

耐热嗜碱蛋白酶基因的克隆、 表达及其酶学性质分析

谢爱连¹, 林碧瑜¹, 牛丹丹^{1*}, NOKUTHULA Peace Mchunu², 叶秀云¹

(1.福州大学生物科学与工程学院,福建省海洋酶工程重点实验室,福建福州 350108;

2.Department of Biotechnology and Food Technology, Faculty of Applied Sciences, Durban University of Technology, Natal Durban 4000)

摘要:碱性蛋白酶是一类重要的工业酶制剂。为进一步提高碱性蛋白酶在高温碱性条件下的活力,增强其工业应用价值,本文从地衣芽胞杆菌 CCTCC M2018539 中首先通过 PCR 扩增获得碱性蛋白酶编码基因 *aprE539* 并克隆入表达载体 pND-113 中,在枯草芽胞杆菌 WB600 中实现碱性蛋白酶 AprE539 的表达;重组酶 AprE539 经硫酸铵沉降(30%~70%)、透析、DEAE 阴离子交换和超滤获得纯酶,并以 SDS-PAGE 电泳测定 AprE539 的分子量大小。结果表明, AprE539 的分子量大小为 30 kDa。进一步对其酶学性质研究表明: AprE539 的最适作用 pH 为 11.0,最适作用温度为 65~70 °C;在 pH6.0~12.0 范围内具有较好的稳定性;在 60 °C 保温 1 h 后酶活剩余 70%; Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对酶活有明显促进作用。AprE539 在氨基酸序列上仅有 2 个氨基酸残基与碱性蛋白酶 2709 存在差异,但其酶学特征差异明显,为后续进一步探究其酶学性质差异性奠定基础。

关键词:地衣芽胞杆菌,耐热嗜碱性蛋白酶,克隆与表达,酶学性质

Gene Cloning, Expression and Enzymatic Properties of a Thermotolerant and Alkalophilic Protease Gene

XIE Ai-lian¹, LIN Bi-yu¹, NIU Dan-dan^{1*}, NOKUTHULA Peace Mchunu², YE Xiu-yun¹

(1.Key Laboratory of Marine Enzyme Engineering of Fujian Province,

College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China;

2.Department of Biotechnology and Food Technology, Faculty of

Applied Sciences, Durban University of Technology, Durban 4000, South Africa)

Abstract: Alkaline protease is one of the most important industrial proteases. To further improve its activity under high temperature alkaline conditions and enhance its industrial application values, the alkaline protease-encoding gene *aprE539* was obtained by PCR amplification from *Bacillus licheniformis* CTCCC M2018539 and cloned into the expression vector pND-113 to express alkaline protease AprE539 in *Bacillus subtilis* WB600 in this study. The recombinant AprE539 was purified by ammonium sulfate precipitation (30%~70%), dialysis, DEAE anion sepharose anion-exchange chromatography separating to obtain pur enzyme. And the molecular weight of the purified AprE539 was determined by SDS-PAGE. The experimental results were as follows: The molecular weight of the purified AprE539 was 30 kDa. The recombinant AprE539 had the maximum activity at pH11.0 and 65~70 °C. It was stable at pH6.0~12.0 and remained about 70% of the activity after incubation at 60 °C for 1 h. Its activity was significantly enhanced with the existence of Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} . Two amino acid residues difference were found between AprE539 and alkaline protease 2709. However their properties were different remarkably, which would lay a foundation for further exploring the differences of their enzymatic properties.

Key words: *Bacillus licheniformis*; thermotolerant and alkalophilic protease; cloning and expression; enzymatic properties

中图分类号: TS201.2*5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)20-0101-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.20.017

引文格式: 谢爱连, 林碧瑜, 牛丹丹, 等. 耐热嗜碱蛋白酶基因的克隆、表达及其酶学性质分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(20): 101-106.

收稿日期: 2019-01-22

作者简介: 谢爱连(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 酶工程, E-mail: 1428763237@qq.com。

* 通讯作者: 牛丹丹(1980-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 工业微生物育种与酶工程, E-mail: ddniu0529@fzu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金(31601407); 海洋生物酶工程创新服务平台(2014FJPT02)。

碱性蛋白酶是指在碱性条件下能够水解蛋白质肽键的蛋白酶,是工业酶制剂中使用量最大的酶制剂之一,其分子量一般在 15~40 kDa 大小之间,等电点(pI)大多数处于 8.0~9.0 之间^[1-4]。碱性蛋白酶在食品加工行业中的应用,主要集中在大米蛋白的酶解^[5]、花芸豆多肽的提取^[6]、面包制作、蛋白水解产物苦味的脱除等方面^[7-9]。

