

文章编号: 1000-5013(2009)03-0297-05

一株碱性脱毛蛋白酶产生菌的筛选 及系统发育分析

王 耿, 方柏山, 张婷婷, 靳鸿蔚, 刘桂兰

(华侨大学 工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 泉州 362021)

摘要: 经过采集土样, 分离、筛选得到一株产碱性蛋白酶的菌株, 编号为 A607. 通过摇瓶发酵, 对发酵上清液进行酶活测定和脱毛实验, 证实所产生的酶具有蛋白酶水解活性和良好的脱毛能力, 其酶活达到 $263.39 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 、比活力为 $1215.24 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$. 16S rDNA 序列分析表明, 该菌株与 *Bacillus pumilus* 具有高达 99% 的相似性. 用 PHYLIP 程序将该菌株与报道的相关碱性蛋白酶产生菌进行系统发育进化分析, 发现菌株 A607 与 *Bacillus pumilus* 处于同一分支.

关键词: 短小芽孢杆菌; 碱性蛋白酶; 脱毛; 16S rDNA; 系统发育

中图分类号: Q 939.124; Q 556⁺.903; Q 993

文献标识码: A

在制革行业里, 一般采用传统的“灰碱法”脱毛, 这种方法虽然在技术上很成熟, 但会带来大量的污染问题. 随着人们对环境污染的关注程度越来越高, 寻求新的、无污染的脱毛方法代替碱法脱毛已是大势所趋. 酶法脱毛便是当中较有效的一种. 它与灰碱法脱毛相比, 最大的优点是无毒、无害、污染很少, 不仅消除了硫化物污染, 而且可以减少废水中的化学需氧量和 5 日生化需氧量. 另外, 酶法脱毛还能回收高质量的毛^[1]. 碱性蛋白酶是一类最适 pH 值偏碱性的蛋白酶, 主要应用于洗涤及制革工业, 广泛存在于动、植物及微生物生物体中, 最早在猪的胰脏中被发现. 1945 年, 瑞士 Jaag 等^[2] 在地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 中发现了碱性蛋白酶. 目前, 用于生产碱性蛋白酶的菌株主要是枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和短小芽孢杆菌, 在我国用于生产的菌株主要有地衣芽孢杆菌 2709, 1213 及短小芽孢杆菌 289, 209^[3]. 本文对所分离得到的一株产碱性蛋白酶的细菌进行了初步研究, 并进行系统发育分析.

1 材料和方法

1.1 材料

土样采集于福建泉州制革厂、屠宰场; 进口的腌制牛皮由泉州晋江兴业皮革有限公司提供.

1.2 培养基

(1) 固体分离培养基(1 L). 牛肉膏 10 g, 蛋白胨 3 g, NaCl 10 g, 酪素 15 g, 琼脂粉 10 g, pH= 9.5.

(2) 斜面培养基(1 L). 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂粉 15 g, pH 值为 7.0~7.2. (3) 基本发

酵培养基(1 L). 牛肉膏 10 g, 蛋白胨 3 g, NaCl 10 g, pH= 9.5.

1.3 菌株的筛选

参照文[4-5], 在采集的土样中加入一定量的碱液, 将样品的 pH 值调至碱性, 室温放置 14 d. 取 1 g 土样加于 9 mL 无菌水中, 摇匀后将此培养液梯度涂布于固体分离培养基平板上, 室温培养 1~2 d. 挑取分离平板上水解圈直径为菌落直径 3 倍以上的菌落, 转移到斜面培养基上保藏, 并进行下一步的摇瓶复筛. 通过液体摇瓶培养, 测定发酵上清液的酶活力, 选取一株产酶最高的菌株作为研究对象.

收稿日期: 2008-04-11

通信作者: 方柏山(1957-), 男, 教授, 主要从事合成生物学的研究. E-mail: fangbs@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省科技重大专项(2005HZ03-3); 国务院侨办科研基金资助项目(06QZR07)

1.4 酶活测定

碱性蛋白酶酶活测定采用 Folin-酚法^[6,7]. 取 1 mL 酶液(40 °C 预热 2 min), 加入 1 mL 的 2% 酪蛋白溶液(40 °C 预热 2 min), 混合, 40 °C 下精确反应 10 min, 加 2 mL 的 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氯乙酸(TCA) 终止反应. 在 40 °C 水浴 20 min, 自然冷却后, 于离心机($4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 离心 10 min. 然后, 吸取上清 1 mL, 加入 5 mL 的 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠溶液, 再加入 1 mL 的 Folin-酚试剂, 40 °C 显色 20 min, 以失活酶作对照, 记录 680 nm 处的 $D(680)$ 值. 以每分钟水解酪蛋白产生 $1 \mu\text{g}$ 酪氨酸为 1 个酶活力单位.

