

高强度耐有机溶剂蛋白酶的纯化及性质

姚忠, 孙蓓蓓, 李霜, 何冰芳

(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

摘要: 分离纯化了自行筛选的耐有机溶剂的地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* YP1 所产的溶剂稳定性蛋白酶. 发酵液经硫酸铵沉淀、疏水层析及强阳离子交换层析纯化, 得到电泳纯的蛋白酶; 分子量约为 28 kDa, 纯化蛋白酶的比酶活达到 1.18×10^5 U/mg, 纯化倍数为 37.2, 酶活回收率为 20.8%. 纯化的 YP1 蛋白酶对 50%(v/v) 的多种亲水或疏水有机溶剂具有很高的耐受性, 其中 50%(v/v) 的 DMF 和 DMSO 能显著促进 YP1 蛋白酶活力. YP1 蛋白酶为 Zn^{2+} 蛋白酶, 最适反应温度为 55 °C, 最适反应 pH 为 10.0, pH 8.0~13.0 范围内具有高活力. 以酪蛋白为底物, YP1 蛋白酶的米氏常数 K_m 为 0.048 g/L.

关键词: 碱性蛋白酶; 耐有机溶剂; 地衣芽孢杆菌; 纯化; 表征

中图分类号: Q556.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2008)06-1195-05

1 前言

蛋白酶是一类重要的工业用酶, 广泛应用于洗涤剂、食品、制药、制革、诊断试剂及污水处理等领域^[1,2]. 自 1937 年首次报道采用蛋白酶催化肽合成以来, 由于其与化学催化肽合成相比具有避免使用昂贵的侧链保护基团及危险性化学试剂等优点, 已大量应用于小肽合成^[3-5]. 在含高浓度亲水有机溶剂体系中, 酶催化反应会快速向氨基酸脱水缩合形成肽键方向进行, 而添加高浓度的亲水性溶剂往往导致酶的失活^[6].

溶剂稳定性蛋白酶是近年来发现的一类新型蛋白酶, 在有机溶剂中具有稳定的天然特性, 由耐有机溶剂的假单胞菌^[7,8]和蜡状芽孢杆菌^[9]等极端微生物产生. 已报道的耐有机溶剂蛋白酶对疏水性有机溶剂具有耐受性, 而对亲水性有机溶剂耐受性相对较弱, 一般在 pH>9 的反应体系中活力显著降低.

本实验室自行筛选出一株耐有机溶剂的地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* YP1, 所产胞外蛋白酶具有对高浓度亲水及疏水有机溶剂的耐受性及极端的耐碱性, 推测为新酶, 有望在非水酶催化及洗涤剂领域应用^[10]. 本工作对 *Bacillus licheniformis* YP1 的耐有机溶剂蛋白酶进行了分离纯化和酶学性质表征.

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 菌株

耐有机溶剂地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis*

YP1 为本实验室自行筛选并保存.

2.1.2 试剂

分子量标准蛋白为 Sigma 公司产品, 各种有机溶剂均为国产分析纯试剂.

2.2 方法

2.2.1 粗酶液的制备

参照文献[10]对 *B. licheniformis* YP1 进行产酶发酵, 发酵液低温离心, 上清为粗酶液.

2.2.2 蛋白酶活力测定

参照文献[7]略作修改: 以 10 g/L 酪蛋白(0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 10.0)为底物, 取酶液 1 mL 加入 2 mL 底物中, 置于 40 °C 水浴中反应 10 min 后, 加入 3 mL 100 g/L 三氯乙酸终止反应, 室温下静置 15 min, 以 10000 r/min 离心 10 min, 取上清 1 mL 加入 5 mL 0.55 mol/L 碳酸钠溶液、1 mL Folin-酚试剂, 充分混合后置于 40 °C 水浴中显色 15 min, 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 A_{650} . 定义在相应条件下, 1 min 催化产生 1 μ g 酪氨酸所需的酶量为一个酶活力单位(U).

2.2.3 蛋白含量测定

采用 Bradford 法^[11], 标准蛋白为牛血清白蛋白(BSA).

