[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]
C12N 9/48
C12N 9/52 C12N 1/20
C12P 21/04

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96193145.0

[43]公开日 1998 年 5 月 6 日

[11] 公开号 CN 1181108A

[22]申请日 96.2.16

[30]优先权

[32]95.2.17 [33]JP[31]29904/95

[86]国际申请 PCT/US96/02115 96.2.16

[87]国际公布 WO96/25489 英 96.8.22

[85]进入国家阶段日期 97.10.8

[71]申请人 普罗格特-甘布尔公司

地址 美国俄亥俄州

[72]发明人 民谷荣一

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 周慧敏

权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图页数 11 页

[54]发明名称 嗜冷蛋白酶和嗜冷细菌

[57]摘要

本文公开了新的嗜冷蛋白酶和具有嗜冷蛋白酶产生能力的微生物。作用于并分解酪蛋白和二甲基酪蛋白但不作用于核糖核酸酶的所述蛋白酶具有约40℃的最佳温度。在 pH7 贮存 1 小时的条件下，在温度高达 30℃时其几乎不失活，但是在 40℃时活性丧失约 40%。在 50℃时，该蛋白酶迅速失活以致活性在约 15 分钟内完全丧失。本文也公开了具有该蛋白酶产生能力的比目鱼黄杆菌。

权　利　要　求　书

1. 一种嗜冷蛋白酶，该蛋白酶具有下列理化性质:

-特异性活性和底物特异性: 其作用于酪蛋白和二甲基酪蛋白并分解它们但不作用于核糖核酸酶;

-最佳温度: 其具有在约 40 ℃的最佳作用温度; 和

-温度稳定性: 在 pH 7 贮存 1 小时的条件下，在温度最高达到 30 ℃时其几乎不失活，但是在 40 ℃时活性丧失约 40%。在 50 ℃时，其迅速失活以致活性在约 15 分钟内完全丧失。

2. 如权利要求 1 所要求的嗜冷蛋白酶，该蛋白酶还具有下列理化性质:

-最佳 pH: 其在 pH7.5 时具有最佳作用; 和

-稳定的 pH 范围: 在 20 ℃贮存 1 小时的条件下，其在 pH 6.0-10.0 的范围内稳定。

3. 如权利要求 1 所要求的嗜冷蛋白酶，其中所说的蛋白酶在用 SDS-PAGE 和凝胶过滤法测定时具有约 38 kDa 的分子量。

4. 如权利要求 1 所要求的嗜冷蛋白酶，其中所说的蛋白酶在用等电点聚焦测定时具有约 4.5 的等电点。

5. 一种属于比目鱼黄杆菌(Flavobacterium balustinum)的分离的微生物，该微生物能够产生如权利要求 1 至 4 之任一所要求的蛋白酶。

6. 如权利要求 5 所要求的属于比目鱼黄杆菌的分离的微生物，其中所说的微生物优选地在 10 至 20 ℃的范围内生长。

7. 如权利要求 5 所要求的属于比目鱼黄杆菌的分离的微生物，该微生物是比目鱼黄杆菌 P104 (FERM BP-5006)。

8. 一种制备嗜冷蛋白酶的方法，该方法包括以下步骤:

培养如权利要求 5 所要求的比目鱼黄杆菌，和

从培养物中收集如权利要求 1 所要求的嗜冷蛋白酶。

9. 一种制备嗜冷蛋白酶的方法，该方法包括以下步骤:

培养如权利要求 6 所要求的比目鱼黄杆菌，和

从培养物中收集如权利要求 1 所要求的嗜冷蛋白酶。

10. 一种制备嗜冷蛋白酶的方法，该方法包括以下步骤:

培养如权利要求 7 所要求的比目鱼黄杆菌，和

从培养物中收集如权利要求 1 所要求的嗜冷蛋白酶。

说　明　书

嗜冷蛋白酶和嗜冷细菌

发明背景

发明所属技术领域

本发明涉及在低温度范围内具有高活性的蛋白酶，其用途以及产生该蛋白酶的嗜冷细菌。

背景技术

人们了解嗜冷细菌已有一段长的时间，这些细菌的存在可以在低温环境中得到广泛的证实。可以从许多低温环境(如土壤、渔业产品、奶制品以及人工低温度环境)分离到嗜冷细菌。已从食品微生物的需要出发对嗜冷细菌进行了研究，但主要局限于有关微生物的种系发生研究。

同时，人们期待从嗜冷细菌获得的酶是在低温范围中具有具有最佳温度的嗜冷酶。在低温下有效发挥作用的嗜冷酶被认为能够掺入到例如即使在低温水中也可以使用的去垢剂中。也被认为可以用于存在室温下易挥发的有机溶剂的化学反应中，和用于在食品不腐败的温度下改善食品的质量。此外，对来源于嗜冷细菌的酶的研究对揭示嗜冷细菌的生理功能和对低温的适应机制相当有意义。

发明概述

现在我们已发现产生新的嗜冷蛋白酶的新的细菌菌株。

因此，本发明的目的是提供一种新的嗜冷蛋白酶。

本发明的另一个目的是提供产生嗜冷蛋白酶的新的微生物。

本发明的还一个目的是提供用所述的新微生物制备嗜冷蛋白酶的方法。

按照本发明的嗜冷蛋白酶具有下列理化性质。

-特异性活性和底物特异性：其作用于酪蛋白和二甲基酪蛋白并分解它们但不作用于核糖核酸酶；

-最佳温度：其具有在约 40 ℃的最佳作用温度；和

-温度稳定性：在 pH 7 贮存 1 小时的条件下，在温度高达 30 ℃时其几乎不失活，但是在 40 ℃时活性丧失约 40%。在 50 ℃时，其迅速失活以致活性在约 15 分钟内完全丧失。

此外，按照本发明优选的实施方案，本发明的嗜冷蛋白酶也具有下列理化性质:

-最佳 pH：其在 pH7.5 时具有最佳作用；和

-稳定的 pH 范围：在 20 ℃贮存 1 小时的条件下，其在 pH 6.0-10.0 的范围内稳定;

-分子量：约 38 kDa (SDS-PAGE 和凝胶过滤法);

-等电点：约 4.5 。

而且，按照本发明的新微生物是具有以上所述的嗜冷蛋白酶产生能力的比目鱼黄杆菌(Flavobacterium balustinum)。

另外，制备发明的嗜冷蛋白酶的方法包括培养以上所述的比目鱼黄杆菌，从培养物收集所说的嗜冷蛋白酶。

附图简要描述

图 1 是说明实施例 2 的结果的图表，或者显示来源于菌株 P104 的蛋白酶和蛋白酶 Subtilysin Carlsberg 的温度和活性之间的关系。

图 2 是说明实施例 4(2)的结果的图表，或者显示初始 pH 对比目鱼黄杆菌 P104 胞外蛋白酶的活性与产生的影响。

图 3 是说明实施例 4(3)的结果的图表，或者显示培养温度对比目鱼黄杆菌 P104 胞外蛋白酶的活性与产生的影响。图 3(A)、(B)和(C)分别显示在 10 ℃、 20 ℃和 30 ℃时的结果。

图 4 是说明实施例 5(2)(B)中凝胶过滤洗脱结果的图表。

图 5 是说明实施例 5(2)(C)中层析洗脱结果的图表。

图 6 说明实施例 6 中测定分子量的 SDS-PAGE 的结果。

图 7 是实施例 6 中测定分子量的校准曲线。

图 8 是实施例 6 中测定分子量的凝胶过滤的校准曲线。

图 9 说明实施例 7 中等电点聚焦的结果。

图 10 是实施例 7 中等电点聚焦的校准曲线。

图 11 是说明实施例 8 的结果的图表，或者显示 pH 对本发明的酶的酶反应的影响。

图 12 是说明实施例 9 的结果的图表，或者显示本发明的酶对 pH 的稳定性。

图 13 是说明实施例 10 的结果的图表，或者显示温度对本发明的酶的酶反应的影响。

图 14 是说明实施例 11 的结果的图表，或者显示本发明的酶对温度的稳定性。

图 15 是说明实施例 13 的结果的图表，或者是说明蛋白质修饰物 SDS 对本发明的酶的影响的图表。

图 16 是说明实施例 13 的结果的图表，或者是说明蛋白质修饰物尿素对本发明的酶的影响的图表。

图 17 是实施例 16 中检验的本发明的酶的 Lineweaver-Burk 方案。图 17(A)和(B)分别显示在 0 到 2.0 范围中和在 0 到 0.2 范围中 1/v 值的改变。

发明详述

新蛋白酶产生细菌

按照本发明的新蛋白酶由属于黄杆菌属(Flavobacterium)并且具有产生具有以上所述性质的蛋白酶之能力的微生物产生。

具有产生按照本发明的蛋白酶能力之微生物的特定的例子包括比目鱼黄杆菌 P104。这种菌株是从鲑内部器官分离的微生物，已于 1995 年 2 月 17 日以保藏号 FERM 5006 保藏在工业科学和技术机构国立生命科学和人体技术研究所。

以下列出了按照本发明的比目鱼黄杆菌 P104 的细菌学性质:

(1)形态学性质

该菌株以具有 0.4-0.5 × 1.7-1.9 μm 大小的短的杆菌形式存在。

(2)在培养基上的性质

该菌株在琼脂培养基上生长并产生黄色色素。

(3) 生长的最佳条件

pH: 该菌株在 5-9 范围的 pH 下生长，最佳生长 pH 值约为中性。

温度: 该菌株在 10-30 ℃范围的温度下生长，生长的最佳温度约为 20 ℃。

(4) 需氧和非需氧菌之间的区别: 需氧菌。

(5) 革兰氏染色: 阴性。

(6) 生物化学性质

比目鱼黄杆菌 P104 具有以下表 1 所示的主要生物化学性质:

表 1

试验项目	结果
半乳糖苷酶	-
精氨酸二水解酶	-
赖氨酸脱羧酶	-
鸟氨酸脱羧酶	-
柠檬酸利用	-
硫化氢产生	-
脲酶	+
色氨酸脱氨基酶	-
吲哚产生	+
明胶酶	+
葡萄糖	-
D-甘露糖醇	-
肌醇	-
D-山梨醇	-
鼠李糖	-
蔗糖	-
D-蜜二糖	-
D-扁桃苷	-
L-arbinol	-
氧化酶	-

尽管从这些性质似乎可以判断该菌株为 **Flavobacterium indolgenes**，但通过将以下实施例 3 中描述的编码 16S 核糖体 RNA 之 DNA 的碱基序列与已知微生物的碱基序列比较，判断其更适于分类为比目鱼黄杆菌。

