

米曲氨基酰化酶的提取及其酶学性质的表征^{*}

钟琦 关怡新 姚善泾

(浙江大学化学工程与生物工程学系 杭州 310027)

摘要 通过硫酸铵分级沉淀、Sephadex G50 凝胶层析和 DEAE-Sephrose 阴离子交换层析,从米曲霉 3042 中提取得到了米曲氨基酰化酶,该酶的纯化倍数为 54.29,比活为 647.66U/mg,总收率为 49.53%。详细考察了温度、pH、缓冲体系的离子强度和金属离子对米曲氨基酰化酶酶活的影响。结果表明,该酶促反应的最适 pH 为 7.5~8.0,最适反应温度随催化反应时间的延长而降低,缓冲体系中的离子对酶活有抑制作用,而低浓度的 Co^{2+} 对酶活有激活作用。

关键词 米曲氨基酰化酶 纯化 酶学性质

在单一构型氨基酸的生产中,以往手性拆分的目的只是为了得到 *L* 构型的异构体,而将 *D* 构型异构体经外消旋后重新进入拆分步骤。由于一次拆分的理论收率不超过 50%,因而限制了该方法的大规模应用。最近的研究表明,很多氨基酸 2 种构型异构体都有价值,例如 *D*-色氨酸^[1,2]、*D*-丙氨酸^[3]和 *D*-苯丙氨酸^[4]等非天然构型 *D*-氨基酸在医药、食品以及饲料等行业中都具有较好的潜在价值。因为 *D*-氨基酸无法通过发酵法获得,因而手性拆分就显示出它高效、产品分离纯化简便的优点。其中条件温和、效率高、绿色环保的氨基酰化酶法拆分则是同时获取 2 种构型氨基酸的最佳方法之一。

氨基酰化酶[EC 3.5.1.14]是一类能专一水解 *N*-酰基-*L*-氨基酸的酰胺键的酶。由于这种立体专一性,它很早就被用来拆分 *DL*-氨基酸。氨基酰化酶的来源很广,存在于各种动物和植物器官、微生物体内及其发酵液中。微生物中的氨基酰化酶是工业应用最直接和最便利的来源。迄今为止,已经在米曲霉菌^[5](*Aspergillus oryzae*)、葡萄酒色青霉菌^[6](*Penicillium vinaceum*)、产碱杆菌^[7](*Alcaligenes* sp.)、芽孢杆菌^[8,9](*Bacillus* sp.)、阿拉伯乳酸杆菌^[10](*Lactobacillus arabinosus*)、分枝杆菌^[11](*Mycobacterium* sp.)、嗜麦芽假单胞菌^[12](*Pseudomonas mal-*

trophila)等微生物中提取得到,其中以米曲霉固态发酵产生的胞外酶最易获得,也最适合工业应用。文中拟在米曲霉固态发酵的基础上对其进行纯化,并对该酶的酶学性质进行表征,为将其用于手性氨基酸的拆分打下基础。

1 材料及方法

1.1 仪器和试剂

AKTA Explorer 100 纯化系统、Biochrom Ultrospec 3300 紫外/可见光分光光度计,购自瑞典 Amersham Biosciences;UNIVERSAL 32R 高速冷冻离心机,Hitachi 公司产品;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器,河南巩义市英峪予华仪器厂。蛋氨酸(*L*-Methionine),纯度>99.5%,上海生工分装;N-Acetyl-DL-methionine,纯度 99%,Lancaster Synthesis,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 菌种

米曲霉 3042(*Aspergillus oryzae* 3042)由浙江省微生物研究所提供,经本实验室筛选后使用。4℃下保藏,每 3 个月转接 1 次。

1.3 培养基

斜面培养基(g/L):葡萄糖 40.0,胰蛋白胨 20.0,酵母抽提物 3.0, MgSO_4 1.0, K_2HPO_4 2.0,琼脂 15.0,12 MPa(表压)灭菌 20 min。

固态培养基(麸曲培养基):*m*(大豆粉):*m*

第一作者:硕士研究生(姚善泾教授为本文通讯作者)。

^{*} 国家自然科学基金资助项目(No.20276065)

