

球形芽孢杆菌 C₃-41 菌株胞外蛋白酶特性

孙 钊 刘娥英 张用梅

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

球形芽孢杆菌能够合成具杀蚊活性的蛋白晶体, 该晶体在蚊中肠碱性条件下降解产生毒性^[1], 尽管球形芽孢杆菌蛋白酶与杀蚊毒素的降解无关^[2], 但在球形芽孢杆菌杀蚊制剂的产生中有重要意义^[3]. 同时球形芽孢杆菌产生的碱性蛋白酶具有潜在的医疗价值^[4].

我们以本实验室分离的高效杀蚊菌 C₃-41 菌株为材料, 研究了球形芽孢杆菌蛋白酶的产生特性及其理化性质, 在国内尚属首次报道.

1 材料和方法

1.1 菌种

C₃-41 菌株系本实验室分离^[5].

1.2 培养基

1.2.1 1 号培养基: 蛋白胨 1%, 酵母膏 0.3%, pH7.0~7.2.

1.2.2 6 号培养基: 参照文献 [5].

1.2.3 MBS 培养基: 蛋白胨 10g, 酵母膏 2g, MgSO₄ 0.3g, MnSO₄ 0.02g, Fe₂(SO₄)₃ 0.02g, CaCl₂ 0.2g, 加水至 1000ml, pH7.2~7.4.

将菌种接入装于 150ml 锥形瓶的 20ml 培养基中, 32~34℃ 于旋转摇床 220r/min 振荡培养 16~20h. 培养液 4℃ 4000r/min 离心 20min, 测上清液酶活力或 4℃ 保存备用.

1.3 酶活力测定

采用 Folin-酚法, 参照文献 [6].

1.4 蛋白含量测定

采用 Bradford 法, 参照文献 [7].

1.5 Sephadex G-100 柱层析

使用 1.6 × 45cm 层析柱, 洗脱速度为 4.8ml / 管 30min. 在核酸蛋白检测仪监视下, 收集各峰并测酶活力及蛋白含量.

2 结果和讨论

2.1 C₃-41 菌株产酶条件

2.1.1 不同氮源对产酶的影响: 以除去蛋白胨的 MBS 培养基为基础, 加入不同氮源, 结果表明成分复杂的农副产品配方培养基产酶效果最好(表 1):

2.1.2 葡萄糖对产酶的影响: MBS 培养基中加入葡萄糖, 使其终浓度为 0, 0.1%, 0.3%, 0.5% 和 0.8%, 酶活力分别达到 98.5U / ml, 119.4U / ml, 228.4U / ml, 146.8U / ml 和 92.3U / ml. 可见葡萄糖能够促进蛋

表 1 不同氮源对产酶的影响

氮源	浓度 (%)	酶活力 (U/ml)
蛋白胨	1	40.0
硫酸铵	1	19.1
尿素	1	20.0
硝酸铵	1	22.2
黄豆粉+玉米粉	1+1	163.1
黄豆粉+棉籽饼粉	1+1	194.5
玉米粉+棉籽饼粉	1+1	174.8
玉米粉+棉籽饼粉+黄豆粉	1+1+1	179.1

白酶的产生,当浓度为 0.3% 时,酶产量提高了 1 倍。

2.1.3 培养基起始 pH 对产酶的影响:当起始 pH 为 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 和 9.0 时,相对酶活力分别为 88%, 88%, 94%, 100%, 57% 和 42%。起始 pH 为 5.5~7.0 时产酶状况较好,其中以 pH7.0 为最适 pH。

2.1.4 培养基装瓶量对产酶的影响:在 150ml 锥形瓶中分别加入 20~150ml 培养基,装瓶量为 20ml, 80ml 和 150ml 时的产酶量分别为 310.9U/ml, 178.5U/ml 和 110.8U/ml。随着装瓶量的增加,酶产量逐渐降低,间接证明了产酶要求良好的通气条件。

2.1.5 发酵温度对产酶的影响:分别在 25℃, 30℃, 35℃, 40℃ 和 45℃ 下振荡培养, C₃-41 菌株最适发酵产酶温度为 35℃, 低于 35℃ 时酶产量维持在中等水平, 高于 35℃ 时酶产量下降显著。

2.1.6 菌体生长与产酶的关系:蛋白酶合成始于对数生长期, 稳定期早期为产酶高峰期, 随后酶活显著下降(表 2)。可以看出菌株同其他芽孢杆菌一样, 其胞外蛋白酶的合成与芽孢形成有一定关系^[8]。但酶活力达到峰值后两小时即下降了 67%, 培养液中积累蛋白酶活力的这种急剧下降, 仅 Eпремян 等有过类似报道^[9]。这可能是不同菌株产蛋白酶特性不同所致, 也可能是菌体生长不同步, 一部分迟缓发育的菌体继续合成蛋白酶从而掩盖了下降趋势。

表 2 菌株发育状况与蛋白酶的产生

菌龄 (h)	生长阶段	形态特征	酶活力 (U/ml)	相对酶活力 (%)
0~6	延迟期	营养体	4.6	2
8	对数生长期	营养体	11.8	5
10			65.3	26
12			138.5	55
14		稳定期	前期孢囊	192.1
16		中期孢囊	253.6	100
18			83.7	33
20	衰亡期	后期孢囊	56.6	22
22			56.8	22
24		游离芽孢	54.1	21

