

# 一株地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究 II.

方海红<sup>1,3</sup> 黄红英<sup>2</sup> 张林普<sup>1</sup> 夏颖<sup>1</sup> 罗震平<sup>1</sup>

(安徽师范大学生命科学学院 芜湖 241000)<sup>1</sup> (江苏省农业科学院 南京 210014)<sup>2</sup>

(安徽医科大学微生物教研室 合肥 230032)<sup>3</sup>

**摘要:** 曾分离到一株产碱性蛋白酶的地衣芽孢杆菌 011, 命名为地衣芽孢杆菌殒山亚种。酶的最适作用条件: pH9.0, 60℃。对该菌株进行连续 4 次不同的物理、化学方法的诱变处理。诱变剂为紫外线、亚硝酸、和低能 N<sup>+</sup> 离子, 其处理方式包括单独或复合处理两种。最后获得一株高产碱性蛋白酶的变异株 (C<sub>3-03</sub>) 菌株产酶活力从 725u/mL 提高到 12425u/mL。该突变株的最适产酶条件为起始 pH8.0~9.0, 培养温度 32℃~37℃, 振荡培养时间 44~48h。

**关键词:** 地衣芽孢杆菌殒山亚种, 碱性蛋白酶, 诱变育种

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 06-0052-04

## STUDIES ON THE ALKALINE PROTEASE SECRETING FROM A BACILLUS LICHENIFORMIS II.

FANG Hai-Hong<sup>1</sup> HUANG Hong-Ying<sup>2</sup> ZHANG Lin-Pu<sup>1</sup> XIA Ying<sup>1</sup> LUO Zheng-Ping<sup>1</sup>

(Life Science College, Anhui Normal University WuHu 241000)<sup>1</sup>

(Agriculture Science Institute, JiangSu Province, NanJing 210014)<sup>2</sup>

**Abstract:** *Bacillus licheniformis* subsp. *dangshanensis* secreting the alkaline protease was ever isolated in our laboratory. The optimum conditions for enzyme are pH9.0 and 60℃. We had induced the strain by four different successive physical and chemical methods. The inductors, including ultraviolet ray, nitrous acid and low energy N<sup>+</sup> ions, were utilized with independent or compound treatment. Finally, a mutant strain C<sub>3-03</sub> with high yield of alkaline protease was obtained from *B. licheniformis* subsp. *dangshanensis*. The enzyme activity was improved from 725u/mL to 12425u/mL. The mutant's optimum conditions for enzyme production are initial pH8.0~9.0, shaking culture for 44~48h at 32℃~37℃.

**Key words:** *Bacillus licheniformis* subsp. *dangshaensis*, alkaline protease, induction breeding

通过诱变育种途径提高微生物分泌的胞外碱性蛋白酶产量是一种获取工业生产高产菌株的常用方法。本文结合采用近几年来兴起的低能 N<sup>+</sup> 离子注入技术对 011 菌株进行了高产诱变,取得了良好的效果。同时尝试采用该酶消化动物骨骼发现能产生大量的氨基酸,这一结果为饲料工业注入了新的活力,为碱性蛋白酶提供了更加广阔的使用途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

地衣芽孢杆菌殒山亚种 (*Bacillus licheniformis* subsp. *dangshanensis*), 系本实验室保留菌种 (编号 011), 由黄红英等鉴定<sup>[1]</sup>。

### 1.2 培养基

1.2.1 斜面种子培养基: 牛肉膏 3g, 鱼精蛋白胨 10g, NaCl 10g, 琼脂 20g, pH8.0, 定容 1L。

**1.2.2 分离培养基:** 上述 1.2.1 中加入 5g 酪素 (先用 0.2N 的 NaOH 溶解充分)。

**1.2.3 双基质固体平板培养基 (g/L):** 参考文献 [2] 并作部分改进, 用 pH9.0 的硼砂-硼酸缓冲液配制, 含 10g 酪素 (酪素先用上述缓冲液充分溶解), 10g 明胶, 15g 琼脂。每皿 ( $\Phi 9\text{cm}$ ) 20mL 铺制平板。