收稿时间 2003-09-25

(麸皮): $m(\text{自来水}) = 55:45:85$; 0.12 MPa (表压)灭菌 40 min。

1.4 分析方法

1.4.1 酶活的测定

在 1.5 mL 离心管中加入 0.9 mL 0.1 mol/L PBS($\text{pH} 7.5$)和 0.5 mL 0.1 mol/L N-Ac-DL-Met(含 $\text{CoCl}_2 \cdot 1.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$),于 37°C 恒温水浴中预热 10 min。加入 0.1 mL 经过稀释的酶液,迅速混匀, 37°C 水浴保温。30 min 后,取出 150 μL 加到预先已有 50 μL 20% 三氯乙酸的 0.5 mL 离心管中,混匀,灭酶活。经适当稀释,取出 1 mL 溶液,用茚三酮显色法测 570 nm 处吸光值,由标准曲线求得反应液中蛋氨酸含量。为了消除所用试剂和酶液中本身所带有的氨基酸对测定的干扰,将加有 PBS 和酶液的离心管先煮沸 15 min,然后加入底物 N-Ac-DL-Met,其余操作同上,以此作为酶活测定的对照。酶活力单位(U)定义为:在 $\text{pH} 7.5$ 和 37°C 条件下,1 h 内酶催化底物水解释放出 1 μmol L-Met 为 1U。

1.4.2 氨基酸和蛋白质含量的测定

氨基酸含量用茚三酮显色法^[13]测定;蛋白质含量用考马斯亮蓝法^[14]测定。

1.5 实验部分

1.5.1 米曲霉的活化

30°C 斜面培养 3 d。

1.5.2 米曲霉的固态培养

用无菌水洗下经活化后的斜面孢子,制成孢子悬液,取 5 mL 接入装有 60 g 麸曲培养基的 1000 mL 三角瓶中, 28°C ,200 r/min 摇床培养数天。

1.5.3 氨基酰化酶的提取

将米曲霉固体培养得到的培养物转移到烧杯中,加入 250 mL 预冷的去离子水,冰浴下搅拌 2 h,纱布过滤,滤饼再用 50 mL 去离子水抽提 1 次,过滤,合并 2 次滤液,在 4°C ,10000 r/min 下离心 30 min 得到种曲抽提液。将调至一定 pH 值的抽提液用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 进行盐析,收集一定饱和度的组分,用去离子水复溶后透析或过凝胶柱脱盐。离心除去变性蛋白,上清即为粗酶液。用 DEAE-Sepharose 进一步分离纯化。

2 结果与讨论

2.1 氨基酰化酶的提取和纯化

2.1.1 固态发酵时间对氨基酰化酶生产的影响

首先考察了发酵时间对氨基酰化酶生产的影响,分别测定发酵时间为 24、48、72、96 和 120 h 时种曲抽提液中的酶活,其相对值(以最高值为 100)如图 1 所示。结果表明培养 48~72 h 时生产的氨基酰化酶最多,因此将培养时间确定为 60 h。

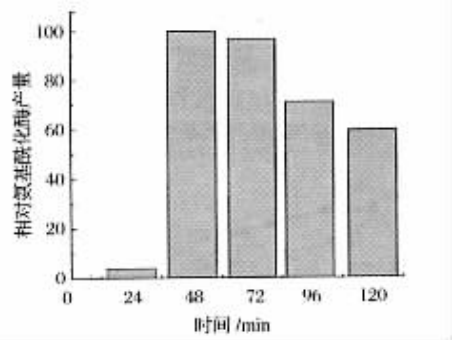


图 1 固态发酵时间对氨基酰化酶产量的影响

2.1.2 种曲抽提液的 pH 值对氨基酰化酶收率的影响

pH 是影响酶稳定性的重要参数之一,米曲氨基酰化酶在 $\text{pH} < 5$ 时很不稳定,极易失活,但调低 pH 可以使部分杂蛋白在盐析之前就被变性沉淀除去,因此抽提液的 pH 会影响氨基酰化酶的提纯效果。调节盐析前上清的 pH 分别为 5.0、6.0、自然 pH(约 7.0)和 8.0,对最终的酶活回收率、蛋白含量和比酶活进行比较。其相对大小(以最高值为 100)如图 2 所示。结果表明,当保持抽提液的自然 pH 时,酶活回收率和比酶活均为最高。