1.5 胶原水解活性测定

参照文[8], 将 0.3 mL 的 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ iv 型胶原底物, 以及 0.2 mL 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 值为 7.5, 含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2) 缓冲液和 0.1 mL 发酵酶液在 37 °C 反应 20 min. 取出 0.1 mL 反应液于 0.5 mL 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 中以终止反应. 采用茚三酮法, 依次加入 0.6 mL 的 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸缓冲液和 0.6 mL 茚三酮, 于 570 nm 处比色, 测定反应所释放的水溶性氨基酸、短肽, 空白为加热失活的酶液. 酶活力单位定义为 37 °C, pH 值为 7.5 条件下, 每分钟每毫升发酵液水解胶原产生相当于 $1 \mu\text{g}$ 甘氨酸的酶量为 1 个酶活力单位.

1.6 蛋白质含量测定

采用考马斯亮兰法, 在波长 595 nm 处测定光吸收值, 以牛血清蛋白绘制标准曲线.

1.7 酶法脱毛实验^[9-10]

剪下一小块未脱毛的牛皮(约 $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$), 用 pH 值为 10 的硼砂-氢氧化钠缓冲液浸泡过夜. 将处理过的牛皮放入小烧杯中, 加入适量酶液, 封口, 于 37 °C, $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下进行脱毛处理. 在不同时间观察其脱毛程度, 每一个试验均设 3 个平行样(以浸泡在相同体积硼砂-氢氧化钠缓冲液中的牛皮作为空白对照样). 另取经过脱毛处理后的生皮在显微镜下进行结构观察, 检查胶原的水解情况.

1.8 碱性蛋白酶产生菌的鉴定

1.8.1 细菌总 DNA 的提取(煮沸冻融法) 从筛选菌株的斜面上挑取一环接入基本发酵培养基, 于 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 37 °C 下摇瓶培养 10~12 h. 取 1.2 mL 种子培养液于 1.5 mL Eppendorf 管中, 在离心机($12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 离心 5 min, 收集细胞, 用无菌双蒸水洗涤 2 次, 加 50~100 μL (视菌体量而定) 无菌双蒸水重悬. 100 °C 水浴 7 min, -20 °C 冰冻 5 min; 再加热 5 min, 置于 -20 °C 冰冻 5 min. 重复操作一次, 于离心机($16\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 离心 10 min. 将上清液分装于一个新的 1.5 mL Eppendorf 管中, 可用作聚合酶链反应(PCR) 扩增的模板.

1.8.2 16S rDNA 的 PCR 扩增和测序 采用细菌 16S rDNA 通用引物 F27($5'$ -AgA gTTT gATCATg-gCTCAg- $3'$) 和 R1492($5'$ -TACggTTACCTTgTTACgACTT- $3'$)^[11]. 引物由北京奥科生物技术有限公司合成. PCR 反应体系(20 μL): 2 μL 的 $10 \times$ Buffer (Mg^{2+} free), 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 1.6 μL MgCl_2 , 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 1.6 μL dNTP, 引物 F27 和 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的引物 R1492 各 1 μL , 2 μL 模板 DNA, 1 μL 的 Taq 酶($1 \text{ mkat} \cdot \text{L}^{-1}$), 重蒸水 9.8 μL . PCR 程序如下: 94 °C, 预变性 5 min; 94 °C, 变性 1 min, 52 °C, 退火 1 min; 72 °C 延伸 2 min, 32 个循环; 72 °C, 延伸 15 min; 10 °C 保存. 利用 OMEGA 公司的 Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒进行 PCR 产物回收, 测序由上海华诺生物科技有限公司完成.

1.8.3 系统进化树的建立 获得该菌的部分长度 16S rDNA 序列(1 434 bp), 向 GenBank 提交该序列(登录号: EF563825). 将测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 中的 16S rDNA 序列进行同源性比较(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), 利用 ClustalX 和 PHYLIP 软件对所选序列进行遗传距离计算, 构建系统发育树.

