

## 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

唐雪明 王正祥 邵蔚蓝 刘吉泉 方慧英 诸葛健\*

(江南大学教育部工业生物技术重点实验室, 无锡 214036)

**摘 要** 在 5L 发酵罐中对重组碱性蛋白酶工程菌株 BP071 高产碱性蛋白酶的条件进行了研究, 通过提高通气量和改变搅拌转速, BP071 可在发酵 40 h 内达到产酶高峰, 酶活力最高可达 24480 u/mL。利用快速蛋白液相层析 (FPLC) 技术, 建立了快速高效纯化碱性蛋白酶的方案。发酵液通过硫酸铵沉淀、DEAE-A-50 脱色及聚乙二醇浓缩得粗酶, 再经过 CM-Sephadex-C-50、Sephadex-G-75 柱层析后得到了单一组份的重组碱性蛋白酶, 酶纯度提高了 76.2 倍。SDS-PAGE 显示重组碱性蛋白酶分子量为 28 kD。酶学性质研究表明, 酶的最适作用 pH 为 11, 最适作用温度为 60℃, 具有良好的 pH 稳定性和热稳定性。 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  对酶的稳定性有促进作用,  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$ 、PMFS 和 DFP 能强烈抑制酶的活力。SDS 和 Urea 对酶的活力无影响。

**关键词** 碱性蛋白酶, 基因工程菌 BP071, 发酵条件, 重组酶的纯化及性质

中图分类号 Q814 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)06-0729-06

与普通微生物一样, 基因重组菌的发酵生产水平不但和菌种的遗传特性有关, 也和发酵工艺控制以及发酵罐的性能有着密切的关系。合理的发酵工艺控制可以给微生物提供良好的环境, 提高细胞水平的调控, 提高目标产品的生产水平。

蛋白酶是工业酶种中用的最多的一种酶, 约占酶总量的 60%, 而碱性蛋白酶又占了蛋白酶的市场销售额的 50% 以上, 它在洗涤剂、食品工业和皮革制造中发挥巨大作用, 目前, 国内外市场上对碱性蛋白酶的需求量增长很快。自从 Jacobs 通过建立基因文库克隆了第一条碱性蛋白酶基因以来, 利用基因工程的手段和蛋白质工程技术获得高产碱性蛋白酶的工程菌已经是当前蛋白酶研究中的一个热点, 这给蛋白酶的进一步应用研究提供了广阔的前景<sup>[1]</sup>。我们在前期工作中利用地衣芽孢杆菌为宿主获得一株碱性蛋白酶的整合型工程菌 BA071, 使其酶产量在基础培养基下提高了 85%。国外生产菌株目前均为基因工程菌株, 发酵单位产量在 25000 ~ 30000 u/mL 之间<sup>[2]</sup>。我国的生产菌株的发酵水平有文献报道的最高不超过 18000 u/mL<sup>[3]</sup>。目前国内外的相关文献中, 多是对传统诱变筛选获得的生产碱性

蛋白酶的芽孢杆菌进行发酵条件的研究, 对重组碱性蛋白酶工程菌进行发酵条件的研究还很少。本实验即是在 5L 发酵罐上对所构建的碱性蛋白酶整合型基因工程菌产酶发酵条件进行了研究, 探讨了相关工艺参数的变化。为了给探索重组酶的性质及其稳定性奠定基础, 我们利用快速蛋白液相层析, 即 FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) 技术, 建立了快速高效纯化碱性蛋白酶的方案, 并对其重组酶的酶学性质进行了研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌株

整合型基因工程菌 BL071 为前期工作构建<sup>[4]</sup>。

#### 1.2 培养基

LB 培养基 (1000mL): 酵母粉 5 g, 蛋白胨 10g, 氯化钠 10g, pH7.2 ~ 7.4; 干酪素固体培养基 (1000mL): 干酪素 8 g, 酵母粉 2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  14g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  6g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2g, 琼脂 12 g, pH7.2 ~ 7.4 基础产酶培养基: 按参考文献 [5], 自然 pH; 发酵培养基 (1000mL): 黄豆饼粉 50g, 玉米粉 50g, 麸皮 25g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.4 g,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1g; 自然 pH,

