

微生物碱性蛋白酶的研究进展

方海红^{1,2} 胡好远² 黄红英² 张林普² 吕正兵²

(安徽师范大学生命科学学院 芜湖 241000)¹ (安徽医科大学微生物教研室 合肥 241000)²

摘要: 碱性蛋白酶可源于动物、植物和微生物。微生物来源的碱性蛋白酶因其具有培养简便、产量丰富而应用尤为广泛,同时菌种筛选、纯化、诱变乃至重组工程菌技术的应用为其大规模工业化生产提供了坚实的基础。本文对微生物碱性蛋白酶产生菌的种类、高产菌株选育工作进展以及碱性蛋白酶的分类、性质、基因结构及功能等方面进行了简要概述。

关键词: 微生物, 碱性蛋白酶, 研究进展

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 02-0057-03

碱性蛋白酶 (Alkaline protease) 是一类最适 pH 为碱性的蛋白酶。最早发现于猪胰脏中, 1945 年瑞士 Dr. Jaag 等人在地衣芽孢杆菌中发现了这类酶^[1]。微生物来源的碱性蛋白酶都是胞外酶, 与动、植物来源的碱性蛋白酶相比还具有适于大规模工业化生产的优点。因此, 微生物碱性蛋白酶的菌种选育、酶转译、分泌及其调控机制的研究一直为人们所关注。本文扼要综述微生物碱性蛋白酶研究进展。

1 微生物碱性蛋白酶的产生菌

近 30 年来, 对微生物碱性蛋白酶的研究更加广泛。该酶主要来源于几种芽孢杆菌, 如地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短小芽孢杆菌以及嗜碱性芽孢杆菌, 灰色链霉菌、费氏链霉菌和某些镰刀菌、霉菌也能产生碱性蛋白酶。我国生产的菌种主要有地衣芽孢杆菌 2709、短小芽孢杆菌 289 和 209 菌株。

2 高产菌种的选育

从工业应用的目的出发, 提高菌种产酶活力是应用的基础。早期的工作主要集中在以各种物理化学手段诱变原始菌株。国内较为典型的有中国科学院微生物研究所那淑敏等人于 1987 年利用亚硝基胍和紫外线复合处理、获得变异株 *Bacillus licheniformis* 533-F13, 产酶活力最高达 10000u/mL 比出发菌株提高了近 20 倍^[2]。1990 年中国科学院微生物研究所邱秀宝等人对嗜碱性短小芽孢杆菌 (*Alkaliphilic Bacillus pumilus*) R115 应用亚硝基胍诱变以及利福平抗性株筛选使酶活力比原始菌株提高 11.8 倍^[3]。除了诱变育种外, 还探索了改变菌种发酵条件来提高酶活力^[2,4]。最近, 本课题组参照文献^[2,3]的研究方法, 结合近年来常用的低能 N⁺ 离子注入技术对一株野生型地衣芽孢杆菌进行了 4 次不同物理化学手段的诱变, 获得一个高产菌株, 其粗酶活力达 12425.9u/mL, 比出发菌株 (725u/mL) 提高 17.1 倍 (待另文发表)。

此外, 利用基因工程技术提高菌种的产酶能力, 不仅使菌种的产酶量有较大的提高, 而且能够改变酶的性质。这促进了研究工作将理论与实践的紧密结合, 缩短了从探索研究到工作应用的时间, 克服了传统育种方法的盲目性。1994 年, 南开大学微生

