

栖土曲霉中性蛋白酶的研究*

吴 弘 胡 学 智

(上海市工业微生物研究所, 上海)

摘要 栖土曲霉 (*Aspergillus terricola*) 3.942 经⁶⁰Co- γ 射线诱变处理, 得到抗克念菌素变异株 NK71, 并对其培养条件进行了优化, 使产酶提高了 76%。用单宁酸沉淀法提取此酶, 并用 DEAE-Sephadex 离子交换层析法进一步纯化。纯化酶的最适反应温度 40—50℃, 最适 pH7, 在 pH5—7.5、低于 40℃时稳定。

关键词 栖土曲霉; 中性蛋白酶; 诱变育种; 酶纯化; 酶性质

栖土曲霉 3.942 由何秉旺等经紫外诱变获得^[1], 又经胡学智对其发酵培养条件进行深入研究之后于 1968 年用于生产中性蛋白酶。近年来, 3.942 菌种出现退化现象, 发酵酶活波动在 2000 u/ml 左右。而且其提取方法 20 多年未作改进, 对该酶的纯化及纯化酶的性质也未作深入研究, 从而制约了该酶应用领域的拓展。

本文报道采用⁶⁰Co- γ 射线和 NTG 对 3.942 菌种进行诱变处理, 筛选到一株抗克念菌素突变株, 并对其发酵培养条件作了试验, 最终使产酶提高了 76%。用单宁酸沉淀法从其发酵液中提取中性蛋白酶, 再经 DEAE-Sephadex 离子交换层析进一步纯化。对纯化酶的性质作了初步研究。

材料与方 法

1. 出发菌株: 栖土曲霉 (*Aspergillus terricola*) 3.942。

2. 培养基: 斜面培养采用察氏培养基。平板分离培养采用酪蛋白培养基 (察氏培养基 + 0.2% 蛋白胨 + 0.4% 酪蛋白)。在平板分离培养基中加入制霉菌素 50 μ g/ml 或克念菌素 400 μ g/ml 即为抗生素选择性培养基。发酵培养基 A(%): 麸皮 3, 米糠 1, 玉米浆 0.5, K_2HPO_4 0.2, LS 0.1, 自然 pH。1 kg/cm² 灭菌 20 min。

3. 诱变及筛选方法: ⁶⁰Co- γ 射线诱变 (剂量 6—20 万伦琴) 和 NTG 诱变 (作用浓度 1000 γ /ml, 28℃ 处理 30 min) 均按常规方法进行^[2]。所得变异株先用平板透明圈法初筛, 摇瓶复筛。

4. 酶的提取: 发酵液离心去除菌体和培养基, 加适量单宁酸沉淀酶蛋白。离心收集沉淀, 加适量聚乙二醇。聚乙二醇与单宁酸结合, 游离出酶蛋白。离心得浓缩酶液, 再经有机溶剂沉淀, 真空干燥得酶粉。

5. 蛋白酶活性测定方法: Folin 法^[3]。

6. 蛋白质浓度测定方法: Folin-酚试剂法^[3]。

7. 氨基氮测定方法: 甲醛测定法^[3]。

8. 还原糖测定方法: 斐林氏法^[3]。

9. 主要试剂: 酪蛋白 (Hammarsten 法制备, Merck), 单宁酸 (工业用), 聚乙二醇 6000 (平均分子量 5500—7500)。

结 果

(一) 栖土曲霉中性蛋白酶高产菌株的选育

1. ⁶⁰Co- γ 射线诱变处理效果: 以⁶⁰Co- γ 射线处理出发菌株的单孢子悬液, 照射剂量 10 万

* 上海科技大学陈卫参加了酶的提纯和性质研究的部分工作。

伦琴时(存活率 6.2%)正变率较高。其中一株变异株 AC 1024 产酶活力较亲株(酶活 1.7×10^3 u/ml) 提高 18%, 达 2.0×10^3 u/ml。

