

蛋白酶产生菌的化学诱变及酶学性质*

马宏宇 李菁菁 祁高富 喻子牛 赵秀云**

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 对1株产蛋白酶的枯草芽胞杆菌(Z5)进行化学诱变,筛选得到1株产较高酶活性、大分子质量蛋白酶的菌株。检测该蛋白酶对底物明胶的分解能力,发现该蛋白酶的分子质量约为100 ku,还原剂巯基乙醇对其活性的影响较大。在不同温度、不同pH值处理该蛋白酶后,用茚三酮法测定酶活性,发现该蛋白酶催化反应的最适pH为6,最适温度为50℃,并且该蛋白酶有较好的热稳定性,70℃处理10 min仍能保留50%左右的酶活性。由于此蛋白酶在分子质量及最适pH方面均不同于已报道过的枯草芽胞杆菌蛋白酶,推测其为一种新型的蛋白酶。

关键词 枯草芽胞杆菌;蛋白酶;化学诱变;酶学性质

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)06-0737-04

由于蛋白酶种类的多样性和水解活性的专一性,在食品、饲料、皮革、医药、日用化学工业生产中应用广泛^[1-2],蛋白酶已成为三大主要酶制剂之一,在工农业生产和人们的生活中发挥着重要的作用^[3-5]。蛋白酶种类很多,重要的有胃蛋白酶、胰蛋白酶、组织蛋白酶、木瓜蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶等。蛋白酶分布广,主要存在于人和动物的消化道中,在植物和微生物中含量也很丰富。由于动植物资源有限,工业上生产蛋白酶制剂主要利用枯草杆菌、栖土曲霉等微生物发酵制备;由于微生物蛋白酶均为胞外酶,与动植物源蛋白酶相比具有下游技术处理相对简单、价格低廉、来源广、菌体易于培养、产量高、高产菌株选育简单、快速,具有动植物蛋白酶所具有的全部特性,因此,易于实现工业化大批量生产。据统计,微生物蛋白酶占据全世界整个酶制剂销售市场的65%的份额^[6]。枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)是工业、农业和医药工业等领域广泛应用的一种细菌。蛋白酶作为枯草芽胞杆菌产生的一种有重要价值的产物早已发挥着重要的作用^[7]。本文报道1株新型蛋白酶高产菌株的诱变、筛选及酶学性质,以期为该酶的进一步研究和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、主要仪器和试剂

枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)为华中农业大

学农业微生物学国家重点实验室保存。离心机型号为5415D,购自Eppendorf公司;恒温摇床型号为HQL150C,购自中国科学院武汉科学仪器厂;生化培养箱型号为LRH-250A,购自广东省医疗器械厂;电泳仪DYY-12型购自北京六一仪器厂。溴酚兰、考马斯亮蓝G-250、过硫酸铵、N',N',N',N'-四甲基氨基甲烷(TEMED)、2-巯基乙醇为Fluka进口分装;三羟甲基氨基甲烷(Tris)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺(Bis)、甘氨酸(Gly)、十二烷基磺酸钠(SDS)、水合茚三酮、抗坏血酸、乙酸、乙酸钠、无水乙醇、三氯乙酸、HgCl₂、盐酸等生化试剂均购自武汉天源生物技术有限公司;干酪素、硫酸二乙酯(DES)、蛋白质分子质量标准为TaKaRa公司产品。

1.2 培养基

LB液体培养基(1 L):蛋白胨10 g,酵母粉5 g, NaCl 10 g, pH调至7.4。

LB固体培养基:在LB液体培养基基础上加1.5%的琼脂。

酪蛋白平板培养基:干酪素10 g,琼脂20 g, pH 7.5,加蒸馏水至终体积1 000 mL。种子培养基(豆粕培养基):豆粕与水按合适的比例进行煮沸2 h,4层纱布过滤,滤液为种子培养基,121℃、30 min湿热灭菌。

