蛋白酶。

4. 只能水解某一种或某两种氨基酸之间肽键的蛋白酶，如精氨酸蛋白酶，胰蛋白酶，酯蛋白酶等。

### 蛋白酶的来源

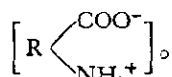
蛋白酶的来源包括动物，植物和微生物。这里仅对微生物来源作一较详细的介绍（见表1）。

### 蛋白酶的性质<sup>[21]</sup>

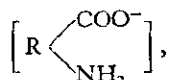
同所有酶类一样，蛋白酶是一种生物高分子，其本质是蛋白质，因此具有蛋白质的性质。

1. 具有胶体的特性：对高温、酸、碱高度的敏感，易变性失活。

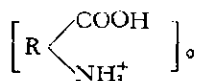
2. 具有两性电解质的特性：溶于水时由COOH基解离而放出的质子立即与NH<sub>2</sub>基结合，于是大部分的酶分子呈离子化状态



在高于其等电点 pH 的介质中带负电



在低于其等电点 pH 的介质中蛋白分子带正电



当酸性解离与碱性解离程度一致时，酶分子中的NH<sub>3</sub><sup>+</sup>基与COO<sup>-</sup>基数量相等，为酶分子的等电点。此时酶分子最不稳定，容易呈沉淀析出。

3. 水化层的失水性：由于酶分子是一种亲水性胶体，在它的分子外面形成一种特殊的水化层，加入某些脱水剂（如：盐类，有机溶剂等）可使这种水化作用降低，使酶呈沉淀析出。

4. 对底物作用的高度专一性：蛋白酶只能水解蛋白质肽链，不能水解淀粉，脂肪等其他物质。而且不同品种的蛋白酶不能分解同一种蛋白质，如弹性蛋白酶只能分解弹性蛋白，不能分解胶原蛋白，反之亦然。

