

纳豆芽孢杆菌配伍发酵产中性蛋白酶的性质研究

孙晓鸣,王萍*,陈静

(江西农业大学 动物科学技术学院 江西 南昌 330045)

摘要:为研究纳豆芽孢杆菌 SH 和 B1 配伍发酵产物中中性蛋白酶的性质,通过 Folin-酚法测定中性蛋白酶的最适作用温度、最适作用 pH 值、pH 稳定性、热稳定性和金属离子、表面活性剂、抑制剂、模拟胃肠道环境对酶活力的影响,绘制相对酶活力变化图。结果表明:该酶的最适作用温度为 70 ℃,最适作用 pH 为 11.0,其次是 pH 为 7.0,40 ℃ 时热稳定性较好,在 pH 6~7 时比较稳定,属中性蛋白酶。金属离子、抑制剂和模拟胃环境对酶有抑制作用,而 10 g/L Tween-80 和模拟肠道环境对酶有激活作用。

关键词:纳豆芽孢杆菌;配伍发酵;中性蛋白酶;酶学性质

中图分类号:S432.4 文献标识码:A 文章编号:1000-2286(2010)01-0163-06

A Study on Neutral Protease Characterization of Ferments by *Bacillus natto* Compatibility

SUN Xiao-ming, WANG Ping*, CHEN Jing

(College of Animal Science and Technology, JAU, Nanchang 330045, China)

Abstract: The purpose is to study the enzyme characterizations of neutral protease fermented by synergism strains of *Bacillus natto* SH and B1. The optimal reaction temperature, optimal reaction pH, pH stability, thermal stability, metal ions, surface-active agent, inhibitor, simulated intestinal environment on enzyme stability were determined by Folin-phenol method, diversify graphs of residual activity were drawn. The results showed that the optimal reaction temperature of protease was 70 ℃, the optimal pH was 11.0, the next was 7.0. The thermal stability of protease was high at 40 ℃, and stable from pH 6 to 7, belonging to neutral protease. The protease activity was inhibited by metal ions, inhibitor and simulate stomach environment, but stimulated by 10 g/L Tween-80 and simulate intestinal tract environment.

Key words: *Bacillus natto*; fermentation compatibility; neutral protease; enzyme characterization

纳豆芽孢杆菌是在 20 世纪中期从日本传统食品中分离出来,属细菌科,芽孢杆菌属,其原始菌株与枯草芽孢杆菌相同,是枯草芽孢杆菌的一个亚种^[1];1999 年被农业部列入 12 种可直接饲喂动物的饲料及微生物添加剂。研究发现纳豆芽孢杆菌是中性蛋白酶的重要微生物来源之一,它以其无病原性、安全和能形成抗性内生孢子——芽孢等特点,成为饲料酶添加剂的理想生产菌株。但中性蛋白酶的发酵单位一直很低,采用多菌混合液体发酵的工艺来获得高产中性蛋白酶的协同菌株,能够达到多菌混合共生,

收稿日期:2009-06-04 修回日期:2009-12-18

基金项目:江西省教育厅科研项目资助(赣教高字[2007]6号)和江西农业大学研究生创新基金资助(YC08A053)

作者简介:孙晓鸣(1983-),女,硕士生,主要从事免疫学基础理论与应用研究,E-mail:sunxm1123@126.com;

* 通讯作者:王萍,副教授,E-mail:jxjs6263wplm@163.com。

保证发酵液中生物量充足营养丰富,促进产酶,本实验室已通过实验证明菌株之间的科学配伍在摇瓶发酵中能显著提高蛋白酶的活性^[2]。

SH 和 B1 是本实验室从纳豆中分离的两株产中性蛋白酶活性较高的菌株,已对其抗菌作用、芽孢特性及菌株配伍发酵进行了研究^[2,3],但是对其分泌的中性蛋白酶的特性还不清楚。本文着重考察酶最适作用温度、最适作用 pH 值、金属离子、表面活性剂、抑制剂、模拟胃肠道环境对酶作用条件及稳定性的影响,希望通过此研究得到纳豆芽孢杆菌 SH 和 B1 配伍发酵产物中中性蛋白酶的最佳反应条件和酶的稳定性,为其作为饲料酶添加剂的应用奠定良好的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*) SH、B1 株(本实验室分离保存)。

