

嗜盐古生菌 *Halogramum rubrum* RO2-11 胞外蛋白酶酶学特性研究

高瑞昌, 刘向东, 陆文婷, 崔恒林, 袁丽
(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212031)

摘要: 对嗜盐古菌 *Halogramum rubrum* RO2-11 所产胞外蛋白酶的特性进行初步研究, 脱脂奶粉平板法验证其是否可以产生胞外蛋白酶, 福林酚法测定胞外蛋白酶酶活。试验结果表明, 嗜盐古菌 *Halogramum rubrum* RO2-11 可以产生胞外蛋白酶, 此蛋白酶对高浓度的 NaCl 有一定的耐受性; 酶促反应的最佳温度为 50 °C, 在温度超过 60 °C 后, 对温度的耐受性下降; 最佳 pH 为 8.0, 在 pH 8.0~11.0 之间有较高的活性并保持相对稳定, 表明该酶是一种碱性蛋白酶; 金属离子 Ca^{2+} 对该蛋白酶有激活作用, Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 对该蛋白酶有抑制作用; 金属螯合剂 EDTA 对蛋白酶有强烈的抑制作用, 有机溶剂异丙醇、巯基反应物 DTNB 和丝氨酸抑制剂 PMSF 对酶活力的影响很小, 表明该蛋白酶是一类不含巯基的金属蛋白酶, 并且能够耐受一定浓度的有机溶剂。

关键词: 嗜盐古菌; 蛋白酶; 酶学特性

文章编号: 1673-9078(2015)2-32-36

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.006

Properties of Extracellular Protease Produced by *Halogramum rubrum* RO2-11

GAO Rui-chang, LIU Xiang-dong, LU Wen-ting, CUI Heng-lin, YUAN Li

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212031, China)

Abstract: In this study, the characteristics of an extracellular protease produced by *Halogramum rubrum* RO2-11 were studied. Skimmed milk powder medium was used to confirm extracellular protease production, while enzyme activity was determined by Folin-Phenol method. The results showed that *Halogramum rubrum* RO2-11 produced an extracellular protease with a certain tolerance to high concentration of NaCl. The optimum temperature for enzymatic reaction was 50 °C. The temperature tolerance of the enzyme decreased at temperatures exceeding 60 °C. The optimum pH for enzymatic reaction was 8.0. The enzyme showed high activity and stability between pH values of 8.0 and 11.0, demonstrating that the enzyme was an alkaline protease. The enzyme was activated by Ca^{2+} but was inhibited by Mn^{2+} and Cu^{2+} . EDTA had a strong inhibitive effect on the protease. However, isopropanol, DTNB (a mercapto reactant) and PMSF (a serine inhibitor) had little influence on the activity of the enzyme, which showed that the enzyme might be a metalloprotease without a mercapto group and tolerant towards organic solvent to a certain extent.

Key words: halophilic archaea; protease; enzyme characteristic

蛋白酶是水解蛋白质肽键的一类酶的总称, 在生命过程中起着重要的作用^[1], 同时也广泛应用于皮革、毛皮、丝绸、医药、食品、酿造等工业领域^[2]。蛋白酶存在于动物内脏, 植物茎叶, 果实和微生物^[3~5]中, 考虑到动植物来源的蛋白酶受到各种因素的影响, 包括植物生长季节, 动物宰杀成本, 提取过程费时费力等因素, 人们越来越多的把目光投到微生物蛋白酶上,

收稿日期: 2014-07-03

基金项目: 国家自然科学基金 (31340065); 江苏大学“青年骨干教师培养工程”; 江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介: 高瑞昌, 男, 博士, 副教授, 主要从事水产品化学与综合利用

