

嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 产胞外蛋白酶特性及其酶学性质

高瑞昌,赵梦琴,石彤,崔恒林,袁丽\*

(江苏大学 食品与生物工程学院,江苏 镇江,212013)

**摘要** 对嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 生长过程中的产酶特性做了初步研究,并研究了其胞外蛋白酶的理化特性。试验结果表明:嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 生长周期较长,从对数期开始分泌大量胞外蛋白酶;胞外蛋白酶的最适酶解反应温度是 60 ℃;该蛋白酶具有较好的热稳定性,70 ℃ 条件下放置 60 min,酶活力基本保持不变;最适反应 pH 为 7.5,在 pH 6.5~8.5 范围内酶活力保持稳定;此蛋白酶对 NaCl 耐受性不强,NaCl 浓度超过 2 mol/L 时,酶活力被显著抑制( $P<0.01$ );金属离子  $\text{Ca}^{2+}$  对蛋白酶活力具有激活作用,可以增强蛋白酶热稳定性; $\text{Mn}^{2+}$  则对蛋白酶活力具有抑制作用,而  $\text{K}^{+}$  与  $\text{Mg}^{2+}$  对蛋白酶活力无影响;1.31 mol/L 异丙醇以及 1 mmol/L DTNB 对酶活力基本无影响,5 mmol/L 的 EDTA 严重抑制其蛋白酶活力,1 mmol/L 的 PMSF 则使其完全失活,说明此酶可能是一种金属依赖性的丝氨酸蛋白酶。

**关键词** 嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp.;胞外蛋白酶;酶学特性

极端微生物是一类在包括高温、高盐、高酸、高碱和高压的极端环境中可以存活的生物体。它是在恶劣条件中仍然有活性和功能的酶的重要来源。现在所研究的极端微生物主要有:嗜热微生物、嗜冷菌和耐盐菌、极端嗜酸微生物、嗜碱微生物、嗜盐微生物、嗜压微生物等<sup>[1]</sup>。嗜盐细菌是生长在盐湖、盐碱土、盐沼、海水和盐场等高盐环境下的微生物<sup>[2]</sup>,其生长环境必须要有一定浓度 NaCl 的存在, $\text{Na}^{+}$  对嗜盐古生菌维持其细胞壁稳定性,防止细胞被裂解等有重要作用。

胞外酶是微生物生长过程中所分泌的主要代谢产物。嗜盐古生菌在生长过程中分泌的胞外蛋白酶具有一定的耐盐性,且在高盐条件下也可以完成催化反应。UDOMSIL 等人利用添加一种嗜盐球菌作为发酵剂以提高鱼露风味,添加嗜盐球菌可以对鱼露中氨基酸残基的侧链进行修饰、增加挥发性物质,并且可以减少鱼露产品中生物胺成分<sup>[3]</sup>。另外,DE 等人对 *Natrialba* 等属的嗜盐古生菌的产胞外蛋白酶的特性进行了研究<sup>[4]</sup>。国内也有研究者开始以丰富的嗜盐古生菌为资源进行了胞外蛋白酶筛选研究。石万良等报道了嗜盐古生菌(*Natrinema* sp.) R625 所产胞

外蛋白酶的特性<sup>[5]</sup>。高瑞昌等对嗜盐古菌 *Halogramma rubrum* RO2-11 所产胞外蛋白酶的特性进行了报道<sup>[6]</sup>。嗜盐古生菌独特的生存环境也造就了其胞外蛋白酶的特殊性质,为其在特殊领域的应用提供了天然保障,如高盐发酵工业、洗涤和污水处理行业等。

但是相对于资源丰富的嗜盐古生菌,对其特有蛋白酶资源的研究与利用还处于起步阶段。课题组前期从台北盐场分离鉴定了一株嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp., 本研究在其基础上对该菌产胞外蛋白酶的能力及其酶学性质进行初步研究,为进一步纯化鉴定以及在高盐发酵食品工业中的应用提供基础。

## 1 材料与方法

## 1.1 原料与仪器

嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 分离自台北盐场;LRH-250 培养箱,上海一恒科技有限公司;超净台,苏州净化设备有限公司;TE612-L 电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;HH-S<sub>2</sub> 数显恒温水浴锅,金坛市医疗仪器厂;BCD-227SF(NR-B2356)松下冰箱,无锡松下冷机有限公司;FE20-K 酸度计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.2 嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 的培养