1.1.2 培养基 种子培养基^[4]:牛肉膏 0.5 g,蛋白胨 1.0 g,NaCl 0.5 g,溶于 100 mL 蒸馏水,pH 7.0~7.2,121 °C 灭菌 20 min;发酵培养基:麸皮 2 g,豆粕 1 g,Na₂HPO₄ 0.1 g,CaCl₂ 0.1 g,溶于 100 mL 蒸馏水,pH 7.0~7.2,121 °C 灭菌 20 min(本实验室优化制得)。

1.1.3 主要试剂来源及配制 豆粕和麸皮均为江西赣达牧业有限公司商品。

5 g/L SDS 溶液的配制:称取 0.5 g C₁₂H₂₅NaO₄S,加 pH 为 7.0 的磷酸缓冲液溶解定容至 100 mL。

1 mmol/L EDTA 溶液的配制:精确称取 0.372 g C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈,加 pH 为 7.0 的磷酸缓冲液溶解定容至 100 mL,配成 10 mmol/L 的溶液,使用前 10 倍稀释。

1 mmol/L PMSF 溶液的配制:精确称取 0.174 g C₇H₇PO₂S,加 pH 为 7.0 的磷酸缓冲液溶解定容至 100 mL,配成 10 mmol/L 的溶液,使用前 10 倍稀释。

体外模拟胃环境^[5]:用 pH 为 2.0 的 HCl 溶液配制质量浓度为 1 mg/mL 胃蛋白酶溶液,作为模拟胃液。

体外模拟肠道环境^[5]:用 pH 为 7.0 的磷酸缓冲液配制质量浓度为 1.0 mg/mL 的胰蛋白酶溶液,再加入 2 mg/g 的胆盐(*m*_{胆酸钠}:*m*_{脱氧胆酸钠} = 1:1),作为模拟肠液。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 将斜面保存的纳豆芽孢杆菌 SH、B1 株用接种环接种到装有 20 mL 种子培养基的 50 mL 三角锥瓶中,置 37 °C 振荡培养 12 h 进行活化。取种龄 5 h 的种子液,按 5.75% 接种量(试验证明,两菌种等比例混合后产酶活力最高,文中均为两菌种等比例混合)接入到装有 15 mL 起始 pH 值为 6.0 的发酵培养基中,32 °C 200 r/min 振荡培养 42 h 取发酵液,测定蛋白酶活性。

1.2.2 粗酶液的制备 将培养至 42 h 时的发酵液于 8 000 r/min 离心 10 min,提取上清,即为粗酶液。

1.2.3 蛋白酶活性测定方法 采用 Folin-酚法^[6]。先将 2% 酪蛋白放入 40 °C 恒温水浴中,预热 5 min。取 1 mL 粗酶液,加预热后的酪蛋白 1.0 mL,摇匀,并在 40 °C 下保温 10 min。再加 0.4 mol/L 三氯乙酸 2.0 mL,摇匀后静止放置 10 min,4 000 r/min 离心 20 min,取上清 1.0 mL,于 40 °C 下加 0.4 mol/L 碳酸钠溶液 5.0 mL 和 1.0 mL 福林酚试剂,保温 20 min。在 680 nm 波长下比色,测其吸光度(测定空白时,加酪蛋白与三氯乙酸的顺序相反)。

蛋白酶活力计算方法为:

$$\text{酶活力(U/mL)} = \Delta OD_{680} \times K \times 4/10 \times N \quad (1)$$

(1)式中, ΔOD_{680} :样品测定与空白试验光密度值之差; K :吸光常数;即 OD 值为 1.0 时每毫升酪氨酸的含量($\mu\text{g/L}$)。本实验中 $K = 103.75$;4:反应试剂总体积(mL);10:反应时间(min); N :粗酶液的稀释倍数。