通讯作者: 袁丽, 女, 硕士, 副教授, 主要从事食品新技术研究

微生物蛋白酶的主要提取来源是霉菌和细菌, 其次放线菌和酵母菌也可做蛋白酶生产的来源。

嗜盐古菌是生活在高盐度环境中的一类古生细菌, 其最显著的特点是一般需要 1.5 M 以上的盐浓度才能生长, 主要分布于盐湖、盐田等天然或人工高盐环境。嗜盐古菌这种特殊的生长环境使其所产生的蛋白酶大多数具有嗜盐、耐盐的特性, 在高盐发酵食品工业中可能有着非常大的应用潜力, 并且逐渐成为近年来国内外学者的研究热点。Akolkar 等人对一株嗜盐菌 *Halobacterium sp.* SP1 (1) 所产的胞外蛋白酶进行了研究并以此为基础改良了传统鱼露发酵方法, 使鱼露发酵的时间大大缩短^[6~7]; Namwong 等人从鱼露

中分离出一株嗜盐菌 *Halobacillus sp.* SR5-3 并对其所产的蛋白酶进行了性质研究, 表明其所产的蛋白酶具有嗜盐的特性^[5]; 目前, 有报道认为 *Haloferax*、*Natrococcus* 和 *Natrialba* 等属的几株极端嗜盐古生菌也可以产生胞外蛋白酶^[8]。我国存在着丰富的盐湖、盐田、盐井等高盐资源, 这其中蕴藏着丰富的嗜盐物种。近几年来, 国内的学者对嗜盐古菌所产蛋白酶资源的研究取得了丰硕的成果, 武汉大学石万良等从嗜盐古生菌 (*Natrinema sp.*) R625 中分离纯化出一种胞外蛋白酶, 并对其性质进行了研究^[9]; 牟云壮运用六株产蛋白酶嗜盐古生菌发酵鱼露, 进一步缩短了鱼露发酵时间^[10]。然而相对于丰富的嗜盐古生菌资源, 对其所产蛋白酶的研究仍然还有很大的拓展空间。我们从江苏如东盐田分离鉴定出一株嗜盐古生菌 *Halogramum rubrum* RO2-11, 验证其可以产生胞外蛋白酶并对其酶学特性进行了初步研究, 为进一步对其分离纯化并可能提供一种新型工业用耐盐蛋白酶提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

嗜盐古生菌 *Halogramum rubrum* RO2-11 分离自江苏如东盐田、PHS-3C 型 pH 计 (LIDA)、LRH 系列生化培养箱, 上海一恒科技有限公司; SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台, 苏州净化设备有限公司; 电子天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; 722N 可见分光光度计, 上海精科。

1.2 嗜盐古生菌 *Halogramum rubrum* RO2-11

产蛋白酶验证试验^[10]

配制含 0.5% (*mV*) 脱脂奶粉的平板, 接种培养形成明显的菌落后, 观察透明圈。阳性-菌落周围有透明圈; 阴性-菌落周围无透明圈。

1.3 粗酶液的制备

取活化后的 *Halogramum rubrum* RO2-11 按 0.6% 的比例接种于液体培养基中扩大培养, 37 °C, 120 r/min 培养 5 d 后, 取新鲜发酵液, 9000 r/min 离心 15 min, 除去菌体得到粗酶液。

1.4 蛋白酶活性的测定^[11]

参照福林酚法, 以 2% 的酪蛋白为底物, 取 3 支试管并编号, 分别加入 1 mL 粗酶液, 置于 40 °C 的水

浴锅中预热 5 min, 后各加入 1 mL 已在 40 °C 水浴锅中预热的 2% 的酪蛋白, 反应 20 min 后, 在各个试管中加入 2 mL 0.4 M 的三氯乙酸终止反应并过滤。取 1 mL 滤液加入到含有 5 mL 0.4 M 的 Na₂CO₃ 溶液的试管中, 各加入 1 mL 的福林酚试剂, 置于 40 °C 的水浴锅中显色 20 min。同时做空白试验, 即加入酶液后, 先加入 2 mL 0.4 M 的三氯乙酸, 再加入 1 mL 2% 的酪蛋白溶液, 显色结束后在 680 nm 的波长下测定吸光值。酶活力单位定义为 1 mL 酶液在 50 °C 和 pH 8.0 的条件下, 每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸为一个酶活力单位, 以 U 表示。

