

一株产蛋白酶不动杆菌的分离与酶学性质

李 伟, 龚劲松, 李 恒, 张旦旦, 陆震鸣, 许正宏, 史劲松*

(江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以脱脂奶粉或羊毛粉为唯一碳氮源, 从环境样品中筛选蛋白酶产生菌, 首次获得一株高产蛋白酶的醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*) E9, 初步发酵优化显示, 该菌株的最适发酵产酶温度 35 ℃, 培养基初始 pH 6.0, 接种量为质量分数 4%, 培养时间 30 h; 发酵培养基: 蔗糖 10 g/L, 牛肉膏 15 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 7 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1 g/L。酶学性质初步研究表明, 不动杆菌 E9 所产的蛋白酶属于中性蛋白酶, 最适作用温度 50 ℃, 最适 pH 8.0, 在 pH 5.0~8.0 及 40 ℃ 以下时具有良好的稳定性, 酶反应动力学参数 K_m 为 7.067 mg/mL, V_{max} 为 966.7 $\mu g/(mL \cdot min)$ 。

关键词: 蛋白酶; 筛选; 鉴定; 醋酸钙不动杆菌; 酶学性质

中图分类号: Q 939 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2017)01-0008-07

Screening of a Protease-Producing Strain *Acinetobacter calcoaceticus* and Characterization of the Enzyme

LI Wei, GONG Jinsong, LI Heng, ZHANG Dandan, LU Zhenming, XU Zhenghong, SHI Jinsong*

(School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A strain E9 to produce protease efficiently was screened from environmental samples with skimmed milk as carbon and nitrogen sources and was identified to be a strain of *Acinetobacter calcoaceticus* based on biochemical and physiological properties as well as the 16S rDNA gene sequencing. Its optimal fermentation conditions were found to be temperature 35 ℃, initial pH 6.0, inoculation 4% and culture time of 30 h, and the optimal fermentation medium contained 10 g/L of sucrose, 15 g/L of beef extract, 7 g/L of $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 3 g/L of KH_2PO_4 and 1 g/L of $MgCl_2 \cdot 6H_2O$. The resulting protease showed high activity and superior stability with moderate temperature and neutral pH values, and its kinetic parameters K_m and V_{max} were determined to be 7.067 mg/mL and 966.7 $\mu g/(mL \cdot min)$, respectively.

Keywords: protease, screening, identification, *Acinetobacter calcoaceticus*, enzymatic properties

蛋白酶广泛分布于动物、植物和微生物中, 是生命活动中一类极为重要的水解酶。1945 年 Jaag

等人地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* 中发现了碱性蛋白酶^[1-2], 从此微生物源蛋白酶逐步成为蛋

收稿日期: 2015-04-08

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA022204C)。

* 通信作者: 史劲松(1971—), 男, 江苏宿迁人, 工学博士, 教授, 主要从事酶工程及天然活性物质开发研究。Email: shijs@163.com

引用本文: 李伟, 龚劲松, 李恒, 等. 一株产蛋白酶不动杆菌的分离与酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(01): 8-14.

白酶研究的热点。微生物繁殖速度快,种类繁多,培养方法简单,易于大批量生产和提取。因此,微生物蛋白酶的筛选和应用研究一直是生物催化与转化领域的一个十分重要的工作。然而,近30年来,并没有很多新的蛋白酶品种投入到工业应用中,目前应用的主要品种仍然芽孢杆菌蛋白酶,如地衣芽孢杆菌2709^[3]和C₁₂₁₃^[4]、短小芽孢杆菌289和209^[5],上述蛋白酶大都为中温、碱性品种,普遍存在中性催化活力低、温度稳定性不好、粗品气味较大等缺点。随着众多工业领域对新型酶制剂的需求,未来蛋白酶的研究发展将主要集中于:(1)继续筛选新来源的蛋白酶菌种和基因资源,为蛋白酶在制革、纺织等领域的应用提供新的素材;(2)利用分子改造技术对微生物蛋白酶进行性能优化,通过高效表达为工业领域提供性能优良的酶品种^[6-8],而微生物资源和基因资源将是这项工作的基础。