2.1.3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析饱和度的确定

分别取不同的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度对抽提上清液进行盐析,测定上清中的酶活,得到 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析饱和度和上清液中酶活保留率的关系,如图 3 所示。从图 3 可以看出, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度为 30% 时,有 90% 以上的酶活保留在上清液中;而当饱和度为 70% 时,上

清液中的酶活仅为 10%。据此我们收集饱和度和为 30% ~ 70% 之间的组分,在 30% 的饱和条件下,先沉淀除去大量杂蛋白,然后在 70% 的饱和条件下收集大部分的目标蛋白即氨基酰化酶。

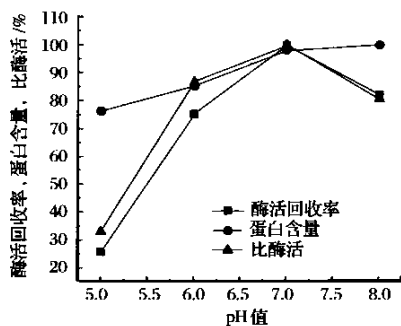


图2 种曲抽提液的 pH 对氨基酰化酶收率的影响

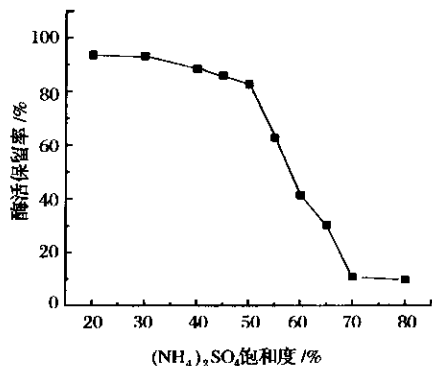


图3 不同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度对氨基酰化酶沉淀的影响

2.1.4 层析条件的确定

将硫酸铵盐析沉淀后的样品经透析脱盐后,采用阴离子交换层析 DEAE-Sepharose 进一步纯化,通过对不同 pH 缓冲液和洗脱方式的比较,最后确定的分离条件是以 0.02 mol/L 的 Tris-HCl (pH 6.8) 为缓冲体系,用含 1 mol/L 的 NaCl 的相同缓冲体系进行阶跃梯度洗脱,结果如图 4 所示,氨基酰化酶的酶活集中在洗脱的第 2 个峰中。同时将硫酸铵盐析沉淀后未经透析的样品直接过凝胶柱 Sephadex G50,纯化结果如图 5 所示。从图 5 可以看出,G50 可以将氨基酰化酶和大部分杂蛋白分开,更重要的是氨基酰化酶先于 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 洗脱,对氨基酰化酶而言该步骤既达到了脱盐的目的又起到了初

步纯化的作用。

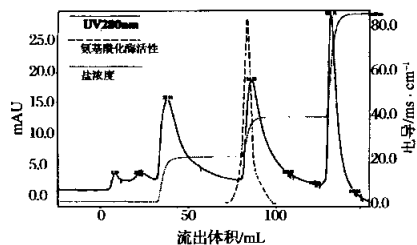


图4 DEAE-Sepharose 阴离子交换层析

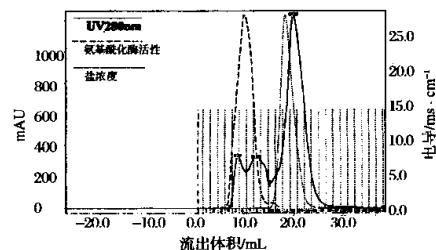


图5 Sephadex G50 凝胶层析

2.1.5 氨基酰化酶的纯化结果

氨基酰化酶提取过程的酶活回收率和纯化倍数如表 1 所示。通过比较透析脱盐和凝胶柱脱盐这两种方式,不难看出,经 70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析之后的透析步骤是酶活损失最多的一步,因此使用凝胶层析进行脱盐可以提高酶活的回收率,但纯化倍数略低。

2.2 米曲氨基酰化酶酶学性质的研究

2.2.1 酶的热稳定性

考查了米曲氨基酰化酶在不同温度下酶活的稳定性。将密闭于试管中的酶液分别置于 4℃、37℃、50℃、60℃、70℃ 和 80℃ 的水浴中保温一定时间后,测定其酶活。图 6 为保温时间和酶活的关系图(将初始酶活定为 100)。从图 6 可以看出,米曲氨基酰化酶在高温时极易失活,60℃ 时 90 min,70℃ 时 20 min,80℃ 时仅 10 min 就已完全失活,而在 50℃ 时则不同,虽然酶活有所下降,但在 34 h 时仍保留有 30% 的酶活,这一点在工业应用中是值得关注的;在 4℃ 和 37℃ 时,氨基酰化酶都表现出较好的稳定性,表明该酶在一般的温度条件下的热稳定性

