

烷烃溶剂对耐有机溶剂极端微生物地衣芽孢杆菌 YP1 产胞外蛋白酶的影响

李 霜 唐啸宇 潘 瑶 何冰芳*

(南京工业大学制药与生命科学学院 南京 210009)

摘 要: 考察了添加 5% (V/V) 浓度的正庚烷、正辛烷、正癸烷、十二烷、十四烷、十六烷等烷烃溶剂对耐有机溶剂极端微生物地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)YP1 的生长及产胞外蛋白酶的影响。结果表明 5% (V/V) 浓度的各种烷烃溶剂对 YP1 蛋白酶的稳定性及菌体生物量均无显著影响, 正庚烷、正辛烷、正癸烷等溶剂显著抑制 YP1 产蛋白酶, 而十二烷、十四烷、十六烷能提高 YP1 产蛋白酶 1 倍以上。发酵液中十四烷的浓度(1% - 8%, V/V)与蛋白酶的活力呈正相关性, 添加十四烷后发酵过程中蛋白酶活力的显著增加出现在菌体生长的对数后期。培养过程中添加十四烷能导致 YP1 菌体形态显著变小。首次报道了烷烃溶剂对极端微生物产蛋白酶的影响。

关键词: 极端微生物, 有机溶剂耐受菌, 烷烃, 蛋白酶

Effect of Alkanes on the Production of a Solvent-stable Extracellular Protease by the Organic Solvent Tolerant Bacterium *Bacillus licheniformis* YP1

LI Shuang TANG Xiao-Yu PAN Yao HE Bing-Fang*

(College of Pharmacy and Life Science, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009)

Abstract: In this paper, the effect of 5% (V/V) n-alkanes (e.g, n-Heptane, n-Octane, n-Decane, n-Dodecane, n-Tetradecane and n-Hexadecane) on the growth and protease production of organic-solvent-tolerant- bacterium *Bacillus licheniformis* YP1 was studied. 5%(V/V) n-alkanes had no effect on the stability of YP1 protease. 5% (V/V) n-alkanes had no notable influence on the yield of strain YP1 but dramatically affected the protease production. The presence of n-Heptane, n-Octane and n-Decane deeply repressed the protease production; however n-Dodecane, n-Tetradecane and n-Hexadecane enhanced the protease production prominently. The concentration of n-Tetradecane (1%-8%, V/V) had a direct ration with the protease production. The detailed experiments showed that the notable increase of protease activity appeared at the late logarithm of cultivation compared with the blank. The cell shape of YP1 strain remarkably decreased when grown in the presence of n-Tetradecane. This is the first report about the effect of n-alkanes on the protease production by the solvent tolerant bacterium.

Keywords: Extremophiles, Organic solvent tolerant bacteria, Alkane, Solvent-stable protease

有机溶媒耐受菌(organic solvent tolerant bacteria, OSTB)是一种相对较新颖的极端微生物,当前对耐有机溶媒微生物的应用研究体现在生物催化、环境生物修复及污水处理等领域,随着工业生物催化技术的发展和推广应用,耐有机溶媒极端微生物将显示其巨大的应用潜力^[1]。对有机溶媒耐性菌所产生的极端酶系的研究开发是充分发掘该类极端微生物资源的重要方向。筛选该类极端微生物产生的典型胞外酶系如蛋白酶、脂肪酶等的研究逐渐成为研究热点^[2,3]。

筛选极端微生物产耐有机溶剂蛋白酶的研究报道较多^[4,5],但是溶剂等极端环境对微生物产蛋白酶能力的影响鲜有报道。在环境中,微生物所接触的各种亲脂性溶剂如烷烃、烷醇、芳香烃等会优先积累于细胞膜上而产生细胞毒性。而耐有机溶剂极端微生物可通过改变膜上的磷脂成分及膜蛋白、固醇等含量来适应溶剂的毒性^[6]。细胞膜的结构或构象的改变将导致膜的理化性质及通透性的变化,从而影响细胞对胞外产物的分泌。