作者从自然环境中采集土样,筛选蛋白酶产生菌株,经过多级筛选共获得各类产酶菌株数十株,其中首次发现了一株产蛋白酶的不动杆菌E9。不动杆菌一般主要来源于土壤和水中,以鲍氏不动杆菌为主,而醋酸钙不动杆菌报道很少^[9]。已有研究主要涉及脂肪酶的表达合成^[10]及环境污染物的生物降解^[11-12],而关于不动杆菌属菌株产蛋白酶的研究尚未见文献报道。作者通过生理生化和分子生物学鉴定确立该菌株E9为一株产中性蛋白酶的醋酸钙不动杆菌*Acinetobacter calcoaceticus*,并发现该菌株所产中性蛋白酶具有较高的催化潜力和良好的稳定性。E9蛋白酶的发现,对研究微生物蛋白酶的来源与进化关系也具有一定意义,而且,不同微生物来源的酶类在结构、序列和催化机制方面往往存在较大的差异,其深入研究将加深对酶的构效关系理解,并推动酶的分子改造工作。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 样品来源 土样,采集自羊圈、畜牧场土壤、皮革厂等富含蛋白的环境,置于低温保存。

1.1.2 培养基 初筛培养基(g/L):脱脂奶粉(或羊毛粉)10,NaCl 0.5,琼脂粉 18;pH 自然;复筛和发酵基础培养基(g/L):葡萄糖 5,蛋白胨 10,酵母粉 5,K₂HPO₄·3H₂O 7,KH₂PO₄ 3;pH 7.0;种子培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母粉 5,NaCl 10,pH 自然。

1.1.3 主要试剂及仪器 细菌基因组DNA提取试剂盒、小量质粒提取试剂盒及琼脂糖凝胶回收试剂盒:购自上海捷瑞生物工程有限公司;扩增及克隆所用试剂:购自宝生物工程(大连)有限公司(Takara);胰蛋白胨、酵母粉:Oxoid公司产品。

小型高速离心机:Eppendorf公司产品;PCR扩增仪,Bio-Rad公司产品;核酸电泳系统,COSMO Bio公司产品;生化培养箱:博讯公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 产蛋白酶菌株的初筛 称取1g土样,加到9mL无菌水中,充分振荡后,吸取上层浊液稀释至10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸和10⁻⁹级数,各吸取50μL涂布在初筛培养基上,置于37℃生化培养箱中培养48~96h,观察是否有透明圈的菌落。挑取透明圈较大的单菌落,划线分离,并通过镜检确定为纯化菌落。

1.2.2 产蛋白酶菌株的复筛 将初筛菌株接种至种子培养基中,30℃,220r/min放置于回旋式摇床中培养12h,再转接至复筛培养基中,培养48h后,取1mL菌液进行高速离心,12000r/min离心10min。取上清进行蛋白酶酶活检测。选取酶活最高的菌株进行后续实验研究。

1.2.3 蛋白酶酶活测定 采用福林法(GB/T23527-2009)进行酶活检测。

酶活定义:1mL液体酶在40℃和pH8.0条件下,1min水解酪蛋白产生1μg酪氨酸为一个酶活力单位。

酶活计算公式:酶活力(U/mL)=A×K×4/10×n

A:样品平行试验的平均A值;K:吸光常数;4:反应试剂的总体积;10:酶解反应时间;n:酶液稀释总倍数。

1.2.4 产蛋白酶菌株的形态及生理生化鉴定 将筛选并纯化好的菌株划线在LB培养基平板上,37℃培养,观察菌落形态。革兰氏染色后镜检。

生理生化鉴定参照伯杰细菌手册第九版进行相关实验。

1.2.5 16S rDNA 分子鉴定 参照文献[13],采用细菌基因组提取试剂盒提取基因组,用细菌16S rDNA通用引物(正向引物P0:5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物P6:5'-CTACGGCTACCTTGT TACGA-3')进行16S rDNA的扩增。扩增产物经0.8g/dL琼脂糖凝胶电泳,割胶回收后连接pMD-19T载体,转化至宿主*E.coli* JM109中,采用

小量质粒提取试剂盒提取质粒,送至上海生工测序。测序结果在 NCBI 的 GenBank 中进行 BLAST 序列比对,确定种属。采用 MEGA 5.0 软件进行同源比对分析,构建系统发育树。

