

研究报告



地衣芽孢杆菌 TG116 胞外蛋白酶产酶条件与酶学性质

令利军* 焦正龙 王军英 马稳霞 李子彬 赵云花 张玺 冯娟娟

西北师范大学生命科学学院 甘肃 兰州 730070

摘要:【背景】从独角莲中分离得到的地衣芽孢杆菌 TG116 是一株对植物病原菌具有广谱抗性作用的生防菌株。【目的】优化 TG116 的产酶条件并探索其酶学性质, 进一步了解其抗菌机制。【方法】采用 Folin-Phenol 显色法与响应曲面法, 优化菌株 TG116 的产酶条件并研究其蛋白酶的酶学性质。【结果】菌株 TG116 产酶最适条件为: 温度 40.83 °C, pH 8.01, 发酵时间 53.74 h, 增加通气量可以显著提高酶活力。按照优化后的条件培养 48 h 后, 上清液蛋白酶活力从 57.46 U/mL 达到了 254.07 U/mL。酶学性质研究表明: 该酶为碱性蛋白酶, 最适反应 pH 为 8.5, 最适反应温度为 50 °C, 具有良好的温度和 pH 稳定性, EDTA 对酶活具有强烈的抑制作用, 金属离子 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Co^{2+} 、 K^+ 等对酶活也具有一定的抑制作用。【结论】菌株 TG116 具有良好的 pH 与温度稳定性, 在实际应用中蛋白酶不易失活, 可以分解真菌的细胞壁蛋白成分, 破坏细胞壁结构, 从而抑制甚至杀死病原菌, 达到抗菌作用。

关键词: 碱性蛋白酶, 产酶条件, 酶学性质

Production and characterization of extracellular protease from biocontrol strain *Bacillus licheniformis* TG116

LING Li-Jun* JIAO Zheng-Long WANG Jun-Ying MA Wen-Xia

LI Zi-Bin ZHAO Yun-Hua ZHANG Xi FENG Juan-Juan

College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu 730070, China

Abstract: [Background] *Bacillus licheniformis* TG116 isolated from *Typhonium giganteum* Engl is a biocontrol strain with broad-spectrum against plant pathogens. [Objective] In order to optimize the enzyme production conditions of TG116 and explore its enzymatic properties. [Methods] The optimization of enzyme production conditions and the enzymatic properties of proteases were investigated by Folin-Phenol chromogenic method and response surface methodology. [Results] The optimal enzyme conditions to produce strain TG116 were temperature 40.83 °C, pH 8.01, and fermentation time 53.74 h and increasing aeration could significantly enhance enzyme activity. After 48 hours of incubation under optimized conditions, the protease activity of the supernatant reached 254.07 U/mL from 57.46 U/mL. The protein was alkaline protease, with optimum pH 8.5, the optimum temperature 50 °C and it has good temperature and pH stability. EDTA had strong inhibitory effect on enzyme activity and metal ions Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Co^{2+} , K^+ also

Foundation items: Lanzhou Science and Technology Plan Project (2018-1-104); Gansu International Science and Technology Cooperation Special (1504WKCA028)

*Corresponding author: E-mail: linglijun@nwnu.edu.cn

Received: 16-10-2018; Accepted: 13-12-2018; Published online: 09-01-2019

基金项目: 兰州市科技计划项目(2018-1-104); 甘肃省国际科技合作专项(1504WKCA028)

*通信作者: E-mail: linglijun@nwnu.edu.cn

收稿日期: 2018-10-16; 接受日期: 2018-12-13; 网络首发日期: 2019-01-09

have showed a certain inhibitory effect. [Conclusion] Strain TG116 has great pH and temperature stability. The proteases are not easily inactivated in practical applications, which can decompose the cell wall protein components of fungi and destroy the cell wall structure, thus inhibiting and even killing pathogenic bacteria to achieve antibacterial effects.

Keywords: Alkaline protease, Enzyme production conditions, Enzymatic properties

芽孢杆菌(*Bacillus*)是一种研究较为透彻的防菌株资源,其中一些种类在微生物农药研发方面得到广泛应用。芽孢杆菌具有很强的适应性,对多种植物病原菌具有抗性,而且对环境与动植物都无毒、无污染、无残留,也不会使病原菌产生抗药性^[1]。目前,国内外研发应用的菌株有解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) FZB42, 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) GB03^[2]、GB34^[2]、RB14^[3]、NB22^[3]、B-916^[4]、BL03^[5], 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) GB34^[2]等。

芽孢杆菌目前已知的抗菌机制有竞争作用^[6]、诱导植物抗病性^[4]或产生拮抗作用,如抗生素 Surfactin (表面活性素)、Iturin (伊枯草菌素)和 Fengycin (丰宁素)等^[7], 细胞壁降解酶几丁质酶^[8]、 β -1,3-葡聚糖酶^[9]、蛋白酶^[10]等,以及其它抗菌物质,如抗菌蛋白^[11]等。

生防微生物在拮抗病原真菌的过程中,其产生的活性成分首先需要突破病原真菌的细胞壁才能对病原真菌起到拮抗作用。大部分病原真菌细胞壁均含有几丁质、 β -1,3-葡聚糖和蛋白质等成分^[12],要突破细胞壁就需要多种水解酶的共同作用才能将其降解。杨合同等^[13]研究表明,木霉菌产生的不同类型的葡聚糖酶(α -1,3、 β -1,3、 β -1,4 和 β -1,6-葡聚糖酶)可以水解真菌细胞壁葡聚糖层,破损细胞壁骨架,与几丁质酶或抗生素协同抗菌。

蛋白酶又称蛋白质水解酶,是一种重要的生物大分子,可以通过水解多肽链来降解蛋白质,在动物、植物和微生物中广泛存在。蛋白酶具有相当可观的经济价值和研究价值,在理论研究中,蛋白酶的生理功能涉及蛋白质的折叠、孢子的形成和释放、萌芽和营养、酶修饰和级联反应、细胞周期以及基因表达调控等;在商业领域,蛋白酶在洗涤剂、