2.2.4 SDS-PAGE 电泳分析

采用浓度为 12.5% 的十二烷基磺酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)垂直板电泳^[12].

2.2.5 米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} 的测定

参照文献[13], 以酪蛋白为底物, 用 pH 10.0 的

Glycine-NaOH 缓冲液配成不同浓度的底物溶液, 测定不同底物浓度下蛋白酶的催化反应速度, 根据 Lineweaver-Burk 法计算 K_m 和 V_{max} .

3 结果与讨论

3.1 蛋白酶的分离纯化

3.1.1 硫酸铵沉淀

向粗酶液中缓慢加入研细的固体硫酸铵, 至 80% 饱和度, 4℃ 下静置过夜, 离心弃上清, 沉淀用少量 pH 9.0 的 Gly-NaOH 溶解.

3.1.2 Phenyl Sepharose HP 柱层析

硫酸铵沉淀的 Gly-NaOH 溶解液上 Phenyl Sepharose HP 疏水层析柱, 采用阶段洗脱(缓冲液 A: 1.0 mol/L NaCl, 50 mmol/L pH 9.0 的 Gly-NaOH 缓冲液; 缓冲液 B: 50 mmol/L pH 9.0 的 Gly-NaOH 缓冲液), 结果示于图 1, 酶活出现于 50% B 缓冲液处. 合并蛋白酶活性组分, 在 pH 8.6 的 Gly-NaOH 缓冲液中 4℃ 透析过夜.

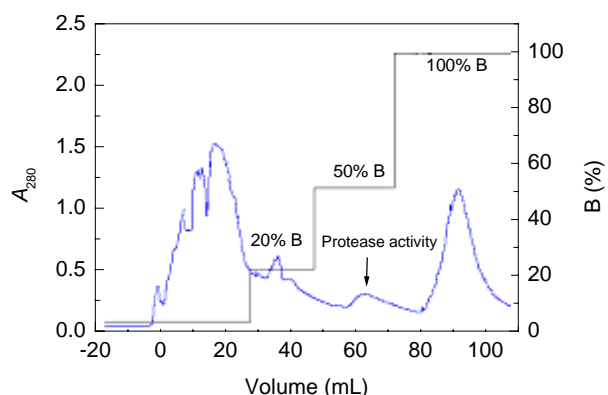


图1 CL-4B 疏水层析纯化 YP1 蛋白酶
Fig.1 YP1 protease purification by Phenyl Sepharose CL-4B chromatography

3.1.3 SP Sepharose™ FF 柱层析

透析后组分通过 SP 强阳离子柱进行分离纯化, 采用 10%~50% B 梯度洗脱(缓冲液 A: 50mmol/L pH 8.6 的 Gly-NaOH 缓冲液, 缓冲液 B: 1 mol/L NaCl, 50 mmol/L pH 8.6 的 Gly-NaOH 缓冲液), 结果如图 2 所示. 活性组分出现在 16% B 处, 可见该蛋白酶不易吸附于离子交换柱上, 可能与其蛋白表面疏水性较强或等电点接近 pH 8.6 有关.

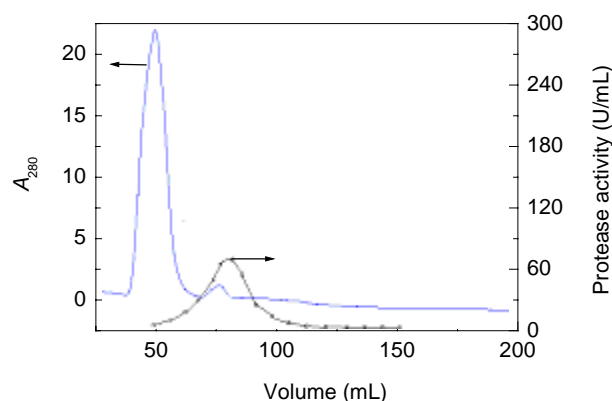
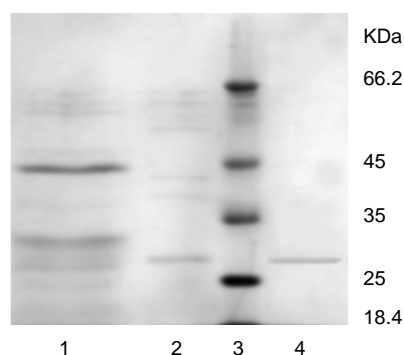