物系杨文博、冯耀宇通过基因工程手段构建了一株直接利用淀粉作为发酵碳源的菌株, 摇瓶发酵酶活力高达 14014u/mL^[5]。

3 碱性蛋白酶的分类及性质

已报道的市售细菌碱性蛋白酶有枯草酶 Subtilisin Carlsberg, Subtilisin BPN (nagarase, Novoenzyme) 以及枯草杆菌糖化型 α -淀粉酶产生菌的碱性蛋白酶 (subtilisin amylosacchariticus) 等多种。Keay 按不同 pH 对蛋白酶作用于酪素的活性曲线, 酯酶对蛋白酶的活力的比值, 免疫学分析中有无交叉反应以及蛋白酶氨基酸组成和序列的差异, 将其分为两种类型: A 型为 Carlsberg 型蛋白酶, B 型为 Novo 型蛋白酶。大多数微生物碱性蛋白酶作用于肽链的中间, 生成二个肽。除酶本身的氨基酸残基外, 不具有特定的活性基团, 酶发挥作用时不需要特定的激活剂, 而需要金属离子激活, 如除去金属离子就不能作用, 必须的金属离子有 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 等^[6]。酶的活性中心含有丝氨酸, 故又称丝氨酸蛋白酶。因此, 这类蛋白酶遇到作用于丝氨酸的试剂二异丙基氟磷酸 (DFP) 便失活, 这是碱性蛋白酶的一个重要特征。但是碱性蛋白酶对金属螯合剂 EDTA、重金属和巯基试剂却不敏感。钙离子对此酶有一定的稳定作用。碱性蛋白酶有较大的耐热性, 55℃下放置 30min 能保留大部分活力。碱性蛋白酶作用位点要求在水解点羧基侧具有芳香族或疏水性氨基酸 (如酪氨酸、苯丙氨酸、丙氨酸等), 它比中性蛋白酶有更大的水解能力。此外, 碱性蛋白酶还具有酯酶的活力。

4 碱性蛋白酶的基因结构及功能

从 80 年末期开始, 微生物蛋白酶的研究逐渐向基础理论和应用的纵深发展, 主要表现在对蛋白酶基因结构、蛋白质三维空间结构、结构与功能的关系以及蛋白质工程等方面的研究。

信号肽的存在是区分胞质蛋白和输出蛋白的唯一显著特征。研究发现, 在 *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. stearo-thermophilus* 中分泌的中性蛋白酶与在 *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheni-formis* 中分泌的碱性蛋白酶中信号肽段有同源程度很高的保守序列^[7]。这些信号肽的保守序列在带正电荷的 N 端紧跟一段疏水残基, 在极性 C 区有一个共有序列切割位点, Ala-x-Ala, 切割一般在 C 端 Ala 之后。这两个 Ala 残基常被其他短肽链氨基酸残基取代, x 位优先选择大体积的氨基酸残基。中国科学院生物物理研究雷虹等人早在 1992 年就依据地衣芽孢杆菌 NCIB6816 的 subtilisin Carlsberg 基因序列设计引物, 通过 PCR 技术从地衣芽孢杆菌 2709 菌株的染色体 DNA 中扩增了 2709 碱性蛋白酶基因中编码成熟的 2709 碱性蛋白酶的序列, 全序列分析结果显示: 2709 碱性蛋白酶的编码序列与相应的 NCIB6816 序列相比有 3% 左右的碱基组成差异: 与已发表两种 subtilisin Carlsberg 型氨基酸序列长度 (274 个氨基酸) 一致, 仅 5 个氨基酸差异, 同源率为 98% - 99%, 属典型的 subtilisin carlsberg 类。通过对已知的 subtilisin 类蛋白酶的氨基酸序列和空间结构比较可知, subtilisin carlsberg 在 5 个位置上所发生的氨基酸置换均在其它 subtilisin 类蛋白中有所出现, 其中 102 位, 128 位, 211 位氨基酸位于空间结构保守区内, 157 位, 160 位氨基酸位于空间结构可变区内 102 位, 128 位氨基酸参与酶与底物的相互作用^[8]。随后, 洪杨等人又在上述基础上通过原位杂交从 2709 基因文库筛选出含有完整的 2709 碱性蛋白酶基因的阳性克隆, 测序结果显

