

微生物产弹性蛋白酶研究进展

颜子颖

(广州医药工业研究所)

关国雄

(广州白云山制药总厂生化所)

弹性蛋白酶(Elastase)是一种以分解不溶性弹性蛋白为特征的广谱蛋白水解酶,具有重大的经济和应用价值。目前,弹性蛋白酶主要作为治疗高血脂症、防治动脉粥样硬化症的生化药物,疗效确切,安全可靠。我国该产品的生产是由猪胰提取,由于脏器资源利用受限制,胰弹性蛋白酶一向供不应求。国外,药用弹性蛋白酶有通过动物胰脏提取,也有发酵生产,其作用效果相似^[1]。利用微生物发酵大规模工业化生产弹性蛋白酶有很大的现实意义,不仅能提供足够的治疗用药物酶,也能为开拓该酶的其它方面的应用提供充足的酶源。本文对国内外研究微生物弹性蛋白酶的情况作一综述报道。

(一) 弹性蛋白酶的特点和分布

自1949年Baló和Banga从胰脏分离纯化出弹性蛋白酶^[2]并提出其含量水平与动脉粥样硬化症有关^[3]以来,对该酶的研究一直很活跃,多年的药理、临床证据表明,该酶对治疗高血脂症,防治动脉粥样硬化症疗效甚佳,表现在:(1)使动脉壁弹性、伸展性回复;(2)阻止主动脉冠状动脉斑块的形成;(3)改善血清脂质水平;(4)改善脂蛋白代谢。同时,弹性蛋白酶水解专一性较广,脂肪族非极性氨基酸为羧端的肽键都能为之分解,并且具有酯酶及脂蛋白水解酶活性,能降解包括抗一般蛋白水解酶作用的弹性硬蛋白在内的大多数蛋白质,因而在食品工业中将有广泛的应用前景。

弹性蛋白酶在动物体内分布较广,主要存

在动物胰脏中,此外,在皮肤、主动脉、血小板、白血球中也都有存在。同时,在微生物类群中也广有分布,细菌、放线菌、真菌中都有分泌胞外弹性蛋白酶菌株的报道^[4]。

(二) 国内、外研究应用微生物生产弹性蛋白酶近况

1962年L. Mandl和B. Cohen从牙周病患者的送检样品中首次分离出产胞外弹性蛋白酶的微生物*Flavobacterium elastolyticum*^[5],并从它的培养液中分离纯化出专一降解弹性蛋白的菌源性弹性蛋白酶以来,从细菌、霉菌、放线菌、酵母菌中都相继分离出产酶菌株及其菌源弹性蛋白酶。但研究初期,主要集中于医学微生物病原学的研究,以考察牙周炎、肺气肿以及某些眼病的发生是否与产弹性蛋白酶的微生物侵染人体结缔组织有关。70年代中期以来,日本学者和苏联学者对应用微生物发酵生产弹性蛋白酶都进行了大量的研究工作,并申报了不少专利菌种,我国文献至今未见有这方面的研究报道。笔者1986年以来,在中山大学生物系工作时,就产弹性蛋白酶菌种的筛选、发酵条件的研究及酶的分离提纯等方面进行研究,并取得一定成果。

(三) 微生物来源的弹性蛋白酶

细菌中不少属中都有产弹性蛋白酶的菌株,如黄杆菌属(*Flavobacterium*)^[5,6]、假单胞

本文引用作者的某些研究结果是在中山大学生物系工作时完成的,谨此向作者的导师林哲甫教授、张维钦副教授致以敬意和谢意。

杆菌属 (*Pseudomonas*)^[7]、弧菌属 (*Vibrio*)^[8]、链球菌属 (*Staphylococcus*)^[9]、短杆菌属 (*Brevibacterium*)^[9]、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)^[10,11] 中都有产酶菌株的报道。其中研究得比较详尽的是森原和之研究的绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455)^[7]。另外, 1974 年 I. Shio 和 H. Ozaki 从自然界取样分离出的 *Flavobacterium immotum* 9—35^[6] 具有很强的弹性蛋白酶分泌能力, 后来分离得一株利福平抗性的高产突变株 *Flavobacterium* R-102-87^[12]。该菌在以葡萄糖、干酪素为营养源的发酵培养基中, 30℃ 振荡培养 24 小时, 酶产量达每毫升发酵液 145 单位 (以 40℃, 20 分钟使 1.0 毫克地衣红-弹性蛋白底物完全溶解的酶量为 1 活力单位^[13], 下同)。