地衣芽胞杆菌 2709 菌株生产的碱性蛋白酶,是目前我国工业上使用最广的碱性蛋白酶,也是我国生产量最大的碱性蛋白酶^[10-12]。地衣芽胞杆菌碱性蛋白酶 2709,是典型的 Subtilisin Carlsberg 类蛋白酶,其编码基因有 1140 bp,由信号肽(长度 87 bp)、前导肽(长度 228 bp)以及成熟肽(长度 825 bp)组成。碱性蛋白酶可以有效的加速干酪的生产和成熟,用于干酪制品的制作^[13-14];碱性蛋白酶可以水解诸如大豆蛋白、大米蛋白、花生蛋白等植物蛋白,用于功能食品的开发^[15-18]。碱性蛋白酶 2709 的最适作用 pH 在 9.5 左右,与目前国际上采用最适作用 pH 可以达到 10.5~12.0 其他细菌来源的碱性蛋白酶有一定差距;在耐热性能方面,碱性蛋白酶 2709 不耐热,不适合在高温条件下应用^[19-22]。因此挖掘耐热嗜碱新型蛋白酶资源依然是研究的热点。

本研究基于碱性条件(pH12)对前期^[23]所保藏的微生物菌种进行产碱性蛋白酶能力复筛,获得一株在碱性条件下作用性能优于地衣芽胞杆菌碱性蛋白酶 2709 的菌株,此菌株经鉴定为地衣芽胞杆菌,编号为 BL236,并在中国典型培养物保藏中心保藏,保藏号为 CCTCC NO: M2018539。本研究就其编码基因进行了克隆、表达与酶学特征解析,以期为新型碱性蛋白酶的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*) WB600、地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*) CCTCC M2018539、枯草芽胞杆菌重组菌 WB600(pND-113)、枯草芽胞杆菌重组菌 WB600(pND-aprE2709)以及表达载体 pND-113^[24]均来自福州大学生物科学与工程学院酶工程研究所;胰蛋白酶、酵母提取物 英国 Oxoid 公司;三氯乙酸(TCA)、无水碳酸钠、NaCl、乳糖、硫酸铵、柠檬酸三钠、K₂HPO₄·3H₂O、KH₂PO₄ 国药集团化学试剂有限公司;酪蛋白 上海生工生物工程有限公司;脱脂奶粉 内蒙古伊利实业集团股份有限公司;琼脂粉、福林酚试剂 北京索来宝公司;豆饼粉 福州福大百特生物科技有限公司;限制性内切酶 *Sma*I、*Bam*HI 和 T₄ DNA 连接酶 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒 OMEGA 公司;LA Taq DNA 聚合酶、核酸分子量标准品(1 kb DNA Ladder(Dye Plus))、蛋白质分子量标准、硫酸卡那霉素 宝生物工程(大连)有限公司;PCR 扩增所用引物 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;其他试剂 均为国产分析纯;LB

培养基(g/L):胰蛋白酶 1%,酵母提取物 0.5%,NaCl 1%,pH7.0~7.2,121 °C 灭菌 20 min。蛋白酶鉴定培养基(g/L):在 LB 培养基中添加 0.5% 的脱脂奶粉,1%~2% 的琼脂粉,调节 pH 至 7.0;发酵培养基(g/L):乳糖 2%,豆饼粉 2%,硫酸铵 0.5%,柠檬酸三钠 0.25%,K₂HPO₄·3H₂O 1.8%,KH₂PO₄ 0.3%,调节 pH 至 7.0。

Lynx 400 高速落地冷冻离心机、CF-16RX 梯度热循环 PCR 仪 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;AKTA pure system H8 蛋白纯化仪 GE 医疗集团;AE-8150 蛋白电泳仪 日本 ATTO 公司;TU-100C 恒温金属浴 上海一恒科技有限公司;DYCP-31DN 核酸水平电泳槽 北京市六一仪器厂;30 kDa 超滤离心管 北京索来宝科技有限公司;OHRUS pH 计 奥豪斯仪器(常州)有限公司。

1.2 AprE539 蛋白酶编码基因的分子克隆与异源表达

1.2.1 蛋白酶编码基因的克隆及重组质粒的构建 PCR产物和质粒的纯化、酶切、连接、转化以及转化子的筛选等均按照实验室常规方法进行^[25],使用试剂盒时按照试剂盒说明书进行。以地衣芽胞杆菌 CCTCC M2018539 基因组 DNA 为模板,aprE-BL1(5'-AGC GGATCCGCTCAGCCGCGCAAATG-3',下划线为引入的 *Bam*HI 酶切位点)和 aprE-BL2(5'-GGGTTATTGAGCGGCAGCTTCGACAT-3')为引物,进行 PCR 扩增反应,使用的循环参数是 94 °C 预变性 5 min,然后在 94 °C 变性 30 s,52 °C 下退火 30 s,72 °C 下延伸 60 s,进行 30 个循环,30 个循环结束后在 72 °C 下延伸 10 min。然后使用 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化,而后将经 *Bam*HI 酶切后的 PCR 产物克隆入经 *Bam*HI/*Sma*I 双酶切后的质粒 pND-113 中,并转化到大肠杆菌 JM109 中,获得重组质粒 pND-aprE539。经 *Bam*HI 酶切(酶切体系为 10 μL,加酶量 1 μL,在 37 °C 酶切 1 h)及核酸电泳进行重组质粒的验证。克隆基因用 Sanger 测序法进行核苷酸序列测定。