耐有机溶媒极端微生物 *Bacillus licheniformis* YP1 所分泌的蛋白酶具有广泛的有机溶剂耐受性及其它特质,可应用于有机相的酶促肽合成反应^[7]。本文考察了烷烃类溶剂对该菌株生长及产胞外蛋白酶的影响,丰富了耐有机溶媒极端微生物的生物学研究。

1 材料与方法

1.1 实验菌株及试剂

耐有机溶媒极端微生物 *Bacillus licheniformis* YP1, 本室分离保藏;酪蛋白(Casein Acid Hydrolysate)购自 Sigma 公司;胰蛋白酶(Trypsin 1:250)购自南京生兴生物技术公司;各种有机溶剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 培养基及培养方法: 1) MLB培养基^[2]: 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 5 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, pH7.2。

2) 产酶发酵培养基: 可溶性淀粉 10 g/L, 玉米浆 10mL/L, 脱酚棉籽蛋白 5 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, pH 7.5。以MLB培养基为种子培养基,过夜培养种子液,接种量为 2%, 每 250 mL三角瓶

装液量为 30 mL, 以橡胶塞封口, 于 37 ℃, 180 r/min 培养 36 h。

1.2.2 微生物生长的测定: 取发酵液 1 mL, 10000 r/min离心 1 min后, 弃上清, 用 1 mL无菌水均匀悬浮菌泥, 稀释, 测样品的OD₆₆₀。

1.2.3 蛋白酶活力测定: 参照文献[4]略改动, 将发酵液于 4 ℃, 10000 r/min离心 5 min, 取上清为粗酶液, 以 1%(W/V)酪蛋白(0.1 M Tris-HCl 缓冲液, pH9.0)为底物, 取粗酶液 1mL加入到 2mL底物中, 置于 40 ℃水浴中反应 10 min后, 加入 3mL 10%(W/V)三氯乙酸终止反应, 室温下静置 15 min, 10000 r/min离心 3 min, 取上清 1 mL加入 5 mL 0.55 mol/L碳酸钠溶液、1mL Folin-酚试剂(北京鼎国生物技术公司), 充分混匀后, 置 40 ℃水浴显色 15 min, 取出冷却到室温, 以先加入三氯乙酸终止反应的样品为空白对照, 测样品的吸光值OD₆₅₀。每 1 单位(U)蛋白酶活定义为在相应条件下, 每mL发酵液每min催化产生 1 μg酪氨酸(μg/mL·min)。

1.2.4 溶剂对 YP1 蛋白酶稳定性的影响: 取不添加溶剂的对照组发酵液上清 2 mL, 添加 5%(V/V)的庚烷、辛烷、癸烷、十二烷、十四烷、十六烷, 密封, 于 37 ℃, 180 r/min 振荡处理 36 h, 4 ℃下 10000 r/min离心 10 min后, 取水相, 按 1.2.3 方法检测蛋白酶活力, 以不添加溶剂处理的为对照, 每实验重复 3 次。

1.2.5 溶剂对 YP1 产蛋白酶的影响: 在 YP1 产酶发酵过程中添加 5%(V/V)的各种烷烃溶剂, 考察其对 YP1 的生长及产胞外蛋白酶的影响, 每实验重复 3 次, 以不添加溶剂的产酶发酵为对照。

1.2.6 菌体的电镜观察: 分别接种 YP1 菌株于 MLB 和添加 5%(V/V)十四烷 MLB 培养基中, 37 ℃培养 12 h, 10000 r/min离心 1 min, 收集菌体, 将菌体用无菌水悬浮, 浓度大于 10⁸/mL, 用铜网蘸取少许菌液, 1% PTA(磷钨酸)对菌体进行负染色, 自然风干后, 用HITACHI H-7650 透射电镜观察菌体形态。

2 结果

2.1 烷烃溶剂对 YP1 蛋白酶稳定性的影响

YP1 蛋白酶经各种烷烃溶剂振荡处理 36 h 后, 蛋白酶相对残余活力如图 1 所示, 5%(V/V)浓度的各种烷烃溶剂对 YP1 蛋白酶粗酶液稳定性无显著影响。

