

我国碱性蛋白酶的应用及研究进展

薛林贵

(庆阳师范高等专科学校生物系 甘肃西峰 745000)

碱性蛋白酶(Alkaline Protease)指在 pH 值碱性范围内水解蛋白质肽键的酶类,最早发现在猪胰脏中。1913 年 Rohm 首先将胰蛋白酶作为洗涤剂使用^[1]。1945 年瑞士的 Dr. Jaag 等发现了微生物碱性蛋白酶^[2],使蛋白酶有可能广泛用于洗涤剂工业。近 20 年来对碱性蛋白酶的研究更加广泛^[3]。我国碱性蛋白酶的研究近十年才有较大的发展,特别是近几年取得了可喜的成果,及时转化为生产力,具有很大的经济和社会效益。

1 我国碱性蛋白酶研究的近况及其应用

1.1 用于碱性蛋白酶生产的主要微生物 目前用于碱性蛋白酶的生产菌和研究对象主要是枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌及短小芽孢杆菌^[4],如我国目前使用的 2709 地衣芽孢杆菌和 1213 地衣芽孢杆菌,嗜碱性短小芽孢杆菌(*Alkaliphilic Bacillus pumillus*) B₄₅ 等^[11]。目前也在不断选育新菌株^[5~11]。产碱性蛋白酶的放线菌较少,主要是链霉菌,产生的碱性蛋白酶耐高温,很适合于工业生产^[5]。

1.2 碱性蛋白酶的应用及其研究现状 碱性蛋白酶最适作用 pH 值为 9~10。主要应用于加酶洗涤剂,在制革、丝绸等工业也有广泛的用途^[7]。我国自 1978 年开始推广应用,目前加酶洗涤剂约占总洗涤剂的 10%~15%,1989 年生产洗涤剂用蛋白酶 15~20 万吨^[4],目前生产应用更多。近年来我国科学工作者对碱性蛋白酶生产进行了不懈的探讨^[6~10]。邱秀宝等^[11,13],从 38 份土样中筛选到一株嗜碱性短小芽孢杆菌 R₁₁₅,经选育获得一株具有高产稳产碱性蛋白酶变异株 B₄₅,经发酵条件研究酶活力达 18000u/ml 达到全国最高水平。徐子渊等^[14]将原碱性蛋白酶生产菌 2709 进行诱变育种,获得变异株 C₁₂₁₃,酶产量提高了 40%。郑铁曾等进行了提高 C₁₂₁₃ 菌碱性蛋白酶活力的研究,酶活力提高了 170%。冯清平等^[6,7,17],从 28 份土样中筛选到一株嗜碱性地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*) 53-A₆,对其原生质体进行复合诱变处理,从中选育出了耐高温、耐碱的碱性蛋白酶高产菌株,以期应用于工业生产。综上所述,

我国碱性蛋白酶的研究发展很快,总的趋势是对高温耐碱性稳定性好的蛋白酶和常温碱性蛋白酶的研究,酶活力水平不断提高。也有致力于蛋白酶基因的筛选、克隆和表达方面的研究^[25~26]。

2 碱性蛋白酶研究的技术进展

2.1 微生物细胞的诱变技术(传统法) 众所周知,利用物理的、化学的诱变剂单独或复合处理微生物细胞是选育高产变种行之有效的方法^[10,15]。至今仍然是碱性蛋白酶育种的有效方法之一^[3,10]。

2.2 微生物的原生质体技术 新近发展起来的原生质体技术,对实现有效的遗传育种提供了很大的方便,通过诱变、融合原生质体或原生质体的诱变融合相结合来改变菌种的遗传特性,选育出碱性蛋白酶高产菌株,根据文献报道^[9,10,20]和我们的实验结果证明,这是一种非常有效的遗传育种技术。

2.3 DNA 体外重组技术——基因工程 基因工程是以分子遗传学的理论为基础,综合分子生物学和微生物遗传学的最新技术而发展起来的一门新兴技术学科。它是分子水平的、定向的,是一种全新的技术,可能给生产实践带来飞跃的发展,也将是遗传学研究的一个重要手段^[21]。我国在这方面的技术研究进展很快。在碱性蛋白酶基因的克隆、表达等方面取得了许多重大的成果^[25,26]。目前,研究较多的质粒-宿主系统有三大系统:大肠杆菌系统、酵母系统和枯草杆菌系统。江盛等^[25]利用 PUC18 质粒作载体,将嗜麦芽假单胞菌的碱性蛋白酶基因克隆到 *E. coli*(TGI) 中,获得克隆株 G3,其酶活是出发株的 3~4 倍。雷虹等^[26]利用 PCR 技术从地衣芽孢杆菌 2709 菌株的染色体 DNA 中扩增了 2709 碱性蛋白酶的编码序列,肯定了 2709 菌碱性蛋白酶属典型的 Subtilisin Carlsberg。刘永亮等^[12]利用枯草杆菌碱性蛋白酶 E 基因的信号顺序构建分泌表达载体获得成功。赵云德等^[26]对地衣芽孢杆菌 2709 碱性蛋白酶基因进行了克隆和序列分析。王培之等^[16]用遗传工

