

## 植物细胞离析酶的制备和应用

林开江 袁康培 王坤元 陈 兵 董国强

(浙江省农业科学院微生物研究所, 杭州 310021)

**摘 要** 用 *Aspergillus* sp. A-19 菌经固体发酵研制成一种新的植物细胞离析酶 (Separatase ZA-P)。其离析单细胞的酶活力平均为 70 767u/g, 有效作用的 pH 在 3.0—7.0, 温度为 20—45℃。发酵培养基配方是麸皮: 桔皮粉:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (w/w) 为 100:100:0.63, 料水比为 1:2.0, 培养适宜条件为 25℃、60 小时。

**关键词** *Aspergillus* sp., 植物细胞离析酶, 原生质体

植物细胞离析酶是一种生物技术工具酶, 其作用是把植物组织分离成单细胞, 与纤维素酶配合使用制备高等植物原生质体, 也可用于提取 DNA<sup>[1]</sup>、细胞器<sup>[2]</sup>以及植物病毒<sup>[3]</sup>等。不少微生物能产生分离植物单细胞的酶<sup>[4-8]</sup>, 但植物病原菌和放线菌所产生的酶对植物原生质体的活性可能有毒害, 没有在实际中应用, 只有 *Rhizopus* 和 *Aspergillus* 被用来生产植物细胞离析酶<sup>[9-13]</sup>。本文报道植物细胞离析酶 Separatase ZA-P (以下简称 ZA-P) 的制备和应用效果。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

ZA-P 的生产菌种为我们自选出的 *Aspergillus* sp. A-19<sup>[14]</sup>。

Macerozyme R-10 和 Pectolyade Y-23 (以下简称 R-10 和 Y-23) 直接来自日本 Yakult Honsha 公司和 Seishin Pharmaceutical 公司。其它试剂均为分析纯。

马铃薯块茎购自市场, 甘蓝叶片采自田间。

#### 1.2 方 法

**1.2.1 酶活力测定:** 离析酶: 参照 Ishii 的方法<sup>[9]</sup>测定。蛋白酶: 按轻工部食品局〔80〕轻食发字第 2 号文件中规定的方法测定。纤维素酶: 按 Mandels 的方法<sup>[15]</sup>测定。果胶酶: 吸适当稀释的酶液 0.5ml 于 1.8×18cm 的试管中, 加 0.50% 的果胶液 (用 pH4.6 的缓冲液配制) 0.5ml 及 pH4.6 的磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲液 1.0ml, 50℃ 保温 30 分钟, 每管加 DNS 液 3ml, 加热煮沸 5—10 分钟显色, 加水 16ml, 于 721 型分光光度计 550nm 处比色。在上述条件下分解果胶每小时产生 1mg 还原糖的酶量定为 1 个酶活力单位。

**1.2.2 发酵培养及酶的制备:** 试验均在 300ml 三角瓶中进行, 每瓶装干料 20g。完成培养后按 1:5 的料水比加冷开水捣碎浸泡 2 小时, 挤去残渣, 过滤获得酶液。取 50ml 酶液于 150ml 三角瓶中, 加入 1.5g 甘蓝叶片细条 (0.1—0.2×1.0cm), 35℃、140r/min 振

荡 6 小时, 经 40 目尼龙纱过滤, 测量单细胞体积, 以此表示酶液对叶肉组织离析作用的强弱。制片镜检酶液对细胞的影响。

## 2 结果与讨论

### 2.1 发酵条件试验

**2.1.1 培养基配方:** 在麸皮中添加桔皮粉和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  对 A-19 产酶有明显的促进作用 (表 1, 2), 添加黄豆饼粉、米糠以及  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{CoCl}_2$  等没有多大的促进作用, 而  $\text{NaNO}_3$  还有反作用。故选用的培养基为麸皮: 桔皮粉:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (w/w) 为 100:100:0.63。

表 1 培养料中桔皮粉加量对产酶的影响

Table 1 The effect of content of orange-peel powder in medium on enzyme production