**1.2.4 发酵培养基:** 参考文献 [3], 并补充酪素 0.5% (先用 0.2N 的 NaOH 溶解充分), 调 pH9.0。10mL 试管装 0.5mL。37°C 150r/min 摇瓶发酵 44h。

**1.2.5 摇瓶条件和发酵培养基 (g/L):** 见文献 [3]。

### 1.3 初筛菌种蛋白酶活力的测定

见文献 [3]。

### 1.4 蛋白酶活力测定

见文献 [4]。

### 1.5 诱变育种

**1.5.1 第一次诱变:** 参照文献 [5、6], 以 011 为出发菌株, 30W、垂直距离 10cm 紫外线 (254nm) 照射 10sec、20sec、30sec、60sec。粗筛后保留水解圈直径大于 15mm (见图 1) 的菌株 (5 株) 作为第二次诱变的出发菌株。

**1.5.2 第二次诱变:** 参照文献 [5], 0.025mol/LHNO<sub>2</sub> 37°C 温浴 30min, 按 10 倍梯度稀释后紫外线继续分别处理 30sec、60sec。粗筛保留高产菌株 (5 株)。

**1.5.3 第三次诱变:** 同 1.6.1, 紫外线 (254nm) 分别照射 30sec、60sec、90sec。

**1.5.4 第四次诱变:** 按文献 [7、8] 进行, 出发菌株为前 3 次诱变菌株各一株, N<sup>+</sup> 剂量为  $50 \times 2.6 \times 10^{13}$  ions/cm<sup>2</sup>、 $150 \times 2.6 \times 10^{13}$  ions/cm<sup>2</sup>、 $250 \times 2.6 \times 10^{13}$  ions/cm<sup>2</sup>, 粗筛保留高产菌种。

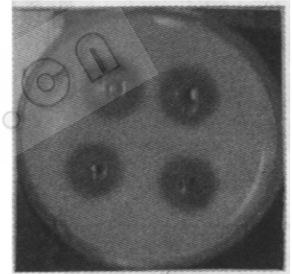


图 1 碱性蛋白酶水解圈直径

### 1.6 粗酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳

**1.6.1 粗酶制备:** 将发酵 44h 的粗酶液低速离心, 取上清用蒸馏水在 4°C 冰箱透析 24h 除去大量盐份, 用聚乙二醇吸水浓缩酶液。

**1.6.2 凝胶电泳:** 采用中性 SDS 连续系统。按文献 [9] 进行, 胶浓度为 7.5%。

### 1.7 粗酶液消化食用后动物骨骼的试验

**1.7.1 消化底物制备:** 收集食用后动物骨骼 (猪、鸡、鱼), 加清水煮沸 3h 以上, 剔除表面的结缔组织及肌肉组织。烘干至恒重, 磨成粉末, 按蒸馏水与骨粉质量比为 3: 2 的比例配制被测液, 常规灭菌 20min 备用。将 44h 发酵液 (即粗酶液) 按 1: 4 (v/w) 的接种量与被测液混匀, 50°C 消化 9d 和 14d 后, 检测消化情况。设未接种处理作对照。

**1.7.2 消化产物检测:** 按常规氨基酸纸上层析操作进行, 标准氨基酸和被测样品各点样 5 $\mu$ L。其中标准氨基酸为 Glu1000 $\mu$ g/mL, Phe1000 $\mu$ g/mL, Gly1000 $\mu$ g/mL, Pro1000 $\mu$ g/mL, Tyr150 $\mu$ g/mL, 采用酸性系统, 定性检测消化产物的氨基酸种类; 同时取 14d 发酵产物用蒸馏水充分洗涤过滤, 过滤后残渣烘箱烘干至恒重, 与消化前干重相比较, 定量检测粗酶对食用后动物骨骼的消化作用。

