

一株产高温蛋白酶耐热菌 BY25 的产酶条件与酶学性质研究^①

彭素萍^{1,2,3}, 林先贵^{1,2*}, 王—明^{1,2,3}

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; —2 中国科学院南京土壤研究所-香港浸会大学土壤与环境联合开放实验室, 南京 210008; —3 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 对菌株 BY25 的生长条件、产酶条件及其产生的蛋白酶的酶学性质进行了研究。结果发现, BY25 的最高生长温度为 55℃, 最适生长温度为 50℃, 最佳产酶温度为 30℃, 最佳培养起始 pH 为 8.0, 最佳 C 源为葡萄糖, 高通气量明显提高菌株产酶能力。在以上条件下培养 52 h, 上清液蛋白酶活力达 4 170 U/ml。酶学性质研究表明: 该蛋白酶为高温中性金属蛋白酶, 最适反应 pH 为 7.0, 最适反应温度为 55℃, 具有良好的 pH 耐受性和较好的热稳定性; EDTA 能强烈抑制酶活力, 而 Fe²⁺、Cu²⁺ 对酶活力也具有一定抑制作用。

关键词: 高温蛋白酶; 产酶条件; 酶学性质

中图分类号: Q93

蛋白酶是一类重要的水解酶, 其产量约占工业酶总产量的 60% 以上^[1-2], 广泛应用于食品、医药、洗涤剂、纺织及皮革处理等方面。高温中性蛋白酶具有良好的热稳定性, 能够弥补普通中性蛋白酶的不足, 具有广阔应用前景。应用上, 高温蛋白酶更优于常温蛋白酶。在高温下, 产物被常见的常温微生物污染的机率降低; 反应液的黏度降低, 底物的溶解度、生物可利用性增加, 加快了反应速率。

此外, 对蛋白酶耐热机理的研究, 将促进蛋白质工程的发展。可以为改造具有重要商业价值的天然酶, 提高其稳定性提供理论依据。20 世纪 70 年代以来, 高温中性蛋白酶已成为酶学研究领域的热点之一。微生物是蛋白酶最重要的来源, 高温蛋白酶则主要来源于嗜热菌, 分离高效产酶菌株并研究其酶学性质对合理利用这些菌株资源具有重要意义。

本研究对产耐高温蛋白酶的高产菌株 BY25 的产酶条件进行了优化, 并对其产生蛋白酶的酶学特性进行了研究, 以期为该菌株的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株

BY25, 由本研究室分离保存。

1.2 培养基

1.2.1 LB 培养基 (g/L) 蛋白胨 10, 酵母膏 5, NaCl 5, pH 7.2。

1.2.2 牛奶培养基 (g/L)^[3] —脱脂牛奶 10, 酵母膏 2.5, pH 自然。

1.2.3 基础发酵培养基 (g/L)^[4] —葡萄糖 60, 豆饼粉 30, 麸皮 40, Na₂HPO₄ 4, MgSO₄·H₂O 0.2, CaCl₂ 0.2, pH 7.0。

1.3 酶活力测定

采用 Folin 显色法^[5]。将培养液离心取上清, 以适当 pH 缓冲液稀释后, 取 200 μl 加入 2 ml 离心管中, 55℃ 水浴预热 1 min, 加入 200 μl 的 2% 酪蛋白溶液, 55℃ 水浴保温 10 min, 迅速加入 600 μl 的 0.4 mol/L 三氯乙酸终止反应, 室温静置 15 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清 500 μl, 置于试管中, 加入 2 500 μl 的 0.4 mol/L Na₂CO₃ 溶液及 500 μl 福林酚工作液, 测定 680 nm 吸光度。对照在加入酪蛋白溶液前先加入三氯乙酸, 其余条件相同。将每分钟水解酪蛋白释放 1 μg 酪氨酸的酶量定义为一个蛋白酶活力单位。

①基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD10B09、2006BAD10B05)和

* 通讯作者(xglin@issas.ac.cn)

作者简介: 彭素萍(1983—), 女, 广东潮州人, 硕士研究生, 主要从事工业微生物学方向

①①基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD10B09、2006BAD10B05)和江苏省科技攻关项目(BE2007337)资助。

* 通讯作者(xglin@issas.ac.cn)