发酵培养基:6 g豆粕溶于100 mL水,121℃、30 min湿热灭菌。

收稿日期:2009-12-19;修回日期:2010-06-24

* 国家“863”计划(2006AA10A210)和国家自然科学基金项目(30500332)资助

** 通讯作者。E-mail: xiuyunzh@mail.hzau.edu.cn

马宏宇,女,1983年生,硕士研究生。研究方向:微生物工程与制剂。E-mail: mahongyu06@163.com

营养肉汤培养基:牛肉膏 0.3 g,蛋白胨 1.0 g, NaCl 0.5 g,水 100 mL,pH 7.0~7.2。

1.3 枯草芽胞杆菌(Z5)的化学诱变

挑取已在 LB 固体培养基活化的枯草芽胞杆菌 Z5 接种于 LB 液体培养基中,于 37 °C、200 r/min 摇床振荡培养 24 h。然后按 1% 接种量进行活化培养至对数期, *D* 值达到 0.5~0.6。6 000 r/min,离心 10 min,收集菌体,用无菌生理盐水将菌体洗涤 2 次,再用生理盐水将细菌调至($10^5 \sim 10^8$)/mL,取 20 mL 稀释好的菌液,加入体积分数分别为 0.5%、0.8%、1.2%、1.5%、2.0% 和 2.5% 的硫酸二乙酯(DES),每种诱变 DES 处理的菌体分别在 160 r/min 振荡处理 15、20、25、30、40 min 后加入 0.5 mL 的 25% 硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)终止反应,以加无菌水处理的菌体作空白对照^[8],然后取 100 μL 菌液稀释涂在酪蛋白平板培养基上。

1.4 产高活性蛋白酶枯草芽胞杆菌的筛选

1) 初筛。37 °C 培养 28 h 后,测量并记录透明圈直径 *R*/mm 与菌落直径 *r*/mm 的大小并计算比值 (*R/r*),选出 *R/r* 值较大的菌株进行复筛。

2) 复筛。初筛菌株在豆粕培养基中 37 °C、200 r/min 振荡培养,每隔 12 h 取发酵液,4 °C、8 000 r/min 离心除菌体,上清即为粗酶液,测其蛋白酶活力,选出与出发菌株相比酶活力提高最大的突变菌株。蛋白酶活力测定方法参照文献^[9],酶活定义:1 mL 酶液在 pH 7.6 时,每分钟水解酪蛋白产生 1 μg NH_2 的酶量为 1 个酶活力单位。

1.5 蛋白酶分子质量及最佳产酶时间测定

挑取初步筛选的菌株接种于营养肉汁培养基中,37 °C 震荡培养过夜,然后按 1% 的接种量接种于种子培养基上,120 r/min、37 °C 振荡培养 24 h 作为种子液,再接种于发酵培养基,37 °C、120 r/min 培养,分别于发酵 12、24、36、48、96 h 后取样,12 000 r/min、离心 10 min,检测上清液中蛋白酶活力。同时接种未经诱变的菌株 Z5 做同样的处理为对照。通过改进的 SDS-PAGE 方法检测蛋白酶活力。具体方法和普通 SDS-PAGE 类似,但要在分离胶中加入 1% 体积的明胶作为底物,观测明胶的分解情况,来判断蛋白酶的活力。

1.6 酶学性质的初步研究

1) 蛋白酶最适 pH 和 pH 稳定性。经过 96 h 培养过的粗酶液,在不同的 pH 值的磷酸缓冲液下进行酶促反应测定蛋白酶活性。参照文献^[10]测定蛋

白酶活性。

2) 蛋白酶最适温度和热稳定性。经过 96 h 培养过的上清粗提液分别在 33、37、40、50、60、70、80 °C 进行酶促反应 30 min,参照文献^[10]测定蛋白酶活性。

3) 还原剂巯基乙醇对酶活性的影响。分别用 1、10 mmol/L 的 2-巯基乙醇作为还原剂处理蛋白酶粗提液,在 50 °C 保温 1 h,通过在分离胶中加 1% 明胶作为底物的 SDS-PAGE 的方法,观察明胶的水解情况,检测还原剂对该蛋白酶活性的影响。

