

# 微生物碱性蛋白酶研究进展

邓菊云

(湖南省农村科技发展中心, 湖南 长沙 410001)

**摘要:** 本文主要综述了微生物碱性蛋白酶在国内外的应用研究和现状, 对微生物碱性蛋白酶的产生菌, 碱性蛋白酶的应用、基因结构及性质, 高产工程菌的选育技术等方面的研究进展进行了概述, 并根据当前应用研究状况对微生物碱性蛋白酶在今后的发展进行了展望。

**关键词:** 碱性蛋白酶; 基因工程; 研究进展

**中图分类号:** TS201.2; **文献标识码:** A; **文章篇号:** 1673-9078(2008)03-0293-04

## Research Progress in Microbial Alkaline Protease

DENG Ju-yun

(Rural Science and Technology Development Center of Hunan Province, Changsha 410001, China)

**Abstract:** The current research status of microbial alkaline protease and its application at home and abroad were summarized. The producing strains, gene structure and properties of the alkaline protease, the screening and culturing of engineering strains with high production of the alkaline protease were introduced and the develop of alkaline protease was forecasted according to current applications studies.

**Key words:** alkaline protease; gene engineering; research Advance

碱性蛋白酶 (*Alkaline protease*) 是指在 pH 值偏碱性范围内水解蛋白质肽键的酶类, 1913 年 Rohm 首先将胰蛋白酶作为洗涤浸泡剂使用, 1945 年瑞士 Dr.Jaag 等人在地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 中发现了碱性蛋白酶<sup>[1]</sup>。有数据显示, 全世界工业用酶每年销售额大约为 1 亿美元<sup>[2]</sup>, 在所有的工业用酶制剂中 75% 是蛋白水解酶, 而蛋白酶是工业用酶中占据比例最大的酶类, 大约占全世界每年总销售量的 60% 左右<sup>[3]</sup>。碱性蛋白酶在食品、洗涤及制革等行业中有着广泛的用途<sup>[4-6]</sup>。由于微生物蛋白酶均为胞外酶, 与动、植物源蛋白酶相比具有下游技术处理相对简单、价格低廉、来源广、菌体易于培养、产量高、高产菌株选育简单、快速、具有动植物蛋白酶所具有的全部特性, 同时易于实现工业化生产。而且碱性蛋白酶比中性蛋白酶具有更强的水解能力和耐碱能力, 有较大耐热性且有一定的酯酶活力。因此, 碱性蛋白酶研究成为蛋白酶研究的热点<sup>[7-9]</sup>。本文综述了碱性蛋白酶国内外研究现状、高产菌株的选育新途径、基因结构与功能, 并根据当前研究现状, 对碱性蛋白酶在今后的发展进行了展望。

### 1 微生物碱性蛋白酶应用研究现状

#### 1.1 微生物碱性蛋白酶主要产酶菌种

收稿日期: 2007-11-05

目前, 碱性蛋白酶主要产生菌及研究对象有: 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、嗜碱性芽孢杆菌 (*Bacillus Sp*) 和链霉菌 (如灰色链霉菌、费氏链霉菌等) 以及霉菌。我国用于工业化生产的蛋白酶菌种主要有: 地衣芽孢杆菌 2709<sup>[10]</sup>、地衣芽孢杆菌 C<sub>1213</sub><sup>[11]</sup> 以及短小芽孢杆菌 289 和 209<sup>[12]</sup>。

#### 1.2 微生物碱性蛋白酶应用与研究现状

##### 1.2.1 国外研究现状

目前, 国外碱性蛋白酶主要应用于洗涤及皮革等行业中, 99% 以上洗涤剂均添加了碱性蛋白酶, 因此市场需求出现了供不应求的现象。相信随着碱性蛋白酶研究的进一步深入, 该现象将会得到有效的缓解。当前国外碱性蛋白酶高产菌株的选育主要用基因工程技术和蛋白质工程手段进行工业微生物菌种的定向选育, 目的性强, 而且酶结构研究得也比较的深入。Tsuyoshi Nonaka<sup>[13]</sup> 等人研究了枯草杆菌抗氧化性稳定性并期望能应用于洗涤剂行业。Kunamneni Adinarayana<sup>[14]</sup> 等人研究了枯草芽孢杆菌 PE-11 的热稳定性。研究表明, 该酶在 60 °C 处理了 350 min 酶仍保持 100% 活力。极端碱性蛋白酶和高活力碱性蛋白酶工程菌构建成为国外碱性蛋白酶的热点<sup>[15]</sup>。