酶活力单位的定义:1 mL 酶液在 40 °C,pH 7.0 的条件下,每分钟水解酪素产生 1 μg 酪氨酸所需的酶量定义为一个活力单位,表示为 U/mL。

1.2.4 酶学性质研究 (1) 酶最适作用温度的研究。用 pH 7.0 的磷酸缓冲液稀释粗酶液并配制 pH 7.0 的 20 g/L 酪蛋白溶液,将 1 mL 适当稀释的粗酶液与 1 mL 的 20 g/L 酪蛋白溶液混合,分别于 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C 下反应 10 min,测定酶在各选定温度下的酶活力。以温度为横坐标,相对酶活力为

纵坐标作图。

(2) 酶最作用 pH 的研究。用浓度为 0.1 mol/L 的不同 pH 缓冲液 (pH 3 ~ 11) 稀释粗酶液,再分别与相应 pH 缓冲液配制的 1 mL 的 20 g/L 酪蛋白底物混合,40 °C 下反应 10 min,测定蛋白酶活力,以 pH 值为横坐标,相对酶活力为纵坐标作图。(其中 pH 值 3.0 ~ 5.0 的溶液由柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制,pH 值 6.0 ~ 8.0 的溶液由 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液配制,pH 9.0 ~ 11.0 的溶液由甘氨酸 - NaOH 缓冲液配制)。

(3) 酶的 pH 稳定性研究。将不同 pH 缓冲液稀释的粗酶液与酪蛋白混合,在 40 °C 保温 1 h 后,用磷酸缓冲液稀释使 pH 值达到 7.0,测定不同 pH 值下的残存蛋白酶活力。以 pH 值为横坐标,相对酶活力为纵坐标作图。

(4) 酶热稳定性的研究。将粗酶液用 pH 7.0 的磷酸缓冲液适当稀释后,分别放在 40, 50, 60, 70, 80 °C 水浴中保温 10, 20, 30, 40, 50, 60 min 后,立即置于冰水中冷却,然后在 40 °C 下测定其残存酶活力,以不经保温的粗酶液作为对照。以保温时间为横坐标,相对酶活力为纵坐标作图。

(5) 金属离子与酶稳定性的关系。将用 pH 7.0 的磷酸缓冲液配制的 10 mmol/L 的不同金属离子溶液与粗酶液等量混合,形成 5 mmol/L 的金属离子溶液,在 40 °C 保温 30 min 后,测定残余蛋白酶活力,以不加金属离子作对照 (CK)。以金属离子为横坐标,相对蛋白酶活力为纵坐标作图。

(6) 表面活性剂与酶活性的关系。将用 pH 7.0 的磷酸缓冲液配制的不同浓度的 Tween - 80 表面活性剂溶液 (2, 4, 6, 8, 10 g/L) 与粗酶液等量混合,形成浓度为 1, 2, 3, 4, 5 g/L 的表面活性剂溶液,立即测定蛋白酶活力。以不加表面活性剂作对照 (CK)。以 Tween - 80 浓度为横坐标,相对酶活力为纵坐标作图。

(7) 抑制剂与酶活性的关系。用 pH 7.0 的磷酸缓冲液配制的 5 g/L SDS, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF 分别稀释粗酶液,于 40 °C 保温 10 min,测定残余蛋白酶活力。以不加抑制剂作对照 (CK)。以不同抑制剂为横坐标,相对酶活力为纵坐标作图。

(8) 模拟胃肠道环境对酶活性的影响测定。①将模拟胃液、模拟肠液分别与粗酶液等量混合,于 40 °C 保温 10, 30 min,然后用 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 校正 pH 达到 7.0,测定残余蛋白酶活力。②先将模拟胃液与粗酶液混合分别作用 10 min 和 30 min 后,再加入模拟肠液,然后用 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 校正 pH 达到 7.0,测定残余蛋白酶活力。

以不加模拟胃液和模拟肠液作对照 (CK),以模拟胃液为横坐标,相对酶活力为纵坐标作图。

2 结果与分析

2.1 酶最作用温度

温度是影响酶活性的主要因素之一,通常情况下,在最适温度下酶的活力最高。不同温度对酶活力的影响如图 1 所示。70 °C 下酶活最高,30 °C 下酶活为最高酶活的 15.09%,60 °C 下酶活为最高酶活的 87.52%,80 °C 下降至 61.03%。可见该酶在 60 ~ 80 °C 均具有较高稳定性,酶的最适作用温度为 70 °C。高温使酶活下降的主要原因是由于高温破坏了酶蛋白的天然构象从而导致酶蛋白的失活。