2 结果与分析

2.1 菌株的初步筛选

根据平板上酪素的水解情况,测量透明圈直径 *R*/mm 与菌落直径 *r*/mm 的大小并计算水解圈直径和菌落直径的比值 (*R/r*) (表 1),得到 *R/r* 值较大(表明蛋白酶活性较高的菌株)的 16 个菌株作为下一步筛选的试验材料。其中 0.5% 的 DES 处理 Z5 得到 6 株突变株 (Z5-1~Z5-6),1.0% 的 DES 处理 Z5 得到 1 株突变株 (Z5-7),1.5% 的 DES 处理 Z5 得到 2 株突变株 (Z5-8,Z5-9),2.0% DES 稀释度的 7 株 (Z5-10~Z5-16)。

表 1 蛋白酶平板上水解圈直径和菌落直径大小及比值

Table 1 The size of hydrolysis circle diameter and colony diameter and the ratios			
菌落序号 Colony number	透明圈直径(<i>R</i>)/mm Diameter of hydrolysis circle	菌落直径(<i>r</i>)/mm Diameter of colony	<i>R/r</i>
Z5-1	14.5	7.0	2.07
Z5-2	14.0	7.5	1.87
Z5-3	13.5	9.5	1.42
Z5-4	14.5	8.0	1.81
Z5-5	13.0	7.0	1.86
Z5-6	12.0	7.0	1.71
Z5-7	11.5	6.5	1.77
Z5-8	14.5	8.5	1.71
Z5-9	12.0	7.0	1.71
Z5-10	13.0	7.5	1.73
Z5-11	12.0	7.0	1.71
Z5-12	11.5	7.0	1.64
Z5-13	14.0	8.0	1.75
Z5-14	15.0	7.0	2.14
Z5-15	13.5	8.0	1.69
Z5-16	12.0	6.0	2.00

2.2 菌株的复筛

将初筛得到的 16 株菌株接种于豆粕培养基进行发酵,通过印三酮比色法测定粗酶液的活性,得到酶活较高的 4 个菌株作为优选菌株。其中 0.5% 稀释度的 DES 处理 25 min 得到的 2 株菌、2.0% 稀释

度的 DES 处理 30 min 得到的 2 株菌蛋白酶活性较高(表 2),选择其中活性最高的 1 株 Z5-14 进行酶学性质分析。

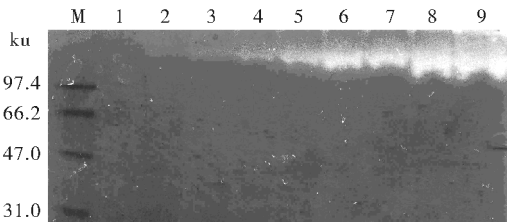
表 2 复筛测定的蛋白酶活力

Table 2 Proteinase activity in the second screening

菌株号 Strain number	酶活力 Enzyme activity U/mL
Z5-1	1 897
Z5-4	2 017
Z5-14	2 579
Z5-16	1 953

2.3 蛋白酶分子质量及其最佳培养时间

从图 1 可以看出该蛋白酶分子质量较大,约 100 ku,目前所报道的蛋白酶分子质量多为 20 ku 左右,说明该蛋白酶为 1 个新酶。该酶活性极高,不需孵育,在 SDS-PAGE 电泳过程中就可降解分离胶中的明胶蛋白质底物。同时,随着时间延长、菌体的生长,该菌产生蛋白酶的产量逐渐升高,产生了越来越明显的明胶水解亮带。产酶最佳时间为 96 h。



M. 蛋白质分子质量标准 Protein molecular marker; 1~9. 分别为 0,12,24,36,48,60,72,84,96 h 的发酵液 The broth refers to 0,12,24,36,48,60,72,84,96 h.