## 2 结果与讨论

### 2.1 碱性蛋白酶高产菌株的诱变育种

对一株野生型地衣芽孢杆菌碓山亚种进行了连续不同方式的 4 次诱变, 筛选出一

株高产、那淑敏<sup>[3]</sup>等人用传统诱变育种方法提高的酶活力都高。冰箱保存3个月，活力几乎没有降低。诱变过程中不同出发菌株不同处理方式均挑取50株作为粗筛菌种。取水解圈直径15~22mm的菌株作为保留菌株。这些菌株的共同特征为：菌落圆形，灰白色，干燥，易挑取。发酵液粘度低，对后处理有利(图2)

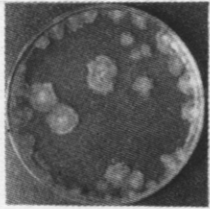


图2 高产菌株的菌落形态

前3次诱变结束后保留26株，摇瓶发酵44h，离心取上清即得粗酶液，稀释200倍。按文献[4]测定其蛋白酶活力，结果发现：紫外诱变30s(致死率达90%以上)以及HNO<sub>2</sub>诱变(致死率达80%以上)，这两种方式其高产突变诱变效果较好，复合诱变后有两株酶活力达10000u/mL以上，离子束作为诱变源集能量沉积、质量沉积、动量交换、电荷交换等多种因子于一体，相当于复合诱变剂。复合诱变效率比单一诱变因素高，这一点已在辐射生物学中得到了充分的证明<sup>[8]</sup>。第4次诱变取经30s紫外线诱变株分别进行3个不同剂量的N<sup>+</sup>离子注入，结果表明：在 $6.63 \times 10^{15} \sim 6.76 \times 10^{15}$  ions/cm<sup>2</sup>高剂量范围内N<sup>+</sup>注入对诱导碱性蛋白酶活性的提高效果较好，最高达12425.9u/mL。这与文献[7]报道的剂量范围有差异，认为与该菌为革兰氏阳性芽孢杆菌有关，一方面革兰氏阳性菌的细胞壁厚能更耐受外界环境的压力，另一方面，芽孢有极强的抗辐射能力。

表1 紫外线、亚硝酸、N<sup>+</sup>离子注入的诱变结果

菌号	处理方法	活力(u/mL)	提高倍数
O11	野生菌	725.00	
C <sub>51</sub>	紫外线	5397.30	7.44
E <sub>W-132</sub>	亚硝酸+紫外线	7487.80	10.33
D <sub>II-155</sub>	紫外线	10292.40	14.16
C <sub>3-03</sub>	N <sup>+</sup> 离子注入	12425.90	17.14

## 2.2 粗酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳

SDS是一种阴离子去污剂，足够量的SDS在还原剂巯基乙醇存在下，能破坏蛋白质以非共价键连接起来的亚稳定状态，从而将其解离成单个的亚基构成SDS-蛋白质复合物。这种复合物是椭圆形或杆状的，短轴约为18埃，与蛋白质的种类无关；而其长轴则与蛋白质的分子量成正比。经验表明：在一定的凝胶浓度下，对一定分子量范围的蛋白质来说其泳动率与分子量的对数呈直线关系。因此先由一些已知分子量的蛋白质作出标准曲线，通过对比便可测知未知蛋白质样品的分子量，还可判断出是否存在亚基<sup>[9]</sup>。地衣及芽孢杆菌分泌的碱性蛋白酶属Carlsberg蛋白酶，是由274个氨基酸构成的一条多肽链结构。显然，对特定种类的碱性蛋白酶进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，应该只出现一条电泳区带。本实验对野生原始菌株和诱变高产菌株同时进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，结果仅显示出—条电泳区带(图3)，说明该菌在本实验所给定的发酵条件下分泌的胞外碱性蛋白酶种类较单