1.5 酶学性质研究

1.5.1 热稳定性

取经缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 适当稀释的酶液分别置于 30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C 的温度下, 保温 20 min、30 min、40 min、50 min、60 min, 再取 1 mL 测定酶活。

1.5.2 最适反应温度

将经适当稀释的酶液分别于 35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C 的温度下与底物反应, 测定不同反应温度下蛋白酶活力的变化。

1.5.3 酸碱稳定性

将酶反应液的 pH 分别调整为 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 (pH 6.0 用 50 mmol/L 的乳酸盐缓冲液, pH 7.0~9.0 用 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, pH 10.0~11.0 用 50 mmol/L 的硼酸盐缓冲液), 在各个 pH 环境中放置 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min, 根据所得的最适温度测定酶活性。

1.5.4 最适反应 pH

将酶反应液的 pH 分别调整为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 在最适反应温度下分别与对应 pH 的底物反应, 测定不同 pH 条件下酶活力的变化。

1.5.5 NaCl 浓度对酶活力的影响

将酶液用含有不同浓度 NaCl 的缓冲液稀释, 使反应体系中 NaCl 的终浓度分别为 0.5 mol/L、1.0 mol/L、1.5 mol/L、2.0 mol/L、2.5 mol/L、3.0 mol/L, 在最适反应温度和最适反应 pH 的条件下测定不同浓度的 NaCl 对酶活力的影响。

1.5.6 金属离子对酶活力的影响

分别加入不同浓度梯度的 K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺, 在最适反应温度和最适反应 pH 的条件下测定金属离子对酶活性的影响。

1.5.7 添加剂对酶活力的影响

分别加入 PMSF, EDTA, isopropanol, DTNB,

使其在反应体系的终浓度为 1 mmol/L、5 mmol/L、10%、1 mmol/L, 在最适反应温度和最适反应 pH 的条件下测定不同添加剂对酶活力的影响。

1.6 数据分析

运用软件 SPSS10.0 对试验数据进行统计分析, 数据均以均值±标准差 (mean±SD) 表示, 显著水平设为 0.05, 极显著水平设为 0.01。

2 结果

2.1 嗜盐古生菌 *Halogram rubrum* RO2-11

产蛋白酶验证试验



图 1 产蛋白酶试验

Fig.1 Protease production test

蛋白酶对酪蛋白、乳清蛋白、谷物蛋白等都有很好的水解作用, 牛奶中主要含有酪蛋白和乳清蛋白, 因此在含 0.5% (m/V) 脱脂奶粉的平板接种嗜盐古生菌 *Halogram rubrum* RO2-11, 待长出菌落后, 可观察到菌落周围有明显的直径为 2.5 cm 左右的水解透明圈, 表明该菌可以产生胞外蛋白酶。