培养该菌株的培养基可以是液体或者固体培养基，但是通常采用以液体培养基进行的振荡培养或通气培养。

培养所述微生物的培养基可以是任何适于生长并可以产生蛋白酶的培养基。具体地说，碳源的例子包括葡萄糖、海藻糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉和麦芽寡-糖化物。氮源的例子包括酵母膏、麦芽提取物、

牛肉提取物、大豆粉、棉籽粉、玉米浆、各种氨基酸和它们的盐和硝酸盐。也可以利用包含适当的无机盐如镁、钙、钠、钾、铁和 maganese 磷酸盐和其它必需营养物的合成培养基或者天然培养基。

培养条件如 pH 和温度可以在产生蛋白酶的范围内确定，液体振荡培养或者通气搅拌培养在 pH 约中性和温度约 20 ℃下进行。

本发明的蛋白酶在细菌细胞的细胞壁中、在细胞之内、在培养液上清液中产生，并且可以是细菌细胞、粗酶(从细菌细胞或者培养液上清液获得的)或提取的和纯化的酶形式。

酶的收集

为了从培养液收集和纯化按照本发明的蛋白酶，可以单独或组合使用众所周知的方法。

按照本发明的蛋白酶主要被分泌到细胞外，即分泌到培养液中，因此可以用例如过滤或离心容易地除去细菌细胞来获得粗酶溶液。用已知方法可以进一步纯化粗酶溶液。所述方法优选地包括用盐（如硫酸铵）进行的盐析；用有机溶剂（如甲醇，乙醇或者丙酮）进行的沉淀；未加工淀粉吸附法；超滤法；和各种层析法（如凝胶过滤层析或者离子交换层析）。优选方法的特定例子在以下实施例中描述。

蛋白酶的性质

测定了按照本发明的蛋白酶的性质，结果如下：

(1) 活性和底物特异性

本发明的酶很好地分解大分子蛋白质如酪蛋白或二甲基酪蛋白或者变性蛋白质。它也分解明胶(与酪蛋白比较胶原比例为约 50%的变性蛋白质)。然而，其对其它天然蛋白质有很小的作用，它根本不作用于核糖核酸酶。

工业上使用的蛋白酶如枯草杆菌蛋白酶可以具有非底物特异性，几乎作用于所有蛋白质。相反，本发明的酶仅仅作用于大分子蛋白质或者酶相对容易接近的变性蛋白质。

一种类似本发明的、来源于嗜冷细菌荧光假单胞菌的蛋白酶已成功地分解了大分子蛋白质如酪蛋白或二甲基酪蛋白或者变性蛋白质。然而，该酶不同于本发明的酶它也分解天然球状蛋白如血红蛋白和牛血清白蛋白（与二甲基酪蛋白相比，以约 40 %的比例）。这样，本发明的酶很可能具有比已知的酶更高的底物特异性。

(2) 最佳温度和稳定温度

本发明的酶在约 40 ℃下发挥作用。

在 pH 7 贮存 1 小时的条件下，在温度高达 30 ℃时其几乎不失活，但是在 40 ℃时活性丧失约 40%。在 50 ℃时，该蛋白酶迅速失活以致活性在约 15 分钟内完全丧失。

因此，本发明的酶被称为嗜冷酶，其在低温下显示出有效的催化作用。

(3) 最佳 pH 和稳定 pH 范围

本发明的酶具有 7.5 的最佳 pH。

此外，在 20 ℃贮存 1 小时的条件下，其在 pH 6.0-10.0 的范围内稳定。

由此，该酶是中性蛋白酶，其在极端酸性或者碱性范围中将不起作用。并且在极端酸性或者碱性范围下贮存时其会失活。

(4) 分子量

在用 SDS-PAGE 和凝胶过滤法测定时，本发明的酶具有约 38 kDa 的分子量。

(5) 等电点

用等电点聚焦测定时，本发明的酶具有约 4.5 的等电点。

(6) 活性的抑制

所述酶的蛋白酶活性不受苯甲基磺酰氟或碘乙酰胺抑制，但明显地受乙二胺四乙酸、2,2-二吡啶基、柠檬酸或者草酸抑制。由此看出蛋白酶活性依赖于金属离子，这表明本发明的酶是金属蛋白酶。从蛋白酶活性受柠檬酸和草酸两者之一抑制可认为所述的活性依赖于钙。

此外，酶的活性明显地受金属离子如 Ag^{+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}、Co^{2+} 和 Fe^{2+} 抑制，特别是明显地受 Ag^{+} 抑制。然而，它不受 Mg^{2+} 或者 Ca^{2+} 抑制。

(7) 酶反应动力学

对底物(如酪蛋白)浓度，本发明的酶显示出 Michaelis-Menten 型反应速率。随着温度的增加，Km 值降低，Vmax 值增加。此外，在 10 到 40 ℃的范围中，酶的 Kcat 值非常高。在过量底物存在下，酶通常受到抑制。然而，在本发明的酶的情况下，当系统接近最佳作用温度时 Kcat 值增加。因此，就不能观察到可觉察的由分解产物产生的抑制

作用而言，所述的酶是有利的。从 Lineweaver-Burk 图也可以相信，由温度引起的抑制作用是一种复合形式的，即，温度的影响是非竞争性抑制的，分解产物的影响是竞争性抑制的。

酶的用途

按照本发明的嗜冷蛋白酶在低温范围内具有最佳温度。这样，对于本发明的嗜冷蛋白酶而言，在低温下分解蛋白质是可能的。例如，通过把本发明的蛋白酶掺入进去垢剂组合物制备即使在低温水中也可以使用的去垢剂。除了掺入本发明的嗜冷蛋白酶外，这种去垢剂组合物可以按照常规方法制备。简言之，可以通过把本发明的蛋白酶与普通去垢剂组分，如去垢剂的表面活性剂、漂白剂或者助洗剂组合来制备。

此外，按照本发明的嗜冷蛋白酶的酶反应可以在低温下进行。这样，即使反应系统包括室温下易挥发的有机溶剂，反应也可以在所述有机溶剂不易挥发的低温下进行。而且，当意欲通过按照本发明的蛋白酶改善食品质量时，使用本发明的蛋白酶是有利的，因为在低温下进行可以有效地防止食品分解。

此外，由于提供了按照本发明的蛋白酶，有希望在嗜冷细菌的生理机制和它们的应用机制的研究上取得进展。

以下参照特定实施例详细描述本发明，但本发明不受到这些实施例的限制。

在这一部分中，除非有其它说明，用蛋白质染色法和 Bio-Rad 蛋白质测定法定量测定蛋白质，通过在 280nm 时的紫外范围中的吸收测定层析过程中洗脱物的蛋白组份。

此外，蛋白酶的活性按如下所述测定:

(a) 用偶氮酪蛋白获得的蛋白质分解活性

将一份 0.05ml 样品酶溶液添加到 0.3 ml 包含 1%(W/V)偶氮酪蛋白(azocasein) 的 0.067M 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中，混合物在 30 ℃下保持 30 分钟。然后以 6%三氯乙酸溶液终止反应。在 15 分钟之后，将反应混合物在室温 14,000 rpm 下离心 5 分钟。测定上清液在 340 nm 的吸收率。酶活性以 ACU (偶氮酪蛋白消化单位，指在 340nm 下每分钟吸光率增加 0.001)为基础确定。

(b) 用改进的 Anson 法获得的蛋白质分解活性

将一份 0.05ml 样品酶溶液添加到 0.3 ml 包含 1%(W/V)偶氮酪蛋白(azocasein) 的 0.067M 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中，混合物在 30 ℃下保持 30 分钟。然后以 7.5%三氯乙酸溶液终止反应。在 30 分钟之后，将反应混合物在室温和 14,000 rpm 下离心 5 分钟。测定上清液在 280nm 的吸收率。酶活性以 AU (改进的 Anson 单位，指每分钟产生 1 μmol 量的酪氨酸)为基础确定。

实施例 1

(1) 筛选新的细菌菌株

在琼脂平板培养基上进行新细菌菌株的分离。将鲑内器官的分离样品悬浮在生理盐水中，将上清液用作贮存溶液。从贮存溶液制成 10^2 稀释度。将贮存溶液和 10^2 稀释液各 0.2 ml 喷布在筛选琼脂平板培养基上(3 克/升聚蛋白胨(polypeptone)、 10 克/升酵母膏、 10 克/升酪蛋白钠、 0.2 克/升 M $gSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 2.0 克/升琼脂，在 9cm 培养皿上)，于 10 ℃ 培养 3 天。在已在琼脂平板上生长的菌落中选择生长良好的菌落，继代培养并接种到琼脂平板上供贮存。

在琼脂平板培养基上测定胞外酶活性。将分离的细菌菌株经划线接种到以上所述的筛选琼脂平板培养基上，于 10 ℃培养 3 天。然后将 10%三氯乙酸溶液喷布到琼脂平板培养基上，细菌在该培养基上生长，通过清晰噬斑的存在确定蛋白酶产生细菌。

(2) 培养分离的细菌菌株和产生酶

将从贮存培养基分离细菌接种到 25ml 预培养培养基(10 克/升聚蛋白胨、 10 克/升内提取物(endoextract)、 0.2 克/升 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 pH 7.0 ， 在 100 ml 锥形瓶中)上， 为了稳定细菌的生长活性， 在 TAITECNR-80 中在 10 ℃和 150 rpm 下旋转振荡培养 48 小时。在常规培养条件下， 将 0.25 ml 预培养溶液接种到 25 ml 产生酶的培养基 (5 克/升聚蛋白胨、 2.5 克/升酵母膏、 5 克/升酪蛋白钠、 0.2 克/升 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ， pH7.0，在 100 ml 锥形瓶中)上。于 10 ℃和 150 rpm 下在旋转摇床上旋转-振荡培养 72 小时。培养基事先已在 1.2 kgf /cm^2 刻度(gauge)(121 ℃)下蒸汽灭菌 15 分钟。

将分离的细菌菌株贮存在琼脂平板培养基中以便在 10 ℃贮存。在 2 周到 1 个月之后继代培养。

(3) 测定蛋白酶活性

用离心(17,000 × g， 4 ℃， 15 分钟)澄清以上步骤(2)获得的培养液。把上清液用作粗酶溶液。通过偶氮酪蛋白的分解测定蛋白酶活性。将一份 0.05 ml 的粗酶溶液添加到 0.3 ml 包含 1%(W/V)偶氮酪蛋白(pH 7.0)的 0.067M 磷酸盐溶液中，混合物在 20 ℃下保持 30 分钟。然后以 6%三氯乙酸溶液终止反应，在 15 分钟之后，在室温和 14,000rpm 下离心反应混合物 5 分钟。用分光光度计(Beekman DU640)测量上清液在 340 nm 的吸收率。酶活性以 ACU (偶氮酪蛋白消化单位，指在 340nm 下每分钟吸收率增加 0.001)为基础确定。