2.2 酶最作用 pH 值

酶的活性受到 pH 环境的影响,在某一 pH 值下,酶活最高,高于或低于这一 pH 值,酶活降低,通常把表现出最大酶活的 pH 值称为该酶的最适 pH。不同 pH 值对酶活力的影响由图 2 所示,该酶的最适作用 pH 为 11.0,其次为 7.0,在 6.0 ~ 7.0 的范围内均具有较高活力。由此推断该粗酶液中酶的种类可能不是单一的。

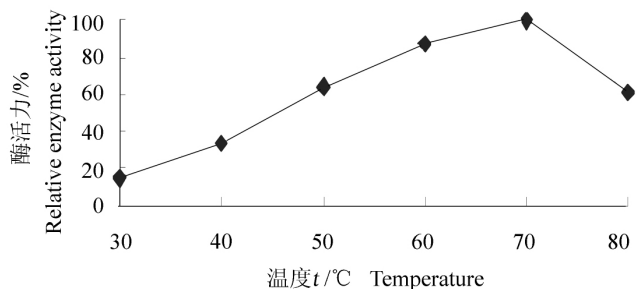


图 1 酶最作用温度

Fig. 1 The optimal acting temperature of the protease

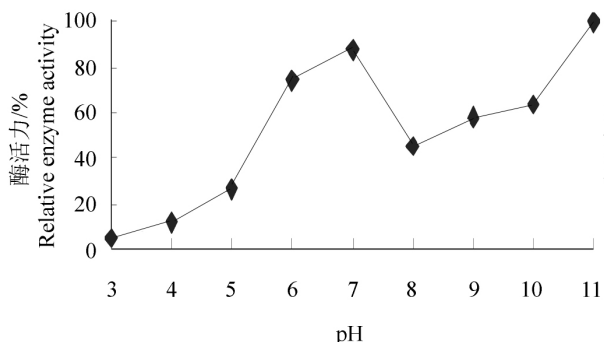


图 2 酶最适作用 pH 值

Fig. 2 The optimal acting pH of the protease

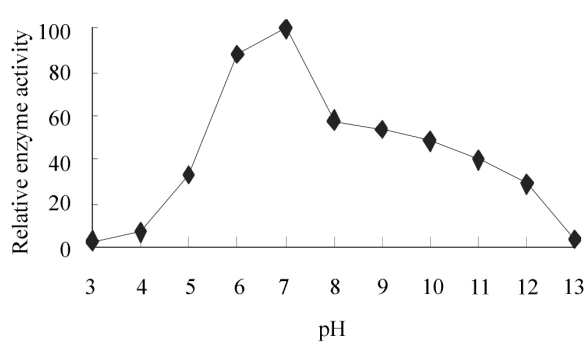


图 3 pH 值对酶热稳定性的影响

Fig. 3 The effect of pH on protease stability

2.3 pH 对酶稳定性的影响

将不同 pH 缓冲液稀释的粗酶液与酪蛋白混合,在 40 °C 保温 1 h 后,剩余酶活力结果见图 3。在 40 °C 条件下,酶在 pH 6~7 比较稳定,保温 1 h 仍能保持 80% 以上活力。pH 值低于 5 或高于 9 时酶不够稳定,活力迅速降低。说明该酶对酸碱的耐受性较低。

pH 影响酶活力的原因可能为过酸或过碱可以使酶的空间结构破坏,引起酶构象的改变,酶活性丧失。当改变不很剧烈时,酶虽未变性,但活力受到影响。pH 能够影响维持酶分子空间结构的有关基团解离,从而影响了酶活性部位的构象,进而影响酶的活性。