2.2 酶学特性

2.2.1 热稳定性

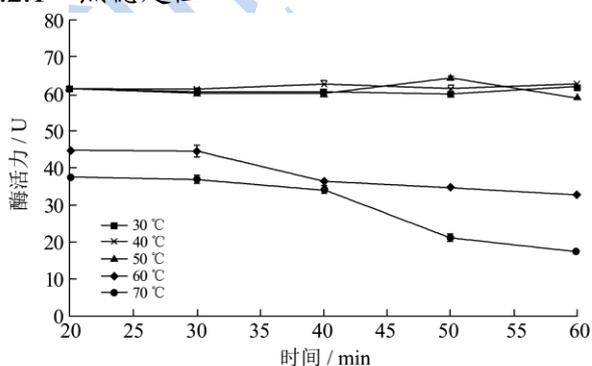


图 2 温度对蛋白酶活力的影响

Fig.2 Effect of temperature on protease activity

由图 2 分析可知, 蛋白酶在 30 °C~50 °C 的温度

下处理 20 min~60 min 后, 仍保持较高的活力并且相对稳定, 在 50 °C 的条件下处理 50 min 后酶活力最高, 此蛋白酶可在 50 °C 的温度下保持稳定的酶活, 表明其有一定的耐热能力, 这对于食品发酵过程是至关重要的, 食品发酵过程会伴随着热量的产生, 一定的耐热能力可以保证蛋白酶在温度升高时依然可以保持稳定且较高的酶活性。当温度达到 60 °C~70 °C 后, 蛋白酶的活力下降明显, 并且随着处理时间的增加而逐渐降低。出现这种现象的原因是蛋白酶的实质是蛋白质, 过高的温度导致酶的结构发生变化而逐渐失去活性^[12]。

2.2.2 最适反应温度

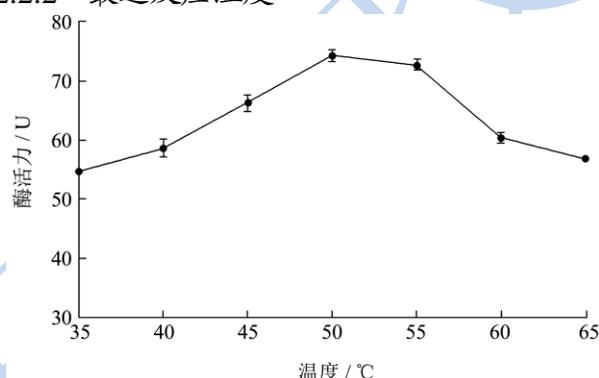


图 3 酶的最适反应温度

Fig.3 Optimum reaction temperature of the protease

由图 3 分析可知, 蛋白酶活力随着反应温度的增大而逐渐增加, 在反应温度达到 50 °C 时酶活力最高, 当反应温度继续升高时, 酶活力逐渐降低。表明酶的反应过程依赖一定的温度, 一定的温度可以加快分子运动, 增加分子碰撞频率, 加速酶促反应, 但酶的实质是一种蛋白质, 过高的温度会使蛋白质失活。

2.2.3 酸碱稳定性

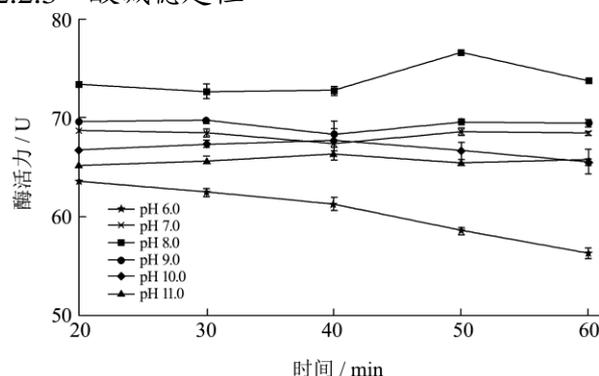


图 4 pH 对酶活性的影响

Fig.4 Effect of pH on protease activity

适宜的 pH 条件是保持酶活力的重要条件, 由图 4 可知, 蛋白酶的最适 pH 值为 8.0, 在 pH 6.0 的条件下, 酶活力最低, 并且随着时间的延长而逐渐下降, 当 pH > 9.0 时, 酶活力下降但仍可保持较高水平且相对稳

