

# 一株深海来源苏云金芽孢杆菌 SWJS07 所产蛋白酶的分离纯化及性质研究

赵谋明, 郇惠杰, 雷芬芬, 崔春

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 利用超滤、硫酸铵盐析、DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱层析、Sephadex G-75 分子筛柱层析对一株南海深海来源菌苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*) SWJS07 所产蛋白酶进行分离纯化, 纯化后经 SDS-PAGE 鉴定达到电泳纯, 相对分子质量为 37.0 kDa, 酶的比活力提高了 6.39 倍, 回收率为 37.14%。研究其酶学性质表明, 该蛋白酶最适催化温度为 55 °C, 在 30 °C~45 °C 下稳定性较高, 保温 300 min 残留酶活在 80% 以上; 最适 pH 6.5, 在 pH 6.0~9.0 蛋白酶稳定, 4 °C 放置 24 h 残留酶活在 80% 以上; 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  对蛋白酶有不同程度的激活作用, 而  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$  则强烈地抑制蛋白酶活; 当在蛋白酶中添加 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  时, 其最适催化温度分别为 60 °C 和 55 °C, 蛋白酶活分别提高了 32.86% 和 28.35%, 60 °C 保温 30 min 相对酶活基本保持不变, 与纯酶 (相对酶活残留 21.02%) 相比蛋白酶的热稳定性显著提高; EDTA- $\text{Na}_2$  可强烈抑制蛋白酶活, 推测该蛋白酶属于金属蛋白酶。

**关键词:** 苏云金芽孢杆菌 SWJS07; 蛋白酶; 分离纯化; 酶学性质

文章编号: 1673-9078(2015)8-165-170

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.027

## Purification and Characterization of Protease from Marine *B. thuringiensis* SWJS07

ZHAO Mou-ming, HUAN Hui-je, LEI Fen-fen, CUI Chun

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The protease produced by the marine strain *B. thuringiensis* SWJS07 was purified to homogeneity by ultrafiltration, ammonium sulfate precipitation, anion-exchange chromatography (DEAE-Sepharose Fast Flow) and gel filtration chromatography (Sephadex G-75), with a 6.39-fold increase in specific activity and 37.14% recovery and the molecular weight was estimated to be 37.0 kDa on SDS-PAGE. The optimal temperature and pH for the purified protease were determined to be 55 °C and pH 6.5. The protease was highly stable from 30 °C to 45 °C and between pH 6.0 and 9.0 and it was activated by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ , while  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  had a strong inhibitory effect. The optimal temperature were 60 °C and 55 °C in the presence of 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ , and the activity were increase by 32.86%, 28.35%, respectively. Meanwhile, thermostability of the protease was enhanced by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ . In the presence of 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ , the activity of the protease were retained unchanged after heating for 30 min at 60 °C, however, it retained 21.02% of its initial activity in the absence of them. It was strongly inhibited by EDTA- $\text{Na}_2$ , indicating that the protease may be metalloprotease.

**Key words:** *B. thuringiensis* SWJS07; protease; purification; characterization

蛋白酶的主要功能是水解蛋白质, 具有催化条件温和、效率高、能提升蛋白质的功能性质等优点, 被广泛应用于食品、洗涤、皮革、饲料、医药、环境保护、化工等行业<sup>[1]</sup>。蛋白酶可分离自微生物、动物、植物, 是迄今为止研究最深入的一类酶, 其中, 微生物来源的蛋白酶因具有生长速度快、培养条件简单、

性质稳定、活性高等优点, 得到广泛地开发。1960 年, Dane 等首次从一株地衣芽孢杆菌中分离出碱性蛋白酶, 直至今日, 人们仍认为微生物是目前最适合用来批量生产蛋白酶最重要的资源<sup>[2]</sup>。

海洋面积广阔, 蕴含了丰富的微生物资源。海洋环境多变使海洋微生物在进化过程中分泌各式各样的酶以适应复杂的生存环境, 这也使得海洋微生物在代谢系统与防御系统与陆生微生物有着显著的差异, 是开发新型酶制剂的重要资源库。1972 年, Nobou Kato 等<sup>[3]</sup>从一株海洋嗜冷杆菌中分离出一种新型的碱性蛋白酶, 而引起了人们对海洋微生物研究的重视, 随后科研工作者对其研究从未停止过。从 1997 年开