制革、丝绸食品以及制药等行业都有广泛的应用。

TG116 菌株^[14]从独角莲(*Typhonium giganteum* Engl)块茎中分离筛选得到,其对辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici*)、辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsici*)、马铃薯立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、黄瓜枯萎病菌(*F. oxysporum*)、黄瓜灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)等6种供试植物病原菌均有良好的抑制作用,为广谱型抑制菌。

经生理生化分析和16S rRNA 基因序列分析,将TG116 菌株鉴定为地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)。为了开发利用该菌,对菌株TG116 蛋白酶的产酶条件与酶活性性质展开深入研究。

1 材料与方法

1.1 菌株

供试菌株为地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) TG116 菌株,自独角莲块茎内分离筛选得到。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L)^[15]: 蛋白胨 10.0, 酵母膏 5.0, NaCl 5.0, pH 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

GYP 培养基(g/L)^[15]: 蛋白胨 5.0, 酵母粉 5.0, 葡萄糖 20.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

牛奶琼脂培养基(g/L)^[16]: 脱脂牛奶 10.0, 酵母膏 2.5, 琼脂 20.0, pH 自然, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

产酶培养基(g/L)^[17]: 葡萄糖 10.0, 酵母粉 5.0, 酪蛋白 10.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, K_2HPO_4 1.0, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 略作改动。

1.3 主要试剂和仪器

干酪素,上海中秦化学试剂有限公司;脱脂奶粉,广州赛国生物科技有限责任公司。紫外可见分光光度计,上海昂拉仪器有限公司。

1.4 酪氨酸酶活力定义和 L-酪氨酸标准曲线制定

1.4.1 酶活力定义

酶活力定义为: 1 mL 酶液在 pH 7.2、温度 40 °C 条件下水浴 20 min 后, 以每分钟水解酪蛋白产生 1 μ g 酪氨酸为 1 个蛋白酶活单位。

1.4.2 L-酪氨酸标准曲线制定

按照李金鞠等^[17]方法绘制标准曲线。

1.5 酶活力测定

用牛奶琼脂培养基测定该菌株的蛋白水解能力。将菌株发酵液 10 000 r/min 离心 5 min, 0.2 μ m 水相滤膜过滤除菌后, 用牛津杯法测定蛋白水解能力。具体为在牛奶琼脂培养平板上放置 3 个牛津杯, 加入 200 μ L 的无菌发酵液, 37 °C 恒温培养箱放置 12 h, 然后观察它的水解圈大小, 来判断它是否具有蛋白水解能力。

采用 Folin-Phenol 显色法来测定蛋白酶活力。将发酵液离心取上清, 以合适 pH 缓冲液按 1:2 进行稀释后, 取 1 mL 加入 1.5 cm \times 15 cm 的试管中, 40 °C 预热 5 min, 加入 1 mL pH 7.2 的 1% 酪蛋白溶液, 40 °C 水浴 10 min, 迅速加入 2 mL 0.4 mol/L 三氯乙酸来终止反应, 室温静置 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清 1 mL, 置于 1.5 cm \times 15 cm 试管中, 加入 5 mL 0.4 mol/L 碳酸钠和 1 mL 1 mol/L 福林酚, 混合均匀, 40 °C 保温 20 min, 测定 680 nm 吸光度。对照先加 2 mL 0.4 mol/L 三氯乙酸, 然后再加入 1 mL pH 7.2 的 1% 酪蛋白溶液, 其他条件相同。

1.6 产酶条件优化

1.6.1 粗酶液的制备

用 GYP 培养基活化菌株 TG116, 将种子液按 2% 接种量接种于蛋白酶产酶培养基中, 30 °C、170 r/min 培养 48 h 后, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液即为粗酶液。

1.6.2 最佳发酵温度筛选

将种子液按 2% 接种量接种到起始 pH 7.2 的产酶培养基上, 分别在 30、40、50、60 °C 下 170 r/min 培养。培养 48 h 后取样, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清测定蛋白酶活力。将菌液稀释 10 倍后于

600 nm 处测定菌体浓度。

1.6.3 最佳发酵 pH 筛选

将种子液按 2% 接种量接种到起始 pH 分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的产酶培养基中, 于 30 °C、170 r/min 培养 48 h 后, 10 000 r/min 离心 5 min, 测定上清中蛋白酶活力。将菌液稀释 10 倍后于 600 nm 处测定菌体浓度。

1.6.4 最佳发酵时间筛选

将种子液按 2% 接种量接种到起始 pH 7.2 的产酶培养基上, 置于 30 °C、170 r/min 振荡培养, 每隔 24 h 取菌液 10 000 r/min 离心 5 min, 测定蛋白酶活力。将菌液稀释 10 倍后于 600 nm 处测定菌体浓度。

1.6.5 装液量优化

在 250 mL 的三角瓶中分别加入 25、50、100、150 mL 产酶培养基, 起始 pH 7.2, 接种 2% 的种子液, 于 30 °C、170 r/min 培养 48 h, 取菌液 10 000 r/min 离心 5 min, 测定上清中蛋白酶活力。将菌液稀释 10 倍后于 600 nm 处测定菌体浓度。

1.7 响应曲面法优化发酵条件

结合单因素发酵试验, 应用 Box-Behnken 模型, 以温度(°C)、pH、时间(h)为考察因子, 以蛋白酶活力为响应值, 利用 Design-Expert V.8.0.5.0 软件设计 3 因素 3 水平的响应面法试验, 共有 17 组试验, 编码结果见表 1。

1.8 蛋白酶酶学性质研究

1.8.1 温度对酶活力的影响

将粗酶液用 pH 7.2 缓冲液稀释 3 倍, 于 30–70 °C 下, 以 5 °C 为梯度, 以 pH 7.2 的 1.0% 酪蛋白为底物, 按 Folin-Phenol 显色法分别测定蛋白酶活力。

