

嗜热脂肪芽孢杆菌高温蛋白酶的产生条件及酶学性质*

唐 兵 周林峰 陈向东 戴 玄¹ 彭珍荣²

(武汉大学生命科学院 武汉 430072)

摘 要:对嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilis*)WF146 的产蛋白酶的条件进行了研究,在 58℃ 条件下,WF146 在 pH 值为 7.5 的 Fd 培养基中振荡发酵培养 48h 后,发酵液中高温蛋白酶产量可达 600u/mL 以上。对该酶性质的研究表明,酶分子量为 34kD,最适作用 pH 为 8.0,最适作用温度为 80℃,具有良好的 pH 稳定性及热稳定性。Ca²⁺ 对该酶的稳定性具有重要影响,PMSF、DFP 及 IAA 能强烈抑制酶活力,而 DTT 对该蛋白酶活力无影响。

关键词:嗜热脂肪芽孢杆菌 WF146,高温蛋白酶,性质

中图分类号:Q936 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2000)02-0188-92

蛋白酶是一类广泛应用于食品、医药、洗涤剂、纺织及皮革处理等方面的重要工业用酶。而高温蛋白酶具有耐热、耐变性剂、耐有机溶剂等优点,有重要应用价值。不仅如此,对高温蛋白酶的耐热机制的阐明还可以为人们利用蛋白质工程技术改造天然酶,从而提高其稳定性提供理论依据。人们已经从许多嗜热细菌中分离到高温蛋白酶^[1-3],其中嗜热解脲芽孢杆菌(*Bacillus thermoproteolyticus*)生产的嗜热蛋白酶(thermolysin)已在工业上用来生产二肽甜味剂(aspartame)^[4]。但是,高温蛋白酶一般酶产量低、生产成本高。我们筛选到一株高温蛋白酶的高产菌株嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)WF146^[5],对其产酶条件及一些酶性质进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌株

嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)WF146 为本实验室分离鉴定^[5]。

1.2 Fd 培养基(%)

葡萄糖 1,酵母膏 0.2,蛋白胨 0.05,NaCl 0.2,CaCl₂ 0.2,K₂HPO₄ 0.05,KH₂PO₄ 0.0125,MgSO₄·7H₂O 0.001,FeSO₄ 0.0001,pH7.8。

1.3 细菌培养

将嗜热脂肪芽孢杆菌 WF146 接种于装有 40mL Fd 培养基的三角摇瓶(250 mL)中,于 58℃ 摇床(250r/min)培养 48h 后获得发酵液。

1.4 酶的纯化

将发酵液离心取上清液,在上清液中加入 0.8% 的 SDS,于 80℃ 保温 5min 后,进行硫酸铵分级盐析(45%~65% 饱和度),沉淀溶于缓冲液 A(50 mmol/L Tris-HCl,5 mmol/L CaCl₂,pH7.5)中,对相同的缓冲液充分透析,然后过 Sephadex G50 凝胶柱(2cm×75cm),

* 武汉市晨光计划资助项目(985003077)

1 现在工作地址:四川涪陵师范学院生物系;2 通讯作者

作者简介:唐 兵(1968-),男,山东省济南市人,武汉大学生命科学院副教授,博士,主要从事微生物生理及应用微生物学研究

收稿日期:1998-05-08,修回日期:1998-10-19

收集第一个蛋白峰,经 SDS-PAGE 检查为均一酶。

1.5 无 Ca^{2+} 酶制备

将酶液装入透析袋,在缓冲液 B(50mmol/L Tris-HCl,10mmol/L EGTA,pH7.5)中于 4℃ 透析过夜,再将透析袋放入缓冲液 C(50mmol/L Tris-HCl,pH7.5)中于 4℃ 透析过夜,获得无 Ca^{2+} 酶。

1.6 酶活力测定

参见文献[5]。检测含有 DTT 的样品酶活力时,直接测定 A_{280} 值。

1.7 SDS-PAGE

参见文献[6]。高温蛋白酶样品中加入 10mmol/L IAA 于 25℃ 放置 1h 后,经热处理再进行电泳。蛋白质低分子量标准样品购自上海东风丽珠生物制品公司。

1.8 试剂

苯甲基磺酰氟(PMSF)、二异丙基氟磷酸(DFP)购自 Sigma 公司,二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酸(IAA)、乙二醇-双(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA)、乙二胺四乙酸(EDTA)购自华美生物工程公司,其它化学试剂均采用国产或进口分析纯。

2 结果

2.1 产酶条件

通过正交实验法,获得了嗜热脂肪芽孢杆菌 WF146 发酵产高温蛋白酶的 Fd 培养基,WF146 在 Fd 培养基中发酵产酶的最适温度为 58℃(图 1-a),最适 pH 值为 7.5(图 1-b),增加通气量有利于产酶(图 1-c)。由图 1-d 可见,WF146 在 Fd 培养基中生长 12h 进