2.4 酶的热稳定性

将粗酶液于不同温度保温不同时间后,测定其残余酶活力,如图 4 所示。40 °C 保温 50 min,活力未见明显下降,保温 60 min 仍保留 70% 以上的活力;在 50 °C 保温 60 min 后,其酶活力降至 54.86%;60 °C 保温 20 min 酶活力仅剩余 21.94%,保温 50 min,剩余酶活力仅为 10.61%;而在 70 °C 和 80 °C 保温 10 min 酶活力几乎丧失。

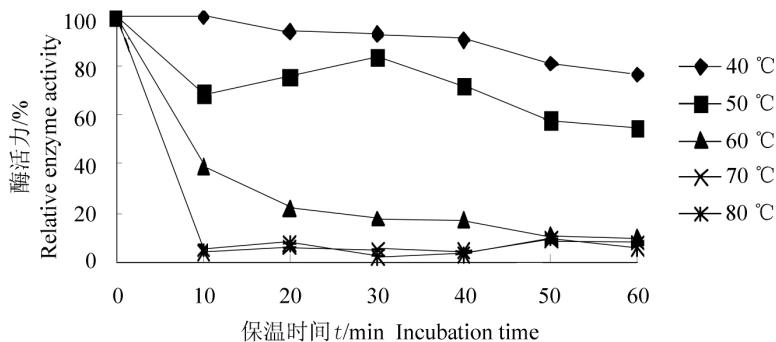


图 4 酶的热稳定性

Fig. 4 Thermostability of the protease

结合图 3 可见,虽然此酶的最适反应温度较高,但是温度稳定性并不好。究其原因,除了温度升高对酶结构本身造成的影响以外,蛋白酶自身的降解对酶的稳定性造成了很大的影响。结果表明,中性蛋白酶随温度升高,其活性也丧失很多,热稳定性差,在 40 °C 左右稳定性较好,50 °C 时的半衰期为 60 min。其他学者的研究也是如此,如米曲霉中性蛋白酶^[7]在 40 °C 下处理 150 min 后,酶活力保持 67.5%。但 50 °C 处理 30 min 后,酶活力迅速失活,只保持了 23.7% 的活力。

2.5 金属离子对酶稳定性的影响

从图 5 可以看出, Ca²⁺ 对酶有轻微的抑制作用,这与肖怀秋^[8]等研究的芽孢杆菌 N19 中性蛋白酶 Ca²⁺ 对酶的有关报道一致。而 Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, K⁺, Fe³⁺, Al³⁺, Pb²⁺ 等金属离子对酶抑制作用

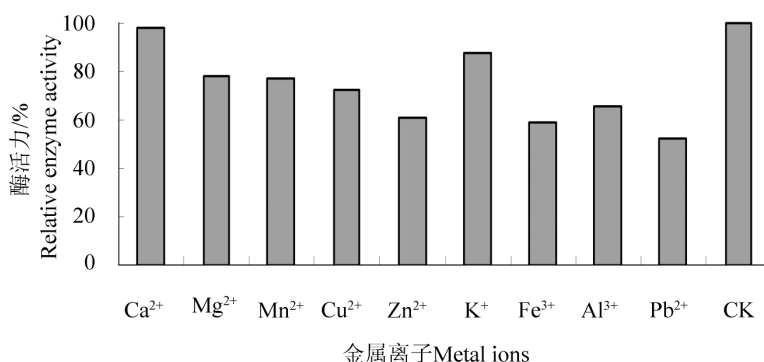


图 5 金属离子对酶稳定性的影响

Fig. 5 The effect of metal ions on enzyme stability

比 Ca^{2+} 更明显,分析可能与其浓度有关系,随着浓度的降低可能会对酶活力表现出的一定影响^[9]。

2.6 表面活性剂对酶稳定性的影响

表面活性剂具有双基团即亲水基团与疏水基团,添加一定浓度的表面活性剂有利于提高酶的催化能力。从图 6 可以看出,随着 Tween-80 浓度的上升酶催化能力也有所上升,当浓度为 10 g/L 时,酶活力比对照(CK)提高了 23%。