Wheat bran : orange peel powder (w/w)	Single cell volume (ml)	Cell damage
3 : 1	1.66	Most cracked
1 : 1	2.40	Intact
1 : 3	1.28	All cracked

表 2 培养料中硫酸铵加量对产酶的影响

Table 2 The effect of ammonium sulphate content in medium on enzyme production

Ammonium sulphate (% , w/w)	Single cell volume (ml)	Cell damage
2.50	1.95	Intact
1.25	2.50	Intact
0.63	2.78	Intact
0.31	2.68	Intact
0.16	2.54	Intact
0.00	1.81	Intact

**2.1.2 料水比:** 当料水比为 1:1.5, 2.0,

2.5 和 3.0 时, 单细胞体积分别为 1.95,

2.42, 2.31 和 1.64ml, 可见料水比以 1:2.0—2.5 为宜。

**2.1.3 培养基起始 pH:** 当起始 pH 值为 4.0, 5.0, 6.0, 7.8, 8.0 和 9.0 时, 单细胞体积分别为 1.20, 1.14, 1.29, 1.31, 1.52 和 0.98ml, 说明起始 pH 值对产酶有一定的影响, 以中性或微碱性对产酶较有利。

**2.1.4 发酵温度与时间:** 温度以 25℃, 时间以 60 小时产酶较多 (表 3), 酶液的质量也好, 被处理的细胞不受损伤。随着温度的升高和时间的延长, 酶液对细胞的破损程度会增加。

### 3.2 酶的制备、性质和应用

**3.2.1 酶的制备:** 按 1:5 的料水比在完成发酵的培养料中加入 1.0%NaCl 溶液, 捣碎后浸泡 2 小时, 过滤, 除去残渣, 即得粗酶液, 然后按下列顺序纯化: 粗酶液→澄清处理→清酶液→加 60% (w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (饱和度为 85%) 盐析→静置 1 小时过滤→酶泥加水复溶→过滤去除沉淀→清酶液→采用国产 1 号通用树脂脱色 (透明度达 70%以上)→超滤浓缩 (超滤膜的截留分子量为 10 000, 型号为 XHH-1)→ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  盐析 (用量同上)→酶泥→干燥→脱盐→干燥磨粉 (或在超滤浓缩后直接冷冻干燥、磨粉)。以上纯化过程中不调 pH, 超滤温度为 15℃左右, 盐析在室温下进行。

表 3 培养温度与时间对产酶的影响  
Table 3 The effect of culture temperature and period on enzyme production

Temperature (°C)	Period (h)	Single cell volume (ml)	Cell damage
25	48	2.68	Intact
	60	3.56	Intact
	72	2.63	Most intact
	84	1.03	All cracked
27	48	3.10	Intact
	60	3.17	Intact
	72	1.96	Most intact
	84	0.70	All cracked
29	48	3.47	Intact
	60	3.22	Intact
	72	1.05	Most intact
	84	0.59	All cracked
31	48	3.08	Intact
	60	3.28	Intact
	72	2.00	Most intact
	84	0.74	All cracked

3.2.2 酶的性质: ZA-P 粉末呈淡黄褐色, 溶液透明无沉淀。离析酶活力平均为 70767 u/g, 高于 Y-23, 远高于 R-10 (表 4)。ZA-P 中各种酶的含量见表 5。其有效作用的 pH

表 4 3 种离析酶的活力比较

Table 4 The activities of three kinds of macerating enzymes

Maceration enzyme	Special Activity (u/g)			Average
	I	II	III	
separatase ZA-P	96 000	66 300	50 000	70 767
Pectolyase Y-23	80 000	64 300	29 000	57 767
Macerozyme R-10	14 000	13 000	12 000	13 000

表 5 Separatase ZA-P 中各种酶的含量  
Table 5 Enzymatic composition of separ-  
ratase ZA-P

Assayed enzymes	Special activity (u/g)
Cellulase	
FPA	16.27
C <sub>1</sub>	6.5
C <sub>x</sub>	23.2
Pectinase	17 000—22 000
Protease (acid)	38 200
Protease (neutral)	1 640
Chitinase	Trace