2 结果与分析

2.1 碱性蛋白酶产生菌的筛选

根据水解圈与菌落的直径比, 从酪蛋白培养平板上初步分离得到 11 株产碱性蛋白酶菌株. 液体摇瓶发酵培养所得菌株, 用 Folin-酚法测定其所产的碱性蛋白酶的活力. 经反复比较后, 编号为 A607 菌株产酶活力相对较高, 达到 $263.39 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$, 比活力为 $1\,215.24 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$; 同时, 测得 A607 菌株的胶

原水解能力大小为 $21.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$, 说明该发酵液几乎不具备胶原水解能力。

2.2 脱毛能力的测试

脱毛效果至今尚无量化的标准, 仅根据将毛从皮上扯下所需用力程度予以表征^[12]。实验中做以下规定: 无需用力即可全部去除毛, 视为脱毛效果最佳; 只需轻推就可将毛全部除去, 视为脱毛效果良好; 需重推才能将毛除去, 视为脱毛效果一般; 需用力拉扯才能把毛去除, 视为具有一定的脱毛能力, 但效果较差; 而即使用力拉扯都无法把毛去除掉, 视为无脱毛效果。

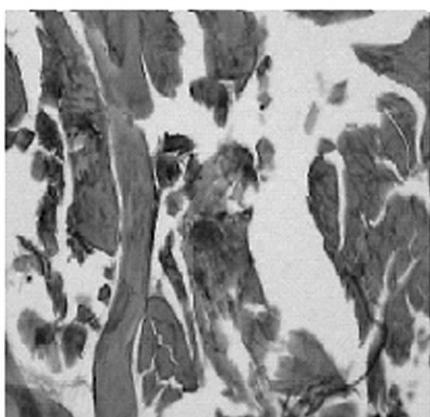
取发酵酶液进行脱毛实验, 在不同的时间(t) 分别取样进行脱毛效果评价, 结果如表 1 所示。从表 1 可知, 在 8 h 前具有一定的脱毛能力, 但效果很差; 在 12 h, 脱毛效果一般; 而在 16 h 以后, 毛已经全部去除, 说明该菌所产的酶具有很好的脱毛能力。

表 1 脱毛效果评价

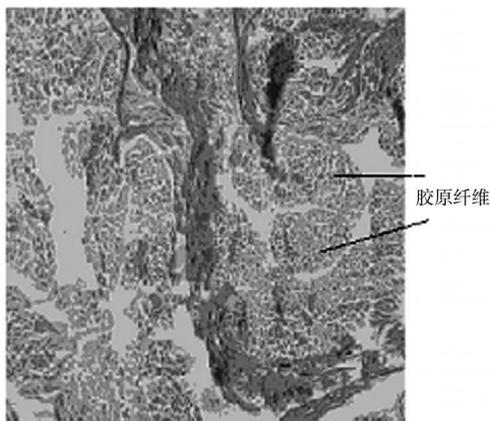
Tab.1 Evaluation of depilatory activity

t/h	4	8	12	16	24
脱毛效果	较差	较差	一般	最佳	最佳

在显微镜下对经过脱毛处理的生皮结构进行观察, 结果如图 1 所示。由图 1 中可以看出, 经发酵酶液脱毛处理后, 生皮中胶原纤维不仅没有被破坏, 而且具有一定的分散性。这种分散性在传统的灰碱法处理后的生皮中几乎观察不到。说明了该菌所产的酶液具有良好的脱毛能力, 且对生皮胶原无破坏性。因此, 选择 A607 菌株进一步研究。



(a) 灰碱法脱毛



(b) 酶法脱毛

图 1 脱毛处理的生皮结构

Fig.1 Microscopic examination of bovine skin after unhairing process

2.3 A607 菌株生长及产酶动力学

将 A607 菌接入到液体发酵培养基中, 于 37°C , $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床振荡培养。每隔 1 h 取样, 测定培养液在 600 nm 下的吸光值, 以未接入菌的培养基作为空白对照, 结果如图 2 所示。同时, 每隔 6 h 取样测定发酵上清液的酶活(u), 结果如表 2 所示。

从图 2, 表 2 可以看出, A607 在 5 h 左右进入对数生长期, 在 15 h 后进入了稳定期。蛋白酶的产生与菌体生长呈复合型。即菌体生长进入对数期后才分泌碱性蛋白酶, 且蛋白酶的酶活不断地上升, 在 24 h 达到最高值, 然后下降。

表 2 发酵液的酶活力

Tab.2 The proteolytic activity of the fermentation broth

t/h	6	12	18	24	30
$u/\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$	15.0	75.0	131.7	165.0	83.4

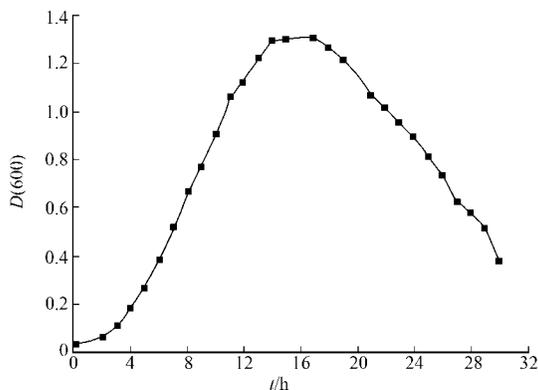


图 2 A607 的生长曲线

Fig.2 Growth curve of A607

2.3 16S rDNA 的 PCR 扩增结果及系统发育分析

提取 A607 的总 DNA 作为模板, 利用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 扩增的目的片断测序结果为 1 434 bp, 其在 GenBank 的登录号为

EF563825. 测序片段用 BLAST 软件与 GenBank 中的 16S rDNA 序列进行同源性比较.