较好。

表 1 氨基酰化酶的纯化

提纯步骤		总酶活	总蛋白含量	比酶活	回收率	纯化倍数
		/U	/mg	/U·mg ⁻¹	/%	
1	种曲抽提	6 471.90	542.57	11.93	100	1
2	30% 的 (NH ₄) ₂ SO ₄ 盐析	6 025.34	183.08	32.91	93.10	2.76
3	70% 硫酸铵盐析、透析	3 807.33	34.41	110.63	58.83	9.27
	DEAE-Sepharose 层析	3 205.92	4.95	647.66	49.53	54.29
	B 70% 硫酸铵盐析、凝胶层析	4 340.70	16.57	261.96	67.07	21.96

反应进行至 120 min ,70℃ 始终是表观最适反应温度 ;之后直到 240 min ,表观最适反应温度为 50℃ 而反应进行到 240 min 以后 ,37℃ 时的产物量最大。结合 2.2.1 节酶的热稳定性质可以看出 ,该酶在反应过程中的热稳定性(即操作稳定性)要优于未反应时的热稳定性。在氨基酰化酶的实际应用中可以结合反应时间等情况 ,选取合适的反应温度 ,以达到最佳的催化效率。

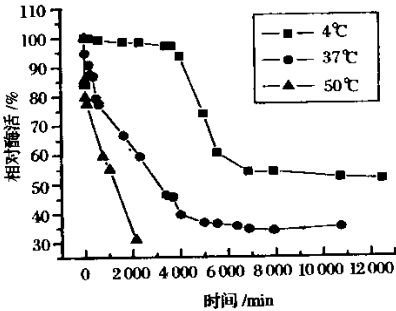


图 6(a) 酶的热失活曲线(4℃、37℃和 50℃)

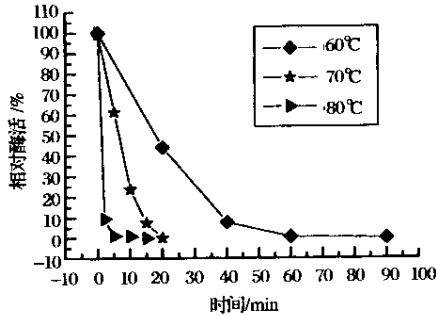


图 6(b) 酶的热失活曲线(60℃、70℃和 80℃)

2.2.2 温度对酶活力的影响

考查了米曲氨基酰化酶在不同温度下的相对酶活 ,图 7 为反应温度和酶活的关系图(将最大的酶活定为 100)。从图 7 中可以看出 ,70℃ 时酶活达到最大值。但这只表明氨基酰化酶在反应进行 30 min 时的表观最适温度为 70℃。当反应温度升高时 ,反应速度和酶蛋白变性导致酶失活的速度同时加快 ,表观最适温度不仅取决于反应速度 ,还和酶活在该温度下随时间变化的性质相关 ,因此表观最适温度和测定的反应时间有关。一般而言 ,测定反应的时间越长 ,表观最适温度越低。氨基酰化酶在各温度下的反应进程如图 8 所示。从图 8 可以看到 ,

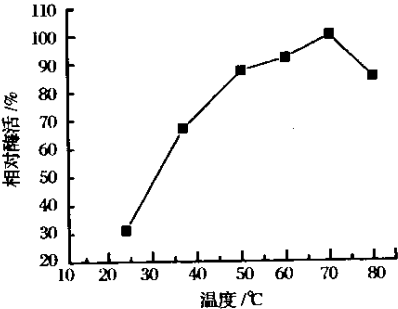


图 7 温度对酶活的影响(反应 30 min)