以 4% 的比例将活化后的嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 接种到 250 mL 的 NOM 培养基中。NOM 培养基成分(g/L):酵母提取物 0.05,鱼蛋白胨 0.25,甲酸钠 0.25,醋酸钠 0.25,丙酮酸钠 0.25,KCl

第一作者:博士,教授(袁丽副教授为通讯作者,E-mail: mail: yuanli24@163.com)。

基金项目:国家自然科学基金(31340065);江苏大学"青年骨干教师培养工程";江苏高校优势学科建设工程资助项目

收稿日期:2016-06-05,改回日期:2016-07-14

5.4,  $\text{CaCl}_2$  0.29,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.27,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  26.8,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  23,  $\text{NaCl}$  184,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  buffer 2 mL/L。接种后,将培养液于 37 ℃ 的恒温培养箱中 160 r/min 培养,每隔 24 h 在无菌超净台上取出 10 mL 菌液,以 NOM 培养基为空白对照,用分光光度计在波长 550 nm 处测定吸光度。将剩余菌液在 9 000 r/min 离心 15 min (4 ℃) 除去菌株,取上清液作为酶液备用。

### 1.3 蛋白酶活力的测定

参考 ZBX 66030—1987<sup>[7]</sup>,用福林酚法测定蛋白酶活力。将酶液用相应的缓冲液稀释 2 倍,取 4 支干净的试管,标号 0,1,2,3。在每一支试管中准确加入 1 mL 酶液,然后向 0 号管中加入 2 mL 0.4 mol/L 的 TCA,在水温 60 ℃ 下,将酶液和 2% 酪蛋白分别预热 5 min,然后向每一支试管里准确加入 1 mL 酪蛋白,在 60 ℃ 下反应 20 min 后,立即向试管中加入 0.4 mol/L 的 TCA 2 mL 以终止反应。在室温下静置 10 min 后,5 000 r/min 离心 15 min,接着分别取 1 mL 的反应液于干净的试管中,加入 5 mL 0.4 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,1 mL 福林酚,40 ℃ 下显色 20 min 后,以 0 管为空白,在波长 680 nm 处测定吸光度。酶活力单位定义为 1 mL 的酶液在特定的温度,适当的 pH 条件下,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,以 U 表示。

### 1.4 酶学性质的测定

#### 1.4.1 蛋白酶的热稳定性测定

将酶液在 40、50、60、70、80、90 ℃ 下分别放置 20、30、40、50、60 min,然后参照 1.3 所述测定其酶活力。

#### 1.4.2 蛋白酶的最适反应温度

将酶液分别在 45、50、55、60、65、70、75、80 ℃ 下与底物进行反应,然后参照 1.3 所述测定其酶活力。

#### 1.4.3 蛋白酶的酸碱稳定性

将酶液的 pH 分别调至 6.0、7.0、8.0、9.0,于最适温度下放置 20、30、40、50、60 min 后,将再将酶液 pH 调整到最适 pH,然后参照 1.3 所述测定其酶活力。

#### 1.4.4 蛋白酶的最适反应 pH

用 50 mmol/L 的乳酸-乳酸钠缓冲液将反应液的 pH 调整到 6.0 和 6.5,用 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液将粗酶液的 pH 调整到 7.0、7.5、8.0、8.5 和 9.0,用 50 mmol/L 硼砂-NaOH 缓冲液将酶液的 pH 调整到 9.5 和 10.0,再与相应 pH 的底物在最适温度下反应,然后参照 1.3 所述测定其酶活力。

#### 1.4.5 NaCl 对蛋白酶活力的影响

向反应体系中加入不同量的 NaCl,使 NaCl 在反应体系中的终浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mol/L,将反应液在最适温度和最适 pH 下反应,然后参照 1.3 所述测定其酶活力。