图 1 蛋白酶的分子质量及产酶最佳时间

Fig.1 Molecular weight of the protease and best time for enzyme production

2.4 酶学性质分析

1)蛋白酶最适 pH 和 pH 稳定性。由图 2 可看出该蛋白酶在偏酸性的环境下有较大的活性,说明其为酸性蛋白酶。当 pH>4,蛋白酶活力迅速升高,在 pH 为 6 时达到最大,酶作用的最适 pH 为 6。当 pH>6 后,酶的活力下降很快。

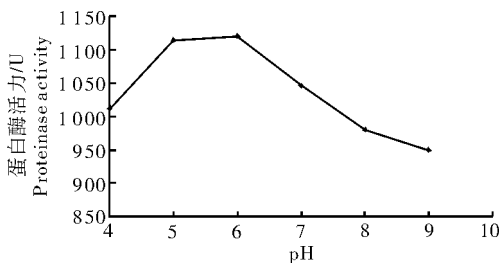


图 2 蛋白酶的最适 pH

Fig.2 The optimum pH of the protease

2)蛋白酶最适温度和热稳定性。由图 3 可看出,酶作用最适温度曲线是典型的钟罩图形。酶促反应最适温度测定结果表明,其最适温度为 50℃。当反应温度超过 50℃,酶活力成直线下下降,到达 80℃ 时,酶的活性几乎完全消失。酶的热稳定性试验表明 70℃ 处理 10 min 保留 43% 的酶活力,处理 60 min 后仍保留 14% 的酶活力;80℃ 处理 5 min 残余酶活力仅为 12%,处理 15 min 后,酶活性几乎完全消失。

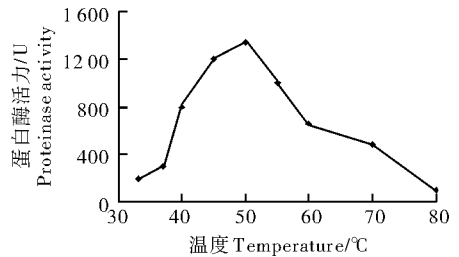


图 3 蛋白酶的最适温度

Fig.3 The optimum temperature of the protease

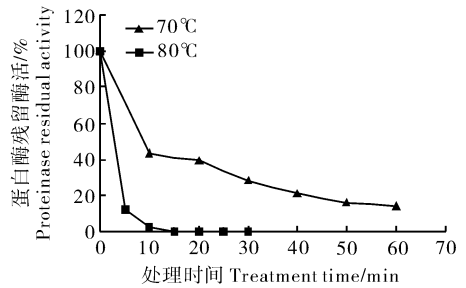
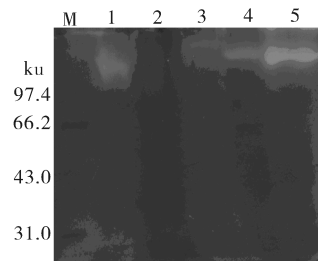


图 4 蛋白酶的热稳定性

Fig.4 The thermal stability of protease

3)还原剂巯基乙醇对蛋白酶活性的影响。经高浓度的还原剂 2-巯基乙醇处理后,蛋白酶活力完全消失。说明该蛋白酶对 2-巯基乙醇非常敏感。



M. 蛋白质分子质量标准 Protein molecular marker; 2: 经 1 mol/L 巯基乙醇处理后的蛋白酶 The protease was dealt with 1 mol/L mercaptoethanol; 1,5: 未经巯基乙醇处理的蛋白酶 The protease was not dealt with mercaptoethanol; 3,4: 经 10 mmol/L 巯基乙醇处理过的蛋白酶 The protease was dealt with 10 mmol/L mercaptoethanol.

