

# 高产碱性蛋白酶地衣芽孢杆菌的研究进展

杨金龙<sup>1</sup>, 潘康成<sup>1</sup>, 赵小林<sup>2</sup>

(1. 四川农业大学动物科技学院, 四川 雅安 625014; 2. 四川农业大学林学院艺学院, 四川 雅安 625014)

中图分类号: Q55 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2005)01-0059-03

碱性蛋白酶(Alkaline protease)广泛存在于微生物中, 最早发现在猪的胰脏中<sup>[1]</sup>, 1913 年 Rhom 首先将胰蛋白酶作为洗涤浸泡剂使用。1945 年瑞士的 Dr. Jagg 等发现了微生物碱性蛋白酶, 使其成为洗涤剂的主要添加剂之一。碱性蛋白酶在丝绸、制革工业、饲料工业、动物食品加工中也有广泛用途, 如添加到动物饲料中以提高饲料利用率; 用于制作海鲜调味品; 用于 CGM (玉米渣) 的水解, 以制取玉米肽饮料; 水解大豆蛋白生产大豆多肽等。由于市场的需求, 高产、高效、耐高温、耐高碱的四高型碱性蛋白酶成为国内外当前研究的热点。现将我国有关地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶菌株的选育、酶生产工艺条件和碱性蛋白酶基因工程等方面的研究现状介绍如下。

## 1 菌株选育的研究

### 1.1 从土样中筛选菌株

产碱性蛋白酶的地衣芽孢杆菌菌株大多是从自然环境中分离筛选而得。冯清平等(1994)采集全国有关生态土样 28 份, 将初选获得的菌株进行摇床培养测定, 挑选出生长快、易过滤、性状好、酶活力较高的 1 株为实验菌株。将其接种在生孢子培养基上 50 °C 培养 72 h, 洗下孢子置 80 °C 水浴中处理 15 min, 然后稀释涂皿, 挑选单菌落进行摇瓶培养, 进一步选育出活力在 45 °C 为 1 250 U/ml 的菌株 53-A6<sup>[2]</sup>。胡承等(1999)从 11 份样品中分离到 124 株产碱性蛋白酶的菌株, 经反复比较后, 最终得到 8 株产酶活力超过 1 000 U/ml 的菌株。其中编号为 JF-1d 的菌株产酶活力达 1 400 U/ml, 且产酶稳定, 发酵液澄清, 粘度小<sup>[3]</sup>。

### 1.2 紫外诱变原生质体选育碱性蛋白酶高产菌株

为了提高地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶的产量, 薛林贵等(1995)以地衣芽孢杆菌 53 号菌为出发菌株, 在原生质形成和再生的最佳条件下制备原生质体, 并对原生质体进行了多次诱变处理, 最终获得了高产、稳定、耐高温的菌株 53-G<sub>38-6</sub>, 产酶活力由 1 104 U/ml 提高到 22 080 U/ml<sup>[4]</sup>, 该菌株热稳定性强, 60 °C 处理 1 h 剩余酶活 55 %, 在 pH 9~10.5 范围内比较稳定, 这也是近年来用诱变法获得的较为理想的四高型产碱性蛋白酶的地衣芽孢杆菌菌株<sup>[5]</sup>。方海红等(2001)对曾分离得到的地衣芽孢杆菌饒山亚种 011 菌株进行连续 4 次不同的物理化学诱变, 最后获得一株高产碱性蛋白酶的变异株(C-03), 产酶活力从 725 U/ml 提高到 12 425 U/ml, 经验证, 该突变株的最适产酶条件为 pH 8.0~9.0, 培养温度 32~37 °C, 振荡培养时间 44~48 h, 从而为人们诱变高产地衣芽孢杆菌提供了新的经验<sup>[6]</sup>。

