



研究报告

尖孢镰刀菌 M1 耐热蛋白酶纯化及酶学性质

王世伟¹ 王卿惠² 向文胜² 莫继先¹ 李婷婷¹ 翟丽萍¹ 王韬¹

1 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院 抗性基因工程与寒地生物多样性保护重点实验室 黑龙江 齐齐哈尔 161005

2 东北农业大学生命科学学院 黑龙江 哈尔滨 150030

摘要:【背景】前期工作中,从北大仓白酒大曲分离到一株真菌,经形态学和分子生物学方法,将其鉴定为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) M1,研究发现该菌能产中性蛋白酶。中性蛋白酶是应用于工业化生产的重要酶制剂。由于其作用条件温和、催化速率较高,被广泛应用于食品、医药、皮革、饲料、化工和废弃物处理行业。【目的】为了使该菌蛋白酶应用于相关工业生产,需要对该蛋白酶进行纯化和酶学特性研究。【方法】采用硫酸铵分级分离、疏水和离子交换层析对该菌蛋白酶进行纯化,通过 SDS-PAGE 测定酶的纯度和分子量,并研究其热稳定性和酸碱适应性。【结果】经各步层析,蛋白酶纯化倍数达 26.1,得率为 7.9%;经测定纯酶的分子量为 62 kD;该酶最适温度为 40 °C,最适 pH 为 7.0,属于中性蛋白酶;该酶对酸较敏感,对碱有较强的耐受性;耐热性较强,但酶活性不受乙二胺四乙酸二钠盐抑制。【结论】由于该中性蛋白酶具有较好的耐热性,因此,可作为工业生产上潜在的生物催化剂。

关键词: 镰刀菌属, 耐热蛋白酶, 纯化, 特征

Purification and characterization of the thermostable protease from *Fusarium oxysporum* M1

WANG Shiwei¹ WANG Qinghui² XIANG Wensheng² MO Jixian¹ LI Tingting¹
ZHAI Liping¹ WANG Tao¹

1 Key Laboratory of Resistance Gene Engineering and Preservation of Biodiversity in Cold Areas, College of Life Sciences and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161005, China

2 School of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China

Abstract: [Background] A fungus producing a neutral protease was isolated from *Daqu* of Beidacang liquor and identified as *Fusarium oxysporum* M1 by morphology and molecular biology in our preliminary work. Neutral proteases are important enzyme preparations which have been widely used in industrial production, such as food, medicine, leather, feed, chemical and waste treatment owing to its mild reaction conditions and high catalytic rate. [Objective] In order to apply the neutral protease from *Fusarium*

Foundation item: Basic Scientific Research Business Cost Project of Heilongjiang Provincial Undergraduate Universities in 2018 (135309482)

*Corresponding author: Tel: 86-791-83813459; E-mail: wsw888535@sohu.com

Received: 17-07-2020; Accepted: 28-08-2020; Published online: 30-03-2021

基金项目: 2018 年度黑龙江省省属本科高校基本科研业务费科研项目(135309482)

*通信作者: Tel: 0791-83813459; E-mail: wsw888535@sohu.com

收稿日期: 2020-07-17; 接受日期: 2020-08-28; 网络首发日期: 2021-03-30

oxysporim M1 to related industrial production, it is very necessary to purify the protease and study its enzymatic characteristics. **[Methods]** The protease was purified through ammonium sulfate fractionation, hydrophobic and ion exchange chromatography in this paper, and then its molecular weight was determined by SDS-PAGE electrophoresis. At same time, the thermal stability and acid-base adaptability of the enzyme were also studied. **[Results]** The protease purification fold and yield were 26.1 and 7.9% by different chromatography steps. The molecular weight of the purified enzyme was 62 kD. The optimum temperature and pH value were 40 °C and 7.0 respectively. The protease belongs to a neutral protease which is sensitive to acid but strong tolerance to alkali. However, it is interesting that the enzyme have strong heat resistance, but is not inhibited by EDTA. **[Conclusion]** Therefore, the protease from *Fusarium oxysporim* M1 can be used as a biological catalyst used in different industrial applications in the future.

Keywords: *Fusarium*, thermostable protease, purification, characterization

镰刀菌属(*Fusarium* sp.)是由 Link 以粉红镰刀菌(*Fusarium roseum*)为基础建立起来的, 其纺锤形不分隔孢子着生于子座上^[1]。该属许多种均能产生重要酶类, 如纤维酶^[2-4]、果胶酶^[5]、木聚糖水解酶^[6-7]等。

镰刀菌属不同种能产生不同性质的蛋白酶, 其中碱性蛋白酶比较常见。温云平等^[8]对禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*) F15 产碱性蛋白酶发酵条件进行了优化, 使其活力高达 534.2 U/mL。Pekkarinen 等^[9]通过大小排阻和阳离子交换色谱纯化了黄色镰刀菌(*Fusarium culmorum*)碱性丝氨酸蛋白酶, 分子量为 28.7 kD, 在 pH 8.3–9.6 和 50 °C 下活性最高; 该酶受苯甲磺酰氟和凝乳酶抑制剂抑制, 但不受大豆胰蛋白酶或鲍曼-伯克抑制剂影响。Pekkarinen 等^[10]纯化了黄色镰刀菌(*F. culmorum*)胰蛋白酶, 该酶在 pH 9.0 和 45 °C 时活性最高, 可被钙离子稳定, 能优先水解精氨酸和赖氨酸残基 C 端的蛋白质底物 β -嘌呤硫氨酸的肽键。该蛋白酶可能对真菌在谷物中的定居起重要作用。除碱性蛋白酶外, 镰刀菌属还能产生酸性蛋白酶。Kolaczowska 等^[11]从串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)培养滤液中提取 ACD 蛋白酶, 经丙酮沉淀、凝胶过滤和离子交换层析纯化获得一种酸性蛋白酶, 该酶等电点 pI 为 4.9, 分子量为 38 kD, 最适 pH 值为 3.2; 该酶在 pH 3.0–5.5 范围内表现出最大稳定性; 胃蛋白酶抑制剂对该蛋白酶活性有较强的抑制作用, 而巯基试剂、丝氨酸型蛋白酶抑制剂和金属螯合剂对