1.2.6 菌体生长及产酶曲线 将目的菌株接种至发酵基础培养基中,37 ℃、220 r/min 培养。每隔 2 h 取样检测 OD600 值与蛋白酶酶活,绘制菌株生长及酶活曲线。

1.2.7 发酵条件 采用摇瓶方式研究发酵条件,回旋式摇床转速 220 r/min,培养温度 37 ℃,接种量为体积分数 1%,培养时间 30 h。依次改变接种量、培养温度、初始 pH,考察不同培养条件下菌株产蛋白酶情况。在单因素优化培养条件下,开展发酵培养基的碳源、氮源和金属离子的优化。

1.2.8 粗蛋白酶的性质 发酵液 12 000 r/min,4 ℃ 离心 10 min,取上清为粗酶液。研究温度、pH、金属离子、蛋白酶抑制剂和表面活性剂等对粗酶的影响,并进行反应动力学参数测定。

1) 温度对蛋白酶酶活的影响 酶液经过适当稀释,分别于 10、20、30、40、50、60、70、80 ℃ 条件下测定蛋白酶活力,研究酶的最适作用温度和温度稳定性。

2) pH 对蛋白酶酶活的影响 配制浓度为 0.04 mol/L H_3BO_3 、 H_3PO_4 、 CH_3COOH 的不同 pH 的 B-R 缓冲液,分别测定 pH 3.0~11.0 范围的酶活,确定该酶的最适作用 pH 值。取适量酶液分别用不同 pH 的缓冲液稀释至适当浓度,于 40 ℃ 静置 1 h,按照酶活测定方法测定残余酶活力。

3) 金属离子、蛋白酶抑制剂和表面活性剂等化学试剂对酶活的影响 在酶液中分别添加不同金属离子(5 mmol/L 和 10 mmol/L)、表面活性剂(1 g/dL)、蛋白酶抑制剂(5 mmol/L)等化学试剂,分别测定酶活力。以未添加的反应管为对照。

4) 酶反应动力学参数 用 pH 8.0 的缓冲液分别配制不同质量分数的酪蛋白溶液:0.1%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2%,分别测定上述底物浓度下的蛋白酶酶活,利用数据分析软件 GraphPad Prism 5.0 计算该酶以酪蛋白为底物时的 K_m 值和 $V_{\max}$ 值,并以 $1/V$ 对 $1/[S]$ 进行双倒数作图。

1.2.9 统计学分析 在研究的每项实验中,均设 3 个平行。采用统计分析软件 GraphPad Prism 5 对实验数据进行平均值和标准差分析。

2 结果与讨论

2.1 环境微生物群落中蛋白酶产生菌的筛选

环境微生物群落中包含丰富的微生物资源,通常采用富集培养的方法,可筛选出在特定条件下生长的微生物。作者以牛奶、羊毛粉为唯一碳氮源,从羊圈、畜牧场土壤、皮革厂等环境中采集土样,筛选各类蛋白酶产生菌株,经过平板初筛和测酶活复筛的两级筛选共获得各类蛋白酶产生菌 30 余株,其中包括两株高产角蛋白酶的短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus*^[14]和链霉菌 *Streptomyces aureofaciens*^[15],短小芽孢杆菌角蛋白酶能有效水解角蛋白底物而对胶原蛋白的酶活较低,可用于制革领域的脱毛工艺,另外,酶还对 SDS、吐温、曲拉通等表面活性剂具有较强的耐受能力,因而该蛋白酶在洗涤剂工业中也具有一定的应用潜力;链霉菌角蛋白酶则表现出对强碱性条件及多种表面活性剂存在下的突出稳定性,同样表明了该蛋白酶的潜在应用价值。

本次筛选中,首次发现了一株产蛋白酶的不动杆菌 E9。通过生理生化和分子生物学鉴定确立该菌株为一株产蛋白酶的醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*),并发现其具有较高的产酶潜力。为了进一步挖掘该酶的产酶能力及考察该酶的应用性能,作者对醋酸钙不动杆菌产蛋白酶进行了深入研究,考察了不同发酵条件对于产酶的影响,并分析了优化后的蛋白酶的酶学特征。