表 1 Box-Behnken 试验设计因素和水平

Table 1 Factors and level of Box-Behnken experiment design

因素 Factor	编码水平 Encoding Level		
Temperature (°C)	35	40	45
Time (h)	24	48	72
pH	7.0	8.0	9.0

1.8.2 pH 对酶活力的影响

将粗酶液分别用 pH 5.5–10.5 缓冲液稀释, 以 0.5 为梯度, 相应 pH 的 1.0% 酪蛋白为底物, 按 Folin-Phenol 显色法于 40 °C 测定蛋白酶活力。

1.8.3 温度稳定性

将粗酶液在 40、50、60 °C 的恒温水浴中分别保温 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h, 处理结束后立即放入冰水中, 按 Folin-Phenol 显色法于 40 °C 测定剩余酶活力。

1.8.4 pH 稳定性

将粗酶液在 pH 3.0–11.0 的缓冲溶液中液稀释 3 倍, 于 25 °C 孵育 1 h 后按 Folin-Phenol 显色法于 40 °C 测定剩余酶活力。

1.8.5 变性剂对蛋白酶的影响

分别配制浓度为 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.0 mmol/L 的 EDTA、Tris、SDS 溶液, 将变性剂 SDS、Tris 以及金属螯合剂 EDTA 以 0.1:2 的比例与酶液混合, 于 40 °C 反应 10 min, 按 Folin-Phenol 显色法于 40 °C 测定蛋白酶活力。

1.8.6 金属离子对蛋白酶的影响

配制 0.001 mol/L 的氯盐金属离子, 将各种金属离子以 0.1:2 的比例与酶液混合, 于 40 °C 反应 10 min, 按 Folin-Phenol 显色法于 40 °C 测定蛋白酶活力。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶标准曲线与酶活力测定

2.1.1 蛋白酶标准曲线

由图 1 可见, 酪蛋白标准曲线 $Y=0.010\ 29X+0.016\ 29$, 线性相关系数 R^2 为 0.998 3, 线性良好, 可用于蛋白酶活力测定。

2.1.2 蛋白酶活力

由图 2 可知, 该菌株发酵液具有明显的蛋白水解能力。按 1.3 方法测定 TG116 的蛋白酶活性, 产酶量为 57.46 ± 1.67 U/mL。

2.2 菌株 TG116 的产酶条件优化

2.2.1 温度对 TG116 产酶的影响

由图 3 可知, 该蛋白酶活力随温度升高呈现出先上升后下降的趋势, 40 °C 时活性最高, 30–50 °C

之间都有较好的酶活性。由菌浓度可以看出, 在不同的温度下菌体繁殖速度不同, 这直接影响了蛋白酶活力的高低, 在 40 °C 时该菌具有最大菌浓度, 其蛋白酶活力也达到了最高。

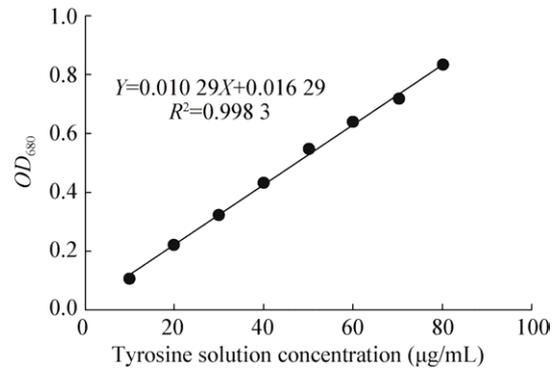


图 1 酪蛋白标准曲线

Figure 1 The standard curve of casein

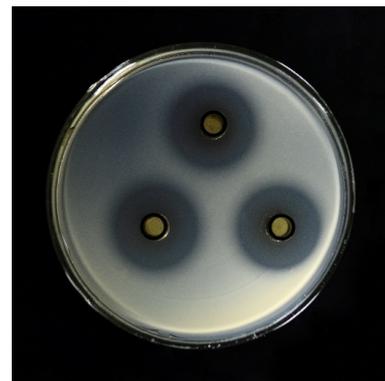


图 2 菌株发酵液蛋白酶活力检测

Figure 2 Detection of protease activity in fermentation broth

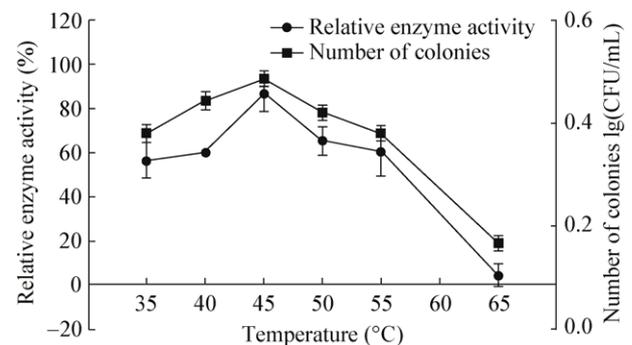


图 3 温度对蛋白酶活性的影响

Figure 3 Effect of temperature on protease activity

2.2.2 初始 pH 对 TG116 产酶的影响

由图 4 可知, 该蛋白酶活力随 pH 升高呈现出先上升后下降的趋势, pH 在 8.0 时达到最大值, 在碱性范围内都有比较好的活性。酶活性与菌体数量成正比关系, 在 pH 为 8.0 时, 菌落数也达到了最大, 随着 pH 的变大, 菌落数开始锐减。

2.2.3 发酵时间对 TG116 产酶的影响

由图 5 可知, 随着发酵时间的延长, 酶活随之增大, 在 48 h 可达到最大; 在 48 h 之后, 酶活开始下降; 96 h 后, 酶活开始稳定, 不再变化。菌体生长曲线可以看出, 在 48 h 左右达到了生长对数期, 此时拥有最大酶活力; 72 h 后开始到达稳定期与衰弱期, 酶活力也随之开始下降, 最后达到了稳定期, 可能是因为细菌生长达到稳定期密度开始变大, 培养基内营养物质逐渐消耗, 酶活达到了稳定。

