

文章编号:1671-6833(2010)01-0070-04

产高温碱性蛋白酶菌株筛选及酶学性质研究

翁海波, 敬蔚然, 杨丹丽, 柳丽平, 王志强

(郑州大学 生物工程系, 郑州 河南 450001)

摘要:从高温堆肥土样中筛选到一株高产蛋白酶的菌株,经鉴定为 *Bacillus subtilis*,命名为 I15.对最适产酶发酵条件进行了优化,并研究了发酵产蛋白酶的酶学性质.结果表明,玉米淀粉和豆饼粉是该菌发酵产蛋白酶的最适经济碳氮源;该蛋白酶属高温碱性蛋白酶,具有很强的热稳定性和酸碱稳定性.另外,突出的性质是该蛋白酶对表面活性剂和温和型去垢剂具有超强的耐受性,将具有广阔的市场前景.

关键词:高温碱性蛋白酶;筛选;酶学性质

中图分类号:Q55 **文献标识码:**A

0 引言

蛋白酶是工业用酶中最为重要的一种酶,其销售额占酶制剂总销售额的近60%^[1].蛋白酶按其pH值分为酸性蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶.碱性蛋白酶是商品蛋白酶中应用最广、产量最大的一类蛋白酶^[2],占世界总酶产量的30%^[3],具有相当大的工业化前景^[4].可应用于洗涤剂,皮革加工,银回收,医疗,食品加工,饲料和化学工业以及废物处理^[5-6].然而,在工业化应用中很多碱性蛋白酶存在弊端,例如在表面活性剂、氧化剂、高温环境中活力不高,稳定性较差,培养基成本较高等.

笔者从高温堆肥中筛选出来的产高温碱性蛋白酶菌株,其发酵所产的蛋白酶具有良好的热稳定性和酸碱稳定性,并对表面活性剂、温和型去垢剂有超强的耐受性,具有巨大的潜在应用价值.

1 材料与方法

1.1 菌株

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* I15,为研究者从高温堆肥土样筛选到的一株高产蛋白酶的菌株.

1.2 仪器及试剂

pH计,722型分光光度计,恒温水浴锅,高速冷冻离心机,福林试剂,1%酪素.

1.3 培养基

① LB 平板培养基.

② 筛选平板培养基:葡萄糖1%,蛋白胨0.5%,氯化钠1%,脱脂奶粉2%,琼脂粉1.5%.

③ 种子培养基:LB 液体培养基.

④ 基础培养基的质量分数:葡萄糖1%,酵母提取物0.5%,氯化钠1%,pH 7.0.

⑤ 产酶培养基的质量分数:玉米淀粉1.2%,豆饼粉0.3%,氯化钠1%,CaCl₂ 1 mmol·L⁻¹,MgCl₂ 1 mmol·L⁻¹,pH 8.0.

1.4 分离、筛选和鉴定

1.4.1 分离

将富集的土壤悬液按每级稀释10倍的次序得到10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ mol·L⁻¹的悬液,并从中各吸取0.2 mL稀释液,加到筛选平板培养基内,用涂棒涂匀,在37℃培养箱中培养48 h.

1.4.2 耐热蛋白酶菌株的初筛(透明圈法)^[7]

用牙签将分离得到的单菌落点到筛选平板上,50℃培养箱培养48 h,观察透明圈大小,记录透明圈直径.

1.4.3 耐热蛋白酶菌株的复筛(发酵产酶)

将产生较大透明圈的18个菌株,接种在基础培养基中,37℃培养24 h发酵产酶,发酵液10 000 r·min⁻¹低温离心15 min,测蛋白酶活性.确定最优菌株,并划线保存在LB平板培养基上.

收稿日期:2009-08-11;修订日期:2009-10-28

基金项目:河南省重点科技攻关项目(072102220002)

通信作者:翁海波(1974-),男,河南清丰人,郑州大学副教授,研究方向为微生物学. E-mail: hbweng@163.com.