2.2 菌株 E9 的形态学特征及系统分析

2.2.1 生理生化及形态学特征 菌株 E9 在 LB 平板上培养 24 h 后菌落呈圆形、中间隆起、边缘整齐、湿润有光泽,颜色为米白色。镜检(革兰氏染色)形态为球杆状,革兰氏阴性。菌株 E9 的生理生化特征见表 1,参考伯杰细菌手册第九版,发现该菌株属于不动杆菌属(*Acinetobacter*)菌株特征相似。

2.2.2 16S rDNA 测序及系统进化分析 提取菌株 E9 的基因组 DNA,经 PCR 扩增的 16S rDNA 片段送至上海生工公司测序,测序结果在 NCBI 中采用 BLAST 软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行比对。比对结果表明,该菌与醋酸钙不动杆菌 *Acinetobacter calcoaceticus* (KJ149815.1)具有最高相似度,为 99%;采用 N-J 法构建菌株 E9 的系统发育树(图 1),结果显示菌株 E9 与 *A. calcoaceticus* (KJ149815.1)在同一分支上。综上所述,将该菌株确

认为醋酸钙不动杆菌(*A. calcoaceticus*)。不动杆菌在外界环境中广泛存在,主要来源于土壤和水,在人体的各处也有分布。在不动杆菌属中,醋酸钙不动杆菌报道较少。在已有文献资料中,醋酸钙不动杆菌仅被报道用于产生脂肪酶^[10]及用于降解柴油^[16]、表面活性剂^[17]和农药^[11-12]等,而关于该菌株产蛋白酶的研究尚未见文献报道。

表1 菌株E9的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical properties of strain E9

鉴定项目	鉴定结果
革兰氏染色	-
氧化酶	-
淀粉水解	+
明胶液化	+
硝酸盐还原性	-
青霉素耐受性	+
需氧性	+

注:“+”表示阳性或能利用;“-”表示阴性或不能利用

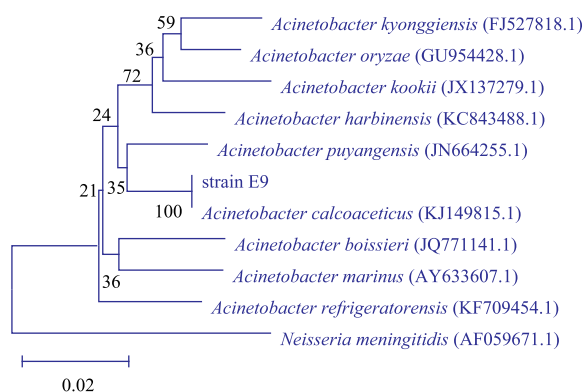


图1 菌株E9的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of strain E9

2.3 发酵条件研究

2.3.1 生长曲线和产酶曲线 由图2得知,菌株E9在0~8 h处于延滞期,从第8 h开始进入对数生长期,第30 h菌浓达到最高值,在第35 h左右时菌体开始进入衰亡期。菌株产蛋白酶的趋势与菌体生长情况具有密切联系,第30 h产酶水平达到最高,最高酶活为418 U/mL。

2.3.2 培养条件对产蛋白酶的影响 考察了培养温度、pH以及接种量对于发酵产酶的影响。由图3(a)可以看出,在一定温度下,菌体浓度和产酶水平随着温度升高而增加,在35℃时达到最高值,之后

随温度升高菌体和产酶均呈下降趋势。pH对产酶影响的结果表明,初始pH为6.0时,生物量和蛋白酶酶活均达到最高(图3(b)),在pH 6.0~7.0范围内均表现较高酶活,其他pH条件下生物量和酶活显著下降,说明初始pH在中性左右适合菌体生长及发酵产酶。另外,接种量的大小对产酶影响差异不大(结果未显示),在体积分数0.5%~6%的接种量范围内微生物均能获得较高的生物量和产酶水平,最终选取产生较高酶活的体积分数4%作为后续实验的接种量。

