

蛋壳内膜分解菌所产蛋白酶的纯化 及其 N-末端氨基酸序列测定

李 勃* 党 永 马 瑜 陈颖怡

(陕西省微生物研究所 西安 710043)

摘 要: 从土壤中分离得到的 1 株产蛋壳内膜分解酶(ESM protease)的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。通过对其发酵液进行饱和硫酸铵盐析, 二次离子交换层析得到蛋壳内膜分解活性达到 304.5 U/mg 的目标蛋白, SDS-PAGE 电泳显示该酶分子量约为 32 kD, 通过测定其 N-末端 15 个氨基酸残基为: Ala、Glu、Ala、Gly、Gly、Val、Ala、Gly、Lys、Glu、Asp、Ala、Ala、Glu 和 Leu。
关键词: 蛋壳内膜蛋白酶, 铜绿假单胞菌, 纯化, N-末端氨基酸测序

Purification and N-terminal Amino Acid Sequencing of the ESM Protease Isolated from an Eggshell Membrane-degrading Bacteria

LI Bo* DANG Yong MA Yu CHEN Ying-Yi

(Shaanxi Microbiology Institute, Xi'an 710043)

Abstract: A strain producing eggshell membrane protease (ESM protease) was isolated from the soil and identified as *Pseudomonas aeruginosa*. The enzyme isolated from the fermentation liquid of this strain and purified by ammonium sulfate precipitation, quadratic anion-exchange chromatography exhibited eggshell membrane degrading activity of 304.5 U/mg. By SDS-PAGE, the protein molecular mass is 32 kD. The N-terminal amino acid sequence of this protease is: Ala, Glu, Ala, Gly, Gly, Val, Ala, Gly, Lys, Glu, Asp, Ala, Ala, Glu, Leu.

Keywords: ESM protease, *Pseudomonas aeruginosa*, Purification, N-terminal amino acid sequencing

蛋壳内膜(eggshell membrane 简称ESM)是一种平均厚度约 70 μm 的生物膜^[1], 含水约为 20%, 其主要成分为由角蛋白和粘多糖结合形成的纤维状蛋白, 通过角蛋白分子链间及链内高密度的二硫键交联形成内外两层紧密的网状结构^[2]。蛋壳内膜中富含与人皮肤弹性有关的角蛋白及构成胶原蛋白的羟脯氨酸以及透明质酸、粘多糖等多种有机成分^[3], 因而在

医疗卫生、化妆品及轻工等领域具有很大的开发潜力。但是由于蛋壳内膜在自然条件下性质非常稳定, 对于酸、碱以及蛋白酶都具有极好的稳定性, 且不溶于水和多种溶剂, 因而长期以来一直被视为一种无法有效利用的生物资源^[4]。

本研究从土壤中分离得到能够产蛋壳分解酶(ESM protease)的菌株, 经鉴定为假单胞菌属的铜绿

* 通讯作者: ✉ libo1981222@gmail.com

收稿日期: 2008-01-09; 接受日期: 2008-04-07

假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 前期研究发现该菌在 30 ℃、pH 8.0 条件下对于鸡蛋壳内膜具有显著的分解能力, 通过对其产酶进行了分离纯化及蛋白质氮末端测序, 希望能够对该类膜的生物降解机理以及该类蛋白酶的应用进行深入研究。

1 材料与方 法

1.1 菌种及培养基

1.1.1 菌种: 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 由本实验室从土壤中分离得到。

1.1.2 培养基: 溶液 A (pH 7.0): KH_2PO_4 0.136 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.68 g, NaCl 0.2 g, NH_4NO_3 0.2 g, 酵母提取物 0.05, 蛋白胨 1.0 g, ESM 0.4 g, H_2O 86 mL。

溶液 B (pH 7.0): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.136 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.68 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, H_2O 14 mL。