图2 SP 强阳离子层析纯化 YP1 蛋白酶的活性及吸光度
Fig.2 Protease activity and A_{280} of YP1 protease purification by SP Sepharose cation ion exchange chromatography

蛋白酶的纯化倍数和回收率见表 1, 通过硫酸铵沉淀、疏水层析及强阳离子交换层析, 比活力提高了 37.2 倍, 酶活力回收率达 20.83%. 分离纯化产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)表明纯化的蛋白酶已达到电泳纯(图 3), 该蛋白酶的分子量约为 28 kDa. 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 以酪蛋白为底物, YP1 蛋白酶的米氏常数 K_m 为 0.048 g/L, 最大反应速度 V_{max} 为 3.27 $\mu\text{g}/\text{min}$.



Lane 1. Protease by ammonium sulfate precipitation
2. Pooled protease fractions from Phenyl Sepharose FF
3. Molecular mass marker proteins
4. Purified protease

图3 YP1 蛋白酶纯化电泳图
Fig.3 Electrophoresis result with 12.5% cross-linked polyacrylamide gel

表 1 YP1 蛋白酶的分离纯化结果

Table 1 Purification results of protease in culture supernatant of *B. licheniformis* YP1

Method	Total activity (U)	Total enzyme (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery rate (%)	Purification (fold)
Crude extraction	167 700	53.0	3166	100	1
Ammonium sulfate precipitation	132 900	31.3	4 244	79.3	1.30
Phenyl SepharoseFF chromatography	63 830	1.09	58 830	38.1	18.6
SP Sepharose FF chromatography	34 930	0.296	117 800	20.8	37.2

3.2 蛋白酶性质

3.2.1 酶的最适反应温度与热稳定性

pH 10.0 条件下, 以酪蛋白为底物, 于不同温度下测定酶活力. 图 4 表明, YP1 蛋白酶的最适反应温度为 55 °C.

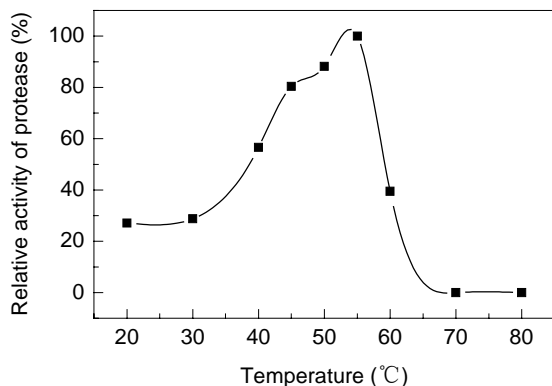


图 4 温度对 YP1 蛋白酶活力的影响
Fig.4 Effect of temperature on the activity of purified YP1 protease

纯化的 YP1 蛋白酶的热稳定性如图 5 所示, 该酶在 40 和 45 °C 分别保温 1 h 后, 酶活几乎不变; 于 50 °C 保温 1 h 后, 酶活残留 75% 左右. 因此本实验在 40 °C 下进行蛋白酶的活力检测.

