

摘 要

本论文以本实验室保存的深海适冷交替假单胞菌 *Pseudoaltermonas* sp. SM9913 所产的适冷蛋白酶为研究对象, 着眼于解决产酶效率和酶的稳定性两方面制约适冷蛋白酶产业化应用的关键因素, 取得了一定的进展。

首先对 *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶的发酵产酶条件进行了优化。研究结果表明, 在发酵培养基中添加一定量柠檬酸钠有利于提高产酶; 蛋白质类氮源物质如豆粕、豆饼粉对产酶具有促进作用, 较易吸收利用的氮源, 如豆粕水解液、蛋白胨、尿素、铵盐等, 对产酶有抑制作用; 钙、镁离子对产酶都有一定的促进作用, 而锌、铜、铁离子对产酶有抑制作用; 表面活性剂吐温 80 和 SDS 都对产酶有促进作用; 磷酸盐是产酶必需的; 发酵产酶是好氧过程, 装液量较少对产酶比较有利; 发酵液初始 pH7.0 以上有利于产酶。优化后产酶提高了约 65%, 但尚未达到工业化生产的要求, 需进一步对菌株加以改造, 以提高其产酶效率。

然后对 *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶粗酶及纯酶的热稳定性分别进行了研究。结果表明, *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶粗酶及纯酶溶液对热都比较敏感, 热稳定性较差。粗酶液在室温 (20~25℃) 和 30℃ 下保温 96 小时后酶活分别丧失 83.6% 和 94.9%, 纯酶溶液在 30℃ 下 60min 酶活丧失 40.3%, 在 40℃ 下 20min 酶活丧失 68.9%。然而干燥后的 *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶粗酶粉却具有很好的稳定性, 酶粉在室温和 30℃ 下保存三个月, 酶活基本没有丧失, 其稳定性完全可以达到工业化生产酶制剂的要求。结合以前的研究结果, 进一步表明 *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶在溶液状态下对热敏感的主要原因是自溶, 而非热变性。因此如何阻止该适冷蛋白酶自溶是保持其在溶液中稳定性的关键。

比较了几种不同的糖 (葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、海藻糖) 对粗酶液稳定性的保护作用, 海藻糖的保护作用最为显著。进一步研究了海藻糖在不同温度条件——20℃、30℃、40℃ 下以及不同浓度的海藻糖对粗酶液的保护情况, 结果表明, 不同温度 (20~40℃) 下, 海藻糖对粗酶液热稳定性都有很好的保护作用, 在一定程度上有效地阻止了适冷酶蛋白的自溶, 而且温度越高, 这种保护作用就越显著。海藻糖对粗酶液热稳定性保护作用的最佳浓度为 10~15%。海藻糖用于适冷蛋白酶纯酶的稳定性保护同样取得了很好的效果, 加入海藻糖后的纯酶溶

液 40℃保温 30min, 酶活基本没有丧失。

进一步对海藻糖保护适冷酶热稳定性的机理进行了探讨。利用高效毛细管电泳 (HPCE) 高效、快速的特点, 实时检测了 *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶纯酶在 40℃下自溶的动态过程以及海藻糖对酶蛋白的稳定性保护作用。结果表明, 海藻糖加入前后, *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶的毛细管电泳行为发生了明显的变化。海藻糖的存在, 可以在一定程度阻止适冷酶蛋白自溶的发生, 起到稳定适冷蛋白酶活性的作用。根据 HPCE 检测数据, 结合国外近年来的实验数据、研究结果, 对海藻糖稳定酶蛋白活性的机制进行了分析, 推测海藻糖对酶分子的稳定性保护作用是通过与酶蛋白整体结构的结合而实现的。这种结合作用的驱动力来自于酶蛋白表面的亲水性以及海藻糖强的水合特性, 海藻糖与酶蛋白之间似乎不存在强的氢键作用。

关键词: 适冷蛋白酶 发酵条件 稳定性 海藻糖 高效毛细管电泳

ABSTRACT

There are two key limits when cold-adapted protease is used in industry, one is enzyme production efficiency, and the other is its stability. We have studied the cold-adapted protease secreted by cold-adapted *Pseudoaltermonas* sp. SM9913 preserved in our lab and made some achievements to solve the above problems.

First, the fermentation conditions of the cold-adapted protease secreted by *P. sp.* SM9913 were optimized. The results showed that citrate would increase the production of protease. If bean-bits and bean-cake powders were added to the media as nitrogen sources, the yield of protease increased. While the nitrogen source that could be absorbed easily, such as bean-bits hydrolysate, peptone, urea and ammonium, restrained the production of protease. Some metal ions such as Mg^{2+} , Ca^{2+} promoted the *P.sp.*SM9913 to secret protease, while others such as Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} have negative effect. Surface-active agents, Tween 80 and SDS, could increase the production of protease. Phosphate was necessary for *P.sp.*SM9913 to secret protease. Oxygen was strictly needed in fermentation, less liquid culture medium was beneficial for production of protease. The initial pH of the medium above 7 was good for protease production. The yield of protease had increased by 65% after optimized, which still not accord with the standard of industrial production however. Further efforts like strain engineering needed to improve the enzyme production efficiency.

Second, the stabilities of crude and purified cold-adapted proteases secreted by *P.sp.*SM9913 were studied respectively. The results showed that they are all thermolabile. The activity of crude cold-adapted protease decreased 83.6% at room temperature for 96h and decreased 94.9% at 30℃ for 96h. The enzyme activity decreased 40.3% at 30℃ for 60min and decreased 68.9% at 40℃ for 20min. However, the crude enzyme was stable after freezing-dry or being dried at room temperature. While the enzyme powder was stored at room temperature and 30℃ for three months, the protease activity did not decrease, which accorded with the standard of industrial enzyme preparation. According to the research results before, cause of the

protease thermolabile in solution is further indicated to be “autolysis”, not denaturation. So, the key to keep protease stable in solution state is to prevent its autolysis.

Several sugars were used for stabilizing the crude protease. Trehalose has remarkable effect compared to other sugars. So the stabilized effects of trehalose at various temperatures were further studied. The results showed that trehalose could stabilize the crude protease effectively and its protective effects would increase when temperature rise. The optimal concentration of trehalose to stabilized crude enzyme is 10-15%. Trehalose has the same effect on stabilizing the purified protease, which could remain activity constant at the presence of trehalose at 40°C for 30min.

Last, the autolysis processes of purified protease with and without the protection of trehalose at 40°C were detected with capillary electrophoresis. It showed that the results were different in two conditions. Trehalose could inhibit autolysis and stabilize the protease. The stabilization mechanism was inferred according to the recent research results of home and abroad, that trehalose stabilized the protease by act on its integrated structure. The impetus of combination of trehalose and protease comes from hydrophilic property of protease surface and hydration of trehalose. There seems no hydrogen-bond action between them.

Key words: Cold-adapted protease; Fermentation; Stability; Trehalose; HPCE

原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名： 李建伟 日期： 2003.5.12

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解山东大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权山东大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

(保密论文在解密后应遵守此规定)

论文作者签名： 李建伟 导师签名： 张安忠 日期： 2003.5.12

第一章 前言

1.1 研究背景

海洋是人类赖以生存和发展的资料宝库。海洋面积占地球表面的 71%，海水总体积占地球总水量的 97%，浩瀚海洋中生活着 20 万余种生物，丰富多彩的海洋生物资源具有广阔的开发前景。海洋农业，将是为人类供应蛋白质的主要产地；海洋生物天然产物，将为人类提供治疗疑难病的特效药物和特殊功用的生化产品；海洋作为地球最大的生态系统，将对维护地球生存环境起举足轻重的作用（林锦湖 1994）。在“21 世纪是海洋开发的新世纪”的呼声中，发展海洋生物技术，加快海洋生物资源的开发利用进程，成了当今科学研究最具发展前景的领域，也成了科技较发达国家和地区今后经济发展的战略重点之一（林岳夫，尹卫平 1996）。

海洋生物技术是运用现代生物学、化学和工程学的手段，利用海洋生物体、生命系统和生命过程，生产有用产品的一门高技术科学，是现代生物技术与海洋生物学相交叉的产物，是 80 年代以来发展起来的新兴科学技术领域。海洋生物技术的发展将使人类更有效地开发海洋生物资源，对人多地少的我国生存和发展具有重要意义，将是未来知识经济的重要体现。

我国海洋生物经分类鉴定的有 20278 种，分属 44 个门，其中 12 个门是海洋中所特有的（印莉萍 1999）。1996 年，我国政府将海洋生物技术列入 863 国家高技术发展计划。目前海洋生物技术一方面着眼于天然资源的开发，另一方面利用细胞融合、染色体操作进行海洋生物的育种、海洋微生物与微藻类的研究。海洋生物具有耐盐、耐寒、耐热、耐压、光合成、固氮、硝酸还原、浮游、发光和吸磁等机能，人们期待在基因水平上阐明这些机能并加以利用。基于此，本实验室开展了对海洋深海适冷微生物的研究工作，并取得了海洋 863 计划的资助。本篇论文就是本实验室承担的海洋 863 课题——“深海适冷蛋白酶的研究”的部分内容。

深海是一个特殊的生态环境，这里永久低温（火山口除外）、高压、黑暗。生活在这种特殊环境下的微生物必然有特殊的生理代谢机制，对深海微生物的研

究不仅有助于我们了解生命的起源,而且可以了解各种极端微生物的生活特性,有助于我们对深海微生物资源的开发利用。深海中微生物种类和数量之多超乎人们的想象,在深海海水中存在着各种微型浮游微生物,海底沉积物中微生物的种类更为广泛(Norkrans and Stehn 1978; Vetriani 等 1999)。Takami 等(1997)通过平板培养在 10898 米深的海底沉积物中发现其中的微生物包括放线菌、真菌、非极端菌和各种极端菌如嗜碱菌、嗜热菌、嗜压菌、嗜冷菌等,通过 16SrDNA 同源序列比较发现其中的微生物种类远比培养出来的多。由于深海绝大部分处于低温,可以肯定,在这里生长的微生物大多为嗜冷或耐冷的。在 2500~6500 米深的海底沉积物中,分离的微生物可以证实这一点——其中大多为嗜冷的,在 20℃以上不能生长。例如深海菌株 DB67 在 1 个大气压下在 10℃以上则不能生长,但在高压下,其生长温度则要高一些(Kato 等 1995; Kato 等 1996; Isaksen and Jorgensen 1996)。

1.1.1 适冷微生物

1.1.1.1 定义

适冷微生物(Cold-adapted microorganism)也称低温微生物,最早的适冷微生物是由 Forster 发现的,他于 1887 年报道了在冷冻保存的鱼中分离到能在 0℃下生长良好的细菌。此后,大量能在低温环境中生存的有机生物体被发现,主要是细菌、酵母、单细胞藻类、霉菌(Russell 1992; Gounot and Russell 1999)。在 1902 年, Schmidt-Nielso 首先将能在 0℃下生长的微生物命名为嗜冷微生物(Psychrophiles)。以后, Ingraham 和 Stokes (1959)、Stokes (1963) 给出一个更为准确的定义,他们将在一周或两周内在 0℃下能够生长出肉眼可见的菌落的微生物称为嗜冷微生物,并区分成专性嗜冷微生物(obligate psychrophiles)和兼性嗜冷微生物(facultative psychrophiles)。专性嗜冷微生物是指最适生长温度低于 20℃的微生物,而兼性嗜冷微生物是指最适生长温度高于 20℃的微生物。由于在这个定义中,兼性嗜冷微生物并没有嗜低温的特征,与中温微生物难以区别,因此, Morita 于 1975 年重新给出了一个适冷微生物的定义。他将适冷微生物分成两大类:嗜冷微生物(psychrophiles)和耐冷微生物(psychrotrophs)。嗜冷微生物是指最适生长温度不高于 15℃,最高生长温度不高于 20℃的微生物。耐冷微生物是指在 0℃下能够生长繁殖,最适生长温度为 20~25℃的微生物。现

在 Morita 关于适冷微生物的定义已被广泛采用。

1.1.1.2 分布及微生物多样性

由于地球生物圈的 85%左右每年都会降到 5℃以下, 75%常年处于 5℃以下 (J.A. Baross, R.Y. Morita 1978; Peter P. Sheridan, Nicholas Panasik, Jonna M. Coombs, Jean E. Brenchley 2000), 因此适冷微生物在地球上广泛分布, 如南北两极地区、冰窟、高山、深海乃至冷库等低温环境中都有适冷微生物存在。自 Forster 发现适冷微生物以来, 各国科学家对低温环境下适冷微生物的多样性, 适冷微生物的分离培养、生理特征、遗传特征等进行了广泛的研究。对适冷微生物的研究不仅有助于我们了解适冷微生物在这些低温环境下对生物链、地球的物质循环所起的作用, 而且为人类利用这些适冷微生物资源奠定了基础。

适冷微生物在自然界中的种类很多, 具有广泛的微生物区系, 已发现的适冷微生物既有真细菌、蓝细菌, 又有酵母菌、真菌和藻类及古细菌。从各种环境中分离培养的结果来看, 细菌的数量最大, 种类也最多。在革兰氏阴性菌中, 数量最多、分布最广的是假单胞菌属, 其次是 *Achromobacter*、*Flavobacterium*、*Alcaligenes*、*Aeromonas*、*Xanthomonas*、*Serratia* 等。低温的革兰氏阳性菌有 *Arthrobacterium*、*Bacillus* 和 *Micrococcus* 等。适冷真菌在自然界中也很多。适冷的酵母 *Toralopsis* 属和 *Candida* 属是从极地冰、雪、土壤等自然环境中分离到的。另外, 从冷藏食品中分离到的适冷酵母有 *Candida*、*Cryptococcus*、*Rhodotorala*、*Toralopsis*、*Hanseniaspora* 和 *Saccharomyces*, 其中 *Candida* 是存在最为普遍的适冷酵母。目前已分离到的适冷真菌至少属于 8 个属, 数量最多、分布最广的是 *Penicillium* 和 *Cladosporium* (Margesin and Schinner 1994)。在极地和深海中也分离到一些种类的病毒, 这些病毒也可能具有适冷特征 (Danovaro and Serresi 2000; Fuhrman 1999)。在深海中还存在着适冷的蓝细菌和绿藻 (Jannasch and Taylor 1984)。在雪原上存在的著名的“红雪”现象, 实际上是由几种适冷的雪藻引起的, 最常见的一种是 *Chlamydomonas nivolis*。这些雪藻在 10℃以上不能生长, 产生鲜红的孢子形成所谓的“红雪” (Brock 1979)。

从低温环境中所分离到的适冷微生物中, 耐冷微生物的数量往往多于嗜冷微生物, 比如 Kobori (1984) 从南极海水中分离到 155 株细菌中, 耐冷菌占 77%, 而嗜冷菌占 23%, 这是由于耐冷菌在适应温度快速改变以及对环境中营养物的

利用上更具优势。这些适冷微生物对陆地和海洋低温生态环境中的物质循环和生物物质的初步生产具有重要作用。由于采样的困难以及培养技术的限制，目前分离到的适冷微生物种类还只是所有适冷微生物中很少的一部分。

1.1.1.3 适冷机制

适冷微生物经过长期的进化适应，形成了一套适应低温环境的特殊结构和特殊的代谢机制。

(1) 适冷微生物的适冷结构

对适冷微生物适冷结构研究最多的是其膜的结构。一方面，与中温微生物和嗜高温微生物相比较而言，适冷微生物膜中不饱和脂肪酸的比例增大，环状脂肪酸的比例减小，从而导致膜脂的熔点降低，使膜脂在低温下保持液态，具有流动性，这对适冷菌在低温下的生存非常重要 (Bhakoo M, Herbert, RA 1980; Marr and Ingraham 1962; Suutari M, Laakso S 1993; Neidleman 1990; Russell and Fukunaga 1990); 另一方面，膜的面积增大，使得适冷微生物在低温环境下也可以吸收更多的营养 (Russel and Fukunaga, 1990)。增加膜中不饱和脂肪酸含量从而改变膜的结构是微生物适应低温的策略之一，已被许多试验证实。将 *E.coli* 或 *Salmonella* 突变体培养在含不饱和脂肪酸的培养基中会导致这些菌的最低生长温度降低，增加其适冷性 (Marr and Ingraham 1962)。Canillac 等 (1982) 将中温的、耐冷的、嗜冷的三株 *Arthrobacter* 菌株分别培养在低于其最适温度的温度下，结果三株菌膜脂中不饱和脂肪酸的含量都增多。膜中的不饱和脂肪酸是由不饱和脂肪酸合成酶合成的，对嗜冷菌如 *Bacillus*、*Listeria*、*Pseudomonas*、*Brevibacterium* 和嗜冷酵母的研究表明，低温能诱导不饱和脂肪酸合成酶的合成，高温使适冷菌失去合成此酶的能力并导致酶失活。因此适冷菌在高温下难以保持膜中不饱和脂肪酸的含量，这可能也是适冷菌不耐高温的原因之一 (Gounot 1986)。

除了对适冷菌膜的结构研究较多之外，对适冷菌所产生的适冷酶的结构也有较为详细的研究，适冷酶特殊的结构特性将在下面的适冷酶综述部分具体说明。

适冷微生物能够在低温下正常生长，除了有适应低温的膜结构和酶结构之外，还有其它不同于中温或高温微生物的适低温结构。

(2) 适冷微生物的适冷代谢机制

适冷微生物能够适应低温特殊的生态环境，除了有适应低温的特殊结构之

外,更重要的是有适应低温的各种代谢机制,保证其在低温下的正常生长。这些机制包括低温下营养物质的吸收和转运、DNA 的复制合成、蛋白质的合成、合成代谢和分解代谢的正常进行、能量代谢的正常进行、细胞的分裂等(辛明秀,马延和 1996)。

a. 保持膜对胞外营养物质的正常转运吸收

中温微生物在低于 5℃ 时一般就不能吸收代谢外源物质而只能代谢内源物质,这是限制其在低温下生长的原因之一。而嗜冷微生物由于其膜在 0℃ 甚至 0℃ 以下仍具有流动性,因此它们在 0℃ 甚至 0℃ 以下仍可吸收胞外营养物质。Morton 等(1978)研究了嗜冷、中温和嗜热的 *Torulopsis* 属酵母对胞外葡萄糖的转运能力,发现只有嗜冷酵母能够在 2℃ 的低温下转运葡萄糖。Herbert 等(1992)研究比较嗜冷的弧菌和耐冷的假单胞菌在不同温度下对葡萄糖和乳糖的吸收速度时发现,嗜冷弧菌吸收利用葡萄糖和乳糖在 0℃ 时最快,而在 15~20℃ 时降低;而耐冷假单胞菌在 20℃ 时吸收葡萄糖和乳糖最快。由此可见,嗜冷微生物适应温度越低,在低温下膜转运和吸收营养物质的能力越强。嗜冷微生物这种能够在低温下保持膜对胞外营养物质运转吸收的能力,为其在低温下的正常生长提供了物质基础。

b. 在低温下产生大量不同类型的酶

许多研究表明,嗜冷微生物的最高产酶温度在最适生长温度以下(Hoshino 等 1997),嗜冷微生物一些酶的产生是由生长温度调节而不是生长速率调节的。嗜冷微生物在低温下产生更多的酶可以补偿低温下酶活较低的缺陷,保证其高效率地利用低温环境中的营养物质(Burini 等 1994; Guillou 等 1995)。