收稿日期: 2014-09-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 课题 (2012AA092104; 2013AA102201-1); 海洋公益性行业科研专项 (201305018-7); 广东省海洋经济创新发展区域示范专项 (GD2012-D01-002)

作者简介: 赵谋明 (1964-), 博士, 博士生导师, 研究方向: 食品生物技术、蛋白质化学与工程

始, 中国制定了一系列的海洋微生物计划, 持续不断地增加对海洋微生物酶的研究支持<sup>[4]</sup>。总的来说人类对海洋微生物的研究仍处于初始阶段, 但它具有巨大的开发潜力及产业应用优势。

有关海洋微生物来源蛋白酶的报道有很多, 但由于筛选出的微生物生存环境、进化程度、筛选条件等各异, 使这些蛋白酶的酶学性质之间存在很大的差异。本文对一株南海深海来源的苏云金芽孢杆菌所产蛋白酶 SWJS07 进行分离纯化, 并研究了其酶学性质, 为该蛋白酶的深入研究与工业化应用提供了重要的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与培养基

菌株: *B. thuringiensis* SWJS07 由华南理工大学食品生物技术实验室从南海深海海泥中筛选分离并保藏;

活化培养基: Zobell 2216 E 培养基;

发酵培养基: 大豆分离蛋白 6 g, 葡萄糖 6 g, NaCl 10 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3 g,  $\text{CaCl}_2$  0.5 g,  $\text{CaCO}_3$  0.25 g, 甘油 4 g, 去离子水 1 L, pH 7.5。

### 1.2 主要试剂与仪器

酪氨酸, Sigma 公司; 酵母粉, 广东环凯微生物科技有限公司; 蛋白胨, 北京奥博星生物技术有限公司; 大豆分离蛋白, 山东香驰豆业科技有限公司; DEAE Sepharose Fast Flow、Sphe dex G-75, 瑞典 Pharmacia; Folin 试剂, 根据参考文献自配<sup>[5]</sup>; 其他试剂均为国产分析纯。

超滤浓缩装置, Millipore 公司; 真空冷冻干燥机, 德国 Martin Christ 公司; UV-2100 紫外可见分光光度计, 尤尼柯仪器有限公司; 电泳仪, 北京六一仪器厂; CXG-1 恒温层析柜、自动收集器、HL-2D 定时数显恒流泵, 上海沪西仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 粗酶的制备

从平板上挑取 *B. thuringiensis* SWJS07 单菌落接入种子培养基, 37 °C, 150 r/min 条件下培养 12 h。以 3% 的接种量转接于发酵培养基, 37 °C, 150 r/min 培养 32 h。将发酵液在 10000 r/min, 4 °C 条件下离心 10 min, 取上清液, 用 5 kDa 膜进行超滤浓缩, 收集分子量大于 5 kDa 的截留液, 即得粗酶液。

#### 1.3.2 蛋白酶活力测定

蛋白酶活力 (activity of protease): 以蛋白酶活力单位表示, 定义为 1 mL 液体酶在一定温度和 pH 值条件下, 每分钟水解酪蛋白产生相当于 1  $\mu\text{g}$  酪氨酸所需要的酶量, 定义为一个酶活单位 (U)。测定方法参考 Folin-酚法<sup>[6]</sup>。

#### 1.3.3 蛋白含量测定

采用 Bradford 法<sup>[7]</sup>。

#### 1.3.4 蛋白酶分子量测定

按 Laemmli 法<sup>[8]</sup>进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 分离胶 12%, 浓缩胶 5%, 电泳结束后, 采用考马斯亮蓝染色 (R-250), 甲醇-冰醋酸脱色, 根据标准蛋白迁移率计算公式求出样品蛋白酶的分子量。

#### 1.3.5 数据分析

所有试验至少重复测定三次, 数据以平均值、方差表示。使用 Excel 2007 进行数据处理分析并绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶的分离纯化