1987 年, 笔者从中山大学校园土壤中分离纯化出一株其分泌胞外弹性蛋白酶能力的黄杆菌 *Flavobacterium* sp17-87, 摇瓶培养每毫升发酵液酶产量在 120 单位以上, 并从中成功分离出黄杆菌弹性蛋白酶结晶。该菌产酶的最佳碳、氮源是葡萄糖和干酪素, 同时也能利用粗物质如麸皮、羽毛粉、玉米粉等作为生长、产酶的营养源。该菌利用粗物质发酵, 酶产量为最佳培养基的 80%, 但增加通风能使产量提高到每毫升 130 单位以上。发酵产酶不需添加特殊的生长因子, 也不需弹性蛋白作为诱导物, 酶的生成分泌在发酵 18 小时即达峰值。

苏联学者对微生物弹性蛋白酶进行了较多的研究, 在 *Aspergillus*^[14]、*Actinomyces*^[15,16]、*Geothicum*^[17] 等属中都分离到产弹性蛋白酶的菌株。1972 年 Rassulin 分离出产酶菌 *Actinomyces rimosus*^[15] 并申报了专利, 其后分离纯化了该酶, 并把它和胰弹性蛋白酶进行比较, 发现除分子量较大外, 其它性质及水解专一性等都与胰源酶十分相似^[18]。Lagutina 也从蛋白酶生产菌 *Actinomyces fradiae* 119 所生产的蛋白酶制剂 Protofradin 中分离出弹性蛋白酶组分^[16]; 另外 Parkarskyte 等人对不同种属的微生物菌株研究了它们产弹性蛋白酶的能力, 并对此作了较为系统的研究, 从中筛选出弹

性蛋白酶高产菌 *Aspergillus versicolor* 837^[14] 全面考察了该菌株的产酶情况以及酶的性质, 该菌在深层液体培养中, 以硫酸铵为氮源的马铃薯汁培养基培养 48 小时, 然后强烈通风培养 4 天, 培养液积聚大量胞外弹性蛋白酶^[19]。

(四) 微生物弹性蛋白酶性质

来源不同的微生物弹性蛋白酶, 都能降解其天然底物——弹性硬蛋白, 作为同功不同源蛋白质, 其特点、性质、分子量大小等都所有差异, 但多数酶蛋白等电点都较高, 见表 1。

微生物弹性蛋白酶与胰弹性蛋白酶一样, 具有较广的水解专一性, 不但能专一降解弹性蛋白, 而且对酪蛋白、明胶、血纤维蛋白、血红蛋白、白蛋白等多种蛋白质都能分解, 是一广谱的肽链内切酶。笔者所提纯获得的聚丙烯酰胺凝胶电泳均一的 *Flavobacterium* sp17-87 弹性蛋白酶, 以地衣红-弹性蛋白为底物, 比活力 580 弹性酶单位/毫克蛋白; 以干酪素为底物, 比活力 1724 蛋白水解酶单位/毫克蛋白。(以每分钟分解干酪素生成 1 微克酪氨酸的酶量为 1 个蛋白水解酶单位^[20], 下同)。

(五) 微生物弹性蛋白酶的分离制备

由于微生物弹性蛋白酶都是胞外酶, 其分离纯化相对较为容易, 文献所报道的产酶菌株所产的弹性蛋白酶都已被纯化得到纯酶制品, 而且从 *Pseudomonas* 属^[6] 和 *Flavobacterium* 属^[7] 中都曾获得弹性蛋白酶结晶。电泳均一的菌源弹性蛋白酶易溶于水而结晶态的酶难溶于水, 这一性质与胰弹性蛋白酶很相似^[21]。