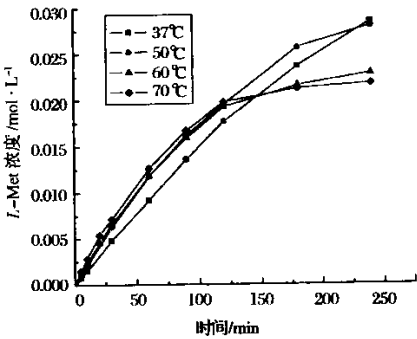


图 8 不同温度下的酶促反应进程

2.2.3 pH 对酶活力的影响

考查了米曲氨基酰化酶在不同 pH 环境下水解 N-Ac- DL -Met 产生 L -Met 能力的大小。

图 9 为反应 pH 和酶活的关系图(将最大的酶活定为 100)。从图 9 可以看出,米曲氨基酰化酶在 pH5.0 以下基本失活,而在偏碱性的 pH7.5~8.0 酶活最高。

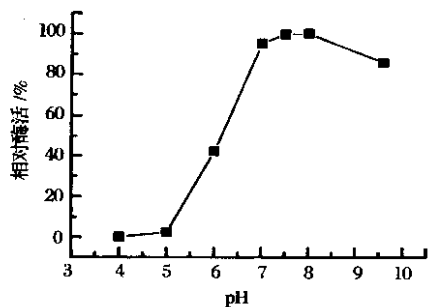


图 9 pH 对酶活的影响(反应 30 min)

2.2.4 缓冲体系离子强度对酶活力的影响

在氨基酸的拆分过程中,随着反应的进行,水解产生的乙酸会使反应液的 pH 下降,这将导致氨基酰化酶酶活的下降,维持 pH 最易行的方法是使用缓冲体系。而缓冲体系的离子强度大小一方面决定了缓冲能力的强弱,另一方面也会影响到酶活和后续分离的难易程度。在不同离子强度的缓冲体系中测定了氨基酰化酶的酶活,结果如图 10 所示。

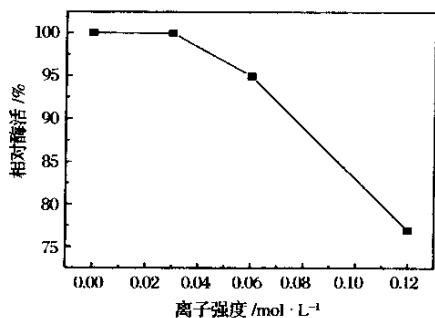


图 10 离子强度对酶活的影响(反应 30 min)

从图 10 可以看出,反应进行 30 min,离子强度超过 0.03 mol/L 之后,酶活随着缓冲体系离子强度的增大而降低。反应初期由于乙酸的产生量较小,对反应体系的 pH 影响较小,因此缓冲体系维持 pH 的作用没有充分显现,此时得到的结果说明缓冲体系的存在有抑制酶活的作用。因此在实际的工业应用中,采取 pH 定时监测和调整的方法来控制反应体系的 pH 要

优于使用缓冲溶液的控制方法,这样即有利于酶活的充分发挥又有利于后续的分选过程。

2.2.5 金属离子对酶活力的影响

氨基酰化酶是由 2 个亚基组成的二聚体金属酶,米曲氨基酰化酶每个酶分子中含有 2 个 Co^{2+} ,有 2 个金属离子松散结合位点与二价金属离子结合^[15]。因此有必要考察不同金属离子在不同浓度下对酶活的影响。分别测定了反应体系中 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 在浓度为 $5 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 、 $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 和 $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 时米曲氨基酰化酶的酶活,结果如表 2(以不加金属离子的体系中的酶活为 100)所示。

表 2 金属离子对酶活的影响

离子 ¹⁾	离子浓度/mol · L ⁻¹		
	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}
Co^{2+}	61.95	94.36	116.77
Ca^{2+}	72.27	89.87	96.24
Mn^{2+}	2.36	53.40	92.36
Mg^{2+}	82.71	96.98	100

1) Co^{2+} 、 Ca^{2+} 为金属氯化物, Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 为金属硫酸盐。

从表 2 可以看出,高浓度金属离子的存在对酶活都会有不同程度的抑制作用,随着离子浓度的降低,抑制作用也随之减弱。在考查的 4 种金属离子中,低浓度的 Co^{2+} 对酶活有激活作用, Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 的存在对酶活的影响很小,而高浓度的 Mn^{2+} 对酶活的影响较大。在实际应用中可以加入低浓度的 Co^{2+} 以提高酶活,同时应该严格控制原料中对酶活影响较大的金属离子的浓度,以减少其对酶活产生的负面影响。