2.2 酶的纯化

2.2.1 粗酶制备: 发酵液上清液用硫酸铵沉淀, 取 30%~65% 段沉淀溶于含 10mmol/L Ca²⁺ 的

Tris-HCl缓冲液中,并对相同缓冲液透析至无 HN_4^+ ,4℃ 保存备用。

2.2.2 Sephadex G-100柱层析:取 3.5ml 粗酶液上柱,用核酸蛋白检测仪监测峰形。出现两个吸收峰,峰 I 为杂蛋白,峰 II 为活性峰,收集活性峰洗脱液并浓缩。纯化后酶的比活为 6741.5U / mg 蛋白,纯化倍数达到 5.5(表 3)。

表 3 酶的纯化

步 骤	体 积 (ml)	总酶活力 (U)	总蛋白 (mg)	比 活 (U/mg)	酶回收率 (%)	纯化倍数
发酵液上清	300	73872	60.0	1231.2	100	1.0
硫酸铵沉淀 (30%~65%)	9	55404	14.4	3847.5	75	3.1
Sephadex G-100 柱层析	18	35730	5.3	6741.5	48	5.5

2.2.3 分子量测定:通过 SDS-PAGE测得酶的分子量为 42000。

2.3 酶的性质

2.3.1 酶作用最适温度:pH 为 10.5 时,在不同温度下测酶活力,酶的最适反应温度为 40℃,在 30℃~45℃ 均具有较好酶活力,相对酶活力在 60% 以上。

2.3.2 酶作用最适 pH:将酶液用 pH6.0~12.0 的“广泛缓冲液”^[10]稀释,以对应的同一 pH 的酪蛋白为底物,37℃ 下测酶活力。酶的最适 pH 为 11.0,pH7.0~12.0 均有较高酶活力,相对酶活力约在 60% 以上。

2.3.3 pH 对酶稳定性的影响:酶液用一系列 pH 为 3.0~12.0“广泛缓冲液”稀释,37℃ 保温 60min,然后用 pH10.5 的浓稠砂-氢氧化钠缓冲液将各管 pH 统一调至 10.5,测酶活力。酶在 pH11.0 时稳定性最好,pH5.0~11.0 也有较好稳定性,相对酶活力在 80% 以上。

2.3.4 温度对酶稳定性的影响:酶经不同温度处理后再在 37℃ 下测其残存酶活力。结果表明,酶对温度比较敏感,45℃ 处理 15min 酶活力丧失 50%,35℃ 处理 4h,酶活力丧失 73%。在 Ca^{2+} 存在下,热稳定性明显提高,45℃ 保温 90min 仍保持 69% 的活力,35℃ 保温 6h,仍有 89% 的活力。

2.3.5 金属离子对酶活力的影响:将酶液与 10mmol / L 不同离子混合测酶活力。结果表明, Mn^{2+} , Ca^{2+} 对酶活力有促进作用; Hg^{2+} , Fe^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} 等对酶活力有抑制作用,酶活力丧失 95% 以上; K^+ , Na^+ , Mg^{2+} 等对酶活力无明显影响。

2.3.6 各种化学修饰剂对酶活力的影响:苯甲基磺酰氨(PMSF)和 EDTA 均可抑制 98% 以上的活力。而碘乙酸,水杨醛和二硫苏糖醇对酶活力没有影响,当浓度为 10 mmol / L 时,酶仍保持 95% 以上活力。该酶对去垢剂 SDS 的稳定性也较好。

C₃-41 菌株蛋白酶具有碱性最适作用 pH,酶活力被 PMSF 完全抑制,因此它属于丝氨酸蛋白酶。EDTA 对酶活力的抑制可能是破坏了酶的构象的缘故^[11]。

参 考 文 献

- [1] Brodwell A H, Baumann P. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53: 1333~1337.
- [2] Brodwell A H, Baumann P. *Appl Environ Microbiol*, 1986, 52: 758~764.
- [3] Dumusois C, Priest F G. *Bacteriol*, 1993, 75: 416~419.
- [4] Yoshida K. *Int J Clin Pharmacol Therp Toxicol*, 1983, 21: 439~446.
- [5] 张用梅,刘婉英,戴顺英,等.两株高毒力球形芽孢杆菌的分离.见:杀虫微生物(第一卷).北京:北京农

业大学出版社, 1987. 98~101.

- [6] 北京大学生物化学教研室编. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1990. 151~154.
- [7] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, 12: 248~254.
- [8] Priest F G. *Bacteriol Rev*, 1977, 41(3): 711~763.
- [9] 喻子牛. 酶. 见: 喻子牛主编. 苏云金芽孢杆菌. 北京: 科学出版社, 1990. 87.
- [10] 赵永芳编著. 生物化学技术原理及其应用(第二版). 武汉: 武汉大学出版社, 1994. 418.
- [11] Almog O. *J Mol Biol*, 1994, 235: 760~762.

THE PROPERTIES OF PROTEASE FROM *BACILLUS SPHAERICUS* C₃-41

Sun Fan Liu Eying Zhang Yongmei

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

Abstract The production and properties of protease from *Bacillus sphaericus* strain C₃-41 were reported in this paper. It was found out that the secrete of extracellular protease began at the exponential phase, reached a maxium at the early phase of sporangium and then decrease rapidly. The production conditions of the protease have been studied. The protease preparation was purified by salting out with ammonium sulfate and by chromatagraphy fractionating on Sephadex G-100. The purified enzyme have a specific activity of 6741.5U/mg protein and a molecular weight of 42000. The optimal activities of the protease were around pH11.0 and at 4℃ respectively. The enzyme was stable at pH5.0~12.0. The proteolytic activity was inhibited by phenylmethylsulphony fluoride (PMSF) and EDTA, but not by IAA, SA and DTT. The activity was inhibited in the presence of Al³⁺, Hg²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ and Fe²⁺. The enzyme was sensitive to higher temperature, but was quite stable in the presence of Ca²⁺.

Key words *Bacillus sphaericus* strain C₃-41, Protease