收稿日期 2002-06-18, 修回日期 2002-08-16。

基金项目 教育部高等学校骨干教师项目资助 (No. [2000] 65)。

\* 通讯作者。Tel: 86-510-5874341; Fax: 86-510-5886642; E-mail: jianzhuge@hotmail.com

在 36℃ 下通风培养,前期通风 1 : 0.15,后期通风 1 : 0.2,搅拌 40 h 左右。

### 1.3 主要仪器和试剂

全自动发酵罐 KF-5L (韩国发酵机株式会社产品);快速蛋白液相层析系 FPLC,垂直板状电泳系统 (Bio-Rad 公司产品);DEAE Sephadex-A-50、CM-Sephadex-C-50、Sephadex-G-75 均为瑞典 Pharmacia 公司产品,其他试剂均为国产分析纯。

### 1.4 发酵罐发酵条件

发酵罐有效容积 5L,投料体积 2L;培养温度 36℃,pH 值和 DO 值采用 pH 电极和溶氧电极在线检测。

### 1.5 细胞生长曲线测定

采用血球计数法测定取平均值。

### 1.6 还原糖测定

培养液离心、过滤去上清,用生物传感器检测。硫酸铵梯度盐析、透析和蛋白质浓缩方法见文献 [6]。

### 1.7 CM-Sephadex-C-50 柱层析

将处理好的凝胶装柱后,用 0.02 mol/L pH6.0 的 PBS 缓冲液平衡,上样后用同样的 PBS 缓冲液 (流经 A 泵)及含 1mol/L NaCl 的 0.02 mol/L pH6.0 的 PBS 缓冲液 (流经 B 泵)在 FPLC 系统中自动混匀进行离子梯度洗脱,分步收集器速度为 4mL/min,收集活性峰洗脱液。

### 1.8 Sephadex-G-75 柱层析

将 CM-Sephadex-C-50 层析所收集活性峰洗脱液 2mL 上样,用含 0.15 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L pH6.0 的 PBS 缓冲液在 FPLC 系统控制下洗脱,分步收集器速度为 2mL/min 收集活性峰,浓缩酶液,至 -4℃ 保存。

### 1.9 蛋白浓度测定

Bradford 法<sup>[7]</sup>,以牛血清白蛋白作为标准。

### 1.10 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 方法参照文献 [8],采用 12% 的分离胶和 4% 的浓缩胶进行。

### 1.11 酶活测定方法

按部颁行业标准 QB/1803<sup>[5]</sup>进行酶活定义:1mL 液体酶,在 40℃ 和 pH10.5 的条件下,1min 水解 1 $\mu$ g 酪素产生 1 $\mu$ g 酪氨酸为 1 个活力单位,以 u/mL 表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同转速对重组菌产酶的影响

地衣芽孢杆菌产碱性蛋白酶是耗氧发酵过程,

可以改变搅拌转速来调节通气量。搅拌转速的增加,在一定范围内可以显著提高溶氧,搅拌转速超过一定值后就不再成为提高溶氧的限制因素。剧烈的搅拌除了消耗大量功率外,还会使发酵液产生大量泡沫,搅拌叶的剪切作用也会造成细胞的损伤,使菌体提前自,产酶量降低。因此,对产酶而言,存在一个最佳搅拌转速的问题。

搅拌对泡沫的影响很大。一般发酵罐接种后加大风量和搅拌,会使泡沫多到无法控制。一般发酵前期风量不需要很大,此时菌体呼吸虽然旺盛,但菌体数量尚少,总的耗氧量不高,应先开小风量逐步加大,待菌体浓度达到一定程度以后,再加大风量,同时用消泡剂消除泡沫。通过预备实验确定本实验中采用前期通风 1 : 0.15,后期通风 1 : 0.2,结果显示 (图 1),在 500r/min 搅拌转速下发酵水平最高,为 24480u/mL;700 r/min 搅拌转速下发酵水平次之,300r/min 搅拌转速下发酵水平最低。而原出发菌株在 500 r/min 搅拌转速下,发酵水平为 9040u/mL,重组菌的发酵水平比出发菌株提高了 170.8%。