## 2 酶生产工艺条件的研究

### 2.1 地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶提取新工艺

如何解决碱性蛋白酶提取工艺落后的问题, 我国科研工作者进行了不懈的努力。周晓云等(1993)研究了以 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 为主要盐析剂提取碱性蛋白酶的工艺, 分别就 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 加量、pH 值和温度 3 个因素进行试验, 确认 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 最佳用量为 25 %, 最佳 pH 值为 8.5 和最佳温度 30 °C; 其中 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 是影响盐析的主要因素, 而 pH 值和温度的影响较小, 从而提出了用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 取代有严重恶臭味的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 作盐析剂的新工艺路线<sup>[7]</sup>。彭勇等(2000)将地衣芽孢杆菌 JF-1d 进行 3 级发酵后, 将发酵液离心去

收稿日期: 2004-07-05

作者简介: 杨金龙(1969-), 男, 河北唐山人, 讲师, 硕士, 主要从事微生态与兽医药理学的教学工作, 研究方向为应用微生态工程与新兽药开发。E-mail: yangjinlongfirs0@163.com

菌体,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分段盐析透析后进行 Sephadex G—100 柱层析得粗酶制剂, 比活力从 1 878 U/mg 提高到 6 795 U/mg, 酶活力回收率为 35.3%, 并测得此酶水解酪蛋白的最适反应温度为 55 °C, 最适 pH 为 10.5, 并具有较高的热稳定性, 对 SDS 有较强的耐受性<sup>[8]</sup>。

## 2.2 提高碱性蛋白酶生产效率的工艺条件

为了提高碱性蛋白酶的生产效率, 裴娟萍等(1995)就蛋白酶生产中培养基原料的选择、表面活性剂的添加及发酵终点的控制对产酶及酶活性稳定性进行了研究。在摇瓶发酵 20 h, 产酶进入旺盛阶段, 加入表面活性剂, 当发酵液 pH 达 7.0 左右时终止发酵, 比较添加的表面活性剂对产酶的促进作用。在地衣芽孢杆菌生长到对数期后期, 添加 0.01% 表面活性剂 Tx—10 碱性蛋白酶产量提高 27%, 而添加其他表面活性剂, 或者在对数周期前期、中期添加 Tx—10 表面活性剂产量都会下降, 生产中应注意表面活性剂的选用和添加时间。分别用新鲜的和有霉味、挂丝结块的玉米粉配制发酵培养基, 进行产量试验时, 发现霉变的玉米粉产生大量的泡沫, 酶产量下降 65%; 用东北大豆生产的豆饼粉做原料, 则产酶量较高<sup>[9]</sup>。

## 3 地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶基因的克隆及表达

### 3.1 地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶基因在枯草芽孢杆菌中的克隆及表达

Jacobs 等(1985)对 *B. Licheniformis subtilisin* 基因进行了克隆、DNA 序列分析和二级结构的比较研究, 所克隆的基因需要 *B. subtilis* 的启动子才能表达<sup>[10]</sup>。何超刚等(1988)对碱性蛋白酶生产菌 *B. licheniformis* 2709 的碱性蛋白酶基因进行克隆, 得到 5.0 kb DNA 片段<sup>[11]</sup>。吴宝东等(1992)采用 DNA 重组技术, 用鸟枪法克隆获得地衣芽孢杆菌  $\text{C}_{1213}$  碱性蛋白酶基因, 在对载体枯草芽孢杆菌穿梭质粒(PMK4DNA)进行处理时, 是将经 *Bam*HI 酶切后用 CIP 脱磷; 而  $\text{C}_{1213}$  染色体 DNA 的处理, 则是将经 *Sau*3A 酶切后用琼脂糖凝胶电泳法去除无效小分子和大分子 DNA 片段。将上述 2 种处理过的 DNA 片段按 2:3 的比例混合后用 T4 DNA 连接酶进行连接, 然后用其含 30  $\mu\text{g}$  PMK4 DNA 的连接混合物对 *BD*<sub>105</sub> 进行转化, 在 *DM*3+*Cm* 平板上得到  $2.2 \times 10^4$  个菌落, 将这些菌落复印到脱脂奶平板上, 共得到有水解圈的菌落 2 株。将得到的 1 株产蛋白酶的 *BD*<sub>105</sub> 接种在不含 *Cm* 的 LB 中, 经摇床培