作为步骤(1)-(3)的结果，分离到具有蛋白酶活性的细菌菌株 P104 。该细菌菌株具有下表所示的蛋白酶活性。

在表中，通过与分开的黄噬纤维菌菌株(Cytophaga xantha) IFO 14972 的生长相比较获得所述菌株的生长速率。

表 2

具有蛋白酶活性的细菌菌株

菌株	生长速率	蛋白酶活性 ($\times 10^3$ ACU/ml)
P104	+ + +	0.982

实施例 2

P104 的蛋白酶活性

在 0-60 ℃温度范围中用蛋白酶产生菌株 P104 测定温度对酶活性的影响。也以相同的方式用 Subtilisin Carlsberg (西格马)(市售的得自地衣芽孢杆菌的蛋白酶)测定酶活性的温度依赖性。

结果在图 1 中显示，在图 1 中，菌株 P104 的酶比活性以□表示，Subtilisin Carlsberg 的酶比活性以Δ表示。

菌株 P104 胞外蛋白酶(exoprotease)和 Subtilisin Carlsberg 的最佳温度分别是 40 ℃和 60 ℃或更高。在温度约 20 ℃时，菌株 P104 的胞外蛋白酶保持最佳温度时活性的 40%或更高的蛋白酶活性， Subtilisin Carlsberg 仅保持最佳温度时的蛋白酶活性的约 10%。

此外，在 10 至 40 ℃范围中计算了这些胞外蛋白酶反应的活化能。结果示于下表中:

表 3

细菌细胞	活化能(KJ/mol)
P104	39.8
枯草芽孢杆菌	58.3

实施例 3

由编码 16S 核糖体 RNA 之 DNA 的碱基序列鉴别菌株 P104

将实施例 2 获得的培养液取样到 1.5 ml 微量离心管中，经离心收集细胞。抽提基因组 DNA，以便经 PCR(聚合酶链反应)扩增编码 16S 核糖体 RNA 之 DNA 的碱基序列。用 Sanger 法与供鉴别的 GenBank 数据库比较确定碱基序列。使用的引物列于以下，1F-Link 和 5R-Link 用于 PCR。

引物:

1F-Link: 5'-TGTAAAACGACGGCCAGTAGTTTGATCATGGCTCAG-3'

3R-Link: 5'-CAGGAAACAGCTATGACCCGTCAATTCATTTGAGTT-3'

3F-Link: 5'-TGTTAAAACGACGGCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA-3'

5R-Link: 5'-TGTAAAACGACGGCCAGTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA-3'.

与 GenBank 数据库比较的结果在下列表中显示。在该表中，询问代表来源于菌株 P104 的 16S 核糖体 RNA 基因，对象代表比目鱼黄杆菌 S16 核糖体 RNA(FVBRR16SH). 结果细菌菌株被鉴别为比目鱼黄杆菌。由此该菌株被称为比目鱼黄杆菌 P104。

(a) 使用引物 1F-Link

等同性= 185/204 (90%), 阳性 = 185/204 (90%)

```
询问   :1   G A T C A A C G C T A G C G G G A G G C
             : : :   : : : : : : : : : : : : : : :
对象  :31   G A T N A A C G C T A G C G G G A G G C
询问  :21   C T A A C A C A T G C A A G C C G A G C
             : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象  :51   C T A A C A C A T G C A A G C C G A G C
询问  :41   G G T A T T T G T C T T T C G G G A C A
             : : : : :       :     : : : : :   :
对象 :71    G G T A T A G A T T C T T C G G A A T C
询问 :61    G A G A G A G C G G A G T A C G G G T G
               : : : : : : : : :   : : : : : : : :
对象 :91    T A G A G A G C G G C G T A C G G G T G
询问 :81    C G G A A C A C G T G T G C A A C C T A
             : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象 :111   C G G A A C A C G T G T G C A A C C T A
询问 :101   C C T T T A T C A G G G G G A T A G C C
             : :   : : : : : : : : : : : : : : : :
对象 :131   C C N T T A T C A G G G G G A T A G C C
询问 :121   T T T C G A A A G G A A G A T T A A T A
             : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象 :151   T T T C G A A A G G A A G A T T A A T A
询问 :141   C C C C A T A A T A T A T T G A T T G G
             : : :   : : : : : : : : : : :   : : :
对象 :171   C C C N A T A A T A T A T T G A C T G G
询问 :161   C A T C A G T T A C T A T T G A C A A C
             : : : : : : :       : : : : : :   : : :
对象 :191   C A T C A G T C G A T A T T G A A A A C
询问 :181   T C C G G T G G A T A G A G A T G G T C
             : : : : : : : : : : : : : : : : :   :
对象 :211   T C C G G T G G A T A G A G A T G G G C
询问 :201   A C G C
             : : : :
对象 :231   A C G C
```

(b) 使用引物 3F-Link

等同性 = 208/330 (63%), 阳性 = 208/330 (63%)

```
询问   :1    G A T A T T A C T T A G A A C A C C A A
             : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象   :695  G A T A T T A C T T A G A A C A C C A A
询问   :21   T T G C G A G G G A N G T T C A C T A T
             : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象   :715  T T G C G A A G G C A G G T C A C T A T
询问   :41   G T N T N A C C T G A T G C N G A T G N
             : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象   :735  G T T T T A A C T G A C G C T G A T G G
询问   :61   C C G A A A G T G N G N T G A G T G A A
             : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象   :755  A C G A A A G C G T G G G G A G C G A A
询问   :81   C A G G A T T A G T T N C C A T G G T C
             : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象   :775  C A G G A T T A G A T A C C C T G G T A
询问   :101  G N C C A C G N C G T N C A C N A T N T
             : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象   :795  G T C C A C G C C G T A A A C G A T G C
询问   :121  T A T C T C G N T T N T G G G A T T A N
             : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象   :815  T A A C T C G T T T T T G G G C T T T A
询问   :141  N A G T N C A G C G A G T A A C A N A G
             : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象   :835  G G G T T C A G A G A C T A A G C G A A
询问   :161  A G T N G T A T G N N A G N C A C C N G
             : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象   :845  A G T G A T A A G T T A G C N A C C T G
询问   :181  N C G N G T C N G T T C G C A G G T T T
             : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象   :865  G G G A G T A C G T T C G C A A G A A T
询问   :201  C G A A N T C A G C N T C C T G G C G G
             : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象   :885  G A A A C T C A A A G G A A T T G A C G
```

```
询问 :201   N T G G C C N N T A C A C N C T G T G N
                : :       : : :     :   : : : :
对象 :905   G G N N C C N G C A C A A G C G G T G G
询问 :221   T T T A T A T N G T N T A A N G C G T T
              : : : :   :   : :   : : :     : :
对象 :925   A T T A T G T G G T T T A A T T C G A T
询问 :241   N A T N C N A G A G G G T C C T N A C C
              : :   :     : : : :     : : :   : : :
对象 :945   G A T A C G C G A G G A A C C T T A C C
询问 :261   A N G N T T N N T T N G G G T C N T C C
            :   :     :           : : :       :
对象 :965   A A G G C T T A A A T G G G A A T T G A
询问 :281   C A G C C T T C G T C T N T A C T T G T
            : : :     : :   :                 :   :
对象 :985   C A G G T T T A G A A A T A G A C T T T
询问 :301   G N T T C G G A C A
                : : : : : : : :
对象 :1005  T C T T C G G A C A
```

(c) 使用引物 3R-Link

等同性 = 128/162 (79%), 阳性 = 128/162 (79%)

```
询问 :162   T T N T T G G G N A T A A N A G G G N C
            : :     :   : :     : : :   : : : : :   :
对象 :552   T T T A T T G G G T T T A A A G G G T C
询问 :142   C N T C N G C G G A C C T G T A A A T C
            :   :     : : : : :   : : : : : : : : :
对象 :572   C G T A G G C G G A T C T G T A A G T C
询问 :122   A T T G G T G A T A T C T C A G A G C C
            :   : : : : : : :   : : : : : :   : : :
对象 :592   A G T G G T G A A A T C T C A T A G C T
询问 :102   T G T C T A T G G G A C T A C C A T T G
            :     : : : : : :     : : :   : : : : : :
对象 :612   T A A C T A T G A A A C T G C C A T T G
询问 :82    A T G C T C C A G G T C A T G A G T C T
              : :   : :   : : : : : : :   : : : : :
对象 :632   A T A C T G C A G G T C T T G A G T A A
```

```
询问 :62    A G C A G G A G T G G C T G G A A T A A
            : :   : :   : : : : : : : : : : : : :
对象 :652   A G T A G A A G T G G C T G G A A T A A
询问 :42    G T A C T G T A A C G G T G T A A T G C
            : : :   : : : :   : : : : : :   : : : :
对象 :672   G T A G T G T A G C G G T G A A A T G C
询问 :22    A T A G A T A T T A C T C A G A A C C C
            : : : : : : : : : : : : :   : : : : :  :
对象 :692   A T A G A T A T T A C T T A G A A C A C
询问 :2     C A
            : :
对象:712    C A
```

(d) 使用引物 5R-Link

等同性= 237/273 (86%), 阳性 = 237/273 (86%)

```
询问 :273   C C G G T A C N C C T T G G G C C A C A
            : :   : : :   : : : : : : : : : : : :
对象 :1193  C C C T T A C G C C T T G G G C C A C A
询问 :253   C A C G T A A T A C A A T G N C A A G N
            : : : : : : : : : : : : : :   : : :
对象 :1213  C A C G T A A T A C A A T G G C C A G T
询问 :233   A C A G A G N G T A G C N A C C A G N C
            : : : : : :   : : : : : :   : : : : :  :
对象 :1233  A C A G A G G G C A G C T A C C A G G C
询问 :213   G N C T G G A T G C G A A T C T C G A A
            :   : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象 :1253  G A C T G G A T G C G A A T C T C G A A
询问 :193   A N C T G C N C T C A G A N C G G A N T
            :   : :   :   : : : : : :   : : : :  :
对象 :1273  A G C T N G N C T C A G T T C G G A T T
询问 :173   G G A G T C T G C A A C T C G A C T C T
            : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象 :1293  G G A G T C T G C A A C T C G A C T C T
询问 :153   A T G A A A C T G G A T N C G C T A G T
            : : : : :   : : : : :   : : : : : : :
对象 :1313  A T G A A G C T G G A A T C G C T A G T
```

