

产蛋白酶枯草杆菌的选育及应用研究

II. N1025 菌产酶条件与酶性质的初步考察

李传友 张其玖* 邱秀宝 黎高翔 杨康婉

(中国科学院微生物研究所, 北京)

摘要 本文报道产蛋白酶菌株枯草杆菌 N1025 的产酶条件及酶性质的初步考察。在 45℃ 培养, 最适产酶时间为 20 小时, 培养基以自然 pH 为好, CaCl_2 、 MgSO_4 、 FeCl_3 及 CaCO_3 有促进产酶作用, 尿素、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 及 NaNO_3 对产酶有明显的抑制作用。以酪蛋白为底物, 在 45℃ 时, pH7—8 酶活性较高; 在 52—55℃, 出现 pH 7 及 9 两个活性峰, 以 pH 9 较高。酶作用的最适温度, 随 pH 不同而变化。以蚕丝为底物, 在 45℃ 作用, 酶活性峰在 pH7.0。

关键词 枯草杆菌蛋白酶; 蚕丝

N1025 是一株蛋白酶高产菌株^[1], 它的高效脱丝胶性能及高温 (45℃) 培养特性, 很适合南方丝脱胶业的扩大应用。本文报道 N1025 菌株在复筛试验基础上, 进一步试验了产酶条件, 同时作了初步的酶性质考察。

材料与 方法

(一) 材料

1. 酪蛋白 (B. D. H 产品), 酪氨酸(层析纯), 其它试剂均为国产分析纯试剂。
2. 斜面培养基及培养方法见文献 [1]。
3. Folin 试剂^[2]。
4. 生蚕丝、生绸 10 电力纺。
5. 基础培养基 (%): 玉米粉 4, 黄豆饼粉 2, K_2HPO_4 0.2, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0005, pH7.5—8。

(二) 酶活测定

1. 以酪素为底物, 参看文献 [1]。
2. 以丝绸为底物
 - a. 蚕丝前处理: 称取一定量的生蚕丝 (约 0.5g) 放入试管中, 加入 10ml 0.1% Na_2CO_3 , 在 85℃ 保温 15 分钟, 小心倾去溶液, 蚕丝用蒸馏水洗三次, 控干备用。
 - b. 10 电力纺生绸前处理: 将已知重量的

10 电力纺绸片浸入煮沸的 0.5% Na_2CO_3 水溶液中 1 秒钟, 蒸 9 秒钟; 或将绸片在 0.5% Na_2CO_3 浸透后, 在蒸汽中保温 3 分钟, 用蒸馏水漂洗三次, 控干备用。

c. 酶处理: 将经过前处理的蚕丝或绸片浸入指定的酶液中进行酶解。

d. 后处理: 酶解反应结束, 将蚕丝或绸片漂洗干净, 晾干, 放入 CaCl_2 干燥器中过夜称重, 计算炼减率。

结果与 讨论

(一) 最适产酶条件

1. 在 45℃ 培养的最适时间: 从表 1 看出, N1025 菌在本实验条件下, 以培养 20 小时酶活最高。

表 1 最适培养时间

培养时间 (h)	16	20	24	36
酶活性 (u/ml)	2366	2695	2502	2207

基础培养基, 在 45℃ 摇床培养

2. 培养基最适 pH: 前文报道的复筛试验中, 在 37℃ 培养, N1025 及其它三株菌的酶活高峰在不同培养时间里大都在 pH7—8 处出现。

* 现在通讯处: 中国科学院生物物理研究所

为了简化工艺和采用更好的温度条件,又在 45°C 条件下,进行了自然 pH 及 pH7.5 培养的产酶比较(表 2)。结果表明,培养 20—24 小时酶活较高。另外,在 45°C 培养要求较低的培养基 pH。这样,在生产酶制剂时,可以省去调 pH 这一步骤。

表 2 培养基最适 pH

酶活性 (u/ml)	培养时间 (h)			
	16	20	24	26
pH 自然 (6.7)	2423	2593	2560	1570
7.5	2400	2161	2480	1680

