

一株地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究 I.

黄红英¹ 方海红² 刘爱民² 夏颖² 吕正兵² 张林普²

(江苏省农业科学院土壤肥料研究所 南京 210014)¹ (安徽师范大学生命科学院 芜湖 241000)²

摘要: 从皖北盐碱地土样中分离到 011 菌株, 对其进行了菌种鉴定以及胞外碱性蛋白酶的初步研究。结果表明: 011 菌株符合地衣芽孢杆菌种的特征, 但该菌芽孢端生、孢囊膨大、中度耐盐、高度耐碱, 可在 NaCl 浓度为 13% 和 pH11 的培养基中生长, 这些特征又不同于该种几个模式株, 因而将 011 菌株鉴定为地衣芽孢杆菌的一个亚种, 命名为地衣芽孢杆菌汤山亚种 (*Bacillus licheniformis* subsp. *dangshanensis*)。该菌在发酵培养基中能产生较高产量的胞外碱性蛋白酶(725u/mL)。酶的最适作用条件: 60℃、pH9.0, 该酶在 pH6.0~11 范围内稳定。

关键词: 地衣芽孢杆菌亚种, 菌种鉴定, 碱性蛋白酶

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 05-0020-05

STUDY ON THE ALKALINE PROTEASE SECRETING FROM A *BACILLUS LICHENIFORMIS* I.

HUANG Hong-Ying FANG Hai-Hong LIU Ai-Ming XIA Ying Lü Zheng-Bing ZHANG Lin-Pu

(Institute of Soil and Fertilizer, Jiangsu Academy of Agriculture Science, Nanjing 210014)

(College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000)

Abstract: Strain 011 isolated from salt-soda soil in the north of Anhui province was identified, and its alkaline protease was studied. Results indicated it possesses characters common to *Bacillus licheniformis*, but differs from known typical strain of *Bacillus licheniformis* in sporangium shape, spore location and tolerant degree to salt and alkalinity.

收稿日期: 2000-07-07, 修回日期: 2000-09-15

The strain may grow in medium with 13% NaCl and the value of pH 12. Strain 011, therefore, was identified as a subspecies of *B. licheniformis* and designated as *Bacillus licheniformis* subsp. *dangshanensis*. Growing in fermentative medium, the strain can produce high yield alkaline protease (725u/mL), whose optimum conditions are pH 9.0 and 60°C. The enzyme is stable in the range of pH from 6-11.

Key words: *Bacillus licheniformis* subsp. *dangshanensis*, Identification, Alkaline protease

大量研究证明,天然高盐碱域中存在多种耐盐碱微生物,由于长期处于这种极端的环境中,它们往往具有不同于一般微生物的遗传和生理特性。开展耐盐碱微生物资源调查和相关的遗传生理特性分析,不仅有利于微生物生态、进化的研究,同时也是开发工业用酶的一条新的途径。本文报告从我国安徽砀山盐碱地土壤中分离的011菌株鉴定结果及其碱性蛋白酶的粗酶部分性质。

1 材料与方法

1.1 样品及菌株分离

样品采自皖北盐碱土壤。分离及纯化均采用含 7% NaCl (w/v) 的牛肉膏蛋白胨培养基,按稀释涂布平板法对土样进行细菌分离,用划线法纯化。

1.2 菌株的鉴定

主要参考《伯杰氏细菌系统分类手册》^[1]和 Gordon 等^[2]的研究工作,鉴定程序按照《一般细菌常用鉴定方法》^[3]及《微生物实验技术教程》^[4]进行。用光镜和电镜观察^[5]菌体形态结构,并用 Tm 法^[6,7]测定 DNA 中 G + Cmol%。

1.3 胞外碱性蛋白酶

1.3.1 摇瓶发酵培养基:参照文献 [8] 配制。

1.3.2 碱性蛋白酶粗酶活力测定:按文献 [9] 进行。37°C 振荡培养 48h,将发酵液离心 (5,000r/min) 10min,上清液即为粗酶液,采用 Folin 试剂显色法,测定酶活力。

2 结果

2.1 菌种鉴定

2.1.1 形态特征:011 菌株革兰氏染色反应为阳性,无荚膜,菌体呈杆状,两端钝圆,大小为 0.6 ~ 0.8 μ m \times 1.0 ~ 3.5 μ m,具 6 ~ 10 根鞭毛。芽孢柱状、端生,芽孢囊膨大 (见图 1)。