1. 从发酵液中回收弹性蛋白酶: 胞外弹性蛋白酶等电点一般都较高, 多数为一碱性蛋白质, 可以用离子交换树脂直接吸附发酵液中的弹性蛋白酶。一般处理是调整发酵液 (连同菌体) 的酸碱度, 使 pH 在 4.5—6.5 之间, 直接加入处理好的弱酸性阳离子交换树脂 (如 Amberlite CG50) 吸附发酵液中的酶, 洗涤除去杂质和菌体细胞, 提高洗脱液的 pH 及离子强度使酶解吸, 再以有机溶剂沉淀得粗品。Moriyama, Ozaki 及 Rassulin 应用类似方法分别从 *P. aeruginosa*、*F. immotum* 以及 *A. rimosus* 的发酵

表1 微生物弹性蛋白酶

产酶菌株	发现者	酶学性质			文献
		分子量	等电点 pI	最适作用 pH	
<i>Flavobacterium elastiolyticum</i>	I.Mandl B.Cohen			7.4	[5]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	K.Morihara	39500	5.9	8.0	[7]
<i>Flavobacterium immotum</i> 9-35	I.Shio H.Ozaki	23000	8.9	7.2	[6]
<i>Vibrio vulnificus</i>	K.Mahendra	56000	5.8	7.8	[8]
<i>Bacillus</i> sp. Ya-B	Y. Ch. Tsai	23700	10.6	11.7	[10]
<i>Bacillus subtilis</i>	K.Mohinder	25000		9.0	[11]
<i>Actinomyces rimosus</i>	Rassulin Yu.	30000		8.8	[15]
<i>Actinomyces fradiae</i>	Lagutina L.	17800	>10	9.2	[16]
<i>Aspergillus versicolor</i>	Parkarskyte	32000		9.0	[14]
<i>Flavobacterium</i> sp. 17-87	熊子颖 关国雄	21300	>8.3	7.4	
猪胰弹性蛋白酶	J.Balo I.Banga	25900	9.5	8.8	

液中直接抽提出弹性蛋白酶,工艺简便,一步就去除了近95%的杂蛋白(包括菌体细胞),大大有利于酶的进一步提纯。

2. 弹性蛋白酶的精制: 提纯弹性蛋白酶的方法很多,应用常规的生化分离技术如离子交换纤维素层析、分子筛凝胶过滤等都能达到目的。近年来也发展了亲和层析的方法,把酶的合成底物多聚丙氨酸偶联到琼脂糖凝胶上装柱或以其天然底物——弹性硬蛋白(elastin)作为亲和吸附剂来提纯精制胰弹性蛋白酶^[22,23]。

笔者采用下面方法都能成功地从黄杆菌发酵液中分离得聚丙烯酰胺凝胶电泳均一的弹性蛋白酶纯品,进而制备得酶的结晶。

纯化方法1: 黄杆菌发酵液离心弃菌体→硫酸铵分级盐析→沉淀对0.05mol/L, pH8.5 缓冲液透析→DEAE-纤维素柱层析→0.2mol/L, pH7.5 缓冲液洗脱→含酶组分 sephadex G75 柱层析→收集得电泳均一酶制品(比活提高46倍,收率12%)。

纯化方法2: 黄杆菌发酵液离心弃菌体→硫酸铵分级盐析→沉淀对0.05mol/L, pH4.5 缓冲液透析→弹性蛋白-纤维素(1:10)亲和柱层析→1.0mol/L, pH4.5 缓冲液洗脱收集得电泳均一酶制品(比活提高46倍,收率51%)。