##### 1.2.2 国内研究现状

碱性蛋白酶主要应用于洗涤、制革、食品等行业中。目前我国洗涤行业中加酶洗涤剂也占90%以上,且占有率有上升趋势。我国碱性蛋白酶的研究发展很快。邱秀宝<sup>[16]</sup>采集38个不同土样,从中筛选到一株产碱性蛋白酶的嗜碱性短小芽孢杆菌R<sub>115</sub>,经NTG和利福平处理,获得一株具有高产稳产的碱性蛋白酶变异株B<sub>45</sub>。徐子渊<sup>[17]</sup>等将碱性蛋白酶生产菌2709进行诱变育种,获得变异株C<sub>1213</sub>,酶产量提高了40%。郑铁曾<sup>[18]</sup>等对如何提高C<sub>1213</sub>碱性蛋白酶活力进行了研究,通过优化设计,酶活力达到21000 U/mL,相对原始菌株2709酶活提高了170%。冯清平<sup>[19,20]</sup>等也从土样中筛选到一株产碱性蛋白酶的嗜碱性地衣芽孢杆菌53-A<sub>6</sub>,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株。在生物技术领域中,碱性蛋白酶可作为工具酶用于核酸纯化过程中的蛋白质(包括核酸酶类)去除,因为蛋白酶作用条件温和,对DNA的完整性不会造成破坏。刘成圣<sup>[38]</sup>等人从海洋弧菌(*Vibrio pacini*) X4B-7分离纯化得到电泳纯碱性蛋白酶,该酶可用于解聚组蛋白,DNA琼脂糖凝胶电泳证明:酶对DNA酶有降解作用,而对DNA没有降解作用,该酶有望应用于核酸的提取。此项研究为蛋白酶的应用指明了一个新发展方向。

## 2 高产菌株的选育

高碱性蛋白酶活力菌株是工业化生产实现的前提和基础,然而从自然界分离得到的碱性蛋白酶菌株酶活力一般都较低,不能直接应用于工业化生产。为此,必须对产酶菌株进行定向或非定向性的改造,以提高原始菌株产酶能力符合工业化生产的要求,一般可以采取以下措施:

### 2.1 利用传统的物理、化学因子单独或复合诱变选育高活力菌株

早期许多研究表明,通过物理、化学因子单独或复合诱变选育高活力产碱性蛋白酶菌株是一种切实可行的方法,至今仍不失为菌种选育的一种好方法。那淑敏<sup>[22]</sup>(1987)利用NTG和紫外线复合诱变地衣芽孢杆菌获得变异株*Bacillus licheniformis* 533-F13,产酶活力达10000 U/mL,相对出发菌株酶活提高了近20倍。邱秀宝<sup>[23]</sup>利用NTG对*Alkaliphilic Bacillus pumilus*进行了诱变并利用利福平抗性株筛选到比原始菌株蛋白酶活力出11.8倍的变异株。最近,我们课题组对从土壤中分离纯化得到一株产中性蛋白酶芽孢杆菌(*Bacillus B<sub>4</sub>*)进行了产酶条件优化研究,粗酶液蛋白酶活力比原始菌株提高近8倍<sup>[24]</sup>。由此可

见,通过物理、化学因子诱变或优化发酵条件选育高活力菌株的确是一个切实可行的办法。

### 2.2 原生质体技术选育碱性蛋白酶高产菌株

通过原生质体技术改良碱性蛋白酶菌株有很多成功的研究报道<sup>[9,25,26]</sup>。潘延云<sup>[25]</sup>用原生质体融合的方法,将碱性蛋白酶生产菌2709与含有碱性蛋白酶基因克隆载体pDW<sub>2</sub>的工程菌枯草杆菌BD105进行原生质融合,得到1株高效表达的高产碱性蛋白酶的工程菌A<sub>16</sub>,通过双亲的形态学,营养特征和不同抗药性为筛选指标进行观察证明A<sub>16</sub>携有双亲的遗传物质,表型和生长特征与2709相似,发酵液酶活比2709高50%~100%,摇瓶发酵的产酶水平达到国际领先水平,最高可达30000 U/mL。薛林贵<sup>[26]</sup>等人对地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) 53号菌株在原生质体形成最佳条件下进行原生质体制备并多次紫外线诱变终得一株稳定高产的碱性蛋白酶产生菌53-G<sub>38-6</sub>,酶活由原来的1104 U/mL提高到22080 U/mL,活力提高了近20倍。杨文博<sup>[27]</sup>以短小芽孢杆菌*Bacillus pumilus* C172为出发菌株,采用UV照射、DES和原生质体NTG诱变等复合诱变处理选育出C172-415突变株,碱性蛋白酶摇瓶产酶最高活力达13977 U/mL。原生质体诱变选育高产碱性蛋白酶菌株还有大量报道。实践表明,制备原生体后对其进行诱变能大大提高菌种产酶量或直接原生质融合选育高产碱性蛋白酶菌株不失为一个好的方法。