1.2.2 重组菌的构建与酶液制备 将上述构建获得的重组质粒 pND-aprE539,采用改进后的 Spizizen^[26-27]方法转化到枯草杆菌 WB600 中,涂布于含有卡那霉素的 LB 平板上,37 °C 培养 12 h 后,挑取单菌落进一步在蛋白酶鉴定培养基上筛选转化子。将转化子与对照菌株 WB600(pND-113)同时点接于含 0.5% 脱脂奶粉的鉴定平板上,观察水解圈的情况,并进一步经限制性酶酶切、核酸电泳及蛋白酶活力测定进行重组菌 WB600(pND-aprE539)的确认。将上述构建的重组菌 WB600(pND-aprE539)及实验前期构建的重组菌 WB600(pND-aprE2709)^[19],接种于含 20 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 °C、200 r/min 培养 12~14 h,而后按照 10% 的接种量接种于发酵培养基中,发酵试验在 250 mL 三角瓶中进行,培养基装液量为 50 mL,200 r/min 摇床培养 72 h。发酵结束后,4 °C 离心取上清,获得粗酶液,置于-20 °C 冰箱保藏备用。

1.3 重组碱性蛋白酶的分离纯化与 SDS-PAGE 分析

1.2 获得的粗酶液,进行盐析(30%~70% 硫酸铵)、透析;透析后用 DEAE 阴离子交换色谱柱进行纯化,具体条件为:流动相 A 液为 50 mmol/L pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液,流动相 B 液为含 1 mol/L 氯化钠的 50 mmol/L pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液;收集穿透液采用超滤,选用 30 kDa 的超滤离心管(4000 r/min, 20 min)离心去除分子量小于 30 kDa 的杂蛋白;最后采用 SDS-PAGE 分析蛋白的纯化情况。SDS-PAGE 电泳采用 5% 的浓缩胶,12% 的分离胶。将纯化后的酶分别命名为碱性蛋白酶 AprE539 和碱性蛋白酶 2709,其酶样分别来自重组菌 WB600(pND-*aprE539*)和重组菌 WB600(pND-*aprE2709*)。

1.4 酶学性质的分析

1.4.1 最适作用 pH 和 pH 稳定性 最适作用 pH 的测定:使用 1% 酪蛋白作为底物在 40 °C 下 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 以及 12.0 的 pH 范围内测定 pH 的影响,以最高酶活力为 100%,计算其他作用 pH 下的相对酶活力,以确定其最适作用 pH。pH 稳定性测定:将酶液分别与 pH5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 以及 12.0 的缓冲溶液按照 1:9 的体积比混合后处理 1 h 来确定,在最适的 pH 条件下测定残留的酶活性,以未进行处理的酶样酶活力为 100%,计算相对酶活。缓冲体系为:0.2 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH5~8;0.2 mol/L Na₂B₄O₇·10H₂O-H₃BO₃, pH8~9;0.05 mol/L Gly-NaOH, pH9~11。

1.4.2 最适作用温度和热稳定性 最适作用温度的确定:使用 1% 酪蛋白作为底物,在最适 pH 下测定温度对样本酶活性的影响,测定温度为 40、50、55、60、65、70 以及 75 °C 下酶活力,以酶活最高者计为 100%,计算其他温度下的相对酶活力,以确定其最适反应温度。在 40、50、55、60、65、70 以及 75 °C 下温育 1 h 测定热稳定性,以每隔 10 min 时间间隔取样以测定剩余活性,并以未经加热处理的酶样作为对照(100%),计算相对酶活,以确定酶的热稳定性。

1.4.3 金属离子和化学试剂对酶活的影响 在酶活测定反应体系中,分别加入终浓度为 5 和 10 mmol/L 的 K⁺、Na⁺、Li⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Mg²⁺、Co²⁺、Cr³⁺、Ni²⁺、Ba²⁺、Fe³⁺、Zn²⁺、Fe²⁺、Ca²⁺、Hg²⁺、Ag⁺、β-巯基乙醇、EGTA、SDS 和 EDTA,然后进行样本酶活性测定。以不加金属离子和化学试剂的反应体系的活力为 100%,计算相对酶活,考察金属离子及化学物质对酶活性的影响。