定。

2.2.4 最适反应 pH 值

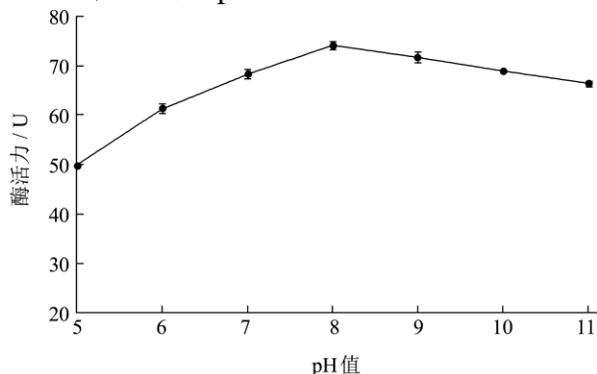


图 5 最适反应 pH 值

Fig.5 Optimum reaction pH of the protease

由图 5 分析可知,嗜盐古生菌 *Halogramum rubrum* RO2-11 胞外蛋白酶的最适反应 pH 值为 8.0, 当 pH 值降低变为酸性条件时, 酶活性下降很快, 当 pH 值升高变为碱性条件时, 酶活力略有下降, 但高于酸性条件下的酶活, 可推断该蛋白酶适宜在偏碱性条件下反应。

2.2.5 NaCl 浓度对蛋白酶活性的影响

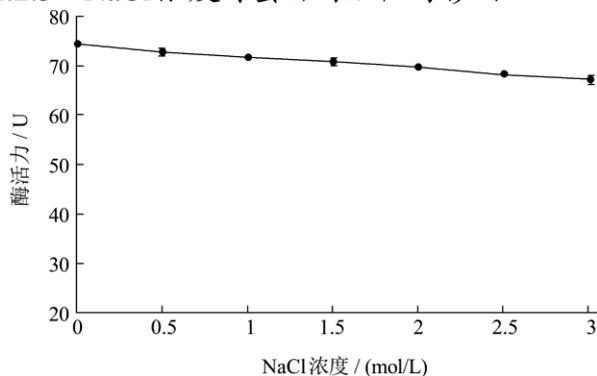


图 6 NaCl 浓度对蛋白酶活性的影响

Fig.6 Effect of NaCl concentration on protease activity

从图 6 分析可知嗜盐古生菌 *Halogramum rubrum* RO2-11 所产的胞外蛋白酶活性随着 NaCl 浓度的升高而略有下降, 但在 3 mol/L 的盐浓度下, 酶活性与无盐条件下相比只损失了 9.5%, 表明该蛋白酶在高盐条件下仍可保持较高活性, 具有耐盐的特性, 此种酶可能存在一种对应的保护机制, 对高浓度的 NaCl 有着良好的耐性。嗜盐古菌所产蛋白酶的这种耐盐的特性可以应用于高盐发酵工业中。

2.2.6 金属离子对蛋白酶活性的影响

图 7 结果表明, Ca^{2+} 可以促进酶的活力, 当 Ca^{2+} 的浓度达到 20 mmol/L 时, 蛋白酶的活力最大。原因可能是 Ca^{2+} 可与该酶活性中心的基团结合并对蛋白酶起到激活的作用, 但金属离子 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 可以抑制酶的活性, 随着浓度的增大, 酶活力逐渐降低。 K^+ 和