2.7 抑制剂对酶活力的影响

不同抑制剂对酶活力的影响如图 7 所示。经 SDS 处理 10 min 后仍可保留 80% 以上的酶活力,表明该酶抗去垢剂。EDTA 能够抑制酶活性,表明金属离子(如 Ca^{2+})对酶活性或稳定性具有重要影响;向 EDTA 处理过的酶液中补加过量的 CaCl_2 ,酶活力依旧丧失 5%,表明 EDTA 对酶活的抑制作用是不可逆的。该酶对 PMSF 敏感,表明部分酶活性中心可能含有丝氨酸残基。EDTA 和 PMSF 都只能抑制部分酶活,当它们同时作用时,酶活力几乎被完全抑制。

2.8 模拟胃肠道环境对酶活力的影响

粗酶液在模拟胃环境中作用 10 min 酶活力仅剩 15.54%,作用 30 min 后几乎全部丧失;在模拟肠道环境中作用 10 min 相对酶活力达 153.83%,作用 30 min 后相对酶活力更高达 161.49%;当将粗酶液先与模拟胃液作用,再加入模拟肠液,相对酶活力仍有所提高,且经胃液作用 30 min 后相对酶活力仍有 136.04%,其具体作用机制有待进一步研究。

3 讨 论

通常情况下,在最适温度酶的活力最高,本实验中虽然此酶的最适反应温度较高,但是温度稳定性并不好,在最适温度 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 下保温 10 min 酶活力几乎丧失。究其原因,除了温度升高对酶结构本身造成的影响以外,蛋白酶自身的降解对酶的稳定性造成了很大的影响。而在 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 稳定性较好,保温 60 min 仍保留 70% 以上的活力, $50\text{ }^\circ\text{C}$ 时的半衰期为 60 min。由该酶的最适作用 pH 为 11.0,次适 pH 为 7.0,推断该粗酶液中酶的种类可能不是单一的,在 $40\text{ }^\circ\text{C}$ pH 6.0~7.0 酶活力比较稳定,保温 1 h 仍能保持