1.5 碱性蛋白酶酶活力的测定

蛋白酶酶活力测定使用福林酚法^[28]。其基本步骤为:取 0.2 mL 酶液至 0.2 mL 1% (w/v) 酪蛋白溶液中,在 40 °C 和 pH10.5 条件下作用 10 min 后,加入 0.4 mL 的 0.4 mol/L 三氯乙酸终止反应,在 40 °C 下显色 20 min,并于 680 nm 处测定吸光度。酶活力单位定义为:在 40 °C 和 pH10.5 条件下 1 min 水解酪蛋白释放 1 μg 酪氨酸所需的酶量,定义为 1 个蛋白酶酶活,以 U/mL 表示。相对酶活力(%)=(处理后的酶

活力/未处理的酶活力)。

1.6 生物信息学分析

运用 DNAMAN 和 MEGA5.0 软件,进行氨基酸序列分析与比对,以图片的形式输出比对结果。

2 结果与分析

2.1 地衣芽胞杆菌 CCTCC M2018539 碱性蛋白酶编码基因的克隆及重组菌的构建

由图 1a-3 可知,以寡核苷酸序列 *aprE*-BL1 和 *aprE*-BL2 为引物,从地衣芽胞杆菌 CCTCC M2018539 基因组中成功扩增大小为 1.0 kb 的目的片段。将扩增片段经核苷酸序列测定后进行分析,其与地衣芽胞杆菌 2709 碱性蛋白酶(*AprE2709*)编码基因的相似度为 98.86% (数据未显示)。将此片段经 *Bam*HI 酶切后克隆入经 *Bam*HI 和 *Sma*I 双酶切后的质粒 pND113 中获得重组质粒 pND-*aprE539*,重组质粒 pND-*aprE539* 经 *Bam*HI 酶切后,条带大小约为 6.3 kb,进一步通过核苷酸电泳测定,确认重组质粒 pND-*aprE539* 构建成功(如图 1a-1)。

采用化学转化法将重组质粒 pND-*aprE539* 转入枯草杆菌 WB600,在抗性平板上筛选转化子,再在含有 0.5% 脱脂奶粉的底物平板上进行确认。在底物平板上,37 °C 条件下,培养 12 h,转化子周围有明显蛋白水解圈,而对照菌 WB600(pND-113)周围未见有明显的水解圈(图 1b)。从转化子中提取重组质粒 pND-*aprE539* 和 pND-113 并进行 *Bam*HI 酶切验证,其条带大小分别为 6.3(图 1a-1)和 5.2 kb(图 1a-2),进一步以质粒 pND-*aprE539* DNA 为模板,*aprE*-BL1 和 *aprE*-BL2 为引物进行 PCR 扩增验证,获得预期大小的 *aprE539* 片段(图 1a-2)。将此转化子命名为 WB600(pND-*aprE539*),保藏用于后续实验。

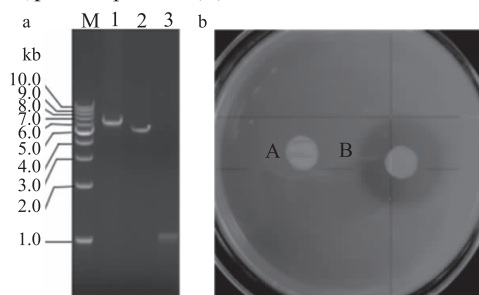


图 1 重组菌水解脱脂奶粉活性与重组质粒的鉴定

Fig.1 Skim milk hydrolysis of recombinant and confirmation of recombinant plasmid

注:a:重组质粒鉴定;1:pND-*aprE539*/*Bam*HI;2:pND-113/*Bam*HI;3:PCR 扩增 *aprE539*;M:1 kb DNA Ladder (Dye Plus)。b:转化子水解脱脂奶粉特征;A:WB600(pND-113);B:WB600(pND-*aprE539*)。

2.2 重组碱性蛋白酶的制备与纯化

将重组菌 WB600(pND-*aprE539*)与 WB600(pND-*aprE2709*)进行摇瓶发酵制备酶液,发酵结束后,发酵液经 4 °C 离心取上清,获得重组粗酶液。再经硫酸铵沉降、透析、阴离子交换色谱和超滤离心管进行纯化,并用 SDS-PAGE 分析纯化效果,结果如图 2 所示。重组碱性蛋白酶 *AprE539* 与碱性蛋白酶

2709 的分子量大小均为 30 kDa, 在 SDS-PAGE 中呈现为单一条带, 达到了电泳纯。

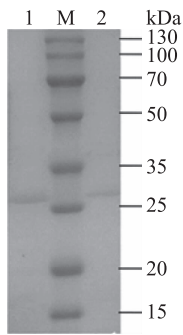


图2 碱性蛋白酶的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE profile of the purified alkaline proteases