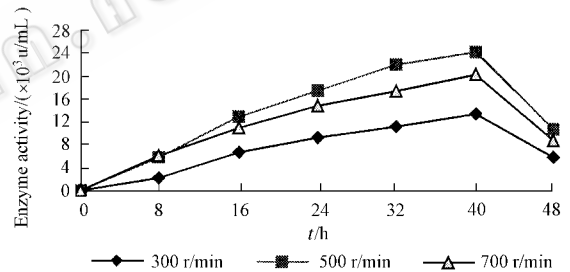


图 1 搅拌转速对产酶的影响

Fig.1 Effect of differential agitation rate on the yield of enzyme

### 2.2 5L 发酵罐培养条件下生长曲线的测定

碱性蛋白酶是在菌体生长对数后期分泌表达,并随着芽孢的形成而快速消失。在 500r/min 下,测定发酵过程中菌体的生长情况。从图 2 可知,菌体在 24 ~ 32 h 内生长迅速,以后细胞略有增长,36 h 左右处于稳定期。在充分溶氧的条件下,菌体密度最高可达到 87 亿个/mL (因为培养基粘度很大,杂质较多,无法用 OD 值法以及细胞干重法检测,所以采用细胞计数法)。与图 1 中结果比较可知,菌体的生长和酶活的变化趋势基本一致,菌体生长到 40 h 左右达到最大值,酶活最高值在 40 h 左右达到最高,因此可以确定发酵终点为 40 h。

### 2.3 发酵过程中还原糖及 pH 的变化

从图 3 中可以看出,培养基中的还原糖随着细胞需求量的增大而逐渐下降。在 20 ~ 30 h 细胞生

长速度加快 细胞对氧的需求加大,所以此时较高搅拌速度可以改善溶氧,否则发酵液中往往会形成溶

氧低谷,甚至 DO 值掉零,从而大大影响细胞的生长,难以提高菌体的密度。

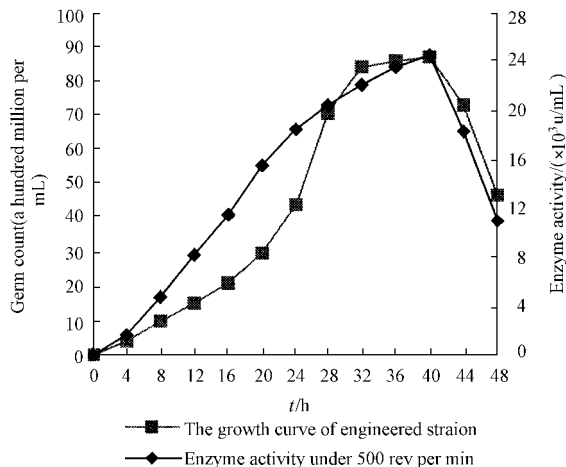


图2 5L发酵罐培养条件下生长曲线

Fig.2 The growth curve of engineered strains in 5L fermenter

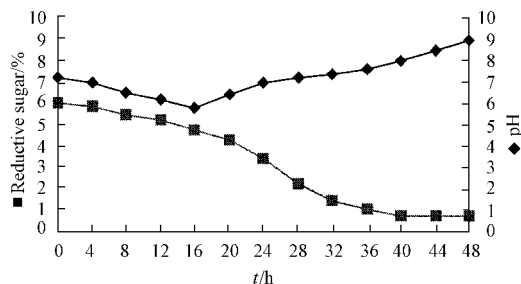


图3 发酵过程中还原糖及 pH 的变化

Fig.3 The variations of reductive sugar and pH

## 2.4 重组酶的制备及其纯化

重组酶的纯化的过程如表 1 所示。重组酶纯度提高了 76.2 倍。

表 1 重组酶的纯化

Table 1 Purification of recombinant protease

Step	Volume/mL	Total Protein /mg	Specific activity ( $\mu$ g/mg)	Recovery of enzyme /%	Purification fold
Supernatant	100	1080	2091.6	100	1
Ammonium sulfate fractionation	25	348.6	4601.5	71	2.2
DEAE Sephadex-A-50	20	62.8	20481.1	58.2	9.8
CM-Sephadex-C-50	10	7.6	60439.6	31.1	44.2
Sephadex-G-75	5	2.9	159381	20.5	76.2

## 2.5 SDS-PAGE 分析

收集 Sephadex-G-75 层析所得的活性峰酶液浓缩取 10 $\mu$ L 浓缩液上样。结果显示得到单一电泳条带,分子量为 28 kD (图 4)。

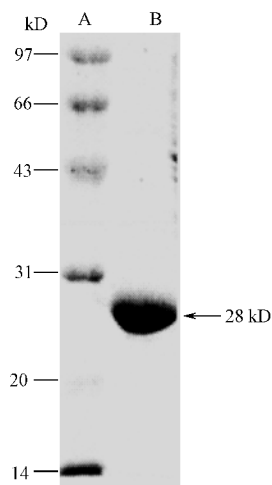


图4 重组碱性蛋白酶的 SDS-PAGE 电泳

Fig.4 SDS-PAGE analysis of recombination enzyme purified  
A. Protein molecular weight markers ; B : recombination enzyme purified