2.1.2 培养特征:在肉汤琼脂平板上,菌落直径 3 ~ 4mm,浅灰色、较薄、不透明、表面粗糙、边缘不整齐、有毛绒状突起。菌落与培养基紧贴、不易挑取。

2.1.3 温度、耐盐度和耐碱性试验:011 菌株

能在 20°C ~ 62°C 生长,最适生长温度范围为 37°C ~ 55°C。在 0.1% ~ 13% NaCl 培养基中生长良好,固体培养基上能正常形成菌落。盐浓度超过 15%,即停止生长,生长最适盐浓度为 1%。在 pH 5.5 ~ 11 的条件下生长,并随着菌体生长,肉汤培养基 pH 值发生改变,趋向 pH 9.0,该菌最适生长 pH 为 9.0。

2.1.4 耐药性试验:四环素 (10 μ g/mL)、庆大霉素 (10 μ g/mL)、链霉素 (15 μ g/mL) 硫

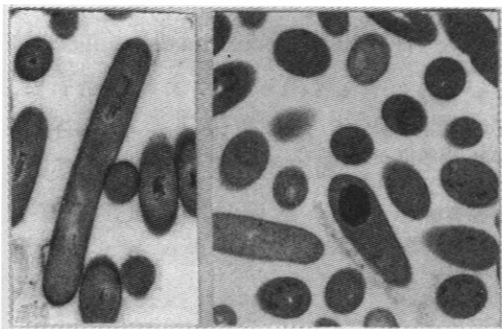


图 1 011 菌株透射电镜照片 (8,000 \times)

酸卡那霉素 (10 μ g/mL) 和氯霉素 (10 μ g/mL) 均能抑制 011 菌株的生长, 而青霉素 (80 μ g/mL) 和氨苄青霉素 (100 μ g/mL) 无抑菌效果。

2.1.5 其它生理生化特性: 穿刺培养时, 011 菌株不仅在琼脂表面生长, 而且表现出良好的侵入生长, 为兼性厌氧型代谢。发酵 D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露糖、蔗糖产酸, 均不产气。V. P 反应阳性, V. P 液 pH5.5。过氧化氢酶阳性, 不形成吲哚和二羟丙酮。水解酪素、淀粉和明胶。在 pH5.7 的 Sabouraud 葡萄糖琼脂上生长, 硝酸盐还原, 不产卵磷脂酶, 利用柠檬酸盐和丙酸盐, 对溶菌酶 (0.001%) 不敏感 (见表 1)。

2.1.6 DNA 中的 G + C mol% 的测定: DNA 中 G + C 含量为 47.1 mol% (Tm)。

2.2 粗酶性质

试验中发现, 011 菌株能快速水解酪素和液化明胶, 说明该菌株具有较强的胞外蛋白酶分泌能力, 故对其胞外蛋白酶活力及其性质进行了研究。

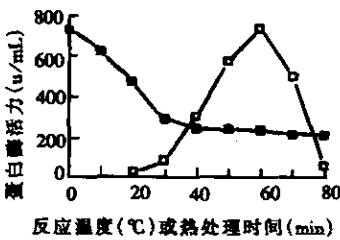


图 2 最适温度与酶的热稳定性
 -□- 温度对酶活力的影响,
 -■- 60°C 热处理对酶活力的影响

2.2.1 最适温度和热稳定性: 将粗酶稀释液与酪蛋白溶液 (用 pH9.0 的 0.1mol/L 硼砂-NaOH 缓冲液配制) 等体积混合, 在 20 $^{\circ}$ C ~ 80 $^{\circ}$ C 的温度条件下分别反应 10min, 从图 2 看出, 反应温度在 60 $^{\circ}$ C 时粗酶活力可达 725u/mL, 高于 70 $^{\circ}$ C 酶活力显著下降; 将酶稀释液放在 60 $^{\circ}$ C 水浴中保温 10 ~ 80min, 测定其剩余酶活力, 从图 2 看出, 在无底物存在的情况下, 60 $^{\circ}$ C 保温 30min 仍保留高达 40% 左右的酶活力, 表明 011 菌株分泌的碱性蛋白酶具有较强的热稳定性。