ESM 的制备方法参照文献[5]从鸡蛋中提取, 将配置好的溶液 A 与溶液 B 分别灭菌后于室温下冷却按比例(86:14, V/V)混合。

1.2 培养方法

种子培养: 菌种在不含 ESM 的基础培养基斜面上 37 ℃ 恒温培养 2 d 后转入含有 ESM 的斜面培养 24 h。

发酵培养: 将种子接种于 70 mL 装量的 500 mL 三角瓶中, 以 180 r/min, 37 ℃ 恒温振荡培养 9 h。

1.3 蛋白含量及酶活力测定

1.3.1 蛋白含量测定: 使用 Folin-酚试剂法^[6], 于 600 nm 下测定溶液的光吸收并根据标准曲线计算蛋白含量。

1.3.2 酶活力测定: 发酵液经 8000 r/min, 10 min 离心后, 取 0.3 mL 稀释 50 倍的上清液加入到 0.8 mL 0.6% 的酪蛋白溶液(pH 8.0)中, 充分摇匀后迅速取出 0.55 mL 反应液加入到含有 0.5 mL 10% TCA 的 eppendorf 管中, 并置于冰浴中终止反应; 其余反应液于 30 ℃ 水浴中反应 1 h 后加入 0.5 mL 10% TCA 终止反应, 并于 13000 r/min, 10 min, 4 ℃ 条件下离心, 取 0.2 mL 离心后的上清液加入到 2.5 mL Na_2CO_3 -NaOH 溶液中, 在 30 ℃ 水浴中放置 10 min 后加入 0.2 mL Folin-酚试剂, 待反应 30 min 后于 600 nm 下检测其吸光度值, 并计算酶活力。

酶活力定义: 在 pH 8.0, 30 ℃ 条件下反应 1 h 使

反应液在 600 nm 的光吸收增加 1 所需的酶量为 1 个酶活单位(U)。

酶活力计算方法: $1 \text{ U} : 1 (\text{ABS at } 600 \text{ nm}) = X \text{ U} :$

$\text{ABS}_{60 \text{ min}-0 \text{ min}}$

$X = 1 \times \text{ABS}_{60 \text{ min}-0 \text{ min}} / 0.15 \times \text{稀释倍数}$

1.4 酶的提取及纯化

1.4.1 粗酶提取: 将发酵液于室温下以 8000 r/min, 10 min 离心后弃去沉淀提取上清液作为粗提酶液。

1.4.2 硫酸铵盐析: 先将粗酶液进行 40% 硫酸铵饱和盐析, 于冰浴中搅拌 30 min 后, 在 4 ℃ 下, 13000 r/min, 10 min 离心取上清, 再进行 80% 硫酸铵饱和盐析, 于冰浴中搅拌 1 h 后, 在 4 ℃ 下, 13000 r/min, 10 min 离心收集沉淀。将沉淀用少量 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 6.0)溶解并装入透析带中于 4 ℃ 下透析过夜。

1.4.3 离子交换柱层析: 1) CM52 纤维素柱层析^[7]: 将透析后的酶液加入 CM52 纤维素阳离子交换柱(1.6 cm × 14 cm), 以 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 6.0)进行洗脱, 流速为 40 mL/h, 每管收集 3 mL。测定每管的蛋白浓度及酶活力。合并活性最高的 3 管收集液, 并于 4 ℃ 下用 pH 8.0 的 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液透析过夜。

2) DE52 纤维素柱层析: 将透析后的试管收集液加入 DE52 纤维素阴离子交换柱(1.6 cm × 14 cm), 以 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)进行洗脱, 流速为 40 mL/h, 每管收集 3 mL。测定每管的蛋白浓度及酶活力。合并有活性最高的 6 管收集液。

1.4.4 蛋白质分子量测定: 将经过两次离子交换层析得到的酶液用 SDS-PAGE 凝胶电泳法检验其纯化程度, 并测定其分子量, 具体方法见文献[8]。

1.4.5 N-末端氨基酸测序: 参照文献[9], 使用半干电转移法将 ESM 蛋白酶条带杂交转移至聚偏二氯乙烯(PVDF)膜上, 切下目标蛋白条带, 对目的蛋白提取物使用岛津的 PPSQ-10 蛋白测序仪对其 N-末端进行测序。

2 结果与分析

2.1 蛋壳内膜分解效果

经前期试验发现该菌株所产的 ESM 蛋白酶为胞外酶, 在 pH 8.0, 30 ℃ 条件下, 其对鸡蛋壳内膜的分解效果显著, 详见图 1。

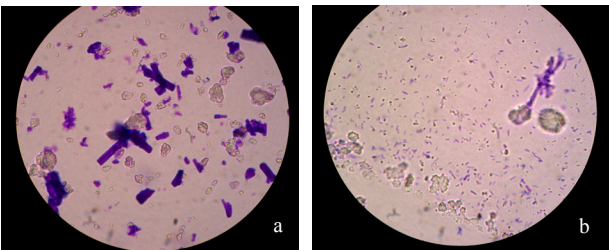


图 1 蛋壳内膜分解效果

Fig. 1 Result of the ESM protease digests the eggshell membrane

a: 空白对照(0 h); b: 蛋壳内膜被该蛋白酶分解 48 h 后的情况

a: Control (0 h); b: Result of the ESM digested by the protease 48 h

2.2 硫酸铵盐析结果

从表 1 结果可见, 40%浓度盐析时的除杂及 70%浓度二次盐析后的初步提纯效果均较为理想。经二次盐析后蛋白酶的相对活力可达 245.6 U/mg, 较粗酶液提高 18.1 倍, 活性收率可达 55%。而且盐析后溶液中残留的蛋白酶总活力仅为 23.4%。