作者简介: 彭素萍(1983—), 女, 广东潮州人, 硕士研究生, 主要从事工业微生物学方向研究。E-mail: sppeng@issas.ac.cn

h

作为接种液，转接基础发酵培养基中，分别测定温度、起始 pH、C 源及通气量对 BY25 产酶的影响。

1.5.1 温度优化 将接种液转接起始 pH 7.0 的基础培养基，培养温度分别为 30℃、45℃、50℃、55℃。培养 14 h 后取样，采用涂布平板法测定菌落数。另于 0~55 h，从 30℃ 及 50℃ 培养物中定时取样，10 000 r/min 离心 10 min，取上清测定蛋白酶活力；并采用涂布平板法测定菌落数。测定菌株生长曲线及产酶曲线。

1.5.2 起始 pH 优化 将接种液转接起始 pH 分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的基础发酵培养基中，于 30℃ 培养 48 h 后，测定上清中蛋白酶活力。

1.5.3 C 源优化 将基础发酵培养基中葡萄糖分别替换成等 C 量的麦芽糖、乳糖、淀粉、蔗糖，起始 pH 7.0，转接接种液，于 30℃ 培养 48 h 后，测定上清中蛋白酶活力。

1.5.4 通气量优化 在 250 ml 三角瓶中分别加入 25、50、100、150 ml 基础发酵培养基，起始 pH 7.0，转接接种液，于 30℃ 培养 48 h，测定上清中蛋白酶活力。

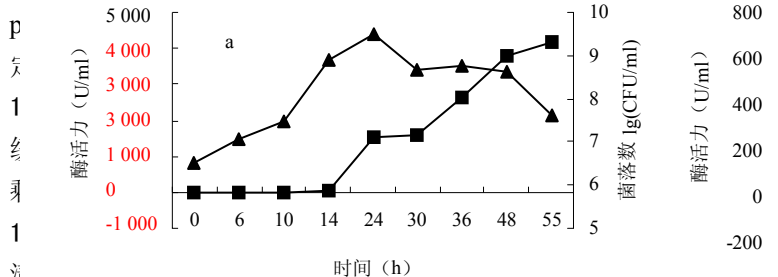
1.6 蛋白酶学性质研究^[6]

1.6.1 温度对酶活力的影响 将上清酶液用 pH

7.0 缓冲液适当稀释，于 30℃ ~ 80℃ 分别测定蛋白酶活力。

1.6.2 pH 对酶活力的影响 将上清酶液分别用 pH 4.0~11.0 缓冲液稀释，于 55℃ 测定蛋白酶活力。

1.6.3 温度稳定性 将上清酶液在 30℃ ~ 90℃、



将上清酶液在 50℃、pH 7.0 测定蛋白酶活力。

2 结果与分析

2.1 菌株 BY25 的产酶条件优化

BY25 原产酶量 304 U/ml。由于培养条件对产酶具有重要的影响，所以本研究对 BY25 菌株的不同产酶条件进行了比较试验。

2.1.1 温度对 BY25 生长及产酶的影响 温度对细菌的生长具有显著的影响。如图 1 所示，BY25 于 50℃ 及 30℃ 的生长曲线表明，50℃ 培养条件下，BY25 于 14 h 完成对数生长期，比 30℃ 培养条件下 24 h 完成对数生长期快 10 小时。另外，菌株 BY25 在 50℃ 条件下的生长速度明显高于 45℃ 及 30℃。55℃ 下，BY25 生长缓慢。因此，该菌最适生长温度为 50℃。

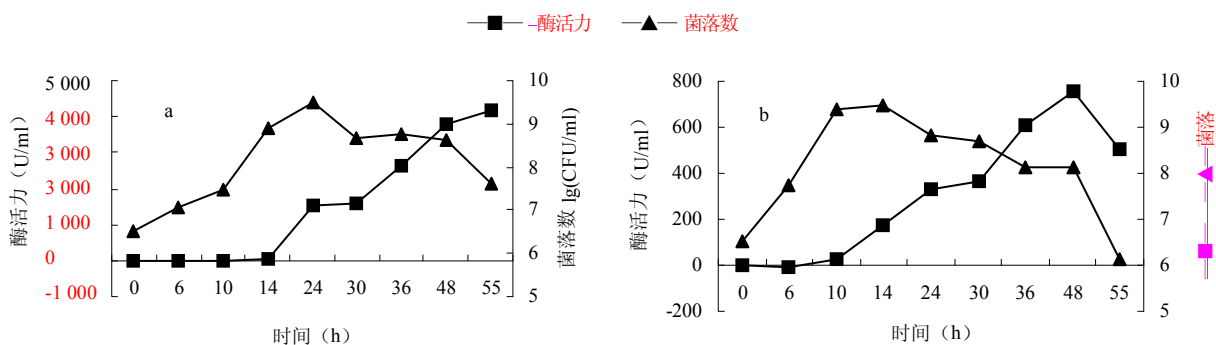


图 1—30℃(a)及 50℃(b)下菌株 BY25 的生长及产酶量

图 1 30℃ (a) 及 50℃ (b) 下菌株 BY25 的生长及产酶量

Fig. 1 Protease production and growth of BY25 at 30℃ (a) and 50℃ (b)