嗜冷菌还能够产生不同类型的同工酶,而且这些同工酶的热稳定性不同,Brenchley 等(1996)发现一株嗜冷菌产生的 β -半乳糖苷酶同工酶具有不同的最适温度。产生不同类型的同工酶可能是嗜冷微生物适应低温的方式之一。

c. 保持酶在低温下的高催化效率

由于嗜冷微生物产生的嗜冷酶的结构更具柔性,利用较少的能量就可发生构象转变,因而,嗜冷酶具有 K_m 低、 E_a 低、 K_{at} 高等特点,使其在低温下具有较高的催化效率。如 Hoshino(1997)从海洋鱼类中分离的 *Pseudomonas* sp. PL-4 产生的嗜冷蛋白酶最适催化温度为 25℃,在 0℃ 仍具有最高活力的 15%,而中

温蛋白酶的最适催化温度一般为 50~60℃，在 0℃下只具有不到 1%的最高酶活力。提高酶在低温下的催化效率也是适冷微生物适应低温环境的途径之一。

d. 加快蛋白质降解，提高生长速率

嗜冷菌的最适生长温度低于 15℃，耐冷菌的最适生长温度也一般为 20℃左右。因此适冷菌在低温下具有更高的生长速率。研究发现，随着温度的降低，适冷菌的生长速率降低得比中温菌慢。适冷菌的温度系数 Q_{10} 小于中温菌的 Q_{10} ，即适冷菌可以在低温下保持高的生长速率 (Margesin and Schinner 1994)。一些研究表明，耐冷菌的蛋白质降解速率比中温菌的要快得多 (Potier 等 1985; Araki 1991; Araki 1992)。蛋白质的迅速转换是适冷菌节省能量的途径之一，特别是在低温生态环境寡营养的情况下，加快蛋白质降解可以迅速为蛋白质的合成提供氨基酸。

e. 产生冷激蛋白 (CSPs)

冷激蛋白 (CSPs) 广泛存在于革兰氏阳性菌和阴性菌中，是细胞在应对冷刺激时所产生的一系列 7kb 左右的蛋白质。当生长温度突然降低时，无论是适冷微生物还是中温微生物都会被诱导产生冷激蛋白 (Mayr 等 1996; Whyte and Inniss 1992)。将嗜冷酵母 *Trichosporon pullulans* 的生长温度从 21℃降为 5℃，它在 12 小时内诱导合成了 26 种冷激蛋白 (Julseth and Inniss 1990)。冷激蛋白中有一些是酶，如与细胞膜在低温下发生结构修饰相关的去饱和酶等 (Russell NJ and Fukunaga N 1990; Russell NJ 1992)。冷激蛋白在适冷微生物对低温的生理适应过程中发挥着重要作用，主要是调节蛋白质的合成和 mRNA 的折叠。

随着新的适冷微生物资源的发现和对适冷微生物适冷机制的详细研究，对适冷微生物的应用将会越来越广泛。

1.1.2 适冷酶

近年来对适冷酶的研究越来越广泛深入。由于适冷酶具有柔性较高的构象，是研究酶的结构与功能的很好的材料，因此近年来的研究主要侧重于探讨适冷酶结构与功能的关系、适冷酶在低温下保持高催化效率的机制，同时探索适冷酶在食品、纺织、洗涤剂及环境保护等行业中的应用 (Gerday 等 1997; Gerday 等 2000)。

1.1.2.1 来源

目前所研究的适冷酶很大一部分是由适冷菌产生的, 还有一部分适冷酶是由中温酶通过生物工程技术如基因定点突变等而产生的 (Demirjian 等 2001; Feller 等 1996; Kano 等 1997; Roovers and Sanchez, 2001; Taguchi 等 2000; Wintrode 等 2000)。目前已报道的适冷酶种类很多 (Ishii 等 1987; Iyo and Forsberg, 1999; Ohkuma 等 1996; Ochiai 等 1979), 其中研究最多的是适冷菌产生的胞外酶如适冷的 α -淀粉酶、适冷蛋白酶、适冷脂酶等。由南极嗜冷菌 *Alteromonas haloplanetis* A23 产生的 α -淀粉酶是第一个被结晶的适冷酶。

1.1.2.2 特性

适冷酶的特性概括起来主要包括以下三个方面。

(1) 低温下较高的催化活性

适冷酶的最适催化温度一般明显低于同类中温酶和高温酶。如适冷蛋白酶的最适催化温度一般为 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$, 而中温蛋白酶的最适催化温度一般为 $50\sim 60^{\circ}\text{C}$ 。适冷酶一般在 0°C 甚至 0°C 以下仍具有较高的催化效率, 目前报道的适冷酶均具有此特征。适冷酶在 0°C 下的残余酶活比例要比同类中温酶高出数倍。比如, 适冷菌 *Fibrobacter succinogenes* S85 产生的适冷葡聚糖酶, 在 0°C 具有 70% 的最高酶活, 而同类中温酶在 0°C 只具有 18% 的最高酶活 (Iyo and Forsberg, 1999)。适冷酶的这一特性主要是由于适冷酶在低温下能够保持较高的转换数 (K_{cat}), 适冷酶低温下高的底物转化效率, 保证了适冷生物在低温下的代谢效率。如由南极嗜冷菌 *Bacillus* TA39 产生的 Subtilisin 当以 Suc-F-A-A-F-pNA 为底物时, 在 4°C 时转化系数 K_{cat} 为 32S^{-1} , 而中温菌 *Bacillus subtilis* 利用同样的底物时, 在 4°C 时的转化系数 K_{cat} 为 18S^{-1} (Feller 等 1996)。由南极鱼中分离的胰蛋白酶以 L-PABA 为底物时, 在 5°C 时的 K_{cat} 为 29min^{-1} , 而牛的胰蛋白酶用同样的底物在 4°C 时的 K_{cat} 为 5.4min^{-1} (Genicot 等 1988)。实验表明, 有许多适冷酶在低温下的 K_{m} 值降低。 K_{m} 值的降低表明酶与底物亲和力的增强, 这是适冷酶在低温下提高催化效率的一种途径。大部分适冷酶都是通过降低 K_{m} 或提高 K_{cat} 或二者都改变来提高酶在低温下的催化效率, 生理系数 $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 值高是适冷酶的基本特征。适冷酶的活化能明显低于中温酶, 表明酶进行催化反应所需的能耗少, 反应能够在低温下进行, 降低活化能也是酶提高在低温下催化效率的途径之一 (Feller and Gerday 1997)。适冷酶之所以能在低温下保持高催化活性, 必然有其分子结构方

面的原因。按一般知识理论推测, 应该是酶活性位点发生了改变。但是大量研究表明, 所有参与反应的氨基酸残基在适冷酶和中温酶中都是严格保守的 (Qian 等 1994; Fields and Somero 1998; D'Amico 等 2000)。因此, 适冷酶的冷适应分子基础必须另行找起。

(2) 热敏感性

绝大多数适冷酶只能在相对低的温度下保持高催化效率, 温度稍高即很快失活, 表现出很高的热敏感性。适冷酶的热变性温度均比同类中温酶低 15~20℃。尽管近年来的研究并未发现适冷酶低温下的高催化活性与其热敏感性之间存在系统性关联, 但是这种趋势确实在自然界中普遍存在。近年来人们更倾向于认为适冷酶的热敏感性是由于缺乏选择压力, 而不是适冷菌为了提高低温催化活性而诱导形成的物理或化学约束的结果 (Miyazaki 等 2000)。Wintrode 等人 (2001) 通过对适冷枯草杆菌蛋白酶 S41 进行定向进化获得的高稳定性突变体 3-2G7 比野生株蛋白酶适应温度更宽、活性更高, 这表明适冷酶并非一定是不稳定的。不过通过对继续传代几次获得的稳定突变株的进一步研究发现, 突变体蛋白酶尽管在 10℃ 时对小分子底物的催化活性明显高于中温 BPN' 枯草杆菌蛋白酶, 但并未表现出更高的酪蛋白水解活性 (Taguchi 等 2000)。而且, 在中温枯草杆菌 BPN' 的适冷突变株中也发现了稳定性降低的现象。在另一个与适冷枯草杆菌蛋白酶 S41 相关的实验中, 为提高中温枯草杆菌 *Bacillus sphaericus* 蛋白酶 SII 在低温下的催化活性, 所获得的四个适冷突变体中的三个表现出稳定性的降低 (Wintrode 等 2000)。因此, 要揭示适冷酶的冷适应性与热敏感性之间的可能关系, 还需要更多的实验证据加以阐明。

(3) 柔性

目前普遍被接受的假说认为, 适冷酶在低的适宜温度下较高的催化活性和较强的热敏感性与蛋白质结构柔性的提高紧密相关 (Fields PA, Somero GN 1998; Zavodszky P, Kardos J, Svingor, Petsko GA 1998)。对已报道的适冷 α -淀粉酶、枯草杆菌蛋白酶、 β -内酰胺酶、磷酸酶等的结构研究表明, 适冷酶在低温下较同类的中温酶和高温酶具有更高的柔性 (Feller and Gerday 1997)。在适冷酶的结构中, 盐桥的数量减少, 疏水核内芳香环的相互作用减弱, 脯氨酸与精氨酸残基数量减少, 酶的疏水性减弱, 亲水性增强, 使酶与溶剂的相互作用增强, 这些结构

的改变都有利于酶分子柔性的增加 (Marshall 1997)。酶分子中在适当部位的柔性的增加, 有利于活性位点与底物的接近和相互作用以及产物的释放, 这已被大量研究所证实 (Aittaleb 等 1997; Russell 等 1998)。如枯草芽孢杆菌蛋白酶 S41 与其同源中温酶相比, 底物结合部位有两个氨基酸残基被取代, 减少了活性部位入口的空间位阻, 使酶分子变得更具柔性, 降低了催化过程中构象改变所耗费的能量。在 S41 中, 盐桥与芳香族相互作用的减少也使酶分子柔性增加, S41 酶分子表面有四个长链的氨基酸残基以及大量的极性氨基酸残基, 主要为天冬氨酸, 使酶分子表面的长度与极性增加, 增强了酶分子与溶剂的相互作用, 使酶更具柔性, 同时降低了酶分子的紧密度和稳定性 (Davail 等 1994)。

根据目前对适冷酶的研究结果, 可以认为适冷酶有两种通过柔性结构进行低温适应的机制, 也由此将适冷酶结构的柔性分为两种——局部柔性和整体柔性 (Zecchinon 等 2001)。

(1) 局部柔性

对适冷磷酸甘油酸激酶 (PGK) 的 DSC (差示扫描量热) 研究发现, 适冷 PGK 蛋白包含两个结构域 (两个峰), 而其酵母同源中温酶只显示一个峰。适冷 PGK 第一个结构域与酶分子的热不稳定性有关, 并推测其具有很高的柔性, 从而赋予酶较高的催化活性; 另一个结构域热稳定性甚至高于酵母中温 PGK, 抵消了第一个结构域引起的熵的不利变化。适冷 PGK 两个结构域之间协同性的丧失, 可能是结构域间疏水相互作用减弱引起的。在适冷几丁二糖酶的 DSC 研究中也发现了同样的结果: 酶显示有两个稳定性截然不同的结构域, 而且活性位点位于稳定性差的结构域中。Gast 等人 (1995) 对酵母同源中温酶进行冷变性, 结果也得到了两个吸收峰。这种适冷酶在催化小分子底物时, 如果增加整个蛋白结构的柔性, 很可能会导致 K_m 值升高, 进而降低酶在低底物浓度时的催化效率。保持一个结构域的刚性可以降低基态 (ground state) 的熵值, 限制低稳定性结构域造成的混乱度影响。

(2) 整体柔性

对适冷 α -淀粉酶的研究发现 (Feller 等 1999), 尽管 α -淀粉酶包括三个结构域, 但是酶分子从天然状态到解构状态只需要一步转化。更有趣的是, 酶的解构是一个完全可逆的过程。稳定能曲线显示, 不仅适冷酶蛋白表现出对 α -淀粉酶

研究以来最低的稳定性，而且特异稳定能（如每个残基的稳定能）都是以前对可逆解构蛋白研究数据中最低的。与上面的 PGK 和几丁二糖酶不同的是， α -淀粉酶的天然底物是高分子量物质，这就可能需要酶分子具有整体的结构柔性，以利于低温下与底物的结合。

1.1.2.3 应用前景

适冷酶由于其在低温下较高的催化活性以及对热比较敏感的特点，在许多行业中具有潜在的应用价值（Gerday 等 2000）。①食品工业。例如在奶制品工业中，可以利用适冷 β -乳糖酶在低温下降解奶制品中的乳糖（世界上约 2/3 人口对乳糖具有不耐受性）；在果汁生产中可以通过添加果胶酶以利于果汁的提取、降低果汁粘度以及提高终产物的澄清度；在肉制品工业中，适冷蛋白酶的使用可以使肉变得更加鲜嫩；在面包工业中，适冷淀粉酶、蛋白酶和木聚糖酶的使用能够缩短发面时间、提高发面和面包的品质，并能保持持久的香味和湿润度。而且，由于这几种酶比较容易失活，因此可以防止反应时间过长导致的发面过软或过粘；另外，在酿造工业、奶酪生产以及动物饲料等方面，适冷酶也都有着很好的应用潜力；②纺织业。在纺织品生产中，织物从主纤维中伸出的棉纤维末端会降低织物的光滑程度并进而影响衣物的外观。利用纤维素酶在一定条件下就可以切除这些伸出的棉纤维末端，提高纺织品的耐用性和柔软度。但在目前的处理工艺中，由于使用的纤维素酶很难失活，所以会导致主纤维结构也发生改变。使用适冷纤维素酶就可以避免这种情况的发生；③洗涤剂工业。在洗涤剂中添加适冷的蛋白酶、脂酶、 α -淀粉酶以及纤维素酶，可以进行冷水洗涤，节省能耗并且减少衣物的磨损；④生物降解。温带地区季节性温度变化大，降低了微生物降解有机污染物的效率。如果使用混和培养的适冷微生物，将有助于提高这些顽固化学污染物的生物降解速率。目前，利用适冷微生物降解有毒化合物如硝化物、烃、芳香族化合物、重金属等以及生物聚合体如纤维素、几丁质、木质素、蛋白质和甘油等的研究已经开展起来（Timmis KN, Pieper DH 1999; Margesin R, Schinner F 1997; Margesin R, Schinner F 1998）。

1.2 立题依据

蛋白酶是目前应用颇为广泛的一类非常重要的工业用酶，已广泛用于食品、洗涤、皮革、饲料等许多行业。目前商品蛋白酶一般都是中温蛋白酶，由中温微

生物产生，产酶微生物的最适生长与产酶温度一般在 30℃ 以上，最适酶活温度一般都在 50℃ 左右。由于中温蛋白酶的最适催化温度较高，在一些低温催化过程中达不到最佳效果。适冷蛋白酶的最适酶活温度一般在 40℃ 以下，由适冷微生物产生。这些适冷微生物的最适生长与产酶温度一般在 20℃ 以下。适冷蛋白酶产酶温度低，在低温下催化效率高等特点，使得适冷蛋白酶有着中温蛋白酶无法比拟的优越性，具有很好的应用前景。例如，目前洗衣粉中的蛋白酶一般都是碱性中温蛋白酶，最适酶活温度一般在 50℃ 以上，因此，要达到最佳效果，洗涤用水要在 50-60℃。如果用最适酶活温度在 30℃ 以下的适冷蛋白酶，则可直接用自来水洗涤，不但能达到最佳洗涤效果，而且还节省了能源；在化妆品与牙膏中使用中温蛋白酶，由于环境温度低，不可能使酶活达到最高，也就达不到最佳应用效果。如果采用最适酶活温度在 35~40℃ 的适冷蛋白酶，就会使化妆品与牙膏在使用过程中蛋白酶酶活达到最高，从而达到最佳应用效果；在皮革、羊毛、制造蛋白水解物等工业上，应用适冷蛋白酶可以部分省却加热与冷却两步，既节省能量又节省时间；由于适冷蛋白酶有着接近自然环境温度的最适催化温度，因此在自然界废物与污水处理方面可能比中温蛋白酶的应用效果更好，这对环境保护有着重要的意义。尤其是在海产品加工及海洋蛋白饵料生产工业中，适冷蛋白酶用以处理废弃蛋白资源，不但可以消除污染，而且可以将部分废弃、低值蛋白资源重新回收利用，或制成海洋饵料，或进行海洋天然活性短肽等药物的提取，“取之于海，用之于海”。另外，适冷蛋白酶在食品保鲜方面也具有非常诱人的应用前景。采用蛋白酶处理肉质冰鲜品以提高肉质冰鲜品的风味是目前国际上正在兴起的研究热点，也是我们实验室目前的一个研究方向。目前所采用的风味酶都是中温蛋白酶，肉质冰鲜品的保存温度为 -2-0℃，中温蛋白酶在 0℃ 下酶活极低，不到其最适酶活温度时的 1%，因此利用中温蛋白酶作为肉质冰鲜品的风味酶只有加大酶的用量，才能明显提高肉质冰鲜品的风味。适冷蛋白酶由于其在低温下催化效率高的特点，在 0℃ 下酶活可以达到其最适酶活温度下的 10~25%，因此利用适冷蛋白酶作为肉质冰鲜品的风味酶，酶的用量较少，就可以明显起到提高风味的效果。我们实验室利用本实验室所产的适冷蛋白酶进行肉质冰鲜品的风味处理已经取得了较好的结果。

如前所述，适冷蛋白酶在低温下的高催化效率是与其分子结构密切相关的，

适冷酶的主要结构特征就是分子结构具有相对较大的柔韧性，以致催化活性中心在低温条件下也能较好地接近、作用底物。分子内部相互作用的减弱、与溶剂之间相互作用的增强、结构域或亚基之间作用的减弱，以及离子之间相互作用的减弱，这些因素在增加了适冷酶柔韧性的同时，也降低了酶的稳定性，使酶对周围环境如温度、pH、离子浓度等变得较为敏感。酶的不稳定性，大大限制了适冷蛋白酶在工业生产上的广泛应用。因此，探索适冷酶热稳定性的保护措施是推动适冷酶广泛应用的关键问题之一。

我们实验室为将交替假单胞菌 *Pseudoaltermonas* sp. SM9913 所产的适冷蛋白酶推向产业化，使之成为工业用蛋白酶家族中的重要一员，做了大量的研究和努力。本篇论文就是其中的一部分工作，目的在于为适冷蛋白酶在工农业生产中的广泛应用扫清障碍，拟解决两方面限制适冷蛋白酶产业化应用的问题：一是提高适冷蛋白酶的产酶效率，二是寻找一种或几种方便有效、成本低廉的适冷蛋白酶的稳定性保护方法，并希望能够从蛋白质结构水平上找到适冷酶热稳定性保护的原因，以“对症下药”，有的放矢地解决适冷酶的稳定性问题。

1.3 研究基础

本实验室通过几年来对深海适冷交替假单胞菌 *Pseudoaltermonas* sp. SM9913 适冷蛋白酶的研究，对该适冷蛋白酶的酶学特性有了较系统的了解。

P. sp. SM9913 筛选自 1800 多米深的南极海底淤泥，是一株典型的适冷菌，在低温下生长速率较高，能够在 0℃ 下正常生长，最适生长温度 15℃，最高生长温度为 35℃，最适产酶温度 10℃。所产蛋白酶粗酶具有典型的适冷蛋白酶特征，在低温下有着较高的催化效率，在 0℃ 仍具有 3% 的酶活力，最适酶活温度 35℃（陈秀兰等 2001）。

对 *P. sp.* SM9913 菌株所产蛋白酶进行了纯化，发现 *P.sp.* SM9913 至少分泌两种蛋白酶，分别命名为 MCP-01 和 MCP-02。