其活性无显著影响。

目前, 镰刀菌属中性蛋白酶的研究逐渐受到重视。秦日甜等^[12]从镰刀菌 Q7-31T 燕麦秸秆诱导发酵粗酶液中纯化并鉴定了一种金属蛋白酶; 经硫酸铵分级沉淀、Sephacryl S-100 凝胶过滤层析和 DEAE 弱阴离子交换层析, 从粗酶液纯化得到大小为 30 kD 的新金属蛋白酶, 比酶活达 2.85 U/mg, 最适 pH 和温度分别为 pH 7.0 和 40 °C, 在 pH 5.0–9.0 范围内具有很好的稳定性。本研究前期工作中从黑龙江北大仓集团有限公司白酒大曲中分到一种真菌, 结合形态学观察和分子生物学方法将其鉴定为尖孢镰刀菌, 命名为 *F. oxysporim* M1, 研究发现该菌发酵液产纤维素酶和耐热性蛋白酶^[13-14]; 同时, 研究也发现其蛋白酶似乎在尖孢镰刀菌与解淀粉芽孢杆菌互作过程中起到了关键作用, 可能是该菌能抑制解淀粉芽孢杆菌一个重要因素。为了研究 *F. oxysporim* M1 蛋白酶酶学性质, 本实验对该菌产蛋白酶纯化和酶学性质进行研究, 以期为研究其与解淀粉芽孢杆菌的互作机理, 以及该蛋白酶在生产上的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株: 分离于黑龙江北大仓集团有限公司酿酒车间白酒大曲(*Daqu*)的 *F. oxysporim* M1, 现保存于齐齐哈尔大学分子实验室。

蛋白质纯化填料: 疏水作用层析填料, 具有

高分辨率的苯基琼脂糖凝胶 6FF/Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (High Sub), Sigma 公司; 离子交换层析填料, DEAE-Sepharose FF, 上海联硕生物科技有限公司。

酪素、酪氨酸, 无锡必康生物工程有限公司; 硫酸铵(AR 级), 天津市致远化学试剂有限公司生产; 蛋白质 Marker, 北京索莱宝科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。

朗基多功能 PCR 仪, 广州飞迪生物科技有限公司; Alpha 凝胶成像系统, Alpha Innotech 公司; 蛋白质纯化系统, Bio-Rad 公司; 电泳系统, 北京六一生物科技有限公司。

PDA 液体培养基(g/L): 土豆 200.0, 蔗糖 20.0, 琼脂 20.0 (固体培养基添加); 牛奶培养基(g/L): 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 5.0, 脱脂奶粉 30.0, 琼脂 15.0; 种子培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 蛋白胨 3.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4, KH_2PO_4 2.0, 尿素 0.3, CaCl_2 0.3, MgSO_4 0.3, FeSO_4 5.0, MnSO_4 0.001 6, ZnSO_4 0.001 4, CoCl_2 0.002, pH 7.0, 装液量 60 mL/150 mL; 发酵培养基(g/L): 燕麦秸秆 5.0, 蛋白胨 3.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4, KH_2PO_4 2.0, 尿素 0.3, CaCl_2 0.3, MgSO_4 0.3, FeSO_4 5.0, MnSO_4 0.001 6, ZnSO_4 0.001 4, CoCl_2 0.002, pH 7.0, 装液量 30 mL/250 mL。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化及形态学观察

取冰箱冷藏保存标记为 M1 纯培养菌株, 定点接种于 PDA 平板(培养基中央), 28 °C 倒置培养 2–3 d 待长出菌落, 肉眼观察记录; 将 M1 菌接种于 PAD 液体培养基, 28 °C、150 r/min 培养 36 h, 然后静置培养 7 d, 待液体培养基长出菌醭(Pellicle); 挑取少量菌醭, 无菌条件下, 使用 0.9% 无菌生理盐水进行制片并显微镜观察。

1.2.2 蛋白酶活性定性检验和定量测定

(1) 定性检验: 用无菌接种环挑取菌醭(约 1 mm^3) 转接到牛奶鉴别培养基上(培养皿中央), 28 °C 倒置培养 24、48、72、96 h, 观察是否产生

透明圈, 按透明圈大小初步判断该菌蛋白酶活性。

(2) 定量测定: 挑取 PDA 斜面活化菌丝 3 环, 接种到 PDA 液体培养基, 28 °C、120 r/min 培养 3 d, 待菌种达到一定浓度(OD_{600} 为 0.5), 转接至液体种子培养基, 28 °C、120 r/min 摇瓶培养 72 h; 按 10% 接种量转接于液体发酵产酶培养基, 28 °C、120 r/min 摇床培养 72 h。由于该菌蛋白酶为分泌型蛋白酶, 菌体内未检测出蛋白酶活性, 因此发酵液经 8 层无菌纱布过滤得到粗酶液, 4 °C 保存备用。利用 Folin 试剂法, 根据酪氨酸标准曲线和酶活单位定义测定蛋白酶活力^[15-16]。蛋白酶在一定的温度下, 以酪蛋白为底物, 产生含有酚基的氨基酸(如酪氨酸), 在碱性条件下将 Folin 试剂还原生成钼蓝和钨蓝, 用分光光度计在 680 nm 波长下比色, 测定溶液的吸光度。酶活力与吸光度成比例, 由此可以计算样品蛋白酶活力。

(3) 蛋白含量测定: 蛋白含量测定采用 Bradford 法^[17], 标准曲线是以牛血清白蛋白为标准绘制。在 1.5 mL 离心管中加入适当稀释的牛血清白蛋白 200 μL , 再加入 1 mL G-250 考马斯亮蓝染液, 5–30 min 内在 595 nm 下测定光吸收值。根据标准曲线计算发酵液和层析后各酶液的蛋白质含量, 计算相应比酶活。

蛋白酶活力单位(U)的定义为: 在一定 pH 条件下, 以 2% 酪蛋白为底物, 每毫升粗酶样品在 40 °C 下每分钟水解酪素生成 1 μg 酪氨酸的酶量。计算酶活力值的公式为:

$$X = (K \times A \times 5 \times N) / 10$$

式中, X 为样品的酶活; K 为由标准曲线得出的光密度为 1 时相当的酪氨酸质量浓度($\mu\text{g/mL}$); A 为样品 OD_{680} 值与空白 OD_{680} 值之差; N 为样品的稀释倍数; 5 为测定中吸取的滤液是全部滤液的 1/5; 10 为酶反应时间 10 min, 以 1 min 计。

1.2.3 蛋白酶纯化

各步纯化酶活测定方法同 1.2.2 定量测定法(Folin 试剂法)。采用考马斯亮蓝法, 用牛血清白蛋白制作蛋白质浓度的标准曲线, 通过标准曲线测

定各步纯化层析液的蛋白质含量, 计算比酶活; 采用 SDS-PAGE 测定酶蛋白的纯度和分子量^[18]。

蛋白酶纯化方法参考文献[19], 方法有所改动。

硫酸铵分级分离: 用分析天平分别称取 0.106、0.146、0.206、0.291、0.361、0.436、0.516、0.603、0.697 g 硫酸铵干燥粉末于 1.5 mL 灭菌 EP 管中, 用微量进样器向各管中分别加入 1 mL 粗酶液。使各管中硫酸铵饱和度分别达到 20%–100% (以 10%递增)。摇匀, 冰箱冷藏 1 h 后, 12 000 r/min 离心 15 min 收集沉淀, 沉淀用同样体积的 25 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.2)重悬。取适量悬浮液测定相对蛋白酶酶活性, 根据各自相对酶活力大小确定最佳方法。按最佳方法获得的酶样品记作 ASF。