1.4.4 菌株的鉴定

1.4.4.1 菌株的形态学鉴定

革兰氏染色法和显微镜镜检

1.4.4.2 菌株的基因鉴定

菌株的基因鉴定采用16S基因序列分析的方法.以过夜菌液为模板,PCR扩增其16S序列,扩增引物为16SF(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和16SR(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'),PCR反应程序为:94℃预变性5min,94℃变性30s,54℃退火30s,72℃延伸90s,34个循环,72℃延伸5min.扩增产物与T载体连接并转化大肠杆菌DH5 α ,筛选出阳性克隆进行DNA测序.扩增引物的合成和16S序列测定均由上海生工生物技术有限公司完成.将16S基因序列在GeneBank中进行Blast,确定其菌属.

1.5 菌株的培养及酶液的制备

①从平板中挑单菌落接种到50mL种子培养基中,37℃摇床培养至OD₆₀₀=0.5~0.6.

②以5%的接种量将种子培养液转接于装有50mL基础培养基的三角瓶中,37℃摇床振荡培养12h.

③将发酵液10000r·min⁻¹低温离心15min,上清液即为酶液,4℃保存备用.

1.6 蛋白酶活力测定

采用Kazumi Hiraga^[8]等使用的方法,并参照我国轻工行业标准QB/T 1803-1993中蛋白酶的试验方法,在pH 8.0,65℃下测定酶活力,即:取250 μ L质量分数1%的酪素(pH 8.0的缓冲液配制)65℃水浴5min,然后加入以相同缓冲液作适当稀释的酶液250 μ L反应10min,最后加入500 μ L 0.4mol·L⁻¹三氯乙酸(TCA)终止反应.离心后取500 μ L上清液于试管中,依次加入2.5mL 0.4mol·L⁻¹Na₂CO₃和500 μ L福林试剂,混匀后40℃保温显色20min,用分光光度计测定680nm处吸光值.对照组在反应前加入TCA,其余条件相同.

酶活定义:将在上述条件(标准条件)下催化酪素水解,每分钟释放出1 μ g酪氨酸所需要的酶量定义为1个酶活力单位,用U·mL⁻¹表示.

1.7 产蛋白酶条件的优化

单因子实验优化该菌产蛋白酶的发酵条件.

1.8 部分酶学性质的研究

在最佳发酵条件下进行发酵产酶,制得酶液,分别研究pH、温度、各种离子对酶促反应的影响,以及酶的热稳定性、酸碱稳定性和蛋白酶抑制

剂、表面活性剂、氧化剂对酶活的影响.

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选与鉴定

2.1.1 菌株的筛选

透明圈法初筛共获得18株有不同大小透明圈的菌株,经发酵产酶复筛后,获得一株产酶量最高的菌株,命名为I15.

2.1.2 菌株的鉴定

2.1.2.1 菌株的形态学鉴定

革兰氏染色呈蓝紫色,该菌为革兰氏阳性菌,此菌LB平板培养菌落近圆形,边缘不整齐,不透明,表面有散射式褶皱,不光滑,液体静置培养表面会形成菌膜.显微镜检菌株为直杆状,链状排列,菌体两端为圆形,大小(15~18)×(210~215) μ m.芽孢近中生,有运动性.

2.1.2.2 菌株的种属鉴定

测序结果在GeneBank中进行Blast比对,I15菌株16S的rDNA序列与枯草芽孢杆菌16S的rDNA序列同源性为100%.因此鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),命名为*B. subtilis* I15.此菌株的16S rDNA序列已上传到Genebank上,序列号为EU152227.

2.2 产蛋白酶条件的研究

通过简单的单因子实验优化,该菌产蛋白酶的最适碳源为质量分数1.2%的玉米淀粉,最适经济氮源为质量分数0.3%豆饼粉.最适发酵初始pH为8.0,最适发酵温度为37℃,最适接种量为7%,150mL最适摇瓶装量为40mL.摇床培养16h,最大产酶量为3884.64U·mL⁻¹.

2.3 酶学性质研究

2.3.1 酶的最适温度

酶液用pH为8.0的Tris-HCl缓冲液适当稀释,再与质量分数1%的酪素混合,在不同温度下分别反应10min,Folin法测酶活力,结果如图1,该酶的最适反应温度为65℃,且在70℃时仍有较高活性.