范围为 3.0—7.0, 最适 pH4.4 左右 (图 1)。ZA-P 中果胶酶酶解果胶的适宜温度为 15—60°C, 最适在 50°C 左右; 离析植物细胞的适宜温度为 20—45°C, 最适在 40°C 左右 (图 2)。但在实际应用时, 考虑到 pH 和温度对原生质的影响, 认为 pH 以 5.0—5.5。温度以 30—35°C 为宜。

经一些大学和科研单位试用表明 ZA-P 制备植物原生质体的效果相当于或超过 Y-23, 而远优于 R-10 (表 6), 对原生质体无毒害作用。中国水稻研究所用该酶与我们研制的纤维素酶 Cellulase ZA-P 混合制

备的水稻原生质体已再生成植株。

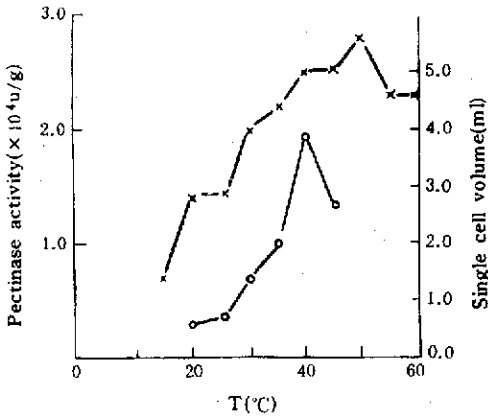


图 1 Separatase ZA-P 酶活力与 pH 的关系  
Fig. 1 Special activity of separatase ZA-P in various pH

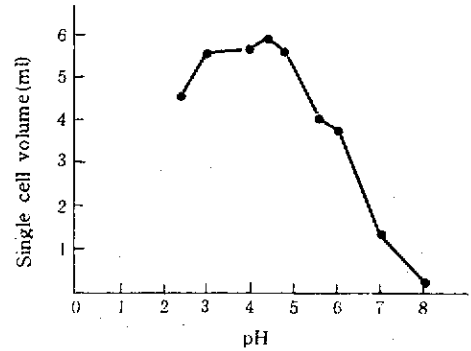


图 2 Separatase ZA-P 酶活力与温度的关系  
Fig. 2 Special activity of separatase ZA-P in different temperature  
x—x Pectinase activity  
o—o Single cell volume

表 6 Separatase ZA-P 分离植物原生质体的效果

Table 6 The effect of Separatase ZA-P on protoplast preparation

Material	Enzyme solution (%)	Number of protoplast ( $\times 10^6$ )	Material	Enzyme solution (%)	Number of protoplast ( $\times 10^6$ )
Rice	S 0.05 +RS 2.0	7.18	Wheat	S 0.10 +OR 2.0	5.20
	S 0.05 +C 2.0	7.00		Y-23 0.10 +OR 2.0	3.50
	Y-23 0.05 +RS 2.0	6.25		MR 0.10 +OR 2.0	1.10
	S 0.05 +OR 2.0	6.15	Millet	S 0.10 +OR 2.0	6.60
	Y-23 0.05 +OR 2.0	5.15		Y-23 0.10 +OR 2.0	3.40
Barley	Y-23 0.10 +RS 2.0	47.60	MR 0.10 +OR 2.0	0.70	
	Y-23 0.10 +C 2.0	37.90	Alfalfa	S 0.05 +C 1.0	2.80
	S 0.10 +RS 2.0	52.10		Y-23 0.05 +C 1.0	1.80
	S 0.10 +C 2.0	40.90		MR 0.50 +C 1.0	1.00

S; Separatase ZA-P, MR; Macerzyme R-10, Y-23; Pectolyase Y-23, C; Cellulase ZA-P, OR; Onozuka R-10, RS; Onozuka RS