07.10.08

```
询问 :133   A A T C G C A T A T C A G N C A T G A T
            : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象 :1333  A A T C G C A T A T C A G C C A T G A T
询问 :113   N C G G T G A A N A C G T T G C C N G G
              : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象 :1353  G C G G T G A A T A C G T T C C C N G G
询问 :93    C C T T G N A A A C A C C G C C C G T C
            : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象:1373   C C T T G T A C A C A C C G C N C G T C
询问 :73    A A C C C A T G G A A G T T T G G G G T
            : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象:1393   A A G C C A T G G A A G T T T G G G G T
询问 :53    A C C T G N A G T C G G T G A C C G T A
            : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象:1413   A C C T G A A G T C G G T G A C C G T A
询问 :33    A C N G G A C C T N C C T A G G G T A N
            : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
对象 :1433  A C A G G A G C T G C C T A G G G T A A
询问 :13    N A C A A G T A A C T A G
              : : : : : : : : : : : : :
对象 :1453  A A C A A G T A A C T A G
```

实施例 4

培养比目鱼黄杆菌 P104

(1) 测定细菌细胞的密度

用生理盐水稀释实施例 2 获得的培养液，以使在细胞计数池中包含 0-5 个细胞。用光学显微镜计数细胞。在 660nm 经光谱法测定培养稀释液的浓度以获得细胞和浓度之间的关系。以下方程式代表浊度和比目鱼黄杆菌 P104 细菌细胞浓度之间的关系：

(细胞/ml)=1.13 × 10^9 × Abs. 660 nm

其中 1.13 × 10^9 是从校准曲线获得的因子。

(2) pH 的影响

在 5 至 9 范围内的蛋白酶产生培养基的各种 pH 下培养细菌菌株，以确定起始 pH 对胞外蛋白酶活性和其产生的影响。

结果在图 2 中显示。

在碱性 pH 中，增殖明显降低，蛋白酶活性也降低。然而，在酸性 pH 范围中观察到增殖或蛋白酶活性的明显不同。在中性 pH 范围中细菌菌株增殖良好，并且蛋白酶活性保持在最高水平上。

(3) 培养温度的影响

在 10-30 ℃范围内的各种温度下培养比目鱼黄杆菌 P104，以测定随着培养的进行胞外蛋白酶活性和增殖的增减。

结果在图 3 中显示。

虽然在 10 ℃和 20 ℃的温度下细菌菌株生长良好，但在 30 ℃的增殖速率是在 10 ℃或 20 ℃稳定期的约一半。在 20 ℃时，菌株表现出最高的增殖速率，所以培养的最佳温度被认为是约 20 ℃。

实施例 5

纯化得自比目鱼黄杆菌 P104 的蛋白酶

(1) 培养细菌菌株

将从以下贮存细胞培养基获得的分离的细菌菌株接种到 25ml 以下预培养基(在 100ml 锥形瓶中)中，于 10 ℃ TAITEC NR-80 中 150 rpm 下旋转振荡培养 48 小时。通过接种 0.25ml 预培养液到在 10ml 锥形瓶中的以下常规培养基中，于 10 ℃在 150 rpm 下旋转振荡培养溶液 72 小时。

贮存培养基：

聚蛋白胨 3 g/l，

酶提取物 2.5 g/l，

酪蛋白钠 20g/l，

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/l，

琼脂 20g/l，

pH 7.0

预培养基:

聚蛋白胨 3 g/l，

酶提取物 2.5 g/l，

酪蛋白钠 1g/l，

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/l，

pH 7.0

常规培养基

聚蛋白胨 3 g/l，

酶提取物 2.5 g/l，

酪蛋白钠 5g/l，

$KH_2PO_4 \cdot 7H_2O$3 g/l

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/l，

pH 7.0

在 1.2 kgf/cm^2 刻度(120 ℃)下，用高压蒸汽高压灭菌材料(例如培养基)15 分钟。

将比目鱼黄杆菌 P104 接种到琼脂平板上，于 10 ℃贮存，继代培养 2 周至 1 个月。

(2) 纯化蛋白酶

(a) 用硫酸铵盐析

经离心(17,000 × g 15 分钟)使以上步骤(1)获得的培养液澄清。将上清液用作酶溶液。将硫酸铵添加到粗酶溶液中，以使溶液含有饱和浓度 50%的硫酸铵。缓慢搅拌 1 小时后，离心(17,000 × g 15 分钟)沉降溶液，给出 0-50%饱和组份。 25 ℃饱和浓度时，硫酸铵的添加量用作添加的硫酸铵的量。

(b) 凝胶过滤

接着在 HiLoad 16/60 Superdex 200 制备分级(prep grade)柱上进行

凝胶过滤.所有柱层析中的操作都于4℃下用HiLoad系统50(Farmacia Biotec Co.)作为层析系统进行。

通过在约 60cm/小时的线速度下以至少 3(400ml)到凝胶体积的比例流过 20 mM Bis-Tris 缓冲液(pH 6.0)平衡 HiLoad 16/60 Superdex 200 制备分级柱. 将已用硫酸铵盐析的样品酶溶液的 5ml 组份装载到具有 Superloop 的柱上。用 20 mM Bis-Tris 缓冲液(pH 6.0)为洗脱液，以约 60 cm/小时的线速度洗脱柱，收集 5ml 组份。

洗脱曲线在图 4 中显示。

作为排阻极限，洗脱一种包含在培养液中的具有高分子量的透明黄色蛋白质。作为具有 280nm 紫外吸收的后续组份，洗脱一种无色透明组份。附着在蛋白酶上的片段似乎被除去，因为在这一组份中存在蛋白酶活性。

(c) 柱层析

接着用 Q 琼脂糖凝胶 HP 柱进行离子交换层析，由 5 个系列连接的 HiTrapQ(1ml)柱组成的ϕ 0.7 X12.5 cm 柱用作层析柱。通过在约 35cm/小时的线速度下以至少 5(25ml)到凝胶体积的比例流过 20 mM Bis-Tris 缓冲液(pH 6.0)平衡柱。

将进凝胶过滤洗脱的组份和具有蛋白酶活性的样品酶溶液以约 17.5cm/小时线性速度装载到具有 Superloop 的柱上。用 80ml 具有添加到其中的 1M NaC1 的 20mM Bis-Tris 缓冲液通过线性离子强度增加梯度(0-150 mM)以约 35 cm/小时的线性速度洗脱柱，收集 2ml 组份。

洗脱曲线在图 5 中显示。

此外，以上描述的纯化方法总结在下表中。

表 4

蛋白酶纯化总结

	量 (ml)	蛋白质 (mg)	酶活性 (× 10^3ACU)	比活性 (× 10^3ACU·mg^{-1})	回吸率 (%)	纯化级别 (×)
培养物质	270	13.0	365	28.1	100	1
用硫酸铵盐析	5	3.38	273	80.8	74.8	2.9
凝胶过滤	25	0.752	77.7	103	21.3	3.7
离子交换层析	18	0.154	29.3	190	8.03	6.8

实施例 6

蛋白酶纯度和分子量测定

(1) 电泳

(a) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

使用具有 1mm 厚度的 10%聚丙烯酰胺凝胶。将 20mA 电流施用到凝胶上进行电泳，直到溴酚蓝(BPB)达到最下端。用具有溶解于其中的 0.02 %考马斯亮蓝 R250 的 30%甲醇和 10%乙酸的含水混合物染色凝胶板 1 小时，然后，用脱色剂(30%甲醇和 10%乙酸)脱色过夜。

用具有作为标记的磷酸化酶、白蛋白、卵白蛋白、碳酸酐酶、胰蛋白酶抑制剂和α-乳清蛋白经 SDS-PAGE 测定所述蛋白酶分子量。

SDS-PAGE 的结果和校准曲线在图 6 和 7 中显示出。所述酶显示出单一带，由此可认为是单一的蛋白质，而不是亚单位结构。

(b) 凝胶过滤

用 Hiprep 16/60 聚丙烯酰胺葡聚糖 S-100 HR 经凝胶过滤法测定分子量。通过在约 30cm/小时的线速度下以至少 3(400ml)到凝胶体积的比例流过具有添加到其中的 0.15M NaCl 的 50 mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)平衡柱。将 1ml 的样品酶溶液装载到柱上，用如上的相同的缓冲液以约 3030cm/小时的线性速率洗脱，收集 2ml 组份。用白蛋白(67 kDa)、卵白蛋白(43 kDa)，胰凝乳蛋白酶原 A(25kDa)，核糖核酸酶 A(13.7 kDa)作为标准蛋白质测定蓝葡聚糖(Blue Dextran)2000 的排出体积。

结果示于表 8 中。此外，记载各蛋白质在 280nm 的紫外吸收值和酶活性。蛋白质的紫外吸收曲线也显示出在 278nm 的最大吸收(无可见吸收)。从这些观察结果可以认为所述蛋白质具有测定其性质合乎需要的纯度。

实施例 7

等电点聚焦

用 Phast 系统(Farmacia-Biotec 公司)进行等电点聚焦。使用 IEF3-9 凝胶，将样品装载在距阳极 3cm 的点上。于 15 ℃和 410 Vh 时在 2,000 V，2.5 mA 的条件下进行电泳。于 20 ℃经用 20%TCA 溶液固定染色凝胶平板 5 分钟，用冲洗和脱色溶液(30%甲醇和 10%乙酸)洗涤 2 分钟。最终于 50 ℃用具有溶解于其中的 0.02%考马斯亮蓝 R250 的溶液冲洗和脱色 10 分钟。Broad pI Calibration 试剂盒(Farmacia-Biotec 公司)用作标记。

等电点聚焦的结果和校准曲线显示在图 9 和图 10 中。

所述酶基本上被染色为具有 pH4.5 的等电点的单一带。

实施例 8

pH 对酶反应的影响

在各种 pH 下用酶分解偶氮酪蛋白(azocasein)。

反应混合物中的缓冲液具有 67mM 的浓度，并且分别包括乙酸盐缓冲液(pH 4-4.5)、KH_2PO_4-NaH_2PO_4(pH 6.0-8.0)、NaB_4O_7-HCl(pH 8.0-9.0)、NaB_4O_7-NaOH(pH 9.5-10)和 Na_2HPO_4-NaOH(pH 10.5-12.0)。

结果示于图 11 中。

在最佳 pH 的 pH7.5 下的酶的相对反应性在 6.0 到 10.0 的 pH 范围内被保持在约 80%的水平上。由此发现所述酶在以中性 pH 为中心的相当宽的范围内起作用。然而，在 pH5.5 或更低或者 10.5 或更高的范围中所述酶的作用不令人满意，在 pH12 时其被灭活，丧失蛋白酶活性。