蛋白酶 MCP-01 是一分子量为 60.7KD、等电点为 3.0 左右的酸性蛋白质。单体酶。抑制剂实验表明蛋白酶 MCP-01 的活性中心含有丝氨酸残基和钙离子；在海水中具有最高的酶活性，并具有较好的耐盐性，在 6% 的 NaCl 中仍具有 75% 的酶活性；最适酶活温度为 30~35℃，比一般的中温蛋白酶低 20℃ 左右，酶的适冷性很好，同时对热非常敏感，是典型的适冷酶；蛋白酶 MCP-01 抗变性剂 SDS

的能力很差,在碳酸、Tris、磷酸、硼酸四种不同的缓冲液中的最适 pH、最适酶活温度、在 0℃下的酶活力、热敏感性等均不同,其中,在碳酸缓冲液中对热最敏感,在 Tris、磷酸中次之,在硼酸缓冲液中热稳定性最好。这表明蛋白酶 MCP-01 的立体结构可能比较柔顺、松散,易受缓冲液中离子强度和电荷等因素的影响。SDS-PAGE 图谱显示蛋白酶 MCP-01 热敏感性的主要原因是自溶 (Chen XL 等 2002)。对蛋白酶 MCP-01 的氨基酸组成分析表明,酶分子中精氨酸的含量很低,使得蛋白结构中盐桥较少,有利于酶分子的构象柔顺。

蛋白酶 MCP-02 的分子量为 36KD,抑制剂实验表明蛋白酶 MCP-02 的活性中心可能含有锌离子,最适酶活温度为 50~55℃,对冷的适应性较差,对热比较稳定,属中温蛋白酶。因此,研究结果表明,蛋白酶 MCP-01 和 MCP-02 属于两种不同种类的蛋白酶。

1.4 参考文献

1. 林锦湖. 增强海洋意识 重视海洋生物技术. 生物工程进展, 1994, 14(6): 4-6
2. 林岳夫, 尹卫平. 海洋生物技术研究开发动向. 海洋开发与管理, 1996, 4: 33-35
3. 印莉萍. 海洋生物技术. 生物学通报, 1999, 34(9): 21
4. Norkrans B, Stehn BO (1978) Sediment bacteria in the deep Norwegian Sea. *Marine Biol.* 47: 201-209
5. Vetriani Costantino, Jannasch Holger W, Macgregor Barbara J, Stahl David A, Reysenbach Anna-Louise (1999) Population structure and phylogenetic Characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. *Appl Envir Microbiol.* 65(10): 4375-4384
6. Takami H, Inoue A, Fujii F, Horikoshi K (1997) Microorganisms isolated from the deepest mud of Mariana Trench. *FEMS Microbiol Lett.* 152: 279-285
7. Kato C, Sato T, Horikoshi K (1995) Isolation and properties of barophilic and barotolerant bacteria from deep-sea mud samples. *Biodiv Conserv.* 4: 1-9
8. Isaksen Mai Faurschou, Jorgensen Bo Barker (1996) Adaptation of psychrophilic and psychrotrophic sulfate-reducing bacteria to permanently cold marine environments. *Appl Envir Microbiol.* 62(2): 408-414

9. Russell NJ (1992) Physiology and molecular biology of psychrophilic microorganisms. In: Herbert RA and Sharp RJ (eds) Molecular biology and biotechnology of extremophiles. Blackie and Son, London, pp. 203–224
10. Gounot AM, Russell NJ (1999) Physiology of cold-adapted microorganisms. In Margesin R and Schinner F (eds) Cold-adapted organisms: ecology, physiology, enzymology, and molecular biology. Springer, Berlin, pp. 33–55
11. Ingraham JL, and Stokes JL (1959) Psychrophilic bacteria. Bact. Rev. 23: 97-108
12. Stokes JL (1963) General biology and nomenclature of psychrophilic microorganisms, in: Recent progress in microbiology, University of Toronto Press, Toronto. 187-192
13. Morita R. Y. (1975) Psychrophilic bacteria. Bact Rev 39, 144-167
14. Baross JA, Morita RY (1978) Microbial life at low temperatures: ecological aspects, Microbial Life in Extreme Environments. 9-71.
15. Peter P Sheridan, Nicholas Panasik, Jonna M Coombs, Jean E Brenchley (2000) Approaches for deciphering the structural basis of low temperature enzyme activity. Biochimica et Biophysica Acta. 1543, 417-433
16. Margesin R, Schinner F (1994) Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology. J Biotech. 33: 1-14
17. Danovaro Roberto and Serresi Michela (2000) Viral density and virus-to-bacterium ratio in deep-sea sediment of the eastern Mediterranean. Appl Envir Microbiol. 66(5): 1857-1861
18. Fuhrman JA (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. Nature. 399: 541-548
19. Jannasch Holger W, Taylor Craig D (1984) Deep-sea microbiology. Ann Rev Microbiol. 38: 487-514
20. Brock TD (1979) Biology of Microorganisms. 3rd edn. Pretice-Hall. New Jersey
21. Kobori H, Sullivan CW, Shizuya H (1984) Heat-labile alkaline phosphatase from Antarctic bacteria: rapid 5' end-labeling of nucleic acids. Proc Natl Acad Sci. 81: 6691-6695
22. Bhakoo M, Herbert,RA (1980) Fatty acids and phospholipid composition of five

- psychrotrophic *Pseudomonas* spp. grown at different temperatures. Arch Microbiol 121: 121-127
23. Marr AG, Ingraham JL (1962) Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. J Bacteriol 84: 1260-1267
24. Suutari M, Laakso S (1993) Effect of growth temperature on the fatty acid composition of *Mycobacterium phlei*. Arch Microbiol 159:119-123
25. Neidleman SL (1990) Enzyme reactions under stress conditions. Crit Rev Biotechnol. 9: 273-286
26. Russell NJ, Fukunaga N (1990) A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. FEMS Microbiol Rev. 75: 171-182
27. Gounot AM (1986) Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. Experientia. 42:1192-1197
28. 辛明秀, 马延和. 嗜冷菌和耐冷菌. 微生物学通报, 1996, 26(2): 155, 109
29. Morton H, Watson K, Streamer M (1978) FEMS Microbiol. Lett. 4: 291
30. Herbert RA, (1992) Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles. Glasgow and London, New York: Champan and Hall
31. Hoshino T, Ishizaki K, Sakamoto T, Kumeta H, Yumoto I, Matsuyama H, Ohgiya S. (1997) Isolation of a *Pseudomonas* species from fish intestine that produces a protease active at low temperature. Lett Appl Microbiol. 25: 70-72
32. Burini Jean-Francois, Gugi Bruno, Merieau Annabelle, Guespin-Michel Janine F (1994) Lipase and acidic phosphatase from the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*: two enzymes whose synthesis is regulated by the growth temperature FEMS Micro Lett. 122: 13-18
33. Guillou C, Merieau A, Trebert B, Guespin Michel JF (1995) Growth temperature is involved in the regulation of extracellular lipase at two different levels in *Pseudomonas fluorescens* strain MF0. Biotech. Lett. 17(4): 377-382
34. Brenchley JE (1996) Psychrophilic Microorganisms and Their Cold-active Enzymes. J Ind Microbiol & Biotechnol. 17: 432-437
35. Potier Patrick, Hipkiss AR, Kushner DJ (1985) Protein turnover in a

- pseudotrophic bacterium. Arch Microbiol. 142: 28-33

46. Roovers Martine, Sanchez Rony, Legrain Christianne, Glansdorff Nicolas (2001) Experimental evolution of enzyme temperature activity profile: selection in vivo and characterization of low-temperature-adapted mutants of *Pyrococcus furiosus* ornithine carbamoyltransferase. J Bacteri. 183(3): 1101-1105
47. Taguchi Seiichi, Komada Shingo, Momose Haruo (2000) The complete amino acid substitutions at position 131 that are positively involved in cold adaptation of subtilisin BPN'. Appl Envir Microbiol. 66(4): 1410-1415
48. Wintrode PL, Miyazaki K, Arnold FH (2000) Cold adaptation of a mesophilic subtilisin-like protease by laboratory evolution. J Biol Chem 275:31635-31640
49. Ishii Atsushi, Ochai Toshiro, Imagawa Shigeki, Fukunaga Noriyuki, Sasaki Shoji, Minowa Osamu, Mizuno Yusuke, Shiokawa Hiroyuki (1987) Isozymes of isocitrate dehydrogenase from an obligately psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE-1: purification, and modulation of activities by growth conditions. J Biochem. 102: 1489-1498
50. Iyo AH, Forsberg CW (1999) A cold-active glucanase from the ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85. Appl Envir Microbiol. 65(3): 995-998
51. Ohkuma Moriya, Ohtoko Kuniyo, Takada Nobuhiko, Hamamoto Tetsuo, Usami Ron, Kudo Toshiaki, Horikoshi Koki (1996) Characterization of malate dehydrogenase from deep-sea psychrophilic *Vibrio* sp. strain no. 5710 and cloning of its gene. FEMS Microbiol Lett. 137: 247-252
52. Ochiai Toshiro, Fukunaga Noriyuki, Sasaki Shoji (1979) Purification and some properties of two NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenases from an obligately psychrophilic marine bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE-1. J Biochem. 86: 377-384
53. Genicot S, Feller G, Gerday C (1988) Trysin from Antarctic fish (*Paranotothenia magellanica* Forster) as compared with trout (*Salmo gairdneri*) trypsin. Comp Biochem Physiol. 90B: 601-609
54. Feller G, Gerday C (1997) Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. Cell Mol Life Sci. 53: 830-841
55. Qian M, Haser R, Buisson G, Duee E, Payan F (1994) The active center of a mammalian alpha-amylase. Structure of the complex of a pancreatic alpha-

- amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2-Å resolution. *Biochemistry* 33: 6284–6294
56. D'Amico S, Gerday C, Feller G (2000) Structural similarities and evolutionary relationships in chloride-dependent alpha-amylases. *Gene* 253: 95–105
57. Miyazaki K, Wintrode PL, Grayling RA, Rubingh DN, Arnold FH (2000) Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *J Mol Biol* 297: 1015–1026
58. Wintrode PL, Miyazaki K, Arnold FH (2001) Patterns of adaptation in a laboratory evolved thermophilic enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1549(1): 1-8
59. Fields PA, Somero GN (1998) Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A(4) orthologs of Antarctic notothenioid fishes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11476–11481
60. Zavodszky P, Kardos J, Svingor, Petsko GA (1998) Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7406–7411
61. Marshall Craig J (1997) Cold-adapted enzymes. *Tibtech*. 15: 359-364
62. Aittaleb M, Hubner R, Lamotte-Brasseur J and Gerday C (1997) Cold adaptation parameters derived from cDNA sequencing and molecular modelling of elastase from Antarctic fish *Notothenia neglecta*. *Protein Eng.* 10: 475-477
63. Russell NJ (1998) Molecular adaptations in psychrophilic bacteria: potential for biotechnological applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 61:1-21.
64. Davail Stephane, Feller Georges, Narinx Emmanuel and Gerday Charles (1994) Cold adaptation of proteins—Purification, characterization, and sequence of the heat-labile subtilisin from the Antarctic psychrophile *Bacillus* TA41. *J Bio Chem.* 269(26): 17448-17453
65. Zecchinon L, Claverie P, Collins T, D'Amico S, Delille D, Feller G, Georlette D, Gratia E, Hoyoux A, Meuwis MA, Sonan G, Gerday C (2001) Did psychrophilic enzymes really win the challenge? *Extremophiles*. 5(5): 313-321.
66. Gast K, Damaschun G, Desmadril M, Minard P, Muller-Frohne M, Pfeil W, Zirwer D (1995) Cold denaturation of yeast phosphoglycerate kinase: which domain is

- more stable? FEBS Lett 358: 247-250
67. Feller G, D'Amico D, Gerday C (1999) Thermodynamic stability of a cold-active α -amylase from the Antarctic bacterium *Alteromonas haloplanctis*. *Biochemistry*. 38: 4613-4619
 68. Timmis KN, Pieper DH (1999) Bacteria designed for bioremediation. *Trends in Biotechnol.* 17: 201-204
 69. Margesin R, Schinner F (1997) Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. *Appl Environ Microbiol.* 63: 2660-2664
 70. Margesin R, Schinner F (1998) Low-temperature bioremediation of a waste water contaminated with anionic surfactant and fuel oil. *Appl Microbiol Biotechnol.* 49: 482-486
 71. 陈秀兰, 张玉忠, 王运涛, 高培基, 栾惕武. 深海适冷菌 SM9913 产生的低温蛋白酶. *海洋科学*, 2001, 25(1): 4-9.
 72. Chen XL, Sun CY, Zhang YZ, Gao PJ (2002) Effects of different buffers on the thermostability and autolysis of a cold-adapted protease MCP-01. *Journal of Protein Chemistry.* 21(8): 523-527

第二章 *Pseudoaltermonas* sp. SM9913 适冷蛋白酶发酵产酶条件优化

由于适冷蛋白酶具有产酶温度低，在低温下催化效率高等特点，所以在食品、医药、纺织、皮革、洗涤剂、化妆品以及废物处理等行业有着很好的应用前景。但目前制约适冷蛋白酶在工业生产中广泛应用的因素主要有两方面：一是适冷蛋白酶的热不稳定性。尽管适冷蛋白酶在低温下有着较高的催化效率，但是它对热敏感，在常温或更高温度下酶活丧失很快，如何采取措施对适冷蛋白酶的热稳定性加以保护，也就成了适冷蛋白酶能被广泛推广应用的关键所在，这个问题将在下一章作进一步探讨。制约适冷蛋白酶产业化应用的第二个主要因素是产酶效率较低。由于适冷微生物特别是海洋适冷微生物生活环境的特殊性，如低温、寡营养、低氧分压、高压、高渗、黑暗等环境因素的限制，使得适冷微生物产酶效率较低。所以，尽管适冷蛋白酶在低温下有着中温蛋白酶无可比拟的高催化效率，但是菌株产酶效率太低，大大限制了其在生产中的应用。

本章旨在通过改进产酶发酵条件来提高 *Pseudoaltermonas* sp. SM9913 的产酶效率。参考借鉴近年来国内外对适冷蛋白酶产酶条件的研究成果（Kristjansson 等 1999；Taguchi 等 1998；Secades and Guijarro 1999；张云波，孙谧，王跃军等 2000），从发酵产酶培养基的碳源、氮源、无机盐、金属离子、表面活性剂、pH 以及装液量等几个方面对 *P.sp.*SM9913 产酶条件加以研究，以期能够最大限度地提高其产酶效率。

2.1 材料和方法

2.1.1 试验菌株

交替假单胞菌 *Pseudoaltermonas* sp. SM9913，从 1800 多米深的海底泥样中筛得。

2.1.2 培养基

海水 LB 斜面培养基：蛋白胨 1%，酵母粉 0.3%，葡萄糖 1%，琼脂 1.6%，

用陈海水配制, pH7.2—7.5

液体发酵培养基: 玉米粉 2%, 麸皮 1%, 豆粕 2%, Na_2HPO_4 0.1%, KH_2PO_4 0.03%, CaCl_2 0.1%, 用陈海水配制, pH7.5

2.1.3 试剂、药品

Folin 试剂的配制参考张树政《酶制剂工业》一书

本章所用培养基质、化学试剂均为国内生产的分析纯(吐温 80 为化学纯)

2.1.4 仪器

HZQ-Q 振荡器, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司

722S 分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司

5804R 冷冻离心机, Eppendoff 公司

TGL-16G 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂

DK-8 型电热恒温水槽, 上海精宏实验设备有限公司

2.1.5 发酵产酶

*P.sp.*SM9913 LB 斜面划线, 15℃下培养 48 小时, 接种液体发酵产酶培养基, 12℃、200rpm 发酵 72 小时, 发酵液 4℃、10000rpm 离心 10 分钟, 上清液即为粗酶液。

2.1.6 蛋白酶活力测定

Folin 法(张树政, 1984)。粗酶液进行适当稀释, 取 1ml, 加入 1ml 35℃下预保温的 2%酪蛋白溶液, 35℃水浴反应 10min 后, 加入 2ml 0.4M 的三氯乙酸终止反应, 继续保温沉淀 10min 后, 10000rpm 常温离心 10min, 取 1ml 上清液加入 5ml 0.4M 的碳酸钠, 混匀后加入 1ml Folin 试剂, 混匀后在 40℃水浴保温 20min, 测定 660nm 处的 OD 值。对照为 1ml 适当稀释后酶液先加 2ml 0.4M 三氯乙酸, 35℃保温 10min 后, 加入 1ml 2%酪蛋白溶液, 继续保温 10min, 其它步骤不变。标准曲线用不同浓度的酪氨酸来制定。

酶活力定义为每分钟由酪蛋白释出的三氯乙酸可溶物, 其 Folin 试剂呈色度与 1 微克酪氨酸相当时所需的酶量为 1 个单位。

2.2 结果与分析

2.2.1 几种碳源对产酶的影响

考查比较了麸皮、玉米粉、淀粉、葡萄糖、酵母粉、琥珀酸、柠檬酸钠等碳源物质对产酶的影响，结果如图 2-1 所示：

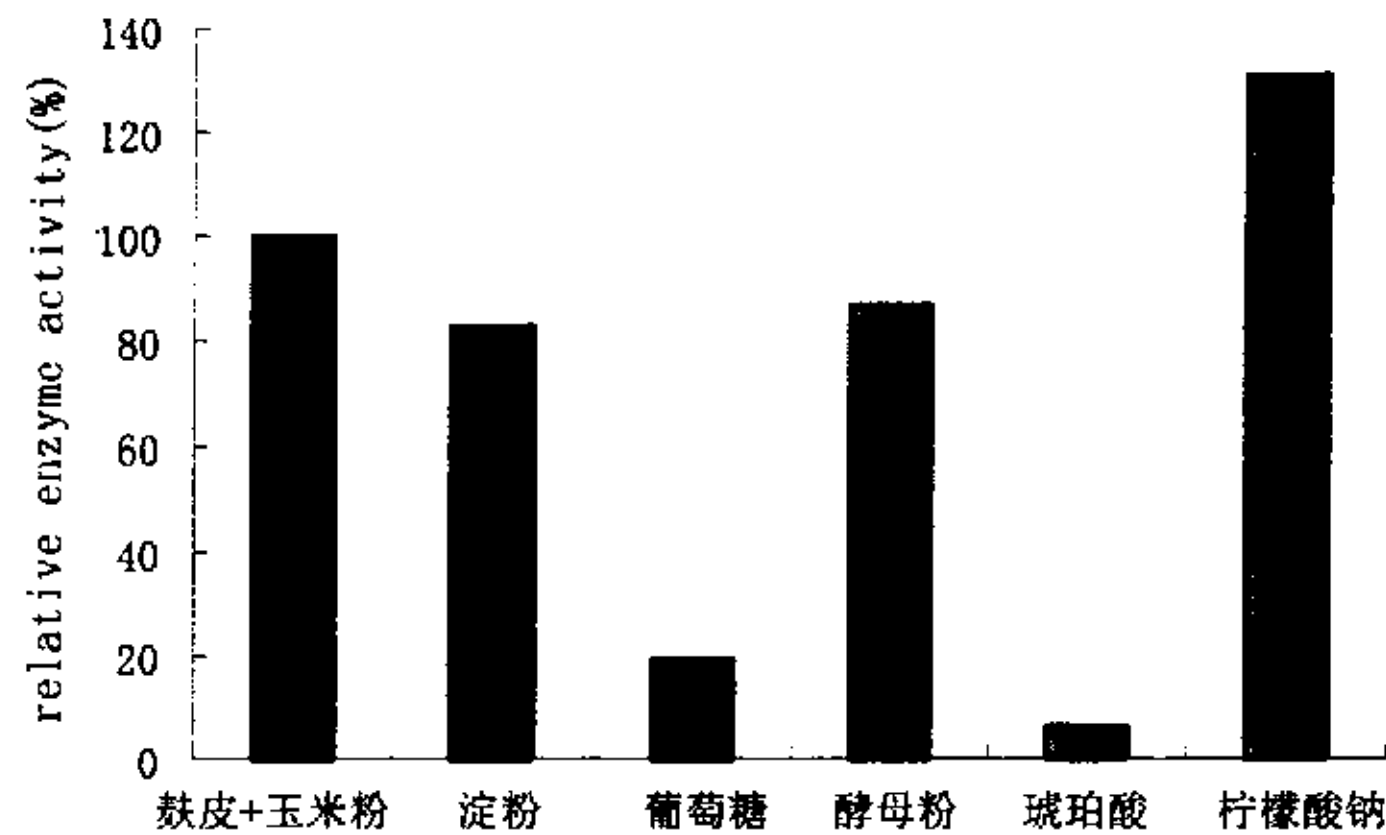


图 2-1 几种碳源对 P.sp.SM9913 发酵产酶的影响

Fig. 2-1 Effect of carbon sources on P.sp.SM9913 protease production

从结果可以看出，在这几种碳源物质中，柠檬酸钠对产酶具有明显的促进作用，加有 0.5%柠檬酸钠的发酵培养基，粗酶液酶活比对照配方高 30.8%；而葡萄糖、琥珀酸对产酶有抑制作用，粗酶液酶活分别仅为对照酶活的 19.1%和 6.1%，可能葡萄糖和琥珀酸对酶的合成有分解代谢阻遏作用；酵母粉和淀粉类碳源效果较麸皮玉米粉类碳源略差，但对产酶无明显抑制作用。

