

【文章编号】 1004-1540(2009)02-0149-05

嗜热芽孢杆菌产耐热蛋白酶稳定性的研究

胡毅恒, 何华锋, 黄光荣, 蒋家新

(中国计量学院 生命科学学院, 浙江 杭州 310018)

【摘要】 实验室成功地分离保存了一株产蛋白酶的耐热芽孢杆菌. 该菌所产的蛋白酶最适 pH 7.5, 在 pH 4.0~9.0 时较稳定. 最适温度为 70 °C, 80 °C 以下时热稳定性较好, 在稳定的 pH 或温度下能保持 1 h 以上活性不变. 通过添加 Ca^{2+} , Li^+ , Co^{2+} , Mg^{2+} 等 12 种金属离子证实该酶为金属激活蛋白酶, 其中 Li^+ 提高该酶活性最显著. 氧化剂过氧化氢可以提高该酶的活力, 表面活性剂如 Tween 80 和 Triton X-100 对酶活力影响不大. 该蛋白酶对各种常用的商品洗涤剂耐受能力较强, 在洗涤工业中具有较好的应用前景.

【关键词】 嗜热芽孢杆菌; 耐高温蛋白酶; 稳定性

【中图分类号】 Q554.3

【文献标识码】 A

Stability of a thermostable protease from a thermophilic *Bacillus*

HU Yi-heng, HE Hua-feng, HUANG Guang-rong, JIANG Jia-xin

(College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: A thermophilic *Bacillus* which can produce a thermostable protease was separated and preserved. The protease had a good stability between pH 4.0~9.0. Its optimum pH was pH 7.5. It was of good stability when below 80 °C. The optimum temperature was 70 °C; and its activity almost had no change in stable pH or temperature over an hour. The protease proved to be a metalloprotease by adding 12 kinds of metal ions such as Ca^{2+} , Li^+ , Co^{2+} , Mg^{2+} ; and Li^+ increased the activity of the protease most. H_2O_2 could reinforce the activity of the protease; and surfactants such as Tween 80 and Triton X-100 had little influence on it. The protease markedly exhibits its tolerance against a variety of detergents. Therefore it can be used as an excellent additive in industrial applications, especially in the detergent industry.

Key words: thermophilic *Bacillus*; thermostable protease; stability

蛋白酶是一种重要的工业酶制剂, 占酶制剂市场的 65% 以上份额^[1], 目前已在皮革、医药、化工、食品、洗涤、纺织等行业中大量应用, 带来了很

大的经济与社会效应. 微生物产生的蛋白酶是商业用蛋白酶的主要来源之一^[2-5]. 芽孢杆菌 (*Bacillus*) 是一种很好的蛋白酶生产菌, 成为目前细

【收稿日期】 2009-04-12

【基金项目】 浙江省自然科学基金资助项目 (No. Y405083)

【作者简介】 胡毅恒 (1984 -), 男, 湖南澧县人, 硕士研究生. 主要研究方向为食品微生物发酵及产物分离纯化工作.

菌产蛋白酶研究和应用的主要菌种之一. 由于不同菌株产生的蛋白酶均具有其特异性, 因此, 为了更好地适应工业生产的需要, 研究开发新的具有优良特性的蛋白酶资源很有必要和具有广泛的市场前景.

对于一种新的蛋白酶, 研究其生化特性及其稳定性是对其进行应用开发的基础. 在蛋白酶中加入一些其它的酶, 例如纤维素酶、脂肪酶等能够改善在洗涤剂中的洗涤效果^[6]. 而且洗涤剂中一些物质对蛋白酶的活力也可能产生影响, 如通常情况下蛋白酶在高温时活力大大降低, 甚至失活. 因此, 一种新的蛋白酶资源应用于洗涤行业前必需对其生化稳定性进行研究. 对实验室筛选的一株耐高温芽孢杆菌所产生的耐高温蛋白酶在特定环境中的稳定性进行了研究, 以期为该蛋白酶进一步的应用研究提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 蛋白酶来源及主要试剂

耐热芽孢杆菌菌株 HL-3, 本实验室保存. 该菌株产蛋白酶条件: 46 °C 培养 60 h, 摇瓶速率 150 r/min, 接种量为 5 mL/100 mL, 培养基组成为(g/100 mL): 葡萄糖 6.0, 豆饼粉 3.0, NaH_2PO_4 0.4, MgSO_4 0.02, CaCl_2 0.02, pH 自然. 摇瓶发酵液经离心(10 000 r/min, 4 °C, 20 min)后的上清液冷冻干燥成粉末, -20 °C 保存备用.