养 37 °C 8 h 及 45 °C 2 h 后涂布于脱脂奶平板, 共观察 2 509 个菌落, 其中 60 株有水解圈, 并且只有这 60 株有 *Cm* 抗性, 说明蛋白酶基因重组于 PMK4 质粒上, 用 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定其胞外蛋白质分子量, 得知此基因产物与  $\text{C}_{1213}$  碱性蛋白酶分子量相同, 是同一种蛋白酶, 再用酶切和琼脂糖凝胶电泳法确定所克隆 DNA 片段的物理图谱, 其大小为 2.3 kb<sup>[12]</sup>。

### 3.2 地衣芽孢杆菌 6816 碱性蛋白酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达

大多数碱性蛋白酶的基因克隆表达是在枯草芽孢杆菌蛋白酶缺失宿主中进行, 但要构建合适的表达载体并非易事, 成功地获得高表达的情况也很少。地衣芽孢杆菌 6816 碱性蛋白酶具有良好的特性, 为获得高效表达的碱性蛋白酶, 唐雪明等(2001)将地衣芽孢杆菌 6816 碱性蛋白酶基因成功地引入含 T7 启动子的大肠杆菌高效表达载体 PET—20b 中, 对碱性蛋白酶的高效表达进行研究。地衣芽孢杆菌 6816 碱性蛋白酶基因通过 PCR 扩增后, 经纯化回收, 再用 T4DNA 连接酶连接转化大肠杆菌 JM 109, 充分利用 PET—20b 载体上的信号肽, 使重组质粒为分泌表达载体, 命名为 pAPRI。经 SDS—PAGE 分析显示, 融合表达产物的分子量为 30 kD, 同核酸序列测定所推导的值相符, 表达产物占细胞总蛋白 7.5%, 重组菌的酶活提高 3.3 倍; 重组菌表达的碱性蛋白酶在进入大肠杆菌周质空间时存在前肽自动脱落的现象<sup>[13]</sup>。

## 4 结语

随着研究的深入, 特别是基因工程在菌种选育方面的运用, 地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶产量提高将有巨大的发展前景。在重视基因工程技术的同时, 不能忽视对自然界中四高菌株的筛选和诱变, 应加强对酶生产工艺条件的研究, 以满足工农业生产中对酶的大量需求。

### 参考文献:

- [1] Fogarty WM. Enzymes of eacillus species[J]. Process Biochem, 1974(7): 27—35.
- [2] 冯清平, 沈剑敏, 高燕. 紫外诱变原声质体选育碱性蛋白酶高产菌株的研究 III[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 1994, 30(4): 83—87.
- [3] 胡承, 彭勇, 王忠彦, 等. 地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究: I 碱性蛋白酶高产菌的筛选及产酶条件初探[J]. 工业微生物, 1999, 29(4): 27—30.

# 新城疫病毒的一般生物学特性及其致病的分子基础

程相朝<sup>1</sup>, 李慧琴<sup>2</sup>, 吴庭才<sup>1</sup>

(1. 河南科技大学动物科技学院, 河南 洛阳 471003; 2. 汝州市成人中专, 河南 汝州 467500)

中图分类号: S852.6      文献标识码: A      文章编号: 1004-3268(2005)01-0061-04

新城疫病毒(NDV)所致疫病鸡新城疫(ND)又称亚洲鸡瘟, 是禽类的一种以呼吸道、消化道黏膜出血为典型症状的高度接触性急性败血性传染病, 严重危害养禽业的发展。我国于 1935 年首次发现有 ND 的流行, 但到 1948 年才得以最后证实<sup>[1]</sup>。由于 ND 给世界养禽业造成的巨大损失, 故对其病原 NDV 的研究一直是禽病研究的重点。现就新城疫病毒的一般生物学特性及其致病的分子学基础综述如下。

## 1 NDV 的一般生物学特性

### 1.1 病毒的分类和理化特性

NDV 属于副黏病毒科、副黏病毒亚科的腮腺炎病毒属。病毒粒子呈多形性, 直径约为 100~250 nm, 有囊膜的病毒粒子一般呈圆形, 但常因囊膜破损而形态不规则。