疏水作用层析: ASF 经浓缩、过滤后直接上样于疏水层析柱, 疏水层析柱为 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (2.0 cm×23 cm), 每次进样 2 mL。先用 1 mol/L (NH₄)₂SO₄ 的缓冲液 B 对柱进行平衡 (Equilibration); 然后用 100%–0% 的硫酸铵 (25 mmol/L PBS, pH 7.4) 溶液进行梯度洗脱, 流速为 2 mL/min; 最后一步为等度洗脱 (Isocratic Elution), 使用 120 mL 的 25 mmol/L PBS 缓冲液以 2 mL/min 的流速冲洗。表现最大酶活力峰收集后, 经透析、浓缩后获得的样品记作 HIC, 进行酶活和比酶活的测定和计算。

离子交换层析: HIC 样品经透析除盐、超滤管 (Milipore Amicon Ultra-15, 10 kD) 浓缩后, 进样于 DEAE-Sepharose FF (2.0 cm×23 cm) 柱; 进样后用 25 mmol/L PBS 缓冲液(pH 7.2)以 2 mL/min 流速平衡洗脱, 去除未结合蛋白质; 然后用 60%–100% 浓度逐渐上升的 NaCl 进行洗脱, 流速为 2.5 mL/min; 最后以流速为 2.0 mL/min 的 1 mol/L NaCl 进行等梯度洗脱。表现最大酶活力的峰收集起来, 样品经透析、冻干浓缩获得的浓缩液记作 DEAE, 进行酶活和比酶活的测定和计算, 以及 SDS-PAGE

检验。

1.2.4 蛋白酶的酶学性质研究

(1) 最适温度及稳定性测定

将 2.0% 干酪素溶液分别在 10、20、30、40、50、60、70、80、100 °C 水浴中预热 5 min, 然后加入 1 mL 稀释的蛋白酶纯化液, 在各自温度水浴中继续保温 10 min, 采用上述福林-酚法测定酶活力, 以确定最适温度; 将 1 mL 纯酶液分别在上述温度条件下保温 120 min, 将预热后的酶液加入到经 40 °C 预热的 5 mL 酪素溶液中, 40 °C 保温 10 min, 采用福林酚法测定酶活力, 研究酶的热稳定性。

(2) 最适 pH 及其稳定性测定

将 2.0% 干酪素溶液添加到不同 pH 缓冲液中, 缓冲液 pH 范围为 pH 3.0–5.0 (10 mmol/L 乙酸)、pH 6.0–7.0 (10 mmol/L 磷酸)、pH 8.0–9.0 (10 mmol/L Tris-HCl)、pH 10.0–11.0 (10 mmol/L 碳酸氢盐), 将 1 mL 纯酶液加入到 5 mL 已在 40 °C 水浴锅中预热的不同 pH 干酪素溶液中, 40 °C 保温 10 min, 然后用福林酚法测定酶在不同 pH 下酶活力, 以确定最适 pH; 将纯酶液加入到各 pH 值缓冲液中, 室温(25 °C)保温 120 min, 然后通过福林酚法测定蛋白酶的酶活力, 研究酶 pH 稳定性。

(3) EDTA 对蛋白酶的影响

为了研究乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)对蛋白酶的影响, 在室温下, 适当纯化的蛋白酶与 1 mol/L EDTA 在 pH 7.0 下预保温 1 h 测定蛋白酶活性, 与对照(未加 EDTA)进行比较, 研究蛋白酶活性变化。

2 结果与分析

2.1 *Fusarium oxysporum* M1 形态学观察

将纯培养 *Fusarium oxysporum* M1 菌株接到 PDA 平板(或牛奶培养基)上, 28 °C 恒温培养 3 d 后观察菌落形态。如图 1A 所示, *F. oxysporum* M1 菌落呈白色絮状, 菌丝细长, 呈绒毡状, 质地较紧密, 中央呈聚集性轻微突起。镰刀菌有性时期分别属于肉座菌科(*Hypocreaceae*)赤霉属(*Gillerella*)、

丛赤壳属(*Nectria*)、丽赤壳属(*Calonectria*)和小赤壳属(*Micronectriella*)等。除 *Gillerella zea* 常见和易培养外,大部分种在培养基上较少形成子囊壳,而且有些种至今未发现有无性时期,因此上述镰刀菌菌落为无性时期菌落形态。

如图 1 所示, *F. oxysporum* M1 在 PDA 培养基上,由于有大量孢子生成而呈粉质(图 1A);在牛奶培养基上(图 1B),由于有充足的养分,菌落出现从中心向四周放射状的凹陷。菌落中间突起,菌落和菌丝更加厚重。其原因可能是蛋白酶水解蛋白产生大量氨基酸,从而促进菌落生长。总之,形态观察结果与镰刀菌菌落形态特征完全一致。

如图 2 所示,为使用 0.9%生理盐水直接制片,使用 40×显微镜观察结果。图 2 中包括菌丝形态(Hypha)、小孢子形态(Microconidia)、分生孢子梗(Conidiophore)和大孢子(Macroconidia)形态,其中,菌株 *F. oxysporum* M1 大孢子和小孢子清晰,大型分生孢子无色,多胞,镰刀形,略弯曲,两端稍尖,少许弯曲,有隔;分生孢子梗(Conidiophore)分枝;小型分生孢子无色,单胞,卵圆形、瓜子型等。

2.2 *Fusarium oxysporum* M1 产蛋白酶定性检验

蛋白酶初筛实验中,常使用脱脂奶粉和酪蛋白作氮源^[20]培养基,检验蛋白酶产生菌在培养皿

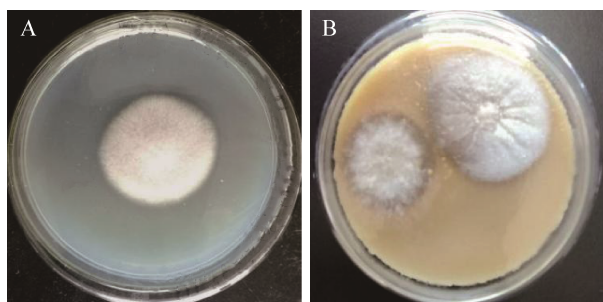


图 1 *Fusarium oxysporum* M1 菌落形态图

Figure 1 *Fusarium oxysporum* M1 colony morphology

注: A: 尖孢镰刀菌 M1 菌株在 PDA 培养基上的菌落形态; B: 尖孢镰刀菌 M1 菌株在牛奶培养基上的菌落形态

Note: A: *Fusarium oxysporum* M1 colony morphology in PDA medium; B: *Fusarium oxysporum* M1 colony morphology in milk culture-medium