#### 2.1.1 硫酸铵盐析及 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱层析

在粗酶液中添加硫酸铵至饱和度为 70%, 4 °C 静置 12 h, 离心收集沉淀, 将其溶解于 0.1 M pH 7.2 的磷酸盐缓冲液, 并在此缓冲液条件下透析 24 h, 每 4 h 更换一次透析液。收集透析脱盐后的蛋白酶冷冻干燥, 于 4 °C 冰箱保藏备用。

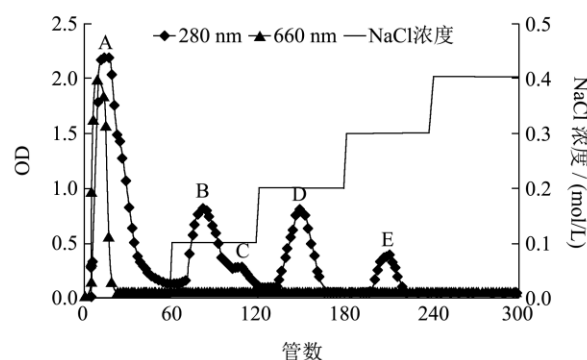


图 1 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱层析

Fig.1 DEAE-Sepharose FF column chromatography

将上一步所得蛋白酶溶于 25 mM pH 7.2 Tris-HCl (含 2 mM  $\text{CaCl}_2$ ) 缓冲液后上 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱 (2.5×20 cm), 分别用含 0、0.1、0.2、0.3、0.4 M NaCl 的此缓冲液进行洗脱, 流速 2 mL/min, 每根管收集 2 min, 于 280 nm 处检测各组蛋白含量, 并按蛋白酶活力测定方法检测各组分在 660 nm 的吸光

值,洗脱图谱见图1。

结果表明,洗脱液中共有A、B、C、D、E 5个蛋白吸收峰,蛋白酶活峰主要集中在A峰,蛋白酶未被填料吸附,这可能与洗脱缓冲溶液的pH值有关,但杂蛋白能较好地吸附在填料上,在一定程度上仍然实现了目标蛋白与杂蛋白的分离。收集蛋白酶活峰冷冻干燥,于4℃冰箱保藏备用。

### 2.1.2 Sephadex G-75 分子筛柱层析

将上一步所得蛋白酶溶于25 mM pH 7.2 Tris-HCl (含2 mM CaCl<sub>2</sub>)缓冲液后上Sephadex G-75分子筛层析柱(1.6×100 cm),并在此缓冲液体系下进行洗脱,流速0.5 mL/min,每根管收集8 min,分别于280 nm、660 nm下测定各个组分的蛋白含量与蛋白酶活力,洗脱图谱见图2。

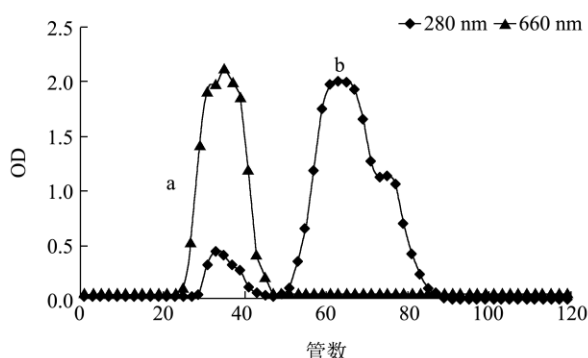


图2 Sephadex G-75 分子筛柱层析

Fig.2 Sephadex G-75 gel filtration column chromatography

结果表明,由Sephadex G-75分子筛柱层析后共收集到2个蛋白吸收峰a与b,酶活检测表明a峰为活性峰,且酶活峰能与a蛋白峰很好地重叠,说明该步骤分离效果较理想。