2. NTG 诱变处理效果: 以 AC 1024 为出发株, 用 NTG 处理(致死率 83.3%), 得一株抗克念菌素突变株 NK 71, 产酶活力 2.5×10^3 u/ml。

(二) 变异株 NK 71 发酵培养基及培养条件的优化

1. 培养基碳氮源的试验: 以麸皮、米糠、玉米粉、豆饼粉、黄豆粉、玉米浆等为原料, 配成 30 多种基本培养基, 接种 NK 71 斜面菌种进行试验。结果表明, 以麸皮、米糠、玉米浆或麸皮、米糠、黄豆粉较为合适。对供试的 30 余种基本培养基的碳氮源含量进行分析, 发现 NK 71 菌株发酵产酶的适宜碳氮源比在 1.2 左右。

为进一步确定碳氮源间的最佳配比, 对麸皮、米糠、玉米浆三因素各取三水平进行正交试验。结果表明, 在实验条件下, 三者的最佳配比为麸皮 5%, 米糠 1%, 玉米浆 1% (发酵培养基 C)。同样对麸皮、米糠、黄豆粉进行正交试验, 确定了发酵培养基 B 的碳氮源配比。对这两组培养基进行比较表明, 使用培养基 B 产酶更高, 发酵三天产酶可达 2.84×10^3 u/ml (表 1)。

表 1 三组发酵培养基的比较

编号	培养基配比	酶活 ($\times 10^3$ u/ml)
A	麸皮:米糠:玉米浆=3:1:0.5	2.51
C	麸皮:米糠:玉米浆=5:1:1	2.67
B	麸皮:米糠:黄豆粉=3:2:0.5	2.84

2. 发酵培养基固形物浓度试验: 麸皮、米糠、黄豆粉按正交试验确定的配比混合均匀, 配成各种固形物总浓度, 以两种装液量进行试验(图 1)。在一定范围内, 产酶随固形物浓度增加而提高, 但固形物浓度过高, 产酶反而迅速减少。这可能是由于固形物浓度过高使得发酵液稠厚而引起通风供氧严重不足所致。

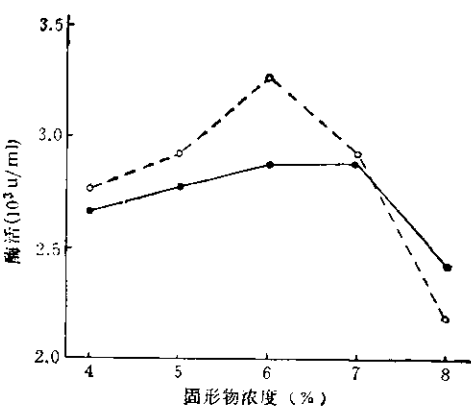


图 1 发酵培养基固形物浓度对产酶的影响 250 ml 三角瓶装液量: 20 ml(○) 25 ml(△)

3. 无机盐对发酵产酶的影响: 在发酵培养基 B 中添加各种无机盐进行试验, 由表 2 可见,

表 2 无机盐对发酵产酶的影响

无机盐(%)	终 pH	酶活 ($\times 10^3$ u/ml)
NaNO ₃ 0.3	8.5	0.98
NH ₄ Cl 0.5	7.0	0.87
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5	7.0	0.92
(NH ₄) ₂ HPO ₄ 0.5	6.5	1.49
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O 0.5	6.5	2.89
Na ₂ C ₂ H ₃ O ₇ ·2H ₂ O 0.3	6.5	2.30
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O 0.3	6.0	1.86
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.5	1.91
CaCl ₂ 0.5	6.5	1.16
对照	6.0	1.15