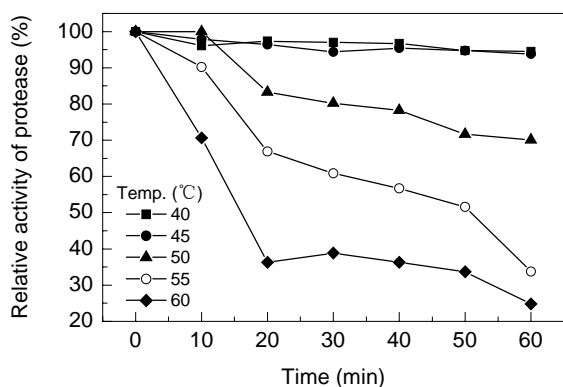


图 5 不同温度下 YP1 蛋白酶的热稳定性
Fig.5 Thermal stability of purified YP1 protease at different temperatures

3.2.2 酶的最适反应 pH 与 pH 稳定性

以酪蛋白为底物, 在不同 pH 缓冲体系中测定蛋白酶活力. 由图 6 可见, YP1 蛋白酶在很宽的 pH 范围(8~13)内具有较高活力, 该酶的最适反应 pH 为 10. 已报道的碱性蛋白酶通常在 pH 11 以上时几乎丧失活力^[14,15], 而本研究的 YP1 蛋白酶在 pH 13 的体系中仍然保留 85% 的活力, 体现了超常的耐碱性能.

3.2.3 金属离子对蛋白酶活力的影响

在 YP1 蛋白酶中加入 5 mmol/L 乙二胺四乙酸

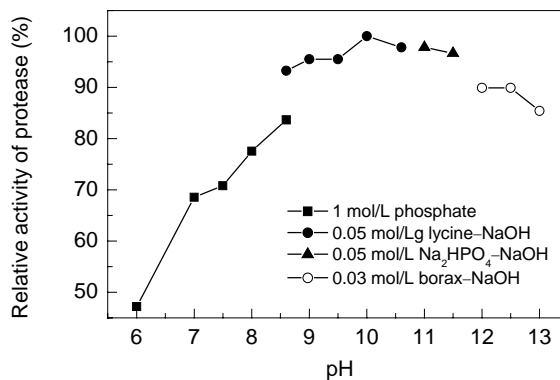


图 6 pH 对 YP1 蛋白酶活力的影响
Fig.6 pH dependence of the purified YP1 protease

(Ethylene Diamine-N,N-tetraacetic Acid, EDTA), 于 4 °C 下放置 30 min. 图 7 表明 EDTA 对蛋白酶有显著的抑制作用, 添加各种金属离子后被抑制的蛋白酶活力均有一定程度的恢复, 其中加入 Zn²⁺ 后蛋白酶活力显著高于原蛋白, 由此推测该蛋白酶为金属(Zn²⁺)蛋白酶.

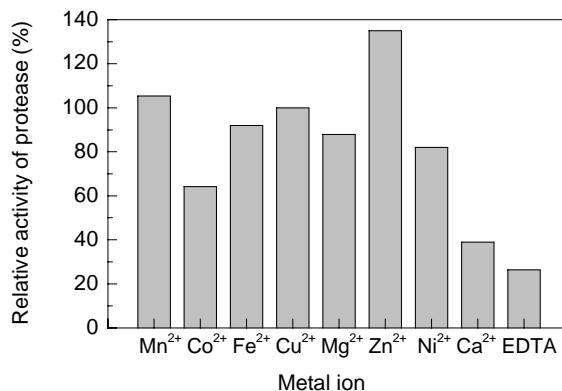


图 7 金属离子对被 EDTA 抑制的 YP1 蛋白酶的酶活恢复作用
Fig.7 Activity recovery of EDTA-inhibited YP1 protease by addition of different metal ions

3.2.4 有机溶剂对蛋白酶活力的影响

纯化后的 YP1 酶液与等体积有机溶剂混合后, 置于 40 °C 水浴摇床中, 160 r/min 振荡 1 h 后测定酶活, 其相对活力如图 8 所示. YP1 蛋白酶对多种亲水或疏水有机溶剂具有很高的耐受性, 特别是在亲水性有机溶剂中的稳定性显著超过胰蛋白酶(Trypsin), 仅有丁醇和环己烷处理后酶活力有一定下降, 蛋白酶活力分别为对照的 69% 和 72%; 亲水性溶剂二甲基甲酰胺(Dimethyl Formamide, DMF)和二甲基亚砷(Dimethyl Sulphoxide, DMSO)反而能促进该蛋白酶活力, 处理后的蛋白酶活力分别为对照的 128% 和 132%. 蛋白质在溶液中的稳定性取决于电荷层与水化层, 亲水性有机溶剂极易夺取蛋白表面的水化层, 导致蛋白变性或失活. 通常 50%(v/v)的丙酮体系是蛋白质沉淀所用体系, 而本研究的蛋白酶在此