结果表明, 所分离的菌株 A607 与 *Bacillus pumilus* 16S rDNA 的相似性水平达到 99% 以上. 用 Clustal X 和 PHYLIP 等软件分析该菌株和已报道的碱性蛋白酶产生菌, 得到的系统发育进化树, 如图 3 所示. 图 3 中, 用于进化树构建的菌株的名称和序列登录号, 如表 3 所示.

通过与已知的类群在系统分类上的聚类分析, 可见菌株 A607 与 *Bacillus pumilus* 处于同一分支, 该结果与序列同源性比较结果一致.

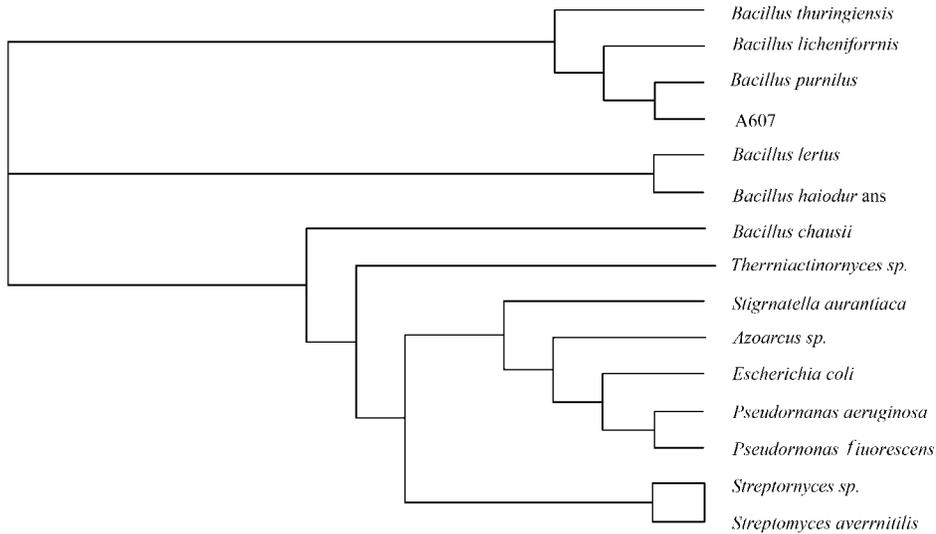


图 3 系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree

表 3 菌株的名称和序列登录号表

Tab. 3 The proteolytic activity of the fermentation broth

菌株名称	登录号	菌株名称	登录号
A607	EF563825.1	<i>Bacillus pumilus</i>	EF528291.1
<i>Bacillus subtilis</i>	AB305270.1	<i>Bacillus lentus</i>	AM086233.1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	EF537013.1	<i>Bacillus halodurans</i>	EF466141.1
<i>Bacillus clausii</i>	AB251924.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AB305018.1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	EF552157.1	<i>Thermoactinomyces sp.</i>	AB239530.1
<i>Streptomyces sp.</i>	EF582615.1	<i>Azococcus sp.</i> (strain EbN1)	AB241407.1
<i>Stigmatella aurantiaca</i>	DQ768127.1	<i>Streptomyces avermitilis</i>	DQ768097.1
<i>Escherichia coli</i>	EF560794.1		

3 讨论

目前, 碱性蛋白酶已经被广泛地应用到在食品、洗涤及制革等行业. 传统制革工艺造成严重的环境污染, 该问题的解决有赖于酶法脱毛的大力推广. 通过对筛选所获得的菌 A607 进行研究, 初步鉴定该菌为短小芽孢杆菌, 并证实其发酵酶液具有碱性蛋白酶活力和良好的脱毛效果.

