

微生物凝乳酶的研究

II. 酶学性质

马俊 姜成林 郭光远 徐丽华 刘勇 杨宇容

(云南省微生物研究所,昆明)

摘要 从2502株菌中筛选到一株真菌 Y85-8512,经诱变育种,发酵物的凝乳酶活力为5000 u/g以上。对该酶的酶学性质进行了研究,其最适反应温度为70℃,酶在50℃保温半小时稳定;pH 5.0时酶活最高,pH 7.0酶几乎失活;pH 2—5,室温保持1小时,剩余酶活力为66—100%。该酶凝乳活性与水解蛋白质活性之比为4782。还与胃蛋白酶、小牛凝乳酶及毛霉凝乳酶进行了比较,初步认为该酶不同于这几种酶。

关键词 微生物凝乳酶;酶学性质

凝乳酶是制造乳酪的一种关键性酶,最初从小牛皱胃液中制取。因不能满足制酪工业的大量需求,多年来人们一直在探究凝乳酶的新来源。60年代末,Somkuti等^[1]和Aunstrup^[2]分别从微小毛霉(*Mucor pusillus*)和米黑毛霉(*M. miehei*)发现了凝乳酶,从而使微生物凝乳酶得到了广泛应用。1980年美国凝乳酶的销售额估计达1500万美元^[3]。目前全世界凝乳酶的年产值约1.2亿美元,占酶制剂总市场的15%^[4]。如今这种酶的世界市场供应仍然紧张,预计以后该酶的需求量还会不断增加。1984年以来我们对2502株菌株进行了研究,从中筛选到一株真菌,经诱变处理,凝乳酶活力为5000 u/g以上。对高产菌株的发酵条件、酶制备条件及毒性进行了研究^[5],发现真菌Y85-8512适合生产凝乳酶。本文对该菌株产生的凝乳酶进行了酶学性质的研究,并与其它几种酶进行了比较。

材料和方法

(一) 菌种

本实验室分离并经诱变处理的菌株(*Mucor* sp.) Y85-8512^[5]。

(二) 发酵、酶制备及凝乳酶活力测定、蛋白水解活性测定

采用前文^[5]的方法。

(三) 酶样品来源

胃蛋白酶来自中国科学院生物化学研究所;胰蛋白酶来自上海化学试剂公司(进口分装);小牛凝乳酶和毛霉凝乳酶为日本明治制果公司赠送(Sigma公司)。Sephadex G-100来自Pharmacia公司(进口分装)。其余均从昆明化学试剂公司购买。

结果和讨论

(一) Y85-8512 酶精制

Y85-8512粗酶6克,溶于pH 5.0、0.05 mol/L 120 ml 醋酸钠缓冲液中,磁力搅拌器搅拌,使其充分溶解。离心(4000 r/min)5分钟,取上清液,加硫酸铵使之达到70%饱和度,放置于0℃。离心得沉淀物,使其溶于适量上述醋酸钠液中,加1%活性炭吸附色素物质。离心两次除去活性炭,上清液用滤纸过滤,滤液中加入硫酸铵至70%饱和度,置于0℃过夜。离心,沉淀物溶于适量pH 5.0、0.05 mol/L 醋酸钠液中,上Sephadex G-100柱层析(800 ml 柱床),用pH 5.0、0.05 mol/L 醋酸钠缓冲液洗脱,通过核酸蛋白检测仪及记录仪监测,收集

云南省应用基础研究基金资助的课题。

活性峰(图1), 将其用真空减压超滤器过滤(滤膜截留分子量为10000), 收集活性部分, 冰冻干燥浓缩, 将浓缩液上 Sephadex G-100 柱层析(400 ml 柱床), 收集活性峰, 即得 Y85-8512 精制酶。

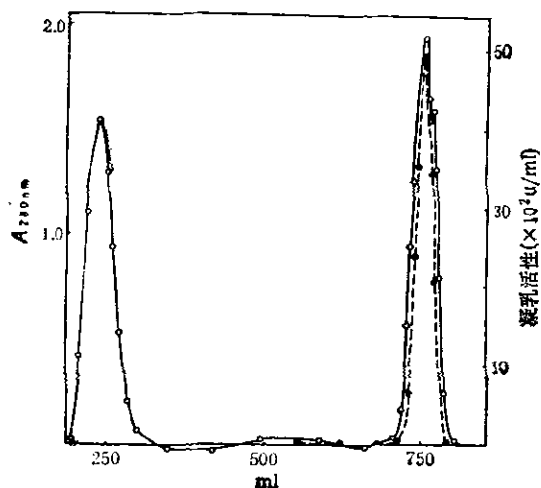


图1 Y85-8512 酶的柱层析图谱, sephadex G100 (4 × 70 cm)