### 2.3 利用基因工程技术选育高产菌株的选育

自1985年Jacobs<sup>[28]</sup>第一次通过建立基因文库克隆了第一条碱性蛋白酶基因以来,利用基因工程手段获得高产碱性蛋白酶高产工程菌已成为当前蛋白酶研究的热点之一。利用基因工程技术手段提高菌种的产酶能力,不仅使菌种产酶量有极大的提高,且能够改变酶某些特性以满足生产需求,促进了理论与实践应用的紧密融合,大大缩短了从探索研究到生产应用的周期,同时也克服了传统菌种选育方法的随机性和盲目性,为微生物育种提供一条新的思路和途径。杨文博<sup>[29]</sup>等人将*Bacillus pumilus* C172-60为受体株,采用原生质体转化技术将携带糖化型 $\alpha$ -淀粉酶基因(Amy)、Cm<sup>r</sup>基因, Km<sup>r</sup>基因的pBX96质粒成功导入到受体内,并获得能直接利用淀粉作为碳源并保留噬菌体抗性、产碱性蛋白酶的工程菌C172-306(pBX96)。雷虹<sup>[30]</sup>等成功利用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并肯定了2709菌碱性蛋白酶属典型的*Subtilisin Carlberg*。刘永亮<sup>[31]</sup>等利用枯草杆菌碱性

蛋白酶 E 基因的信号顺序构建分泌表达载体获得成功。王培之<sup>[32]</sup>等成功利用遗传工程的方法构建一个分泌型高表达的枯草杆菌碱性蛋白酶 E (*Subtilisin E*) 的枯草杆菌质粒-宿主系统。唐雪明<sup>[33]</sup>等对重组碱性蛋白酶工程菌株 BP071 高产碱性蛋白酶的发酵条件进行了优化研究, 酶活达 24480 U/mL。目前, 国内用于碱性蛋白酶生产的菌种, 酶活一般都维持在 18000 U/mL, 与国外的 25,000~30,000 U/mL 相比还比较低。因此, 通过基因工程手段定向改造产酶菌株有很好的发展前景, 将为我国碱性蛋白酶的发展起到推波助澜的作用。

#### 2.4 蛋白质工程技术选育高产菌株的选育

蛋白质工程 (protein engineering) 是指通过对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<sup>[33]</sup>, 主要集中在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方面。我国在蛋白质工程技术选育高产碱性蛋白酶菌株取得了重大的成就。王贤舜<sup>[34]</sup>用蛋白质工程的方法在计算机图像系统上对预定的分子改造方案进行了预测, 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。1998 年 wells 和 Estell 将 BPN 酶与底物残基侧链关系密切的三个残基逐步改换成 Carlsberg 酶底物的残基, 同时对于活性部位的 Ser221, His64, Asn155 也做了替换, 实现了 BPN 酶的专一性转化为类似于 Carlsberg 酶的专一性<sup>[35]</sup>。

### 3 碱性蛋白酶基因结构及功能

20 世纪 80 年代以后, 微生物蛋白酶研究转向基因结构、空间结构以及结构与功能的关系的研究上来。随着生物技术基础研究的快速发展, 蛋白质工程也有了突飞猛进的发展。枯草杆菌蛋白酶与蛋白质工程主要集中在酶的专一性和催化机理、稳定性作用力和结构预测等方面<sup>[36,37]</sup>。大多数微生物碱性蛋白酶的活性中心含有丝氨酸, 属于丝氨酸蛋白酶 (*serine protease*)。当遇到作用于丝氨酸的试剂二异丙基氟磷酸 (DFP) 便失活, 这是碱性蛋白酶的一个重要特征。碱性蛋白酶需要有金属离子的激活, 必须的金属离子有  $Mn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$  等。 $Ca^{2+}$  对碱性蛋白酶有稳定作用<sup>[38]</sup>。

信号肽的存在是区分胞质蛋白和输出蛋白的唯一显著特征。有研究发现, 在 *B.amyloliquefaciens*、*B.subtilis*、*B.stearo-thermophilus* 中分泌的中性蛋白酶与在 *B.amyloliquefaciens*、*B. subtilis*、*B. licheniformis*