主要化学试剂: Tween 80, H_2O_2 , Triton X-100, SDS, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 , FeCl_2 , NaCl, MnCl_2 , AlCl_3 , ZnCl_2 , CaCl_2 , LiCl, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, MgCl_2 和 KCl, NaOH, Na_2CO_3 , NaHCO_3 , NaOOCCH_3 (NaAc), KH_2PO_4 , Cl_3CCOOH (TCA), Tris-HCl, $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa}$ (酒石酸钾钠) 和酪蛋白, 均为分析纯.

商品洗涤剂: 立白洗洁精、立白冷水超速洗衣粉、雕牌生姜洗洁精、雕牌超白加酶洗衣粉、超能去渍 365 洗衣粉、奇强高效洗衣粉、汰渍 365 全能含舒肤佳皂粒洗衣粉、奥妙净蓝全效洗衣粉, 均购自杭州下沙物美超级市场.

1.2 蛋白酶活力测定

取 100 μL 蛋白酶液于离心管(1.5 mL)中, 加入 400 μL 已在 70 °C 水浴中保温 5 min 后的 2% 酪蛋白, 于 70 °C 水浴中 10 min, 加入 1 mL

10 g/100 mL TCA 终止酶反应. 做 3 个平行试验, 同时做空白(即加入酶后直接用 TCA 沉淀酶并使酶失活, 然后再加 2% 酪蛋白). 冷却后离心(14 000 r/min, 20 min), 取 0.2 mL 上清液以福林酚法测定蛋白质含量^[7]. 以每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸所需酶量为 1 个酶活力单位(U).

1.3 温度和 pH 对蛋白酶活力的影响

将 2% 酪蛋白底物分别于 35~90 °C 下^[8] 水浴保温 10 min 后, 立即在另一 70 °C 水浴锅中测定其蛋白酶活力.

在不同 pH 缓冲体系(50 mmol/L pH 4.0~5.5 HAc-NaAc 缓冲液、50 mmol/L pH 6.0~7.0 KH_2PO_4 -NaOH 缓冲液、50 mmol/L pH 7.5~9.0 Tris-HCl 缓冲液、50 mmol/L pH 9.5~11.0 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液)中^[9] 以 2% 酪蛋白为底物测定蛋白酶活力.

1.4 蛋白酶的温度和 pH 稳定性

将 1 mL 酶液分别于 40, 50, 60, 70, 80 °C 下保温, 在 10, 20, 30, 40, 50, 60 min 后, 取 100 μL 酶液立即在 70 °C 下测定蛋白酶活力.

1 mL 酶液分别在不同 pH(4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0) 缓冲体系中于 4 °C 保存 30 min 和 60 min 后在 70 °C 下以 2% 酪蛋白为底物测定蛋白酶活力.

1.5 蛋白酶的金属离子稳定性^[10]

用 5.0 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA) 螯合金属离子并以 20 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl 透析 24 h, 期间更换缓冲液 3 次. 除去 EDTA 后的蛋白酶分别与等体积的 2.0 mmol/L 的 Cu^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Na^+ , Mn^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Li^+ , Co^{2+} , Mg^{2+} 和 K^+ 混合, 于 4 °C 下 30 min 后在 70 °C 下测定其蛋白酶活力, 同时以 50 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液代替金属离子溶液做空白试验.