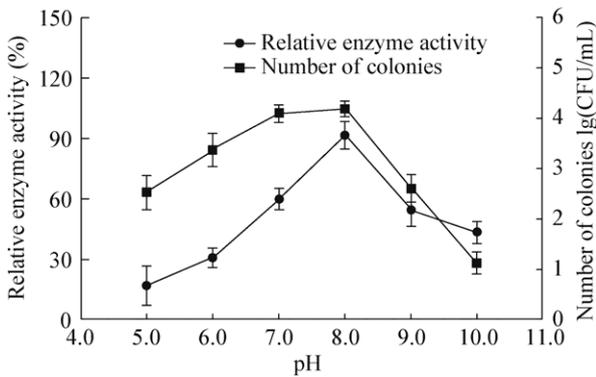


图 4 pH 值对蛋白酶活性的影响

Figure 4 Effect of pH on protease activity

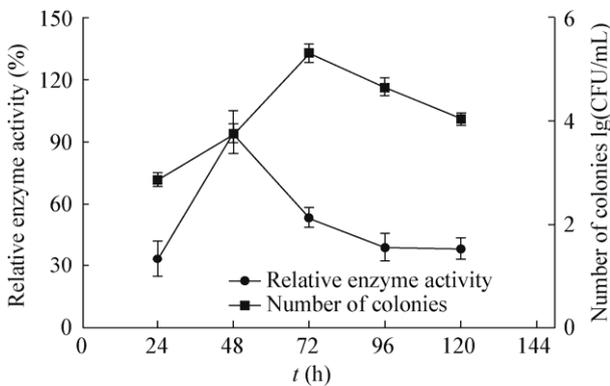


图 5 发酵时间对蛋白酶活性的影响

Figure 5 Effect of fermentation time on protease activity

2.2.4 装载体积对 TG116 产酶的影响

由图 6 可知, 在 250 mL 的锥形瓶中, 以 25 mL 的装液量其酶活性最高, 100 mL 以及 150 mL 装液体积下酶活力明显降低。在不同的装液量中, 由于溶氧量的不同, 导致了菌体浓度的不同, 可见随着供氧量的增加, 菌体浓度变大, 酶活性也增强。

2.3 响应面法优化 TG116 产酶条件

2.3.1 Design-Expert V8.0.5.0 设计及实验结果

运用 Design-Expert V8.0.5.0 分析软件, 在单因素试验基础上, 利用响应面确定 TG116 的最佳产酶条件, 试验结果如表 2 所示。

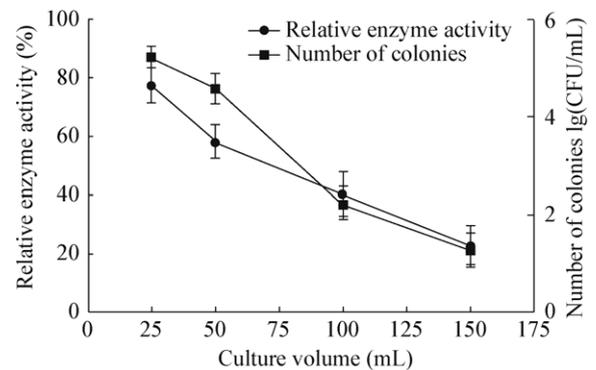


图 6 装液体积对蛋白酶活性的影响

Figure 6 Effects of culture volume on protease activity

表 2 响应面实验设计结果

Table 2 The experiment designing result of response surface

序号 No.	温度 Temperature (°C) (A)	pH (B)	时间 Time (h) (C)	蛋白酶酶活 Protease activity (U/mL)
1	45	7.0	48	148.08
2	40	7.0	72	120.84
3	40	7.0	24	44.91
4	35	7.0	48	64.63
5	35	8.0	72	96.36
6	40	8.0	48	252.22
7	40	8.0	48	264.29
8	40	8.0	48	259.55
9	35	8.0	24	24.63
10	40	8.0	48	254.90
11	40	8.0	48	260.60
12	45	8.0	24	67.97
13	45	8.0	72	144.93
14	40	9.0	24	59.65
15	45	9.0	48	122.94
16	40	9.0	72	135.37
17	35	9.0	48	87.57

2.3.2 回归模型的建立和分析

对表 2 中的试验数据进行回归分析, 得二次回归模型编码方程为:

$$\text{蛋白酶活力(U/mL)}=258.31+26.34\times A+3.38\times B+37.54\times C-12.02\times AB+1.31\times AC-0.053\times BC-79.61\times A^2-72.89\times B^2-95.23\times C^2.$$

通过回归模型分析响应面的参数。由表 3 可以看出: 模型极显著($P<0.0001$), 失拟项 $P=0.1485$, 说明模型失拟不显著, 回归显著, 不需要引入更高次数的项。其中 A、C、 A^2 、 B^2 、 C^2 对 TG116 产酶影响较大, 达到极显著($P<0.0001$); 其次, AB 达到显著($P<0.05$)。

从表 4 可以看出, 模型的 $R^2=0.9973$, 校正系数 0.9939, 预测系数 0.9688, 预测值与校正值较为接近, 说明该模型拟合度较好, 可以用来分析和预测 TG116 的最佳产酶条件。

2.3.3 发酵条件的响应面分析及优化

根据 TG116 最佳产酶条件的回归方程计算

所得的结果, 得到不同因素之间的相应曲面图。

由图 7 温度和 pH 对 TG116 蛋白酶活力交互影响的响应面图 7A 可以看出, 随着发酵温度逐渐提高, 酶活力先增大后减小, 在温度为 40 °C 时达到最大值, 随着 pH 的增大, 酶活力出现先增大后减小的趋势, 在 pH 为 8.0 时达到最大值; 由温度和时间对 TG116 蛋白酶活力交互影响的响应面图 7B 可以看出, 随着温度的提高, 酶活力先增大后减小, 随着发酵时间的延长酶活力先增大后减小, 在 48 h 时达到最大值; 由 pH 和时间对 TG116 蛋白酶活力交互影响的响应面图 7C 可以看出, 随着 pH 的增大和发酵时间的延长, 酶活力均呈现出先增大后减小的趋势。