实施例 9

蛋白酶的 pH 稳定性

在具有含 Econo-Pac(Biorad Co.)的各种 pH 下测定酶。使用的缓冲溶液具有 67mM 的浓度，并且分别包括乙酸盐缓冲液(pH 4-5)、KH_2PO_4-NaH_2PO_4(pH 6-8)、甘氨酸-NaOH(pH 9-10)和 Na_2HPO_4-NaOH(pH 11-12)。

结果示于图 12 中。

发现在 20 ℃ 1 小时的条件下，所述酶在 6.0 到 10.0 的 pH 范围内稳定。

实施例 10

稳定对酶反应的影响

在 0 到 70 ℃的反应温度和各种 pH 下用酶分解偶氮酪蛋白。

用市售的酶进行类似的反应，所述酶例如 Subtilisin Carlsberg、V8 蛋白酶(其是来源于 Staphylococcus aurcub V8 的蛋白酶)、Sabinase (Novonordisc)和 Alkalase (Novonordisc)。

由 Kcat 表示的结果(假定存在过量底物，因而酶都以酶-底物复合物的形式存在)在图 13 中给出。在图 13 中，□代表所述酶，◆代表 V8 蛋白酶，O 代表 Subtilisin Carlsberg，Δ 代表 Sabinase，∇代表 Alkalase。

发现所述酶具有在 40 ℃的最佳温度，在超过最佳温度的酶反应温度下迅速失活。并且发现所有的市售蛋白酶具有 50 ℃或更高的最佳温度，

在 10 到 40 ℃的范围内，本发明的酶的 Kcat 值高于任何比较蛋白酶的。

实施例 11

蛋白酶的温度稳定性

在 20 到 50 ℃的温度范围内保持本发明的酶。活性随时间的变化示于图 14 中，其中□代表 20 ℃的变化，◆代表 30 ℃的变化，O 代表 40 ℃的变化，Δ代表 50 ℃的变化。

在 20 ℃ 或者 30 ℃ 酶几乎不失活，但在 40 ℃ 1 小时后逐渐失活至 20 ℃或 30 ℃酶活性的约 60%，在 50 ℃约 15 分钟迅速完全失活。

本发明的酶被认为对热不稳定，因为以上温度低于在以前的实验中使用的比较蛋白酶的最佳温度。

实施例 12

抑制剂的影响

对丝氨酸蛋白酶起作用的苯甲基磺酰氟(PMSF)、对半胱氨酸蛋白酶起作用的碘乙酰胺 (IAA)、对金属蛋白酶起作用的乙二胺四乙酸 (EDTA)、O-菲咯啉、2,2-二吡啶基，和特异性地作用于钙的柠檬酸盐与草酸盐用作抑制剂。在各种浓度的抑制剂添加到酶反应系统中后，在 20 ℃保持 1 小时以检测幸存的蛋白酶活性。

结果在下表中显示。

表 5

抑制剂的影响

抑制剂	浓度	残存的活性(%)
无	10mM	100
PMSF	10mM	99
碘乙酰胺	10mM	94
EDTA	10mM	8
o-菲咯啉	10mM	91
2,2'-二吡啶基	10mM	39
柠檬酸盐	10mM	41
	100mM	0
草酸盐	10mM	45
	100mM	0

所述酶的蛋白酶活性不被 PMSF 或者 IAA 抑制，但是明显地被 EDTA， 2,2-二吡啶基、柠檬酸盐或者草酸盐抑制。从这些观察结果发现所述的蛋白酶活性是金属离子依赖性的。由此，本发明的酶是金属蛋白酶。从被柠檬酸盐或草酸盐抑制也可以认为所述的蛋白酶活性依赖于钙。

实施例 13

蛋白质变性剂的影响

SDS 和尿素用作蛋白质变性剂。在添加各种浓度的蛋白质变性剂后，将酶反应系统在 20 ℃保持 1 小时以检测剩余的蛋白酶活性。

有关 SDS 和尿素的结果分别显示在图 15 和 16 中。

即使在相当低的浓度下，所述蛋白酶也受 SDS 抑制，在 0.25%SDS 时被完全灭活。在高达 2M 浓度时，所述蛋白酶也不受尿素抑制，但被 3M 尿素抑制至约 40%，被 4M 尿素完全灭活。

实施例 14

金属离子的影响

$AgNO_3$， $CuSO_4$， $ZnSO_4$， $CoSO_4$， $FeSO_4$， $MnSO_4$， $CaCl_2$ 和 $MgSO_4$ 用作金属来源。在添加金属盐以保证最终浓度为 1mM 后，将酶反应系统在 20 ℃保持 1 小时以检测剩余的蛋白酶活性。

结果在下列表中显示。

表 6

金属离子的影响

金属离子	剩余活性(%)
无	100
Ag^{2+}	11
Cu^{2+}	44
Zn^{2+}	61
Co^{2+}	63
Fe^{2+}	76
Mn^{2+}	95
Ca^{2+}	100
Mg^{2+}	100

本发明的酶被 Ag^{2+}、 Cu^{2+}、 Zn^{2+}、 Co^{2+}和 Fe^{2+}深度抑制. 当被 Ag^{2+}抑制时，以上仅 10%的蛋白酶活性被保留. 本发明的酶一点也不被 Mg^{2+}或 Ca^{2+}抑制。

实施例 15

底物特异性

酪蛋白(Hammarsten)、二甲基酪蛋白、明胶、血红蛋白、牛血清白蛋白和核糖核酸酶用作底物蛋白质，以便经改进的 Anson 方法测定蛋白酶解活性。偶氮酪蛋白和偶氮白蛋白用作偶氮蛋白修饰蛋白质。结果在下表中显示。

表 7

底物特异性

底物（1%）	水解率(%)
酪蛋白 (Hammarsten)	100
二甲基酪蛋白	93
明胶	53
血红蛋白	18
牛血清白蛋白	17
核糖核酸酶	0
偶氮酪蛋白	100
偶氮白蛋白	20

本发明的酶很好地分解高分子蛋白质和变性蛋白质如酪蛋白和二甲基酪蛋白，也分解作为胶原变性蛋白质的明胶(以酪蛋白为基础的约 50%). 酶几乎不作用于其它的天然蛋白质，特别是它不作用于核糖核酸酶上。

实施例 16

与酪蛋白的酶反应动力学

用包含 0.05-1%酪蛋白(作为底物)的溶液获得在 5 到 40 ℃的各种温度下的 Lineweaver-Burk 图. 该图示于图 17 中，其中上图 (A) 说明在 0 到 2.0 的范围中 1/v 值的改变，下图(B)说明在 0 到 0.2 的范围中 1/v 值的改变. 在该图中，□代表 5 ℃的曲线，✧代表 10 ℃的曲线，○代表 20 ℃的曲线，Δ 代表 30 ℃的曲线，▽代表 40 ℃的曲线。

酶反应动力常数从 Lineweaver-Burk 图获得，如下表所示。

表 8

底物特异性

底物(1%)	水解速率(%)
酪蛋白(Hammarsten)	100
二甲基酪蛋白	93
明胶	53
血红蛋白	18
牛血清白蛋白	17
核糖核酸酶	0
偶氮酪蛋白	100
偶氮白蛋白	20

从上表可以明显看出，所述酶对酪蛋白浓度表现出 Michaelis-Mentne 型反应速率。随着温度的增加，Km 值降低，Vmax 值增加。在 5 ℃和 10 ℃时，在高浓度酪蛋白中，酶活性被抑制。一般来说，在过量底物浓度中酶倾向于受到抑制。然而，在增加的反应温度下，在 1%酪蛋白中，所述酶不被抑制。这被认为是由于 Kcat 值增加至接近最佳温度和酪蛋白分解产物小的抑制作用。从 Lineveaver-Burk 图也可以认为温度的抑制方式是混合型的。即，认为温度的影响是非竞争性的或者非竞争性抑制，酪蛋白分解产物的影响是竞争性抑制。

说 明 书 附 图

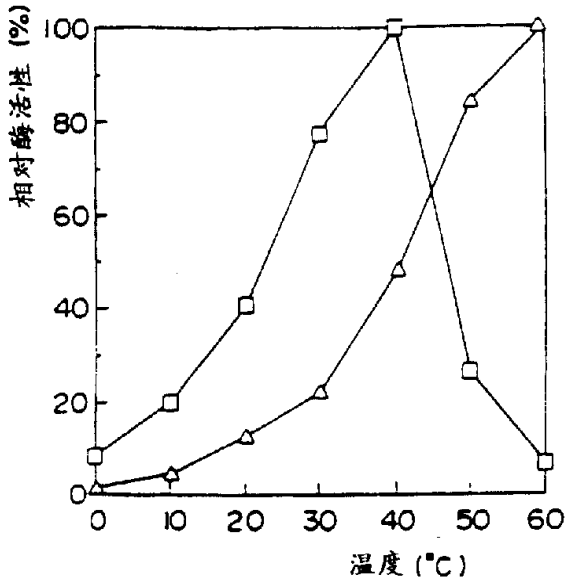

相对酶活性 (%)
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
温度 (°C)

图 1

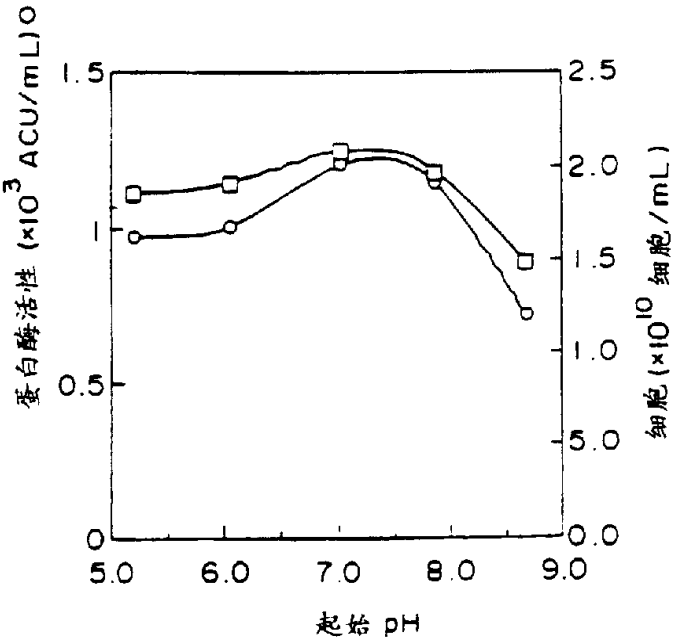

蛋白酶活性 (×10³ ACU/mL)
细胞 (×10¹⁰ 细胞/mL)
1.5
1
0.5
0
2.5
2.0
1.5
1.0
5.0
0.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
起始 pH