经以上分离纯化步骤,蛋白酶比活力显著提高,由4136.61 U/mg提升至26418.24 U/mg,纯化了6.39倍,产率为37.14% (表1)。

表1 *B. thuringiensis* SWJS07 所产蛋白酶的分离纯化

Table 1 Purification of protease from *B. thuringiensis* SWJS07

纯化步骤	总蛋白 /mg	总酶活 /U	比活力 /(U/mg)	纯化 倍数	产率 /%
粗酶液	27.34	113095	4136.61	1.00	100.00
硫酸铵沉淀	15.28	81994	5366.10	1.30	72.50
DEAE-Sephrose FF	3.41	60958	17876.25	4.32	53.90
Sephadex G-75	1.59	42005	26418.24	6.39	37.14

纯化所得蛋白酶的纯度采用 SDS-PAGE 电泳鉴定,电泳图如图3,如图所示,纯化后蛋白酶电泳图显示单一条带,表明以上分离纯化方法有效,经纯化后的蛋白酶达到电泳纯。根据标准蛋白分子量及相对迁移率,绘制标准曲线,计算出该蛋白酶的相对分子

质量为37.0 ku。

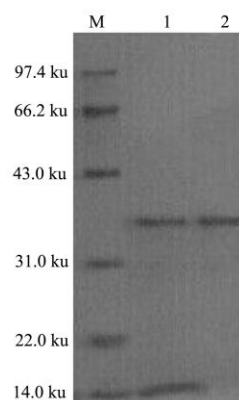


图3 蛋白酶的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 SDS-PAGE of purified protease

注: M: 标准蛋白质分子量; 1: 纯化前蛋白酶; 2: 纯化后蛋白酶。

## 2.2 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶的酶学性质

质

### 2.2.1 温度对 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶活的影响

在30~70℃范围内,测定不同温度对 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶活力的影响,考察酶促反应最适温度,结果见图4。

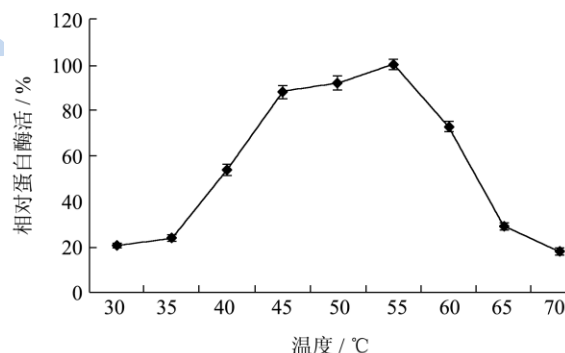


图4 温度对 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶活的影响

Fig.4 Effect of temperature on activity of protease from *B. thuringiensis* SWJS07

温度是影响酶促反应速率的重要因素,随着温度的升高,参加反应的活化分子数量增多,从而加快酶促反应速度;当温度持续升高,蛋白酶作为一种生物大分子物质会逐渐变性失去活性,从而使酶促反应速度下降,而蛋白酶的最适催化温度就是上述两种过程平衡的结果。*B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶在不同温度下酶促反应速率差异较大,结果如图4所示,30~55℃时蛋白酶活逐渐升高,超过65℃后蛋白酶活力急剧下降,当温度为70℃时,相对蛋白酶活力仅



剩 18.21%，在 45~55 °C 范围内蛋白酶具有较高活力，相对蛋白酶活均在 87% 以上，最适反应温度为 55 °C，属于中温蛋白酶。

### 2.2.2 温度对 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶热稳定性的影响

将蛋白酶在 30~65 °C 范围内分别保温 10~300 min，冰水迅速冷却后在各温度下测定蛋白酶残余活力，结果见图 5。

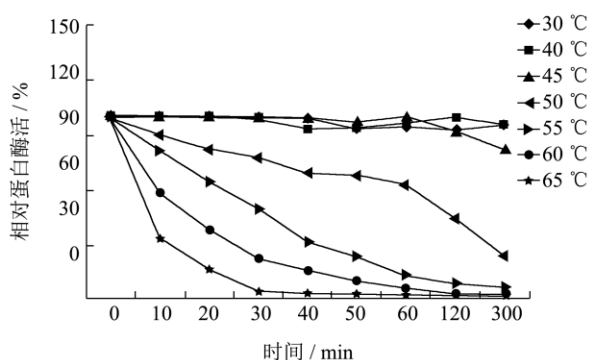


图 5 温度对 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶稳定性的影响

Fig.5 Effect of temperature on stability of protease from *B. thuringiensis* SWJS07

