

# 极端嗜盐古生菌(*Natrinema* sp.) R6-5 胞外嗜盐 蛋白酶的纯化和性质研究

石万良, 钟传奇, 唐兵, 沈萍\*

(武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

**摘 要** 采用 bacitracin-Sepharose 4B 亲和层析的方法得到凝胶电泳均一的来自极端嗜盐古生菌(*Natrinema* sp.) R6-5 的胞外嗜盐蛋白酶。经 SDS-PAGE 分析该酶亚基分子量为 62kDa。PMSF 对它的活性完全抑制, 表明它是一种丝氨酸蛋白酶, 该酶反应的最适 NaCl 浓度为 3mol/L, 最适温度为 45℃, 最适 pH 值为 8.0。在高盐条件下能维持高活性并十分稳定, 具有重要的潜在应用价值。

**关键词**: 嗜盐古生菌, 胞外嗜盐蛋白酶, 纯化, 性质

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0161-03

蛋白酶在生命过程中承担重要的使命, 比如胞内非正常蛋白的清理、转录因子的调控、前体的加工、发育和分化控制、调节细胞周期和凋亡。此外, 蛋白酶在生物技术和工业上也有广泛的应用, 比如广泛应用于洗涤剂、食品、医药、制革、纺织及废物处理等工业领域<sup>[1]</sup>。蛋白酶制剂主要来源于微生物。嗜盐古生菌是在高盐条件下生长的一种微生物, 它主要生长在盐湖、盐碱湖、盐沼、死海和盐场等极端离子的环境中, 它是极端环境微生物的一个重要成员, 嗜盐古生菌最显著的生理特征是生长绝对依赖高浓度 NaCl, 生长最适盐浓度为 3 ~ 4mol/L NaCl<sup>[2]</sup>。嗜盐古生菌的酶能在高盐的条件下维持高活性和稳定性, 普通的酶在这种条件下会变性而失去活性。由于嗜盐酶具有这种独特的性质, 因此来自于极端嗜盐古生菌的酶在高盐或者低水活性的条件下具有非常重要的应用潜力, 同时也是生物化学和酶学等基础研究的一个令人感兴趣的材料。

目前虽然有嗜盐古生菌能分泌胞外嗜盐蛋白酶的报道, 但只有少数几种极端嗜盐古生菌的胞外嗜盐蛋白酶被分离纯化<sup>[3]</sup>。我们从湖北应城盐矿分离到一株高产胞外嗜盐蛋白酶的嗜盐古生菌 R6-5, 并首次对该菌所分泌的胞外嗜盐蛋白酶进行了纯化及性质研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种和培养基

**1.1.1 菌种** 嗜盐古生菌(*Natrinema* sp.) R6-5 分离自湖北应城盐矿。

**1.1.2 培养基**: 每升含 NaCl 250g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10g, CaCl<sub>2</sub> 0.2g, 明胶 10g, 酵母抽提物 1g, pH 值 7.5。

### 1.2 蛋白酶活力测定<sup>[4]</sup>

酶活性的测定: 将 1mL 的酶液含有 3mol/L 的 NaCl 和 1% 的偶氮酪素用 0.1mol/L Tris-HCl 调节 pH 值为 8.0, 其中含有 3mol/L 的 NaCl 和 10mmol/L 的 CaCl<sub>2</sub>, 于 37℃ 反应 30min, 加入 20% 的三氯乙酸终止反应, 室温放置 15min 后, 12000r/min 离心 10min 取上清, 测定上清 OD<sub>335</sub> 值。该值与先加入三氯乙酸使酶失活的对照样品的 OD<sub>335</sub> 值差为酶反应的增加值。一个酶活力单位 (U) 定义为: 在上述反应条件下, 使反应液上清 OD<sub>335</sub> 值每分钟增加 0.001 个单位所需要的酶量。

### 1.3 酶的分选纯化

**1.3.1 粗酶液制备**: 从平板上挑取单菌落于 5mL 上述液体培养基中培养 37℃, 200r/min 培养 6d 后, 将新鲜菌液按 1% 的接种量扩大培养, 条件同前, 将 500mL 发酵液 12000 × g 离心 15min 除去菌体得到粗酶液。