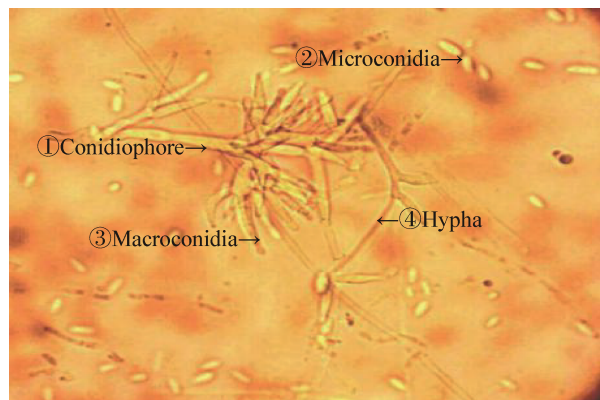


图 2 尖孢镰刀菌 M1 形态学观察结果(16×40)

Figure 2 Mycelium micrograph characteristics of *Fusarium oxysporum* M1 under microscope (16×40)

中产生透明圈情况,可初步定性鉴定菌株有无蛋白酶活性。透明圈大小往往能够直接反映蛋白酶活力高低。图 3A、3B、3C、3D 分别代表 *Fusarium oxysporum* M1 (培养基背面观察)在牛奶培养基上培养 24、48、72、96 h 后菌落生长情况,其产生透明圈直径分别为 2.2、3.3、3.9 和 4.2 cm。该菌在培养基上生长 1 d 后透明圈就十分明显(图 3A),说明该蛋白酶可能受脱脂奶粉中蛋白质诱导而迅速产生。

周雪雁等^[21]选用菌落透明圈和菌落直径比值(H/C 值)作为产蛋白酶高活力细菌的筛选方法,但对真菌而言,由于菌丝生长较快,可迅速向外延伸扩充甚至掩盖透明圈的真实大小。因此,以 H/C 值作为唯一筛选依据并不很适用。

2.3 *Fusarium oxysporum* M1 产蛋白酶定量分析

图 4 表示 *F. oxysporum* M1 在液体发酵培养基中随着培养时间延长菌株生长变化情况,其中 A-E 是使用装液量为 30 mL/250 mL、120 r/min 摇瓶发酵培养 24、48、72、96、120 h 后进行拍照观察的结果。

从图 4 可以看出,随着培养时间逐步延长,由于菌丝生长加快,发酵液透明度逐渐减小,发酵培养时间进一步延长后颜色变成浅粉色,后期出现菌丝和孢子挂壁呈“紫色环”现象。蛋白酶初步测

试结果表明, 在发酵时间为 72 h 时该蛋白酶活性最高, 并随时间延长趋于稳定, 因此选用发酵培养时间为 72 h 进行后续蛋白酶活性定量分析。

以 *F. oxysporum* M1 菌株发酵 72 h 获得发酵液, 根据前述蛋白酶定量测定 Folin 试剂法, 根据实验获得的酪氨酸标准曲线 $Y=0.009\ 8X+0.004\ 6$ ($R^2=0.999\ 7$), 获得 K 值为 $OD_{680}=1$ (Y 轴) 时, X 轴对应的酪氨酸质量浓度($\mu\text{g/mL}$)。由上述酪氨酸标准曲线公式得知 K 值(X 轴)为 101.57。根据所测得的粗酶发酵液 OD_{680} 计算, 获得 *Fusarium oxysporum* M1 蛋白酶活力为 234.42 U/mL。

2.4 *Fusarium oxysporum* M1 蛋白酶纯化

2.4.1 M1 菌株发酵液蛋白酶硫酸铵分级分离

F. oxysporum M1 发酵液内含有蛋白酶, 纯化蛋白酶共使用了 10 瓶菌摇瓶发酵, 装液量为 30 mL/250 mL, 进行不同饱和浓度的硫酸铵沉淀

酶蛋白。预试验发现, 在 20%–40%硫酸铵饱和浓度范围内对酶蛋白沉淀后, 重悬液初始相对酶活力很低, 之后酶活开始逐渐升高, 达 70%饱和度时, 酶活力最高。因此后续实验采用 40%–70%饱和硫酸铵进行分级分离, 获得的蛋白酶活性最高。在后继实验中, 硫酸分级分离的所有批次皆用该饱和浓度的硫酸铵进行分级分离, 获得的蛋白酶记作 ASF (Ammonium Sulfate Fractionation)。

2.4.2 疏水作用层析对 M1 菌株蛋白酶的纯化

疏水作用层析 (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC) 是分离不同蛋白质的有效方法。不同蛋白酶疏水性质不同, 因此, 在逐渐降低离子强度洗脱缓冲液作用下, 洗脱时间不同, 可将不同疏水性蛋白分开。图 5 是经疏水作用层析获得的洗脱曲线。

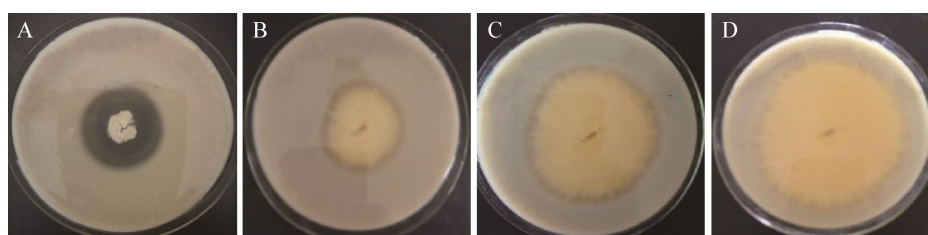


图 3 M1 菌株牛奶培养基上透明圈

Figure 3 Clear zone of *Fusarium oxysporum* M1 strain on milk culture-medium

Note: Cultural time: A: 1 day; B: 2 days; C: 3 days; D: 4 days

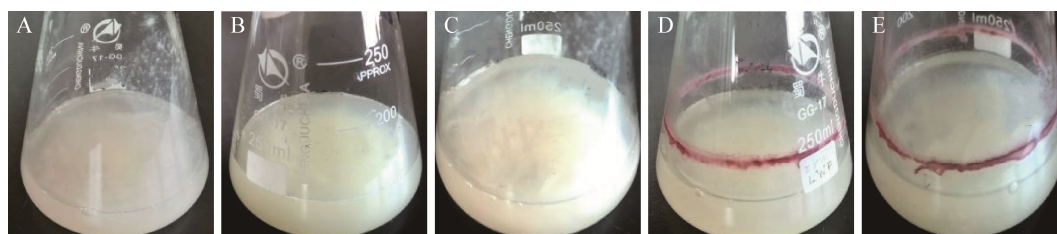


图 4 不同培养时间下 M1 菌株液体发酵培养基的发酵状态

Figure 4 The fermentation liquid from *Fusarium oxysporum* M1 strain on the fermentation medium at different culture time