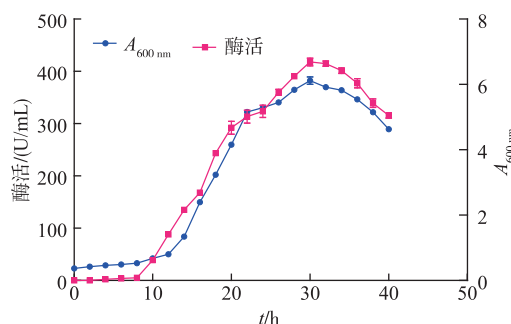
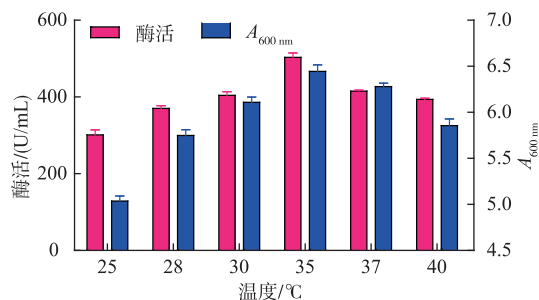
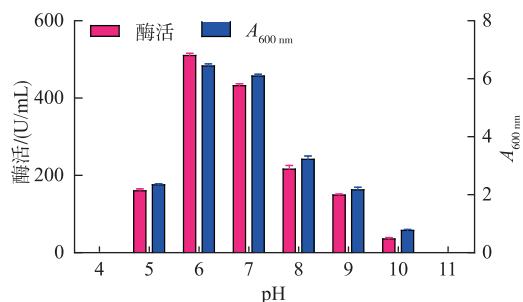


图2 菌株E9发酵生长与产酶曲线

Fig. 2 Curves of cell growth and enzyme activity of strain E9



(a)培养温度对产酶影响



(b)初始pH对产酶影响

图3 培养温度和初始pH对产酶影响

Fig. 3 Effects of cultivation temperature and initial pH on the production of protease

2.3.3 碳源对产蛋白酶的影响 将蔗糖、麦芽糖、玉米粉、可溶性淀粉、甘油、柠檬酸以及不添加碳源(对照2)替代初始培养基(葡萄糖,对照1)的碳源,研究不同碳源对菌株的产酶影响。在产酶发酵过程中碳源为糖的情况下,有蛋白酶的产生,且蔗糖作为碳源能有效促进菌株发酵产生蛋白酶(结果见图4),可溶性淀粉也有较好的促进作用。将蔗糖质量浓度进行进一步的优化,最终结果表明质量浓度为10 g/L时酶活最高。不动杆菌属为非发酵糖革兰氏阴性杆菌,生长过程对营养要求不高,在无糖的条件下,菌体也能生长良好,但无蛋白酶产生,研究发现现有糖存在时能促进产酶。在不动杆菌产胆固醇氧化酶的发酵中也发现了类似现象。

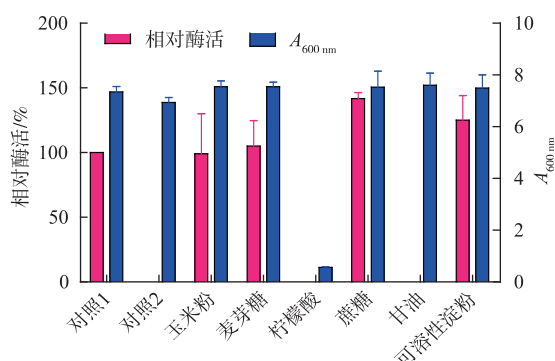


图4 不同碳源对产酶影响

Fig. 4 Effects of carbon resources on the production of protease

2.3.4 氮源产蛋白酶的影响 将玉米浆、豆饼粉、蛋白胨、牛肉膏和胰蛋白胨替代初始培养基的氮源,研究不同氮源对菌株的产酶影响。图5显示,牛肉膏对酶活促进作用最显著,其次为豆饼粉、蛋白胨和大豆蛋白胨,这些氮源中蛋白含量高,对蛋白酶的生产有一定的诱导作用。选择牛肉膏为发酵最适氮源,并进行浓度优化,在牛肉膏质量浓度为10~15 g/L时相对酶活较高,而在15 g/L时获得最高生物量,因此选择15 g/L为其最适浓度。

2.3.5 金属离子产蛋白酶的影响 在培养基中分别添加5 mmol/L的金属离子,以考察不同金属离子对于产酶的影响,结果表明金属离子对产酶的影响并不显著(图6)。Na⁺对产酶具有微弱的抑制作用, K⁺和 Mn²⁺则提高约5%的酶活,仅有 Mg²⁺对产酶具有明显的促进作用,经进一步的浓度优化最终选择