2.3.4 优化发酵参数及验证试验

在 Design expert 10 软件的预测下, 所得理论最佳发酵条件为: 温度 40.83 °C, pH 8.01, 发酵时间 53.74 h, 此时模型预测的最大酶活力为 264.24 U/mL。

表 3 模型方差分析

Table 3 Analysis of variance for the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值
Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value
Model	114 800.00	9	12 758.00	291.20	<0.0001 significant
A	5 550.89	1	5 550.89	126.70	<0.0001
B	91.60	1	91.60	2.09	0.1914
C	11 275.51	1	11 275.51	257.37	<0.0001
AB	577.92	1	577.92	13.19	0.0084
AC	6.84	1	6.84	0.16	0.7046
BC	0.011	1	0.011	25 160.00	0.9878
A^2	26 687.55	1	26 687.55	609.15	<0.0001
B^2	22 372.41	1	22 372.41	510.65	<0.0001
C^2	38 180.93	1	38 180.93	871.49	<0.0001
Residual	306.68	7	43.81		
Lack of fit	215.41	3	71.80	3.15	0.1485 not significant
Pure error	91.27	4	22.82		
Cor total	1.151E+005	16			

表 4 模型 R^2 综合分析

Table 4 Analysis of model R^2

标准偏差	平均值	变异系数	预测平方和	系数	校正 R^2	预测 R^2	信噪比
Std. Dev	Mean	C.V. %	PRESS	R^2	Adj R^2	Pred R^2	Adeq precision
6.62	141.73	4.67	3 589.15	0.9973	0.9939	0.9688	46.767

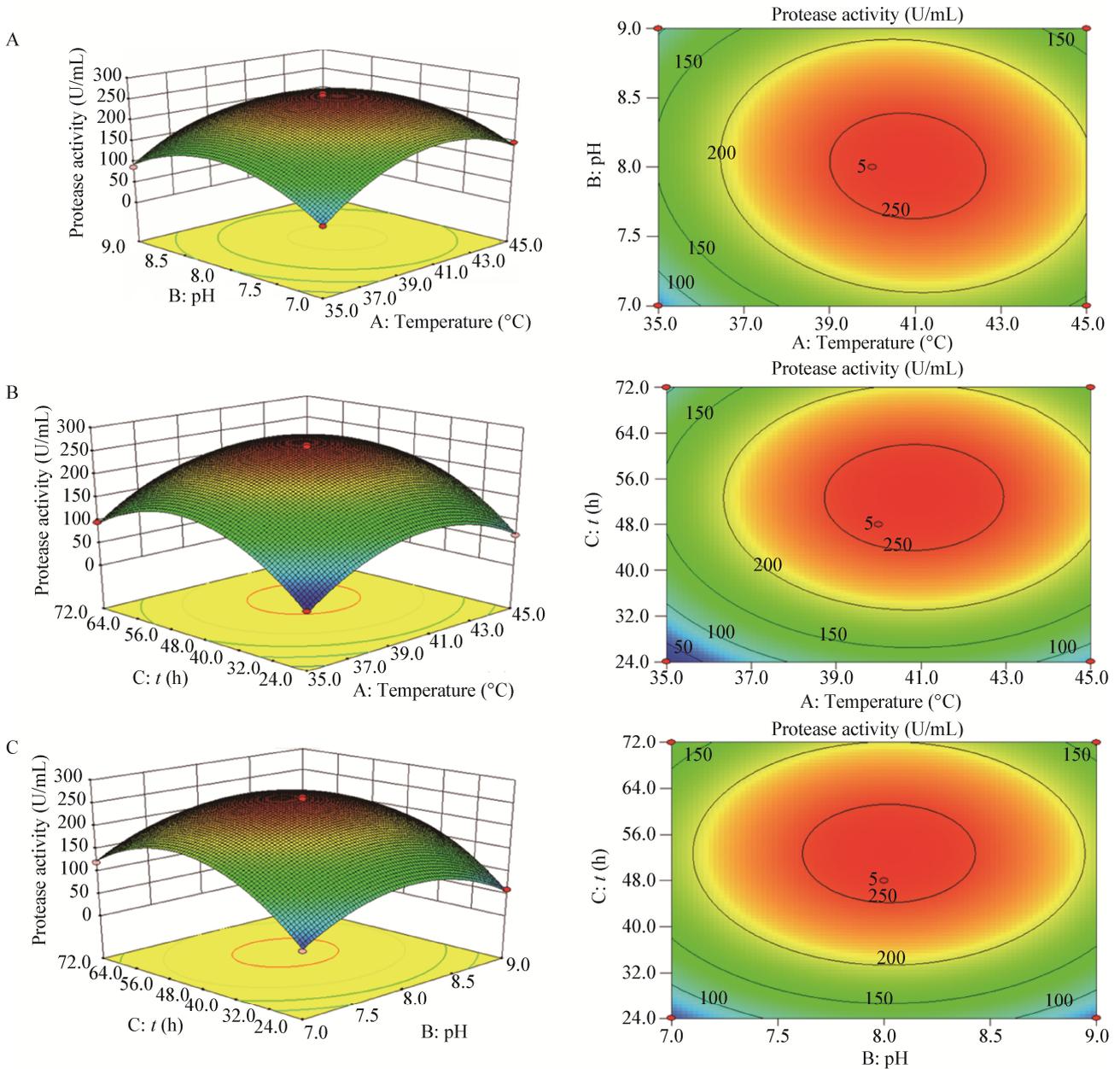


图 7 因素交互作用对蛋白酶活力影响的响应曲线和等高线

Figure 7 Response surface plot and contour plot showing effects of protease activity

注: A: 温度与 pH 对蛋白酶活力交互影响的三维响应曲面图与等高线图; B: 温度与时间对蛋白酶活力交互影响的三维响应曲面图与等高线图; C: pH 与时间对蛋白酶活力交互影响的三维响应曲面图与等高线图。

Note: A: The three-dimensional response surface and contour plots of the interaction of temperature and pH on protease activity; B: The three-dimensional response surface map and contour map of the interaction between temperature and time on protease activity; C: The three-dimensional response surface and contour plots of the interaction of pH and time on protease activity.