2.2.2 麸皮与玉米粉配比对产酶的影响

调整发酵产酶培养基中麸皮与玉米粉配比分别为 (%)：0:2、1:2、2:1、2:0，发酵产酶，酶活测定结果如表 2-1。

表 2-1 麸皮与玉米粉配比对 P.sp.SM9913 发酵产酶的影响

Table 2-1 Effect of the ratio of bran and corn flour on protease production

麸皮与玉米粉配比	酶活 (U/ml)	相对酶活 (%)
0:2	264.99	90.61
1:2	292.45	100
2:1	311.17	106.4
2:0	255.42	87.34

由结果可以看出，麸皮、玉米粉对产酶都有促进作用，麸皮与玉米粉配比为 2:1 时效果较好。

2.2.3 碳源加量对产酶影响

麸皮、玉米粉加量分别提高 1%，即麸皮 2%、玉米粉 3%，考查产酶变化。结果酶活从 260.8U/ml 提高到 354.6U/ml，产酶提高了 36%，说明碳源加量的提高对产酶十分有利，是制约产酶的一个重要因素。

2.2.4 氮源对产酶的影响

考查了几种氮源物质对 SM9913 产酶的影响，氮源组成以及酶活测定比较结果如图 2-2 所示。

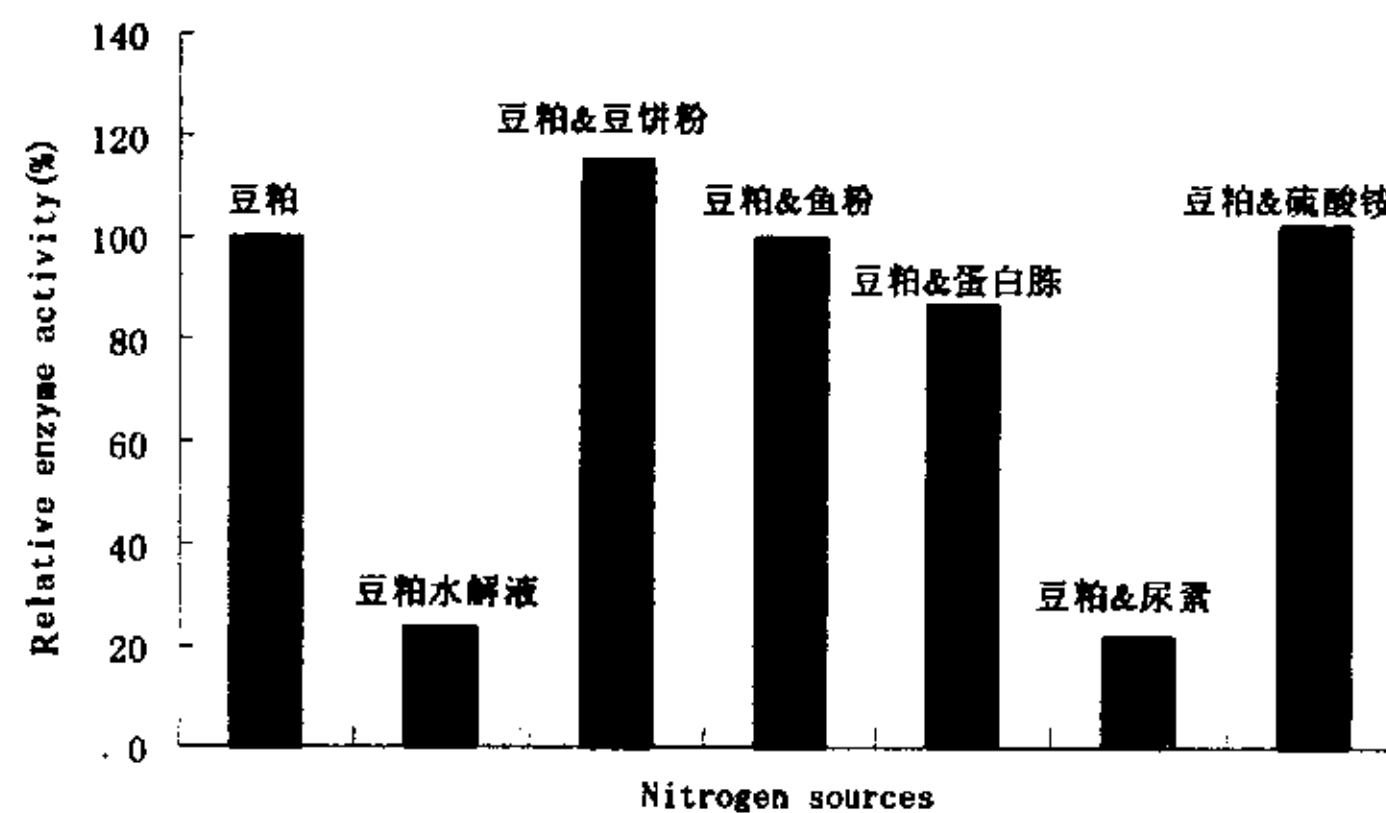


图 2-2 氮源对 P.sp.SM9913 发酵产酶的影响

Fig. 2-2 Effect of nitrogen sources on protease production

产酶比较结果表明，较难利用的氮源物质如豆粕、豆粕粉对产酶具有促进作用；而较易吸收利用的有机氮源，如豆粕水解液、蛋白胨、尿素等，对产酶有抑制作用。蛋白质类氮源优于豆粕水解物等易利用氮源的原因一方面可能是蛋白水解物等抑制蛋白酶的合成，另一方面可能是蛋白质对产酶的诱导作用只发生在培养开始阶段，以后即使出现妨碍的氨基酸或肽，诱导作用仍能继续维持下去。所以，通过这个实验也说明 P.sp.SM9913 所产的适冷蛋白酶很可能是一种诱导型酶，只有当周围环境氮源物质比较难以利用时才开始诱导合成分泌。从试验结果来看，在原配方豆粕含量 2% 的基础上再添加 0.5% 的豆粕粉对产酶有促进作用，其可能原因是原配方中氮源（豆粕）的含量不足，需进一步做提高氮源加量的试验加以验证。

2.2.5 豆粕加量的影响

考查豆粕在发酵培养基中含量分别为 1、2、3、4%时对产酶的影响, 结果如图 2-3 所示, 豆粕含量为 4%时产酶较对照提高了近 40%。

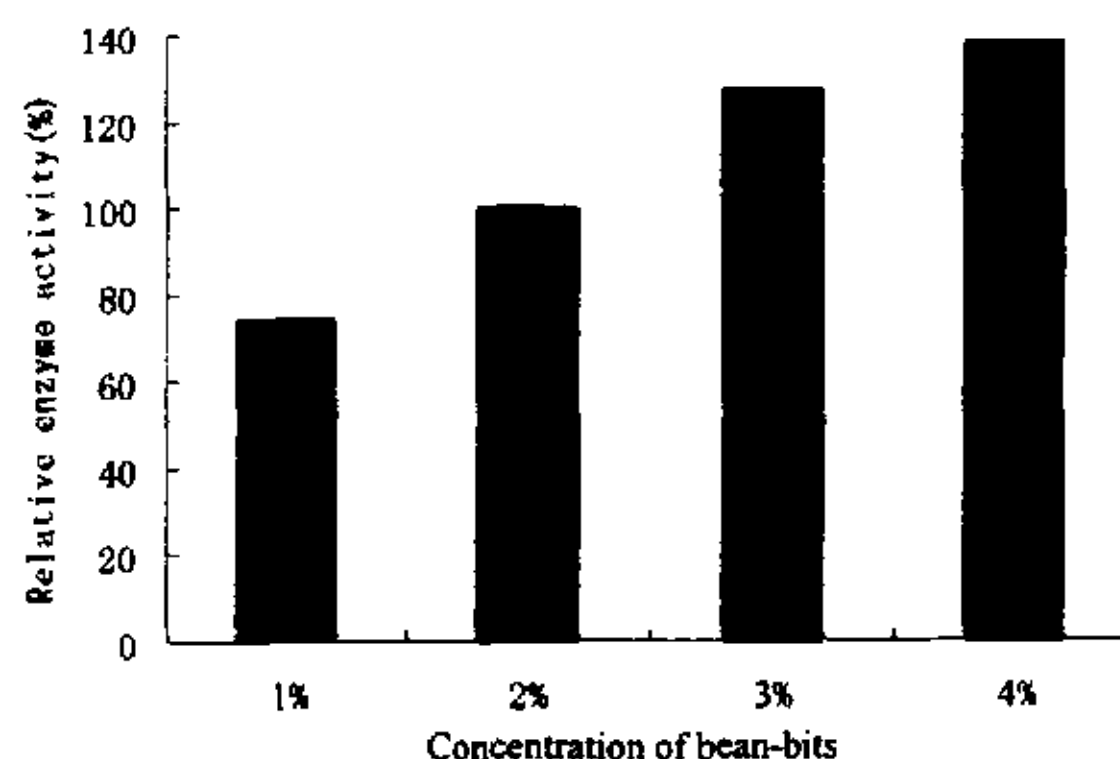


图 2-3 发酵培养基中豆粕含量对 *P.sp.SM9913* 产酶的影响

Fig. 2-3 Effect of concentration of bean-bits on protease production

2.2.6 金属离子对产酶的影响

考查了在发酵培养基中添加 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 六种二价离子对产酶的影响, 六种离子在培养基中含量为 0.01M。发酵产酶的比较结果如图 2-4 所示, 同不含金属离子的对照相比, 钙、镁离子的加入对产酶都有一定的促进作用, 而锌、铜、铁离子对产酶有抑制作用, 添加锰离子对产酶影响不是很大。

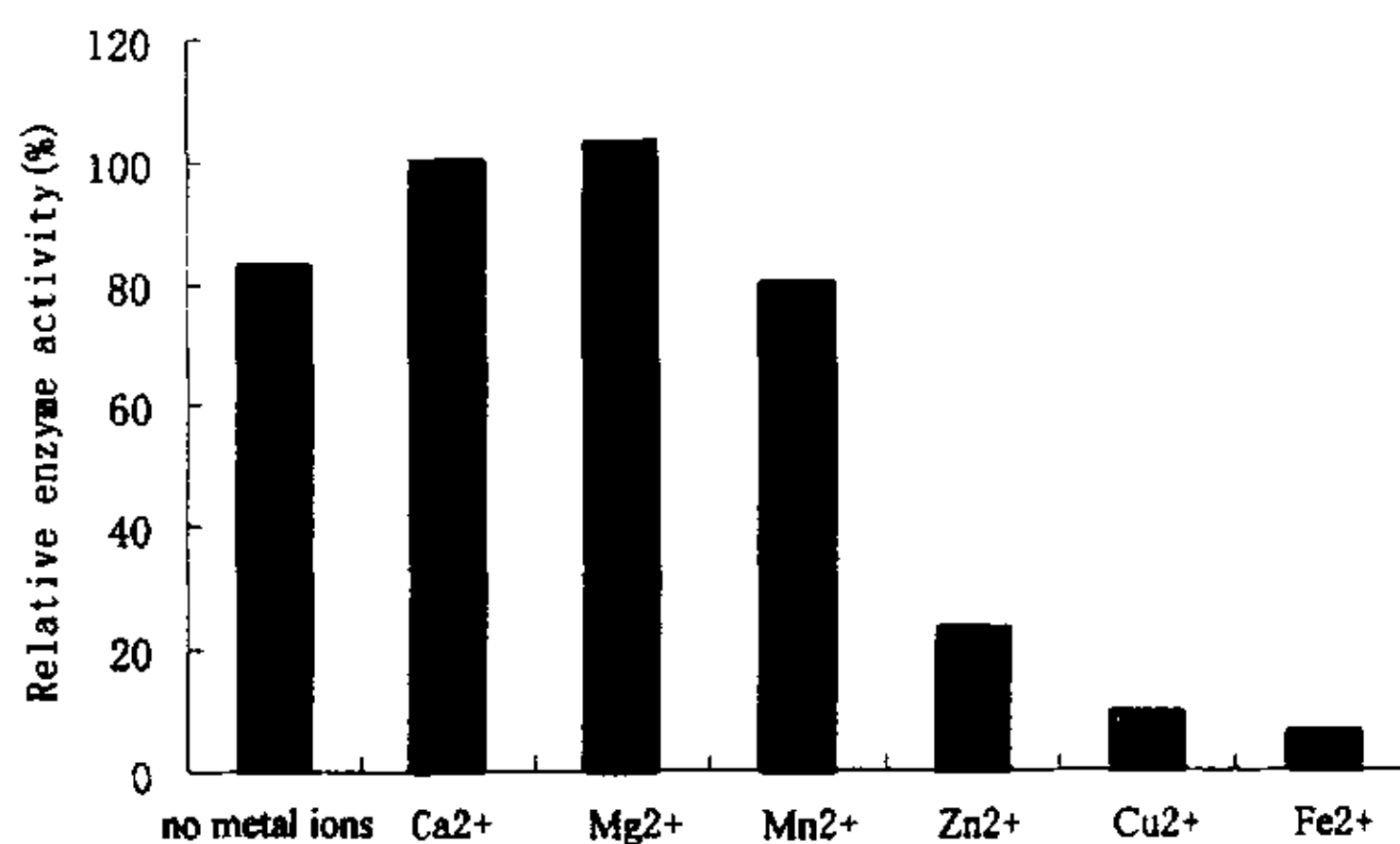


图 2-4 金属离子对 *P.sp.SM9913* 发酵产酶的影响

Fig. 2-4 Effect of metal ions on protease production

2.2.7 表面活性剂对产酶的影响

在发酵培养基中加入一定量的表面活性剂吐温 80 和 SDS (十二烷基硫酸钠), 考查其对产酶影响, 结果如表 2-2。表面活性剂吐温 80 和 SDS 都对产酶有促进作用, 说明一方面表面活性剂的加入, 提高了细胞膜的通透性, 促进了蛋白酶向胞外的分泌, 另一方面表面活性剂使得蛋白酶的更容易脱离细胞膜的附着, 释放到发酵培养基中。

表 2-2 表面活性剂对 P.sp.SM9913 发酵产酶的影响

Table 2-2 Effect of surface-active agents on protease production

Surface-active agent	Concentration (%)	Enzyme activity (U/ml)	Relative enzyme activity (%)
无	0	292.03	100
吐温80	0.1	394.37	135.04
SDS	0.02	343.2	117.52

2.2.8 无机盐对产酶的影响

在原发酵培养基配方基础上, 不加 NaH_2PO_4 和 K_2HPO_4 这两种可以与钙离子生成沉淀的无机盐。 Na^+ 、 K^+ 可以通过海水获得, 同时为了和原配方的离子浓度保持基本一致, 添加 0.1%的 KNO_3 。产酶比较结果如表 2-3 所示, 不含磷酸盐的发酵培养基产酶水平下降许多, 说明尽管磷酸盐能和钙离子生成沉淀, 但还是对产酶有一定促进作用的。

表 2-3 无机盐对 P.sp.SM9913 发酵产酶的影响

Table 2-3 Effect of inorganic salts on protease production

	Concentration(%)	Enzyme activity(U/ml)	Relative enzyme activity(%)
Control	NaH_2PO_4 0.1	292.03	100
	K_2HPO_4 0.03		
Test	KNO_3 0.10	185.54	63.53

2.2.9 溶氧对产酶的影响

考查三角瓶中发酵培养基的不同装液量对产酶的影响, 结果见表 2-5。结果表明, P.sp.SM9913 发酵产酶是好氧过程, 装液量较少对产酶比较有利。但是由于发酵培养基中固形物含量较大, 从发酵结束后三角瓶中残余的发酵液来看, 装液量越少, 水分损失越快。因此, 考虑到装液量 25ml 和 50ml 酶活相差不大 (只相差 6.6%), 还是采取 50ml 装液量比较适宜。

表 2-4 发酵培养基装液量对 P.sp.SM9913 产酶的影响

Table 2-4 Effect of soluble oxygen on protease production

Liquid volume (ml)	Enzyme activity (U/ml)	Relative enzyme activity (%)
25	334.46	106.63
50	313.66	100
100	205.09	65.39

2.2.10 发酵培养基初始 pH 对产酶的影响

考查了发酵培养基初始 pH 分别为 6.0、7.0、8.0 时产酶的变化情况，结果如表 2-5，发酵培养基初始 pH 为酸性时，对产酶有明显的抑制作用；初始 pH7.0 以上比较有利于产酶。

表 2-5 发酵培养基初始 pH 对 P.sp.SM9913 产酶的影响

Table 2-5 Effect of initial pH on protease production

Initial pH	Enzyme activity (U/ml)
6.0	22.67
7.0	265.41
8.0	270.61

2.2.11 新的发酵产酶培养基配方

综合以上发酵培养基组成的实验结果，在原发酵培养基配方基础上，加入了一定量可以促进产酶的柠檬酸以及吐温 80，同时为协调培养基中固形物含量与溶氧的关系，对麸皮与豆粕加量做了调整，拟定了如下几个配方进行发酵产酶，比较产酶效果，结果如图 2-5。

新配方 1: 玉米粉 3%，麸皮 2%，豆粕 2%，柠檬酸钠 0.5%，吐温 80 0.1%， Na_2HPO_4 0.1%， KH_2PO_4 0.03%， CaCl_2 0.1%，用陈海水配制，pH7.5；

新配方 2: 玉米粉 2%，麸皮 1%，豆粕 4%，柠檬酸钠 0.5%，吐温 80 0.1%， Na_2HPO_4 0.1%， KH_2PO_4 0.03%， CaCl_2 0.1%，用陈海水配制，pH7.5；