如图 5 所示，蛋白酶在 30~45 °C 较稳定，保温 300 min 相对蛋白酶活仍保持在 80% 以上，50 °C 以上蛋白酶热稳定性开始变差，55 °C 下保温 1 h 相对蛋白酶活残留仅剩 13.10%。

### 2.2.3 pH 对 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶活的影响

分别在 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液 (pH 5.5~7.5); Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0~9.5) 甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 10.0~12.0) 体系中考察不同 pH 对 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶活力的影响，结果见图 6。

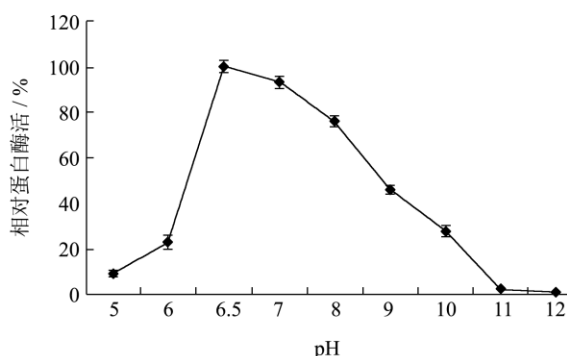


图 6 pH 对 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶活的影响

Fig.6 Effect of pH on activity of protease from *B. thuringiensis* SWJS07

由图 6 知，在 pH 5.0~12.0 范围内，该蛋白酶活力先升高后降低，其中在 pH 6.5 以下时相对酶活急剧下降，pH 6.0 时相对蛋白酶活仅 22.08%，在 pH 6.5~8.0

范围内具有较高相对酶活，均保持在 70% 以上，最适 pH 6.5，属于中性蛋白酶。

### 2.2.4 pH 对 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶稳定性的影响

将纯酶置于不同 pH 缓冲体系中，4 °C 冰箱保藏 0~24 h，分别检测蛋白酶残留量，结果见图 7。

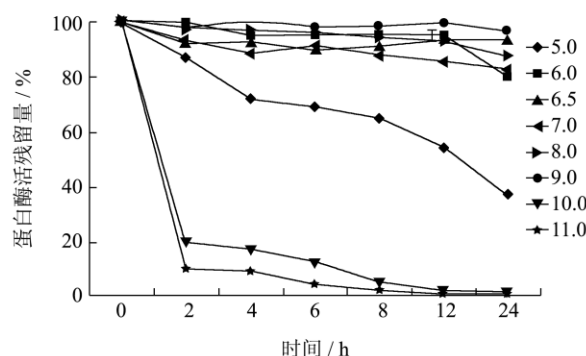


图 7 pH 对 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶稳定性的影响

Fig.7 Effect of pH on stability of protease from *B. thuringiensis* SWJS07

如图 7 所示，蛋白酶在 pH 6.0~9.0 稳定，保藏 24 h 蛋白酶活残留量在 80% 以上，在 pH 大于 10.0 的缓冲体系中，蛋白酶较敏感，保藏 2 h 以上蛋白酶活残留在下降到 20% 以下，这可能是由于强碱性环境可使该酶的构象发生变化而导致蛋白酶活迅速下降。

### 2.2.5 金属离子对 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶的影响

#### 2.2.5.1 不同价态金属离子对 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶活的影响

将不同价态的金属离子分别添加于纯酶液中，使其终浓度为 2 mM，30 °C 放置 30 min，在最适条件下测定蛋白酶活力，以未添加组作为空白对照，结果见表 2。

表 2 金属离子对 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶活的影响

Table 2 Effect of metal ions on activity of protease from *B. thuringiensis* SWJS07