表 1 011 菌株与地衣芽孢杆菌的特征比较^[1,4]

特征	地衣芽孢杆菌	011	特征	地衣芽孢杆菌	011
细胞直径 > 1.0	-	-	丙酸盐利用	+	+
芽孢圆形	-	-	卵磷脂酶	-	-
孢囊膨大	-	+	NO ₃ ⁻ 产生 NO ₂ ⁻	+	+
过氧化氢酶	+	+	形成吲哚	+	+
厌氧生长	+	+	二羟丙酮	ND	-
V.P. 反应			生长条件		
V.P. 肉汤中 pH < 6	+	+	pH6.8 肉汤	+	+
V.P. 肉汤中 pH > 7	-	-	pH5.7	+	+
产酸			NaCl 2%	+	+
D-葡萄糖	+	+	NaCl 5%	+	+
L-阿拉伯糖	+	+	NaCl 7%	+	+
D-木糖	+	+	NaCl 10%	ND	+
D-甘露糖	+	+	温度 5 $^{\circ}$ C	-	-
从葡萄糖产气	-	-	温度 10 $^{\circ}$ C	-	-
酪氨酸分解	-	-	温度 30 $^{\circ}$ C	+	+
苯丙氨酸脱氨	-	-	温度 40 $^{\circ}$ C	+	+
水解物			温度 50 $^{\circ}$ C	+	+
酪素	+	+	温度 55 $^{\circ}$ C	+	+
明胶	+	+	温度 65 $^{\circ}$ C	-	-
淀粉	+	+	0.001% 溶菌酶的肉汤	d	+
柠檬酸盐利用	+	+	G + C mol% (Tm)	46.4	47.1

注: - 90% 以上的菌株是阴性, + 90% 以上菌株是阳性; d 11% ~ 89% 的菌株是阳性, ND 没有资料可用

2.2.2 最适 pH 和对 pH 的稳定性: 碱性蛋白酶是一类在 pH 碱性范围内水解蛋白质肽键的蛋白酶。最适作用 pH 值一般为 9~10。取发酵液离心后的上清液 0.5mL, 加入 9.5mL 不同 pH 的缓冲液 (pH5~12), 测定蛋白酶活力。从图 3 可以看出, 此酶最适 pH 值为 9.0, 在 pH8.0~11.0 之间酶活力都较高。将粗酶液用不同 pH 的缓冲液 (pH5~12) 稀释, 40℃水浴保温 2.5h 后, 测定剩余酶活力。结果表明: 在 pH6.0~10.0 之间酶比较稳定, 剩余酶活力在 90% 以上, 大于 pH11 时酶活力显著下降 (见图 3)。

2.2.3 酶对 SDS 的稳定性: 将不同量的粗酶液与 SDS 等体积混合 (混合液中 SDS 浓度为 0.5%, pH9.0) 在 40℃保温 10min, 再测定剩余酶活力。结果表明: SDS 对酶的抑制作用与酶浓度有关, 酶浓度越高抑制作用越小, 有底物保护下酶稳定性提高。

表 2 SDS 对酶活力的影响

粗酶量 (mL)	剩余酶活力 (%)	
	Test 1	Test 2
对照	100	100
0.2	16.3	26.4
0.4	17.2	27.0
0.6	18.1	27.8
0.8	20.4	35.2
1.0	22.8	40.3