5 mmol/L为其最适浓度。

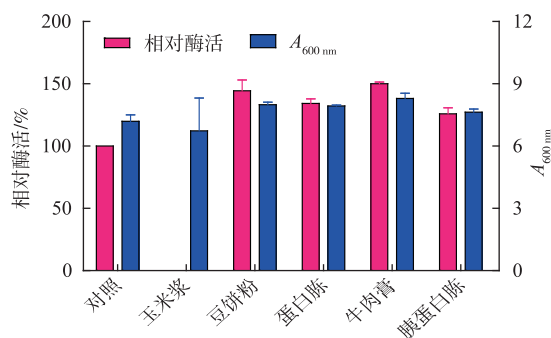


图5 不同氮源对产酶影响

Fig. 5 Effects of nitrogen resources on the production of protease

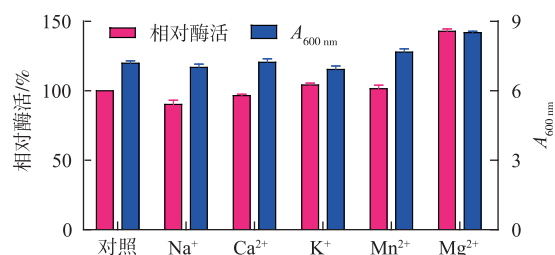


图6 不同金属离子对产酶影响

Fig. 6 Effects of metal ions on the production of protease

2.3.6 优化条件下发酵酶活检测 将菌株按体积分数4%接种量接种至单因素发酵条件优化后的培养基(蔗糖10 g/L,牛肉膏15 g/L, K₂HPO₄·3H₂O 7 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, MgCl₂·6H₂O 1 g/L, 初始pH 6.0)进行发酵,置于回旋摇床220 r/min, 35℃下培养30 h。发酵后进行蛋白酶酶活检测,酶活为570 U/mL,比优化前提高40%。

2.4 酶学特征研究

2.4.1 温度对蛋白酶酶活的影响 温度对蛋白酶活性的影响如图7(a)所示,一定温度范围内,酶活随着温度增加而提高,温度为50℃时酶活最高,这归因于温度升高使酶分子与底物分子的碰撞频率提高,从而获得了较高酶活性。然而,超过60℃时酶活随温度升高而显著下降,这表明高温使酶蛋白变性失活。该酶在40~60℃之间酶活较高,属于中温蛋白酶。热稳定性研究结果显示,该酶在40℃以下具有较好的稳定性,当温度超过50℃,则稳定性减弱。

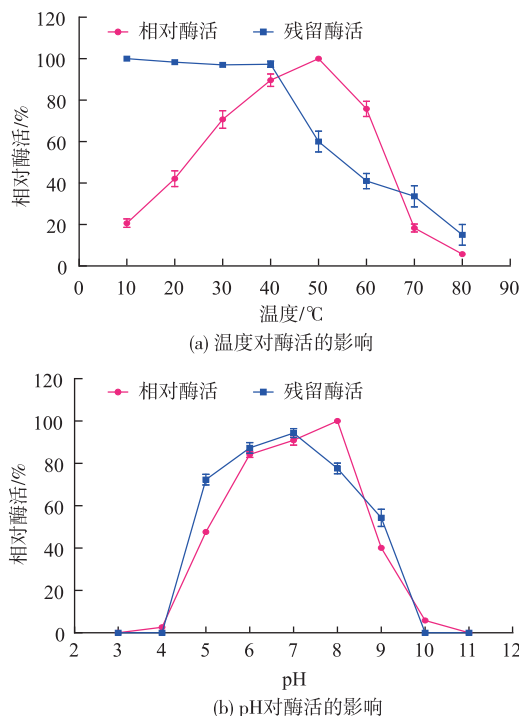


图 7 最适反应温度、pH 及其稳定性

Fig. 7 Effects of temperature and pH on protease activity and stability

2.4.2 pH 对蛋白酶酶活的影响 pH 对蛋白酶活性的影响结果见图 7(b), pH 在 6.0~8.0 时表现出较高酶活,在其他酸碱性条件下酶活均显著降低, pH 8.0 时酶活最高,因此选取 8.0 为酶反应的最适 pH 值。该蛋白酶为中性偏碱蛋白酶,在不同 pH 下静置 1 h 后,在 pH 7.0 时酶稳定性最好,最适 pH 8.0 下,1 h 残留酶活有 80%左右, pH 在 5.0~8.0 时酶活较为稳定,反映了该酶为中性蛋白酶的特点。