## 2.6 重组酶的最适 pH

分别采用  $H_3PO_4-NaH_2PO_4$  (pH4 ~ 5)  $NaH_2PO_4-Na_2HPO_4$  (pH6 ~ 8)  $Na_2B_4O_7-NaOH$  (pH9 ~ 14) 组成的缓冲体系<sup>[9]</sup>,用 0.1 mol/L 的不同 pH 的缓冲液配制成 1% 浓度的酶液,以酪蛋白为底物,在 40 $^{\circ}C$  反应 10min。测定纯酶在一系列 pH 下的活力(图 5)。结果表明,酶的最适 pH 在 11 左右。

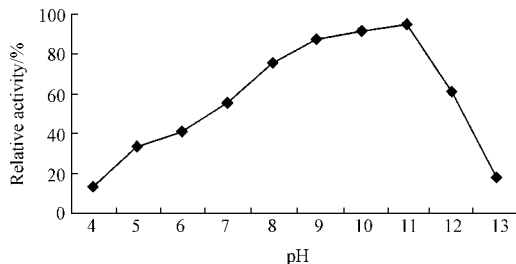


图5 重组酶的最适作用 pH

Fig.5 The optimal reaction pH of recombination enzyme

## 2.7 重组酶的最适温度

用不同 pH11 缓冲液配制的酶液,以酪蛋白为底物在不同温度中反应 10min,测定纯酶在不同温

度下的催化活力。结果表明(图6),该酶在 55℃ ~ 65℃ 之间活力最高,而酶在 40℃ 时的活力仅为 60℃ 时的 37.5% 左右。

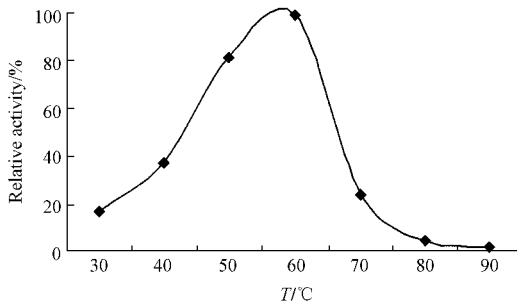


图 6 重组酶的最适作用温度

Fig.6 The optimal reaction temperature of recombination enzyme

## 2.8 pH 对重组酶的稳定性的影响

用不同 pH 的缓冲液配制的酶液,40℃ 处理 60min,再用 pH11 的缓冲液将其稀释一定浓度,并且使 pH 值均达到同一测定值,测剩余酶活力。结果表明(图7)酶在 pH 6.5 ~ 12.0 之间均保持 80% 以上的活力,说明该酶具有较强的耐碱性。

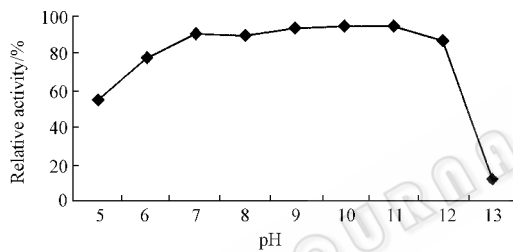


图 7 pH 对重组酶的稳定性的影响

Fig.7 Effect of pH on recombination enzyme stability

## 2.9 重组酶的热稳定性研究

将纯酶用 pH 11 的缓冲液稀释后,经过不同温度保温,按一定时间间隔在 40℃ 下测定其剩余活力。结果见图 8,55℃ 保温 2h,酶活力依然保持在 80% 以上,随着温度的升高,酶的热稳定性下降,60℃ 时酶的半衰期为 2h。65℃ 保温 20min,剩余活力为 33.7%。说明重组酶具有较好的热稳定性。