注: M: 蛋白质分子量标准; 1: 纯化的碱性蛋白酶 2709; 2: 纯化的碱性蛋白酶 AprE539。

2.3 重组碱性蛋白酶 AprE539 的酶学性质分析

2.3.1 最适作用 pH 在不同 pH 反应条件下分析碱性蛋白酶 AprE539 的酶活, 并与碱性蛋白酶 2709 进行比较, 结果如图 3 所示。碱性蛋白酶 AprE539 在 pH11.0 时表现出最高酶活, 而碱性蛋白酶 2709 的最适作用 pH 为 10.0; 碱性蛋白酶 2709 在 pH11.0 时只有 60% 左右的酶活力, 由此可见, 碱性蛋白酶 AprE539 能够在更高的碱性条件下发挥作用。

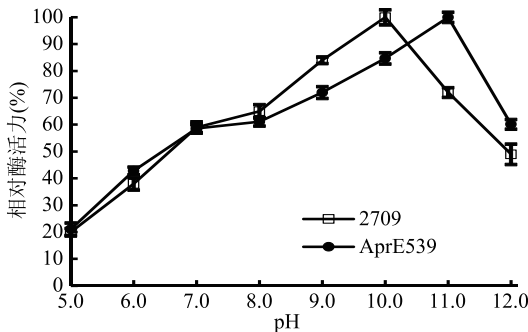


图3 碱性蛋白酶 AprE539 和 2709 的最适作用 pH

Fig.3 Optimal pH of alkaline protease AprE539 and 2709

2.3.2 pH 稳定性 在不同 pH 条件下分析碱性蛋白酶 AprE539 的 pH 稳定性并与碱性蛋白酶 2709 进行比较, 两者均有较宽的 pH 稳定区间, 在 pH6.0~11.0 之间均可维持 80% 以上的酶活 (图 4)。与碱性蛋白酶 2709 不同的是, 碱性蛋白酶 AprE539 在 pH12.0 的条件下仍然维持在 90% 以上的酶活力, 而碱性蛋白酶 2709 在此条件下的 pH 稳定性明显变差 (图 4)。可见, 本文获得的碱性蛋白酶 AprE539 具有在更高的碱性 pH 下的稳定性。

2.3.3 最适作用温度 在不同温度下分析碱性蛋白酶 AprE539 的最适作用温度, 结果汇总于图 5。碱性蛋白酶 AprE539 的最适作用温度为 65~70 °C, 较碱性蛋白酶 2709 的最适作用温度提高了约 10 °C (碱性蛋白酶 2709 的最适作用温度为 55 °C) (图 5)。在 60~75 °C 之间, 碱性蛋白酶 AprE539 的酶活力均高于碱性蛋白酶 2709 的酶活力; 碱性蛋白酶 AprE539 在温度高于 70 °C 时酶活下降, 而碱性蛋白酶 2709 在温

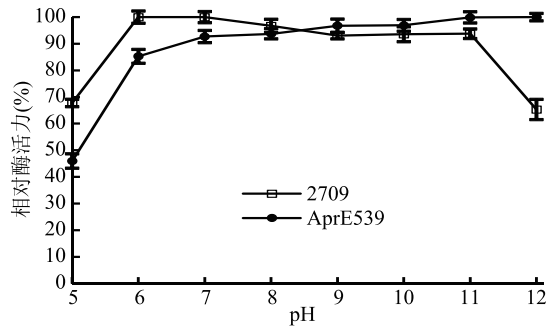


图4 碱性蛋白酶 AprE539 和 2709 的 pH 稳定性

Fig.4 pH stability of alkaline proteases AprE539 and 2709

度高于 55 °C 即直线下降。可见, 本文获得的碱性蛋白酶 AprE539 具有更高的最适作用温度, 其有效作用温度宽度也明显优于碱性蛋白酶 2709。

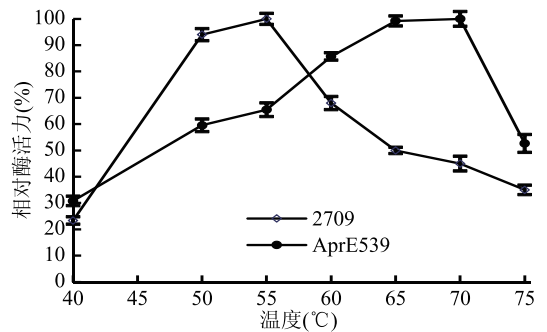


图5 碱性蛋白酶 AprE539 和 2709 的最适作用温度

Fig.5 Temperature optimum of alkaline proteases AprE539 and 2709

2.3.4 热稳定性 对碱性蛋白酶 AprE539 的耐热性进行了分析, 结果汇总于图 6。经 40 °C 保温处理后, 碱性蛋白酶 AprE539 和碱性蛋白酶 2709 的酶活力基本保持不变, 说明在 40 °C 以下, 两种蛋白酶都具有较好热稳定性; 50 °C 保温处理 1 h 后, 碱性蛋白酶 AprE539 维持 80% 的酶活力, 而碱性蛋白酶 2709 仅保留 70% 的酶活力; 在 60 °C 保温处理 1 h 后, 碱性蛋白酶 AprE539 保留 70% 左右的酶活, 而碱性蛋白酶 2709 的酶活丧失严重, 仅剩 30% 左右; 在 65 °C 保温处理 1 h 后, 碱性蛋白酶 AprE539 还保留 40% 左右的酶活, 碱性蛋白酶 2709 仅剩 10% 左右。可见, 碱性蛋白酶 AprE539 较碱性蛋白酶 2709 具有更高的热稳定性。