2.3 离子交换层析结果

2.3.1 CM52 纤维素阳离子交换柱层析: CM52 层析结果见图 2 所示, 层析共有两个洗脱峰出现, 经测定其中第 1 个峰有 ESM 蛋白酶活性, 第 2 个峰为

表 1 硫酸铵盐析各步骤中酶活及蛋白含量测定						
Table 1 Enzyme activity and protein content of each fraction during Ammonium sulfate precipitation						
序号 (Fraction No.)	总体积 Total volume (mL)	E.A Enzyme activity (U/mL)	蛋白含量 Protein content (mg/mL)	相对活力 Specific activity (U/mg)	总活力 Total activity (U)	收率 Recovery (%)
粗酶液 Supernatant of culture	100	31	2.3	13.5	3100	100
40%硫酸铵沉淀得到的蛋白 Ammonium sulfate (0%–40%)	5	1	0.8	1.3	5	0
70%硫酸铵沉淀得到的蛋白 Ammonium sulfate(40%–70%)	7.8	221	0.9	245.6	1723.8	55.7
70%硫酸铵沉淀后的上清液 Ammonium sulfate(70%)	121	6	0.7	8.6	726	23.4

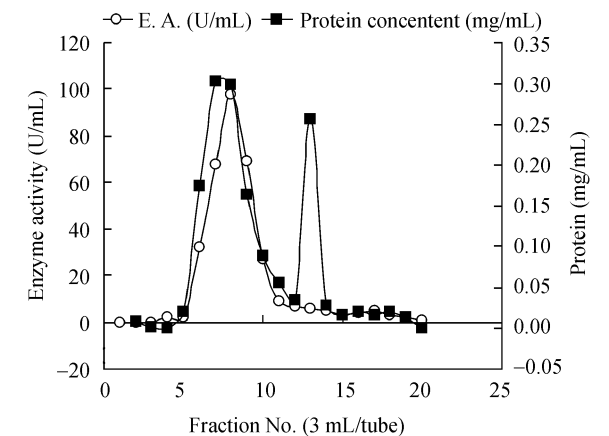


图 2 ESM 蛋白酶 CM52 层析图谱

Fig. 2 ESM protease chromatography curve of CM52

杂质峰。合并 7, 8, 9 号试管收集液透析后进行 DE52 柱层析, 并测定酶活及蛋白含量。

2.3.2 DE52 纤维素阴离子交换柱层析: 经 DE52 柱层析后发现, 13-19 号试管中收集液酶活及蛋白含量均高于其他管。由图 3 可见, 洗脱峰共有 3 个峰出现, 而第 1 和第 2 个峰与酶活力曲线的峰基本重叠, 说明处于该位置的 ESM 蛋白酶纯度较高。收集 13

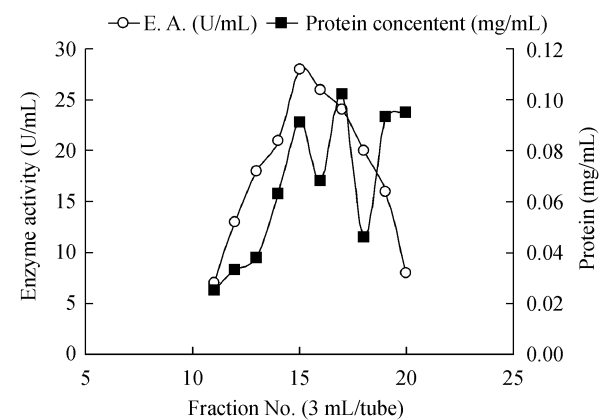


图 3 ESM 蛋白酶 DE52 层析图谱

Fig. 3 ESM protease chromatography curve of DE52

号至 18 试管收集液以葡萄糖凝胶 G-25 进行脱盐, 并以 SDS-PAGE 电泳检验其纯化程度。

2.4 分离纯化结果分析

ESM 蛋白酶的纯化结果如表 2 所示。经 CM52 阳离子交换柱层析后所得蛋白的相对酶活可达 324.7 U/mg, 为粗提酶液活力的 24.1 倍。经 DE52 阴离子交换柱层析后所得蛋白的相对酶活为 304.5 U/mg, 虽然较第 1 次层析酶活力有所下降, 但蛋