1.6 蛋白酶的氧化剂和非离子表面活性剂稳定性^[11]

分别将 1% $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2% $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.1% Tween 80, 0.5% Tween 80, 1% H_2O_2 , 5% H_2O_2 , 10% H_2O_2 , 0.1% Triton X-100, 0.5% Triton X-100, 0.1% SDS 和 0.5% SDS 与等量的蛋白酶液混合, 4 °C 下 30 min 后在

70 °C下测定蛋白酶活力。

1.7 蛋白酶的商品洗涤剂稳定性^[12]

分别将8种商品洗涤剂(液)配成14.0 mg/mL水溶液后在100 °C 5 min灭酶,冷却后与等量的蛋白酶液混合,4 °C下30 min后在70 °C下测定蛋白酶活力。

2 结果与讨论

2.1 温度和pH对蛋白酶活力的影响

该蛋白酶在35~90 °C时的相对酶活力,如图1。该蛋白酶在35 °C至70 °C的时相对酶活力逐步上升,70 °C达到最高,随着温度的继续上升相对酶活力不断下降,在80 °C时剩余活力为55%,85 °C以上时几乎失活。因此,该酶的最适温度为70 °C。在pH4.0~11.0的不同缓冲液中时该蛋白酶的相对酶活力如图2。该蛋白酶在pH 4.0~7.5的时相对酶活力逐渐上升,到pH 7.5时相对酶活力达到最大值,随着pH的继续上升相对酶活力逐渐下降,因此,该酶最适pH为7.5。

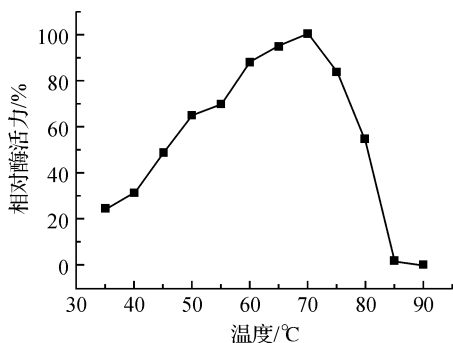


图1 温度对蛋白酶活力的影响

Figure 1 Effect of temperature on the activity of protease

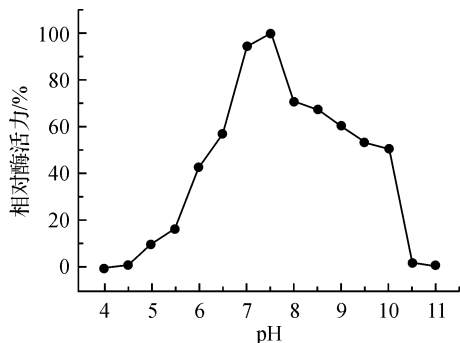


图2 pH对蛋白酶活力的影响

Figure 2 Effect of pH on activity of the protease

2.2 蛋白酶的温度和pH稳定性

该蛋白酶在40~80 °C的温度稳定性的结果如图3。从图3中可以看出,该蛋白酶在40~60 °C范围内稳定性较好,在60 min内酶活力保持80%以上,70 °C也有较好的稳定性,60 min还可保持70%酶活力,因此该酶属于耐热蛋白酶,在80 °C时酶活力随时间延长呈明显下降,在60 min后相对酶能力仅剩35%。

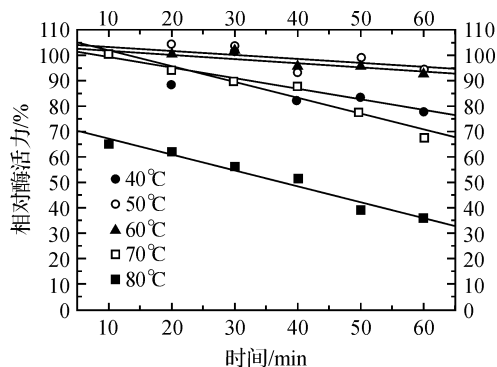


图3 蛋白酶的温度稳定性

Figure 3 Effect of temperature on the stability of protease activity

该蛋白酶的pH稳定性结果如图4。从图4可以看出,在60 min内,该蛋白酶在pH 4.0~9.0时稳定性较好,能保持90%以上的酶活力,但超过pH 9.0时酶稳定性大大降低,pH 10.0时60 min相对酶活力仅为66%,pH 11.0进一步下降到45%左右。