Note: Cultural time: A: 24 h; B: 48 h; C: 72 h; D: 96 h; E: 120 h

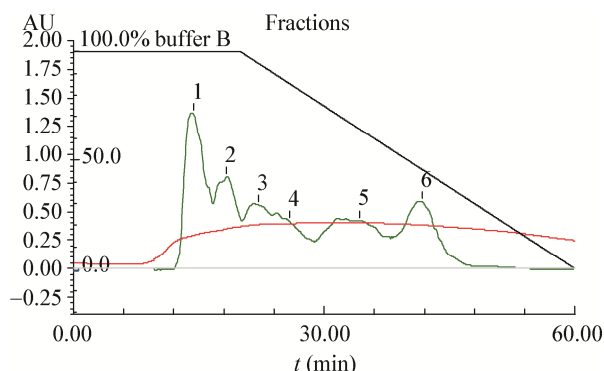


图5 疏水作用层析对 M1 菌株蛋白酶的纯化
Figure 5 HIC purification for protease of *Fusarium oxysporum* M1 strain

从图 5 可看出, 在前 20 min 内洗脱缓冲液为 100%硫酸铵溶液, 在此过程中获得 1 号和 2 号 2 个峰, 分别收集 1 号(起始时间为 12 min, 结束时间 18 min)和 2 号峰(结束时间为 21 min)进行蛋白酶酶活性测定, 没有发现具有蛋白酶活性。同样 3 号、4 号和 5 号峰几乎均无蛋白酶活性(5 号蛋白酶活性较低); 而 6 号峰(收集的起始时间为 40 min, 结束时间为 50 min)具有很高蛋白酶活性, 收集该峰洗脱液, 记作 HIC, 做下一步蛋白酶纯化。

2.4.3 离子交换层析对 M1 菌株蛋白酶的纯化

离子交换层析(Ion-Exchange Chromatography, IEC)是蛋白酶纯化的重要方法。图 6 为采用 DEAE 填料进行离子交换层析所获得的层析图, DEAE 属于阴离子交换树脂。疏水作用层析获得蛋白酶粗品, 由于经透析体积比较大, 因此蛋白酶粗品需要进行浓缩。实验采用了超滤管(10 kD)浓缩, 节省了浓缩时间。从图 6 中可以看出, 疏水层析获得蛋白酶经过透析、超滤后上样离子交换层析柱, 获得了 2 个主要峰, 即 1 号和 2 号峰。1 号峰比较杂乱, 但出峰时间比较快, 用时仅 2 min, 可是面积比较大, 洗脱时间较长, 14 min 后才结束。

经蛋白酶活性测定, 整个 1 号峰收集物没有蛋白酶活性; 2 号峰是通过 60%–100% NaCl 浓度逐渐提高的情况下获得的峰, 洗脱物具有蛋白酶活性。洗脱物经透析、浓缩后获得的蛋白酶样品记作 DEAE。

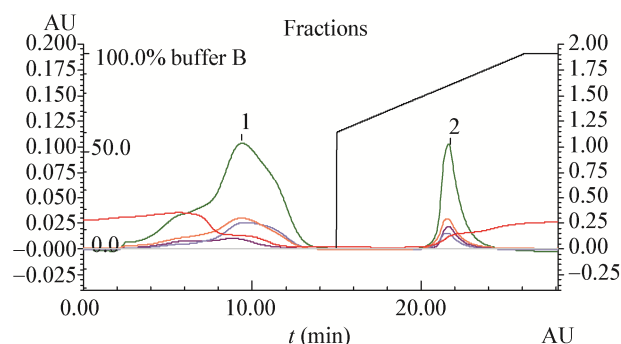


图6 离子交换层析(DEAE)对 M1 菌株蛋白酶的纯化
Figure 6 DEAE purification for the protease of *Fusarium oxysporum* M1 strain

2.4.4 纯化表分析

表 1 归纳了真菌 M1 产蛋白酶纯化过程, 显示了蛋白酶分离和逐步层析后的酶活测定结果, 包括比酶活、纯化倍数以及蛋白酶得率等重要参数。整个纯化包括粗液的制备、硫酸铵分级分离 (ASF)、疏水作用层析 (HIC) 和离子交换层析 (DEAE)。表 1 中蛋白酶纯化结果来自 300 mL 发酵液(10 瓶发酵液, 装样量为 30 mL/250 mL), 经过多次重复纯化获得的结果。

从表 1 可知, 粗酶液, 即无细胞提取物(Cell Free Extract, CFE)总酶活为 70 326 U/mL, 是 300 mL 发酵液的总蛋白酶活, 根据蛋白质标准曲线测得的总蛋白为 833.4 mg, 因此发酵液粗品比酶活达到了 84.38 U/mg。经硫酸铵分级分离 (ASF)、疏水作用层析 (HIC) 和离子交换层析 (DEAE), *F. oxysporum* M1 菌株比酶活达到 2 201.6 U/mg, 纯化倍数达到 26.1, 得率为 7.9%。

表 1 菌株 M1 蛋白酶的纯化表

Table 1 Purification of protease from *Fusarium oxysporum* M1 strain

Purification step	CFE	ASF	HIC	DEAE
Total activity (U/mL)	70 326.0	12 213.6	7 560.0	5 548.0
Total protein (mg)	833.400	74.200	9.424	2.520
Specific activity (U/mg)	84.38	164.60	802.21	2 201.60
Yield (%)	100.000	21.250	9.214	7.900
Fold purification	1.000	1.951	9.501	26.100

2.4.5 纯化蛋白酶电泳分析

图 7 为疏水层析和离子交换层析后再经透析除盐浓缩获得的蛋白酶样品的 SDS-PAGE 电泳图 (Marker 上样量为 2.5 μ L, 蛋白酶样品上样量均为 5 μ L); SDS-PAGE 中的浓缩胶为 4% 的聚丙烯酰胺, 分离胶为 12% 的聚丙烯酰胺。

如图 7 所示, B 泳道的疏水层析后获得的粗蛋白在 97 kD 以上位置明显出现一条蛋白质条带, 在

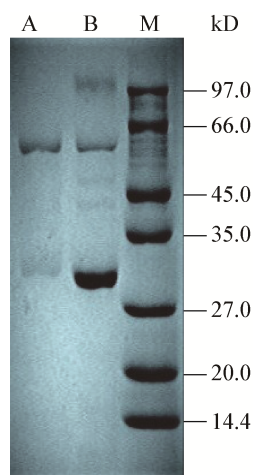


图 7 HIC 和 DEAE 层析获得蛋白酶 SDS-PAGE 电泳分析
Figure 7 SDS-PAGE of protease purified by HIC and DEAE