新配方 3: 玉米粉 2%，麸皮 3%，豆粕 4%，柠檬酸钠 0.5%，吐温 80 0.1%， Na_2HPO_4 0.1%， KH_2PO_4 0.03%， CaCl_2 0.1%，用陈海水配制，pH7.5；

新配方 4: 玉米粉 2%，麸皮 2%，豆粕 3%，柠檬酸钠 0.5%，吐温 80 0.1%， Na_2HPO_4 0.1%， KH_2PO_4 0.03%， CaCl_2 0.1%，用陈海水配制，pH7.5；

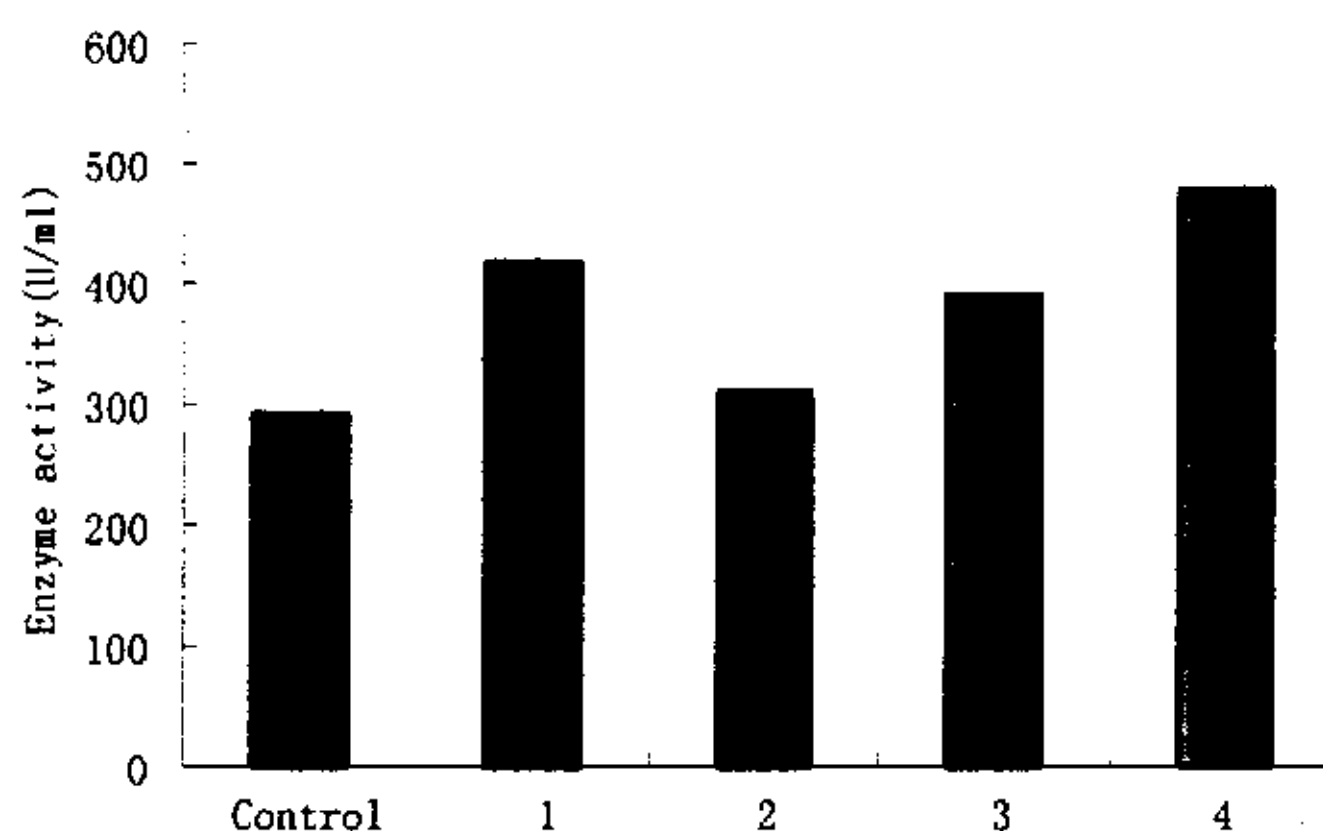


图 2-5 新发酵产酶培养基配方比较

Fig. 2-5 Comparison of several fermentation media

从结果可以看出，新配方 4 的产酶能力最高，比原配方提高了约 65%。因此确定新的发酵产酶培养基配方为：玉米粉 2%，麸皮 2%，豆粕 3%，柠檬酸钠 0.5%，吐温 80 0.1%， Na_2HPO_4 0.1%， KH_2PO_4 0.03%， CaCl_2 0.1%，用陈海水配制，pH7.5，装液量 50ml/500ml 三角瓶。

2.3 讨论

由于深海适冷交替假单胞菌 *Pseudoaltermonas* sp. SM9913 所生存的海洋环境的特殊性，必然在长期进化过程中形成了一些特殊的分子特性、细胞结构、生理生化特征和代谢机制，我们试图从研究 P.sp.SM9913 生存的海洋环境因素（如前所提到的温度、压力、光照、氧气、无机离子、营养等）入手，找到一套最优的产酶条件。但受实验条件的限制，我们无法完全模拟其在海洋中的生活环境，如高压对其生长及产酶的影响以我们目前的设备条件就无法进行研究。本章仅对几个可操作的因素进行了研究，包括发酵产酶培养基的碳源、氮源、无机盐、金属离子、表面活性剂、初始 pH 以及装液量等。最终确定了一个较优的发酵产酶培养基组成：玉米粉 2%，麸皮 2%，豆粕 3%，柠檬酸 0.5%，吐温 80 0.1%， Na_2HPO_4 0.1%， KH_2PO_4 0.03%， CaCl_2 0.1%，用陈海水配制，pH7.5，装液量 50ml/500ml 三角瓶。最高酶活（477.15U/ml）较原来（290U/ml）提高了约 65%，虽尚未达到工业化生产的要求，却使适冷蛋白酶向着工业化生产应用又迈进了一大步。随着以后研究的深入，如果能够利用基因工程等方法改造试验菌株，选育出产酶能力更强的菌种，适冷蛋白酶的应用必将显现出更加诱人的广阔前景。

2.4 参考文献

1. Kristjansson MM, Magnusson OT, Gudmundsson HM, Alfredsson GA, Matsuzawa H (1999) Properties of a subtilisin-like proteinase from a psychrotrophic *Vibrio* species comparison with proteinase K and aqualysin I. *Eur J Biochem.* 260(3): 752-760
2. Taguchi Seiichi, Ozaki Akiyoshi, Momose Haruo (1998) Engineering of cold-adapted protease by sequential random mutagenesis and a screening system. *Appl Envir Microbiol.* 64(2): 492-495
3. Secades P, Guijarro JA (1999) Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Appl Environ Microbiol.* 65(9): 3969-3975
4. 张云波, 孙谧, 王跃军, 洪义国, 阎晓玲, 田杰, 谢峰, 姜展军. 黄海黄杆菌 YS-9412-130 产酶发酵条件的优化. *海洋水产研究*, 2000, 21(4): 26-35
5. 张树政. 酶制剂工业. 科学出版社, 1984

海藻糖日益广泛地应用于食品、医药、化妆品等许多领域。

3.1 材料和方法

3.1.1 实验菌株、培养基

同第二章 2.1.1、2.1.2

3.1.2 材料、药品

(1) 蛋白酶分离纯化介质与材料

透析超滤材料：10000NMWL 透析袋，3000NMWL 聚醚砜超滤膜（62mm），3000NMWL 超滤离心管，均由 Millipore 公司生产。

分离纯化介质：葡聚糖凝胶 SephadexG25，葡聚糖凝胶 SephadexG100，均为 Pharmacia 产品。

(2) 药品

海藻糖（生化试剂），上海恒信化学试剂有限公司

海藻糖（食品级，纯度 96%），重庆正隆利尔生物化学制品有限公司

3.1.3 仪器

YC-1 层析实验冷柜，北京博医康技术公司

杯式超滤器（200ml），Amico Incorporation

层析柱（100cm×16mm、50cm×26mm），上海华美玻璃仪器厂

FREEZE DRY SYSTEM，美国 LABCONCO 公司

BSZ-100 自动部份收集器，上海沪西分析仪器厂

HD21C-A 核酸蛋白检测仪，上海康华生化仪器制造厂

SHB-B88 型循环水式多用真空泵，郑州长城仪器厂

3.1.4 酶活测定方法

同第二章 2.1.6

3.1.5 适冷蛋白酶的分离纯化

(1) 粗酶液的提取参见第二章 2.1.5；

(2) 硫酸铵沉淀：去除粗酶液上层较稠部分，剩余酶液进行硫酸铵沉淀，

饱和度 55%。沉淀后酶液 4℃、8000rpm 离心 15 分钟，沉淀加预冷的 50mmol/l pH9.0Tris-HCl 缓冲液重溶，4℃、10000rpm 离心 15 分钟，上清液为重溶后的酶液。

(3) 酶液的脱盐与浓缩：重溶后的酶液装入 10000NMWL 的透析袋中于 4℃下用 50mmol/l pH9.0Tris-HCl 缓冲液进行透析除盐，每 2~3 小时更换一次缓冲液，更换 4~5 次后用 PEG20000 在 4℃下进行浓缩，当浓缩至样品体积较小时，采用 3000NMWL 聚醚砜超滤膜进行超滤浓缩。

(4) 凝胶过滤层析：葡聚糖凝胶 SephardexG25 与 G100 充分溶胀、抽气，分别装柱 (50cm×26mm 和 100cm×16mm)，用 50mmol/l pH9.0Tris-HCl 缓冲液充分平衡，将浓缩后的酶液上样。SephardexG25 柱的上样量为 10ml，流速 15ml/h。酶液经过 G25 柱脱色之后，浓缩，上 SephadexG100 柱。G100 柱的上样量为 3~4ml，流速<10ml/h。以上层析在 4~8℃的层析冷柜中进行。

3.2 结果与分析

3.2.1 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶的热稳定性研究

3.2.1.1 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶粗酶的热稳定性

发酵提取后的粗酶液不经稀释，分别保存在 4℃、室温 (20~25℃) 和 30℃下，测定不同时间后的残余酶活。如图 3-1，粗酶液在 4℃酶活丧失较慢，96 小时后丧失 33.2%。而随着温度的升高，酶活丧失速度也越来越快，在室温和 30℃下保温 96 小时后酶活分别丧失 83.6%和 94.9%，热稳定性较差。

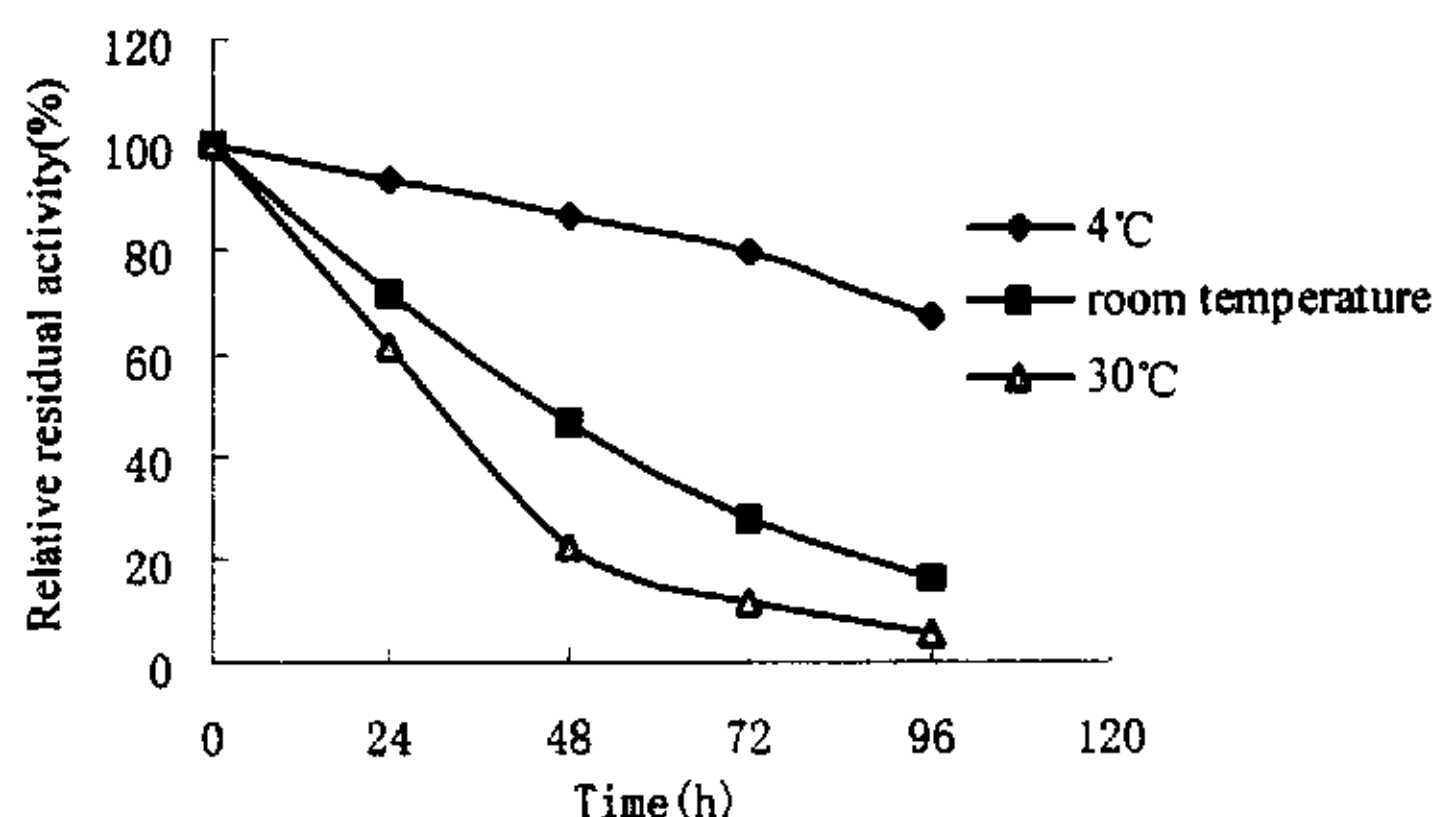


图 3-1 粗酶液在不同温度下保温后的相对残余酶活

Fig. 3-1 Relative residual activity of the crude enzyme incubated at different temperatures

3.2.1.2 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶纯酶的热稳定性

P.sp.SM9913 适冷蛋白酶纯酶的 pH9.1 碳酸缓冲溶液分别在 20℃、30℃、40℃ 下保温不同时间后测定其残留酶活，结果如表 3-1 所示。蛋白酶在碳酸缓冲液中酶活丧失较快，在 30℃ 下 60min 酶活丧失 40.3%，在 40℃ 下 20min 酶活丧失 68.9%。结果表明适冷蛋白酶纯酶在较低温度下比较稳定，随温度升高，稳定性越来越差。

表 3-1 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶纯酶在不同温度下保温不同时间后的残余酶活
Table 3-1 Relative residual activity of the pure enzyme incubated at different temperatures for different time

Temperature(℃)	Incubation time(min)	Relative residual activity (%)
20	40	96.2
	80	89.9
30	30	74.4
	60	59.7
40	10	65.0
	20	31.1

3.2.2 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶粗酶的稳定性保护

3.2.2.1 冷冻干燥或常温干燥对 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶粗酶稳定性的保护作用

发酵所得粗酶液经 55%硫酸铵沉淀去除大部分杂蛋白，沉淀分别在室温下自然风干和用冻干机进行冷冻干燥，然后研碎而成酶粉，各称 1g，重溶后测定酶活。在室温自然风干的酶活为 3235U/g，冷冻干燥后的酶活为 3467U/g。可见，自然风干的酶粉酶活基本没有丧失。将干燥的适冷蛋白酶粉分别在室温和 30℃ 下保存，间隔 15 天测定一次酶活，结果如表 3-2 所示。P.sp.SM9913 所产的适冷蛋白酶的酶粉在室温和 30℃ 下保存三个月，酶活基本没有丧失。

表 3-2 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶粗酶干粉分别在室温和 30℃ 下保存不同时间后的残余酶活
Table 3-2 Residual activity of dry crude enzyme preserved at room temperature and 30℃ for days

Time (day)		0	15	30	45	60	75	90
Enzyme activity (U/g)	Room temperature	3467	3605	3237	3318	3448	3215	3314
	30℃	3467	3417	3269	3438	3309	3212	3288

3.2.2.2 几种不同的糖对粗酶液稳定性的保护作用比较

粗酶液用 0.1M pH9.1 碳酸缓冲液稀释 10 倍，分别加入葡萄糖、蔗糖、麦芽

糖、乳糖、海藻糖（终浓度 10%），30℃下保温 2 小时后，测定残余酶活。结果见图 3-2，加葡萄糖、蔗糖、海藻糖、乳糖、麦芽糖的粗酶液残余酶活分别为 14.95%、13.94%、45.45%、2.63%、9.09%，可以看出，与其它二糖以及单糖葡萄糖相比，海藻糖对粗酶液的稳定性保护作用最为显著。

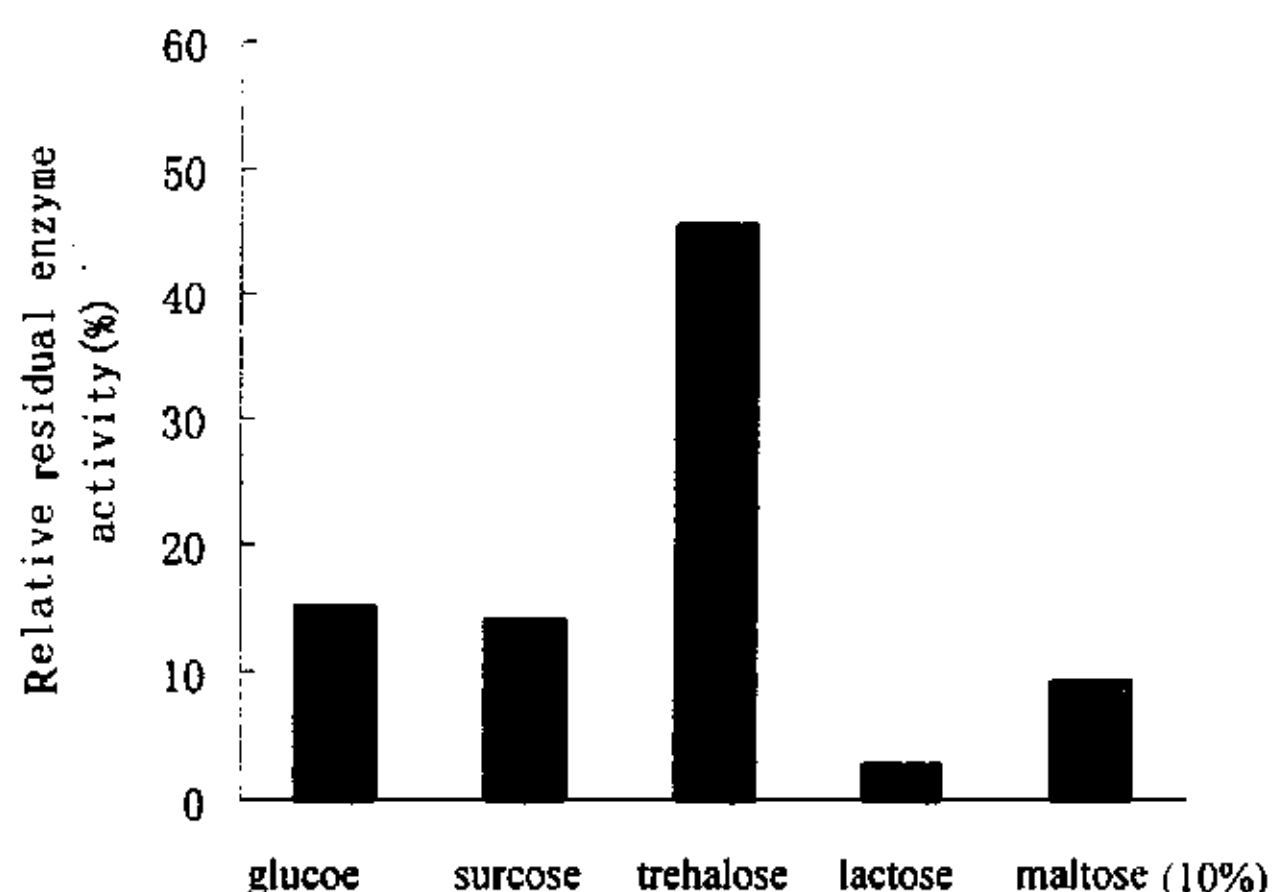


图 3-2 不同的糖对粗酶液稳定性的保护作用比较

Fig. 3-2 Effects of various carbohydrates on the stability of the crude enzyme

3.2.2.3 不同温度条件下海藻糖对粗酶稳定性的保护

粗酶液稀释 10 倍后加入海藻糖（终浓度 10%），分别于 20℃、30℃、40℃下水浴保温一定时间，立即放入冰浴终止活性进一步丧失，测定残余酶活。分别以未加糖的粗酶液作对照，结果见图 3-3、图 3-4、图 3-5。20℃下保温 120min，加与不加海藻糖的粗酶液残余酶活分别为 92.12%和 66.0%；30℃下保温 75min，加与不加海藻糖的粗酶液残余酶活分别为 88.89%和 18.91%；40℃下保温 50min，加与不加海藻糖的粗酶液残余酶活分别为 66.45%、3.41%。结果表明，在 20~40℃下，海藻糖对适冷蛋白酶的热稳定性都有很好的保护作用，而且，温度愈高，海藻糖的保护作用愈加显著。