为了检验模型预测的准确性, 综合考虑实际操作的可能性, 最终将最佳发酵模型修改为: 温度 40.8 °C、pH 8.0、发酵时间 55 h, 进行产蛋白酶的发酵试验, 得到的实际酶活为 254.07 U/mL。实际值比预测值误差为±3.85%, 可见该模型较好地预测

了试验结果。

2.4 酶学性质研究

2.4.1 蛋白酶最佳作用温度及 pH

由图 8A 可知, 该蛋白酶在 30–60 °C 均有蛋白降解活性, 最适作用温度为 50 °C; 图 8A 可知, 在

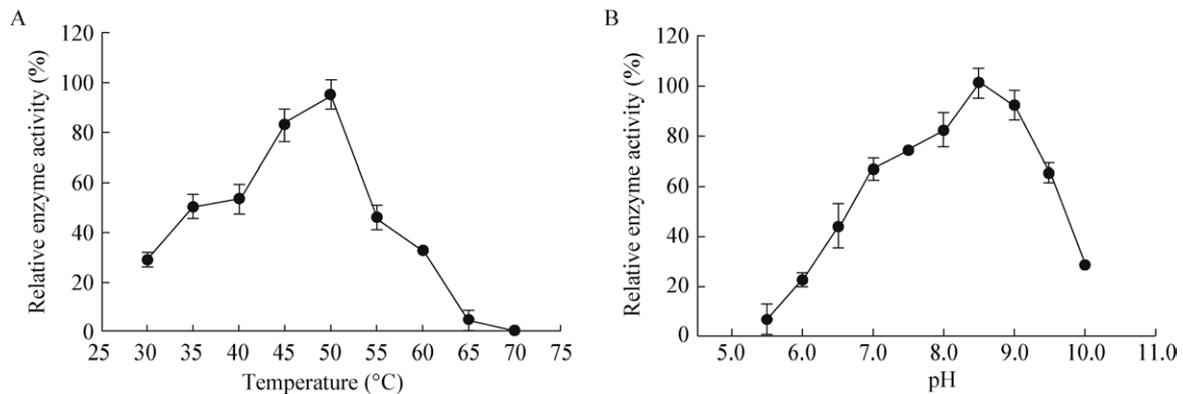


图 8 温度(A)和 pH (B)对蛋白酶活力的影响

Figure 8 Effects of temperatures (A) and pH (B) values on protease activity

pH 7.0–9.0 时具有较高的蛋白酶活力, 最适 pH 8.5, 为碱性蛋白酶。

2.4.2 蛋白酶的温度及 pH 稳定性

由图 9A 可知, 该蛋白酶在 40 °C 时具有良好的稳定性, 水浴 3 h 后还可保留 80% 以上的活性, 50 °C 水浴 2 h 后保留 60% 以上的活性, 60 °C 时该蛋白酶失活; 图 9B 可知, 在 pH>7.0 时, 该蛋白酶具有较好的稳定性, 活性基本保持不变, 但在偏酸的环境下该蛋白酶迅速失活, 说明该蛋白酶为一种碱性蛋白酶。

2.4.3 金属离子及变性剂对酶活力的影响

一些金属离子对蛋白酶活力有激活作用, 但部分也会对蛋白酶活力产生抑制作用。由图 10A 可知, 金属离子 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 对蛋白酶活力均具有

一定的激活作用, 其它金属离子 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Co^{2+} 、 K^+ 等具有一定的抑制作用。图 10B 可知, 变性剂具有强烈的蛋白酶活力抑制作用, 且浓度越大抑制性越强, 其中 EDTA 的抑制性最强。

3 讨论与结论

本研究对生防菌株 TG116 产蛋白酶的性质进行了探究, 结果表明, 该地衣芽孢杆菌最适产酶条件温度为: 40.83 °C, pH 8.01, 发酵时间 53.74 h, 增加通气量可以显著提高酶活力。酶学性质结果表明, 最适反应条件为: 温度 50 °C 和 pH 8.5, 在 50 °C 水浴 2 h 后活性仍大于 60%, 具有良好的温度稳定性; 在 pH 5.0–11.0 之间都具有一定的酶活力, 特别是在碱性环境条件下, 具有良好的 pH 耐受性;