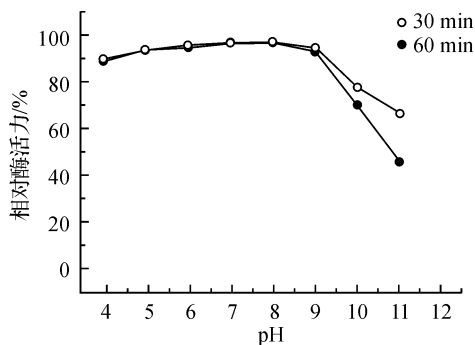


图4 蛋白酶的pH稳定性

Figure 4 Effect of pH on the stability of protease activity

2.3 金属离子对蛋白酶稳定性的影响

将用5.0 mmol/L EDTA螯合金属离子并透

析 24 h 脱 EDTA 的蛋白酶液分别与等体积的 2.0 mmol/L 的 Cu^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Na^+ , Mn^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Li^+ , Co^{2+} , Mg^{2+} 和 K^+ 复性 30 min 后, 以透析 24 h 的蛋白酶液为对照, 在 70 °C 下测定其蛋白酶活力, 结果如表 1. 实验结果表明: Li^+ , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} 和 K^+ 对该中性蛋白酶具有较强的复性能力, 复性后相对酶活分别为 2 817%, 1 933%, 1 908%, 1 492% 和 933%. 因此, 该酶是一种金属激活蛋白酶.

表 1 金属离子对蛋白酶稳定性的影响

Table 1 Effect of metal ions on activity of the protease

金属离子	相对酶活力/%	金属离子	相对酶活力/%
对照	100	Zn^{2+}	433
Cu^{2+}	58	Ca^{2+}	1492
Fe^{3+}	108	Li^+	2817
Fe^{2+}	350	Co^{2+}	1933
Na^+	283	Mg^{2+}	1908
Mn^{2+}	367	K^+	933
Al^{3+}	158		

2.4 洗涤剂对蛋白酶稳定性的影响

分别将配成 14.0 mg/mL 八种商品洗涤剂在 100 °C 下 5 min 灭酶后与等量的蛋白酶液混合, 4 °C 下 30 min, 然后在 70 °C 下测定其蛋白酶活力, 实验结果如表 2. 该蛋白酶对各种常用的洗涤剂的耐受能力都较强, 酶活力大部分保持率在 70% 以上.

表 2 商品洗涤剂对蛋白酶活力的影响

Table 2 Effect of some industrial detergents on activity of the protease

商品洗涤剂	相对酶活力/%	商品洗涤剂	相对酶活力/%
对照	100	雕牌生姜洗洁精	68
奥妙净蓝全效洗衣粉	85	奇强高效洗衣粉	76
雕牌超白加酶洗衣粉	82	立白冷水超速洗衣粉	77
立白洗洁精	74	超能去渍 365 洗衣粉	81
汰渍 365 全能含舒肤佳皂粒洗衣粉	86		

2.5 氧化剂和表面活性剂对蛋白酶活力的影响

该蛋白酶在 1~2% $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.1~0.5% Tween 80, 1~5% H_2O_2 , 0.1~0.5% Triton X-100, 0.1~0.5% SDS 处理 30 min 后, 在 70 °C 下所测得的蛋白酶活力如表 3. 从表 3 可知, 该耐热蛋白酶在所试氧化剂存在时的耐受能力较高, H_2O_2 可以增加该酶活力, 较高浓度效果更好, 而 SDS 对该酶有强烈的抑制作用, 这可能与 SDS 处理后使蛋白酶部分变性有关.

表 3 氧化剂和表面活性剂对蛋白酶活力的影响

Table 3 Effect of some oxidants on activity of the protease

氧化剂/ 表面活性剂	浓度/%	相对酶活/%	氧化剂/ 表面活性剂	浓度/%	相对酶活/%
对照		100	Triton X-100	0.1	97.06
$\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1	75.72	Triton X-100	0.5	94.64
$\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2	61.55	SDS	0.1	4.14
Tween 80	0.1	74.23	SDS	0.5	1.67
Tween 80	0.5	71.29			
H_2O_2	1	134.74			
H_2O_2	5	147.63			