菌株 BY25 的最适产酶温度不同于最适生长温度 (图 1)。在 30℃ 及 50℃ 培养条件下, BY25 均从对数生长期完成后的 24 h、14 h 开始大量产生蛋白酶。在稳定期, 其产酶量持续增加。培养 48 h 后, 菌株 BY25 开始进入衰退期, 在 50℃ 培养条件下其菌落数急剧下降, 培养液中蛋白酶活力也逐步下降; 但是在 30℃ 培养条件下, 其菌落数下降较为缓慢, 而且, 培养液中蛋白酶活力仍在平稳上升中。值得注意的是, 从 BY25 开始产酶起, 30℃ 培养条件下, 培养液中蛋

白酶活力一直显著高于 50℃ 的培养液。由此, 我们认为, 30℃ 更有利于菌株 BY25 蛋白酶的产生及积累。

2.1.2 C 源对 BY25 产酶的影响 在基础发酵培养基中, 分别以等 C 量葡萄糖、麦芽糖、淀粉、乳糖、蔗糖为 C 源, 于 30℃ 下进行 48 h 产酶试验, 表 1 的结果显示, 采用葡萄糖为 C 源时, BY25 产酶量最高, 为 2 206.5 U/ml。显著高于其他 C 源。

表 1 不同 C 源对菌株 BY25 产酶的影响

Table 1 Effects of carbon sources on protease production of BY25

C 源	葡萄糖	麦芽糖	淀粉	乳糖	蔗糖
酶活力 (U/ml)	2 206.5 ± 23.8	1 719.7 ± 56.7	1 108.9 ± 166.6	863.4 ± 69.7	880.5 ± 45.5

培养基成分对微生物中蛋白酶产量有很大的影响。大豆粕是菌株 *Bacillus Cereus* MCMahon B-326 产蛋白酶的最佳 N 源^[7]。而 *Filobacillus sp.* RF 2-5 产酶则依赖于酵母提取物^[8]。活泼^[9]发现, 耐热芽孢杆菌 T9503 的最适 C 源为葡萄糖, 豆饼粉为 N 源时蛋白酶产量最高, 酵母膏次之, 以蛋白胨、尿素为 N 源时则不产酶。

由于许多报道显示, 大分子量的蛋白如明胶、酪蛋白、大豆蛋白有利于诱导蛋白酶的产生。并且本实验中选用的产酶培养基为基础发酵培养基, 利用豆饼粉和麦麸作为 N 源, 有利于废物利用, 故未对 N 源进行更换研究。

2.1.3 起始 pH 对 BY25 产酶的影响 将基础发酵培养基 pH 分别调整为 pH 5.0~10.0, 于 30℃ 下进行 48 h 产酶试验。结果如图 2 所示, 其中起始 pH 7.0~9.0 的培养基中产酶量均较高。当培养基起始 pH 为 10.0 时, 产酶量有所下降。而酸性条件下明显抑制该菌株的产酶量。

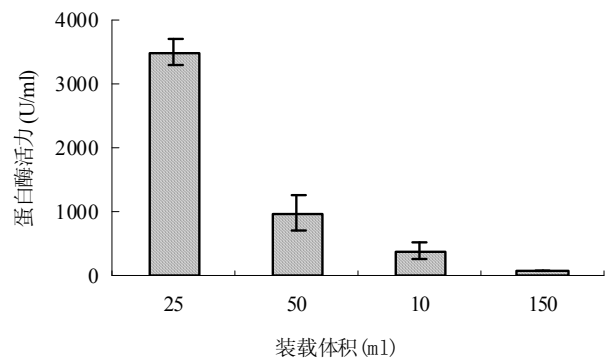
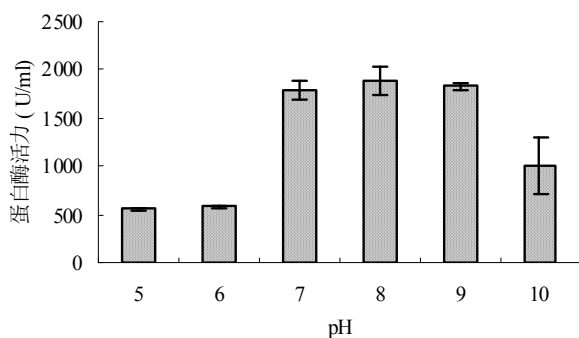