由实验可知, 菌 A607 所产的碱性蛋白酶只能达到酶活为 $263.39 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 、比活力为 $1215.24 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$ 的水平, 与他人报道相比, 酶活力并不是非常高. 刘彦等^[6]从富含蛋白质的土壤中筛选出一株碱性脱毛蛋白酶产生菌(*Bacillus sp.* 8), 其蛋白酶活力为 $3.3 \text{ mkat} \cdot \text{L}^{-1}$. Genckal 等^[13]从自然环境中筛选得到的一株耐碱性的芽孢杆菌 L21, 对该菌的发酵条件进行优化后产生的碱性蛋白酶酶活力可达 $3.6 \text{ mkat} \cdot \text{L}^{-1}$, 不过其比活仅为 $1.0 \text{ mkat} \cdot \text{g}^{-1}$.

A607 发酵所得的酶液虽然酶活力只有 $263.39 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$, 但只要 16 h 的处理时间即可完全除去毛. 黄庆等^[12]对野生菌 BA(06) 进行多次诱变得到的短小芽孢杆菌 UN-31-G-42, 其发酵所得的发酵液酶活力高达 $70.0 \text{ mkat} \cdot \text{L}^{-1}$, 酶液需经 24 h 才发挥脱毛作用. 这说明了该酶在酶活力较低的情况下,

仍能达到与同类脱毛酶相差不多的脱毛效果.从这个角度来说, A607 更有改造前景作为原始菌株.此外,还可以考虑通过优化发酵条件、构建基因工程菌、选用合适的添加剂等手段提高其产酶效率.

能够应用在脱毛工艺的酶必须本身不具备胶原水解能力,因为胶原水解酶的存在会使皮革生产的主要原材料——胶原受到损伤,进而影响成革质量^[14].通过实验,证实了 A607 发酵产生的酶是一种良好的脱毛蛋白酶,本身几乎不具备胶原水解能力,在制革工业上具有很大的应用潜力.在此基础上可以进一步对其脱毛作用进行研究,不断提高酶法脱毛效果,以期更好地应用于制革脱毛领域.

参考文献:

- [1] 许 伟,戴 红,张宗才.制革脱毛方法研究进展[J].皮革科学与工程,2004,14(4):20-24.
- [2] ROSE A H. Economic microbiology[J]. London: Academic Press, 1980:51-72.
- [3] 邱秀宝,程秀兰,袁 影.嗜碱性芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究[J].微生物学通报,1988,15(3):104-104.
- [4] 刘 彦,何先祺,张义正.碱性脱毛蛋白酶产生菌的选育[J].皮革科学与工程,1998,8(4):6-13.
- [5] 沈 萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999:69-74.
- [6] 刘 彦,何先祺.No.813产生的蛋白酶性质研究[J].四川联合大学学报:工程科学版,1998,2(2):107-111.
- [7] 张树政.酶制剂工业:上册[M].北京:科学出版社,1984:260-274.
- [8] JOSEPH R M, JOSEPH H D. Purification and characterization of a marine bacterial collagenase[J]. Biochemistry, 1978,17(14):2857-2863.
- [9] 靳鸿蔚,刘桂兰,王 耿.一株胶原酶产生菌的筛选及系统发育分析[J].华侨大学学报:自然科学版,2008,29(3):387-390.
- [10] RIFFEL A, ORTOLAN S, BANDELLE A. De-hairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2003, 78: 855-859.
- [11] WEISSBURG W G, BARNS S M. 16S rDNA amplification for phylogenetic study[J]. J Bacteriol, 1991, 173:697-703.
- [12] HUANG Qing, PENG Yong, LI Xin, et al. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*[J]. Current Microbiology, 2003(46):169-173.
- [13] GENCKAL H, TARI C. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus sp.* isolated from natural habitats [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006,39:703-710.
- [14] NILEGAONKAR S S, ZAMBARE V P, KANEKAR P P. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326[J]. Bioresource Technology, 2007,98:1238-1245.

Isolation and Phylogenetic Analysis of a Strain Producing Alkaline Protease for Dehairing

WANG Geng, FANG Bai-shan, ZHANG Ting-ting,
JIN Hong-wei, LIU Gui-lan

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Fujian Province University, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: A strain named A607 which yields of alkaline protease for dehairing was isolated from soil. After shaker flask fermentation, it is found that the A607 is of proteolytic activity ($1\ 215.24\ \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}\ \text{protein}$; $263.39\ \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$) and displayed good dehairing activity in the culture solution. Analysis of 16S rDNA sequence suggested that the A607 strain was the closest relative of *Bacillus pumilus* with 99% sequence identity. The phylogenetic analysis was performed by PHYLIP. The result showed that A607 had a high degree of similarity to *Bacillus pumilus* according to the phylogenetic tree.

Keywords: *Bacillus pumilus*; alkaline protease; dehairing; 16SrDNA; phylogenesis

(责任编辑: 陈志贤 英文审校: 陈国华)