

曲霉羧肽酶的分离纯化研究

陆兆新 冯红霞 吕凤霞 别小妹

(南京农业大学食品科技学院,南京 210095)

摘要 采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、酒精、 DE_{52} 和 Sephadex G1-00 对 *Aspergillus* sp CP-1 发酵液进行分离纯化,并检测在分离纯化过程中酶的回收率和比活力,最后用 SDS-PAGE 电泳检验酶的纯度。确定 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和浓度在 60%~90%之间,酒精浓度为 35%~70%之间用于粗酶液的提纯,电泳得到一个清晰的条带。它们的分子质量约为 15 942 u。

关键词 羧肽酶 纯化 电泳 曲霉

蛋白质水解成多肽,其可溶性、热稳定性和在酸性环境下的抗沉淀特性得到很大的改善,但其水解产物却产生了苦味,影响了蛋白质水解产物的应用。苦味随食品蛋白酶解增加而加重,导致蛋白质广泛水解后,苦味肽的形成。因此,对减少、阻止及祛除蛋白质水解物苦味研究已很广泛,且现在仍是令人瞩目的研究领域。

用于苦味肽脱苦的方法有多种,目前最具有应用前景的一种是:用羧肽酶作用于苦味肽,水解掉肽链羧基端的疏水性氨基酸,达到脱苦的目的。羧肽酶有小麦羧肽酶^[1]、动物羧肽酶和微生物羧肽酶^[2~5],动物来源的羧肽酶主要存在于猪、牛等的胰脏中,数量非常有限,价格昂贵,使其应用受到限制。因此微生物来源的羧肽酶具有非常广阔的应用前景。

笔者实验室从土壤微生物中筛选到一株能产生羧肽酶的菌株 CP-1,本文研究羧肽酶的分离纯化方法及酶学性质,为羧肽酶在苦味肽脱苦中的应用提供理论依据和技术参数。

1 材料和方法

1.1 菌种

笔者的实验室从全国各地土壤中筛选到一株能产羧肽酶的菌株,并初步鉴定为

Aspergillus sp CP-1。

1.2 羧肽酶的发酵

曲霉 CP-1 于含有 250 mL 1% 豆粕粉和 0.5% 麸皮的液体培养基的三角瓶中,在 30℃、180 r/min 条件下培养 84 h 后,过滤得到的上清液作为粗酶液。

1.3 酶的分离

1.3.1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀法纯化曲霉羧肽酶^[6,7]

取一定体积的发酵液,分别加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (武汉科建生物公司)粉末至 30%、50%、60%、85% 和 90% 饱和度,静置一段时间,10 000 r/min 离心 10 min,沉淀中分别加入一定体积的 HAc 缓冲液(pH = 4.0),使其溶解,取上清液测定酶活。

1.3.2 酒精沉淀

用 HAc 缓冲液(pH = 4.0)溶解 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀后,加入冷的无水乙醇,使其终体积分数分别达到 30%、40%、60% 和 70%,静置一段时间,10 000 r/min 离心 10 min,沉淀用 HAc 缓冲液(pH = 4.0),使其溶解,取上清液测定酶活。

1.4 酶的纯化

1.4.1 DE_{52} 阴离子交换树脂的处理^[8]

用蒸馏水充分溶胀离子交换树脂 DE_{52} , (Sigma 公司分装),并除去悬浮的细小颗粒后,先用 0.5 mol/L 的 HCl 浸泡 2 h 左右,蒸

馏水洗至中性,再用 0.5 mol/L 的 NaOH 浸泡 2 h 左右,蒸馏水洗至中性,即可装柱。

处理好的离子交换树脂 DE₅₂,装入层析柱使床面平整,胶体无结痕,无气泡,再用 2 个体积的 HAc 缓冲液(pH=6.0)洗柱,使柱子平衡。把用 35%~70% 饱和度的酒精处理得到的沉淀,用 HAc 缓冲液,pH=6.0 溶解,上样于离子交换柱。

本实验采用阶段洗脱法洗脱。配制 0.05 mol/L,pH 分别为 6.0、5.0、4.0 的 HAc 缓冲液,按照 pH 由高到低依次洗脱。自动收集仪设定 10 min/管收集。