表 3 添加物对 N1025 菌产酶的影响

添加物	浓度(%)	酶活性 (u/ml)
Na ₂ HPO ₄	0.20	2720
NaCl	0.15	2848
CaCO ₃	0.50	3065
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.20	2163
NaNO ₃	0.20	280
(NH ₂) ₂ CO	0.20	378
明胶	0.20	2784
CaCl ₂	0.02	2732
MgSO ₄	0.05	3205
MnSO ₄	0.001	2238
ZnSO ₄	0.0005	2795
MnSO ₄	0.005	
CaCl ₂	0.02	
MgSO ₄	0.05	3440
FeCl ₃	0.01	
CaCl ₂	0.02	
MgSO ₄	0.05	3110

3. 添加物对产酶的影响:

从表 3 看出,在基础培养基中添加 0.02% 的 CaCl₂, 0.05% MgSO₄, 0.01% FeCl₃ 的酶活最高;只添加 0.05% MgSO₄ 和 0.5% CaCO₃ 也有较好的效果;尿素及 NaNO₃ 对产酶有明

显的抑制作用;添加 0.2% (NH₄)₂SO₄ 的产酶能力降低 20%。显然,添加无机氮盐对 N1025 菌是无益的。微量 Fe³⁺ 的存在,有利于 N1025 菌蛋白酶的产生,因此可以用铁质发酵罐代替不锈钢发酵罐。

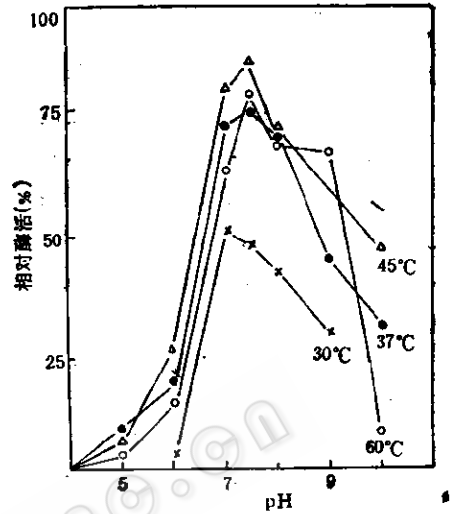


图 1A 酶作用最适 pH

酶用量: 培养液的离心上清液稀释 120 倍后取 1 ml 测定。
缓冲液系统: pH3—6, 柠檬酸-柠檬酸钠, 0.02M。
pH7—8, 磷酸缓冲液, 0.02M。
pH9, 硼砂-硼酸, 0.02M。
pH10, 0.05M 硼砂 50ml + 0.2 N NaOH 43ml + 0.2M Na₂HPO₄ 8.5ml。

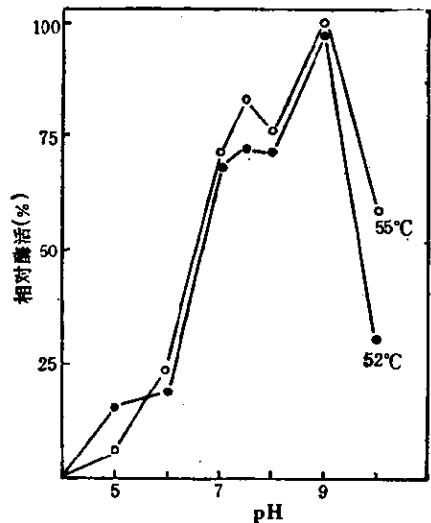


图 1B 酶作用最适 pH

酶用量及缓冲液系统与图 1A 同

4. 接种量与种龄对产酶的影响: 接种量对产酶有一定影响, 以不低于 4% 为宜。种龄对产酶的影响不明显, 以 9 小时左右的种子接种产酶略有提高。

(二) 酶性质的初步考察

1. 以酪蛋白为底物

(1) 酶作用最适 pH: 从图 1A 及图 1B 看出, 在实验条件下, 低于 pH6 及 pH 10 以上酶活均较低; 当酶在 52℃ 及 55℃ 作用时, 有两个活性高峰, 主峰在 pH9, 次峰为 7.5, 在 pH8 处是一酶活低谷。这与文献报道经过提纯的中性蛋白酶及碱性蛋白酶的 pH 曲线不同^[3-5]。这种现象可能反映出 N1025 菌产生的是一个中性蛋白酶与碱性蛋白酶共存的体系。在 60℃ 反应也有两个酶活峰, 主峰是 pH7.5, 次峰为 9, 与在 52℃ 及 55℃ 反应的峰顺序不同。可能是由于高 pH 高温引起酶失活造成的。