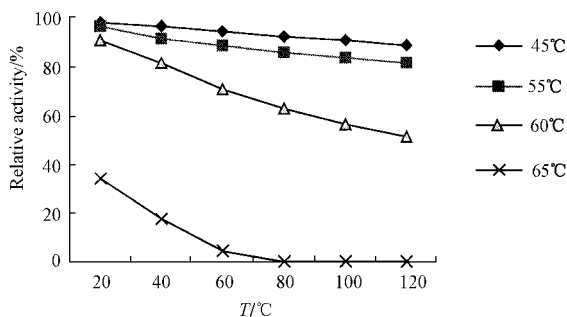


图 8 温度对重组酶的稳定性的影响

Fig.8 Effect of temperature on recombination enzyme stability

## 2.10 金属离子对重组酶活力的影响

用经过稀释的酶液将金属离子配制成 1mmol/L 的溶液,总体积 2.5mL。40℃ 保温 10min 后测酶活。每组均设对照管(无金属离子)。

表 2 金属离子对酶活力的影响

Table 2 Effect of metal salts on enzyme activity

Metal salts	Relative activity/%
Control	100
Ca <sup>2+</sup>	108
Ag <sup>+</sup>	36
Mg <sup>2+</sup>	104
Mn <sup>2+</sup>	96
Pb <sup>2+</sup>	91
Zn <sup>2+</sup>	88
Ba <sup>2+</sup>	94
Hg <sup>2+</sup>	21
Cu <sup>2+</sup>	70
Fe <sup>2+</sup>	83
Ni <sup>2+</sup>	85

结果表明(表2),Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>对酶稍有激活作用,而Hg<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>对酶有明显抑制作用。Nakamura<sup>[10]</sup>等指出,Ca<sup>2+</sup>对许多酶都有稳定保护作用,尤其对耐热酶的热稳定性有很强的保护作用,因为Ca<sup>2+</sup>能帮助酶的三级结构更加稳定。Mg<sup>2+</sup>是否有这样的作用目前的研究尚不明确。

## 2.11 化学试剂对重组酶的影响

将不同的化学试剂与酶液混合,使化学试剂的终浓度为 1 × 10<sup>-3</sup> mol/L,40℃ 保温 10min 后测酶活。每组均设对照管。

表 3 化学试剂对重组酶活性的影响

Table 3 Effect of chemical reagents on enzyme activity

Chemical reagents	Relative activity/%
Control	100
PMSF	0.3
DFP	0.1
SDS	94
Urea	90
EDTA	103

结果表明(表3),酶的活性被苯甲基磺酰氟(PMSF)和二异丙基氟磷酸(DFP)强烈抑制,因为其活性中心为丝氨酸残基,化学修饰后引入的基团阻

碍了底物与活性中心的结合,或改变了活性中心附近的电荷性质从而影响酶的活性,这方面的研究目前尚无明确的结论。乙二胺四乙酸(EDTA)对酶稍有激活作用,而表面活性剂 SDS 和 Urea 对酶活的影响不大。

基因重组菌在构建时候,通常都是采用摇瓶培养的方法比较其生产能力,这样得到的培养工艺一般不能直接应用于发酵罐生产,这是因为在摇瓶中难以进行深入的发酵特性研究,而且摇瓶的操作方式和提供的培养环境与发酵罐有很大的差别,因此对基因重组菌进行发酵特性研究,对发酵过程加以优化,同时掌握基因重组菌发酵放大的特点,可以充分发挥基因重组菌的生产能力,保证产业化的顺利进行。为了给重组菌提供必需的营养和适宜的环境,既要考虑发酵过程中菌体的生长又要考虑外源基因的表达。一般进行基因重组菌发酵都希望得到较高的菌体密度,这样无论基因表达产物是分泌的还是积累在胞内,较高的菌体密度下产物的生产速率可达到较高的水平。

本实验在 5L 发酵罐中对重组碱性蛋白酶工程菌株 BPO71 高产碱性蛋白酶的条件进行了研究,在 36℃,500r/min 条件下,BPO71 在发酵培养基中培养 40h 后,发酵液中碱性蛋白酶为 24480u/mL。在相同发酵条件下,重组菌的发酵水平比出发菌株提高了 170.8%。发酵水平基本达到国外的基因工程菌的水平。

在工业微生物的基因工程研究中,利用芽孢杆菌作为的表达宿主进行外源蛋白的分泌表达很有意义,目的蛋白能以活性结构生成而不发生聚集,避免了复性的困难,产物与大量的细胞蛋白分离,给下游工程的研究带来了便利。碱性蛋白酶为胞外酶,重组酶大量存在于发酵液中,经过梯度盐析、透析、DEAE 纤维素柱脱色,及 CM-Sephadex-C-50 和 Sephadex-G-75 层析后获得电泳纯,纯度提高了 76.2 倍。由于碱性蛋白酶的 pI 一般在 7.0~8.0 之间,所以我们选用阳离子交换柱 CM-Sephadex-C-50,并选用比碱性蛋白酶 pI 低不少于一个单位的 pH 为 6.0 的 0.02 mol/L PBS 缓冲液进行洗脱,获得较好的效果。