1.4.2 SephadexG-100 纯化

经离子交换树脂 DE₅₂分离的粗酶,再用 SephadexG-100(Pharmacia fine chemical)纯化,洗脱液为 pH=5.0 的 HAc 缓冲液,按照 10 min/管收集。

1.5 电泳^[9]

试验采用 SDS-PAGE 连续电泳的方法,检验纯化后酶的纯度并测定酶的分子质量。SDS-PAGE 连续电泳中使用的胶的浓度为 10%。

1.6 羧肽酶酶活测定

以 Cbz-Gly-Tyr 为底物测定羧肽酶的酶活。用茚三酮显色法测定释放的氨基酸量。

1.7 酶学性质研究

以 Cbz-gly-tyr 为底物,pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 的酶反应体系,于 30℃ 反应 30 min 后进行酶活测定,确定酶活反应的最佳 pH 值。

羧肽酶在 pH 值分别为 3、4、5、6、7、8、9 的缓冲液中保温 30 min 后,以 Cbz-gly-tyr 为底物,进行酶活的测定,研究酶对 pH 值的稳定性。

以 Cbz-gly-tyr 为底物,在 HAc 缓冲溶液(pH=5)中,分别在 20、30、50、80℃ 的水浴条件下反应,测定酶活,确定酶的最适反应温度。

酶的醋酸缓冲溶液(pH=5),分别放置在温度为 30、50、80℃ 的条件下保温 30 min

后,以 Cbz-gly-tyr 为底物,测定酶活,研究温度对酶稳定性的影响。

在酶反应体系中加入 1 mmol 的 Ca²⁺、Ba²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、EDTA,研究各种金属离子和金属离子螯合剂对酶活的影响。

2 结果与分析

2.1 (NH₄)₂SO₄ 沉淀处理结果

本实验采用(NH₄)₂SO₄ 沉淀法纯化羧肽酶(见图 1)。

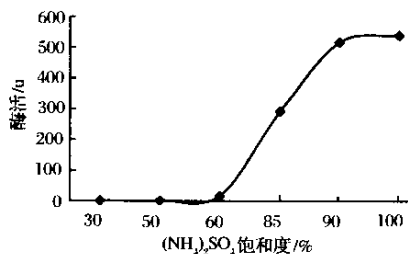


图 1 羧肽酶的(NH₄)₂SO₄ 沉淀曲线

从图 1 可知,60% 饱和度以下的(NH₄)₂SO₄ 沉淀酶活很小,所得沉淀基本上都是杂蛋白,60%~90% 饱和度的(NH₄)₂SO₄ 沉淀酶活最大,同时测得 90% 饱和度的(NH₄)₂SO₄ 沉淀除去后的上清液中酶活仅为 5 u,说明上清液中酶含量很少,因此采用 60%~90% 饱和度的(NH₄)₂SO₄ 对粗酶发酵液进行初步纯化。

2.2 酒精沉淀处理结果

(NH₄)₂SO₄ 沉淀用缓冲液溶解后,加入冷的无水乙醇至 30%、40%、60% 和 70% 浓度,离心得到的沉淀及上清液分别进行酶活测定,结果如 2 所示。

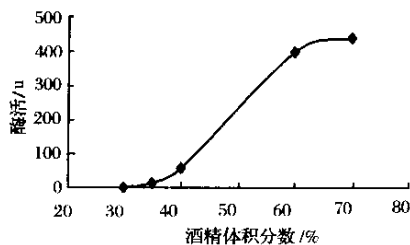


图 2 羧肽酶的酒精沉淀曲线

从图 2 可以看出,35% 浓度的酒精沉淀中酶活很少,大部分是杂蛋白,70% 浓度的酒精沉淀后的上清液中酶活也很少,即体积分数为 35%~70% 的酒精几乎能将全部酶都沉淀。因此,本实验采用浓度为 35%~70% 的酒精沉淀所需的酶。