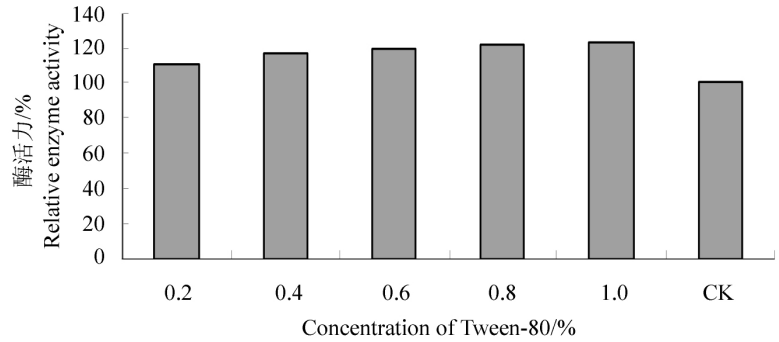


图 6 表面活性剂对酶稳定性的影响

Fig. 6 The effect of surface-active agent on enzyme stability

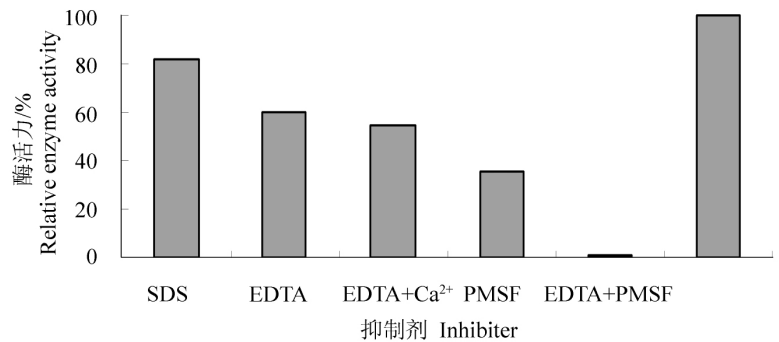


图 7 抑制剂对酶活力的影响

Fig. 7 The effect of inhibitor on enzyme stability

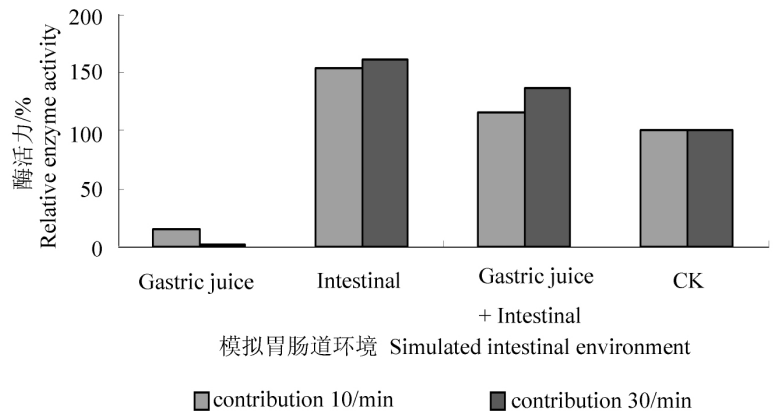


图 8 模拟胃肠道环境对酶活力的影响

Fig. 8 The effect of simulated intestinal environment on enzyme stability

80% 以上活力。pH 值低于 5 或高于 9 时不够稳定,酶活力迅速降低,说明该酶对酸碱的耐受性较低。金属离子中只有 Ca^{2+} 对酶有轻微的抑制作用, Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 K^+ 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、 Pb^{2+} 等对酶的抑制作用更明显,经分析可能与其浓度有关系,随着浓度的降低可能会对酶活力表现出的一定影响。10 g/L Tween-80 能使酶活力提高 23%。经 SDS 处理 10 min 后仍可保留 80% 以上的酶活力,EDTA 能够抑制酶活性,且对酶活的抑制作用是不可逆的,对 PMSF 敏感,但 EDTA 和 PMSF 都只能抑制部分酶活,当它们同时作用时,酶活才几乎被完全抑制。在模拟胃环境中作用 30 min 酶活力几乎全部丧失;在模拟肠道环境中作用 30 min 后相对酶活力高达 161.49%。

参考文献:

- [1] 程安春,潘康成,倪学勤.对我国动物微生态制剂产业发展在欧盟禁用抗生素促生长剂后的战略思考[C]//中国畜牧兽医学动物微生态学分会第三届第八次学术研讨会论文集,2006:1-4.
- [2] 孙晓鸣,宋德平.不同菌株配伍摇瓶发酵蛋白酶的初探[J].江西农业大学学报,2009,31(3):537-540.
- [3] 胡雪萍,孙晓鸣.纳豆杆菌营养体及其芽孢的生物学特性比较研究[J].中国食品学报,2007,7(6):27-32.
- [4] 姚火春.兽医微生物学实验指导(21世纪教材)[M].北京:中国农业出版社,2002:20-21.
- [5] Le H Duc, Huynh A Hong, Simon M Cutting. Vegetative cell of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen delivery[J]. Vaccine, 2003(21):4 215-4 224.
- [6] 周德庆.微生物学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1986:358-360.
- [7] 邓靖,林亲录,赵谋明,等.米曲霉 M3 中性蛋白酶的提取及酶学特性研究[J].中国食品添加剂,2005(2):21-24.
- [8] 肖怀秋,林亲录,李玉珍,等.产中性蛋白酶菌株 B4 发酵条件的研究[J].食品与机械,2004,20(5):23.
- [9] Felix F, N Brouillet. Purification and properties of two peptidases from brewer's yeast [J]. Biochem Biophys Acta, 1998 (122):127-144.

• 简讯 •

我校刘木华教授获“新世纪优秀人才支持计划”项目资助

近日从教育部获悉:刘木华教授主持申报的“农畜产品品质光学检测技术”课题获教育部 2009 年度“新世纪优秀人才支持计划”项目资助(教技函[2010]14号)。

“新世纪优秀人才支持计划”是教育部设立的专项人才支持计划,该计划着眼于培养、支持一批学术基础扎实,具有创新能力和突出发展潜力的优秀青年学术带头人开展教学改革,围绕国家重大科技和工程问题、哲学社会科学问题和国际科学与技术前沿进行创新研究。

• 学报编辑部 •