#### 1.4.6 金属离子对蛋白酶活力的影响

向反应液中分别加入不同量的  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,使其  $\text{K}^+$  和  $\text{Mg}^{2+}$  在反应液中的终浓度分别为 5、10、15、20、25 mmol/L。使  $\text{Ca}^{2+}$  的终浓度为 1、3、5、10、15、20、25 mmol/L。使  $\text{Mn}^{2+}$  的终浓度分别为 1、2、3、4、5 mmol/L,在最适温度和最适 pH 下与底物反应,然后参照 1.3 所述测定其酶活力。

#### 1.4.7 $\text{Ca}^{2+}$ 对蛋白酶稳定性的影响

向 50 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中加入  $\text{Ca}^{2+}$ ,用此缓冲液对酶液进行稀释,使  $\text{Ca}^{2+}$  在反应体系中的终浓度为 5 mmol/L,将含有  $\text{Ca}^{2+}$  的酶液在 50 ℃ 下分别放置 20、30、40、50、60 min 后,分别取出酶液在最适温度和最适 pH 下与底物反应,用福林酚法参照 1.3 所述测定其酶活力。空白对照为缓冲液中不加  $\text{Ca}^{2+}$ 。

#### 1.4.8 添加剂对蛋白酶活力的影响

向反应体系中加入不同的添加剂,使其在反应体系中的终浓度分别为 EDTA: 5 mmol/L; isopropanol: 1.31 mol/L; PMSF: 1 mmol/L; DTNB: 1 mmol/L。然后在所得的最适反应条件下与底物酪蛋白进行反应,参照 1.3 所述测定其残留酶活,空白为不含添加剂的反应体系。

#### 1.4.9 数据分析

用 Excel2003 进行数据处理以及作图,并用 SPSS18.0 进行显著性分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 生长曲线及产胞外蛋白酶的特性

由图 1 可知,嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 菌株生长周期比较长,在生长前期就开始分泌胞外蛋白酶。从对数期开始,胞外蛋白酶含量达到最高且稳定。胞外蛋白酶的生成与嗜盐古菌的生长状态密切相关,且只有达到生长稳定期才能获得大量的蛋白酶。石万良等人研究的极端嗜盐古生菌 (*Natrinema* sp.) R6-5 胞外嗜盐蛋白酶也在对数生长期就可以检测到酶活,并且也是到达稳定期时活性最高<sup>[5]</sup>。

### 2.2 蛋白酶的最适反应温度与热稳定性

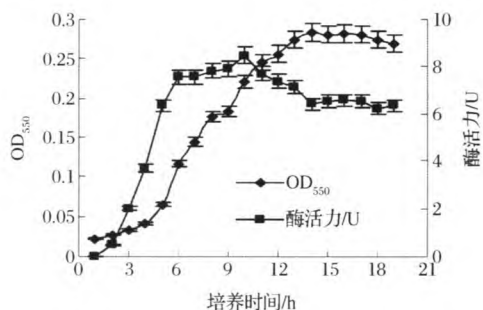


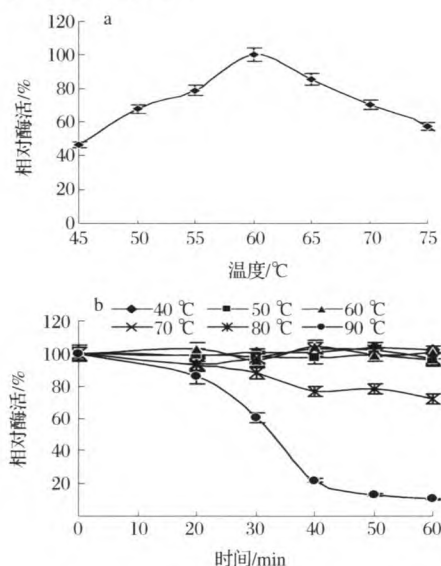
图1 嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 生长曲线及产胞外蛋白酶特性

Fig.1 Growth curve of *Halobacteriaceae* sp. and production of extracellular protease

由图 2. a 可知,嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 的胞外蛋白酶在 45 ~ 75 °C 内均有催化活性,但在 60 °C 时,蛋白酶活力最高。因此,此胞外蛋白酶的最适反应温度应为 60 °C。已有部分报道认为古生菌和地中海嗜盐菌产生的蛋白酶最适催化温度一般为 55 ~ 60 °C<sup>[8-9]</sup>,这与本研究中嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 胞外蛋白酶的最适反应温度相对应。