注: 1 酶与 SDS 在 40℃保温 10min 后加底物,

2 酶, SDS 和底物在 40℃保温 10min

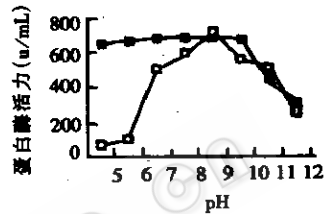


图 3 最适 pH 和酶对 pH 的稳定性

—□— pH 对酶活力的影响,
—■— 酶对 pH 的稳定性

3 讨论

试验表明: 011 菌株具有芽孢, 好氧生长, 菌体杆状, 应属于芽孢杆菌属。依据 011 菌株的生理生化特性, 从 Gordon 等^[2]编写的芽孢杆菌分类检索表可以初步判断该菌为地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)。同时, 从 011 菌株形态特征、生理生化以及 DNA 的 G+Cmol% 也可以发现, 除孢囊膨大以外, 其余特征均与地衣芽孢杆菌典型特征基本相符。而 Gordon 氏分类系统 (1974 年被 Bacillus Sub committee 采用) 首先依据芽孢囊是否膨大以及芽孢着生位置、革兰氏反应将芽孢杆菌分为 3 大类群, 即: 群 1, 芽孢囊不明显膨大, 芽孢椭圆形或柱状, 中生到端生, 革兰氏阳性; 群 2, 芽孢囊膨大, 芽孢椭圆形, 中生到端生, 革兰氏阳性、阴性或可变; 群 3, 芽孢囊膨大, 芽孢球形, 端生到次端生, 革兰氏阳性、阴性或可变。011 菌株芽孢囊明显膨大 (见图 1), 应该归属于群 2 或群 3, 但依据这种划分, 011 菌株不仅在芽孢的形态上与两个群冲突, 而且形态特征和生理生化特征与群 2 或群 3 的已知种都相去甚远。Berkeley 等^[10]的研究结果表明, 在群 1 的某些种内部存在孢囊膨大和不膨大两种情况, 因此, 作者认为孢囊膨大不影响 011 菌株隶属地衣芽孢杆菌这个种的分类地位。鉴于与现有模式菌株 ATCC14805、NCIB9375 和 NCTC10341^[1,10]在孢囊形状、耐盐碱能力方面的差别, 将该菌株鉴定为地衣芽孢杆菌的一个亚种, 命名为地衣芽孢杆菌砾山亚种 (*Bacillus licheniformis* subsp. *dangshanensis*)。一般认为由地衣芽孢杆菌和短小芽孢杆菌产生的碱性蛋白酶为 Carlsberg 型^[11], 添加此类酶的洗涤剂去污效果好, 因为它与 Novo 型碱性蛋白酶相比, 具有更高的酯酶对蛋白酶活力比值, 在洗涤剂中具有较大的稳定性。通过酶

活力检测,发现011菌株能产生较高产量的碱性蛋白酶,其发酵上清的酶活力725u/mL。与我国目前生产上使用的地衣芽孢杆菌2709相比,011菌产生的酶最适温度(60℃)要较前者高10℃^[12]。而且,该蛋白酶的热稳定性和pH的稳定性强,对SDS具有较强的抗性,特别是在有底物保护下,其活力能保持较高水平,这与当前碱性蛋白酶应用广泛的加酶洗涤剂生产、制革等行业的要求相符。该菌体无荚膜,发酵液粘度小,对酶的分泌和后提取有利。因此,011菌株适合作选育工业生产菌的出发菌株。经过多次物理、化学诱变,已经选育出了碱性蛋白酶高产变异株C₃₋₀₃,有关011菌株的诱变结果将另文报道。

参 考 文 献

- [1] Claus D, Berkeley, R. C. W: in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams and Wilkins Co., Baltimore. London. Los Angeles. Sydney, 1984, 1105 ~ 1139.
- [2] Gordon, Re: The genus *Bacillus*, in "Handbook of Microbiology cell: organismic microbiology". Laskin A I and Lechevlier H A, eds, (1973) 72 ~ 88, the chemical kubber co press, devaland ohio.
- [3] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著: 一般细菌常用鉴定方法, 北京: 科学出版社, 1978.
- [4] 宋大新. 《微生物实验技术教程》. 上海: 复旦大学出版社, 1993.
- [5] 谢念铭, 董少清, 王鲁平, 等. 微生物学通报, 1989, 29 (12): 152 ~ 154.
- [6] 周慧玲. 微生物学报, 1978, 18 (2): 134 ~ 139.
- [7] 周志伟. 微生物学通报, 1991, 18 (5): 275 ~ 279.
- [8] 那叔敏. 微生物学报, 1988, 28 (3): 249 ~ 279.
- [9] Spies J R. *Methods in Enzymology*, III, Academic Press Inc, New York 1975, 467.
- [10] Berkeley R C W. Identification of *Bacillus* species. in: *Methods in Microbiology*", Bergan T eds, London. Orlando. New York: Academic press. 1984, 16: 291 ~ 328.
- [11] Keay L. *Ferment. Technol. Today*, 1972, 289 ~ 298.
- [12] 徐子渊. 食品与发酵工业. 1984, 4: 12 ~ 17.