<i>B. thuringiensis</i> SWJS07			
金属离子	相对酶活/%	金属离子	相对酶活/%
空白	100.00±2.10	ZnCl <sub>2</sub>	22.86±0.51
NaCl	103.23±1.62	FeCl <sub>2</sub>	32.18±0.90
KCl	99.48±1.21	CuSO <sub>4</sub>	23.72±0.86
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	101.05±0.83	CdCl <sub>2</sub>	0.81±0.10
CaCl <sub>2</sub>	106.28±1.54	HgCl <sub>2</sub>	1.09±0.11
BaCl <sub>2</sub>	101.71±1.90	FeCl <sub>3</sub>	21.23±0.61
MgSO <sub>4</sub>	98.73±2.17	Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	1.28±0.14
MnSO <sub>4</sub>	128.05±2.13		

结果表明，不同金属离子对蛋白酶活力影响各异 (表 2)，其中，Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Li<sup>+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>对蛋白酶

活基本无影响, 而  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 对蛋白酶活有较强的抑制作用, 试验浓度下可使蛋白酶活丧失 70%~80%, 这一试验结果与已报道的 *B. thuringiensis* 所产蛋白酶存在一定的差异。郑毅<sup>[9]</sup>对 *B. thuringiensis* FS140 蛋白酶的研究表明,  $Fe^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 对 FS140 蛋白酶具有较强的激活作用, 当其终浓度为 3 mM 时, 蛋白酶活分别提高了 40%、19%; 韩科<sup>[10]</sup>对 *B. thuringiensis* FZ62 蛋白酶研究表明, 3 mM  $Fe^{3+}$ 可使蛋白酶活提高 150%。 $Hg^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Al^{3+}$ 可强烈地抑制蛋白酶活, 试验浓度下, 几乎完全抑制了蛋白酶活, 而  $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 对蛋白酶有不同程度的激活作用, 其中  $Mn^{2+}$ 的激活作用最强, 能使蛋白酶活提高 28.05%。

### 2.2.5.2 $Mn^{2+}$ 和 $Ca^{2+}$ 在不同温度下对 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶活的影响

在纯酶液中分别添加 2 mM  $Ca^{2+}$ 与  $Mn^{2+}$ , 置于 30~70 °C 范围内, 测定不同反应温度下蛋白酶活力, 分别考察其最适温度, 将未添加任何离子的纯酶在 55 °C 下的蛋白酶活力定为 100%, 结果见图 8。

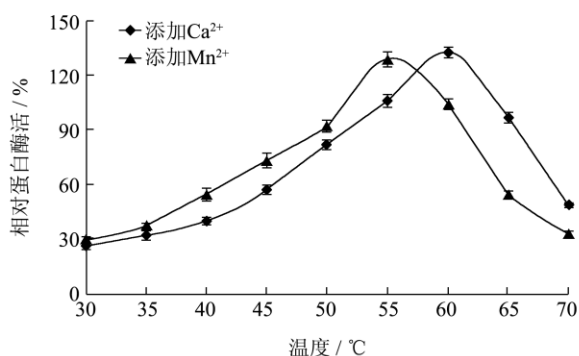


图 8  $Mn^{2+}$ 和  $Ca^{2+}$ 在不同温度下对 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶活的影响

Fig.8 Effect of temperature on protease from *B. thuringiensis* SWJS07 with  $Mn^{2+}$ and  $Ca^{2+}$

结果表明, 添加 2 mM  $Mn^{2+}$ 的纯酶最适催化温度为 55 °C, 在 55 °C、60 °C 相对蛋白酶活分别为 128.35% 和 105.27%; 添加 2 mM  $Ca^{2+}$ 的纯酶最适催化温度为 60 °C, 相对蛋白酶活为 132.86%, 在 50 °C~65 °C 相对蛋白酶活均保持在 80% 以上。这与已报道的一些研究结果相符, Gessesse<sup>[11]</sup>等对嗜碱菌来源的碱性蛋白酶 AR-68 进行研究, 结果表明, AR-68 最适作用温度为 55 °C, 而当添加了 5 mM  $Ca^{2+}$ 时, 该蛋白酶最适作用温度为 65 °C; Ghorbel<sup>[12]</sup>等研究了一株蜡芽芽胞杆菌所产蛋白酶的酶学性质, 结果表明该蛋白酶在未添加及添加 2 mM  $Ca^{2+}$ 的最适催化温度分别为 50 °C 和 60 °C, 且添加了 2 mM  $Ca^{2+}$ 蛋白酶的最高蛋白酶活力约是纯酶的 2.2 倍。