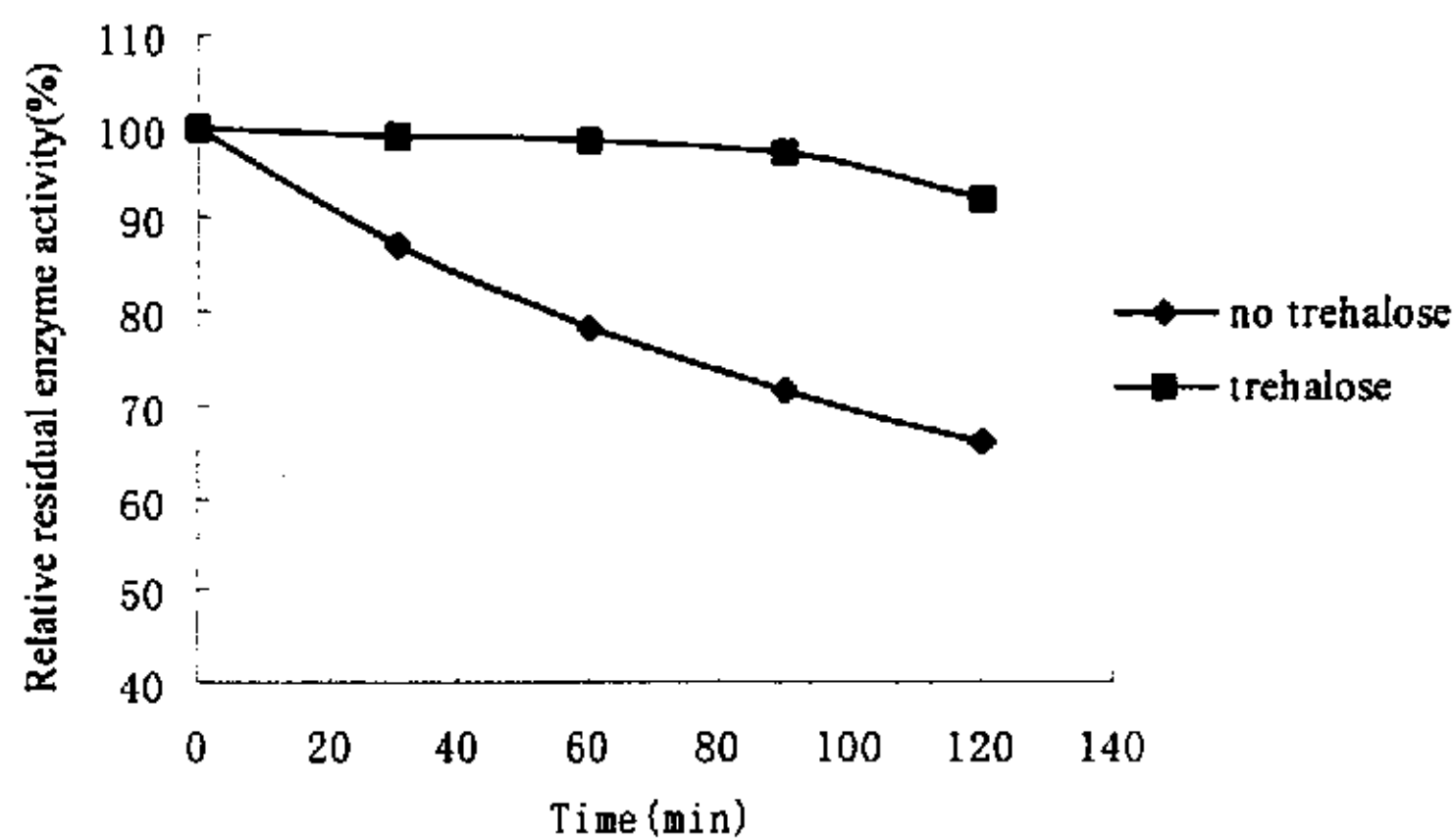


图 3-3 20℃下保温时海藻糖对粗酶稳定性的保护

Fig. 3-3 Effect of trehalose on the stability of the crude enzyme incubated at 20℃

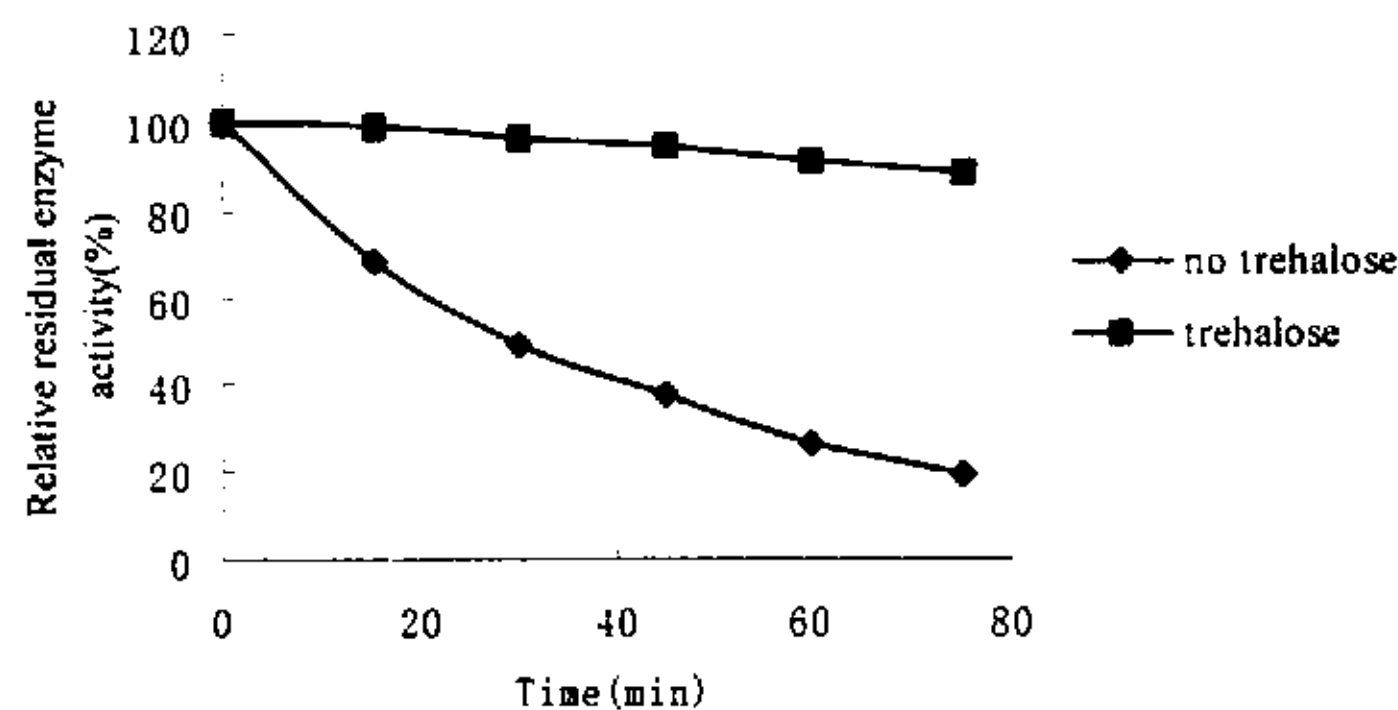


图 3-4 30℃下保温时海藻糖对酶稳定性的保护

Fig. 3-4 Effect of trehalose on the stability of the crude enzyme incubated at 30℃

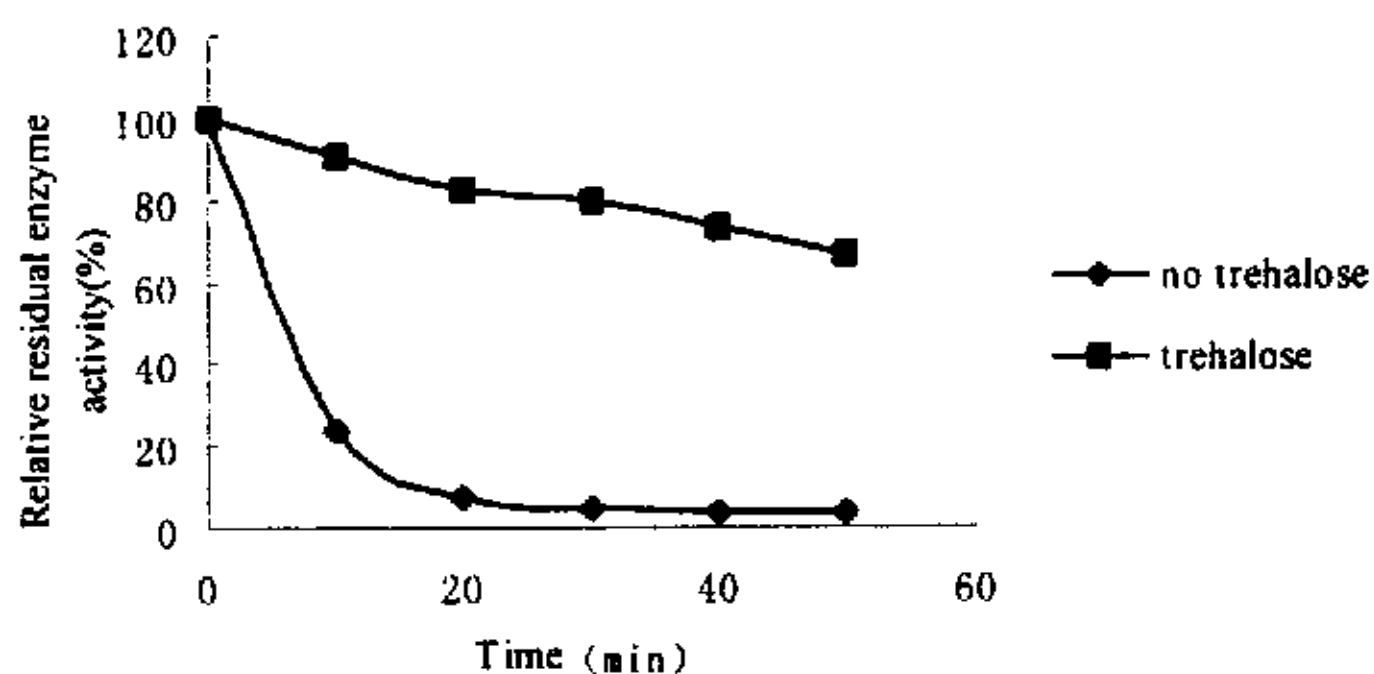


图 3-5 40℃下保温时海藻糖对酶稳定性的保护

Fig. 3-5 Effect of trehalose on the stability of the crude enzyme incubated at 40℃

3.2.2.4 不同的海藻糖浓度对粗酶保护的影响

粗酶液稀释 10 倍，加入海藻糖，使海藻糖终浓度分别为 5%、10%、15%、

20%、25%，30℃保温 2 小时，测定残余酶活。结果见图 3-6，海藻糖浓度为 10~15%时对粗酶液的热稳定性保护作用最好。

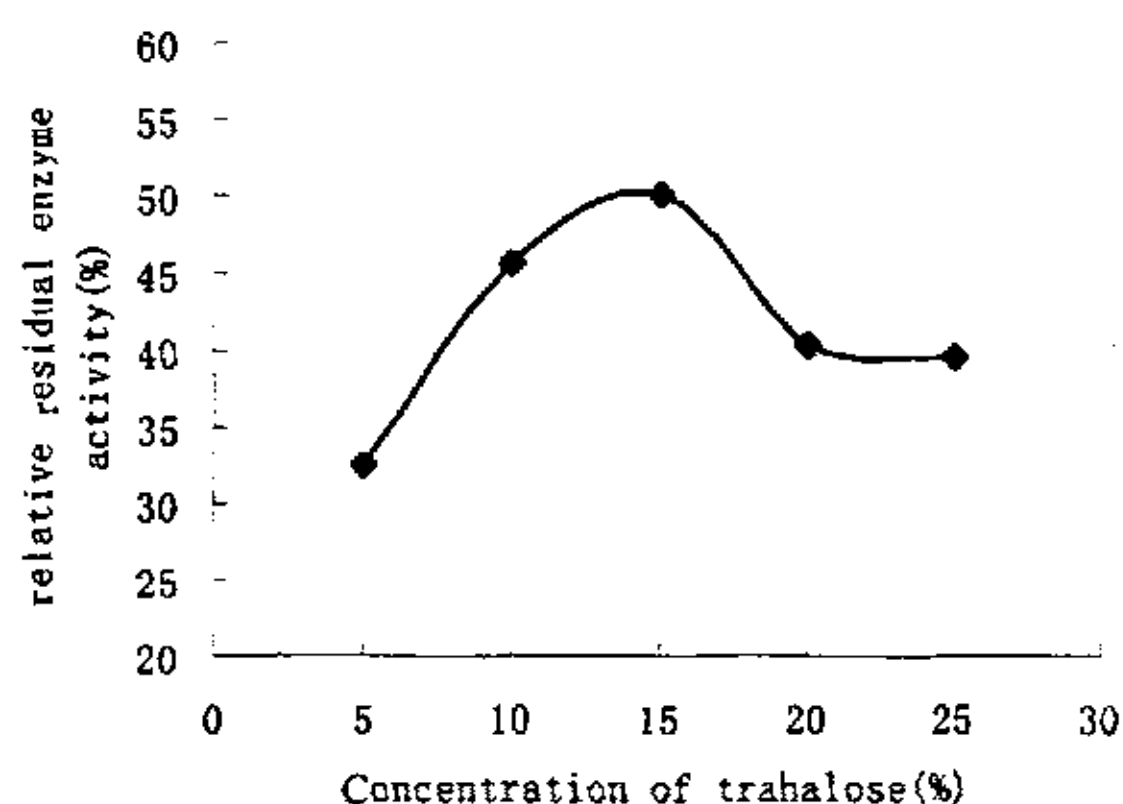


图 3-6 不同浓度海藻糖对粗酶稳定性的影响

Fig. 3-6 Effects of various concentrations of trehalose on the stability of the crude enzyme

3.2.3 海藻糖对 *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶纯酶的稳定性保护

经发酵产酶、粗酶硫酸铵沉淀、透析、分子筛层析得到纯酶。各取 0.5ml 纯酶液，分别用碳酸缓冲液和海藻糖的碳酸缓冲液（0.5g/4.5ml）4.5ml 稀释 10 倍（海藻糖终浓度为 10%）。40℃水浴保温，每隔 5min 取样 0.5ml，测定酶活，零点取样作为对照。酶活测定方法不变，只不过所有试剂加入量减半。酶活测定比较结果如图 3-7 所示。40℃下，海藻糖对纯酶的稳定性保护作用非常显著，未加海藻糖的纯酶液 5min 时酶活就全部丧失，而加入海藻糖后的纯酶溶液保温到 30min 时仍然保持原有酶活不变。