**1.3.2 bacitracin-Sepharose 4B 亲和层析<sup>[5]</sup>**: 将粗酶 37℃ 保温 2h, 用 pH8.0 的 10mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L CaCl<sub>2</sub> 和 3mol/L NaCl 缓冲液透析。然后将离心后的酶液加到平衡过的 bacitracin-Sepharose 4B 亲和柱(1.6cm × 20cm)上, 用 10mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L CaCl<sub>2</sub> 和 3mol/L NaCl 缓冲液再洗涤, 除去杂蛋白后用洗脱缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 3mol/L NaCl 和 15% 异丙醇)洗脱。

### 1.4 SDS-PAGE 分析

参照 Laemmli 等<sup>[6]</sup>的方法进行。

### 1.5 蛋白酶性质研究

**1.5.1 温度的影响**: 将纯化的嗜盐蛋白酶分别于 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃ 和 80℃ 下与底物反应 30min, 测不同温度下的嗜盐蛋白酶活力变化情况。

**1.5.2 pH 值的影响**: 将底物溶于 pH 分别为 4、5、6、7、8、9、

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2004CB719600)

\* 通讯作者。Tel: 86-27-68754533; Fax: 86-27-87883833; E-mail: qingshen@whu.edu.cn

作者简介: 石万良(1972-)男, 湖北人, 博士研究生, 主要从事微生物遗传学研究。E-mail: shiwl@you. com

收稿日期: 2006-05-08; 接受日期: 2006-06-08; 修回日期: 2006-07-05

10、11 的缓冲液中,与纯化的嗜盐蛋白酶进行反应,测不同 pH 值下的嗜盐蛋白酶活力变化情况。

**1.5.3 NaCl 浓度的影响**:将底物溶于不同的 NaCl 的 pH 值 8.0 的缓冲液中,与纯化的嗜盐蛋白酶进行反应,测不同 NaCl 浓度下的蛋白酶活力变化情况。

**1.5.4 添加剂的影响**:将不同浓度的添加剂分别与纯化的嗜盐蛋白酶在 37℃ 条件下温浴 30min 后测定酶的活性。

## 2 结果

### 2.1 产胞外嗜盐蛋白酶菌株的筛选

利用上述培养基添加 1.5% 的牛奶平板对所分离的极端嗜盐菌进行初筛,获得了几株产生透明水解圈的分离株,进一步经摇瓶发酵复筛后,发现其中的 R6-5 株产生的透明圈较大,发酵液的活性较高,它的生长和酶的分泌间关系见图 1。从图 1 中可看出, R6-5 菌株在对数生长期就可以检测到胞外嗜盐蛋白酶的活性,随着菌体密度的增加,发酵液上清的嗜盐蛋白酶活性逐渐增强,到达稳定期时活性最高。

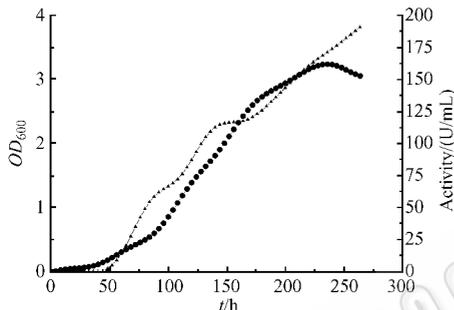


图 1 胞外嗜盐蛋白酶活性与 *Natrinema* sp. R6-5 生长之间的关系

Fig. 1 Production of extracellular protease in *Natrinema* sp. R6-5 during growth. Samples were taken at different times for determination of cell growth ( $OD_{600}$ ) (●) and azocaseinolytic activity in culture medium supernatant (▲).