注: A: 经离子交换层析并浓缩所获得的蛋白酶样品; B: 经疏水作用层析所获得的蛋白酶样品; M: 蛋白质分子量标准

Note: A: The protease samples obtained by ion-exchange chromatography and concentration; B: Protease samples obtained by hydrophobic interaction chromatography; M: Protein molecular weight standard

27–35 kD 之间有一条较粗的明显的条带, 在 45 kD 上下分别有一条较为暗淡的条带, 上述这些蛋白条带都是杂蛋白; A 泳道的离子交换层析后所获得的蛋白酶纯品, 经过离子交换层析后, 在 66 kD 偏下不远处有一条十分清晰的条带, 为纯化的蛋白酶条带。为了测定该蛋白酶的分子量, 以蛋白分子标准中各标准蛋白的迁移率(距离)为横坐标, 以标准分子量大小(kD)的对数为纵坐标, 作图后为一直线。根据 A 泳道中处于 66 kD 偏下的条带, 通过标准曲线计算出该蛋白条带大小约为 62 kD, 说明该蛋白酶的分子量为 62 kD。

2.4.6 纯化蛋白酶的酶学性质

实验分别研究了温度和酸碱性和对 *F. oxysporum* M1 蛋白酶的影响。温度对蛋白酶酶的影响如图 8 所示, 包括蛋白酶的最适温度(图 8A)以及蛋白酶对温度的稳定性(图 8B)。各实验 3 次重复, 从图 8A 中可知, 纯化的蛋白酶其最适温度为 40 $^{\circ}$ C, 70 $^{\circ}$ C 时仍然具有 50% 左右的酶活。

图 8B 为酶的稳定性分析, 是在所设置的温度范围内反应 120 min 后测得的相对酶活力。从图 8B 可知, 在温度 ≤ 50 $^{\circ}$ C 的情况下酶均保持稳定; 温度 ≥ 50 $^{\circ}$ C 后酶稳定性逐渐降低, 但 80 $^{\circ}$ C 时酶仍然残留 35% 的活力, 说明该蛋白酶属耐热的蛋白酶。Iqbalsyah 等^[22]经层析纯化了泥土芽孢杆菌 (*Geobacillus* sp.) PLSA 的耐热蛋白酶, 纯化倍数达 118, 其最佳活性在 60 $^{\circ}$ C 时达到最大, 可用于

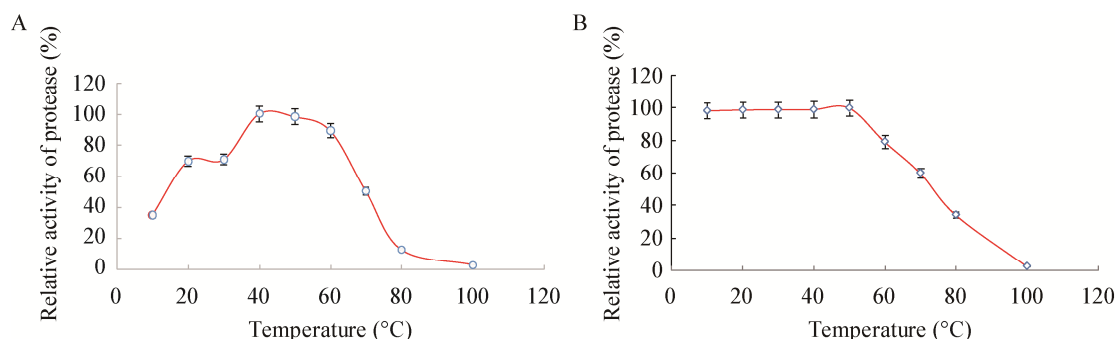


图 8 M1 菌株蛋白酶的最适温度(A)和温度稳定性(B)分析

Figure 8 The optimum temperature (A) and its stability (B) of protease purified from *Fusarium oxysporum* M1 strain

皮肤再生、皱纹抚平及高品质鹿皮生产行业。

F. oxysporum M1 蛋白酶也有很好的耐热性,这种耐热性在实际生产中具有开发潜力。Sun 等^[23]研究了戊糖片球菌产蛋白酶的纯化及生化特性,优化的发酵条件为:发酵时间 36 h,初始 pH 5.0,发酵温度 30 °C;采用硫酸铵沉淀法、离子交换层法和凝胶过滤法得到 29.6 kD 的胞外蛋白酶;在 pH 6.0 和 30 °C 下具有一定的 pH 稳定性和热稳定性;该蛋白酶受 EDTA 抑制。本实验发现, *F. oxysporum* M1 蛋白酶几乎不受 EDTA (1 mol/L)抑制,因此能更好地作为一种潜在的蛋白质催化剂用于工业生产。

图 9 为 *F. oxysporum* M1 蛋白酶最适 pH 以及该酶的 pH 稳定性研究结果,各实验 3 次重复。从图 9A 可以看出, *F. oxysporum* M1 蛋白酶最适 pH 为 7.0,属于中性蛋白酶。图 9B 为该酶 pH 稳定性测量结果,是反应 120 min 之后测得的相对酶活力,可以看出,该酶在 pH 6.0–8.0 范围内均有很好酶活力。相比之下, *F. oxysporum* M1 菌株蛋白酶更具有优势,温度和 pH 适应性更强。

3 讨论

通过 2 种层析纯化了 *F. oxysporum* M1 蛋白酶,方法简单快捷,纯度和得率均好。Chimbekujwo 等^[24]纯化了巴西曲霉 BCW2 蛋白酶,测得分子量为 68 kD,产率和纯化倍数为 28%和 13.3 倍。*F. oxysporum* M1 蛋白酶分子量略小,为 62 kD,其纯

化倍数是 BCW2 蛋白酶的 2 倍。Sun 等^[25]纯化了哈尔滨香肠中发酵乳酸杆菌 R6 蛋白酶,酶分子量为 37.7 kD。可见,不同微生物蛋白酶分子量相差较大,纯化倍数和得率各不相同。Ueda 等^[26]研究了镰刀菌(*Fusarium* sp.) BLB 纤溶蛋白酶,其分子量为 27 kD,在 pH 9.5 和 50 °C 下蛋白酶活性最高,在 pH 2.5–11.5 之间,50 °C 条件下纯化酶仍有活性,说明其蛋白酶具有较宽泛 pH 值适应性。由图 8B 稳定性分析可知,本文纯化的蛋白酶对酸比较敏感,pH 3.0–5.0 范围内,残留≤50%活性;但在 pH 6.0–8.0 范围内酶蛋白十分稳定;pH 9.0–11.0 范围内酶活性才缓慢下降,但在 pH 11.0 时酶仍然具有 50%以上的活力。说明该蛋白酶对酸较敏感,但对碱耐受力强。Barata 等^[27]研究了可水解对硝基苯胺的尖孢镰刀菌碱性丝氨酸蛋白酶,其分子量为 41 kD,在 45 °C 时具有最佳活性,然而到 48 °C 时活性迅速下降;最适 pH 值为 8.0 左右,EDTA 对该酶无抑制作用。本实验 *F. oxysporum* M1 蛋白酶也不受金属离子螯合剂 EDTA 的影响。