5. 抑制、变性与激活：蛋白酶的催化活性可以被某些试剂或金属离子抑制，也可被某些试剂变性，还可被某些金属离子激活。

6. 最适 pH 与作用温度：各种蛋白酶对蛋白质的水解作用都需要有一个最适 pH 值。酶反应的温度越高反应速度越快，但温度越高，稳定性越差。

### 蛋白酶的应用<sup>[13—20]</sup>

1. 在食品方面的应用：用于干酪、肉类、蛋品、豆制品的加工及面包糕点的制造等。

2. 在酿造和发酵工业方面的应用：制造酱油、豆酱及啤酒澄清等。

3. 在日用化工方面的应用：用于香料原料去蛋白，胶片脱胶，加酶洗涤剂、加酶牙膏、牙粉和漱口水的制造，明胶生产等。

4. 在纺织工业上的应用：用于生丝脱胶、茧层解舒、羊毛低温染色，防止毛料毡毛等。

5. 在制革工业中应用：用于皮革脱毛、毛皮软化。

6. 在水产加工中的应用：用于蛋白胍、鱼露、鱼肝油等的制造，鱼类加工与鱼品脱腥。

7. 在水解液制造中的应用：用于水解蛋白，肝水解液，氨基酸，酵母膏、肾水解糖浆等制造。

8. 在医药工业方面的应用：蛋白酶具有较强的消炎消肿作用，可用来治疗慢性气管炎、血

栓静脉炎、盆腔炎；可治疗手术和外伤后的水肿、血肿、清洗伤口、急性扭伤、各种烧伤疤痕软化等。还可用于五官科的慢性副鼻腔炎，角膜炎，牙周炎的治疗等。

## 国内外蛋白酶研究动向

蛋白酶的品种多<sup>[22]</sup>，应用广，这方面的研究颇为热门，每年都有二、三百篇研究报告，从国外研究动向看仍着重于新品种的发掘，并通过发酵条件及遗传育种获得高产蛋白酶的优良菌种。在酶的纯化手段方面，采用了亲和层析<sup>[23]</sup>、等电聚焦及分子筛等新技术，快速而有效的获得理想的纯品，为蛋白酶对底物作用的特异性研究提供了条件。H. Holzer 和 H. Tschesche<sup>[24]</sup> 对蛋白酶的生物学功能作了详细的介绍，有很多科学工作者从事这方面的研究，为医学研究作出重要贡献。Jnichiro yagi 等<sup>[25]</sup> 对头孢霉菌属 (*Cephalosporium*) 产生的碱性蛋白酶进行较细致的底物特异性的研究，在水解氧化胰岛素 B 链中发现至少有 16 个不同的肽类，它在胱氨酸，谷酰胺，组氨酸和酪氨酸残基的特殊位置上进行水解，显然与胰蛋白酶，胃蛋白酶等性质不同。蛋白酶不仅能分解肽链，而且能合成肽链，森原和之用  $\alpha$ -糜蛋白酶等在适当条件下合成了肽链，我国科学家在胰岛素人工合成中也已采用了这种技术。

近二十年来我国蛋白酶研究取得很大进展，至今已生产和应用过的蛋白酶品种已有 21 种之多，广泛用于丝绸脱胶，皮革脱毛，毛皮软化，电影废胶片回收，生化药物生产及用作医药和洗涤剂。在基础研究方面，正在开展酶的纯化，以探索酶的作用机制、物化性质，更进一步弄清其对底物作用的特异性。还有人准备通过酶的组份分析来搞清其脱毛机理等。但是蛋白酶的研究还存在不少问题，例如：应用面还不够广，品种还需增加，如动物体中存在的各种蛋白酶还可以从微生物中去发掘。此外随着

生物学及分子生物学，遗传工程研究的发展，迫切需要有更多的专一性更强的蛋白酶作为工具，这方面的研究也正待加强。蛋白酶在临床化验方面的应用也是值得探索的，蛋白酶的基础研究和应用基础研究也需着手进行，但目前还处于萌芽阶段。

## 参 考 文 献

- [1] Leonard, K.: *Process Biochemistry*, 6(8): 17—21, 1971.
- [2] Henry, T.: *The Chemistry and Technology of enzymes*, 126—176, New York, John Wiley & Sons, Inc., 1950.
- [3] Kenji Yoshida et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 41(5): 745—754, 1977.
- [4] Taro ushijima et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 43(4): 859—860, 1979.
- [5] J. Sawada: *Agr. Biol. Chem.*, 23(6): 348—355, 1964.
- [6] 畚野刚: 酶学杂志, 42(7): 405—409, 1964.
- [7] H. Sekine: *Agr. Biol. Chem.*, 36(2): 207, 1972.
- [8] Henry, T.: *The Chemistry and Technology of Enzymes*, New York, John Wiley & Sons, Inc. 1950, p. 396—407.
- [9] Henry, T.: *ibid*, 482—491.
- [10] Tadanobu Nakadai et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 37(12): 2685—2694, 1973.
- [11] Leonard Keay et al.: *Biotech. Bioeng.* 12(2): 213—249, 1970.
- [12] 官田孝一: 武田研究所报, 31(3): 375, 1972.
- [13] 福本寿一郎: 特许公报, 4501, 1972.
- [14] 小林春彦: 酶学杂志, 48(8) 513, 1970.
- [15] 山村雄一, 青本隆一: 药局, 21(6): 719, 1970.
- [16] 山村雄一, 饭田敏次: 《临床酵素化学》东京医学书院, 大阪, 1965, P. 46.
- [17] 李禄先等: 微生物学报, 2(6): 267—274, 1960.
- [18] Smyth et al.: *Am. J. Pharmacy*, 133: 249, 1961.
- [19] Anon: 日刊工业新闻 1972 11. 30.
- [20] 伊藤万藏, 杉浦衛: 药学杂志, 88(12): 1576—1595, 1968.
- [21] 杉浦衛, 伊藤万藏: 药学杂志, 89(10): 1325—1333.
- [22] Leonard, Keay: *Proteases of the genus Bacillus in Fermentation. Technology Today Proceedings of the IVth International Fermentation Symposium Kyoto.* 289—298, 1972.
- [23] Kunio Fujiwara and Daisuke Tsuru: *J. Biochem.* 76(4): 883—886, 1974.
- [24] Kazuyuki Morihara et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 39(7): 1489—1492, 1975.
- [25] Juiehiro Yagi et al.: 酶学杂志, 52(10): 713, 1974.