对 R6-5 分离株作进一步检测表明,该菌株为革兰氏阴性嗜盐古生菌,最适生长 NaCl 浓度为 4.3mol/L NaCl。经过 GenBank 数据库对比,该菌 16S rRNA 序列与 *Natrinema ajinwensis* strain AJ12<sup>[7]</sup> 的同源性为 99%。

### 2.2 酶的分离纯化

500mL 粗酶液处理后,用 bacitracin-Sepharose 4B 亲和层析,测定各管的蛋白含量和酶活力,将有活性的几管合并,再次用 10mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L CaCl<sub>2</sub> 和 4.3mol/L NaCl 缓冲液透析,除去少量的异丙醇,SDS-PAGE 检测,最终样品已达到电泳纯。经 SDS-PAGE 测定,胞外嗜盐蛋白酶亚基分子量为 62kDa (图 2)。

### 2.3 酶的性质

**2.3.1 pH 对酶活性的影响**:在 3mol/L NaCl 条件 37℃ 下,于不同缓冲条件下测定酶活,缓冲液为 pH 4、5、6、7、8、9、10 和 11,结果表明该酶的最适 pH 值为 8.0,在 pH 值为 9.0 时仍保持很高的活性。

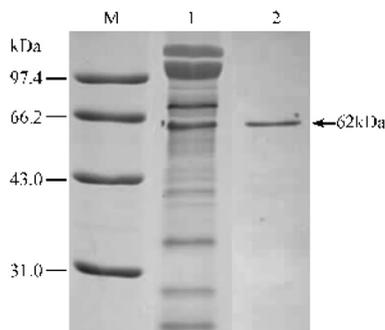


图 2 纯化的胞外嗜盐蛋白酶 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE of purified halophilic extracellular protease. M. Molecular weight markers; 1. the free cell supernatant of *Natrinema* sp. R6-5; 2. the purified extracellular protease.

**2.3.2 温度对酶活性的影响**:在 3mol/L NaCl, pH8.0 的条件 37℃ 下,在不同温度下测定酶活性,该酶在 45℃ 下的活性最高,在 50℃-60℃ 也仍然显示比较高的酶活。

**2.3.3 NaCl 浓度对酶活性的影响**:在 37℃, pH8.0 反应条件下,在不同 NaCl 浓度下测定酶活性,结果表明 3mol/L NaCl 浓度下酶的活性最高,但在 1.5 ~ 4.0mmol/L 浓度范围内,该嗜盐蛋白酶的酶活均保持在一个较高的水平(是最高酶活的 75% ~ 80% 以上),即使在 0.5mol/L NaCl 浓度下,酶的活性也有最高活性的 40%。

**2.3.4 添加剂的影响**:一些添加剂对酶活性的影响见表 1,从表中可以看出 PMSF 完全抑制它的活性,说明该酶属于丝氨酸蛋白酶。一定浓度的有机溶剂 DMSO 和异丙醇对酶的活性完全没有影响,在与表面活性剂 SDS 保温处理后仍然保持较高的活性,结果表明该蛋白酶能够耐受一定的表面活性剂和有机溶剂。

表 1 添加剂对酶活性的影响

Table 1 Effects of different inhibitors on extracellular protease from *Natrinema* sp. R6-5

Inhibitor	Concentration	Relative activity/%
Control		100
PMSF	1 mmol/L	0
DMSO	10%	100
Isopropanol	10%	100
SDS	5%	88
DTT	10mmol/L	56

## 3 讨论

嗜盐古生菌生活在极端的高盐环境,这种环境对于一般的生物来说是致死的条件,嗜盐菌产生胞外嗜盐蛋白酶可以将胞外的蛋白水解成小分子,虽然其生理功能没有完全确定,但是它能够降解胞外蛋白作为营养,这种酶在高盐环境中维持其稳定和高活性<sup>[8]</sup>。采用 bacitracin-Sepharose 4B 亲和层析的方法可以在高盐的条件下得到纯的嗜盐蛋白酶<sup>[5]</sup>。ac.cn