本研究纯化的蛋白酶最适 pH 为 7.0,最适温度为 40 °C;但 pH 9.0–11.0 范围内酶活性均能维持 80%以上,而在 40–60 °C 之间均保持≥90%酶活。Juntunen 等^[28]从木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)中克隆得到一种蛋白酶基因,并在里氏木霉中进行了表达,该蛋白酶最适温度为 60 °C,在 pH 6.0–10.0 范围内表现出较高活性,当 pH≥10.0 时活性急剧下

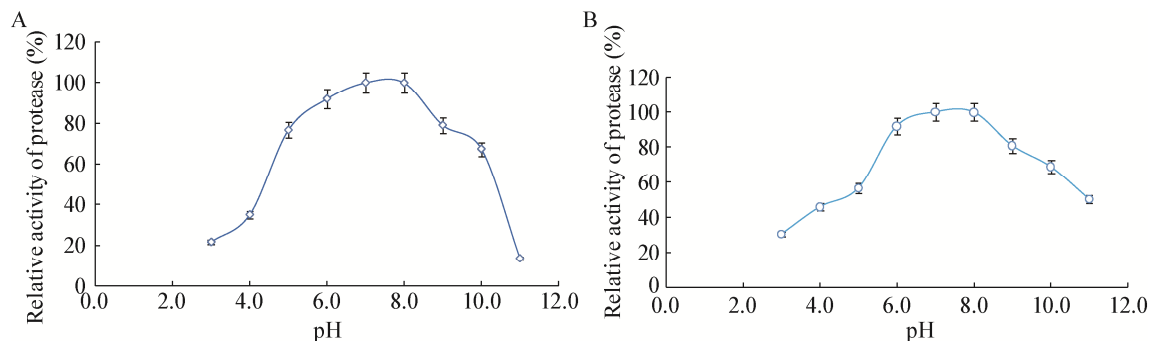


图 9 M1 菌株蛋白酶的最适 pH (A)和 pH 稳定性(B)分析

Figure 9 The optimum pH (A) and its stability to pH (B) of protease purified from *Fusarium oxysporum* M1

降。相比之下, *F. oxysporum* M1 蛋白酶碱耐受性更强, 二者热稳定性相当。木贼蛋白酶具有良好的去污性能, 并与几种商业洗衣粉配方相容性好, 具有广泛工业应用前景。显然, *F. oxysporum* M1 蛋白酶在同领域的应用也具有很大潜力。经过上述比较分析, *F. oxysporum* M1 蛋白酶具有比较明显优势, 该蛋白酶具有很好的应用潜力。

真菌与解淀粉芽孢杆菌“互作”中, 真菌蛋白酶可能起重要作用, 研究这种互作关系具有重要应用价值。Guleria 等^[29]从解淀粉芽孢杆菌 SP1 基因组中扩增出一条碱性蛋白酶基因, 其表达的蛋白酶参与了尖孢镰刀菌有效生物防治。SP1 蛋白酶纯化倍数达 5.62 倍, 比酶活为 607.69 U/mg, 对尖孢镰刀菌生长有抑制作用。一般认为“互作关系”是相互的, 在预实验中发现, *F. oxysporum* M1 菌株对解淀粉芽孢杆菌的抗性可能来自其产生的蛋白酶。因此, M1 菌株蛋白酶的纯化, 可为今后研究这种“互作”关系提供基础。目前对尖孢镰刀菌与解淀粉芽孢杆菌的互作机理不十分明确。Pekkarinen 等^[9]研究发现, 引起赤霉病的真菌很可能在入侵谷物时使用各种酶, 其中蛋白酶可能是水解谷物蛋白质的重要酶。对于本实验纯化的 *F. oxysporum* M1 蛋白酶, 继续研究其特殊性质可能为研究真菌侵染谷物机理提供参考数据, 也可为其将来进行生物防治、减少谷物损失提供科学依据。

4 结论

本文纯化了 *Fusarium oxysporum* M1 蛋白酶, 并研究了其蛋白酶的一些重要性质。该蛋白酶具有宽泛温度和 pH 耐受性。该蛋白酶纯化为其在生产上的应用创造了条件, 同时也为今后研究尖孢镰刀菌与解淀粉芽孢杆菌的“互作”机制提供了基础。

REFERENCES

[1] Booth C. The Genus *Fusarium*[M]. Chen QY, Trans.

Beijing: Agricultural Press, 1988

布斯 C. 镰刀菌属[M]. 陈其焜, 译. 北京: 农业出版社, 1988

- [2] Olajuyigbe FM, Nlekerem CM, Ogunyewo OA. Production and characterization of highly thermostable β -glucosidase during the biodegradation of methyl cellulose by *Fusarium oxysporum*[J]. Biochemistry Research International, 2016, 2016: 3978124
- [3] Shang TT, Li QH, Deng SG. Screening and isolation of highly efficient cellulose-degrading microorganisms and construction of complex microbial system[J]. Agricultural Science & Technology, 2015, 16(4): 639-644,652
- [4] Chang XY, Xie ZL, Zhang FM, Lei JQ, Cui RW, Nie SY. Purification and characterization of endoglucanase Egn21 from *Fusarium* sp. Q7-31T[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(1): 33-42 (in Chinese)
常鑫园, 谢占玲, 张凤梅, 雷洁琼, 崔荣伟, 聂守一. 镰刀菌 Q7-31T 内切葡聚糖酶 Egn21 的分离纯化及酶学性质[J]. 微生物学报, 2017, 57(1): 33-42
- [5] Li WQ, Wu FF, Li HQ, Zhao LZ, Bu YF, Xu W, Peng LH, Yin JH. Effect of metal ions on pectic enzyme activity in *Fusarium oxysporum* fermentation[J]. Journal of Shaoyang University: Natural Science Edition, 2015, 12(4): 50-56 (in Chinese)
李文强, 吴菲菲, 李化强, 赵良忠, 卜宇芳, 徐纬, 彭玲慧, 尹锦辉. 金属离子对尖孢镰刀菌发酵液中果胶酶活性的影响[J]. 邵阳学院学报: 自然科学版, 2015, 12(4): 50-56
- [6] Zhao LZ, Xie ZL, Zhao P. Purification, identification and enzymatic characteristics of a new xylanase Xyn9 from *Fusarium* sp. Q7-31[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2015, 43(5): 42-45 (in Chinese)
赵联正, 谢占玲, 赵朋. 一种新的镰刀菌 Q7-31 木聚糖酶 Xyn9 的分离纯化鉴定及酶学特性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(5): 42-45
- [7] Gómez S, Payne AM, Savko M, Fox GC, Shepard WE, Fernandez FJ, Vega MC. Structural and functional characterization of a highly stable endo- β -1,4-xylanase from *Fusarium oxysporum* and its development as an efficient immobilized biocatalyst[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1): 191
- [8] Wen YP, Ma HX, Lu WZ, Yuan S. Fermentation conditions for alkaline-protease production of *Fusarium graminearum* causing *Fusarium* head blight in wheat[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2006, 22(2): 117-121 (in Chinese)
温云平, 马鸿翔, 陆维忠, 袁生. 小麦赤霉病禾谷镰刀