图 2

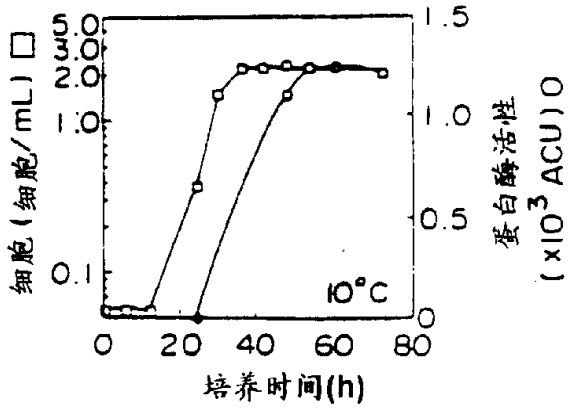

细胞(细胞/mL)□
蛋白酶活性
(×10³ ACU)○
10°C
培养时间(h)

图 3 A

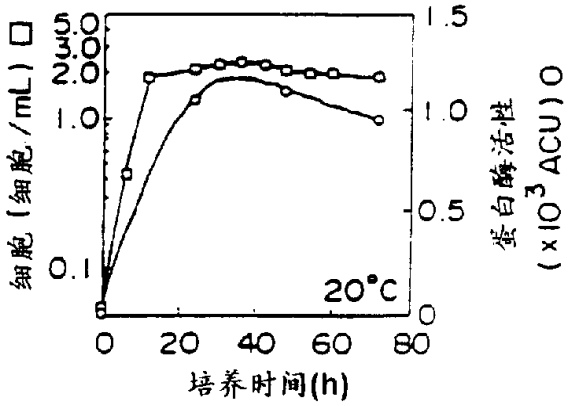

细胞(细胞/mL)□
蛋白酶活性
(×10³ ACU)○
20°C
培养时间(h)

图 3 B

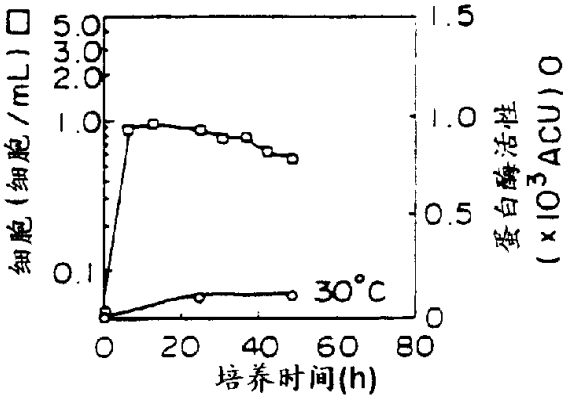

细胞(细胞/mL)□
蛋白酶活性
(×10³ ACU)○
30°C
培养时间(h)

图 3 C

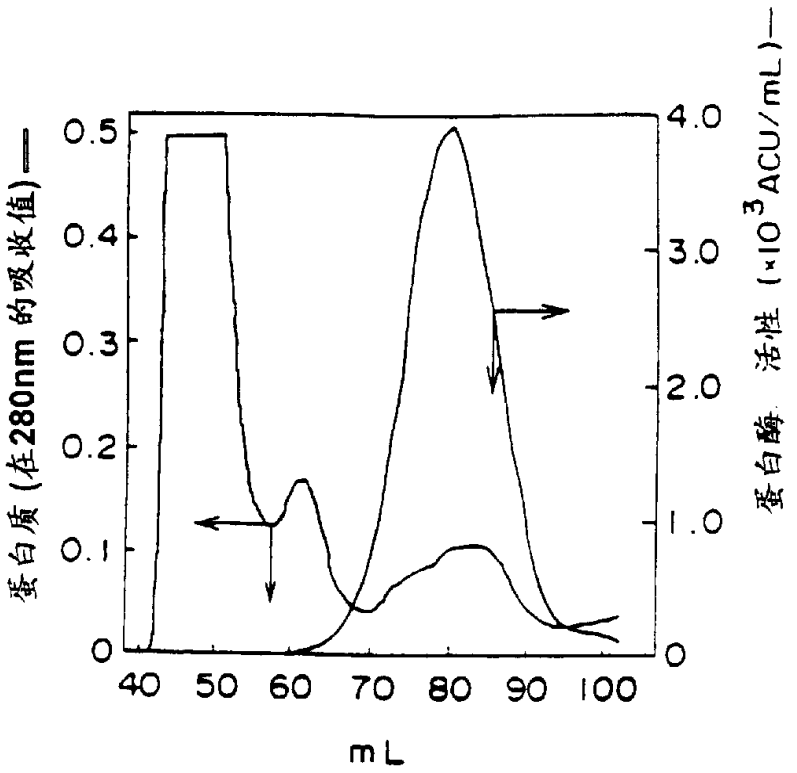

蛋白质 (在280nm 的吸收值)
蛋白酶 活性 (×10³ACU/mL)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
4.0
3.0
2.0
1.0
0
40 50 60 70 80 90 100
mL

图 4

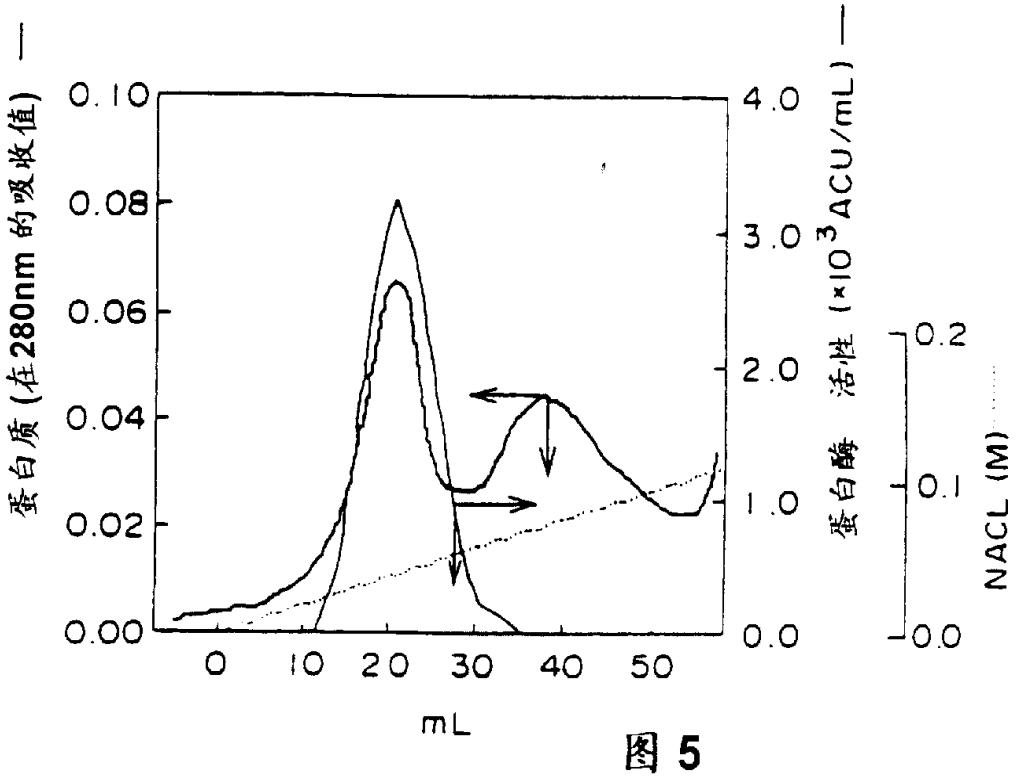

蛋白质 (在280nm 的吸收值)
蛋白酶 活性 (×10³ACU/mL)
NACL (M)
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0.2
0.1
0.0
0 10 20 30 40 50
mL

图 5

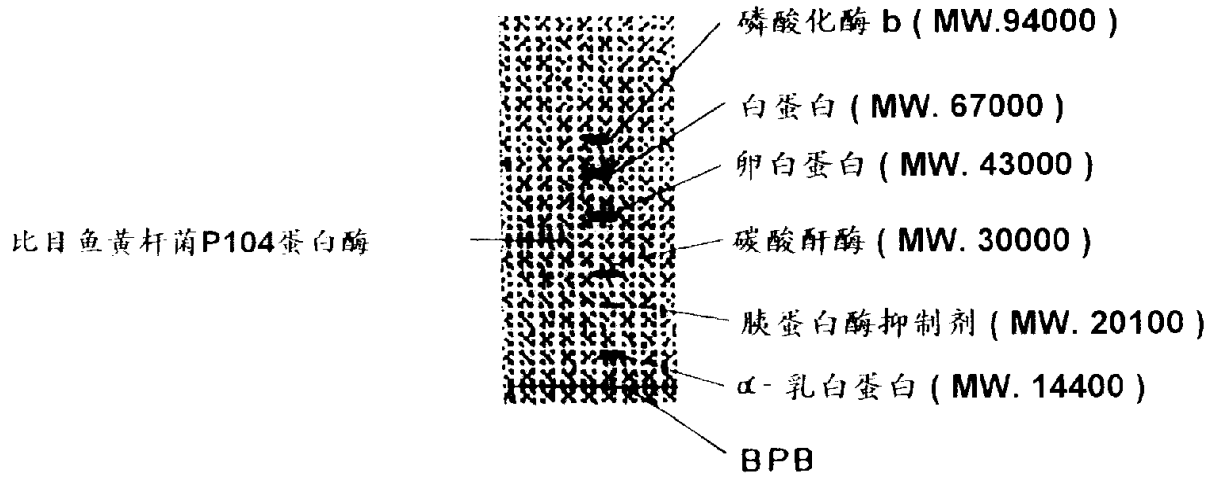

磷酸化酶 b (MW.94000)
白蛋白 (MW. 67000)
卵白蛋白 (MW. 43000)
比目鱼黄杆菌P104蛋白酶
碳酸酐酶 (MW. 30000)
胰蛋白酶抑制剂 (MW. 20100)
α- 乳白蛋白 (MW. 14400)
BPB