2.3.2 酶的最适pH

采用HAc-NaAc(pH5.0)、Na₂HPO₄-NaH₂PO₄(pH6.0)、Tris-HCl(pH7.0~8.0)、Gly-NaOH(pH9.0~10.0)以及Na₂HPO₄-NaOH(pH11.0)组成的缓冲系统配制质量分数1%的酪素,分别与以相应缓冲液稀释的酶液混合后65℃反应10min,测定蛋白酶在一系列pH条件的酶活性,结果如图2所示.该酶的最适pH为

8.0,且在 pH 为 6~11.0 均具有较高活性。

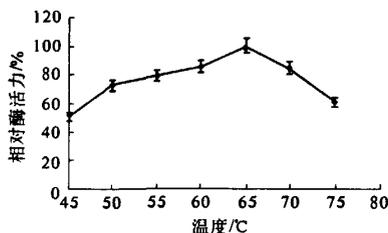


图1 酶的最适作用温度

Fig.1 Optimum temperatures of protease

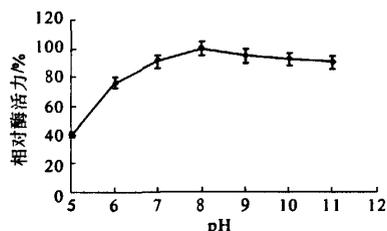


图2 酶的最适作用 pH

Fig.2 Optimum pH of protease

2.3.3 不同离子对酶活的影响

酶液中加入不同离子,使各离子终浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,在标准条件下测定酶活性,结果见表 1。

表 1 不同离子对酶活性的影响

Tab.1 Effects of different ions on protease activity

不同离子/ ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	相对酶活力 /%	不同离子/ ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	相对酶活力/ %
对照	100.00	Ag^+	94.63
Co^{2+}	7.05	Fe^{3+}	0.00
Cu^{2+}	0.00	Hg^{2+}	24.36
Ba^{2+}	100.19	Ca^{2+}	108.93
Pb^{2+}	27.93	Zn^{2+}	0.00
Bi^{2+}	45.24	Mg^{2+}	101.55
Al^{3+}	0.00	Mn^{2+}	0.00
Ni^{2+}	28.00	Sr^{2+}	108.85

2.3.4 酶的热稳定性

酶液分别在 40、50、60、70 °C 保温 3 h,在标准条件下,每隔 30 min 测定一次酶活力,结果如图 3 所示。该酶在 50 °C 保温 3 h,酶活性几乎没有下降,70 °C 时半衰期为 2.5 h。

2.3.5 酶的酸碱稳定性

酶液分别在一系列 pH 缓冲液系统中 25 °C 保存 1 h 和 24 h 后,在标准条件下测定酶活力,结果如图 4,该酶在各种缓冲液中保存 24 h 后其残

余酶活性均较高,在 pH 7~11 能保持至少 82% 的酶活,显示其极好的酸碱稳定性,在 pH 为 8 时最稳定。

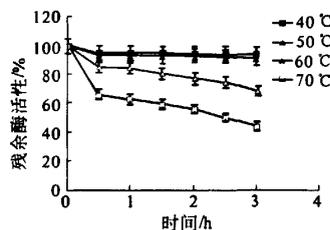


图3 酶的热稳定性

Fig.3 Temperature stability of protease

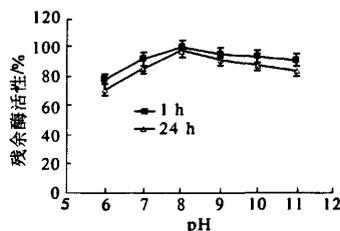


图4 酶的 pH 稳定

Fig.4 pH stability of protease

2.3.6 抑制剂与蛋白酶的酶活

酶液与丝氨酸类蛋白酶抑制剂 PMSF 和金属离子蛋白酶抑制剂 EDTA 按照表 2 所示浓度混合,25 °C 放置 1 h,在标准条件下测其酶活力,结果如表 2 所示,蛋白酶几乎能被 PMSF 和 EDTA 完全抑制。

表 2 抑制剂对酶活性的影响

Tab.2 Effects of inhibitors on protease activity

抑制剂	类型	浓度 /($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	残余酶活力 /%
PMSF	丝氨酸类抑制剂	1	22.28
		5	21.38
		10	19.94
EDTA	金属离子抑制剂	1	92.16
		5	59.46
		10	13.61

2.3.7 不同化学试剂对酶活的影响

酶液与不同试剂包括去垢剂,表面活性剂和氧化剂按表 3 所示浓度混合,25 °C 放置 1 h,在标准条件下测其酶活力,结果如表 3 所示,表面活性剂和温和型去垢剂对该酶几乎没影响,反而提高了酶活性。该酶的这一特性,使其可以用做洗涤剂的添加剂或用于皮革工业等。