图 2 起始 pH 对菌株 BY25 产酶的影响

Fig. 2 Effects of initial pH of culture medium on protease production of BY25



2.1.4 装载体积对 BY25 产酶的影响 图3结果显示,25 ml 的装载量中,菌株产酶量最高,为 3 685 U/ml,明显高于 50 ml 及以上的装载量。100 ml 及 150 ml 的装载量下,液面较高,供氧量受限,BY25 产酶量显著下降。并且,在各种因素中,通气量对 BY25 产酶量的影响最为显著。

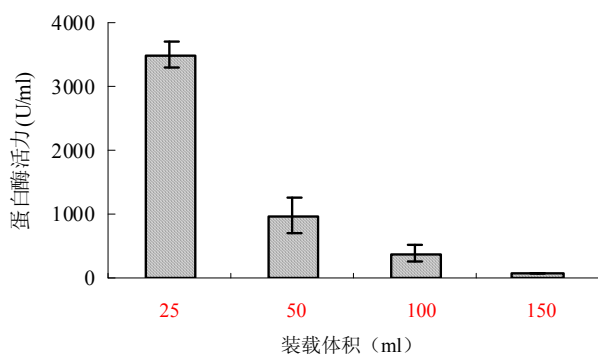


图3 装载体积对菌株 BY25 产酶的影响

Fig. 3 Effects of culture volume on protease production of BY25

的影响最为显著。

图3—装载体积对菌株 BY25 产酶的影响

Fig. 3—Effects of culture volume on protease production of BY25

经过以上条件优化,在最适培养条件下培养 52 h,上清液蛋白酶活力达 4 170 U/ml。

2.2 酶学性质研究

2.2.1 蛋白酶最佳作用温度及 pH

从图4可知,该蛋白酶在 30℃ ~ 70℃ 范围内均具有蛋白降解活性,其最适作用温度为 55℃,在 50℃ ~ 60℃ 范围内均有较高的酶活力。在 pH 5 ~ 8 区间,该蛋白酶活力较高,其最适作用 pH 为 7,为中性蛋白酶,但是在 pH 5 ~ 6 的偏酸性环境中,蛋白酶活力均保持在 80% 以上。

2.2.2 蛋白酶的温度及 pH 稳定性

与酶的最佳作用条件不同,酶的稳定性是指在特定条件下保持其空间构象的能力。因此,我们将目的蛋白酶孵育于不同温度及 pH 条件下 30 min 后,再在其最适作用条件下测定剩余酶活力。

如图5所示,该蛋白酶在 60℃ 以下具有很好的温度稳定性,60℃ 水浴 30 min,剩余酶活力仍保持在 55%。该蛋白酶在 pH 5~11 均具有良好的 pH 稳定性,在 pH 11 缓冲液中孵育 30 min 剩余酶活力约为 95%。与图4结果比较可知,虽然该蛋白酶的最适作用 pH 为 7.0,但在 pH 5 ~ 11 范围内都具有很高的稳定性。因此,该蛋白酶可适用于中性及偏酸性工作环境。

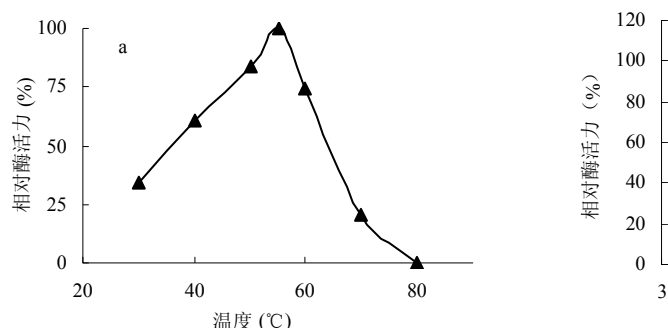


图 4 温度 (a) 和 pH (b) 对酶活力的影响

Fig. 4 Effects of temperatures (a) and pH (b) values on enzyme activity

2.2.2 蛋白酶的~~温度及 pH 稳定性~~

与酶的最佳作用条件不同，酶的稳定性是指在特定条件下保持其空间构象的能力。因此，我们将目的蛋白酶~~孵育于不同温度及 pH 条件下 30 min 后，再在其最适作用条件下测定剩余酶活力。~~