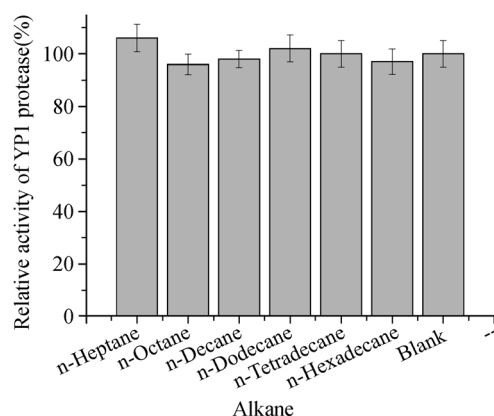


图1 烷烃溶剂对 YP1 蛋白酶活力的影响

Fig. 1 Effect of alkanes on the activity of YP1 protease

2.2 烷烃溶剂对 YP1 菌株生长及产酶的影响

实验中所用溶剂的 $\log P_{O/W}$ 值及其对菌株YP1的生长及产胞外蛋白酶的影响如表1所示。由于2.1实验中各种5%(V/V)烷烃溶剂对YP1蛋白酶的稳定性无显著影响,因此发酵过程中所检测到的酶活变化均可以理解为菌体分泌的蛋白酶量的变化。6种烷烃对YP1菌株的生物量无显著影响,YP1在不含烷烃的对照组中蛋白酶活力为326 U,庚烷、辛烷、癸烷显著抑制了菌株的产酶,十二烷、十四烷、十六烷却能显著促进YP1的产酶,发酵液上清中蛋白酶活力高达700 U以上。YP1菌株为好气性芽孢杆菌,在溶氧良好的情况下,发酵液中酶活可达527 U。在橡胶塞封口的密封容器中培养的YP1菌株的生物量及酶活均有显著的下降,但长链烷烃如十二烷、十四烷、十六烷等仍然极大地促进了产酶。

表1 烷烃溶剂对 YP1 菌株生长及产酶的影响
Table 1 Effects of n-alkanes on the growth and protease production of strain YP1

Organic solvents	$\log P_{O/W}$	Cell Growth (OD_{660})	Protease Activity ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{min}$)
n-Heptane	4.0	4.96	280
n-Octane	4.5	4.81	302
n-Decane	5.6	4.90	228
n-Dodecane	6.6	4.92	717
n-Tetradecane	7.6	5.16	746
n-Hexadecane	8.8	5.22	732
Blank	—	5.21	326

2.3 不同浓度十四烷对 YP1 生长及产酶的影响

在YP1产酶发酵过程中分别添加1%–15%(V/V)的十四烷,结果如图2所示,添加浓度为1%–10%(V/V)的十四烷对菌体生长无显著影响,菌体生物量均能达到对照组的90%以上,发酵液中蛋白酶活力与十四烷的浓度呈正相关性,其中,8%(V/V)和10%(V/V)的十四烷对YP1产酶影响差异

不显著,发酵液上清中蛋白酶活力高达750 U左右,是对照组活力的2.3倍;12%(V/V)和15%(V/V)的十四烷对YP1的生长具有一定的抑制作用,菌体生物量为对照组的82%和70%,但发酵液中蛋白酶活力仍达700 U以上。进一步的研究表明,YP1蛋白酶经12%和15%的十四烷处理36 h后,残余活力分别为对照的108%和124%。

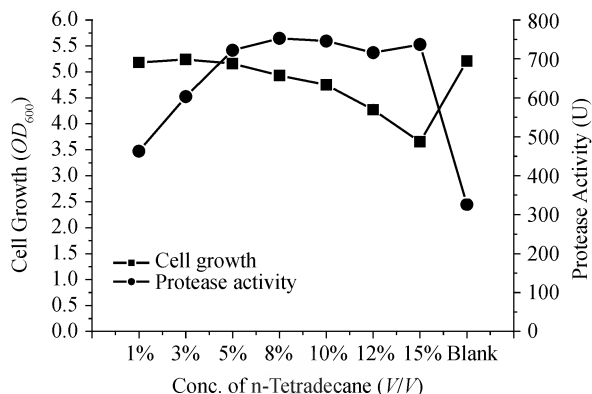


图2 发酵液中十四烷的浓度对 YP1 生长及产蛋白酶的影响

Fig. 2 Effects of concentration of n-Tetradecene on the cell growth and protease production of strain YP1