应用天然底物亲和层析除必须于低温(0—

4℃)操作外,由于亲和配体——弹性蛋白不溶于水的性质,因此不需要把它偶联到惰性载体纤维素上。亲和层析柱制备简易,方法简便易行,柱体吸附效率高,特异性强,仅一步柱层析即可获得电泳均一的酶制品,达到用一般方法分离的效果而纯酶收得率却高的多。

(六) 微生物弹性蛋白酶的应用

弹性蛋白酶用途很广,目前,该酶主要由脏器提取,产量小,价格高,限制了酶的利用。如能实现微生物工业化生产该酶,将为开拓该酶的应用提供廉价、充足的酶源。

1. 医药应用: 弹性蛋白酶主要作为治疗药物。在医疗上主要用于:(1) 治疗高血脂症;(2) 防治动脉粥样硬化;(3) 抑制脂肪肝发展;(4) 治疗慢性气管炎及其它结缔组织纤维增生性疾病;(5) 外用于消除皮肤焦痂、碎屑、用于烧伤患者的治疗以及皮肤溃疡、口腔溃疡等症^[24]。由于胰弹性蛋白酶和菌源弹性蛋白酶性质有所差别,虽然国外有报道菌源酶可替代胰酶用作药品,但具体涉及到某一属菌株所产的酶,必须在药理、毒理及药效方面与胰源酶作充分的比较以确保疗效及安全性。

2. 食品工业的应用: 弹性蛋白酶水解专一性很广,许多动、植物蛋白都能为之降解,特别是一些难以处理、食用的如韧带、大动脉血管、筋腱等蛋白废料,因而在农副产品深加工、高蛋

白食品的制作、罐头加工业等方面将会得到广泛应用。

同时弹性蛋白酶专一降解结缔组织中坚韧的弹性纤维组分,因而可作为理想的肉类嫩化剂用于食品加工和日常生活。现用作嫩肉剂的蛋白水解酶是来自番木瓜 (*Carica papaya*) 的木瓜蛋白酶。笔者比较了它和黄杆菌弹性蛋白酶对不同蛋白质的水解和作用方式后发现:(1)木瓜蛋白酶对弹性蛋白无水解能力;(2)在弹性蛋白和其它食用蛋白共存时,弹性蛋白酶优先水解弹性蛋白;(3)对食用蛋白质的水解能力,弹性蛋白酶比木瓜酶强一倍。由此,我们可以认为:弹性蛋白酶可通过选择水解肉类中坚韧的弹性纤维部分来真正起到使肉类嫩化又不会改变口感和风味,而不是单纯对食用蛋白加以非选择性部分消化。用作嫩肉剂,弹性蛋白酶将比木瓜酶具有更大的优越性和可接受性。采用具相同干酪素水解活力的电泳均一黄杆菌弹性蛋白酶和木瓜蛋白酶,在相同条件下对肉类蛋白进行消化试验,结果见表 2。

表 2 酶对肉食蛋白的消化能力比较

蛋白 \ 酶	消化率 (%)	黄杆菌弹性蛋白酶	木瓜蛋白酶
弹性蛋白 (Sigma)		85.0	0
猪肉		44.2	25.6
牛肉		22.9	12.9
牛胃肌		57.6	22.7

3. 日用化学工业的应用:弹性蛋白酶在日用化工方面的应用,主要用于保健疗效化妆品的生产。国外近年已有把弹性蛋白酶添加入化妆品的报道,认为能起增进、改善皮肤的血液循环的作用,并能改善皮肤脂质代谢,增强皮肤、毛发的弹性、柔性、延缓皮肤老化,减少皱纹及色素沉着,还能促进头发生长,防止脱发^[25]。实验研究表明,对呈老化现象的皮肤施以含弹性蛋白酶的化妆品,对皮肤细胞能起明显的赋活作用,皮肤角化程度减少,润湿程度增加^[26]。特别能满足中、老年人护肤护发的需要。同时,应用弹性蛋白酶生产化妆品用的可溶性低分子量