目前, 虽然有几种来自极端嗜盐古生菌的丝氨酸胞外嗜盐蛋白酶被分离纯化, 主要有 *Halobacterium*、*Haloferax*、*Natrococcus* 和 *Natrialba* 等属的有关菌株<sup>[3]</sup>, 但 *Natrinema* 这个属的胞外嗜盐蛋白酶还未见报道的。而且已报道的这些胞外蛋白酶活性和稳定性依赖于盐的浓度, 有的纯化的嗜盐蛋白酶即使在高盐条件下也很快就失去了活性。我们从 *Natrinema* 属的嗜盐菌中分离并纯化了胞外嗜盐蛋白酶, 该酶也与其它嗜盐胞外嗜盐蛋白酶相似, 属于中温丝氨酸蛋白酶, 其它分离纯化的嗜盐胞外蛋白酶大多数是碱性蛋白酶, 分子量在 40~60kDa 之间, 最适反应温度在 50°C 或更高的温度。我们的研究表明, *Natrinema* sp. R6-5 胞外嗜盐蛋白酶不仅在高盐条件下能维持高活性并十分稳定, 而且具有较高和较广的 pH、盐浓度和温度的适应性。实验表明该酶在高盐条件下, 至少可以维持 3 个月以上的完全活性, 发酵液的上清则可以维持 2 年以上的活性, 相对来说它是一种很稳定的嗜盐酶。此外, 我们的研究还发现该酶对许多有机溶剂和变性剂具有很强的抗性。这些优良特性在皮革制品工业、环境保护、纺织工业等领域以及催化在水溶液中不能发生的转酯作用和多肽制备等特殊应用中具有重要的潜在应用价值。另外, 从现有的蛋白酶数据库中只有 3 个相关的已确定的胞外嗜盐蛋白酶基因序列, 得到更多的基因序列可以根据结构特点更加深入地理解嗜盐蛋白酶的性质。因此, 我们正进一步克隆该嗜盐蛋白酶的基因, 从其序列和结构方面研究它的高盐条件下具有高活性、高稳定性的机理, 为该酶

的实际应用提供理论基础和新的、有价值的资源。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**: 597-635.
- [ 2 ] Oren A. Halophilic microorganisms and their environments; Boston Kluwer Academic Publishers; 2002, Vol. 5.
- [ 3 ] De Castro RE, Maupin-Furlow JA, Giménez MI, et al. Haloarchaeal proteases and proteolytic systems. *FEMS Microbiol Rev*, 2006, **30**: 17-35.
- [ 4 ] Giménez MI, Studdert CA, Sanchez JJ, et al. Extracellular protease of *Natrialba magadii*: purification and biochemical characterization. *Extremophiles*, 2000, **4**: 181-188.
- [ 5 ] Izotova LS, Strongin AY, Chekulaveva LN, et al. Purification and properties of serine protease from *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol*, 1983, **155**: 826-830.
- [ 6 ] King J, Laemmli UK. Polypeptides of the fibres of bacteriophage T4. *J Mol Biol*, 1971, **62**: 465-477.
- [ 7 ] McGenity TJ, Gemmill RT, Grant WD. Proposal of a new halobacterial genus *Natrinema* gen. nov., with two species *Natrinema pellirubrum* nom. nov. and *Natrinema pallidum* nom. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, **48**: 1187-1196.
- [ 8 ] Norberg P, Von Hofsten B. Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. *J Gen Microbiol*, 1969, **55**: 251-256.

## Purification and characterization of extracellular halophilic protease from haloarchaea *Natrinema* sp. R6-5

SHI Wan-liang, ZHONG Chuan-qi, TANG Bing, SHEN Ping\*

( College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China )

**Abstract** : A halophilic extracellular protease from a halophilic archaea *Natrinema* sp. R6-5 was purified to SDS-PAGE homogeneity using bacitracin-Sepharose 4B chromatography. A molecular mass of the purified protease subunit was 62KD determined by SDS-PAGE. The protease activity was inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), suggesting that the protease belong to serine protease. The protease exhibited optimum NaCl concentration is 3 mol/L. At the 3 mol/L NaCl concentration, the optimum temperature and the optimum pH were 45°C and 8.0. The protease could keep high activity and stability in high salt environment and had potential application value.

**Keywords** : Halophilic archaea ; Extracellular halophilic protease ; Purification ; Properties