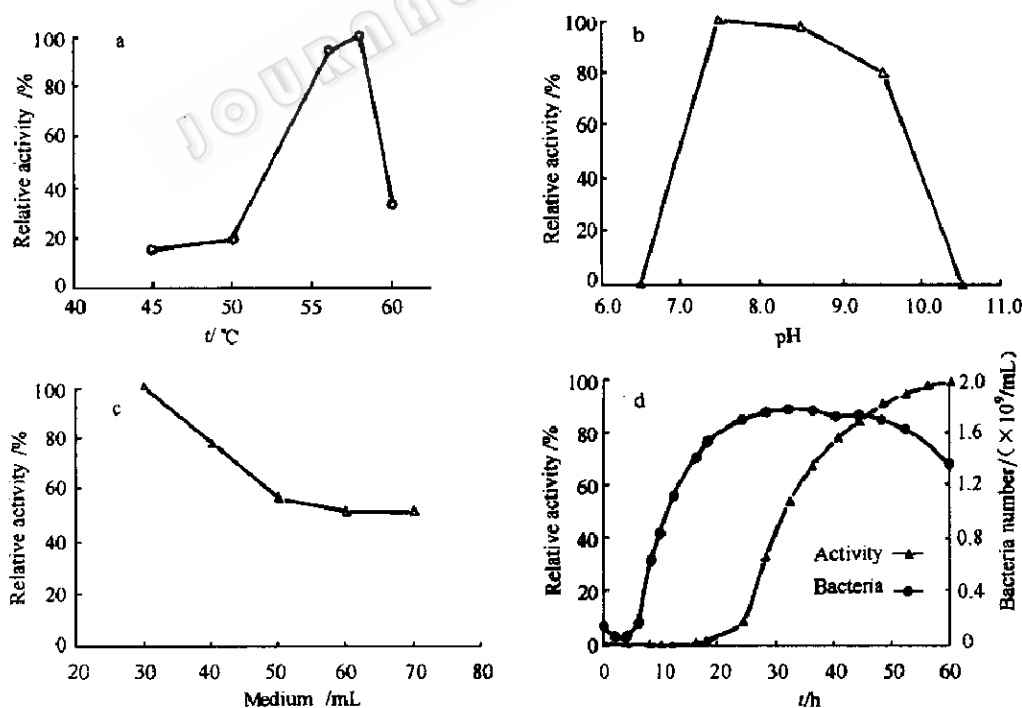


图 1 培养条件对嗜热脂肪芽孢杆菌 WF146 产酶的影响

Fig. 1 Thermophilic protease producing conditions of *B. stearothermophilus* WF146

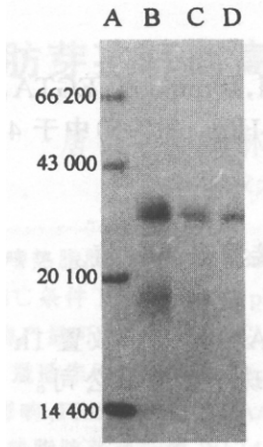


图2 粗酶及纯酶样品 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE pattern of enzyme samples

- A. Standard molecular weight protein;
 B. Crude enzyme sample;
 C. Sample incubated at 80°C for 5 min;
 D. Purified enzyme.

入对数末期后,培养液上清液中开始检测到极少量高温蛋白酶活力。进入到稳定期后酶活力迅速上升,至 48h 后产酶量趋于稳定。嗜热脂肪芽孢杆菌 WF146 蛋白酶产量提高最快时正是芽孢大量产生的时期(24~48h),两者有一定的相关性,这一现象类似中温菌^[7]。

在上述最佳条件下,每毫升发酵液上清液中蛋白酶活力(60°C测定)一般可达 600u 以上。

2.2 酶性质

2.2.1 酶的纯化及酶分子量测定:图 2 显示,粗酶液中杂蛋白分子量均较低(图 2-B),在高温条件下保温一段时间后,大部分杂蛋白被蛋白酶降解,同时也有部分蛋白酶自我降解(图 2-C),再经分级盐析和凝胶过滤,获得了 SDS-PAGE 电泳纯酶样品(图 2-D),该酶分子量约为 34kD。

2.2.2 温度和 pH 对酶活力的影响:以酪蛋白为底物,分别在不同温度或 pH 条件下测定酶活力,由图 3 可见,酶的最适反应温度为 80°C(图 3-a),而最适反应 pH 为 8 左右(图 3-b)。