3.2.3 细胞离析酶的应用：果胶质广泛存在于高等植物的茎、叶、果实等组织中，是植物细胞间质的重要组成部分，起细胞粘合剂的作用。植物细胞离析酶的作用是分解植物组织中的果胶质，使粘结在一起的细胞离解成单个细胞。高质量的植物细胞离析酶应具有均衡的多种果胶酶成分，而且还应包含一种低分子蛋白质，这种蛋白质本身无果胶酶活性，但能增强果胶酶离析单细胞的作用<sup>[16,17]</sup>。用化学方法测出的果胶酶活力往往与分离单细胞的实际效果不一致〔与 Ishii 个人通信〕。日本一些公司和我们目前均采用以马铃薯块茎为材料的生物测定法来检测植物细胞离析酶的活力。此法简便，比较接近实际，但因马铃薯生产有季节性，新鲜的与经过贮藏的马铃薯由于其块茎内部本身存在酶系的活动，可能造成细胞间的果胶质发生变化，因而采用不同时期马铃薯作为测定材料，所得的结果

有一定的差别; 其次, 马铃薯块茎的果胶质与各种高等植物细胞间存在的多种多样的果胶类物质有差异, 故用马铃薯块茎为材料不能反映出植物细胞离析酶作用的广谱性。如用生物测定法时, R-10 的酶活力为 ZA-P 的 1/5—1/4 但用 10 倍于 ZA-P 浓度的 R-10 制备苜蓿原生质体时, 其效果还不及 ZA-P (表 6)。尽管 R-10 的酶活力不算太低, 但其制备禾本科植物原生质体的效果也不佳。所以, 在客观反映植物细胞离析酶活力的简便测定方法方面, 还有待进一步探讨。

### 参 考 文 献

- [1] Suauki M *et al.* Z Pflanzenphysiologie, 1987, 89 : 297—311.
- [2] Nishimura M *et al.* Plant Physiol, 1976, 58:309—314.
- [3] Takebe I. Annual Review of Phytopathology, 1975, 13 : 105—125.
- [4] Hasagawa S *et al.* J Food Sci, 1966, 31 : 838.
- [5] Nagel J D *et al.* Appl Microbiol, 1970, 20 : 374.
- [6] Macmillan J D *et al.* Biochemistry, 1964, 3 : 564.
- [7] Okamoto K *et al.* Agr Biol Chem, 1964, 28 (2) : 331.
- [8] Sato M *et al.* Agr Biol Chem, 1975, 39 (4) : 819—824.
- [9] Ishii S *et al.* Phytopathology, 1976, 66 : 281—289.
- [10] Ishii S *et al.* Agr Biol Chem, 1975, 39 (2) : 313—321.
- [11] Ishii S *et al.* Agr Biol Chem, 1972, 36 (11) : 1885—1893.
- [12] Suzuki H *et al.* J Ferment Technol, 1967, 45 : 73—85.
- [13] Suzuki H *et al.* J Ferment Technol, 1967, 45 : 1080—1088.
- [14] 袁康培等. 浙江农业学报, 1991, 3 (2) : 86—91.
- [15] Mandels R and Weber J. Adv Chem, 1969, 95 : 391—414.
- [16] Ishii S *et al.* Pytopathology, 1976, 66 : 1077—1081.
- [17] Ishii S *et al.* Pytopathology, 1977, 67 : 994—1000.

## Preparation and Application of Maceration Enzyme from *Aspergillus* sp.

Lin Kaijiang · Yuan Kangpei · Wang Kunyuan · Chen Bin · Dong Guoqiang

(Institute of Microbiology, Zhejiang Academy of Agriculture Sciences, Hangzhou 310021)

**Abstract** Separatase ZA-P, a new enzyme for the maceration of plant cells, was prepared from *Aspergillus* sp. A-19 by solid fermentation. Its average activity to macerate the plant tissues into single cells was assayed as 70 767 u/g. The optimum pH for the maceration of plant cells was 3.0—7.0, and the optimum temperature was 20—45°C. The culture medium for the strain consisted of wheat bran, orange peel powder and ammonium sulphate in the ratio of 100 : 100 : 0.63. The ratio of the dry materials to the water (w/v) was 2.0 for the culture medium. The optimum culture condition was of 25°C, and 60 hours.

**Key words** Maceration enzyme, protoplast, *Aspergillus* sp.