图 5 还原剂巯基乙醇对蛋白酶活性的影响

Fig.5 Effect of mercaptoethanol on the protease

3 讨 论

本研究通过对枯草芽胞杆菌 Z5 进行诱变、筛选,分离得到 1 株产分子质量较大、活性较高蛋白酶的菌株,分子质量约 100 ku,目前所报道的蛋白酶分子质量多为 20 ku 左右,说明该蛋白酶为 1 个新酶。通过对该蛋白酶的酶学性质的初步研究,发现该蛋白酶催化反应的最适 pH 为 6,最适温度为 50 °C,并且该蛋白酶有较好的热稳定性,60 °C 处理 10 min 仍能保留 50% 左右的酶活,但是还原剂对其活性影响较大。我们预测该蛋白酶将会在食品工业、纺织业、洗涤业、饲料工业和皮革工业中有很广泛的应用前景,并打算主要研究该酶是否具有降解弹性蛋白和血浆纤维蛋白的能力,探讨其在中医药工业中应用的可行性。下一步我们拟对该蛋白酶进行进一步的分离纯化之后测定其氨基酸序列。根据蛋白质氨基酸序列的测序结果,设计简并引物,克隆得到该蛋白酶的基因序列。酶学性质的进一步研究是近期工作的一个重点,找出其活性中心,确定其催化反应的米氏常数,各种去污剂、螯合剂和金属离子对其活性的影响等,有关工作正在进行中。

参 考 文 献

- [1] MALA B, RAO B, APRNA M, et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases [J]. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 1998, 62(3): 597-635.
- [2] 刘传,董海洲,侯汉学. 淀粉酶和蛋白酶及其在焙烤食品中的作用 [J]. *粮食与油脂*, 2002(6): 38-39.
- [3] HASAN F, SHAH A A, HAMEED A. Industrial applications of microbial lipases [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39: 235-251.
- [4] 刘睿,李才国,刘鼎一,等. 7S 球蛋白的风味蛋白酶改性和功能性质评价 [J]. *华中农业大学学报*, 2007, 26(2): 263-266.
- [5] 付彩霞,赵思明,熊善柏. 鹿血血红蛋白蛋白酶水解工艺条件优化 [J]. *华中农业大学学报*, 2009, 28(6): 759-763.
- [6] GUPTA R, BEG Q K, LORENZ P. Bacterial alkaline proteases, molecular approaches and industrial applications [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59: 15-21.
- [7] 谢栋,彭慷,王津红,等. 枯草芽胞杆菌抗菌蛋白 X 981 纯化与性质 [J]. *微生物学报*, 1998, 38(1): 13-19.
- [8] 王弋博,刘向阳,李三相,等. 用紫外诱变及紫外+硫酸二乙酯复合诱变方法选育高产异淀粉酶菌株 [J]. *青海大学学报:自然科学版*, 2003, 21(4): 7-10.
- [9] 姜锡瑞,段钢. 新编酶制剂实用技术手册 [M]. 北京:中国轻工业出版社, 2002: 412-415.
- [10] 李林珂,高玉千,崔锦,等. 一株蛋白酶产生菌的筛选及酶学性质研究 [J]. *河南农业科学*, 2006(3): 49-52.

Chemomorphosis and Enzymatic Characterization of Proteinase-Producing *Bacillus subtilis*

MA Hong-yu LI Jing-jing QI Gao-fu YU Zi-niu ZHAO Xiu-yun

*College of Life Science and Technology/State Key Laboratory of Agricultural Microbiology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract *Bacillus subtilis* mutant with improved protease activity was obtained using DES treatment. The approximate molecular weight of this protease was obtained using gelatin as a substrate, and effects of mercaptoethanol on the protease activity were detected as well. The protease was treated under different temperatures and pH conditions. The enzyme activity was examined using ninhydrin. The molecular weight of the purified enzyme was estimated to be 100 ku by SDS-PAGE. The optimum pH and temperature was 6.0, 50 °C. About 50% enzymatic activity was retained after incubation at 70 °C for 10 min. The enzyme activity was significantly influenced by mercaptoethanol. Based on the difference of molecular weight and optimum pH from reported protease of *Bacillus subtilis*, it indicated that this protease was a new-type with wide applications.

Key words *Bacillus subtilis*; protease; chemomorphosis; enzymatic characteristics