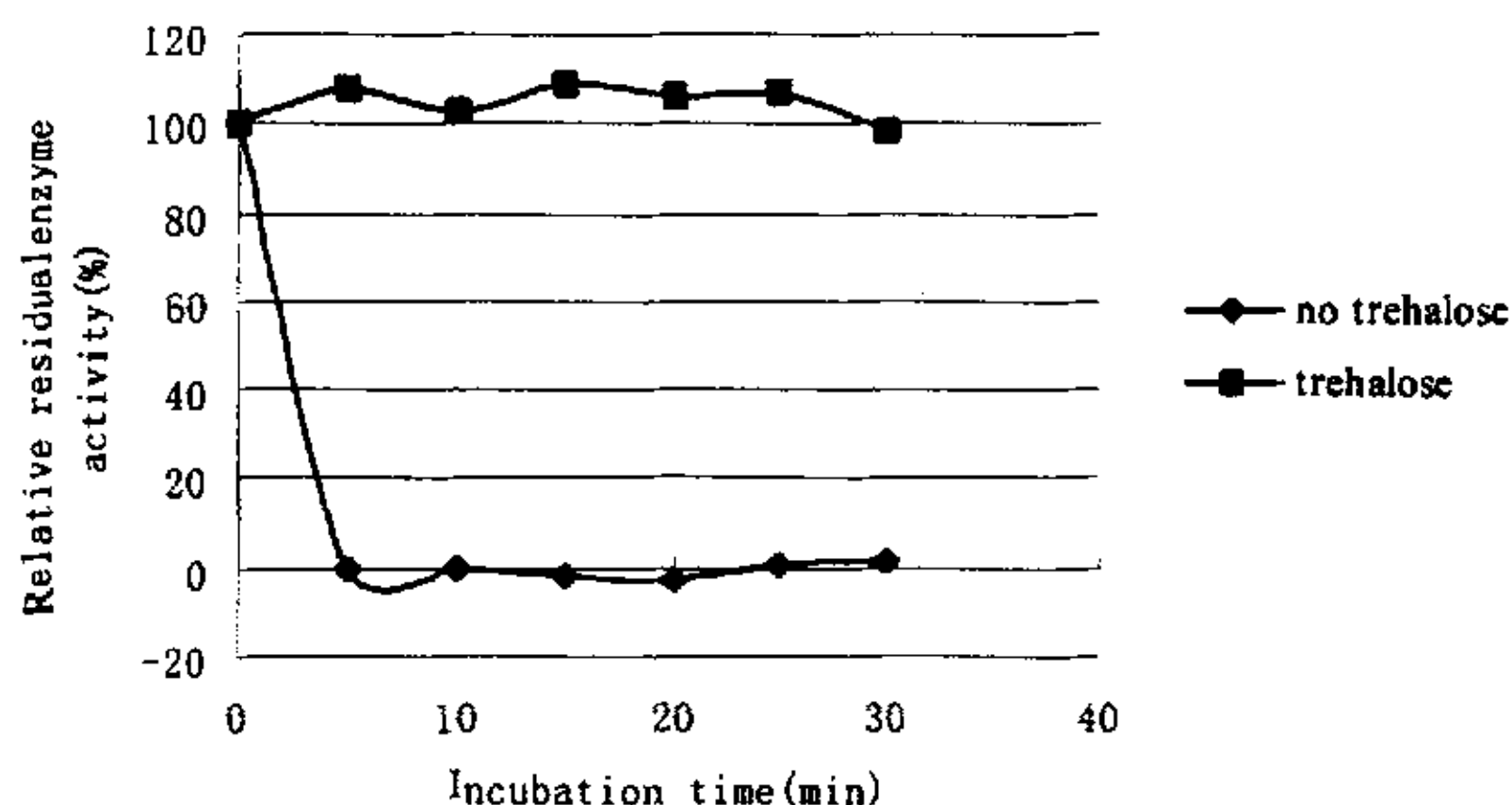


图 3-7 海藻糖对 *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶纯酶稳定性的保护

Fig. 3-7 Effect of trehalose on the stability of the pure enzyme

3.3 讨论

- (1) *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶在溶液状态下对热比较敏感，而干燥之后的酶干粉却具有非常好的稳定性。结合我们实验室以前对 *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶的研究结果 (Chen XL 等 2002)，进一步表明 *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶在溶液状态下酶活容易丧失的主要原因是自溶，而非热变性。因此如何阻止该适冷蛋白酶自溶是保持其在溶液中稳定性的关键。
- (2) 海藻糖对 *P.sp.*SM9913 所产适冷蛋白酶具有非常显著的稳定性保护作用，在一定程度有效阻止了适冷蛋白酶的自溶。这将有助于我们今后将适冷蛋白酶粗酶制成液态酶制剂应用到食品工业、饲料工业等领域。海藻糖的存在，不但可以稳定适冷蛋白酶制剂，使之更加有效地发挥作用，而且海藻糖本身也可以提高食品风味、营养价值以及保存时间。
- (3) 本章中对 *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶纯酶的热稳定性及海藻糖对其稳定性保护的研究除考虑到适冷蛋白酶的基础理论研究以外，还旨在利用其对热不稳定、在较高温度下酶活丧失较快的特点，将它作为研究揭示海藻糖对生物活性物质的稳定性保护机理的研究工具，借助于各种现代化的手段和技术设备，实时动态地研究海藻糖对酶蛋白稳定性的保护作用，将具有效果直观、研究周期短、效率高等优点。
- (4) 在整理分析海藻糖保护 *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶稳定性的实验数据时我们发现了这样一个问题：比较海藻糖加入前后粗酶溶液零点时的酶活测定结果，发现海藻糖的加入对酶分子发挥正常催化活性没有影响。由此推测海藻糖与酶蛋白之间尤其与酶的催化活性中心之间可能并无直接的强相互作用（如氢键等）。因为如果存在强相互作用，这势必会增强酶活性中心的刚性进而影响到酶对底物的催化效率，表现为零点对照的酶活测定结果的降低。这只是根据实验数据做出的一个推测，尚需更进一步的实验证据加以证明。实际上，适冷酶蛋白分子的稳定性、柔韧性和反应活性之间的关系要比预期的复杂得多。适冷酶要发挥高的催化效率，必须保持活性中心稳定性和柔韧性之间微妙的平衡 (Gerday 等 1997)。有研究表明，很可能蛋白分子结构的某些部位控制蛋白的稳定性，而另外某些部位控制蛋白的反应活性，对枯草杆菌蛋白酶 (Narinx 等 1997) 和一种稳定性一般的

类嗜热菌蛋白酶 (Van den Burg B 等 1998) 的定点突变实验就为此提供了证据。通过特定位点的氨基酸残基的替换, 可以使这些酶的稳定性有很大提高, 而催化特性也可以有一定提高或保持原始活性不变。对嗜冷菌、中温菌和嗜热菌酶基因的研究比较发现, 酶蛋白的整体结构要比单纯酶催化中心的结构对酶的低温活性更重要 (Rentier 等 1993)。另外, 通过利用光谱 (荧光光谱、CD 光谱) 技术对冷 α -淀粉酶热变性过程的研究, 酶活性的丧失是发生于构象变化之前的 (Feller 等 1994)。这说明酶活性的丧失并非严格与酶的解折叠相关联, 在酶分子三级结构不发生重大不可逆改变的情况下, 酶与底物之间的相互作用也可以发生改变。因此, 海藻糖对酶蛋白分子稳定性的具体保护机制还需要借助其它实验方法进一步研究确定。

3.4 本章小结

- (1) 本章中对 *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶粗酶及纯酶的热稳定性分别进行了研究。结果表明, *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶粗酶及纯酶溶液对热都比较敏感, 热稳定性较差。
- (2) 干燥 (冷冻干燥或常温干燥) 对 *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶粗酶的稳定性具有很好的保护作用, 酶粉的稳定性完全可以达到工业化生产酶制剂的要求。
- (3) 比较了几种不同的糖 (葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、海藻糖) 对粗酶液稳定性的保护作用, 海藻糖的保护作用最为显著。进一步研究了海藻糖在不同温度条件——20℃、30℃、40℃下以及不同浓度的海藻糖对粗酶液的保护情况, 结果表明, 不同温度 (20~40℃) 下, 海藻糖对粗酶液热稳定性都有很好的保护作用, 而且温度越高, 保护作用越显著。海藻糖用于适冷蛋白酶纯酶的稳定性保护同样取得了很好的效果, 加入海藻糖后的纯酶溶液 40℃保温 30min, 酶活基本没有丧失。

3.5 参考文献

1. Margesin Rosa, Palma Norbert, Knauseder Franz, Schinner Franz (1991) Proteases of psychrotrophic bacteria isolated from glaciers. J Basic Microbiol. 31: 377-383

2. Shiba Masahiro, Takahashi Saori, Sato Ryoichi, Oda Kohei (1997) A novel metalloproteinase, almelysin, from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. No. 3696: purification and characterization. *Biosci Biotech Biochem.* 61(4): 710-715
3. Hoshino T, Ishizaki K, Sakamoto T, Kumeta H, Yumoto I, Matsuyama H, Ohgiya S. (1997) Isolation of a *Pseudomonas* species from fish intestine that produces a protease active at low temperature. *Lett Appl Microbiol.* 25: 70-72
4. Hamamoto Tetsuo, Kaneda Motohiro, Horikoshi Koki, Kudo Toshiaki (1994) Characterization of a protease from a psychrotroph *Pseudomonas Fluorescens* 114. *Appl Envir Microbiol.* 60(10): 3878-3880
5. Benjamin David C., Kristjansdottir sigridur, Gudmundsdottir Agusta (2001) Increasing the thermal stability of euphauserase - a cold-active and multifunctional serine protease from Antarctic krill. *Eur J Biochem.* 268: 127-131
6. Miyazaki Kentaro, Arnold Frances H (1999) Exploring Nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: rapid improvement of protein function. *J Mol Evol.* 49: 716-720
7. Miyazaki K, Wintrode PL, Grayling RA, Rubingh DN, Arnold FH (2000) Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *J Mol Biol* 297: 1015–1026
8. Narinx E, Baise E, Gerday C (1997) Subtilisin from psychrophilic antarctic bacteria: characterization and site-directed mutagenesis of residues possibly involved in the adaptation to cold. *Protein Eng.* 10(11): 1271-1279
9. Taguchi Seiichi, Ozaki Akiyoshi, Momose Haruo (1998) Engineering of cold-adapted protease by sequential random mutagenesis and a screening system. *Appl Envir Microbiol.* 64(2): 492-495
10. Chiara Schiraldi, Isabella Di Lernia and Mario De Rosa (2002) Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends in Biotechnology.* 20(10): 420-425
11. Chen XL, Sun CY, Zhang YZ, Gao PJ (2002) Effects of different buffers on the thermostability and autolysis of a cold-adapted protease MCP-01. *Journal of Protein Chemistry.* 21(8): 523-527

12. Gerday C, Aittaleb M, Arpigny JL, Baise E, Chessa JP, Garsoux G, Petrescu I, Feller G (1997) Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochim Biophys Acta*. 1342(2): 119-131
13. Van den Burg B, Vriend G, Veltman OR, Venema G, Eijsink VG (1998) Engineering an enzyme to resist boiling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(5): 2056-2060
14. Rentier-Delrue F, Mande SC, Moyens S, Terpstra P, Mainfroid V, Goraj K, Lion M, Hol WG, Martial JA (1993) Cloning and overexpression of the triosephosphate isomerase genes from psychrophilic and thermophilic bacteria. Structural comparison of the predicted protein sequences. *J Mol Biol*. 229(1): 85-93
15. Feller G, Payan F, Theys F, Qian M, Haser R, Gerday C (1994) Stability and structural analysis of alpha-amylase from the antarctic psychrophile *Alteromonas haloplanctis* A23. *Eur J Biochem*. 222(2): 441-447

第四章 海藻糖对 *Pseudoaltermonas* sp. SM9913 适冷蛋白酶热稳定性保护机理

如前章所述, *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶在溶液状态下酶活容易丧失的主要原因是由于适冷蛋白酶的自溶。但是目前对其自溶机制以及海藻糖是如何有效阻止其自溶的机理尚不清楚, 这些问题的阐明, 必将对适冷酶的基础研究及海藻糖保护生物活性物质机理的揭示具有重要意义。

本章将利用高效毛细管电泳 (HPCE) 高效、快速的特点对适冷蛋白酶自溶过程及海藻糖对适冷蛋白酶稳定性保护过程进行实时检测研究, 并对海藻糖的稳定性保护机理进行初步探讨。

4.1 材料和方法

4.1.1 试剂、药品

毛细管电泳仪电极缓冲液: 上海雷磁仪器厂试剂分厂生产的 pH9.182 硼砂缓冲液, 0.044g/10ml

4.1.2 仪器

DK-8 型电热恒温水槽, 上海精宏实验设备有限公司

P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System, BECKMAN COULTER

4.1.3 适冷蛋白酶纯化方法见第三章 3.1 “材料与方法”一节

4.1.4 高效毛细管电泳方法

毛细管管长 50cm, 内径 50 μ m, 分离压力 15KV, 进样时间 5 秒, 进样压力 0.5psi, 检测波长 202nm, 电泳温度 15℃。

4.2 结果与分析

4.2.1 HPCE 检测 *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶纯酶 40℃ 下的自溶过程

*P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶纯酶的 Tris-HCl 缓冲溶液于 40℃ 下保温, 间隔 5 分钟取样, 样品取出后立即放入冰浴以阻止酶进一步失活。通过毛细管电泳检测酶蛋白保温过程中的变化, 结果如图 4-1 至图 4-4 (图 4-2、4-3、4-4 是为直观方便,

对图 1 进行坐标轴间隔位移处理后得来的)。

图中 3 分钟左右处是 Tris 的吸收峰。可以看出, Tris 吸收峰的重现性非常好, 可作为内标。由于 *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶纯酶的稳定性很差, 0 点时已经不是单一组分, 能够检测到的至少有 5-6 种以上组分 (图 4-5)。但从图 4-4 上我们仍然可以看出随着保温时间的延长酶蛋白吸收峰的变化情况 (以其中较明显的三个吸收峰 1、2、3 为例进行说明): 0-5 分钟, 峰 1、峰 2 高度明显变低, 峰 3 高度基本不变; 之后, 随着时间的延长, 峰 2、峰 3 高度逐渐降低, 而且在酶蛋白吸收峰与 Tris 吸收峰之间可以看到一些微弱的吸收信号, 同 Tris 峰之前的基线以及 0 点图谱比较, 应该不是仪器稳定性造成的波动, 说明峰 2 和峰 3 处的蛋白片段逐渐降解为一些更小的肽链。通过酶蛋白三个主要吸收峰面积和与内标面积 (即 Tris 吸收峰面积) 之比 (表 4-1), 可以看出随保温时间的延长, 酶蛋白浓度逐渐降低, 也表明了酶蛋白的自溶降解过程。

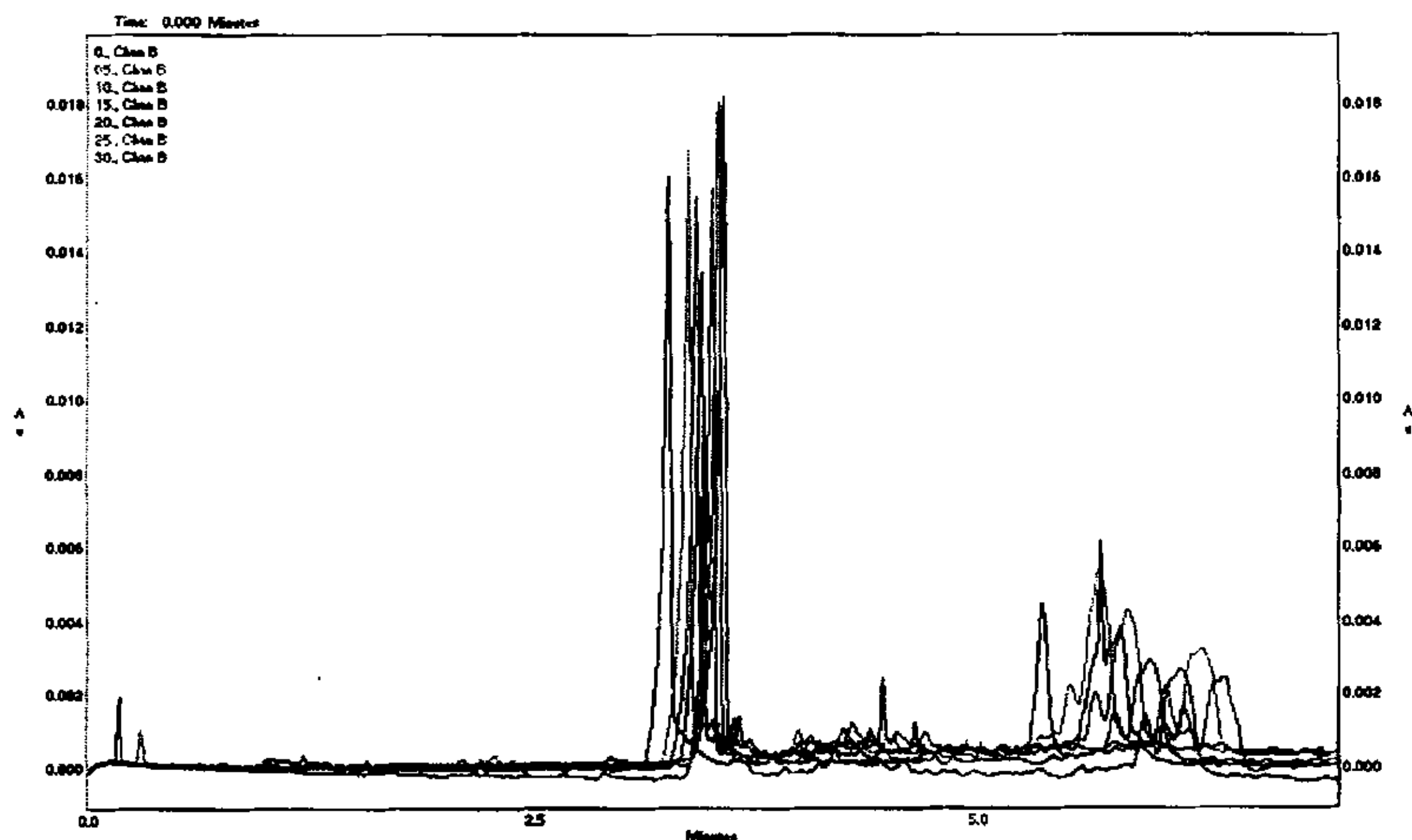


图 4-1 40℃下 *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶纯酶变化的毛细管电泳检测图谱

图左上角数字 0, 10,30 代表保温时间

Fig. 4-1 High performance capillary electrophoresis (HPCE) of the pure cold-adapted protease incubated at 40℃ (0, 10, 20 ... 30 is incubation time)

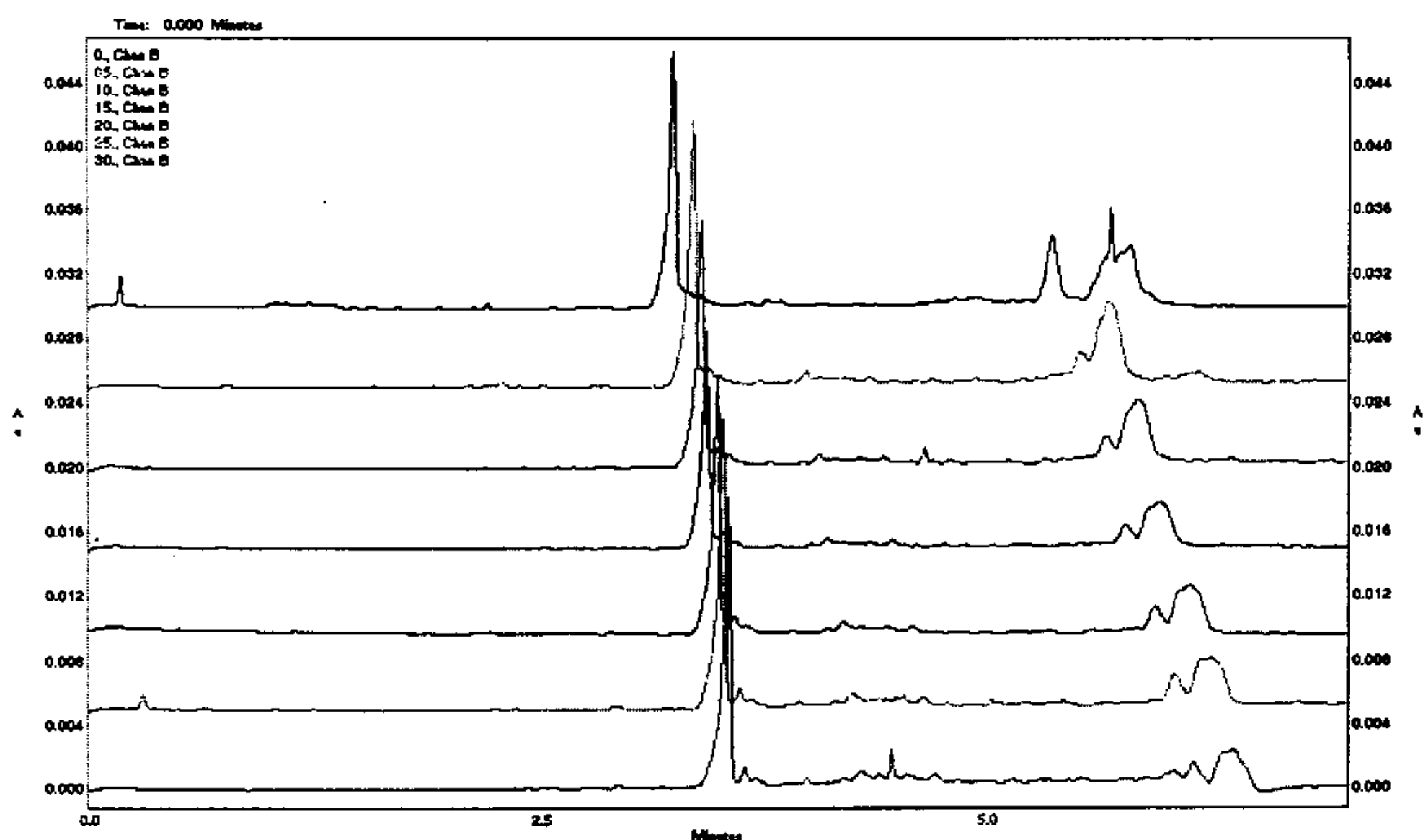


图 4-2 40℃下 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶纯酶变化的毛细管电泳检测图谱
(Y axis offset=0.005, 即将图 4.1 Y 轴间隔平移 0.005AU。自上至下依次是 0、5、10……30min)
Fig. 4-2 HPCE of the pure cold-adapted protease incubated at 40℃
(Y axis offset=0.005, i.e. Y axis of Fig.1 spaced by 0.005AU)