图 6

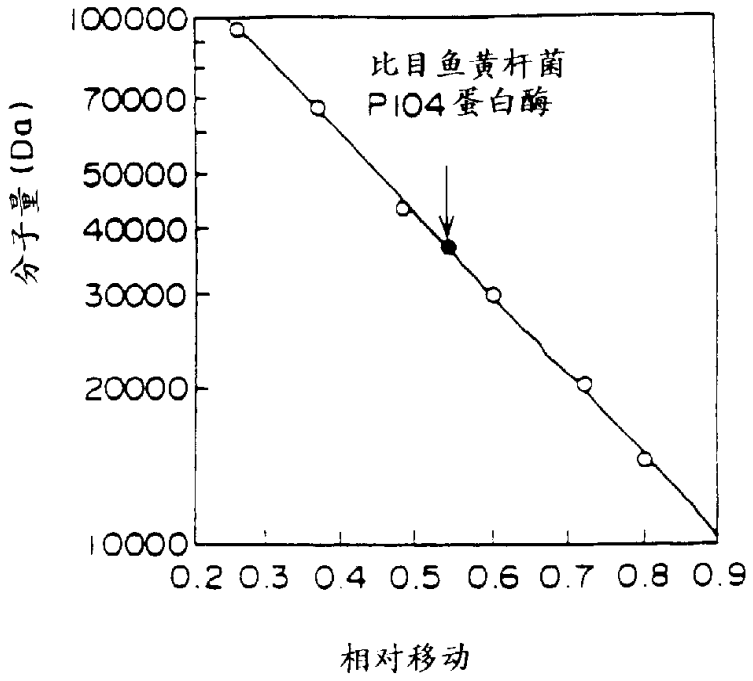

100000
70000
50000
40000
30000
20000
10000
分子量(Da)
比目鱼黄杆菌
P104蛋白酶
0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9
相对移动

图 7

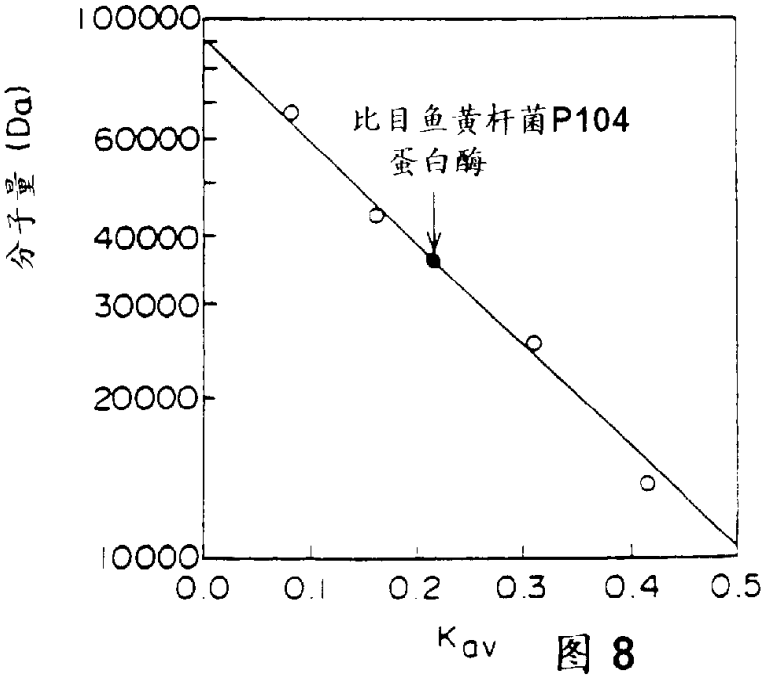

100000
60000
40000
30000
20000
10000
分子量(Da)
比目鱼黄杆菌P104
蛋白酶
0.0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5
Kav

图 8

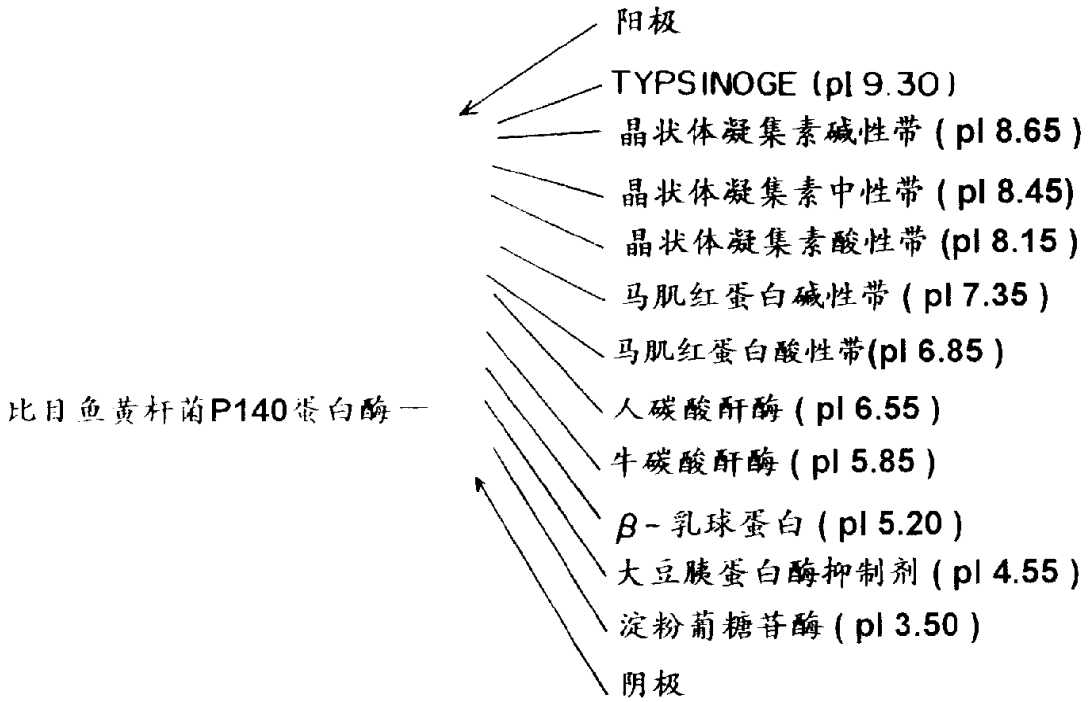

阳极
TYPSINOGE (pI 9.30)
晶状体凝集素碱性带 (pI 8.65)
晶状体凝集素中性带 (pI 8.45)
晶状体凝集素酸性带 (pI 8.15)
马肌红蛋白碱性带 (pI 7.35)
马肌红蛋白酸性带(pI 6.85)
人碳酸酐酶 (pI 6.55)
牛碳酸酐酶 (pI 5.85)
β - 乳球蛋白 (pI 5.20)
大豆胰蛋白酶抑制剂 (pI 4.55)
淀粉葡糖苷酶 (pI 3.50)
阴极
比目鱼黄杆菌P140蛋白酶一

图 9

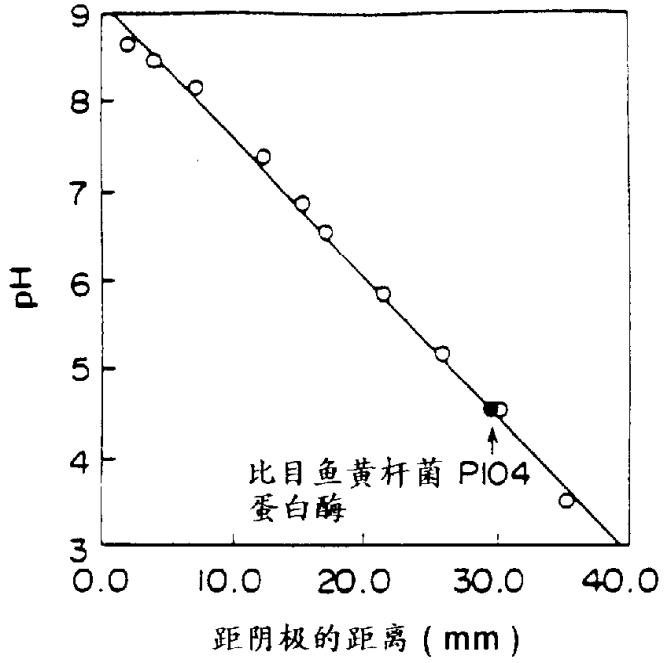

pH
9
8
7
6
5
4
3
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
比目鱼黄杆菌 P104
蛋白酶
距阴极的距离 (mm)

图 10

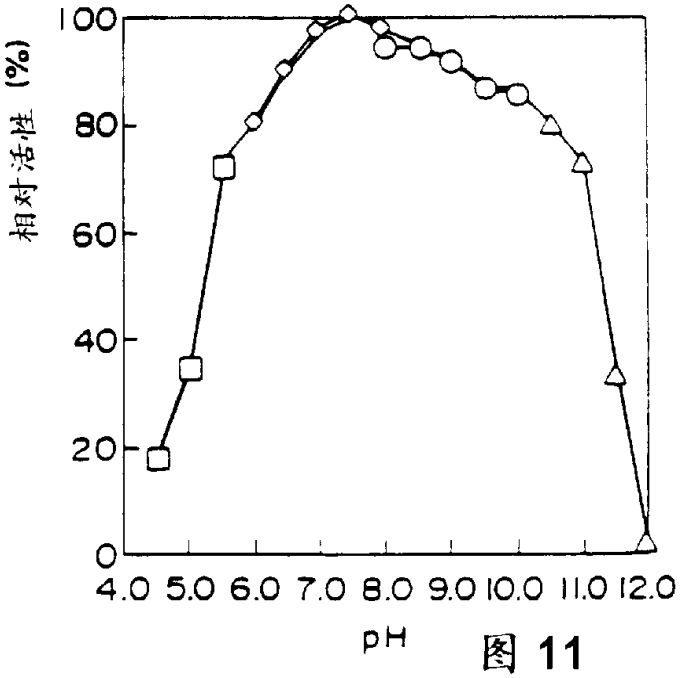

相对活性 (%)
100
80
60
40
20
0
4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 9.0 10.0 11.0 12.0
pH