铵盐和硝酸盐对产酶不利, 磷酸盐可使产酶提高近 1.5 倍, 柠檬酸三钠和硫代硫酸钠对产酶也有明显的促进作用, 钙盐、镁盐没有促进作用。

进一步试验表明, 同时添加两种盐类的效果没有添加单一的磷酸盐的效果好。

对几种磷酸盐进行的比较表明(表 3), 添加 0.5% K₂HPO₄ 效果最好。

4. 微量金属元素对发酵产酶的影响: 在培养基 B 中添加各种微量金属元素的试验表明, 工业生产上常遇见的一些金属如铁、铅、铜、铝、铬等在 5×10^{-4} — 2×10^{-3} mol/L 浓度下对该菌蛋白酶生成无明显影响, Co²⁺、Mn²⁺ 在适当浓度下略有促进作用。但从 Co²⁺、Mn²⁺ 对离体酶的激活作用^[2]来看, 它们的促进

作用可能仅仅在于对酶的激活作用。

表 3 磷酸盐对发酵产酶的影响

磷酸盐种类及浓度(%)		终 pH	酶 活 ($\times 10^3$ u/ml)
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.2	6.6	2.88
	0.5	7.0	3.16
KH_2PO_4	0.2	6.5	1.99
	0.5	6.4	2.29
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	0.2	6.4	2.37
	0.5	6.4	2.65
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0.2	6.0	1.60
	0.5	6.0	2.33
对 照		6.0	1.16

表 4 净洗剂 LS 对 NK 71 菌株发酵产酶的影响

培养基	LS	酶 活 ($\times 10^3$ u/ml)	相对酶活(%)
A	0	1.68	100
	0.1%	2.51	149
C	0	1.84	100
	0.1%	2.67	145
B	0	2.84	100
	0.1%	2.41	84.9

5. 表面活性剂对发酵产酶的影响: 由表 4 可见,在培养基 A、C 中添加 LS(对甲氧基脂肪酰胺基苯磺酸钠)可提高产酶45—50%,而在培养基 B 中添加 LS 对产酶反而不利。又在培养基 B 中分别添加 Tween 80、Tween 20、TX-10、脂肪酸钠、咪唑啉等 10 多种表面活性剂进行试验,结果对产酶均无促进作用,且其中大多数都有不同程度的抑制作用。

6. 培养基初始 pH 对产酶的影响: 试验表明,培养基 B 初始 pH(灭菌前)在 6.5—7.5 时较好。为方便起见,可使用其自然 pH(约 6.8)。

7. 通风量对发酵产酶的影响: 在培养基 B 中, NK 71 菌株对通风量要求很高,通风量大则产酶量高。

8. 发酵周期试验: 250 ml 三角瓶装 20ml

培养基 B, 自然 pH, 灭菌后接种,于 30℃、250 r/min 分培养,结果如图 2 所示。可见,产酶最活跃的时期在 24—48 小时,在 72 小时左右达到产酶高峰,为 3.0×10^3 u/ml,比出发菌株提高了 76%。

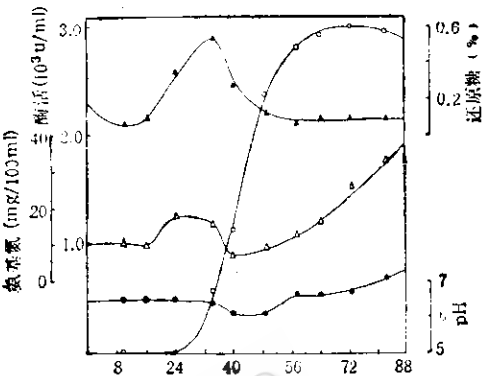


图 2 NK 71 菌株蛋白酶发酵过程
○ 酶活, ● 终 pH, ▲ 还原糖, △ 氨基氮

(三) 栖土曲霉中性蛋白酶的提取和纯化

1. 单宁酸沉淀: 单宁酸沉淀酶蛋白的试验表明,在发酵滤液 pH6.5 时加 1% 单宁酸可使酶蛋白充分沉淀,酶活收率最高。进一步试验表明,用聚乙二醇脱除单宁酸时,聚乙二醇用量(10% 溶液的毫升数)对单宁酸用量(克)的比例为 3:1—4:1 时较好。根据上述条件,处理 2500 ml 原酶液,结果见表 5。