Mg^{2+} 对蛋白酶的活性影响不大, 随着离子浓度的增大, 酶活力基本保持稳定。

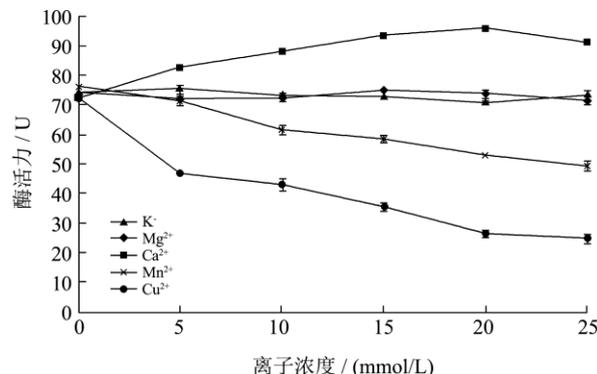


图 7 金属离子对蛋白酶活性的影响

Fig.7 Effect of metal ions on protease activity

2.2.7 添加剂对蛋白酶活性的影响

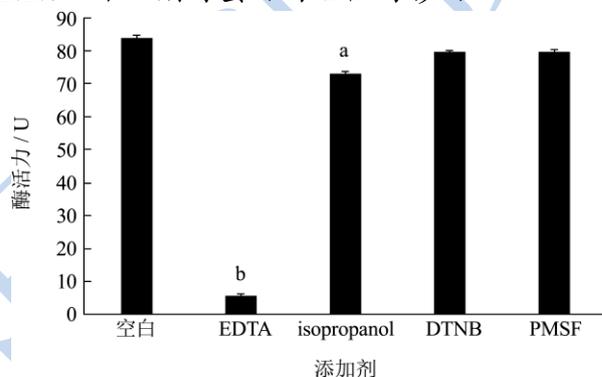


图 8 添加剂对蛋白酶活性的影响

Fig.8 Effect of additives on protease activity

注: a: 与空白对照组比较, 有显著性差异 ($p < 0.05$); b: 与空白对照组比较, 有极显著性差异 ($p < 0.01$)。

图 8 结果表明, EDTA 对该蛋白酶有强烈的抑制作用, 其原因可能是, EDTA 是一种金属螯合剂, 它结合了蛋白酶活性中心的金属离子, 使酶的活性大大降低, 据此可初步推测该酶是一种金属蛋白酶。DTNB 是一种巯基反应物, 是测定蛋白质中巯基的灵敏试剂, 在添加了一定量的 DTNB 后, 酶的活性基本没有影响, 表明该酶的结构中不含巯基。此外, 添加一定量的异丙醇后, 蛋白酶活力下降, 但依然可以保持较高的活性, 说明该酶可抵抗一定浓度的有机试剂。

3 结论

目前, 已报道的嗜盐古生菌所产的胞外蛋白酶均具有嗜盐的特性, 如 Vidyasagar 等从一株嗜盐古菌 *Halogeometricum borinquense* strain TSS101 中得到的蛋白酶在 NaCl 浓度为零时, 相对酶活力为零, 当 NaCl 浓度达到 20% 时, 蛋白酶活力最高^[4]; 石万良等从嗜盐古生菌 (*Natrinema* sp.) R625 中分离出的胞外蛋白酶在 NaCl 浓度为 3 mol/L 时酶的活性最高, 当 NaCl

浓度为 0.5 mol/L 的低浓度时, 蛋白酶活性则下降了 60%^[9]; Norberg 等所研究的 *Halobacterium* 属的嗜盐古菌所产蛋白酶在 2 mol/L 的 NaCl 浓度时酶活力最高, 在低浓度 NaCl 的条件下酶活力为零, 也具有嗜盐的特性^[13]。与上述蛋白酶有所区别的是, 从嗜盐古生菌 *Halogramum rubrum* RO2-11 所得到的蛋白酶具有耐盐的特性, 在 NaCl 浓度为零时蛋白酶活力最高, 当 NaCl 浓度达到 3 mol/L 时酶活力下降但只降低了 9.5%, 属于耐盐型蛋白酶, 在低盐和高盐环境下均可保持较高的酶活性, 因此应用范围更为广泛; 此外, 与其他已报道的嗜盐古菌蛋白酶大部分属于丝氨酸蛋白酶^[3-4,9]不同的是, 该蛋白酶受金属螯合剂 EDTA 的强烈抑制, 属于金属蛋白酶, Ca²⁺能够提高酶的活性, 此性质可应用于原料中钙含量比较丰富的发酵产品, 如用虾头和虾壳来发酵虾油^[4]的过程或者可以在发酵过程中通过添加适量 Ca²⁺的方式进一步提高酶的活性; 该酶具有较广的温度和 pH 适应性, 其最适酶反应温度为 50 °C, 最适反应 pH 为 8.0, 在碱性环境中可保持较高酶活力且稳定; 异丙醇对蛋白酶的活性影响较小, 说明此蛋白酶对异丙醇等有机溶剂有一定的耐受性。怎样运用这些性质并高效的利用嗜盐古生菌蛋白酶资源, 并使其与食品工业得到有效的结合, 是我们研究的目标。为使嗜盐古生菌 *Halogramum rubrum* RO2-11 所产的胞外蛋白酶得到广泛利用, 我们还需要对其蛋白酶进行进一步的分离纯化, 以期获得一种新型工业用耐盐蛋白酶。