- 菌(*Fusarium graminearum*)产碱性蛋白酶的发酵条件[J]. 江苏农业学报, 2006, 22(2): 117-121
- [9] Pekkarinen AI, Jones BL, Niku-Paavola ML. Purification and properties of an alkaline proteinase of *Fusarium culmorum*[J]. FEBS Journal, 2002, 269(3): 798-807
- [10] Pekkarinen AI, Jones BL. Trypsin-like proteinase produced by *Fusarium culmorum* grown on grain proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(13): 3849-3855
- [11] Kołaczowska MK, Wieczorek M, Polanowski A. An aspartic proteinase from *Fusarium moniliforme*. Purification and general properties[J]. European Journal of Biochemistry, 1983, 132(3): 557-561
- [12] Qin RT, Lu YL, Liang GL, Xie ZL, Lei YN. Isolation, purification and identification of metalloprotease FQME14 from *Fusarium* sp. Q7-31T[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(4): 161-167 (in Chinese)
秦日甜, 卢玉丽, 梁高丽, 谢占玲, 雷亚男. 镰刀菌 Q7-31T 金属蛋白酶 FQME14 的分离纯化及鉴定[J]. 生物技术通报, 2018, 34(4): 161-167
- [13] Wang SW, Wang QH, Li XP, Zhang QF, Ma ZK, Tang HP. Progress in molecular identification in the genus *Fusarium* and its important applications[J]. Microbiology China, 2018, 45(4): 907-919 (in Chinese)
王世伟, 王卿惠, 李小鹏, 张其法, 马兆魁, 唐海平. 镰刀菌分子鉴定与重要应用的研究进展[J]. 微生物学通报, 2018, 45(4): 907-919
- [14] Wang SW, Wang QH, Ma ZK, Li XP, Zhang QF, Tang HP. rDNA ITS identification, its cellulase activity and purification of *Fusarium oxysporum* strain M1[J]. Journal of Microbiology, 2018, 38(2): 55-62 (in Chinese)
王世伟, 王卿惠, 马兆魁, 李小鹏, 张其法, 唐海平. *Fusarium oxysporum* M1 菌株的 rDNA ITS 鉴定及其纤维素酶活性及纯化研究[J]. 微生物学杂志, 2018, 38(2): 55-62
- [15] Shen P, Chen XD. Guidance of Microbiology Experiment[M]. 5th ed. Beijing: Higher Education Press, 2018 (in Chinese)
沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 5版. 北京: 高等教育出版社, 2018
- [16] Lakshmi BKM, Mani Kumar D, Hemalatha KPJ. Purification and characterization of alkaline protease with novel properties from *Bacillus cereus* strain S8[J]. Journal, Genetic Engineering & Biotechnology, 2018, 16(2): 295-304
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [18] Niu QX, Shen JK. Micro-volume Coomassie assay for determination of protein[J]. Chinese Journal of Medical Laboratory, 2001, 2(5): 345-347 (in Chinese)
牛青霞, 申济奎. 微量考马斯亮蓝法测定蛋白质含量[J]. 中国医学检验杂志, 2001, 2(5): 345-347
- [19] Wang SW, Wang M, Wang QH. Purification, crystallization and characterization of a nitrile hydratase from *Rhodococcus ruber* CGMCC3090 strain[J]. China Biotechnology, 2017, 37(10): 42-52 (in Chinese)
王世伟, 王敏, 王卿惠. *Rhodococcus ruber* CGMCC3090 腈水合酶纯化、酶学性质及结晶研究[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(10): 42-52
- [20] Yang TB. Condition exploration and application effect of screening method for casein transparent circle hydrolyzed by protease[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 1982(2): 16-20 (in Chinese)
杨天波. 蛋白酶水解酪蛋白透明圈初筛方法的条件探索与应用效应[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 1982(2): 16-20
- [21] Zhou XY, Mima PC, Ma XY, Ma ZR, Ding GT. Isolation and determination of protease activity of a haemoglobin-degrading bacteria[J]. Journal of Microbiology, 2020, 40(2): 66-71 (in Chinese)
周雪雁, 米玛普尺, 马咸莹, 马忠仁, 丁功涛. 1 株血红蛋白分解菌的分离鉴定及其蛋白酶活力测定[J]. 微生物学杂志, 2020, 40(2): 66-71
- [22] Iqbalsyah TM, Malahayati, Atikah, Febriani. Purification and partial characterization of a thermo-halostable protease produced by *Geobacillus* sp. strain PLS A isolated from undersea fumaroles[J]. Journal of Taibah University for Science, 2019, 13(1): 850-857
- [23] Sun FD, Hu YY, Chen Q, Kong BH, Liu Q. Purification and biochemical characteristics of the extracellular protease from *Pediococcus pentosaceus* isolated from Harbin dry sausages[J]. Meat Science, 2019, 156: 156-165
- [24] Chimbekujwo KI, Ja'afaru MI, Adeyemo OM. Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2[J]. Scientific African, 2020, 8: e00398
- [25] Sun FD, Hu YY, Yin XY, Kong BH, Qin LG. Production, purification and biochemical characterization of the microbial protease produced by *Lactobacillus fermentum* R6 isolated from Harbin dry sausages[J]. Process

- Biochemistry, 2020, 89: 37-45
- [26] Ueda M, Kubo T, Miyatake K, Nakamura T. Purification and characterization of fibrinolytic alkaline protease from *Fusarium* sp. BLB[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(2): 331-338
- [27] Barata RA, Andrade MHG, Rodrigues RD, Castro IM. Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Fusarium oxysporum* var. *lini*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 94(4): 304-308
- [28] Juntunen K, Mäkinen S, Isoniemi S, Valtakari L, Pelzer A, Jänis J, Paloheimo M. A new subtilase-like protease deriving from *Fusarium equiseti* with high potential for industrial applications[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 177(2): 407-430
- [29] Guleria S, Walia A, Chauhan A, Shirkot CK. Molecular characterization of alkaline protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 involved in biocontrol of *Fusarium oxysporum*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 232: 134-143