中分泌的碱性蛋白酶信号肽同源程度很高的保守序列<sup>[39]</sup>。信号肽保守序列位于带正电荷的 N 端紧跟一段疏水残基, 在极性 C 区有一个共有序列切割位点: Ala\*-Ala, 一般切割点位于 C 端 Ala 之后, 这两个 Ala 残基常被其它短肽链氨基酸残基取代。\*位优先选择大体积的氨基酸残基。雷虹<sup>[30]</sup>等通过设计合适的引物, 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。对两个克隆的 PCR 片段的全序列分析结果显示, 2709 碱性蛋白酶的编码序列同相应的 NCIB6816 序列相比有 3% 左右的碱基组成差异, 与已发表的两种 *Subtilisin Carlsberg* 型氨基酸序列长度 (274 个氨基酸) 一致, 同源率为 98%~99%。由此肯定了 2709 碱性蛋白酶属典型的 *subtilis Carlsberg* 类。不同菌株产生的碱性蛋白酶其翻译加工、切除信号肽和导肽的过程及调控机制基本一致。

### 4 研究前景

目前, 我国碱性蛋白酶研究已经达到了分子水平, 利用基因工程手段和蛋白质工程手段定向改造碱性蛋白酶产生菌产酶活力及酶学性质是今后很长时期的一个发展趋势。随着生物技术基础研究深入和应用技术手段的完善, 碱性蛋白酶研究将会进入一个全新阶段。今后, 我国碱性蛋白酶研究方向主要转向: (1) 继续运用生物技术和蛋白质手段进一步提高目前工业微生物菌种产酶能力和酶的性质。如构建、克隆高产碱性蛋白酶基因文库并高效表达, 选育耐热、耐碱、抗噬菌体和抗氧化高产碱性蛋白酶菌株等。(2) 建立新的碱性蛋白酶高产基因宿主系统, 为碱性蛋白酶构建更多表达载体, 解决革兰氏阴性胞外酶分泌问题。(3) 为蛋白酶的应用开拓新渠道, 特别是在医学 (生物制药及化疗等) 及生物技术领域中应用。(4) 选育极端碱性蛋白酶产生菌。如低温碱性蛋白酶产生菌、耐高温碱性蛋白酶。综上所述, 碱性蛋白酶研究是富有前景的领域, 同时, 也相信随着碱性蛋白酶研究的进一步深入, 碱性蛋白酶将会成为一个新的经济增长点。

### 参考文献

- [1] Rose A H. Economic Microbiology[M]London: Academic Press.1980,5:51-72
- [2] Godfrey, T, and S. West 1996.Industrial enzymology[M], 2nd ed., p.3. Macmillan Publishes., New York, N.Y.
- [3] Mala B. Rao, Aparna M.Tankasle, Mohini S.Ghatge ,et al. Molecular and Biotechnological aspects of microbial