白含量为 0.072 mg/mL, 较第 1 次柱层析(0.225 mg/mL)大大减少。经冷冻干燥后, 所得纯化蛋白经测定仍具有显著蛋壳内膜分解活性(活性可达 227.4 U/mg)。

2.5 SDS-PAGE 电泳及 N-末端氨基酸序列测定

如图 4 所示箭头所指处为纯化的 ESM 蛋白酶,

结果表明纯化后的该酶蛋白仅有 1 条单一的条带, 其分子量约为 32 kD。经 PPSQ-10 蛋白测序仪测定 ESM 蛋白酶的 N-末端 15 个氨基酸残基为: Ala、Glu、Ala、Gly、Gly、Val、Ala、Gly、Lys、Glu、Asp、Ala、Ala、Glu 和 Leu。

表 2 ESM 蛋白酶分离纯化结果					
Table 2 Separation and purification of ESM protease					
处理 Treatment	E.A. Enzyme activity (U/mL)	蛋白含量 Protein content (mg/mL)	相对酶活 Specific activity (U/mg)	总活力 Total activity (U)	收率 Recovery (%)
粗酶液 Supernatant of culture	31	2.3	13.5	3100	100
盐析 Precipitation	221	0.9	245.6	1723.8	55.7
CM52 层析 CM52 chromatography	78	0.255	324.7	702	22.6
DE52 层析 DE52 chromatography	21.8	0.072	304.5	228.9	7.4

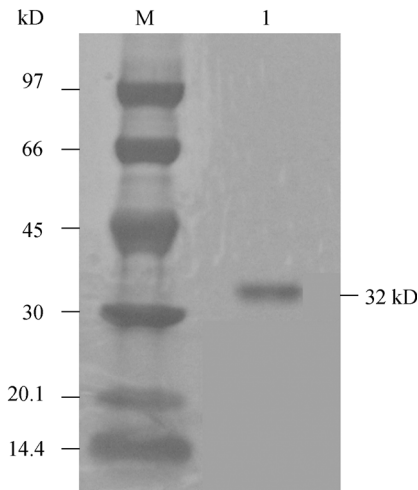


图 4 ESM 蛋白酶的 SDS-PAGE 电泳
Fig. 4 SDS-PAGE of ESM protease
M: Marker(LMW kit); 1: ESM protease

3 结论

蛋壳内膜含有丰富的钙、角蛋白、粘多糖、溶菌酶等成分,又基于蛋壳资源数量巨大,永不衰竭,因而具有很大的利用潜力。随着我国现代蛋制品加工工业的不断发展,在很大程度上改变了原来的蛋壳来源分散、不易收集的情况,然而由于不能对其进行有效利用从而加重了环境污染严重的现状,因此对蛋壳及蛋壳内膜资源化研究与开发具有重要的理论与实践意义。

本实验从土壤中选育得到能够有效分解蛋壳内膜的菌种并对其所产蛋白酶进行了分离纯化工艺研究以及 N-末端氨基酸序列的初步测定。目前对于该

酶蛋白的基因测序工作正在进行中,下一步将对该菌种的诱变及遗传学优化以及蛋壳内膜的分解机理进行深入研究。

参 考 文 献

[1] 罗有福, 佟 健, 盛绍基. 鸡蛋膜的最新研究进展. 云南化工, 2002, 29(1): 21-22.

[2] 张瑞宇. 废弃蛋壳的利用价值及其资源化途径与技术. 重庆工商大学学报(自然科学版), 2006, 23(6): 551-552.

[3] Vladimir Vlad, Ames IA (US). Avian eggshell membrane polypeptide extraction via fermentation process. US0017447A1. 2007, pp.3-6.

[4] 皮钰珍, 岳喜庆, 杜阿南. 蛋壳膜的分离及应用. 食品科技, 2005, 5: 83-84.

[5] Ahlborn GJ, Clare DA, Sheldon BW, *et al.* Identification of eggshell membrane proteins and purification of ovotransferrin and β -NAGase from hen egg white. *The Protein Journal*, 2006, 25(1): 72-81.

[6] 俞建英, 蒋 宇, 王善利. 生物化学实验技术. 北京: 化学工业出版社, 2005, pp.175-177.

[7] Shuichiro Murakami, Chihiro Kohsaka, Takao Okuno, *et al.* Purification, characterization, and gene cloning of *cis,cis*-muconate cycloisomerase from benzamide-as-similating *Arthrobacter* sp. BA-5-17. *FEMS Microbiology letters*, 2004, 231: 119-124.

[8] Robert K Scopes. Protein purification principles and practice. USA: Springer Science&Business Media, Inc, 1994, pp.296-298.

[9] Joseph Sambrook, David W Russell. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, pp.1723-1726.