2.3.5 金属离子对酶活的影响 在酶促反应体系中加入终浓度为 5 mmol/L 或 10 mmol/L 不同的金属离子和化学试剂, 研究其对碱性蛋白酶 AprE539 酶活的影响并与碱性蛋白酶 2709 进行比较, 结果见表 1。金属离子对碱性蛋白酶 AprE539 和碱性蛋白酶 2709 酶活的影响存在明显的差异性。其中, Mn^{2+} 对碱性蛋白酶 AprE539 和碱性蛋白酶 2709 的酶活皆具有明显的激活作用, 且对碱性蛋白酶 AprE539 酶活的激活作用尤为明显, 酶活提高到原来的 4 倍; Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 K^+ 对碱性蛋白酶 AprE539 酶活的激活作用明显, 但对碱性蛋白酶 2709 酶活的影响不明显; Cu^{2+} 对碱性蛋白酶 AprE539 的酶活有明显的促进作用, 但对碱性蛋白酶 2709 的酶活抑制作用明显; Fe^{3+} 、

表1 金属离子和化学试剂对 AprE539 和 2709 碱性蛋白酶酶活的影响 (n=3)

Table 1 Effect of metal ions and chemicals on the activities of AprE539 and 2709 alkaline proteases (n=3)

金属离子与化合物	AprE539 的相对酶活 (%)		2709 的相对酶活 (%)	
	5 mmol/L	10 mmol/L	5 mmol/L	10 mmol/L
对照	100 ± 0.96	100 ± 0.94	100 ± 0.43	100 ± 0.67
K ⁺	96 ± 2.21	112 ± 1.91	84 ± 1.14	87 ± 0.32
Na ⁺	103 ± 2.73	108 ± 2.50	95 ± 1.73	98 ± 1.50
Li ⁺	91 ± 2.32	98 ± 2.42	81 ± 1.38	88 ± 1.49
Mn ²⁺	488 ± 3.71	478 ± 2.68	185 ± 0.76	166 ± 3.01
Cu ²⁺	149 ± 2.24	150 ± 1.36	4 ± 0.76	24 ± 0.91
Mg ²⁺	98 ± 3.52	127 ± 1.89	99 ± 2.30	102 ± 0.24
Co ²⁺	97 ± 2.71	109 ± 1.61	100 ± 1.25	88 ± 0.76
Cr ³⁺	91 ± 3.23	104 ± 1.42	89 ± 1.23	101 ± 1.38
Ni ²⁺	100 ± 3.45	127 ± 2.81	96 ± 0.45	107 ± 0.81
Ba ²⁺	102 ± 1.83	107 ± 1.21	99 ± 0.83	102 ± 0.21
Fe ³⁺	47 ± 4.52	76 ± 1.81	78 ± 1.20	88 ± 1.42
Zn ²⁺	100 ± 2.93	95 ± 1.56	106 ± 3.12	101 ± 2.44
Fe ²⁺	89 ± 3.31	111 ± 1.78	83 ± 2.01	104 ± 0.78
Ca ²⁺	146 ± 4.48	114 ± 3.81	103 ± 2.55	103 ± 1.38
Hg ²⁺	88 ± 2.92	58 ± 2.85	88 ± 2.92	58 ± 2.85
Ag ⁺	54 ± 2.21	34 ± 1.31	50 ± 2.31	32 ± 1.45
SDS	87 ± 0.59	93 ± 1.59	89 ± 2.23	92 ± 0.89
β-巯基乙醇	104 ± 3.21	102 ± 2.54	100 ± 2.21	101 ± 3.54
EGTA	35 ± 2.48	21 ± 2.43	42 ± 2.28	18 ± 2.56
EDTA	48 ± 2.76	26 ± 2.45	53 ± 1.33	83 ± 2.45