- protease[J] *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Sept. 1998(597-635)
- [4] 郑环宇,邵弘,刘燕,等.酶水解大豆分离蛋白制取大豆肽的应用研究[J]. *大豆通报*,2003,(4):25-26
- [5] 夏良树.复合酶在合成洗衣粉中的应用[J].*中南工学院学报*,1999,13(3):33-38
- [6] 刘彦,张义正,等.碱性蛋白酶 No.8 的脱毛条件研究[J].*四川大学学报(工程科学版)*,2002,12(4):15-20
- [7] 邱秀宝,袁影,戴宏,等.嗜碱性芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究 II: 诱变株选育及产酶条件[J].*微生物学报*,1990,30(2):129-133
- [8] 裘娟萍.提高碱性蛋白酶生产效益的措施[J].*氨基酸和生物资源*,1996,18(2):32-35
- [9] 冯清平,沈剑敏,高燕.紫外诱变原生质体选育碱性蛋白酶高产菌株的研究[J].*兰州大学学报(自然科学版)*,1994,30(4):83-87
- [10] 赵良启,郝晋阳.地衣芽孢杆菌产生碱性蛋白酶的动力学研究[J].*生物工程学报*,1998,14(4):395-400
- [11] 郑铁曾,涂提坤.提高 C<sub>1213</sub> 菌碱性蛋白酶活力的研究[J].*食品与发酵工业*,1993,1:25-31
- [12] 邱秀宝,程秀兰,袁影.嗜碱性芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究 I: 菌种分离,筛选及发酵条件的研究[J].*微生物学通报*,1988, 15(3): 101-104
- [13] Tsuyoshi Nonaka, Masahiro Fujihashi, Akiko Kita, Katsuhisa et al. The crystal structure of an oxidatively-stable subtilisin alkaline serine protease, KP-43, with a C-terminal  $\beta$ -barrel domain[J]. *J. Biol. Chem.*, 2004
- [14] Kunamneni Adinarayana, Poluri Elliaiah, Davuluri Siva Prasad et al. Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-11[J]. *AAPS PharmSciTech* 2003,4(4)
- [15] Mala B. Rao, Aparna M. Tanksale, Mohini S. Ghatge et al. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Protease[J] *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998:597-635
- [16] 邱秀宝,袁影.嗜碱性芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究: II. 诱变株选育及产酶条件[J].*微生物学报*,1990,30(2):129-133
- [17] 徐子渊,朱青虹,王建华,等.食品与发酵工业,1984,4:12-16
- [18] 郑铁曾,涂提坤.提高 C<sub>1213</sub> 菌碱性蛋白酶活力的研究[J].*食品与发酵工业*,1993,(1):25-31
- [19] 冯清平,薛林贵.复合诱变原生质体选育耐热碱性蛋白酶高产菌[J].*微生物学报*,1996,36(6):453-459
- [20] 冯清平,薛林贵.紫外诱变原生质体选育碱性蛋白酶高产菌株的研究[J].*兰州大学学报(自然科学版)*,1995,31(3):100-106
- [21] 刘成圣,刘晨光,刘万顺,等.海洋弧菌碱性蛋白酶的分离纯化及部分性质研究[J].*青岛海洋大学学报*,2002,32(5):734-739
- [22] 那淑敏,余茂效.*微生物学报*,1988,28(3):249-256
- [23] 邱秀宝,袁影,戴宏,等.嗜碱性芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究: II. 诱变株选育及产酶条件[J].*微生物学报*,1990,30(2): 129-133
- [24] 肖怀秋,林亲录,李玉珍,等.产中性蛋白酶菌株 B<sub>4</sub> 发酵条件的研究[J].*食品与机械*,2004,(5)
- [25] 潘延云,张贺迎,周艳芬.原生质体融合构建高产碱性蛋白酶工程菌[J].*应用与环境生物学报*,2002,8(4):422-426
- [26] 薛林贵,冯清平.紫外诱变原生质体选育碱性蛋白酶高产菌株的研究 III: 诱变株的选育及其产酶条件的研究[J].*兰州大学学报(自然科学版)*,1997,33(2):72-78
- [27] 杨文博,冯耀宇.短小芽孢杆菌产碱性蛋白酶高酶活力菌株的诱变筛选[J].*天津微生物*,1994,3:1-4
- [28] Jacobs M, Eliasson M, Uhlen M, Cloning-Sequence and expression of subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*. [J] *Nucleic Acids Res.*, 1985,13:8913-8923
- [29] 杨文博,冯耀宇.利用淀粉产生碱性蛋白酶工程菌的构建[J].*微生物学通报*,1994,21(5):274-278
- [30] 雷虹,洪扬.地衣芽孢杆菌 2709 碱性蛋白酶编码序列的 PCR 扩增,克隆及序列测定[J].*生物化学杂志*,1993,9(4): 441-447
- [31] 刘永亮,童克忠.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[J].*遗传学报*,1994,21(3):235-246
- [32] 王培之,王贤舜.利用遗传工程的方法构建一个分泌型高表达的枯草杆菌碱性蛋白酶 E (Subtilisin E) 的枯草杆菌质粒-宿主系统[J].*生物化学杂志*,1992,8(5):541-546
- [33] 唐雪明,王正祥,邵蔚蓝,等.碱性蛋白酶工程菌发酵条件及重组酶的纯化和性质的研究[J].*生物工程学报*,2002,18(6): 729-734
- [34] 王贤舜,毕汝昌.用蛋白质工程的方法改良枯草杆菌蛋白酶 E 的热稳定性[J].*生物化学与生物物理学报*,1993,25(6): 577-583
- [35] Wells J A, Estell DA *TIBS*,1998,13(8):291
- [36] 毕汝昌,储乃明.枯草杆菌蛋白酶与蛋白质工程[J].*生物化学与生物物理进展*,1991,18(5):329-334
- [37] 王凡强,马美荣.枯草杆菌蛋白酶基因工程的研究进展[J].*微生物学通报*,2000,27(3):218-220
- [38] 郭杰炎.*微生物酶*[M].北京:科学出版社,1986
- [39] Marjo Simonen, Ilkka Palva. Protein Secretion in *Bacillus* Species[J].*Microbiological. Roy*, 1993:109-137