2.4.3 金属离子、蛋白酶抑制剂和表面活性剂等化学试剂对酶活的影响 金属离子浓度对酶活影响的研究结果表明,在 5 mmol/L 下, Ca^{2+} 对酶活有较高的促进作用(表 2),这可能归因于 Ca^{2+} 对酶的结构具有潜在影响,其他金属离子均无明显影响甚至存在抑制作用;在浓度为 10 mmol/L 时,所有测试的金属离子均对酶有不同程度的抑制作用。

表面活性剂则对酶活的影响较小(表 3),吐温 80 的存在对酶活还具有微弱的促进作用,而 1% 的 SDS 则对该蛋白酶无显著抑制效果;蛋白酶抑制剂 PMSF 和 EDTA 对酶有明显的抑制作用,而 DTT 对其抑制作用较弱,推测该蛋白酶属于金属丝氨酸蛋白酶类。

表 2 金属离子对蛋白酶酶活的影响

Table 2 Effects of metal ions on the activity of protease

金属离子	浓度/(mmol/L)	相对酶活
对照	0	100.00
Mg^{2+}	5	104.24±2.14
Zn^{2+}	5	—
Na^+	5	64.25±3.18
K^+	5	92.15±3.27
Ag^+	5	—
Ca^{2+}	5	179.26±3.71
Al^{3+}	5	—
Mn^{2+}	5	48.13±2.00
Fe^{3+}	5	44.32±8.79
Sr^{2+}	5	—

注:“—”表示未检测出酶活。

表 3 表面活性剂和蛋白抑制剂对蛋白酶酶活的影响

Table 3 Effects of surfactants and inhibitors on the activity of protease

化学试剂	浓度	相对酶活/%
对照	0	100
吐温 80	1%	102.71±0.86
TritonX-100	1%	83.52±2.72
SDS	1%	92.81±2.33
EDTA	5 mmol/L	24.62±1.13
DTT	5 mmol/L	92.13±2.10
PMSF	5 mmol/L	19.92±0.78

2.4.4 酶反应动力学参数 以不同浓度的酪蛋白溶液为底物分别测定 *A. calcoaceticus* 蛋白酶酶活。通过数据分析软件 GraphPad Prism 5.0 分析并计算,最终结果显示该蛋白酶的动力学参数 K_m 和 V_{max} 分别为 7.067 mg/mL 和 966.7 $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{min})$, Lineweaver-Burk 双倒数图见图 8。这与米曲霉 *Aspergillus oryzae* 蛋白酶的数值类似,其 K_m 为 8.36 mg/mL, V_{max} 为 12.95 $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ 。

3 结 语

作者从土样中筛选出数十株产蛋白酶的菌株,结果首次发现一株高产蛋白酶的不动杆菌 E9,经过形态学和分子生物学鉴定将菌株鉴定为醋酸钙不动杆菌(*A. calcoaceticus*)。鉴于目前尚未见有关该菌来源的蛋白酶报道,研究醋酸钙不动杆菌发酵产

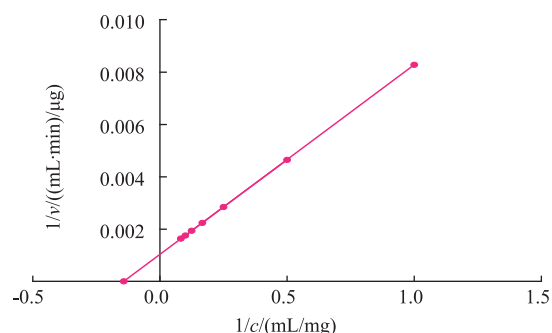


图 8 *A. calcoaceticus* 蛋白酶酶促反应动力学双倒数图

Fig. 8 Lineweaver-Burke plot of *A. calcoaceticus* protease

蛋白酶及其酶学特性具有重要的理论意义和实践价值。

通过对该菌株产蛋白酶的发酵条件和培养基成分分别进行优化,酶活力提高 40%,最高酶活达到 570 U/mL。对蛋白酶的粗酶性质进行了初步研究,发现该蛋白酶属于中温中性蛋白酶,在低温和中性条件下稳定性较好,低浓度 Ca^{2+} 对酶活具有促进作用。蛋白酶抑制剂 PMSF 和 EDTA 对该酶表现出较强的抑制作用,而 DTT 对其作用微弱,推测该蛋白酶属于金属丝氨酸蛋白酶类。