由图 2. b 可知,蛋白酶在 40 ~ 70 °C 水浴放置 20 ~ 60 min,酶活力基本保持不变,无显著差异 ( $P > 0.05$ )。但在 80 °C 放置 40 min 后则下降了 22% ( $P < 0.01$ ),60 min 后酶活力下降更为显著 ( $P < 0.01$ )。在 90 °C 下水浴 20 min 时虽然保持着一定活力,但是水浴 30 min 后,酶活力显著下降了 40% ( $P < 0.01$ ),而 1 h 后蛋白酶活力下降了 90%。蛋白质的三维空间结构高度依赖于一级结构氨基酸间的氢键、盐桥、二硫键等分子间作用力,蛋白酶作为一种蛋白质其活性依赖于具有特殊空间结构的活性中心,故其活性的稳定性取决于蛋白质三维空间结构。而加热可以改变蛋白质空间结构而使蛋白质变性造成蛋白酶失去活性。本研究显示 *Halobacteriaceae* sp. 的胞外蛋白酶具有较强的热稳定性,可能是由于其分子内部维持蛋白质结构的各种分子间作用力较强。而在 90 °C 下放置 30 min 后,蛋白酶活力下降可能是在更高温度下,能够提供足够的能量从而打破维持蛋白结构的作用力,造成蛋白质结构发生变化,从而破坏了特定的活性中心结构,导致酶最终失活<sup>[10]</sup>。MARUTHIAH 等人所报道的海洋芽孢杆菌 AP-MSU6 所分泌的胞外蛋白酶,最适反应温度为 40 °C,其稳定性试验表明,该酶只在 40 ~ 50 °C 时稳定<sup>[11]</sup>。高瑞昌等人研究的嗜盐古生菌 *Halogramum rubrum* RO2-11 的胞外蛋白酶活力只在 30 ~ 50 °C 范围内稳定<sup>[6]</sup>。而 SIN-

SUWAN 等人从泰式鱼露中分离出来的枝芽孢杆菌 SK33 所分泌的蛋白酶,其蛋白酶活力只在 60 °C 以下的温度保持稳定<sup>[12]</sup>。然而,在食品实际发酵过程中一般要保持一定的温度以控制发酵周期与产品品质,因此要求所用的发酵剂必须具有较好热稳定性,从而使蛋白酶能够更好的发挥作用。从试验结果可知,嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 具有较强的热稳定性,具有良好的应用前景。



a - 酶的最适反应温度; b - 蛋白酶的热稳定性

图2 温度对蛋白酶活性的影响

Fig.2 Effect temperature on the protease

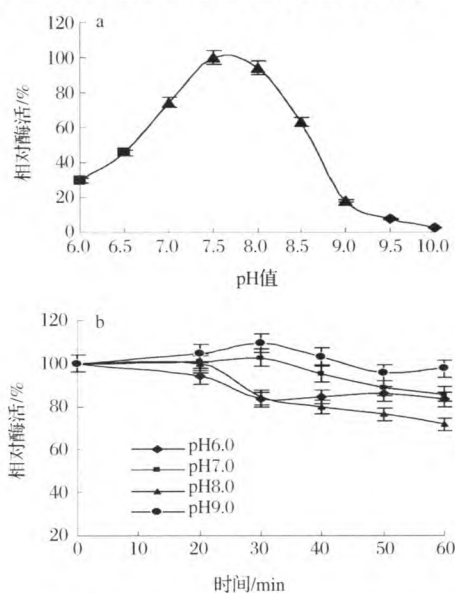
## 2.3 蛋白酶的最适反应 pH 和酸碱稳定性

由图 3a 可知,嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 的胞外蛋白酶在 pH 6.0 ~ 9.0 范围内保持着一定的活力,在 pH 7.5 时表现出最高的催化能力,因此 pH 7.5 是最适反应 pH,但当 pH 超过 9.5 时,蛋白酶基本失去了活力。一般认为中性蛋白酶的最适 pH 介于 6.0 ~ 7.5,因此可判断此酶应是中性蛋白酶。石万良等报道的嗜盐古生菌 (*Natrinema* sp.) R625 所产胞外蛋白酶的最适 pH 是 8.0,在 pH 9.0 时仍保持较高活力,属于碱性蛋白酶<sup>[5]</sup>。