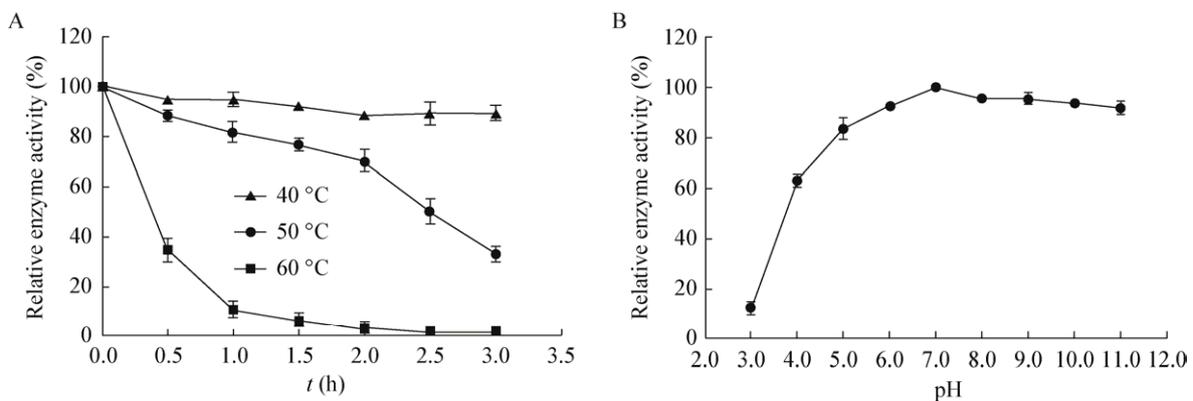


图 9 温度和 pH 对蛋白酶稳定性的影响

Figure 9 Effects of temperatures and pH values on protease stability

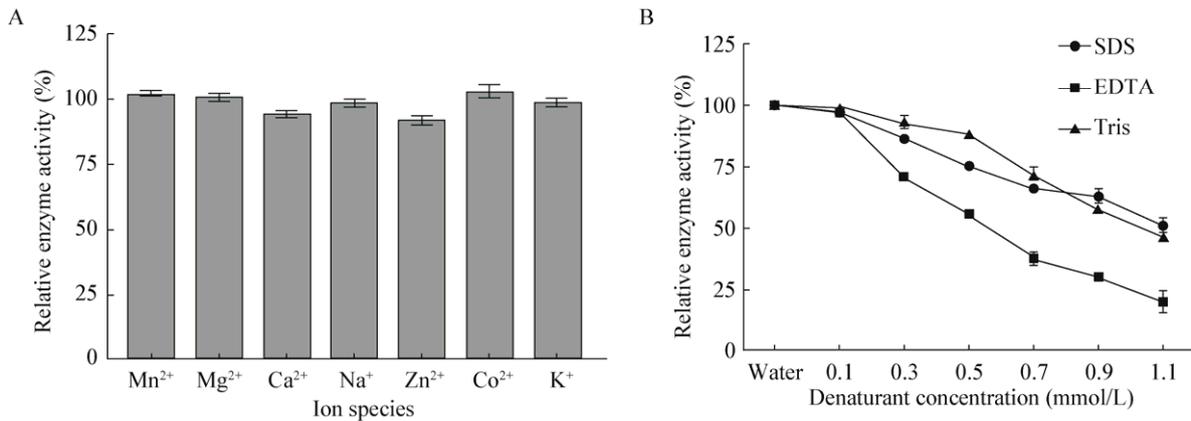


图 10 金属离子(A)与变性剂(B)对蛋白酶稳定性的影响
Figure 10 Effects of metal ions (A) and denaturant (B) on protease activity

金属离子 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 对酶活力具有刺激作用,可以增强蛋白酶活性,而金属离子 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Co^{2+} 、 K^+ 具有一定的抑制作用,变性剂具有强烈的抑制作用。

有文献研究表明,从 *B. proteolyticus* CFR3001^[18]中分离鉴定出一种碱性丝氨酸蛋白酶,它可以通过裂解病原菌的细胞达到抑菌的作用,细胞产蛋白酶最佳条件为: 37 °C、pH 9.0、96 h; 从 *B. cereus* 和 *B. subtilis*^[19]中均分离纯化得到了部分蛋白酶,并对其产酶条件与酶学性质进行了研究,结果表明该蛋白酶在 60 °C、pH 9.1 时具有最高的活性, Mn^{2+} 可以明显增强蛋白酶活性, EDTA 具有强烈的抑制作用,推测该蛋白酶可能为金属蛋白酶; 从嗜热 *Bacillus* 菌株 HS08^[20]中分离纯化得到了带有丝氨酸的蛋白酶,其产酶条件与酶学性质已研究明确; 从 *B. subtilis* PE-11^[21]中分离和纯化得到了热稳定的丝氨酸碱性蛋白酶,其酶学性质已得到表征。与已报道的一些碱性蛋白酶^[20-21]相比,该酶最适作用 pH 较低,因此不易在存储过程中发生变性,不易在使用过程中产生药害,也不会对包装材料产生腐蚀现象,而更适合于农药制剂的生产。

蛋白酶是工业酶中用得最多的一类酶,约占酶总量的 65%^[22]。蛋白酶具有广泛的应用,特别是在食品、洗涤剂、织物、皮革、制药和化学工业中。例如,蛋白酶被广泛应用于增加肉的嫩度。商业蛋

白酶主要由各种细菌产生,据报道,在洗涤剂工业中使用的总微生物酶约 35%是来自细菌的蛋白酶^[23]。蛋白酶通常根据其最适反应 pH 分为酸性蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶。研究者对酸性或碱性蛋白酶的性质的功能的研究进行了广泛的研究,特别是从芽孢杆菌产生碱性蛋白酶用于洗涤剂工业^[24]。通常,用于洗涤剂应用的碱性蛋白酶应在高于 40–50 °C 的温度和 9.0–12.0 的 pH 范围内有活性^[25]。

本研究表明,从地衣芽孢杆菌中分离并部分纯化得到了一种碱性蛋白酶,它具有良好的温度、pH 稳定性。本文研究结果表明 TG116 具有良好适应性,能有效裂解病原菌细胞壁,从而保证其生防作用。

REFERENCES

- [1] Chen ML, Yu H, Gao H, et al. Talking about the research progress of *Bacillus subtilis*[J]. Modern Agriculture, 2014(2): 1-2 (in Chinese)
陈明丽, 于涵, 高虹, 等. 浅谈枯草芽孢杆菌的研究进展[J]. 现代化农业, 2014(2): 1-2
- [2] Qiao JQ, Liu YZ, Zhang RS, et al. Optimization of fermentation process of *Bacillus subtilis* T-500 for production of lipopeptide antibiotics in flask[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2018, 41(3): 447-455 (in Chinese)
乔俊卿, 刘邮洲, 张荣胜, 等. 枯草芽孢杆菌 T-500 产脂肽类抗生素的摇瓶发酵工艺优化[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(3): 447-455
- [3] Asaka O, Shoda M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(11): 4081-4085
- [4] Chen ZY. Study on the mechanism of antagonistic bacteria B-916