如图 5 所示，该蛋白酶在 60℃ 以下具有很好的温度稳定性，60℃ 水浴 30 min，剩余酶活力仍保持在 55%。~~该蛋白酶在 pH 5-11 均具有良好的 pH 稳定性，在 pH 11 缓冲液中孵育 30 min 剩余酶活力约为 95%。与图 4 结果比较可知，虽然该蛋白酶的最适作用 pH 为 7.0，但在 pH 5-11 范围内都具有很高的稳定性。因此，该蛋白酶可适用于中性及偏酸性工作环境。~~

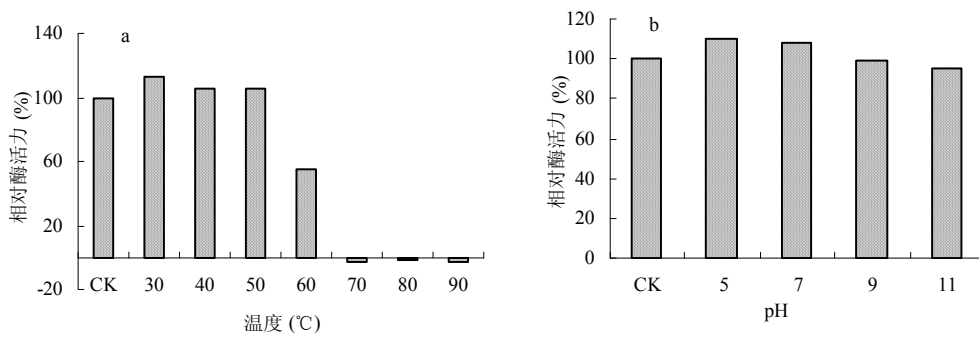
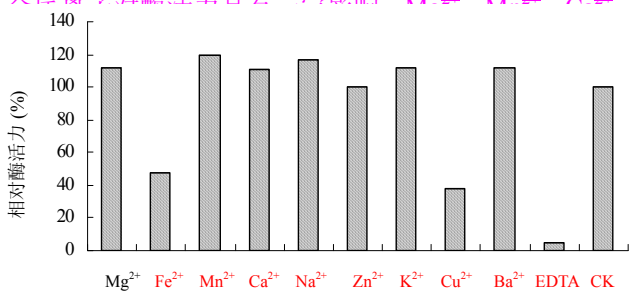
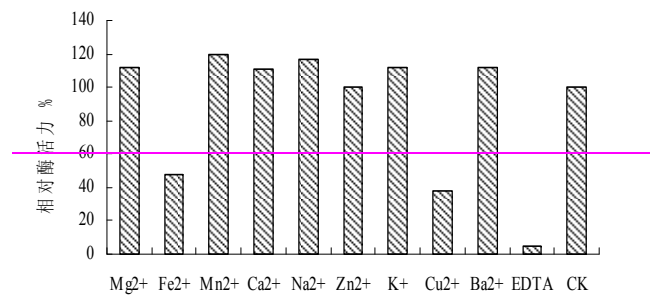


图 5 温度 (a) 及 pH (b) 对酶稳定性的影响

Fig. 5 Effects of temperatures (a) and pH (b) on enzyme stability

2.2.3 金属离子及 EDTA 对酶活力的影响

金属离子可作为蛋白酶的激活剂，但是，激活剂对酶的作用具有一定的选择性，也可对酶活力起抑制作用。通过以下试验，我们将该蛋白酶初步确认为金属蛋白酶。图 6 显示，EDTA 能强烈抑制其酶活力，在 10 mmol/L 的 EDTA 溶液中室温孵育 30 min，酶活力仅剩 5.2%；金属离子对酶活力具有一定影响，Mg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Na⁺、Zn²⁺、K⁺、Ba²⁺ 等对酶活力具有刺激作用，在 10 mmol/L 上述金属离子溶液中室温孵育 30 min，酶活力~~均高于对酶活力具有一定影响。~~



离子种类

图 6 金属离子及 EDTA 对酶活力的影响

Fig. 6 Effects of metal ions and EDTA on enzyme activity

活力均为 100% 以上; 而 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶活力具有一定抑制作用, 在 10 mmol/L 的 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 溶液中室温孵育 30 min, 剩余酶活力分别为 47.2%、37.8%。