3 结 语

研究了一株耐热芽孢杆菌生产的耐热蛋白酶的部分生化特性及稳定性. 该酶的最适温度与 pH 试验表明, 其最适温度为 70 °C, 该酶在 40 °C 至 70 °C 时 60 min 酶活力几乎不受影响, 在 80 °C 时 30 min 和 60 min 后相对酶活为 60% 和 40%. 该酶的最适 pH 为 7.5, 在 pH 4.0~9.0 较稳定, 酶活力几乎不受影响, 在 pH 9.0 以上时稳定性下降, pH 11.0 时相对酶活力下降到 45%. 该蛋白酶用 EDTA 螯合金属离子并透析除 EDTA 后, 用不同金属离子复性, Li^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 等离子能显著提高酶活性, 因此, 该酶为金属激活蛋白酶. 该蛋白酶对常用的几种洗涤剂的耐受能力较强. 该耐热蛋白酶能耐一定浓度的 NaBO_3 和 H_2O_2 , 同时 H_2O_2 可以提高该酶的酶活力, 而 SDS 对该酶有较强抑制作用.

蛋白酶是工业酶制剂中用得比较多的一类酶,耐热蛋白酶具有的耐热、耐洗涤剂、稳定性好和抗氧化性强等特点,为其广泛应用奠定了基础。尽管目前蛋白酶的产量较大,但是仍然不能满足制革、丝绸、日化工业对多品种生产的增长需要,特别是洗涤工业对高温洗涤剂用酶的需求,迫切需要新型的耐热蛋白酶。筛选新的耐热蛋白酶产生菌和对其产蛋白酶的酶学性质研究是开发和应用的基础,再结合现代基因工程^[13]和蛋白质工程技术的应用,诱变、筛选出高产菌株和对酶进行修饰,获得适合需要的蛋白酶,不仅能拓宽人们对蛋白酶及其产生菌株的认识,还将扩大蛋白酶在洗涤剂、纺织以及食品等工业中的应用。

【参 考 文 献】

- [1] RAO M B, TANKSALE A M, GHATGE M S, et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(3): 597-635.
- [2] 汪少芸,黄景洁,常景立,等. 新型复合酶制备鳃鱼蛋白水解物的研究[J]. *中国食品学报*, 2008, 8(2): 123-127.
- [3] 伍先绍,贺稚非,刘琳,等. 碱性蛋白酶产生菌株的筛选及其酶学性质研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2008, 15(3): 58-61.
- [4] HAN S J, CHUNG S C. Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkaophilic *Bacillus* classic I-52 by submerged fermentation: Feasibility as a laundry detergent additive[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38(1-2): 176-183.
- [5] SANDRO G, ASHOK P, CLARICE A O, et al. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32(2): 246-251.
- [6] SHAHRZAD B, MARIA M A, AMARE G, et al. Stability characteristics of a calcium-independent alkaline protease from *Nesterenkonia* sp[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32(5): 525-531.
- [7] 袁玉荪,朱婉华,陈均辉. 生物化学实验[M]. 北京:人民教育出版社, 1981: 46.
- [8] MEERA V, SARAMMA A V. Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(6): 1239-1243.
- [9] HAN S J, YOON M K, JANG W C, et al. Stabilization method of an alkaline protease from inactivation by heat, SDS and hydrogen peroxide[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36(5-6): 766-772.
- [10] 母智深,白英,赵广华,等. 荧光假单胞杆菌胞外蛋白酶的纯化及热稳定性[J]. *高等学校化学学报*, 2008, 29(4): 762-766.
- [11] KIRAN K D, RADHIKA T, RAVI N V, et al. Purification and characterization of a solvent and detergent-stable novel protease from *Bacillus cereus* [EB/OL]. (2007-07-04) [2008-03-06]. <http://www.ncbj.nlm.njh.gov/Pubmed/1761638>.
- [12] RATHINDRA M B, MONIKA P. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus* [J]. *Microbiological Research*, 2004, 159(2): 135-140.
- [13] 贺稚非,周泽扬,李洪军,等. 假单胞菌 SP-6 胞外弹性蛋白酶基因的克隆与表达[J]. *中国食品学报*, 2007, 7(6): 13-20.