- against rice sheath blight[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 1998 (in Chinese)
- 陈志谊. 拮抗细菌 B-916 防治水稻纹枯病作用机制的研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 1998
- [5] Xin YC. Control effects of *Bacillus subtilis* BL03 strain on *Alternaria alternata* and *Colltotrichum gossypii* in field[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2000, 16(1): 47 (in Chinese)
- 辛玉成. 枯草芽孢杆菌 BL03 对苹果霉心病和棉苗病害田间防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2000, 16(1): 47
- [6] Elad Y, Chet I. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium damping-off* by bacteria[J]. Phytopathology, 1987, 77(2): 190-195
- [7] Ran JJ, Xu JH, Hu XD, et al. Identification of a *Bacillus* strain producing lipopeptide and cloning of genes related to lipopeptide[J]. Food Science, 2016, 37(17): 127-132 (in Chinese)
- 冉军舰, 徐剑宏, 胡晓丹, 等. 1 株产脂肽类抗生素芽孢杆菌的鉴定及脂肽类抗生素相关基因克隆[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 127-132
- [8] Liu PL, Cheng DY, Miao LH. Isolation of a chitinase-producing strain *Brevibacillus laterosporus* and its enzymatic properties[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(6): 174-180 (in Chinese)
- 刘蒲临, 程德勇, 缪礼鸿. 产几丁质酶侧孢短芽孢杆菌的筛选及其酶学性质研究[J]. 生物技术通报, 2016, 32(6): 174-180
- [9] Liu Y, Li Y, Yin JY, et al. Study on isolation, identification and enzyme-reaction conditions of *Bacillus amyloliquefaciens* producing cellulase[J]. Acta Ecologiae Animalis Domastici, 2017, 38(4): 58-62 (in Chinese)
- 刘宇, 李阳, 尹碧伊, 等. 一株产纤维素酶的解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其酶促反应适宜条件初步研究[J]. 家畜生态学报, 2017, 38(4): 58-62
- [10] Li HK, Li YR, Li Y, et al. Optimization of fermentation conditions for the production of neutral protease by *Bacillus subtilis*[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(5): 102-107 (in Chinese)
- 李洪康, 李由然, 李赢, 等. 枯草芽孢杆菌产中性蛋白酶发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(5): 102-107
- [11] Yu J, Zhang RY, Tan ZQ, et al. Studies on antifungal activity and purification of antifungal substance from *Bacillus subtilis* B25 strain[J]. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(3): 629-634 (in Chinese)
- 于杰, 张荣意, 谭志琼, 等. 枯草芽孢杆菌 B25 抗真菌作用及抗菌蛋白的分离纯化[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(3): 629-634
- [12] Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall[J]. Bioessays, 2006, 28(8): 799-808
- [13] Yang HT, Guo Y, Li JS, et al. Glucanses produced by *Trichoderma* spp. and control of plant pathogens[J]. Shandong Science, 2003, 16(4): 1-7 (in Chinese)
- 杨合同, 郭勇, 李纪顺, 等. 木霉菌产生的葡聚糖酶和植物病害防治[J]. 山东科学, 2003, 16(4): 1-7
- [14] Ling LJ, Lei L, Feng L, et al. Isolation and identification of endophytic bacterium TG116 from *Typhonium giganteum* and its antimicrobial characteristics[J]. Journal of Northwest Normal University (Natural Science), 2014, 50(5): 91-97 (in Chinese)
- 令利军, 雷蕾, 冯蕾, 等. 独角莲内生细菌 TG116 的分离鉴定及抑菌特性研究[J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2014, 50(5): 91-97
- [15] Li HS, Xie WT, Xu CH. Identification of a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and study on its enzymatic properties[A]//Symposium on Ecological Environment and Sustainable Development of Animal Husbandry and the 2012 Annual Meeting of the Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine and the National Symposium on Young Scientists and Technicians of Animal Husbandry and Veterinary Medicine[C]. Beijing: Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine, 2012 (in Chinese)
- 李红胜, 谢为天, 徐春厚. 一株解淀粉芽孢杆菌的鉴定及其蛋白酶学性质研究[A]//生态环境与畜牧业可持续发展学术研讨会暨中国畜牧兽医学学会 2012 年学术年会和第七届全国畜牧兽医青年科技工作者学术研讨会会议论文集——T06 饲料卫生与安全专题[C]. 北京: 中国畜牧兽医学学会, 2012
- [16] Peng SP, Lin XG, Wang YM. Fermentation conditions and some properties of a thermostable protease from moderate thermophilic strain BY25[J]. Soils, 2010, 42(3): 410-414 (in Chinese)
- 彭素萍, 林先贵, 王一明. 一株产高温蛋白酶耐热菌 BY25 的产酶条件与酶学性质研究[J]. 土壤, 2010, 42(3): 410-414
- [17] Li JJ, Liu HJ, Ye JL, et al. Research on the properties of protease from *Bacillus* strain BLYS-1[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2011, 32(2): 63-67 (in Chinese)
- 李金鞠, 刘海军, 叶晶龙, 等. 一株芽孢杆菌 BLYS-1 蛋白酶性质的研究[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2011, 32(2): 63-67
- [18] Bhaskar N, Sudeepa ES, Rashmi HN, et al. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(14): 2758-2764
- [19] Gerze A, Omay D, Guvenilir Y. Partial purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis megatherium*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2005, 121(1/3): 335-345
- [20] Huang GR, Ying TJ, Huo P, et al. Purification and characterization of a protease from *Thermophilic bacillus* strain HS08[J]. African Journal of Biotechnology, 2006, 5(24): 2433-2438
- [21] Adinarayana K, Ellaiah P, Prasad DS. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11[J]. AAPS PharmSciTech, 2003, 4(4): 440-448
- [22] Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(3): 597-635
- [23] Ferrero MA, Castro GR, Abate CM, et al. Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, 45(3): 327-332
- [24] Fu ZB, Hamid SBA, Razak CNA, et al. Secretory expression in *Escherichia coli* and single-step purification of a heat-stable alkaline protease[J]. Protein Expression and Purification, 2003, 28(1): 63-68
- [25] Haddar A, Agrebi R, Bougatef A, et al. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(13): 3366-3373