参考文献:

- [1] RAO M B, TANKSALE A M, Ghatge M S, et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases[J]. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 1998, 62(3): 597-635.
- [2] DENG Juyun. Research progress in microbial alkaline protease [J]. **Modern Food Science and Technology**, 2008, 24(3): 293-296. (in Chinese)
- [3] ZHAO Liangqi, QI Jing, GAO Jinyang, A kinetic study on the production of alkaline proteinase by *Bacillus licheniformis* 2709[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 1998, 14(4): 395-400. (in Chinese)
- [4] ZHENG Tiezeng, TU Tikun, HUANG Dengyu, et al. Study on raising activity of alkaline protease produced by strain C1213[J]. **Food and Fermentation Industries**, 1993(1): 25-31. (in Chinese)
- [5] QIU Xiubao, CHENG Xiulan, YUAN Ying. The study of alkaline proteinase in *Bacillus basophilus*- I. The study of screening, isolation and fermentation[J]. **Microbiology China**, 1988, 15(3): 101-104. (in Chinese)
- [6] LI D, HUANG F, XIA M, et al. Molecular cloning and expression of a novel mesophilic alkaline protease from *Bacillus* sp. L010 in *Escherichia coli*[J]. **ACTA Microbiologica Sinica**, 2013, 53(11): 1240-1250.
- [7] 郭继平. 米曲霉碱性蛋白酶的异源表达和定向进化以及遗传改造[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2008.
- [8] PAN Yanyun, ZHOU Yanfen, ZHANG Heying, et al. The construction and genetics identification of engineering strain producing alkaline protease[J]. **Natural Sciences Journal of Harbin Normal University**, 2004, 19(4): 97-100. (in Chinese)
- [9] LI Feng, CHAI Jiak, CHANG Dong. *Acinetobacter baumannii* infection in burn wards; 23 case analysis [J]. **Chinese Journal of Nosocomiology**, 2005, 15(6): 711-712. (in Chinese)
- [10] SHI Qiaoqin, CHEN Ruoying, XU Yiqing, et al. Studies on thermostable alkaline lipase in *Acinetobacter calcoaceticus* [J]. **ACTA Microbiologica Sinica**, 1992, 32(6): 425-431. (in Chinese)
- [11] LIU Tingting, DONG Kunming, MIU Li, et al. Isolation, identification and biodegradation characteristics of a bacterial strain able to degrade bifenthrin[J]. **Journal of Agro-Environment Science**, 2012, 31(6): 1147-1152. (in Chinese)
- [12] TANG Jie, ZHANG Qing, ZENG Chaoyi, et al. Isolation and characterization of deltamethrin degrading strain and its degradation characteristic[J]. **Journal of Xihua University-Natural Science**, 2014, 33(3): 108-112. (in Chinese)
- [13] CHEN Y S, YANAGIDA F, SHINOHARA T. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure[J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2005, 40(3): 195-200.
- [14] GONG J S, WANG Y, ZHANG D D, et al. A surfactant-stable *Bacillus pumilus* K9 α -keratinase and its potential application in detergent industry[J]. **Chemical Research in Chinese Universities**, 2015, 31(1): 91-97.
- [15] GONG J S, WANG Y, ZHANG D D, et al. Biochemical characterization of an extreme alkaline and surfactant-stable keratinase derived from a newly isolated actinomycete *Streptomyces aureofaciens* K13[J]. **RSC Advances**, 2015, 5(31): 24691-24699.
- [16] LIU Shasha, CHEN Zhiliang, DONG Jiahua, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of a diesel oil-degrading bacterium[J]. **Chinese Journal of Soil Science**, 2013, 44(6): 1440-1444. (in Chinese)
- [17] GUAN Xiangjie, HE Qiangli, HUANG Shuie, et al. Isolation, identification of a octylphenol polyethoxylate degrading strains and its degradation study[J]. **China Environmental Science**, 2014(6): 1556-1563. (in Chinese)