2.3 DE₅₂洗脱图谱

分步收集未被吸附部分和 pH 分别为 6.0、5.0、4.0 的缓冲液洗脱下的部分。并用核酸蛋白检测仪检测不同 pH 值的洗脱液在 280 nm 处的吸光度,根据显示值绘制洗脱曲线,如图 3 所示。

从图 3 可以看出,大部分蛋白质都分布在未被吸附部分和 pH=6.0 的洗脱液中。

本实验中羧肽酶溶液上样的 pH 为 6, DE₅₂ 是阴离子交换树脂,由于大部分酶活在未被吸附部分和 pH=6.0 的洗脱液中,说明此时酶蛋白带有正电荷,不和离子交换树脂发生交换,而等电点 < 6 的酸性蛋白酶此时带负电,被吸附上去,从而使羧肽酶与酸性蛋白酶分离开来。

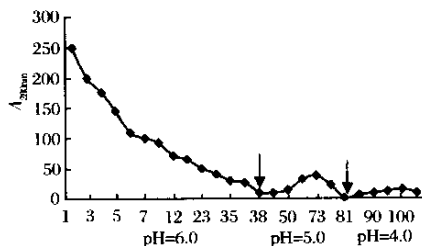


图 3 DE₅₂阶段洗脱图谱

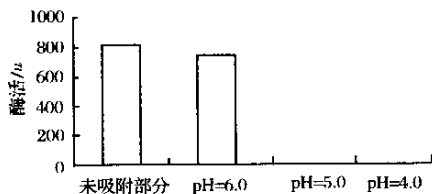


图 4 阶段洗脱各部分的酶活(570 nm)

对各部分收集液进行酶活测定(见图 4),发现酶活主要集中在未被吸附部分和 pH=6.0 的洗脱液中,其酶活分别为 815 u 和 742 u, pH=5.0、pH=4.0 的洗脱液洗脱下的

部分酶活很少,甚至测不到酶活,与阶段洗脱中蛋白质的吸收曲线一致,因此将未吸附和 pH=6.0 时洗脱下的 2 部分合并,再进一步通过 sephadex G-25 纯化。

2.4 Sephadex G-100 分离

从图 5 看,在第 12 管处出现一个大的蛋白峰,虽然只出现一个酶活峰,但是羧肽酶的酶活部分在第 4 管达到最大,羧肽酶样品被全部洗脱下来。

2.5 电泳

将 Sephadex G-100 分离得到的羧肽酶进行 SDS-PAGE 电泳实验,结果只得到一个清晰条带,与 Marker 的第 5 个条带的位置非常接近。根据电泳的分子质量标准曲线计算,该羧肽酶样品的分子质量为 15 942 u。

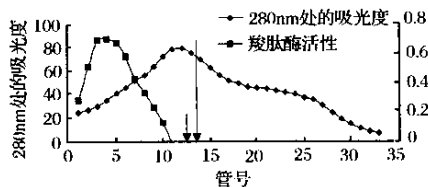


图 5 Sephadex G-100 洗脱液洗脱图谱

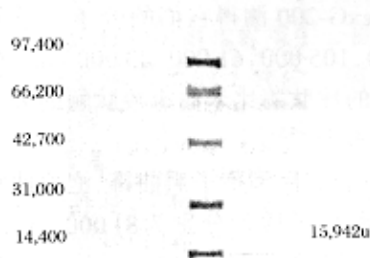


图 6 羧肽酶的电泳图谱

与文献中报道的米曲霉、黑曲霉、泡盛曲霉等产生的羧肽酶相比,所测羧肽酶的分子质量要小得多,因此它可能是一种新型的羧肽酶,因此有待于对该菌株及其产生的羧肽酶进行更深入的研究。

2.6 羧肽酶分离纯化的结果

从表 1 中可看出,在本实验中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 DE₅₂ 对羧肽酶的纯化效果最明显,纯化倍数分别为 2.5 倍和 4 倍,经过一