表 5 单宁酸沉淀法提取 3.942 中性蛋白酶实例

步 骤	体积或重量	酶 活	酶活比活 收率(%, mg)	纯化 倍数
原酶液	2500ml	1.19×10^3 u/ml	—	111
单宁酸-聚乙二醇处理	565 ml	5.64×10^3 u/ml	100	227
酒精沉淀、真空干燥	酶粉 16.0 g	1.27×10^3 u/g	68.4	257

2. 离子交换层析: 将上法制备的酶粉用 pH 7.0、0.001 mol/L Tris-HCl 缓冲液溶解,透析,调 pH 8.4 后上柱(DEAE-Sephadex A-25)。先以平衡缓冲液(pH 8.4、0.05 mol/L Tris-HCl, 含 0.002 mol/L $CaCl_2$)洗去杂蛋白,再用

150 ml 平衡缓冲液、150ml 0.3 (mol/L)NaCl 梯度洗脱(图 3),出现 4 个蛋白峰,而酶活主要分布在峰 1。收集其洗脱液,浓缩、透析、丙酮沉淀制成粉剂。

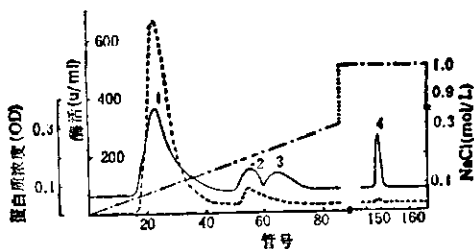


图 3 DEAE-Sephadex A-25 离子交换层析 梯度洗脱曲线
——蛋白质浓度,中性蛋白酶活力,
- - - NaCl 梯度

(四) 赭土曲霉中性蛋白酶性质的初步研究

1. 反应 pH 对酶活性的影响: 在不同 pH 下测定酶活力,结果表明酶反应适宜 pH 范围在 6—8, 最适 pH 7。

2. 酶的 pH 稳定性: 酶液在不同 pH 下于 40℃ 保温 15 分钟,再在 pH 7 测酶活力。结

果表明,此酶在 pH 5—7.5 之间较稳定。

3. 酶反应适宜温度和酶的热稳定性: 在不同温度下测定酶活力,结果表明,其反应适宜温度在 40—50℃。

将酶液在不同温度下分别处理不同时间,再在 40℃ 测酶活。由图 4 可见,在 40℃ 以下酶热稳定性较好。

讨 论

本文采用多烯类抗生素筛选高产菌株,效果较好。其作用机制与膜通透性的改变有关^[4]。通过诱变得到的耐药性菌株,其膜结构发生了某些变化,使得其上的麦角甾醇不再为多烯类抗生素所结合。而膜结构上的这种变化有可能有利于蛋白酶的分泌,从而提高其产酶能力。

试验发现,表面活性剂对产酶的影响与所用培养基成份有关。LS 对以麸皮、米糠、玉米浆为碳氮源的培养基的发酵产酶有促进作用,而对以麸皮、米糠、黄豆粉为碳氮源的发酵产酶不利。这其中的确切作用机制值得进一步深入研究。

参 考 文 献

1. 何秉旺等:微生物学通讯,1: 69,1959。
2. 章名春编著:工业微生物诱变育种,科学出版社,北京 1984。
3. 朱俭等编:生物化学实验,上海科学技术出版社,上海 1981。
4. Suzuki M et al.: Agr. Biol. Chem.. 40(2): 365, 1976。

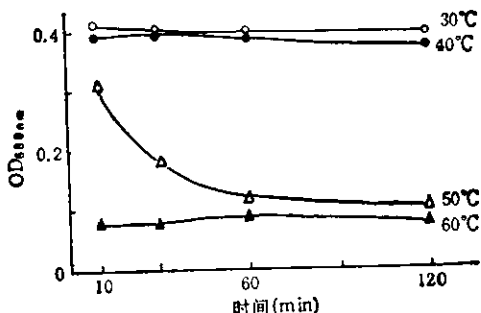


图 4 酶的热稳定性