3 结 语

米曲霉 3042 固态发酵 60 h 后,产生的胞外酶通过 30%~70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、Sephadex G50 凝胶层析、DEAE-Sephadex 阴离子交换层析,得到比活为 647.66 U/mg 的氨基酰化酶。该过程的纯化倍数为 54.29,回收率为 49.53%。该酶的反应最适 pH 为 7.5~8.0,最适反应温度随着作用时间的延长而降低。缓冲体系中的离子对酶活有抑制作用,低浓度的 Co^{2+} 对酶活有激活作用,而 Ca^{2+} 对酶活的影响不大,因此在进一步的酶的固定化研究中可以

考虑用海藻酸钙类的微胶囊对酶进行包埋。

参 考 文 献

- 1 王大慧, 韦 萍, 欧阳平凯. *D*-色氨酸研究进展[J]. 化工进展, 2002, 21(2): 103 ~ 105, 115
- 2 柴多里. *D*-色氨酸[J]. 精细与专用化学品, 2003, 11(5): 24
- 3 王 颖, 李云政. *D*-丙氨酸的用途及制备方法[J]. 辽宁化工, 2003, 32(2): 58 ~ 60
- 4 齐 欣, 赵温涛, 聂建明等. *D*-丙氨酸合成新方法[J]. 化学工业与工程, 2002, 19(5): 394 ~ 397
- 5 Chibata I, Ishikawa T, Yamada S. *L*-amino acid production by aminoacylase from *Aspergillus* [J]. Bull Agr Chem Soc Japan, 1957, 21: 300 ~ 303
- 6 Tosa T, Mori T, Fuse N et al. Studies on continuous enzyme reactions I Screening of carriers for preparation of water-in-soluble aminoacylase[J]. Enzymologia, 1966, 31: 214 ~ 224
- 7 Yang Y B, Hu H L, Chang M C et al. Purification and characterization of *L*-aminoacylase from *Alcaligenes Denitrificans* DA181 [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1994, 58: 204 ~ 205
- 8 Cho H Y, Tanizawa K, Tanaka H et al. Thermostable aminoacylase from *Bacillus thermoglucosidius*; purification and characterization[J]. Agric Biol Chem, 1987, 51: 2793 ~ 2800

- 9 Sakanyan V, Desmarez L, Legrain C et al. Gene cloning, sequence analysis, purification, and characterization of a thermostable aminoacylase from *Bacillus stearothermophilus*[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 3878 ~ 3888
- 10 Park R W, Fox S W. An acylase system related to the utilization of benzoylamino acids by *Lactobacillus Arabinosus*[J]. J Biol Chem, 1960, 235: 3193 ~ 3197
- 11 Matsumoto J, Nagai S. Amidohydrolases for N-short and long chain fatty acyl-*L*-amino acids from *Mycobacteria* [J]. J Biochem, 1972, 72: 269 ~ 279
- 12 Wakayama M, Shiiba E, Sakai K et al. Purification and characterization of *L*-aminoacylase from *Pseudomonas maltophilia* B1 [J]. J Ferment Bioeng, 1998, 85: 278 ~ 282
- 13 张龙翔等编著. 生化实验方法和技术(第二版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 1997. 163 ~ 165
- 14 李建武等编著. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994. 174 ~ 176
- 15 Gentzen I, Lffler H G, Schneider F. Aminoacylase from *Aspergillus oryzae*. Comparison with the pig kidney enzyme[J]. Z Naturforsch C, 1980, 35: 544 ~ 550

Purification and Characterization of Aminoacylase from *Aspergillus oryzae* 3042

Zhong Qi Guan Yixin Yao Shanjing

(Department of Chemical and Biochemical Engineering , Zhejiang University , Hangzhou , 310027)

ABSTRACT The aminoacylase from *Aspergillus oryzae* 3042 was partially purified by ammonium sulfate fractionation, Sephadex G50 and DEAE-Sepharose column chromatography. The specific activity of aminoacylase was 647.66 U/mg. The purification ratio and recovery was 54.29 and 49.53% respectively. The optimal pH of the aminoacylase was 7.5 ~ 8.0, and with the increase of catalysis time, the optimal reaction temperature decreased correspondingly. The ions in the buffer lowered the activity of aminoacylase, but the Co^{2+} in low concentration activated the aminoacylase.

Key words aminoacylase, isolation, characterization