(2) 酶作用最适温度: 从图 2 看出, 在 pH7 及 7.5 条件下, 最适作用温度是 45℃, 在 pH8、9、10 时, 酶的最适作用温度是 52℃。pH 偏碱时, 其最适温度比中性时要高一些。

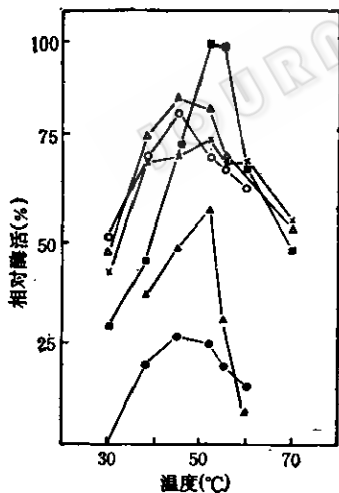


图 2 酶作用最适温度

● pH6, ○ pH7, △ pH7.5, × pH8,
■ pH9, ▲ pH10

(3) 酶脱丝胶过程中的失活情况: N1025 适宜于 45℃ 培养产酶, 酶在中性条件下作用, 最适温度也是 45℃。因此, 了解此反应条件下

酶的稳定情况, 对酶的生产及应用都具有较重要意义。

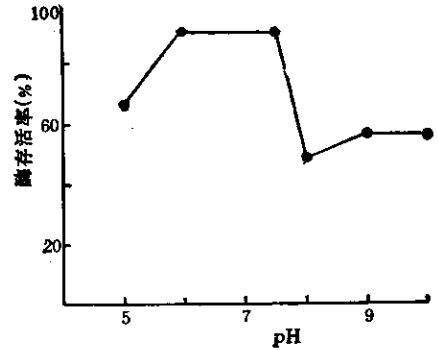


图 3 酶在 45℃ 时的稳定性

酶预先在 45℃ 保温 60 分钟后, 用重氮-5-氨基四唑酪蛋白法测定其残存活性: 6ml 反应液中含 1% 的重氮-5-氨基四唑酪蛋白 2ml, pH 7.5、0.1M 磷酸缓冲液 1ml, 保温 10 分钟, 加入 Zn-Ni 试剂 (10% NiSO₄ · 7H₂O、1.2% ZnSO₄ · 7H₂O, pH3.5) 4ml 终止反应及显色, 过滤, 滤液在 500nm 比色。

从图 3 看出, 在 45℃、pH6—7.5 下作用 60 分钟, 酶存活率达 90% 左右, 在此条件下酶最稳定。pH5 处存活率为 66%, pH9、10 存活率为 57% 左右, pH8 存活率为 50%。由此看来, 在使用 N1025 蛋白酶时, 如果需要反应时间较长, 选择 45℃、pH 7.5 适宜; 如果要求反应时间短, 则应选择 52 或 55℃、pH9 适宜。

(4) 不同助剂对酶活性的影响: 在脱丝胶过程中, 需要加入某些助剂, 如表面活性剂、渗透剂等, 以提高脱丝胶质量。这些助剂对酶的活性产生不同的影响。结果列于表 4。

从表 4 看出, 在 45℃ 60 分钟的酶解条件下, 平平加、过氧化氢、渗透剂 J. F. C. 及保险粉对酶无害, 过氧化氢似有轻微的激活作用; 泡化碱、肥皂、雷米帮 A 对酶有抑制作用。

2. 以蚕丝胶为底物

(1) 不同 pH 对酶脱丝胶的影响: 以桑蚕丝为底物, 酶浓度为 43.0u/ml, 反应体系中含有 0.006% 平平加、0.2% NaCl, 浴比为 1:15, 45℃ 60 分钟。结果见图 4。从图 4 看出, 在