弹性蛋白水解物也很有意义。可溶低分子量弹性蛋白水解物与皮肤天然成份相似,营养成分高,施用含弹性蛋白水解物的化妆品对消除皮肤皱纹,抑制皮肤老化,促进皮肤弹性纤维的新生,保持皮肤弹性效果显著^[27]。目前,该水解物的生产是采用酸解或非特异蛋白酶长时期作用^[28],工艺落后,易发生微生物污染,产物质量不稳定。如能应用廉价的微生物弹性蛋白酶作用,将大大缩短作用时间,简化工艺,降低成本,同时可变废为宝,将难以处理的动物颈、背韧带等废料制成高级化妆品用蛋白水解物。

(七) 利用微生物生产弹性蛋白酶的前景

弹性蛋白酶经济价值高、应用广,目前国内仅从猪胰提取,由于资源利用受限制,作为治疗用生化药物长期供不应求,也局限了在其它方面的应用。不久前,胰弹性蛋白酶基因已被克隆并在 *E. Coli* LE392 中表达成功^[29],但筛选能分泌胞外弹性蛋白酶的高产菌种,应用现成发酵技术大规模工业化生产更有现实意义。尽管我们筛得的 *Flavobacterium* sp.17-67 每升发酵液的酶产量只相当于 0.6 千克鲜猪胰的酶含量(按吴梧桐报道,每千克猪胰含弹性蛋白酶 214000 单位^[30]),产量不算太高,但通过进一步的筛选或诱变育种,有可能选育出供工业生产应用的高产菌种,实现该酶的工业化生产。

参 考 文 献

1. 陈新谦、会有豫编:新编药理学,375 页,第十二版,人民卫生出版社,北京,1988。
2. Balo J and I Banga: *Biochem. J.*, 46: 386, 1950.
3. Balo J and I Banga: *Acta Physiol. Sci. Hung.*, 3:317, 1952.
4. Morihara K et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 120: 68-78, 1967.
5. Mandl I et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 91:47-53, 1960.
6. Ozaki H and I Shio: *J. Biochem.*, 77:171-80, 1975.
7. Morihara K et al.: *J. Biol. Chem.*, 240:3295, 1965.
8. Mahendra et al.: *Infect. Immun.*, 50:534-40, 1985.
9. Varadi DP: *Nature*, 218:468, 1968.
10. Tsai Y Ch: et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 583: 439, 1986.
11. Mohinder K et al.: *Can. J. Microbiol.*, 34:855, 1988.
12. 椎尾勇等:公开特许公报,昭57-107184。

(下转第 376 页)

(上接第 359 页)

13. 张天民编: 动物生化制药学, 139 页, 人民卫生出版社, 北京, 1981。
14. CA100:152364, *Liet. TSR Mokslu. Acad. Ser. C* 4:70, 1983.
15. CA77:46739, *Brit* 1274425, 1972.
16. CA92:53987, *Biochimya*, 44:1972, 1979.
17. CA103:3435, *Dokl. Konf. Mikrobiol. Liet. SSR* 7th., 62—5, 1983.
18. CA83:92954, *Bioorg. Khim.*, 1:554, 1975.
19. CA100:137311, *Doposited Doc., Viniti*, p.215, 1983.
20. 张树政编: 酶制剂工业, 447 页, 科学出版社, 北京, 1984。
21. 张天民编: 动物生化制药学, 141 页, 人民卫生出版社, 北京, 1981。
22. Balny C et al.: *J. Chromatogr.*, 168:133, 1979.
23. 吴梧桐等: 南京药学院学报, 1: 17—20, 1981。
24. 李明沅: 生化药物杂志, 1: 59, 1985。
25. 間藤方雄: 公开特许公报, 昭 61-1612。
26. 間藤方雄: 公开特许公报, 昭 61-91133。
27. Irwin I: US 4474763, 1984.
28. 杨曜中等: 医药工业, 18(5): 194, 1987。
29. 滝口洋: 公开特许公报, 昭 61-249387。
30. 陈春麟, 吴梧桐: 生化药物杂志, 4: 65—67, 1988。