●-● 凝乳活性 ○-○ A_{280nm}

洗脱缓冲液: 0.05 mol/L 醋酸钠缓冲液(pH 5.0)

(二) 几种酶的特性

1. 最适反应温度

脱脂牛奶加 0.01% $CaCl_2$ (pH 6.2), 在各种温度至少保温 10 分钟, 分别加入胃蛋白酶、

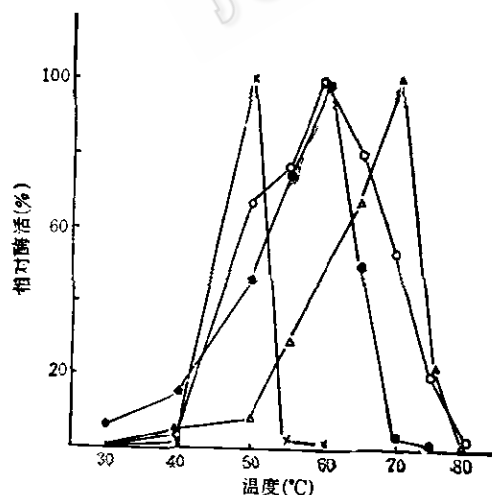


图2 酶作用最适温度

×-× 胃蛋白酶; △-△ 小牛凝乳酶; ○-○ 毛霉凝乳酶; ●-● Y85-8512 酶

毛霉凝乳酶、小牛凝乳酶及 Y85-8512 粗酶液, 测酶活, 结果见图2。胃蛋白酶的最适温度是 50°C, 小牛凝乳酶为 70°C。毛霉凝乳酶和 Y85-8512 粗酶的最适温度均为 60°C, 但后者的最高失活温度低于前者。

2. 热稳定性

脱脂牛奶加 0.11% $CaCl_2$, 35°C 至少保温 10 分钟。各种酶液在不同温度保温 30 分钟, 35°C 测酶活, 结果见图3。毛霉凝乳酶在 60°C 以下稳定; Y85-8512 酶在 50°C 以下稳定; 而其余两种酶均在 40°C 以下稳定。

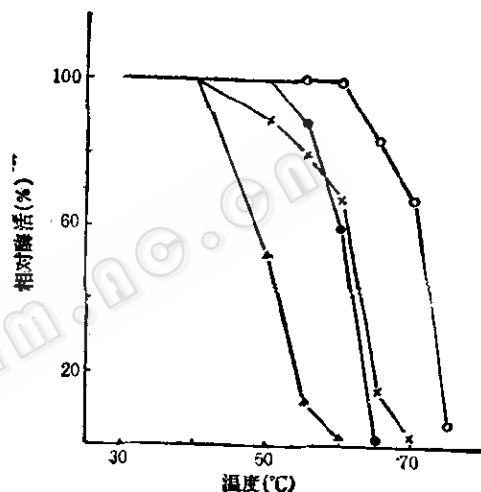


图3 酶的热稳定性

×-× 胃蛋白酶; △-△ 小牛凝乳酶 ○-○ 毛霉凝乳酶; ●-● Y85-8512 酶

3. pH 稳定性

四种酶在室温于不同 pH 值放置 1 小时, 35°C 测酶活, 结果见图4。pH 3—5, 胃蛋白酶剩余酶活力 57~100%、毛霉凝乳酶为 69—100%; pH 3—6 小牛凝乳酶剩余酶活力 65—100%, pH 2—5 Y85-8512 酶剩余酶活力 55—100%。四种酶均在 pH 4 最稳定。

4. 金属离子和抑制剂对酶活力的影响

在脱脂牛奶中加入各种金属离子和抑制剂, 使其浓度为 0.01 mol/L。35°C 预保温 10 分钟以上, 测酶活, 结果见表1。 Ca^{++} 、 Fe^{++} 和 Mg^{++} 对酶有显著的激活作用, Cu^{++} 对酶稍有激活作用。金属螯合剂 EDTA 不仅不抑制酶