### 2.2.5.3 $Ca^{2+}$ 和 $Mn^{2+}$ 在高温下对 *B. thuringiensis*

### SWJS07 蛋白酶稳定性的影响

在纯酶液中分别添加 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mM 的  $Ca^{2+}$ 和  $Mn^{2+}$ , 以未添加任何离子的纯酶液为空白对照, 60 °C 保温 30 min 后冰水迅速冷却后分别在最适条件下测定蛋白酶活力, 将未经任何处理的纯酶液的酶活定为 100%, 结果见图 9。

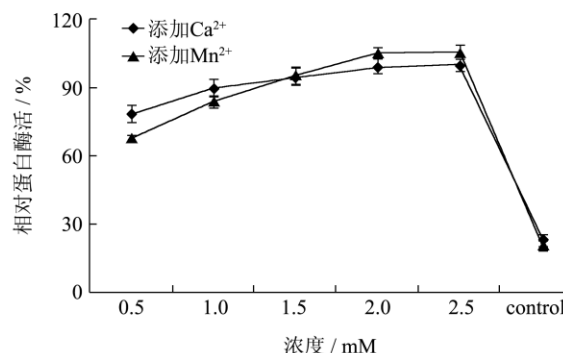


图 9  $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 对 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶热稳定性的影响

Fig.9 Effect of  $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  on the most stability of protease from *B. thuringiensis* SWJS07

结果表明, 空白对照在试验条件下相对蛋白酶活仅剩 21.02%, 而添加  $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 均能显著提高蛋白酶在高温条件下的热稳定性, 且随着添加浓度的增大, 蛋白酶的热稳定性逐渐提升后趋于平稳, 当添加量为 2 mM 时, 蛋白酶相对酶活分别为 103.82%、101.61%。这可能是由于  $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 加强了蛋白酶分子内的相互作用, 使得蛋白酶分子的结构更加稳固, 不易受到外界因素的破坏。此外还可能是由于  $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 能与蛋白酶结合在一起, 降低了蛋白酶的自我分解。

### 2.2.6 蛋白抑制剂对 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶的影响

在纯酶液中分别添加 1 mM、5 mM 的 EDTA- $Na_2$ 、DTNB、PMSF, 30 °C 放置 20 min, 测定蛋白酶活力, 以未添加蛋白抑制剂的作为空白对照, 结果见表 3。

蛋白酶抑制剂具有专一性, 它能够与蛋白酶活性中心上的一些基团结合相结合, 而使蛋白酶活力下降甚至消失。PMSF 为丝氨酸蛋白酶抑制剂; DTNB 为巯基蛋白酶抑制剂, 该化合物能够与含巯基化合物反应, 断裂 DTNB 的二硫键产生  $NTB^-$ ; EDTA- $Na_2$  为金属蛋白酶抑制剂, 能够螯合金属蛋白酶活性中心的金属离子。从表 3 可以看出, 1 mM 和 5 mM 的 DTNB、PMSF 对蛋白酶的抑制作用并不明显, 而 EDTA- $Na_2$  可强烈抑制蛋白酶活, 浓度为 1 mM 时, 相对蛋白酶活仅剩 1.63%, 推测该蛋白酶属于金属蛋白酶, 而  $Mn^{2+}$ 对蛋白酶有明显的激活作用, 猜测其活性中心结构中可能含有  $Mn^{2+}$ 。

表3 抑制剂对 *B. thuringiensis* SWJS07 所产蛋白酶的影响Table 3 Effect of inhibitors of protease from *B. thuringiensis*

SWJS07		
抑制剂	浓度/mM	相对酶活/%
空白		100.00±1.91
EDTA-Na <sub>2</sub>	1	1.63±0.37
	5	0.61±0.15
DTNB	1	90.89±1.52
	5	84.84±2.01
PMSF	1	98.74±0.85
	5	88.92±0.64