3 结论

产耐高温蛋白酶菌株 BY25 的最高生长温度为 55℃, 最适生长温度为 50℃, 属于耐热菌^[10]。粗筛中其产酶量为 304 U/ml, 而培养条件对微生物的生长及产酶影响很大, 对产酶条件的优化往往可以大幅度提高产酶量^[11]。

BY25 产酶条件优化试验表明, 其最佳产酶温度为 30℃, 最佳起始 pH 为 8.0, 最佳 C 源为葡萄糖, 高通气量明显提高菌株产酶能力。在最适培养条件下培养 52 h, 上清液蛋白酶活力达 4 170 U/ml。产酶量提高近 14 倍。

酶学性质研究表明: 该蛋白酶为高温中性金属蛋白酶。最适反应 pH 为 7.0, 最适反应温度为 55℃。50℃ 及以下水浴 30 min 后, 该蛋白酶活力均为对照的 100% 左右, 具有很好的温度稳定性, 60℃ 水浴 30 min, 剩余酶活力约为 55%; 在 pH 5~11 的缓冲液中孵育 30 min 后, 剩余酶活力均在 95% 以上, 具有较好的热稳定性和良好的 pH 耐受性。EDTA 能强烈抑制酶活力, Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^{+} 、 Zn^{2+} 、 K^{+} 、 Ba^{2+} 等对酶活力具有刺激作用, 而 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶活力具有一定抑制作用。

参考文献:

[1] Rao M, Tanksale AM, Ghate MS, Deshpande VV. Molecular and

biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998, 62: 597-635

[2] Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technology*, 2003, 89: 17-34

[3] 日本微生物研究法讨论会编. 程光胜等译. 微生物学实验法. 北京: 科学出版社, 1981

[4] 舒丹, 李宏, 严建华, 陈金瑞, 李辉, 刘成君. 高温芽孢杆菌碱性蛋白酶发酵条件及酶性质研究. *四川大学学报*, 2004, 41(4): 856-860

[4]

[5] 戴玄, 唐兵, 陈向东, 彭珍荣. 产高温蛋白酶微生物菌种资源的研究. *微生物学杂志*, 1997, 17(3): 25-29

[6] Azeredo De LAI, Freire DMG, Soares RMA, Leite SGF, Coelho RRR. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 34: 354-358

[7] Nilegaonkar S, Zambare V, Kanekar P, Dhakephalkar P, Sarnaik S. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresour Technol*, 2007, 98: 1238-1245

[8] Hiraga K, Nishikata Y, Namwong S, Tanasupawat S, Takada K, Oda K. Purification and characterization of serine proteinase from a halophilic bacterium, *Filobacillus* sp. RF2-5. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2005, 69: 38-44

[9] 活泼. 高温中性蛋白酶及其产生菌的初步研究. *工业微生物*, 2003, 33(2): 30-34

[10] Madingan MT, Martinko JM, Parke J. 杨文博译. 微生物生物学. 北京: 科学出版社, 2001

[11] 周虢, 郑毅, 叶海梅, 石磊. 响应面分析法优化耐高温蛋白酶发酵培养基. *生物数学学报*, 2007, 22(1), 113-118

Fermentation Conditions and Some Properties of a Thermostable Protease from Moderate Thermophilic Strain BY25

PENG Su-ping^{1,2,3}, LIN Xian-gui^{1,2}, WANG Yi-ming^{1,2,3}

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China;

2 Joint Open Laboratory of Soil and the Environment, Institute of Soil Science and Hongkong Baptist University, Nanjing 210008, China;

3 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The fermentation conditions and properties of the thermostable protease from a thermophilic strain BY25 were studied. BY25 was

able to grow at temperature up to 55°C, yet the fastest growing rate was achieved at 50°C. And the best fermentation conditions for BY25 to produce protease was at 30°C, with initiating pH of 8.0, and with glucose as carbon source. High oxygen supply was crucial for protease production. Up to 4 170 U of protease in 1 ml of fermented culture medium could be achieved under such condition. The enzyme was identified as thermostable neutral metalloprotease, with highest activity at 55°C, pH 7.0, and exhibited high temperature tolerance and good stability at a wide range of pH. EDTA could inhibit enzyme activity greatly, Fe²⁺ and Cu²⁺ also had negative effects on enzyme activity.

Key words: Thermostable protease, Fermentation conditions, Enzyme properties