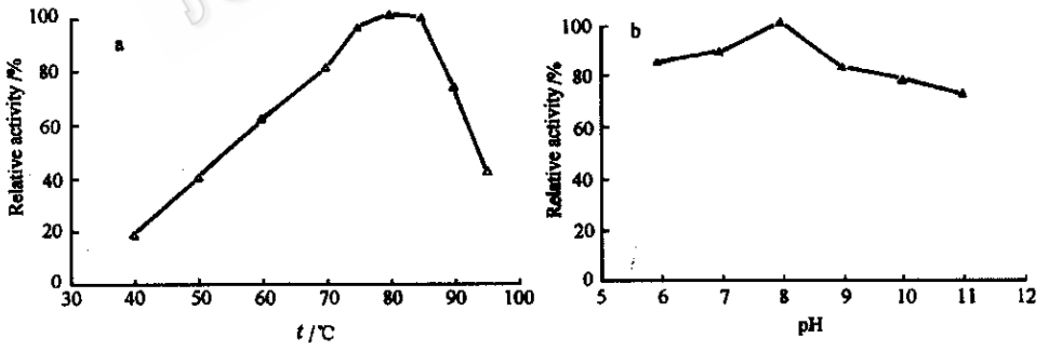


图3 温度(a)和 pH(b)对酶活力的影响

Fig. 3 Effects of temperature (a) and pH (b) on enzyme activity

2.2.3 pH 对酶稳定性的影响:将酶样品用不同 pH 缓冲液稀释,于一定温度条件下保温一定时间后,按标准方法测定酶活力。由图 4 可见,在 25°C 条件下,该酶在 pH 5~12 范围的缓冲液中保温 24h 未见酶活力下降。在 60°C 时,酶在 pH6~12 范围的缓冲液中保温 1h 保持稳定,而当温度提高至 80°C 时,在 pH6~10 范围缓冲液中保温 10min 后酶保持稳定。

2.2.4 酶的热稳定性:将酶样品用缓冲液 A 适当稀释后分别于不同温度保温,按一定时间间隔取样测定酶活力。由图 5 可见,该酶在一定温度范围内具有很好的热稳定性,在 60℃ 保温 5h 后未见酶活力下降。随着温度升高,酶的热稳定性下降,80℃ 时酶的半衰期约 35min。

2.2.5 抑制剂对酶活性的影响:在酶液中加入 10mmol/L 不同种类的抑制剂,于 25℃ (加 DTT 的样品于 60℃ 保温)放置 1h 后依 1.6 节所述方法测定蛋白酶活力(表 1)。

表 1 结果显示,该酶对 PMSF、DFP 和 IAA 敏感,表明该酶活性中心可能含有丝氨酸残基或/和半胱氨酸残基,而 EDTA 和 EGTA 对该酶的抑制作用表明金属离子(如 Ca^{2+})对酶活性或稳定性具有重要影响。进一

表 1 抑制剂对酶活性的影响

Table 1 Effect of inhibitors on enzyme activity

Inhibitor	Remained activity/%
Control	100.0
PMSF	0.3
DFP	0.1
IAA	0.0
EDTA	0.0
EGTA	0.1
DTT	103.0

步研究表明,无 Ca^{2+} 时酶极不稳定,在 60℃ 条件下无法测得酶活性,在 25℃ 保温 10min 后仅保留 40% 酶活性,向失活的无 Ca^{2+} 酶液中补加 $CaCl_2$ 亦未能使酶活力恢复,这说明 Ca^{2+} 在该酶中主要起维持酶结构稳定的作用。另外,对 DTT 具有抗性说明该酶不含二硫键,或二硫键对该酶的蛋白酶活性或稳定性不起重要作用。

3 讨论

目前关于野生嗜热细菌产高温蛋白酶的研究中,报道的菌株的酶产量均较低,一般发酵液酶产量仅为 4.88 到 24.0u/mL(60℃)^[8,9]。嗜热脂肪芽孢杆菌 WF146 在 58℃ 条件下,在 pH 为 7.5 的 Fd 培养基中振荡发酵培养 48h 后,发酵液中高温蛋白酶产量可高达 600u/mL 以上,该菌株所产蛋白酶可用来水解猪血蛋白生产氨基酸^[10]及水解虾壳生产甲

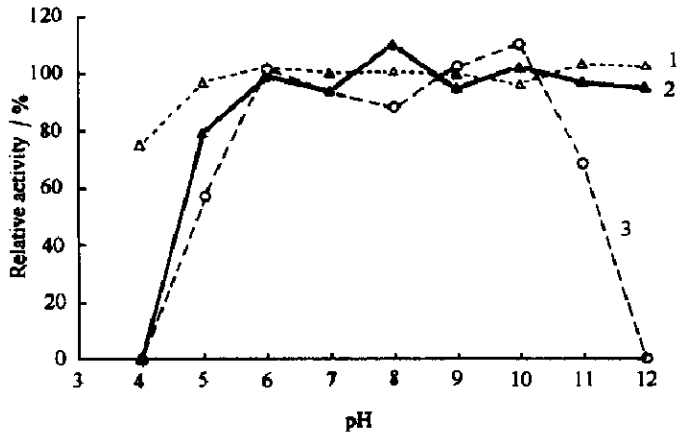


图 4 pH 对酶稳定性的影响

Fig. 4 Effect of pH on enzyme stability

- 1. Incubated at 25°C for 24h;
- 2. Incubated at 60°C for 1h;
- 3. Incubated at 80°C for 10min.