### 2.2.7 动力学常数测定

在蛋白酶最适反应条件下, 改变底物酪蛋白浓度, 使其在反应体系中的终浓度分别为 1、3、5、7、9、11、13 g/L, 测定各底物浓度下的蛋白酶活力。根据米氏方程, 采用双倒数法, 求出该蛋白酶的米氏常数  $K_m$  为 46.85  $\mu\text{g/L}$ ,  $V_{\max}$  为  $3.51 \times 10^{-3} \mu\text{g/(L s)}$ 。

## 3 结论

目前, 虽然有苏云金芽孢杆菌产蛋白酶的相关报道, 但对深海来源的研究尚未见报道, 且 *B. thuringiensis* SWJS07 蛋白酶与已报道的苏云金芽孢杆菌所产蛋白酶性质各异, 是一种新型的蛋白酶。Sugumaran<sup>[13]</sup>等对一株 *B. thuringiensis* MTCC 1953 进行研究, 该菌株所产蛋白酶最适反应温度为 50  $^{\circ}\text{C}$ , 最适 pH 10; Agasthya<sup>[14]</sup>等从屠宰场附近泥土中筛选出一株产蛋白酶苏云金芽孢杆菌, 此蛋白酶最适反应温度为 47  $^{\circ}\text{C}$ , 最适 pH 8。此外,  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  能显著提高蛋白酶热稳定性这一性质使得该酶在高温条件下的高效催化成为可能。

## 参考文献

- [1] Mostafa E S E, Saad M M, Awad H M, et al. Optimization conditions of extracellular proteases production from a newly isolated *Streptomyces pseudogrisiolus* NRC-15 [J]. Journal of Chemistry, 2012, 9(2): 949-961
- [2] Zhang C, Kim S K. Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects [J]. Marine drugs, 2010, 8(6): 1920-1934
- [3] Kato N, Nagasawa T, Tani Y, et al. Protease formation by a marine psychrophilic bacterium [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1972, 36(7): 1177-1184
- [4] 艾云灿. 关于发展我国海洋微生物学及微生物技术的若干思考与实践[J]. 热带海洋学报, 2006, 1: 1
- [5] AI Yun-can. Strategy and practice for development of marine microbiology and biotechnology in China [J]. Journal of Tropical Oceanography, 2006, 1: 1
- [5] SB/T 10317-1999 蛋白酶活力测定法[S]
- [6] 郇惠杰, 钟泓波, 雷芬芬, 等. 产蛋白酶海洋细菌的筛选, 鉴定及发酵培养基的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(24): 181-185
- [6] HUAN Hui-jie, ZHONG Hong-bo, LEI Fen-fen, et al. Isolation and identification of protease-producing marine bacteria and optimization of fermentation medium [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(24): 181-185
- [7] Bradford M M. 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): 248-254
- [8] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685
- [9] 郑毅. 苏云金芽孢杆菌 FS140 菌株蛋白酶的研究[D]. 福建农林大学, 2008
- [9] ZHENG Yi. Studies on the protease from bacillus thuringiensis FS140 strain [D]. Fujian Agriculture and Forestry University, 2008
- [10] 韩科. 苏云金芽孢杆菌 FZ62 蛋白酶分离纯化及性质研究[D]. 福建师范大学, 2009
- [10] HAN Ke. Studies on purification and characteristics of proteinase from bacillus thuringiensis FZ62 [D]. Fujian Normal University, 2009
- [11] Gessesse A, Gashe B A. Production of alkaline protease by an alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline soda lake [J]. Biotechnology letters, 1997, 19(5): 479-481
- [12] Ghorbel B, Sellami-Kamoun A, Nasri M. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32(5): 513-518
- [13] Sugumaran K R, Ponnusami V, Gowdhaman D, et al. Thermo stable alkaline protease production from *Bacillus thuringiensis* MTCC 1953: optimisation and kinetic studies [J]. International Journal of Chem Tech Research, 2012, 4(1): 198-202
- [14] Agasthya A S, Sharma N, Mohan A, et al. Isolation and molecular characterisation of alkaline protease producing *Bacillus thuringiensis* [J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2013, 66(1): 45-51

现代食品科技