体系中搅拌 1 h 后既无沉淀, 其酶活也几乎无变化, 显示了高度的稳定性, 预示着该蛋白酶可能具有独特的结构与表面电荷分布等, 有待进一步研究。

本研究采用了 50%(φ)的有机溶剂浓度, 大大超过了现有报道的耐有机溶剂蛋白酶稳定性检测的 25%(φ)有机溶剂浓度^[16-18]。特别是高浓度亲水性有机溶剂体系是酶法催化小肽合成的高效体系, 该蛋白酶在各种有机溶剂中的高度稳定性显示了其在非水酶催化如小肽酶法合成中的应用前景。

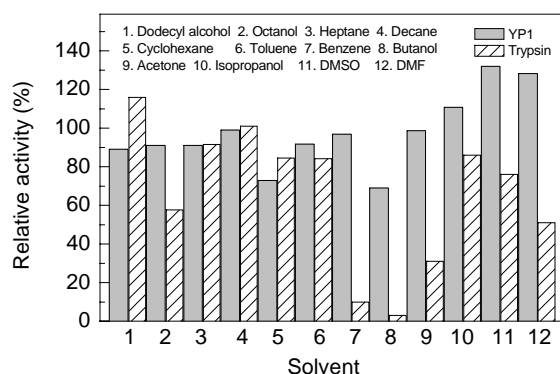


图 8 50%(φ)有机溶剂对 YP1 蛋白酶和胰蛋白酶稳定性的影响
Fig.8 Effect of 50%(φ) organic solvents on the stability of purified protease and trypsin

4 结论

(1) 对耐有机溶剂的地衣芽孢杆菌 YP1 中的耐有机溶剂蛋白酶进行了分离纯化, 通过硫酸铵沉淀、疏水及强阳离子交换层析, 比酶活力提高了 37.2 倍, 达 1.18×10^5 U/mL, 酶活力回收率达 20.8%。分离纯化产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳表明已达到单泳带, 分子量约为 28 kDa。

(2) 纯化的 YP1 蛋白酶在很宽的 pH 范围(8.0~13.0)内具有较高活力, 最适反应 pH 为 10.0, 最适反应温度为 55 °C, 45 °C 以下时有良好的稳定性。以酪蛋白为底物时, YP1 蛋白酶的米氏常数 K_m 为 0.048 g/L。

(3) YP1 蛋白酶为金属蛋白酶, 被金属螯合剂 EDTA 抑制后, 加入 Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} 等金属离子可恢复酶活, 其中 Zn^{2+} 能显著提高 YP1 蛋白酶活力。

(4) YP1 蛋白酶对 50%(φ)的多种亲水或疏水有机溶剂具有很高的耐受性, 在亲水性有机溶剂中的稳定性显著高于胰蛋白酶, 有机溶剂 DMF 和 DMSO 能显著促进 YP1 蛋白酶活力, 处理后的酶活力分别达 128% 和 132%。该蛋白酶的独特性能有望在非水酶催化及洗涤剂等领域中进行开发与应用。

参考文献:

[1] Anwar A, Saleemuddin M. Alkaline Proteases: A Review [J]. Bioresource Technol., 1998, 64(3): 175-183.