程的方法构建了一个高表达的枯草杆菌碱性蛋白酶E的枯草杆菌质粒-宿主系统。

2.4 蛋白质工程 蛋白质工程是指通过天然蛋白质或蛋白质衍生物的结构分析,确定其三级结构模型,然后通过分子设计合成突变基因,经筛选突变体DNA,合成相应蛋白质的方法^[24]。其研究焦点在于提高碱性蛋白酶的稳定性、抗氧化性及改变蛋白酶的专一性等。我国在蛋白质工程方面也取得了重大成果,如863项目中的超氧化剂碱性蛋白酶获得成功^[19]。中国科技大学的王贤舜等^[24]用蛋白质工程的方法首先在计算机图象系统上对预定的分子改造方案进行预测,设计方案,成功地完成了构建1个分泌热稳定性比野生型枯草杆菌蛋白酶E高4倍的工程菌。王培之等^[16]用蛋白质工程的方法完成了构建一个分泌枯草杆菌蛋白酶的工程菌PW8888,其分泌的碱性蛋白酶具有较强的抗氧化性,以期应用于增白加酶洗涤剂。

2.5 孢子热处理 将细菌孢子热处理进行选育,可以获得耐高温的碱性蛋白酶^[10],特别适合于芽孢杆菌的选育。热处理的对象可以是菌体,也可以是孢子或原生质体,在高温下处理一定的时间,使低温菌淘汰而高温菌得以纯化,连续交替多次处理,就可以获得所需耐高温菌种。我们的实验结果^[7]也证实了“热处理-再生-热处理-再生”的交替为选育高温菌的一种行之有效的办法。

3 碱性蛋白酶研究的展望

今后我国碱性蛋白酶的研究将主要致力于:(1)运用基因工程和蛋白质工程手段进一步提高酶的性能,如耐热、耐碱性及对螯合剂的抗性,提高酶的抗氧化性。进一步提高酶活力。通过渗透突变株的利用,分泌载体的构建,诱导物的使用等进一步解决革兰氏阴性菌胞外酶的分泌问题;(2)以石油为原料进行碱性蛋白酶生产;(3)进一步开拓碱性蛋白酶在医药工业方面的应用,特别是生化制药、化疗方面。不久的将来,碱性蛋白酶的研究将进入一个全新的阶段。

参 考 文 献

[1] Fogarty W M. *Process Biochemistry*, 1974, 7:27~35.
[2] Rose A H. *Economic Microbiology*, Academic Press,

London, 1980, 5:51~72.

- [3] Halpern M G. *Industrial enzymes from Microbial Sources*. Naves Data Corporation, 1981.
[4] 夏麟培,陈丙瑜. *工业微生物*, 1989, 19(2):28~31.
[5] 江行娟,杨庆云. *复旦大学学报(自然科学版)*, 1993, 32(4):387~393.
[6] 冯清平,沈剑敏,高燕. *兰州大学学报(自然科学版)*, 1994, 30(4):83~87.
[7] 冯清平,薛林贵. *微生物学报*, 1996, 36(6):453~459.
[8] 邱秀宝,程秀兰. *微生物学报*, 1984, 24(1):66~73.
[9] 程皆能,姚佳萍,杨银华. *工业微生物*, 1986, 16(9):15~25.
[10] 那淑敏,余茂效. *微生物学报*, 1988, 28(3):249~256.
[11] 邱秀宝,程秀兰,袁影. *微生物学通报*, 1988, 15(3):101~104.
[12] 刘永亮,童克忠. *遗传学报*, 1994, 21(3):235~246.
[13] 邱秀宝,戴宏,袁影等. *微生物学报*, 1990, 30(6):445~449.
[14] 徐子渊,朱青虹,王建华等. *食品与发酵工业*, 1984(4):12~16.
[15] 邱秀宝,袁影,戴宏等. *微生物学报*, 1990, 30(2):129~133.
[16] 王培之,王贤舜. *生物化学杂志*, 1993, 9(2):208~212.
[17] 冯清平,薛林贵. *兰州大学学报(自然科学版)*, 1995, 31(3):100~106.
[18] 王培之,王贤舜. *生物化学杂志*, 1992, 8(5):541~546.
[19] 林斌. 863计划生物技术领域年会论文摘要(1989~1990), 1990, 221.
[20] 诸葛健,周立萍,王萍等. *微生物学报*, 1984, 24(1):74~79.
[21] 常尊学,马莉,石松华等. *微生物学通报*, 1991, 18(6):332~336.
[22] 刘白玲,何先琪,张义正. *微生物学通报*, 1994, 21(1):48~51.
[23] 雷虹,洪扬. *生物化学杂志*, 1993, 9(4):441~447.
[24] 王贤舜,王培之. *生物化学与生物物理学报*, 1993, 25(1):51~57.
[25] 江盛梅,沈萍. *生物工程学报*, 1993, 9(3):266~270.
[26] 赵云德,王贤舜,郑屹. *生物化学与生物物理学报*, 1993, 25(6):577~583.