示: 2709 与 NCIB6816 基因序列显示极高的同源性, 其中信号肽与导肽部分无论在氨基酸序列还是在 DNA 序列上均与 NCIB6816 基因完全一致^[9]。由此可见, 不同菌株产生的碱性蛋白酶其翻译加工切除信号肽和导肽的过程及调控机制基本一致。

近年来, 作为研究和改造蛋白质的一门技术, 蛋白质工程获得了迅速发展。对于枯草杆菌蛋白酶与蛋白质工程主要集中在酶的专一性和催化机理、稳定性作用力和性能预测等方面^[10,11]。1998 年, Wells 和 Estell 借助定位诱变赋予 BPN 酶位于口袋底部的 Gly166 残基不同的侧链体积和疏水性, 或与第 156 位残基一起赋予不同荷电性质时, 对具有不同 P1 残基的底物的专一性产生了影响, 只要将 BPN 酶与底物残基侧链关系密切的三个残基逐步改换成 Carlsberg 酶底物的残基, 同时对于活性部位的 Ser221, His64, Asn155 的三个残基也做了替换。这些直接或间接对稳定过渡态有重要贡献的残基的改变都会使 K_{cat} 大大降低, 从而实现了 BPN 酶的专一性转化为类似于 Carlsberg 酶的专一性^[12,13]。根据 1988 年的报道, 至少已制备 400 多个部位专一性的枯草杆菌酶的突变体。已用盒式突变技术获得 BPN 酶抗氧化突变体 (如 Met222Ala 和 Met222Ser 等), 使其在延长的时间内可抗 1mol/L 的 H_2O_2 ^[12]。自由能的计算是蛋白质突变体性能预测的重要环节, 蛋白质工程以枯草杆菌酶 1.8 埃分辨率结构为模型利用自由能微机方法计算相对的自由能差值来实现这一重要步骤。三肽底物被天然酶 (枯草杆菌酶) 及其突变体 (Asn155Ala) 催化时, 结合自由能和活化自由能均发生改变, 微机计算结果表明: 这一突变导致的活化自由能变化较结合自由能的变化大一个数量级。^[10]

5 结语

碱性蛋白酶作为一种重要蛋白质水解酶, 早已实现了工业化生产, 但是人们对它的研究开发兴趣方兴未艾。目前, 微生物碱性蛋白酶的研究已经达到分子水平, 高产菌种的选育已经由传统单纯地使用诱变手段逐步过渡到应用基因工程技术。可以预见, 随着基础研究的不断深入, 在选育高产工业生产菌种领域必将出现新的突破, 同时碱性蛋白酶的应用范围也将进一步扩大。

参考文献

- [1] Rose A H. *Economic Microbiology*, Academicpress, London, 1980, 5: 51 ~ 72.
- [2] 那淑敏, 余茂效. 微生物学报, 1988, 28 (3): 249 ~ 256.
- [3] 邱秀宝, 袁影, 戴宏, 等. 微生物学报, 1990, 30 (2): 129 ~ 133.
- [4] Pinar. atik, Guzide atik. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, 23: 451 ~ 461.
- [5] 杨文博, 冯耀宁. 微生物学通报, 1994, 21 (5): 273 ~ 278.
- [6] 郭杰炎, 蔡武城编著. 微生物酶. 北京: 科学出版社, 1986.
- [7] Marjo Simonen and Ilkka Palva. *Microbiological. Rev.* 1993, 109 ~ 137.
- [8] 雷虹. 生物化学杂志, 1993, 9 (4): 441 ~ 447.
- [9] 洪扬. 生物工程学报, 1994, 10 (3): 271 ~ 276.
- [10] 毕汝昌, 储乃明. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18 (5): 329 ~ 334.
- [11] 王凡强, 马美荣, 王正祥, 等. 微生物学通报, 2000, 27 (3): 218 ~ 220.
- [12] Wells J iA, Estell D A. *TIBS*, 1998, 13 (8): 291.
- [13] Bryan P N. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 3743.