由图 3b 可知,嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 的胞外蛋白酶在 pH 6.0 ~ 9.0 范围内,酶活力基本稳定。值得注意的是,pH 8.0 时,酶的稳定性比其它 pH 下的稳定性要差,但 pH 8.0 时酶的活力是最高的。而高瑞昌等报道的嗜盐古菌 *Halogramum rubrum* RO2-11 所产胞外蛋白酶在 pH 8.0 ~ 11.0 之间都有较高的活性并保持相对稳定<sup>[6]</sup>。说明嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 的胞外蛋白酶是中性蛋白酶,适

合应用到食品生产中,以及用作工业去污剂等。

pH 作为蛋白酶所处环境中最重要的因素之一,对酶活性产生较大影响。作为蛋白质具有本身的等电点(PI),当环境 pH 接近蛋白酶 PI 时,会造成蛋白质沉淀而失去活性。当 pH 过高或过低时也会通过改变酶活性中心必须基团的解离程度而影响酶活性,也可能会通过改变蛋白底物的解离程度而影响酶分子与其结合,从而影响蛋白酶发挥作用。因此为了使酶发挥最佳催化效果时必须了解其最适 pH 及其稳定性,并在实际应用中合理控制催化环境。



a - 蛋白酶的最适 pH; b - 蛋白酶的酸碱稳定性

图3 pH 值对蛋白酶活性的影响

Fig. 3 Effect of pH on protease activity

## 2.4 NaCl 对蛋白酶活性的影响

极端嗜盐菌居住在含盐丰富的场所,例如海水、盐湖、以及高盐食品中。在这些盐浓度极高的环境中,一些普通微生物无法存活,而极端嗜盐菌的生长占优势地位。由图 4 可知,在 0.5 ~ 1.5 mol/L NaCl 浓度范围内,嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 的胞外蛋白酶的活力没有受到显著影响 ( $P > 0.05$ ),而当 NaCl 浓度达到 2, 2.5 和 3 mol/L 时,酶活力显著被抑制 ( $P < 0.01$ ),分别下降了 25%, 52%, 83%。结果表明嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 的胞外蛋白酶虽然产于嗜盐菌,却是在无 NaCl 条件下展示最佳酶活。高耐盐性是嗜盐古菌的酶的一个特征,这种特征可以应用在依赖于高盐高渗透压的生物技术上<sup>[13]</sup>。本研究中,该蛋白酶也显示出一定的耐盐特性,在 NaCl 浓度在 0 ~ 1.5 mol/L 时酶活力保持稳定,而海洋芽孢杆菌 AP-MSU6 所分泌的胞外蛋白酶在 NaCl

浓度为 1 mol/L 时,酶活力已下降了 25%,在 NaCl 浓度为 1.5 mol/L 时酶活力已经下降了 50%<sup>[11]</sup>。蛋白酶之所以能够耐受一定的 NaCl 可能与其活性中心必须氨基酸组成有关。氨基酸作为两性分子,在特定的环境中会因 pH 值不同而带一定的电荷,会产生静电斥力,对于蛋白质结构的稳定性具有较重要作用。而 NaCl 却具有屏蔽电荷的作用,且随浓度增加屏蔽作用增强。此蛋白酶在低浓度 NaCl 条件下静电斥力可能较强,结构较为稳定,然而当 NaCl 浓度增加足够高时,由于屏蔽作用增强,蛋白酶活性中心结构发生变化或者蛋白酶发生沉淀而造成蛋白酶活性显著下降。这种耐盐性在食品发酵中具有重要意义,如在含盐发酵的食品中,添加极端嗜盐古生菌作为发酵剂既达到发酵的目的又防止了腐败微生物的生长。将其应用到鱼露发酵中,其胞外蛋白酶可以在一定盐浓度的发酵环境中不失活并且发挥催化作用,加速鱼露中蛋白质的水解。如 AKOLKAR 等人将极端嗜盐古菌 SP1(1)作为发酵剂,添加到含 25% NaCl 的鱼露发酵过程中,结果显示鱼露中的蛋白质、多肽以及  $\alpha$ -氨基酸含量都比不加菌的空白对照要高<sup>[14]</sup>。