参考文献

- [1] 韩剑. 新疆罗布泊嗜盐细菌的多样性及产酶特性研究[D]. 新疆农业大学硕士学位论文, 2008
HAN Jian. Study on biodiversity and enzyme-producing characteristic of halophilic bacteria from Lop Nur region in Xinjiang [D]. The master's degree paper of Xinjiang Agricultural University, 2008
- [2] Rao M B, Tanksale A M, Ghatge M S, et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62 : 597-635
- [3] Dodia M, Rawal C, Bhimani H, et al. Purification and stability characteristic of an alkaline serine protease from a newly isolated Haloalkaliphilic bacterium sp. AH-6 [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2008, 35(2): 121-131
- [4] Vidyasagar M, Prakash S, Litchfield C, et al. Purification and characterization of a thermostable, haloalkaliphilic extracellular serine protease from the extreme halophilic archaeon *Halogeometricum borinquense* strain TSS101 [J]. *Archaea*, 2006, 2(1): 51-57
- [5] Namwong S, Hiraga K, Takada K, et al. Ahalophilic serine proteinase from *Halobacillus* sp. SR5-3 isolated from fish sauce: purification and characterization [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2006, 70(6): 1395-1401
- [6] Akolkar A V, Deshpande G M, Raval K N, et al. Organic solvent tolerance of *Halobacterium* sp. SP1 (1) and its extracellular protease [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2008, 48(5): 421-425
- [7] Akolkar A V, Durai D, Desai A J. *Halobacterium* sp. SP1 (1) as a starter culture for accelerating fish sauce fermentation [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(1): 44-53
- [8] De Castro R E, Maupin-Furlow J A, Giménez M I, et al. Haloarchaeal proteases and proteolytic systems [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2006, 30: 17-35
- [9] 石万良, 钟传奇, 唐兵, 等. 极端嗜盐古生菌 (*Natrinema* sp.) R625 胞外嗜盐蛋白酶的纯化和性质研究 [J]. *微生物学报*, 2007, 47(1): 161-163
SHI Wan-liang, ZHONG Chuan-qi, TANG Bing, et al. Purification and characterization of extracellular halophilic protease from haloarchaea *Natrinema* sp. R6-5 [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(1): 161-163
- [10] 牟云壮. 异源盐环境嗜盐古菌多样性及发酵鱼露理化特性研究[D]. 江苏大学硕士学位论文, 2013
MU Yun-zhuang. Biodiversity of halophilic archaea isolated from diverse hypersaline environments and physical and chemical properties of fish sauce fermented by halophilic archaea [D]. The master's degree paper of Jiangsu University, 2013
- [11] 蛋白酶活力测定法. 中华人民共和国专业标准, SB/T 10317-1999
Measurement of proteinase activity. The professional standards of the People's Republic of China, SB/T 10317-1999
- [12] 华颖, 沈国华, 刘大群. 白萝卜多酚氧化酶的酶学特性研究 [J]. *现代食品科技*, 2014, 30(1): 69-73
HUA Ying, SHEN Guo-hua, LIU Da-qun. Characterization of polyphenol oxidase extracted from white radish [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(1): 69-73
- [13] Norberg P, Hofsten B. Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria [J]. *Journal of General Microbiology*, 1969, 55: 251-2561
- [14] 冯滢滢, 段杉, 李远志. 食盐浓度对虾油风味成分形成的影响研究 [J]. *现代食品科技*, 2013, 29(2): 269-273

FENG Ying-ying, DUAN Shan, LI Yuan-zhi. Influence of salt concentration on formation of flavour ingredients in

fermentation of shrimp sauce [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(2): 269-273

现代食品科技