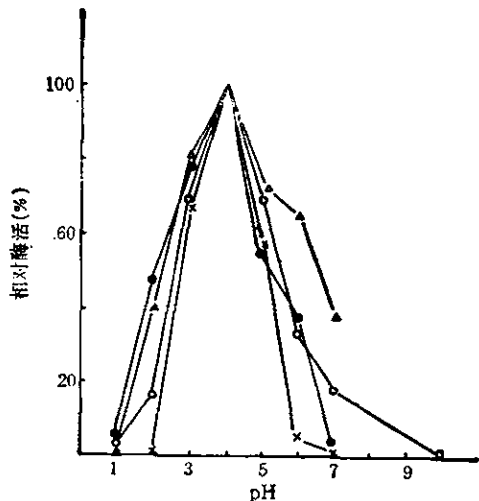


图4 酶对 pH 的稳定性

X—X 蛋白酶；Δ—Δ 小牛凝乳酶 ○—○ 毛霉凝乳酶；●—● Y85-8512 酶

表1 金属离子和抑制剂对各种酶的凝乳活性的影响

	胃蛋白酶	毛霉凝乳酶	牛凝乳酶	Y85-8512 粗酶	Y85-8512 精酶
Ca ⁺⁺	400	282	369	229	320
Fe ⁺⁺	400	343	282	369	320
Mg ⁺⁺	253	218	282	171	141
Cu ⁺⁺	86	49	86	98	73
EDTA	55	36	40	114	74
8-羟基喹啉	26	30	<3	92	32
对照	24	26	<3	76	<6

活,反而略有激活作用。抑制剂 8-羟基喹啉不抑制酶活性。

Y85-8512 精制酶的最适反应温度是 70℃; Y85-8512 粗酶的最适温度为 60℃(表 3)。上述二者最适温度相差 10℃,之所以产生这一差别是因为两者脱脂牛奶中 CaCl₂ 浓度不同,前者 CaCl₂ 浓度是 0.11%,后者 CaCl₂ 浓度为 0.01%。Feder^[6] 等人提出,钙离子对许多酶有

表2 凝乳活性与蛋白水解活性

酶类	凝乳活性 (单位/ml)	蛋白水解活性 (A _{680nm})	比值(单位/ OD _{680nm})
胃蛋白酶	906	0.040	22650
胰蛋白酶	640	0.363	1763
毛霉凝乳酶	640	0.044	14545
小牛凝乳酶	640	0.141	4539
Y85-8512 粗酶	1067	0.217	4917
Y85-8512 精酶	923	0.193	4782

稳定保护作用,尤其对耐热酶的热稳定性有很强保护作用。钙离子能稳定酶的三级结构,从而保护了酶。从上述可知,增加 Ca⁺⁺ 浓度,可提高酶的热稳定温度。

5. 几种酶的凝乳活性与蛋白水解活性

几种蛋白酶的凝乳活性、水解蛋白质活性及二者之比值列于表 2。毛霉凝乳酶凝乳活性与水解蛋白质活性之比为 14545; Y85-8512 粗酶为 4917; Y85-8512 精酶为 4782; 小牛凝乳酶为 4539; 胰蛋白酶为 1763; 胃蛋白酶为 22650。

6. 几种酶的物化性质比较

从表 3 的结果可以看出,四种酶在 pH 4 均最稳定。Y85-8512 酶的化学性质与胃蛋白酶、小牛凝乳酶的化学性质有明显差别。Y85-8512 酶的热稳定温度显著低于毛霉凝乳酶; Ca⁺⁺ 对毛霉凝乳酶的激活作用大于 Y85-8512 酶;毛霉凝乳酶的蛋白水解活性比 Y85-8512 酶低;两者的最适反应温度相同,但毛霉凝乳酶的最高失活温度高于 Y85-8512 酶(图 2)。因此,初步认为 Y85-8512 酶可能与毛霉凝乳酶不同。Y85-8512 酶的氨基酸组成及作用机制等有待进一步研究。

表3 几种酶的物化性质比较

性质	胃蛋白酶	牛凝乳酶	毛霉凝乳酶	Y85-8512 粗酶	Y85-8512 精酶
pH 稳定性	4	4	4	4	4
热稳定温度(℃)	40	40	60	50	50
最适反应温度(℃)	50	70	60	60	70
Ca ⁺⁺ 的激活作用(%)	1667	>12308	1085	301	121
8-羟基喹啉的作用(%)	108	100	115	121	121
凝乳活性/蛋白水解活性	22650	4539	14545	4917	4782

参 考 文 献

- [1] Somkait, G. A. & F. J. Baloil: *J. Bacteriol.*, **95**: 1407—1411, 1968.
- [2] Aunstrup, K.: British Patent, 1108287, 1968.
- [3] 胡学智: 酶制剂工业, 科学出版社, 北京, p. 9—11, 1984。
- [4] 孟广震: 微生物学通报, **14**: 92—94, 1987。
- [5] 郭光远: 微生物学通报, **15**: 207—210, 1988。
- [6] Feder, J. et al: *Biochemistry*, **10**: 4552—4555, 1971.