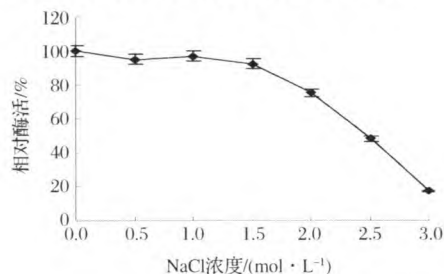


图4 NaCl 浓度对蛋白酶活性的影响

Fig. 4 Effect of NaCl concentration on protease activity

## 2.5 金属离子对蛋白酶稳定性的影响

由图 5 可知,  $K^+$  与  $Mg^{2+}$  对蛋白酶活力基本无影响,  $Mn^{2+}$  对蛋白酶活力具有明显抑制作用 ( $P < 0.01$ )。而  $Ca^{2+}$  对蛋白酶活性具有激活作用。Rachadech 等人提到浓度为 10 mmol/L 的  $Mn^{2+}$  对一些芽孢杆菌的碱性蛋白酶具有强烈抑制作用<sup>[15]</sup>。Kamekura 等人提到亚洲嗜盐碱杆菌 172P1 的胞外蛋白酶活力不受  $Mg^{2+}$  的影响<sup>[16]</sup>。本研究中  $Mn^{2+}$  对 *Halobacteriaceae* sp. 的胞外蛋白酶活力有抑制作用,表明该蛋白酶活性中心对重金属离子较为敏感,在离子作用下发生变性,导致酶活性中心结构发生变化,引起酶活性的丧失。而同为二价金属离子的  $Mg^{2+}$  对 *Halobacteriaceae* sp. 胞外蛋白酶的活力基本无影响,显示该蛋白酶对金属离子具有特异的选择性。对于



蛋白酶而言,金属离子通常分为激活因子和抑制因子,主要是通过改变活性中心的结构而改变酶活性,部分金属离子可能会通过改变底物和酶的结合程度而改变酶活性。

PHROMMAO 等人提出  $\text{Ca}^{2+}$  对 *Virgibacillus* sp. SK37 的胞外蛋白酶活性具有提高作用, $\text{Ca}^{2+}$  浓度达到 15 mmol/L 时,其蛋白酶活力达到最高<sup>[17]</sup>。本研究中  $\text{Ca}^{2+}$  也对嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 的胞外蛋白酶活性具有激活作用,当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度从 0 mmol/L 增加至 5 mmol/L 时,对酶活力具有明显促进作用( $P < 0.01$ )。当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度大于 5 mmol/L 时,对酶活力的促进作用下降,但  $\text{Ca}^{2+}$  浓度达到 25 mmol/L 时的酶活力仍然比浓度为 0 mmol/L 时酶活力要高出 22%。因此嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 胞外蛋白酶的最适反应  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为 5 mmol/L。MONTRIWONG 等人提到  $\text{Ca}^{2+}$  会增加蛋白酶结构的柔韧性,从而对酶活力有激发作用<sup>[18]</sup>。

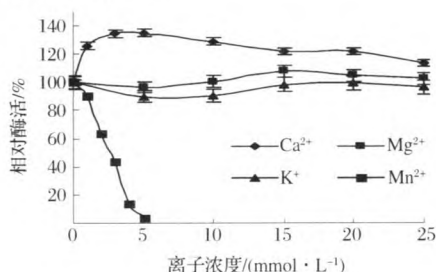


图5 金属离子对蛋白酶活力的影响

Fig. 5 Effect of metal ions on protease activity

## 2.6 $\text{Ca}^{2+}$ 对蛋白酶稳定性的影响

由图6可知,不添加  $\text{Ca}^{2+}$  的空白对照,在 50 °C 水浴 60 min 后,其蛋白酶活力残留率为 91.85%,在此温度下蛋白酶活性的半衰期为 8.21 h。而  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为 5 mmol/L 时,在 50 °C 水浴 60 min 后,其蛋白酶活力残留率为 97.01%,蛋白酶活性的半衰期为 23.10 h。结果表明, $\text{Ca}^{2+}$  可能通过稳定蛋白质构象而增强蛋白酶的热稳定性,从而有效地延迟酶活力丧失。