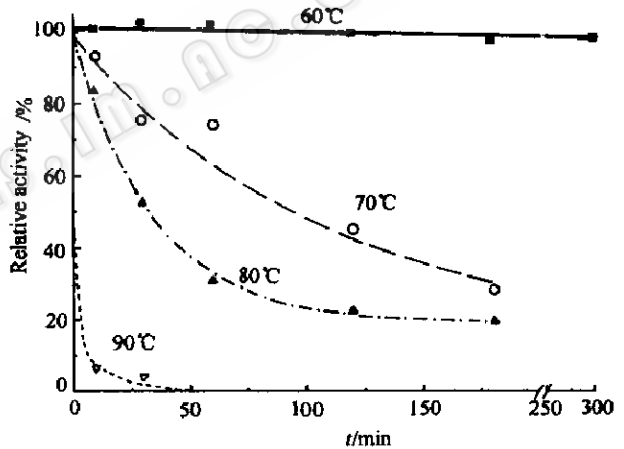


图 5 温度对酶稳定性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on enzyme activity

壳素^[11],是一株具有重要应用价值的野生菌株。

嗜热脂肪芽孢杆菌 WF146 所产蛋白酶为高温中性蛋白酶, Ca^{2+} 在维持酶的稳定性方面起重要作用。按照其催化机制,一般将蛋白酶分为丝氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶、天冬氨酸(酸性)蛋白酶和金属蛋白酶四类,而嗜热脂肪芽孢杆菌 WF146 蛋白酶同时被 PMSF、DFP 和 IAA 强制抑制,其原因可能有两种,一是该酶活性中心同时存在丝氨酸残基和半胱氨酸残基,其催化反应的机制可能具有独特之处;二是活性中心只具有丝氨酸残基和半胱氨酸残基中的一个,另外一个残基虽不直接参与催化反应,但靠近活性中心,化学修饰引入的基团可能阻碍底物与活性中心结合或改变活性中心附近电荷性质从而影响酶的催化活性,有关这一方面的研究尚需进一步深入进行。

参 考 文 献

- [1] Ohta Y. *J Biol Chem*, 1967, 242(3):509~515.
- [2] Cowan D A, Daniel R M. *Biochim Biophys Acta*, 1982, 27:293~305.
- [3] Takii Y, Taguchi H, Shimoto H, *et al. Appl Microbiol Biotechnol*, 1987, 27: 186~191.
- [4] Nagayasu T, Miyanaga M, Tanaka T, *et al. Biotechnol Bioengineer*, 1994, 43: 1108~1117.
- [5] 戴 玄,唐 兵,陈向东,等.微生物学杂志,1997,17(3):25~29.
- [6] 赵永芳.SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳.见:赵永芳主编.生物化学技术原理及其应用.武汉:武汉大学出版社,1994. 343~346.
- [7] Priest F G. *Bacteriol Rev*, 1977, 41(3):711~753.
- [8] 杨庆云,江行娟,吴 琳,等.生物工程学报,1991,7(3):207~212.
- [9] 金 城,杨寿钧,刘宏迪,等.微生物学报,1994,34(4):285~292.
- [10] 杨 伟,彭珍荣.氨基酸和生物资源,1996,18(2):1~4.
- [11] 王维鹏,戴 玄,彭珍荣.华中农业大学学报,1996,(增刊)总 22:137~140.

PRODUCTION AND SOME PROPERTIES OF A THERMOPHILIC PROTEASE FROM *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* WF146

Tang Bing Zhou Linfeng Chen Xiangdong Dai Xuan Peng Zhenrong
(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract: The factors affecting *Bacillus stearothermophilus* WF146 for thermophilic protease producing have been investigated, more than 600 units of enzyme in 1mL of fermented culture could be achieved under suitable condition. The protease had a molecular weight around 34kD estimated by SDS-PAGE, and functioned optimally at pH8.0 and 80°C, respectively. In addition, the enzyme exhibited high temperature tolerance and was stable at a wide range of pH, and Ca^{2+} played a key role for the stability of the enzyme. While the protease activity of the enzyme was strongly inhibited by PMSF, DFP and IAA, and was not affected by DTT.

Key words: *Bacillus stearothermophilus* WF146, Thermophilic protease, Property