影响 NDV 在宿主外生存的主要因素包括病毒的数量、毒株的种类、温度、湿度、阳光照射、贮存条件及是否存在有机物等。一般来说, NDV 对理化因素的抵抗力较强, 在 4℃经几周, -20℃经几个月,

-70℃经几年仍能保持其感染力; 大多数去污剂能迅速将其灭活; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 NaOH 的消毒效果不稳定; NDV 对酸、碱的耐受力较强, 在 pH 2 和 pH 10 条件下可存活数小时; 在 ND 爆发后经 28 周仍能从蛋壳、羽毛和鸡舍及鸡舍内物品中分离到 NDV。

### 1.2 NDV 的生物学活性

NDV 可凝集所有两栖类、爬行类、禽类及小鼠、豚鼠的红细胞, 但凝集牛、绵羊、猪、马及人 O 型血红细胞的能力, 则随毒株或血清型的不同而不同。NDV 凝集红细胞是由于其囊膜表面的 HN 糖蛋白与红细胞表面的受体结合所引起的。常用鸡红细胞做 HA 试验, 同时结合 HI 试验来进行 ND 的抗体监测及诊断<sup>[2]</sup>。

NDV 还具有神经氨酸酶活性(NA)。神经氨酸酶是 HN 蛋白的一部分, 该酶的主要作用是将病毒逐渐从红细胞上洗脱下来。

和其他副黏病毒类似, NDV 可引起红细胞溶解或细胞融合。在病毒复制时, 其囊膜附着于相应细胞膜的受体位点, 进而导致 2 个或多个细胞的融合。僵硬的红细胞膜常因与病毒间的膜融合而导致溶

收稿日期: 2004-10-25  
作者简介: 程相朝(1966-), 男, 河南汝州人, 教授, 博士, 主要从事畜禽疫病防治教学和科研工作。

[ 4 ] 薛林贵, 冯清平. 紫外诱变原生质选育碱性蛋白酶高产菌株的研究[ J ]. 兰州大学学报(自然科学版), 1997, 33(2): 72-78.

[ 5 ] 冯清平, 薛林贵. 复合诱变原生质选育耐热碱性蛋白酶高产菌[ J ]. 微生物学报, 1996, 36(6): 453-459.

[ 6 ] 方海红, 黄红英, 张林普, 等. 一株地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶的纯化[ J ]. 微生物学通报, 2001, 28(6): 52-54.

[ 7 ] 周晓云, 张西宁, 王晓渊. 地衣芽孢杆菌 A-57 碱性蛋白酶的提纯新工艺的探讨[ J ]. 科技通报, 1994, 10(6): 365-368.

[ 8 ] 彭勇. 地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶的纯化 II: 碱性蛋白酶的提纯和性质研究[ J ]. 工业微生物, 2000, 30(4): 37-40.

[ 9 ] 裴娟萍, 钟卫虹, 许伟峰. 提高碱性蛋白酶生产效率的工艺条件研究[ J ]. 科技通报, 1996, 12(4): 207-210.

[ 10 ] Myra Jacobs M, Eliasson M, Uhlen, et al. Cloning, sequencing and expression of subtilisin carlsberg form bacillus licheniformis[ J ]. Nucicic Acid Research, 1985, 13: 8913-8926.

[ 11 ] 何超刚, 徐明华, 金建中, 等. 地衣芽孢杆菌 a-淀粉酶基因的克隆和表达[ J ]. 工业微生物, 1988, 18(3): 1-5.

[ 12 ] 吴宝东, 杨秀, 吴经才. Bacillus Licheniformis 6818 碱性蛋白酶基因在 E. coli 中的克隆和表达[ J ]. 遗传, 1992, 14(3): 14-16.

[ 13 ] 唐雪明, 邵蔚蓝, 沈微, 等. 地衣芽孢杆菌 C<sub>1213</sub> 碱性蛋白酶在枯草芽孢杆菌中的克隆及表达[ J ]. 生物技术, 2001, 11(4): 3-6.