## 2.7 添加剂对蛋白酶活力的影响

由表1可知,经 1.31 mol/L 的异丙醇处理其残留酶活力为 84%,说明该酶可以耐受一定浓度的有机溶剂。经 1 mmol/L DTNB 处理后其残留酶活力为 96%,说明该酶活性中心不含巯基。EDTA 作为金属离子螯合剂具有强烈的螯合作用,可通过螯合  $\text{Ca}^{2+}$  等金属离子使酶活性中心失去辅助因子,从而起到抑制蛋白酶作用。本研究中 5 mmol/L 的 EDTA 能显著

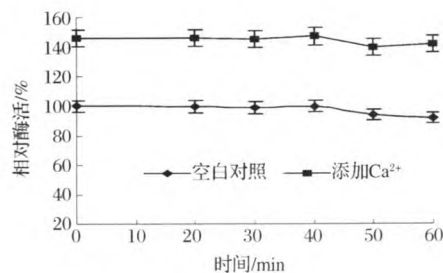


图6  $\text{Ca}^{2+}$  对蛋白酶活力的影响

Fig. 6 Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on protease activity

抑制嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 的胞外蛋白酶活性,酶活力与空白相比下降了 57% ( $P < 0.01$ )。而 PMSF 是一种不可逆的丝氨酸蛋白酶特异性抑制剂,在 1 mmol/L 条件下,该蛋白酶完全失活,说明此酶是一种丝氨酸蛋白酶。综上可知该蛋白酶应是一种金属依赖性丝氨酸蛋白酶。JELLOULI 等人也曾报道过地衣芽孢杆菌的丝氨酸蛋白酶受 EDTA 的强烈抑制,酶活力与空白相比下降了 40%<sup>[19]</sup>。酶的催化反应体系通常是复杂的,尤其是实际工业生产中常存在一些其他因素而影响催化反应,因此充分了解某些常见添加剂对酶活性影响是非常必要的。

表1 添加剂对酶活性的影响

Table 1 Effects of different inhibitors on extracellular protease

添加剂	浓度	残留酶活力/%
空白		100
isopropanol	1.31 mol/L	84
DTNB	1 mmol/L	96
EDTA	5 mmol/L	43
PMSF	1 mmol/L	0

## 3 结论

嗜盐古生菌 *Halobacteriaceae* sp. 能够分泌胞外蛋白酶,这种蛋白酶具有较强的温度耐受性,并且  $\text{Ca}^{2+}$  能够提高其热稳定性;该酶属于一种中性蛋白酶,具有一定的 NaCl 耐受性,依赖于  $\text{Ca}^{2+}$ ,能够耐受一定的异丙醇和 DTNB,但被 PMSF 和 EDTA 强烈抑制,因此该酶应该属于一种金属依赖性的丝氨酸蛋白酶。

## 参考文献

- [1] 董锡文,薛春梅,吴玉德. 极端微生物及其适应机理的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2004, 25(1): 74-77.
- [2] 沈萍. 微生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 2000.