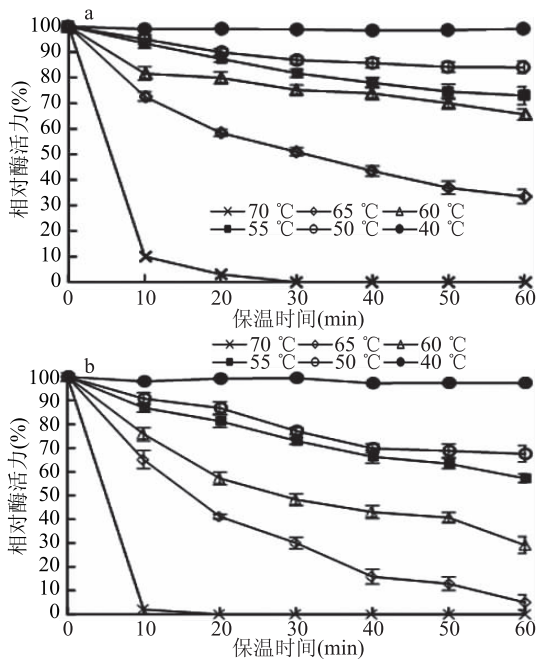


图6 碱性蛋白酶 AprE539 和 2709 的热稳定性

Fig.6 Thermal stability of alkaline protease AprE539 and 2709

注:a: AprE539; b: 2709。

Hg²⁺、Ag⁺对碱性蛋白酶 AprE539 和碱性蛋白酶 2709 的酶活皆有一定的抑制作用。此外,碱性蛋白酶 AprE539 和碱性蛋白酶 2709 对 EDTA 和 EGTA 均较为敏感;SDS 对碱性蛋白酶 AprE539 和碱性蛋白酶 2709 酶活的影响不大。

2.3.6 碱性蛋白酶序列分析 初步探究了碱性蛋白酶 AprE539 与碱性蛋白酶 2709 的氨基酸序列差异,结果如图 7。碱性蛋白酶 AprE539 的氨基酸序列中有 2 个氨基酸残基与碱性蛋白酶 2709 存在差异,分别是 28 位的异亮氨酸 (Ile) 和 124 位的丙氨酸 (Ala),其中, Ile28 位于蛋白酶的前肽序列中,会随着碱性蛋白酶 AprE539 前体的激活而被切割掉^[19], Ala124 位于成熟肽上。此 2 处差异与碱性蛋白酶 AprE539 所表现出的酶学性质的变化之间的内在本质,有待在后续研究中进一步阐明。

3 结论

本研究以实验前期一株优良碱性蛋白酶产酶菌株 CCTCC M2018539 为基础,通过基因克隆、异源表达及酶学性质分析等获得一种热稳定性较好且在高碱性下 pH 稳定性好的碱性蛋白酶 AprE539,其最适作用 pH11.0,在 pH6.0~12.0 的条件下处理 1 h 后,酶活力仍然维持在 90% 以上;最适作用温度为 65~70 °C,在 60 °C 保温 1 h 后,酶活剩余 70%;Cu²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 对酶活有明显促进作用。进一步与工业碱性蛋白酶 2709 氨基酸序列进行了对比,其与 2709 存在 2 个氨基酸的差异,分别是 28 位和 124 位,即蛋白酶 AprE539 的 28 位是异亮氨酸 (Ile),而 2709 是苏氨酸 (Thr),该位点位于前肽区域,会随着前体的激活而被降解;蛋白酶 AprE539 的 124 位是丙氨酸 (Ala),而 2709 是缬氨酸 (Val),二者均是非极性疏水氨基酸,位于蛋白质结构的内部,有助于稳定蛋白的折叠,而丙氨酸 (Ala) 比缬氨酸 (Val) 的侧链基团

AprE539	ACPAKVEKDYI VGFKSGVKVTASVKKL I KESGGKVDKCFRI I NAAKAKLKEALKEVKN	60
2709	ACPAKVEKDYI VGFKSGVKVTASVKKL I KESGGKVDKCFRI I NAAKAKLKEALKEVKN	60
Consensus	aqpaknvekdyy vgfks gvkvt asvkkd-i kesggkvdkqfri i naakakl dkeal kevkn	
AprE539	DPEVAYVEEDHVAHALAQTVPYGI PLI KADKVCAQGFKGANVKVAVLDTGI CASHPELNV	120
2709	DPEVAYVEEDHVAHALAQTVPYGI PLI KADKVCAQGFKGANVKVAVLDTGI CASHPELNV	120
Consensus	dpdvayveedhvaahal aqt vpygi pli kadkvqaqgfkganvkavvl dt gi qashpdl nv	
AprE539	VGGAS FVAGEAYNTDCNGHGT HVAGTVAALNTTGVLVGAPSVSLYAVKVLN SSGSGSYS	180
2709	VGGV SFVAGEAYNTDCNGHGT HVAGTVAALNTTGVLVGAPSVSLYAVKVLN SSGSGSYS	180
Consensus	vgg s fvageaynt dngnght hvagt vaal dnt t gvl gvapsvsl yavkvl nsssgsgsys	