重组酶基本酶学性质研究表明,重组酶具有较高的比活,耐碱性耐热性较好,受表面活性剂的影响

较小,非常适合做洗涤剂中的添加剂。该酶的基因序列与基础研究较为深入的 Subtilisin E 同源性很高,也为丝氨酸碱性蛋白酶,二者在结构和催化机制上存在相似性。有学者对 Subtilisin E 基因序列用定点突变等方法对蛋白质活性中心的部位或临近部位进行改造,试图获得既有高比活又能耐强氧化的新型碱性蛋白酶<sup>[11]</sup>,这一方向的工作目前正成为基础研究的热点,也为以地衣芽孢杆菌为宿主的碱性蛋白酶重组菌的构建提供了新的思路。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Jacobs M, Eliasson M, Uhlen M. Cloning, Sequence and expression of subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*. *Nucleic Acids Res*, 1985, **13**: 8913~8926
- [2] HUO X Y(霍兴云). Actuality of Fermentation Industry in China. *Fourth Biotechnological Process Symposium of Jiangsu Province*. Wuxi: Jiangsu Biotechnological Association, 2000
- [3] XUE L Q(薛林贵). Advances and Application of Alkaline Protease in China. *Microbiology(微生物通报)*, 1997, **24**(6): 370~371
- [4] TANG X M(唐雪明), SHAO W I(邵蔚蓝), WANG Z X(王正祥) et al. Formation of Competent *Bacillus Licheniformis* Cell and High Efficiency Electrotransformation. *Journal of Wuxi University of Light Industry(无锡轻工大学学报)*, 2002, **21**: 340~343
- [5] TANG X M(唐雪明), SHAO W I(邵蔚蓝), SHEN W(沈微) et al. Cloning, expression and sequence analysis of the gene encoding alkaline protease from *Bacillus licheniformis* 2709 and 6816 in *E. coli*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology(中国应用与环境生物学报)*, 2001, **36**: 209~214
- [6] Kamp R M, Choli-Papadopoulou T, Wittmann-Liebold B. Protein structure analysis: preparation, characterization and microsequencing. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997
- [7] Frederick M Ausubel. Short protocols in molecular biology. 3<sup>rd</sup> ed, New York: John Wiley and Sons, Inc, 1995
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [9] ZHAO Y F(赵永芳). Methods and principle of biochemistry. 2<sup>nd</sup> ed, Wuhan: Wuhan University Press(武汉大学出版社), 1995
- [10] Nakamura N, Sashihara N, Nagayama H. Characterization of pullulanase and  $\alpha$ -amylase activities of a thermos sp. AMD33. *Starch Staerke*, 1989, **41**: 112~117
- [11] Takagi, H, Hirai, K, Waeda, Y. Enhance thermostability of the single-cys mutant subtilisin E under oxidizing conditions. *Journal of Biochemistry*, 2000, **128**: 585~589

## Study on Fermentation Condition of Alkaline Protease Gene Engineering Strain and the Purification and Characterization of Recombinant Enzyme

TANG Xue-Ming WANG Zheng-Xiang SHAO Wei-Lan LIU Ji-Quan FANG Hui-Ying ZHUGE Jian\*  
(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract** In a 5L fermentor the production conditions of alkaline protease gene engineering strain BA071 were investigated. The maximum activity of alkaline protease reached 24480 u/mL in 40 hours of fermentation by combination of enhancing aeration and changing the agitation rate. The fast purification method of recombinant protease was conducted with FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). The crude enzyme, treated with ammonium sulfate fractionation and decolorized with DEAE-A-50 and polyethylene glycol concentration, was purified with CM-Sephadex-C-50 and Sephadex-G-75. The purified enzyme appears homologous on SDS-PAGE. The purity of enzyme was increased 76.2 times. SDS-PAGE analysis showed that the molecular weights of expressed recombinant products were about 28kD. The optimal reaction pH and temperature of recombinant enzyme were at pH11 and 60°C, respectively. The recombinant enzyme exhibited high temperature tolerance and was stable at a wide range of pH.  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  can enhance the stability of the recombinant enzyme. While the protease activity of the enzyme was strongly inhibited by  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$ 、PMFS 和 DFP, and was not affected by SDS and Urea.

**Key words** alkaline protease, gene engineering strain BP071, fermentation condition, purification and characterization of recombinant enzyme

Received: 06-18-2002

This work was supported by the Key Teachers Foundation in Colleges and Universities of the Educational Ministry (No. [2000] 35).

\* Corresponding author. Tel: 86-510-5874341; Fax: 86-510-5886642; E-mail: jianzhuge@hotmail.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>