2.4 十四烷对 YP1 发酵过程的影响

在YP1产酶发酵过程中添加5%(V/V)的十四烷,每4 h取样测菌体生长及胞外蛋白酶活力,考察发酵过程不同时间段菌体生长及产酶的状况,结果如图3所示。添加十四烷后,YP1菌体的生长速率及生物量均无显著变化;相对于对照,发酵液中蛋白酶活力在细胞生长的对数后期(24 h–36 h)显著上升。

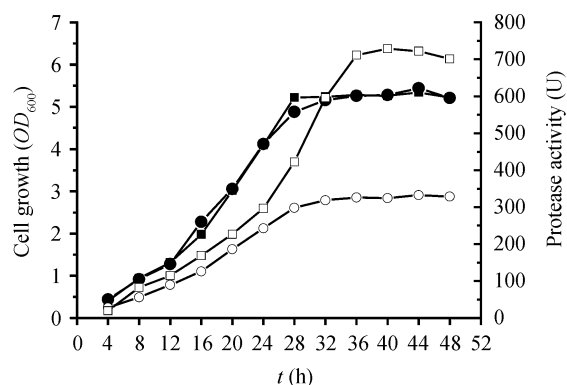


图3 十四烷对 YP1 发酵过程中菌体生长及产蛋白酶的影响(■: 添加十四烷后的生长; □: 添加十四烷后的酶活; ●: 对照组的生长; ○: 对照组的酶活)

Fig. 3 Effects of n-Tetradecane on growth and protease production of strain YP1 (cell growth in the presence (■) and absence (●) of n-Tetradecane; protease production in the presence (□) and absence (○) of n-Tetradecane)

2.5 十四烷对 YP1 菌体形态的影响

YP1 菌株在 MLB 培养基中的菌体形态为杆状具周生鞭毛(图 4A), 细胞大小为 $0.5\ \mu\text{m} \times 2\text{--}3\ \mu\text{m}$; 添加 5% (V/V) 十四烷的培养基中 YP1 菌体显著变小(图 4B), 细胞大小为 $0.3\text{--}0.4\ \mu\text{m} \times 1\text{--}1.5\ \mu\text{m}$; 因此 YP1 在含十四烷的培养基中生长时细胞的比表面积变大。

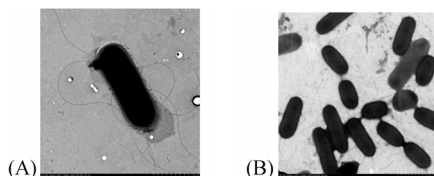


图 4 YP1 菌体的透射电镜照片 (A: 对照; B: 5% (V/V) 十四烷)

Fig. 4 Transmission electron micrograph of strain YP1 cell (in the presence (B) and absence (A) of 5% (V/V) n-Tetradecane)

3 讨论

各种有机溶剂由于在微生物细胞膜上的积累和分布而产生细胞毒性。微生物在溶剂存在的环境中, 可以通过溶剂泵出系统、改变细胞形态等方式来适应溶剂的毒性, 如 Neumann 等报道了耐有机溶剂极端微生物 *Pseudomonas putida* 通过增大细胞的体积, 减小细胞比表面积的途径来适应丁醇、苯酚等溶剂的毒性^[8]。log $P_{O/W}$ 值较大的亲脂性溶剂通常表现出对细胞膜的高度亲和性, 因此相对亲水性溶剂具有更大的细胞毒性^[6]。但对于 log $P_{O/W}$ 大于 4-5 的溶剂来说, 由于该类溶剂在水中的低溶解度阻止了其在细胞膜上的大量积累, 往往对细胞不表现出毒性, 并被广泛应用于双向生物催化或转化体系的萃取相溶剂^[9,10]。5% (V/V) 的各种烷烃溶剂由于其较高的 log P 值而对极端微生物 YP1 的生长未表现出显著的抑制作用。