图7 AprE539 和 2709 的氨基酸序列比对分析

Fig.7 Amino acid sequence alignment of AprE539 and 2709

注:虚线框:差异氨基酸所在位置。

更小,这可能是碱性蛋白酶 AprE539 热稳定性优于 2709 的原因。基于这些差异可以进一步探究蛋白酶结构与功能的相关关系,为后续获得性能更优良的碱性蛋白酶奠定理论基础。

参考文献

- [1] 雷攀先.地衣芽孢杆菌 GXT-1 两个碱性蛋白酶基因的克隆表达、酶学性质研究及分子改造[D].南宁:广西大学,2013.
- [2] Sarker P K, Talukdar S A, Deb P, et al. Optimization and partial characterization of culture conditions for the production of alkaline protease from *Bacillus licheniformis* P003 [J]. Springerplus, 2013, 2(1): 1-11.
- [3] Embaby A M, Saeed H, Hussein A, et al. SHG10 keratinolytic alkaline protease from *Bacillus licheniformis* SHG10 DSM 28096: Pobust stability and unusual non-cumbersome purification[J]. Basic Microbiol, 2016, 56: 1317-1330.
- [4] 王帅, 林学政, 黄晓航, 等. 印尼热泉中嗜热碱性蛋白酶菌株筛选及酶学性质研究[J]. 海洋科学进展, 2012, 30(2): 244-251.
- [5] 吕乐, 刘冬, 万红霞, 等. 碱性蛋白酶 Alcalase 酶解大米蛋白制备小分子肽的动力学研究[J]. 现代食品科技, 2014(7): 149-153.
- [6] 张静, 陈浩然, 王笑颖, 等. 花芸豆多肽提取工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(24): 315-318.
- [7] 高梅娟, 刘平, 兰小红, 等. 双酶酶解豆粕蛋白制备低苦味肽[J]. 食品工业科技, 2010(2): 193-192.
- [8] 夏凡, 琚争艳. 微生物碱性蛋白酶在食品工业中的应用及其安全性研究进展[J]. 山东食品发酵, 2008(2): 19-22.
- [9] 张可欣, 蒋慧, 汤晓娟, 等. 复合酶制剂对甜酒酿面包发酵烘焙特性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(1): 16-21.
- [10] Gupta R, Beg Q K, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2002, 59(1): 15-32.
- [11] Deng A, Jie W, Yun Z, et al. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001 [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(18): 7111-7117.
- [12] Sareen R, Mishra P. Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-37 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 79(3): 399-405.
- [13] Shayeh J S, Sefidbakhht Y, Siadat SOR, et al. Continuous fast fourier transforms cyclic voltammetry as a new approach for investigation of skim milk k-casein proteolysis, a comparative study [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 103: 972-977.
- [14] Anjani K, Kailasapathy K, Phillips M. Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening [J]. International Dairy Journal, 2007, 17(1): 70-86.
- [15] 程晓芳, 袁丹丹, 张余慧, 等. 蛋白酶在食品工业中的应用研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2018, 39(7): 221-224.
- [16] 李胤静, 张娜, 杨宝柱, 等. 大豆分离蛋白的限制性酶解及其功能性质研究 [J]. 中国林副特产, 2014(2): 10-13.
- [17] 谭斌, 单扬. 橙汁花生肽饮料生产工艺 [J]. 食品与机械, 2000(2): 25-26.
- [18] 林敏刚. 碱性蛋白酶在水解植物蛋白中的应用 [J]. 中国油脂, 2009, 34(12): 30-33.
- [19] 黄磊, 董自星, 金鹏, 等. 地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶嗜碱突变体的特征分析 [J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(6): 34-40.
- [20] Fujinami S, Fujisawa M, Mormile M R. Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes - past, present and future [J]. Environmental Technology, 2010, 31(8-9): 845-856.
- [21] Lylloff J E, Hansen L B S, Morten J, et al. Genomic and exoproteomic analyses of cold- and alkaline-adapted bacteria reveal an abundance of secreted subtilisin-like proteases [J]. Microbial Biotechnology, 2016, 9(2): 245-256.
- [22] Saeki K, Ozaki K, Kobayashi T, et al. Detergent alkaline proteases: Enzymatic properties, genes, and crystal structures [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2007, 103(6): 501-508.
- [23] 牛丹丹, 谢爱连, 叶秀云. 一种嗜碱性蛋白酶及其基因工程菌的构建方法: 中国, 2018110698696 [P]. 2018-12-18.
- [24] 牛丹丹, 靳晓, 吴海洋, 等. 解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶高活力突变体的创建与性质研究 [J]. 食品与发酵工业, 2017(10): 29-34.
- [25] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [26] 夏雨. 枯草芽孢杆菌食品级表达系统的构建和分泌表达研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2007.
- [27] 令楨民. *Streptomyces griseus* 胰蛋白酶的分子改造 [D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [28] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 23527-2009 蛋白酶制剂 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.