- [2] Gupta R, Beg Q K, Lorenz P. Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, 59(1): 15-32.
- [3] Sergeeva M V, Paradkar V M, Dordick J S. Peptide Synthesis Using Proteases Dissolved in Organic Solvents [J]. Enzyme Microb. Technol., 1997, 20(8): 623-628.
- [4] Ogino H, Yamada M, Watanabe F, et al. Peptide Synthesis Catalyzed by Organic Solvent-stable Protease from *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 in Monophasic Aqueous-Organic Solvent Systems [J]. J. Biosci. Bioeng., 1999, 88(5): 513-518.
- [5] Kumar D, Bhalla T C. Microbial Proteases in Peptide Synthesis: Approaches and Applications [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2005, 68(6): 726-736.
- [6] Gupta M N. Enzyme Function in Organic Solvents [J]. Eur. J. Biochem., 1992, 203(1/2): 25-32.
- [7] Geok L P, Razak C N A, Rahman R N Z A, et al. Isolation and Screening of an Extracellular Organic Solvent-tolerant Protease Producer [J]. J. Biochem. Eng., 2003, 13(1): 73-77.
- [8] Gupta A, Khara S K. A Protease Stable in Organic Solvents from Solvent Tolerant Strain of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Bioresour. Technol., 2006, 97(15): 1788-1793.
- [9] Ghorbel B, Kamoun A S, Nasri M. Stability Studies of Protease from *Bacillus cereus* BG1 [J]. Enzyme Microb. Technol., 2003, 32(5): 513-518.
- [10] Li S, He B F, Bai Z Z, et al. A Novel Organic Solvent-stable Alkaline Protease from Organic Solvent-tolerant *Bacillus licheniformis* YP1A [J/OL]. J. Mol. Catal. B: Enzym., DOI:10.1016/j.molcatb.2008.08.001.
- [11] Bradford M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding [J]. Anal. Biochem., 1976, 72: 248-254.
- [12] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 42-47.
- [13] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2002. 86-89.
- [14] Beg Q K, Gupta R. Purification and Characterization of an Oxidation-stable, Thiol-dependent Serine Alkaline Protease from *Bacillus mojavensis* [J]. Enzyme Microb. Technol., 2003, 32(2): 294-304.
- [15] Rahman R N Z R A, Geok L P, Basri M. An Organic Solvent-stable Alkaline Protease from *Pseudomonas aeruginosa* Strain K: Enzyme Purification and Characterization [J]. Enzyme Microb. Technol., 2006, 39(7): 1484-1497.
- [16] Ogino H, Watanabe F, Yamada M, et al. Purification and Characterization of Organic Solvent-stable Protease from Organic Solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 [J]. J. Biosci. Bioeng., 1999, 87(1): 61-68.
- [17] Gupta A, Roy I, Khare S K, et al. Purification and Characterization of a Solvent Stable Protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA [J]. J. Chromatography A, 2005, 1069(2): 155-161.
- [18] Wang S L, Yeh P Y. Purification of a Surfactant- and Solvent-stable Alkaliphilic Protease by Bioconversion of Shrimp Shell Wastes Fermented by *Bacillus subtilis* TkU007 [J]. Process. Biochem., 2006, 41: 1545-1552.

Purification and Characterization of Protease with High Stability in Organic Solvents

YAO Zhong, SUN Bei-bei, LI Shuang, HE Bing-fang

(College of Life Science and Pharmaceutical engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: A novel solvent-tolerant protease was produced by a solvent-tolerant *Bacillus licheniformis* YP1 strain isolated from soil. The protease was purified by precipitation with ammonium sulfate, hydrophobic interaction chromatography and cation exchange chromatography, leading to 37.2-fold purification with 20.8% recovery rate. The product showed eletrophoretic homogeneity, as identified by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and the specific activity of the purified protease reached 1.18×10^5 U/mg. SDS-PAGE analysis indicated that the relative molecular mass of the protein was about 28 kDa. The protease was stable and active in all the tested solvents and the protease activity was significantly enhanced in the presence of 50%(φ) DMSO and DMF. The protease was considered as a Zn^{2+} -complexed enzyme with an optimal reaction temperature of 55 °C. The enzyme was stable in the pH range of 8.0~13.0, with an optimum pH of 10.0. The Michaelis constant for caseinolytic activity was 0.048 g/L.

Key words: alkaline protease; solvent tolerance; *Bacillus licheniformis* YP1; purification; stability