表 4 不同助剂对酶活的影响

助剂名称	浓度 (g/l)	相对酶活 (%)	助剂名称	浓度 (g/l)	相对酶活 (%)
原酶液	0	100.0			
平平加	0.1	106.0	泡化碱	0.5	39.5
	0.3	106.0		1.0	39.5
	0.5	102.0		2.0	31.6
过氧化氢	1.0	105.0	肥皂	2.5	70.0
	2.0	110.0		5.0	50.0
	3.0	110.0		10.0	45.0
渗透剂 J. F. C.	0.1	104.0	雷米帮 A	1.0	91.0
	0.3	102.0		2.0	80.0
	0.5	98.0		4.0	63.0
氯化钠	1.0	104.0	保险粉	0.1	100.0
	3.0	100.0		0.3	100.0
	5.0	88.0		0.5	102.5

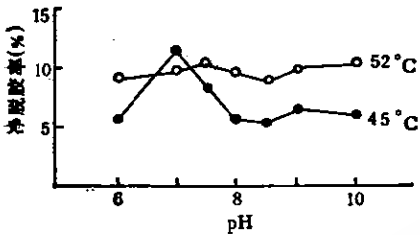


图 4 不同 pH 对酶脱丝胶能力的影响

本试验酶浓度为 590u/ml。pH6—8 用磷酸缓冲液，pH9—10 用硼酸缓冲液(参看图 1A 注)。

52°C 条件下，反应速度较快，脱丝胶效果差别不大，其中以 pH 7.5、9、10 效果略高，活性峰向偏碱方向移动。在 45°C 脱胶，以 pH7 炼减率最高，其次是 pH7.5 和 9，pH9 是次峰，与图 1B 不完全一致，这可能与底物性质上的差别有关。

(2) 不同温度对酶脱丝胶的影响：以 10 电力纺绸片为底物。绸片预先在 0.5% Na₂CO₃ 溶液中浸透，然后在水蒸汽中保温 3 分钟，最后酶解。酶浓度为 90 u/ml，溶于 0.02 M pH 7.0 的磷酸缓冲液中。从表 5 看出，在 55°C 反应 5 分钟炼减率达 24.4%，延长时间，炼减率并无增加。60°C 5 分钟虽与 55°C 5 分钟效果相同，但酶失活较多。

(3) 酶用量试验：以 11210 电力纺生绸片为底物。绸片预先在 0.41% 的 Na₂CO₃ 溶液中

表 5 不同温度对酶脱丝胶的影响

酶解时间 (min)	炼减率 (%)		
	50°C	55°C	60°C
5	22.2	24.4	24.3
10	22.9	24.0	23.7
CK	22.5		

煮沸 1 秒钟，移入水蒸汽中保温 9 秒钟，用 52°C 温水漂洗三次，然后进行酶解。酶用 0.02M pH 7.0 的磷酸缓冲液稀释到所需浓度，在 50°C 反应 5 及 10 分钟。从表 6 看出，在试验条件下，酶浓度以 84 u/ml 较好。酶浓度增加，炼减率并无增加。酶解 5 分钟炼减率达 23.3%，延长至 10 分钟炼减率无明显增加。

表 6 酶用量试验

酶浓度 (u/ml)	炼减率 (%)	
	5 (min)	10 (min)
42		21.6
84	23.3	23.7
126	23.1	23.2
168	22.9	23.9
CK	21.5	21.5

初步试验结果表明,产蛋白酶 N1025 菌种不仅适于工业化生产,而且其酶制剂可用于桑蚕丝脱胶。酶反应条件通常采用 80—90 u/ml, pH7、7.5 或 9, 50—55℃ 酶解 5 分钟,即可达到预期的脱胶效果。

参 考 文 献

[1] 李传友,张其玖:微生物学通报,14(4): 163, 1987。

- [2] 潘家秀等编著:蛋白质分析技术,科学出版社,1962。
- [3] Daisuk Tsuru, et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **30** (7): 651—658, 1966.
- [4] Daisuk Tsuru, et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **30** (12): 1261—1268, 1966.
- [5] Mcconn, J. D. et al.: *J. Biol. Chem.*, **239**: 1706, 1964.