- [3] UDOMSIL N, RODTONG S, CHOI Y J, et al. Use of tetragenococcus halophilus as a starter culture for flavor improvement in fish sauce fermentation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(15): 8 401 - 8 408.
- [4] De C R E, MAUPIN-FURLOW J A, KARINA H S M, et al. Haloarchaeal proteases and proteolytic systems[J]. Fems Microbiology Reviews, 2006, 30(1): 17 - 35.
- [5] 石万良, 钟传奇, 唐兵, 等. 极端嗜盐古生菌(*Natrinema* sp.) R625 胞外嗜盐蛋白酶的纯化和性质研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(1): 161 - 163.
- [6] 高瑞昌, 刘向东, 陆文婷, 等. 嗜盐古生菌 *Halogramma rubrum* RO2-11 胞外蛋白酶酶学特性研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(2): 32 - 36.
- [7] 中华人民共和国专业标准. ZB X 66030-87. 蛋白酶活力测定法[S].
- [8] GIMENEZ M I, STUDDERT C A, SANCHEZ J J, et al. Extracellular protease of *Natrialba magadii*: Purification and biochemical characterization[J]. Extremophiles Life Under Extreme Conditions, 2000, 4(3): 181 - 188.
- [9] STEPANOV V M, RUDENSKAYA G N, REVINA L P, et al. A serine proteinase of an archaeobacterium, *Halobacterium mediterranei*: A homologue of eubacterial subtilisins[J]. Biochemical Journal, 1992, 285(pt 1): 281 - 286.
- [10] KAMRAN A, REHMAN H U, QADER S A U, et al. Purification and characterization of thiol dependent, oxidation-stable serine alkaline protease from thermophilic *Bacillus* sp. [J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2015, 13(1): 59 - 64.
- [11] MARUTHIAH T, ESAKKIRAJ P, PRABAKARAN G, et al. Purification and characterization of moderately halophilic alkaline serine protease from marine *Bacillus subtilis* AP-MSU6[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2013, 2(2): 116 - 119.
- [12] SINSUWAN S, RODTONG S, YONGSAWATDIGUL J. A NaCl-stable serine proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from Thai fish sauce[J]. Food Chemistry, 2010, 119(2): 573 - 579.
- [13] IBRAHIM A S S, AL-SALAMAH A A, ELBADAWI Y B, et al. Production of extracellular alkaline protease by new halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15 isolated from hyper saline soda lakes[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2015, 18(3): 236 - 243.
- [14] AKOLLAR A V, DURAI D, DESAI A J. *Halobacterium* sp. SP1 (1) as a starter culture for accelerating fish sauce fermentation[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(1): 44 - 53.
- [15] RACHADECH W, NAVACHAROEN A, RUANGSIT W, et al. An organic solvent-, detergent-, and thermostable alkaline protease from the mesophilic, organic solvent-tolerant *Bacillus licheniformis* 3C5[J]. Microbiology, 2010, 79(5): 620 - 629.
- [16] KAMEKURA M, SENO Y. A halophilic extracellular protease from a *Halophilic archaeobacterium* strain 172P1[J]. Biochemistry and Cell Biology, 1990, 68(1): 352 - 359.
- [17] PHROMMAO E, YONGSAWATDIGUL J, RODTONG S, et al. A novel subtilase with NaCl-activated and oxidant-stable activity from *Virgibacillus* sp. SK37[J]. BMC Biotechnology, 2011, 11(1): 65 - 65.
- [18] MONTRIWONG A, KAEWPHUAK S, RODTONG S, et al. Novel fibrinolytic enzymes from *Virgibacillus halodentificans* SK1-3-7 isolated from fish sauce fermentation [J]. Process Biochemistry, 2012, 47(12): 2 379 - 2 387.
- [19] JELLOULI K, GHORBEL-BELLAAJ O, AYED H B, et al. Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization [J]. Process Biochemistry, 2011, 46(6): 1 248 - 1 256.

## Biochemical characteristics of an extracellular protease secreted by *Halobacteriaceae* sp.

GAO Rui-chang, ZHAO Meng-qin, SHI Tong, CUI Heng-lin, YUAN Li\*

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212031, China)

**ABSTRACT** In this paper, the characteristics and the production process of an extracellular protease secreted by *Halobacteriaceae* sp. were studied. The strains grew slowly and secreted the maximum protease in Exponential phase. The optimum reaction temperature for this extracellular protease was 60 °C. Further stability experiments showed that this protease was stable at 40 - 80 °C. The protease activity was stable in pH range of 6.5 - 8.5 with an optimum pH of 7.5. Activity of the protease decreased with addition of NaCl. Among the tested metal ions,  $\text{Ca}^{2+}$  induced the activity of the protease as well as enhanced its thermal stability.  $\text{Mn}^{2+}$  inhibited the activity of the protease. The activity of the protease was not affected by  $\text{K}^+$  and  $\text{Mg}^{2+}$ . Slight inhibition of its activity was observed with 1.31 mol/L isopropanol and 1 mmol/L DTNB. The metallo protease inhibitor EDTA inhibited 57% of protease activity compared with control. The protease activity was completely inhibited by 1 mmol/L PMSF. The results suggested that the protease was a metal dependency serine-protease.

**Key words** *Halobacteriaceae* sp.; extracellular proteases; enzyme characteristic