细胞膜的磷脂双分子层结构的相变温度可用 T_M 表示。Lohner 的研究表明, 长链的烷烃 ($C \geq 12$) 增加各种磷脂的 T_M 值, 短链的烷烃 ($C < 12$) 降低 T_M 值; 长链烷烃在磷脂脂肪链上的平行嵌入导致细胞膜的脆性增加, 短链烷烃由于其削弱磷脂脂肪链范德华力而降低膜脂肪的有序性^[11]。长链的烷烃 ($C \geq 12$) 对 YP1 菌株表现为促进蛋白酶分泌, 而短链的烷烃 ($C < 12$) 表现为抑制 YP1 蛋白酶的分泌, 可能与不同链长烷烃对细胞膜的影响差异有关。

溶剂对耐有机溶剂蛋白酶稳定性的影响与蛋白酶的结构特征有一定关系^[12]。Rahman 等报道了 *Bacillus pumilus* 115b 产生的耐有机溶剂蛋白酶经 25% (V/V) 十二烷和十四烷处理后, 酶活为对照的 1.7 和 2.5 倍^[13]。前期的研究表明, YP1 蛋白酶经

50% (V/V) 的十二烷醇处理后能显著促进蛋白酶活力达 121%^[7]。本研究中, 当十四烷的浓度高于 10% (V/V) 后, 能显著增加 YP1 蛋白酶的活力。

本文通过对溶剂对极端微生物 YP1 生长及产蛋白酶的影响研究, 获得了大幅提高耐有机溶剂极端微生物 *Bacillus licheniformis* YP1 产胞外蛋白酶的培养策略, 相关工作将对极端微生物 YP1 的生物学特性及其所产耐有机溶剂蛋白酶的结构表征等研究奠定良好的基础。

参考文献

- [1] Sardesai Y, Bhosle S. Tolerance of bacteria to organic solvents. *Res Microbiol*, 2002, **153**: 263–268.
- [2] Ogino H, Miyamoto K, Ishikawa H. Organic solvent-tolerant bacterium which secretes an organic solvent-stable proteolytic enzyme. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 4258–4262.
- [3] Fang YW, Lu ZX, Lv FX, et al. A Newly Isolated Organic Solvent Tolerant *Staphylococcus saprophyticus* M36 Produced Organic Solvent-Stable Lipase *Curr Microbio*, 2006, **53**: 510–515.
- [4] Geok LP, Razak CN, Rahman RN, et al. Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer. *Biochem Eng J*, 2003, **13**: 73–77.
- [5] Gupta A, Roy I, Khare SK, et al. Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *J Chromatogr A*, 2005, **1069**: 155–161.
- [6] Weber FJ, Bont Jan AM. Adaptation mechanism of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1286**: 225–245.
- [7] 李 霜, 徐 娟, 羊亚平, 等. 溶剂稳定性蛋白酶产生菌的筛选和鉴定. *微生物学报*, 2007, **47**(6): 1032–1037.
- [8] Neumann G, Veeranagouda T, Karegouda B, et al. Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter* sp. adapt to toxic organic compounds by increasing their size. *Extremophiles*, 2005, **9**: 163–168.
- [9] Inoue A, Horikoshi K. Estimation of solvent-tolerance of bacteria by the solvent parameter log P . *J Ferm Bioeng*, 1991, **71**: 194–196.
- [10] Neumann G, Cornelissen S, Breukelen F, et al. Energetic and surface properties of *Pseudomonas putida* DOT-T1E in a two-phase fermentation system with 1-Decanol as second phase. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(6): 4232–4238.
- [11] Lohner K. Effects of small organic molecules on phospholipid phase transitions. *Chem Phys Lipids*, 1991, **57**: 341–362.
- [12] Ogino H, Uchiho T, Doukyu N, et al. Effect of exchange of amino acid residues of the surface region of the PST-01 protease on its organic solvent-stability. *Biochim Biophys Res Commun*, 2007, **358**: 1028–1033.
- [13] Rahman R, Mahamad S, Salleh A, et al. A new organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007, **34**: 509–517.