图3 聚丙烯酰胺电泳示意图

- A H人血清白蛋白电泳带，  
B 原始菌株的蛋白酶电泳带，  
C-G 高产突变株的蛋白酶电泳带

一,有利于酶的分离、提纯及工业应用。

### 2.3 粗酶液消化食用后的动物骨骼

动物性食品中的骨骼常常被人们当作生活垃圾废弃,不仅容易造成环境污染,而且也是资源极大的浪费,本文尝试用碱性蛋白酶发酵液对动物骨骼进行消化处理,获得了较为理想的结果。经酶发酵液处理的骨粉明显变得稀软,取消化处理9d和14d后的产物进行氨基酸纸上层析发现:消化产物不仅含大量氨基酸(与对照相比),而且种类极其丰富(图4、5)。经过消化,骨粉中的水溶性物质明显增加,骨粉的消化率达12%~14%(表2)。经酶处理后动物骨粉氨基酸含量丰富,可以作为工业生产氨基酸的原料,由于还含有多种矿质元素,而且养分更易被动物吸收,又可作为畜牧业一种改良的饲料添加剂。

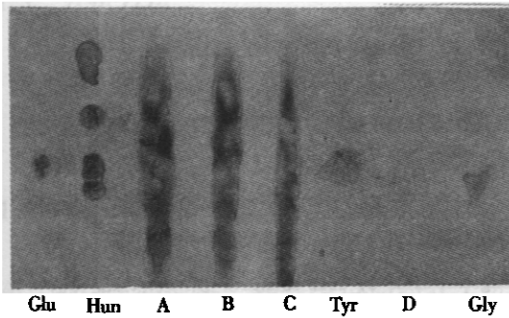


图4 发酵液消化动物骨骼9d后的氨基酸纸上层析

A 猪骨粉, B 鸡骨粉, C 鱼骨粉, D 对照, Gly 甘氨酸, Glu 谷氨酸, Hun 苯丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸、谷氨酸的混合物

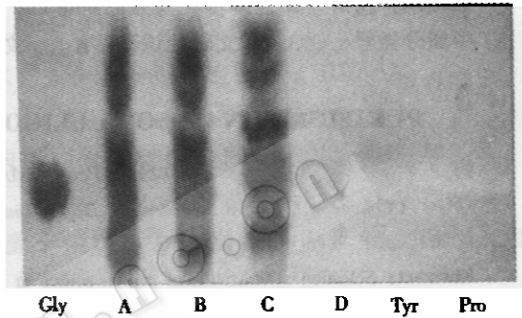


图5 发酵液消化动物骨骼14d后的氨基酸纸上层析

A 猪骨粉, B 鸡骨粉, C 鱼骨粉, D 对照, Gly 甘氨酸, Pro 脯氨酸, Tyr 酪氨酸

表2 骨粉消化前后质量的比较

	猪骨粉	鸡骨粉	鱼骨粉
消化前质量(g)	40.0	41.2	15.6
消化14d后质量(g)	34.2	36.1	13.6
减少量(g)	5.8	5.1	2.0
消化率	14.5%	12.4%	12.8%

致谢 本文在实验和写作过程中得到了吕正兵和张海军的大力帮助,特此致谢。

### 参考文献

- [1] 黄红英, 方海红, 刘爱民, 等. 微生物学通报, 2001, 28 (5): 20~24.
- [2] Thomas J M. Appl Environ Microbiol, 1983, 45: 200~204.
- [3] 那淑敏, 余茂效. 微生物学报, 1988, 28 (3): 249~256.
- [4] Ferrero M A, Castro G R. Microbiol Biotechnol, 1996, 45: 327~332.
- [5] 章名春编著. 工业微生物诱变育种. 科学出版社, 1984.
- [6] 邱秀宝, 袁影, 戴宏, 等. 微生物学报, 1990, 30 (2): 129~133.
- [7] 宋道军, 李红, 王纪, 等. 微生物学报, 1999, 39 (4): 362~366.
- [8] 余增亮著. 离子束生物技术导论. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996.
- [9] 张树政, 孟广震, 何忠效主编. 酶学研究技术(上册). 北京: 科学出版社, 1987.