表3 不同化学试剂对酶活的影响

Tab.3 Effect of different chemicals on protease activity

化学试剂	浓度/%	残余酶活力/%	化学试剂	浓度/%	残余酶活力/%
SDS	0.5(w/v)	55.16	Tween80	1(v/v)	112.55
	1(w/v)	30.98		5(v/v)	106.49
TritonX-100	1(v/v)	112.16	H ₂ O ₂	1(v/v)	87.48
	5(v/v)	120.53		5(v/v)	60.82
Tween20	1(v/v)	112.48	NP-4	1(v/v)	102.62
	5(v/v)	118.12		5(v/v)	101.13

3 结论

上述结果表明,从高温堆肥土样中筛选到的枯草芽孢杆菌 I15 产高温碱性蛋白酶,产酶培养基的主要成分是玉米淀粉和豆饼粉,其来源广,价格低,可以有效降低投入产出比.在优化后的条件下,37 ℃ 培养 16 h 即达产酶高峰为 3 884.64 U · mL⁻¹.蛋白酶的最适反应温度为 65 ℃,具有较好的热稳定性,70 ℃ 时半衰期为 2.5 h;该蛋白酶适应较宽的 pH 谱,其最适反应 pH 为 8.0,且在此 pH 下也具有最强的酸碱稳定性,在 pH 7 ~ 11 能保持至少 82% 的酶活.上述表明该蛋白酶属于高温碱性蛋白酶.而且该酶对表面活性剂和去垢剂具有超强的耐受性,其在表面活性剂中 25 ℃ 保存 1 h,酶活性反而有所提高,在去垢剂中保存 1 h,仍然有较高的活性.本研究结果希望为碱性蛋白酶在工业中的应用提供一定参考.

参考文献:

- [1] MITRA P, CHAKRAVERTY R, CHANDRA A L. Production of proteolytic enzymes by solid state fermentation - an overview[J]. *Sci Ind*, 1996, 55:439 - 442.
- [2] 黄志强,林白雪,谢联辉.产碱性蛋白酶海洋细菌的筛选与鉴定[J].福建农林大学学报:自然科学版,2006, 35(4):416 - 420.
- [3] HORIKOSHI K. Alkalophiles - from an industrial point of view[J]. *FEMS Microbiol* 1996, 18:59 - 70.
- [4] ELIBOL M, MOREIRA A R. Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid substrate fermentation[J]. *Process Biochem* 2005, 40:1951 - 1956.
- [5] WISEMAN A. Designer enzyme and cell applications in industry and in environmental monitoring[J]. *Chem Technol Biotechnol*, 1993, 53:3 - 13.
- [6] ZAMOST B L, Nielsen H, Starnes R. Thermostable enzymes for industrial applications[J]. *Ind Microbiol* 1991, 8:71 - 82.
- [7] 于宏伟,栗志丹,郝珊珊,等.蛋白酶产生菌的筛选及酶学性质研究[J].农产品加工,2006(10):67 - 68.
- [8] KAZUMI H, YASUSHI N, SIRILAK N, et al. Purification and characterization of serine proteinase from a halophilic bacterium, *Halobacillus* sp. RF2 - 5[J]. *BioSci. Biotechnol. Biochem*, 2005, 69 (1):38 - 44.

Screening and Characterization of an Thermophilic Alkaline Crude Protease from an Isolated Strain of *Bacillus subtilis* I15

WENG Hai - bo, JING Wei - ran, YANG Dan - li, LIU Li - ping, WANG Zhi - qiang

(Department of Bioengineering of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: A strain producing higher activity protease named *Bacillus subtilis* I15 is isolated and identified from waste - rich soil which stacked high temperature and long time. We optimize the fermentation conditions of this strain and study a part of enzymology properties. The results show that corn starch and soybean cake powder are the optimization of this strain as carbon and nitrogen source for thermophilic alkaline protease production. The protease belongs to thermophilic alkaline protease, which shows high pH stability and thermal stability. In addition, it shows excellent stability and compatibility with surfactant and detergent. These properties indicate that the protease has a bright market prospect.

Key words: thermophilic alkaline protease; screening; characterization