系列化纯化后,羧肽酶总的纯化倍数达到 4.4 倍,比活力为 613 u/mL。

表 1 羧肽酶的纯化结果表

	粗酸液(体积为 680 mL) (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀	酒精沉淀	DE ₅₂ 洗脱	G-100 洗脱
蛋白含量/mg	181	17.4	12.3	10.8
酶活单位/u	2.5 × 10 ⁴	6.1 × 10 ³	4.9 × 10 ³	2.7 × 10 ³
比活力/u·mg ⁻¹	138	348	389	553
回收率/%	100	24.4	19.6	11
纯化倍数(fold)		2.5	2.8	4

3 结 论

(1)酶的初步纯化中使用了(NH₄)₂SO₄和酒精 2 种方法,通过试验确定(NH₄)₂SO₄的浓度为 60%~90%之间,酒精体积分数为 35%~70%之间。泡盛曲霉羧肽酶的(NH₄)₂SO₄沉淀浓度也在 60%~90%之间被沉淀,酒精的浓度范围却比本实验的小一些,只有 44%~67%。

(2)该羧肽酶经过硫酸铵、酒精、DE₅₂和 Sephadex G-100 分离纯化后,进行电泳实验,得到一条清晰的电泳图谱,根据标准蛋白的分子质量标准曲线,计算得到它的分子质量为 15 942 u。

米曲霉产生的 4 种羧肽酶用 Sephadex G-200 测得它们的分子质量分别为 120 000、105 000、61 000、43 000 ku。本实验菌产生的羧肽酶比米曲霉羧肽酶的分子质量要小的多^[10~15]。

黑曲霉、巨型孢子黑曲霉、泡盛曲霉所产的羧肽酶分子质量分别为 81 000 ku、136 000 (SDS 电泳),72 000 ku (SDS 电泳),都比本实验中的羧肽酶分子质量大。因此本实验菌株产生的是一种分子质量较小的、新型的羧肽酶。

参 考 文 献

- Hironori U, Hiroatsu M, Eiji I. J Agric Food Chem, 1983 (31): 50~53
- Sang-Hyeon LEE, Etsuo M, Hayao T et al. J Biosci Biotech Biochem, 1992, 56(11): 1839~1844
- Charles A, Lesley F L. J Biosci Biotech Biochem, 1991, 220: 17~18
- Ichikawa K, Shiba Y, Jigani Y et al, J Biosci Biotech Biochem, 1993, 57(10): 1686~1690
- Alexander M B et al. Applied and Environmental Microbio, 1999, 65(8): 3298~3303
- 南京农业大学基础科学院生化组. 生物化学研究技术, 1995, 18~20
- 张龙庭, 张庭芳, 李 令. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, (第二版), 1997. 198~203
- Alexander M B Tony Kimberly M et al. B, 1999, 65(8): 3298~3303
- 郭尧君. 蛋白质电泳试验技术. 北京: 科学出版社, 1999, 134
- Tadanobu N, Seiichi N, Nobuyoshi I. Agric Biol Chem, 1972, 36(8): 1343~1352
- Fadanobu N, Seiichi N, Nobuyoshi I. Agric Biol Chem, 1972, 36(9): 1473~1480
- Tadanobu N, Seiichi N, Nobuyoshi I. Agric Biol Chem, 1972, 36(9): 1481~1488
- Fadanobu N, Seiichi N, Nobuyoshi I. Agric Biol Chem, 1973, 37(6): 1237~1251
- Michio T, Taro Eiji I. Current Microbiology, 1982 (7): 19~23
- Eiji I, Akiko Y, Tsuneo N et al. Applied Microbiology, 1973, 26(3): 327~331

Purification and Characterization of Carboxypeptidase from *Aspergillus* sp.

Lu Zhaoxin Feng Hongxia Lu Fengxia Bie Xiaomei

(College of Food Science & Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095)

ABSTRACT Carboxypeptidase was produced by fermentation of *Aspergillus* sp. CP-1. It was purified by (NH₄)₂SO₄ precipitation, ethanol precipitation, DE₅₂ and Sephadex G-100 columns. The purity of the preparation was analyzed by SDS-PAGE and one band was seen on the gel. The molecular weight of the enzyme was about 15 932 u.

Key words carboxypeptidase, purification, electrophoresis, *Aspergillus* sp.