图 11

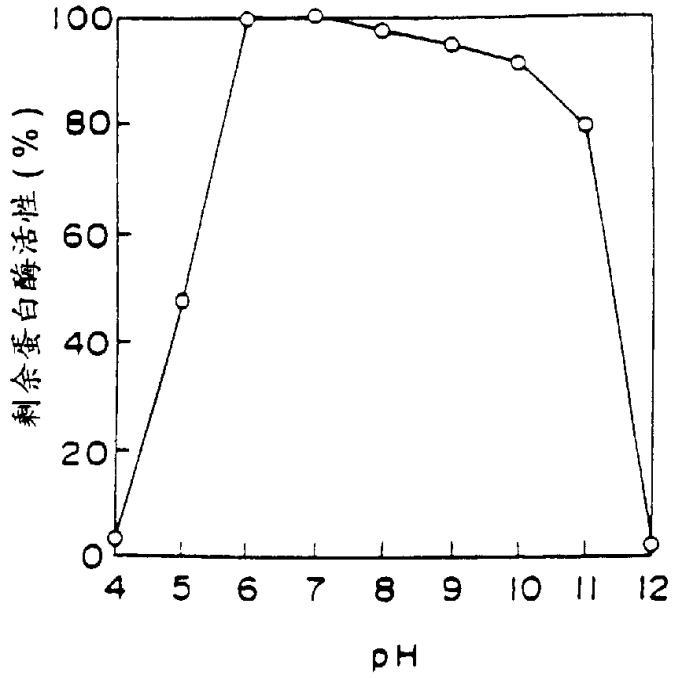

剩余蛋白酶活性（%）
100
80
60
40
20
0
4 5 6 7 8 9 10 11 12
pH

图 12

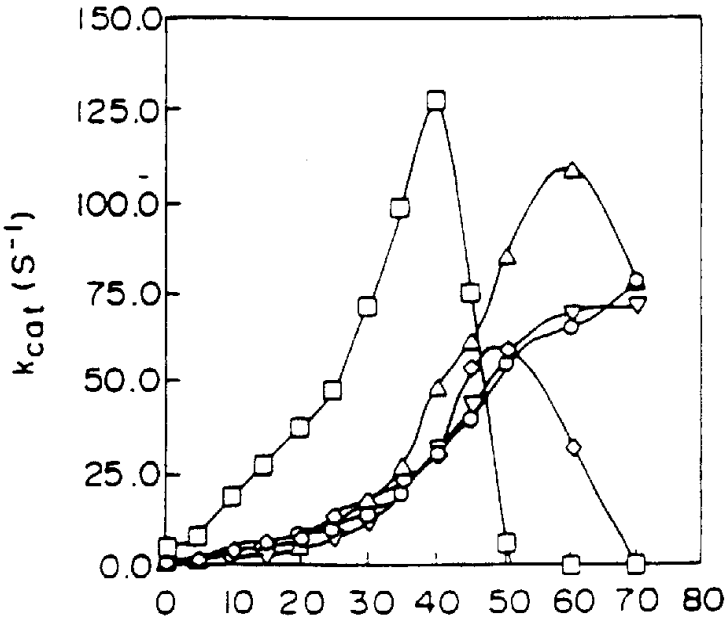

k_{cat} (S^{-1})
150.0
125.0
100.0
75.0
50.0
25.0
0.0
0 10 20 30 40 50 60 70 80
温度（°C）

图 13

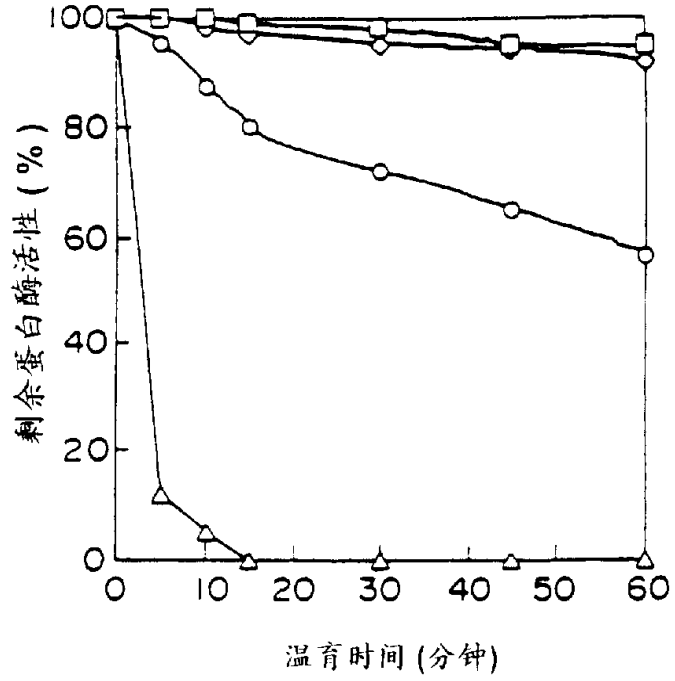

100
80
60
40
20
0
剩余蛋白酶活性(%)
0
10
20
30
40
50
60
温育时间(分钟)

图 14

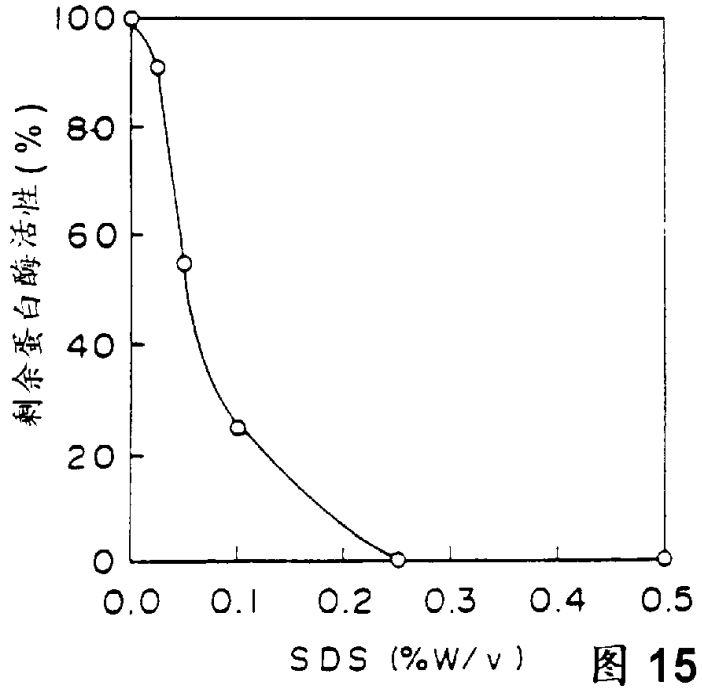

100
80
60
40
20
0
剩余蛋白酶活性(%)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
SDS (%W/v)

图 15

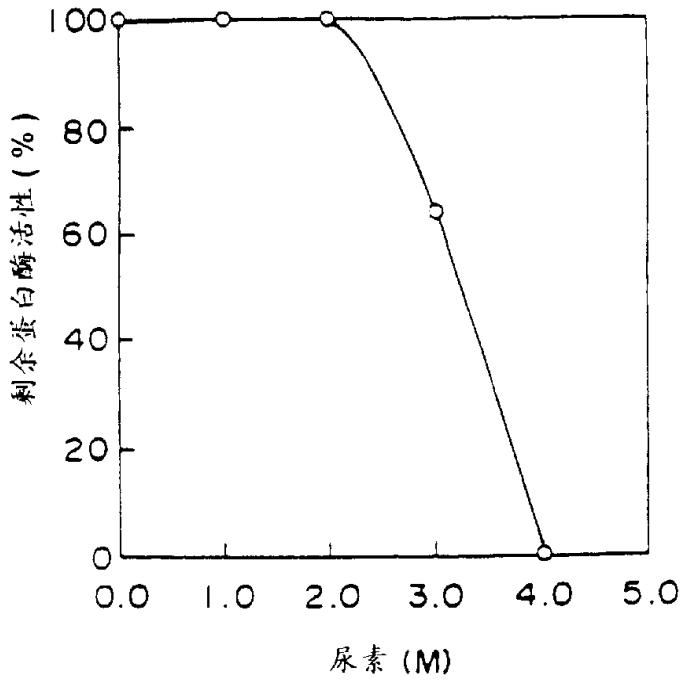


图 16

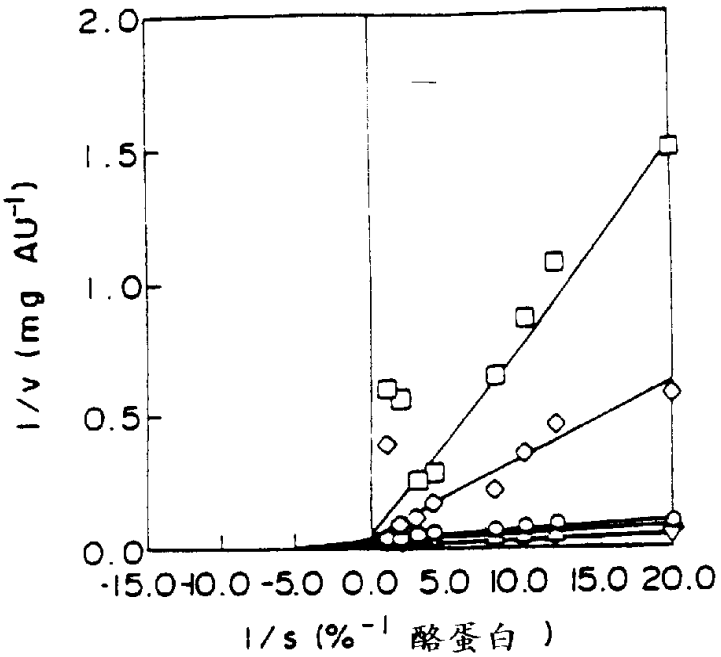

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1/v (mg AU⁻¹)
-15.0 -10.0 -5.0 0.0 5.0 10.0 15.0 20.0
1/s (%⁻¹ 酪蛋白)

图 17 A

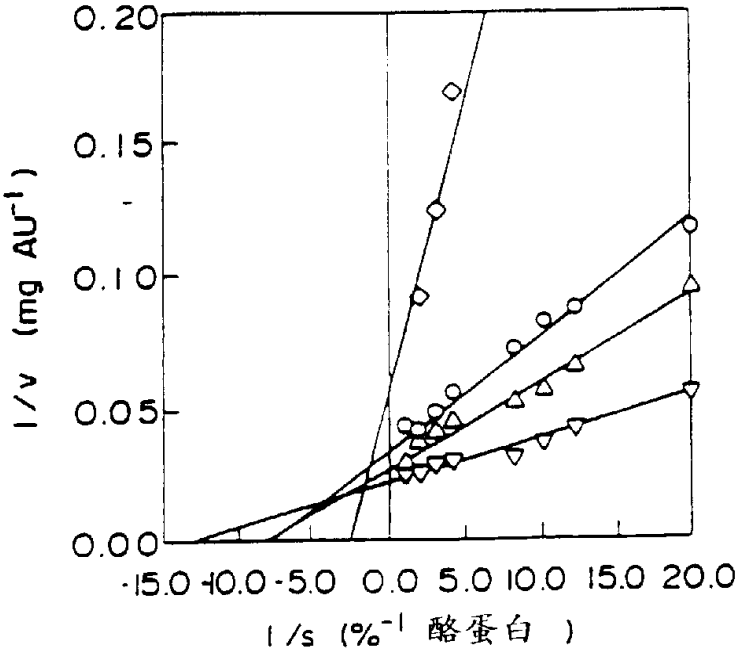

0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
1/v (mg AU⁻¹)
-15.0 -10.0 -5.0 0.0 5.0 10.0 15.0 20.0
1/s (%⁻¹ 酪蛋白)

图 17 B