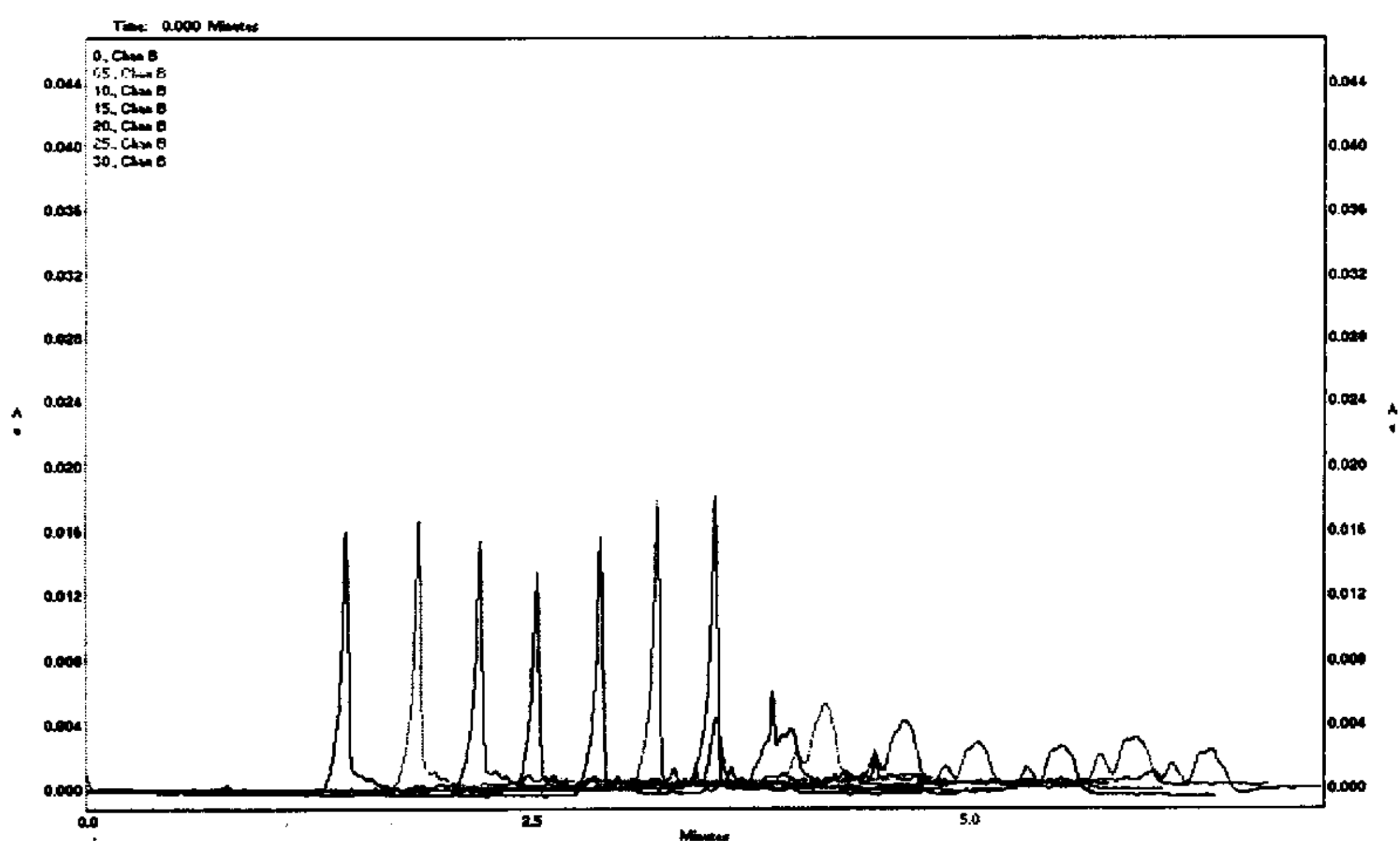


图 4-3 40℃下 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶纯酶变化的毛细管电泳检测图谱 (X axis offset=-0.3)

Fig. 4-3 HPCE of the pure cold-adapted protease incubated at 40℃ (X axis offset=-0.3)

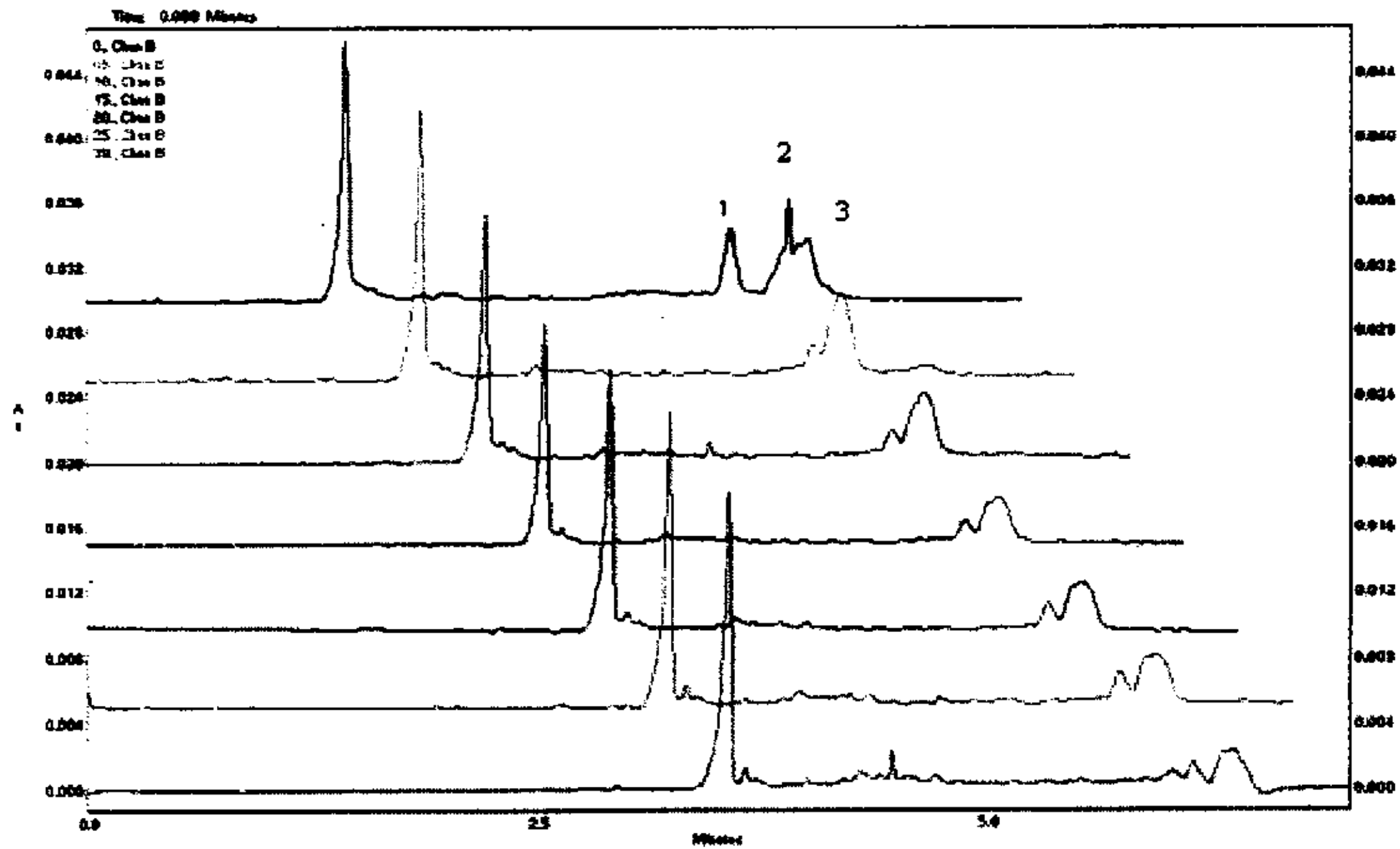


图 4-4 40℃下 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶纯酶变化的毛细管电泳检测图谱
(X axis offset=-0.3, Y axis offset=0.005)

Fig. 4-4 HPCE of the pure cold-adapted protease incubated at 40℃
(X axis offset=-0.3, Y axis offset=0.005)

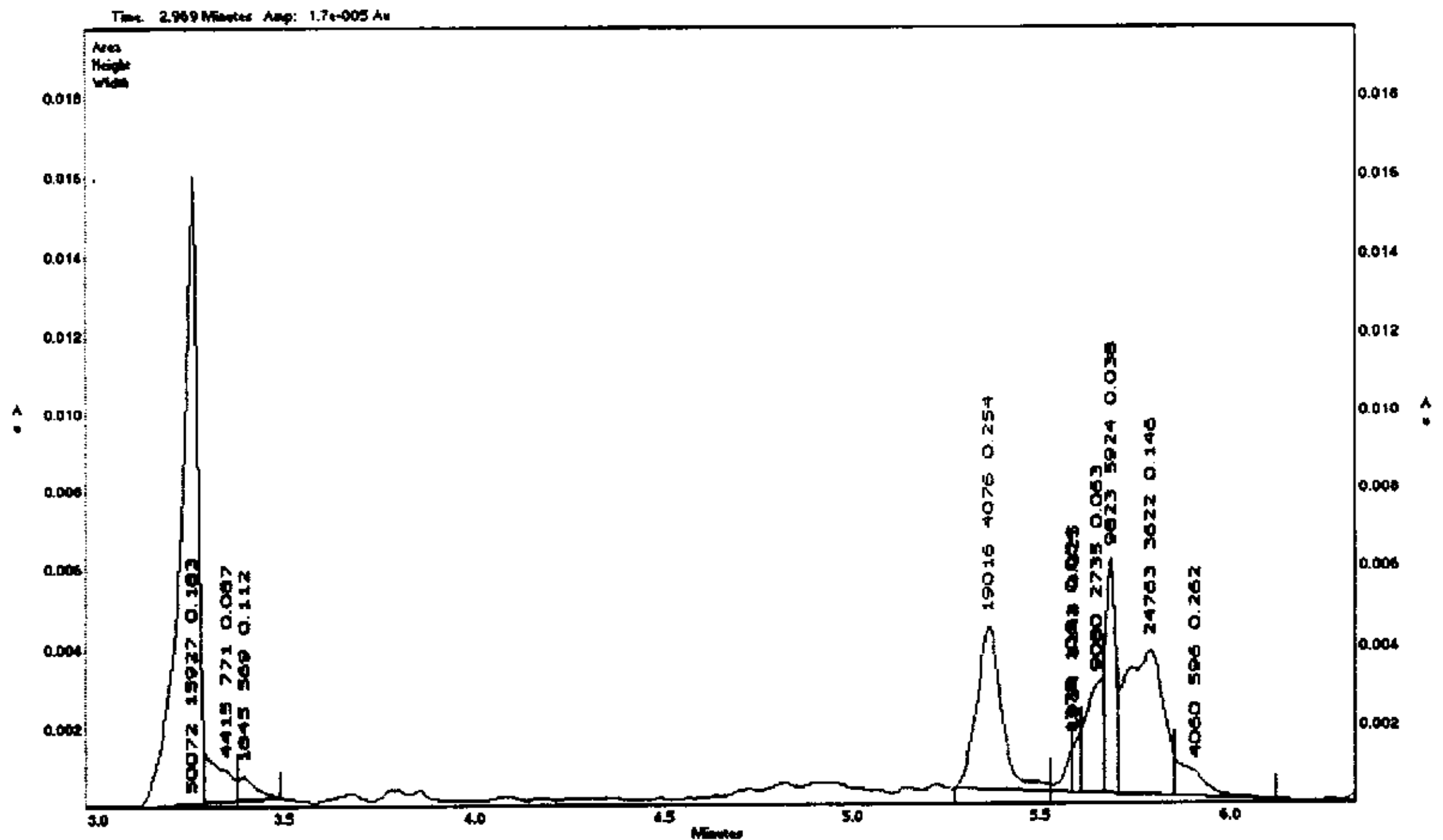


图 4-5 酶蛋白 0 点时吸收峰的毛细管电泳分析图谱
Fig. 4-5 HPCE data process result of the pure protease peak at 0min

表 4-1 40℃下 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶纯酶变化的毛细管电泳检测图谱分析

Table 4-1 HPCE data process results of the pure cold-adapted protease incubated at 40℃

保温时间 (min)	Tris 吸收峰面积 (A_{Tris})	酶蛋白吸收峰面积 (A_{enzyme})	$A_{\text{enzyme}} / A_{\text{Tris}}$
0	56332	60211	1.07
5	59487	47669	0.807
10	56892	41103	0.727
15	47550	32546	0.687
20	57677	37847	0.66
25	62452	39067	0.62
30	62732	23931	0.38

4.2.2 HPCE 检测海藻糖 40℃下对适冷蛋白酶纯酶的稳定性保护

纯酶溶液中加入海藻糖, 使海藻糖终浓度为 10%。40℃水浴保温, 间隔 5 分钟取样, 分别进行毛细管电泳检测, 结果如图 4-10 至图 4-13。同时, 作为对照, 检测了海藻糖的 Tris-HCl 缓冲溶液在保温过程中的变化情况, 如图 4-6。接近 5 分钟时的吸收峰是海藻糖中所含杂质, 在保温 30 分钟后无明显变化, 对热稳定, 因此对适冷酶的分析结果不会有大的影响。我们进而又对酶溶液在海藻糖存在前后的毛细管电泳行为进行了检测比较 (图 4-7 至图 4-9), 发现纯酶溶液中加入海藻糖之后, Tris 出峰时间基本不变 (即使有点迁移, 也是由于海藻糖吸附毛细管壁造成的), 而酶的吸收峰出现时间明显推迟, 据此推测可能海藻糖与酶蛋白发生了结合, 形成的复合物的分子量大于酶蛋白, 但电荷没有大的变化, 致使荷质比减小, 迁移率变小, 出峰时间延迟。另外, 从图上我们可以发现, 虽然 Tris 的吸收峰降低, 但酶蛋白的检测信号却有明显升高, 如果再考虑进海藻糖吸附毛细管壁造成的影响, 理论上酶蛋白的吸收峰应该更高。检测信号升高的可能性一方面是由于海藻糖的加入导致酶蛋白三维构象发生了变化, 暴露出来的肽链增多; 另一可能性是由于海藻糖中所含杂质与酶蛋白发生结合所致。

随保温时间延长, 酶蛋白吸收峰不但没有降低, 反而呈一种持续上升的趋势, 原因可能是在保温过程中, 蛋白的三维结构逐渐变得松散, 暴露出的肽链增多, 从而使得肽键的检测信号升高。从表 4-2 中酶吸收峰面积与内标面积之比也可以直观地看出这种上升趋势。

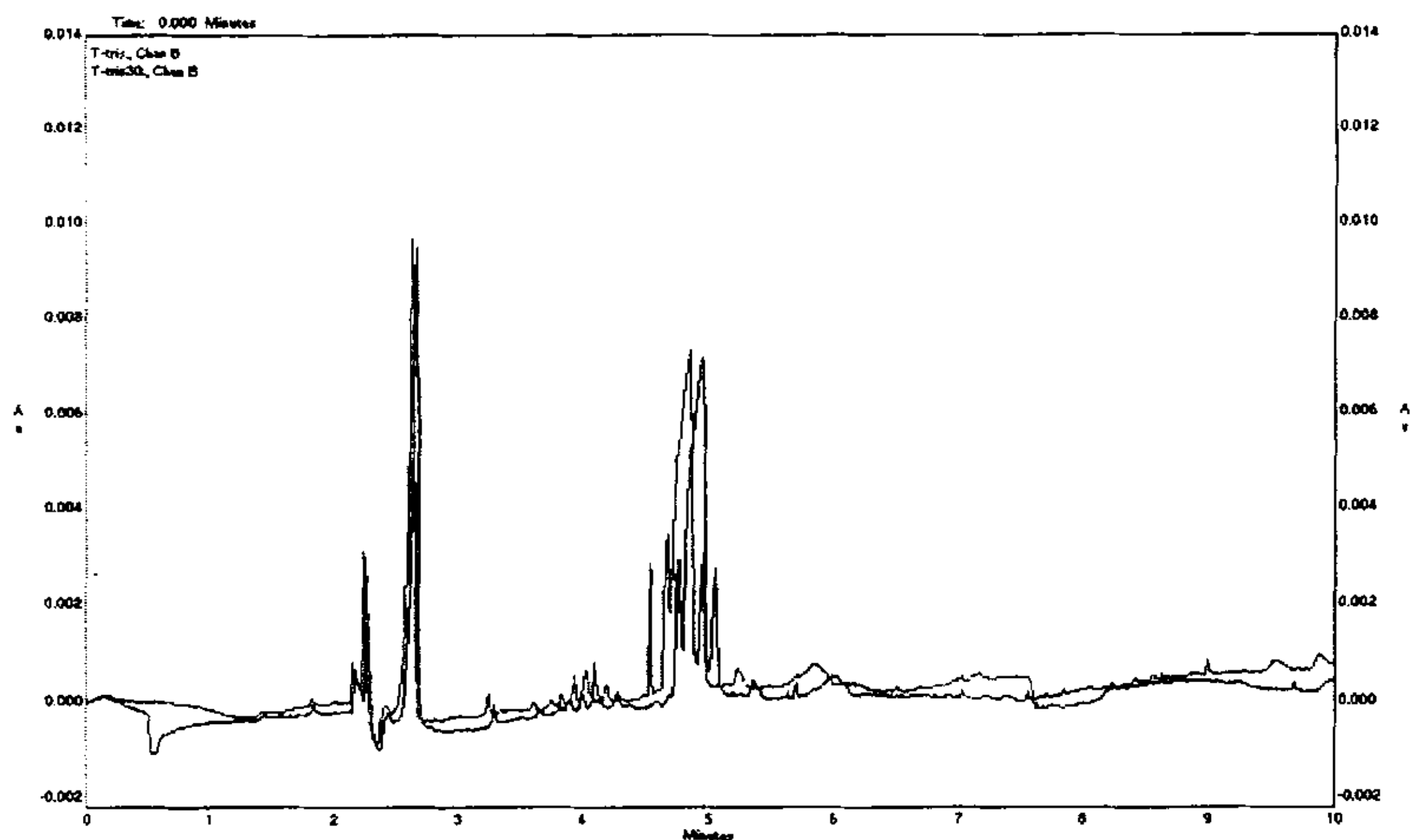


图 4-6 40℃下保温 30min 对海藻糖 Tris 溶液的影响
Fig. 4-6 Effect of incubation at 40℃ for 30min on trehalose-tris solution

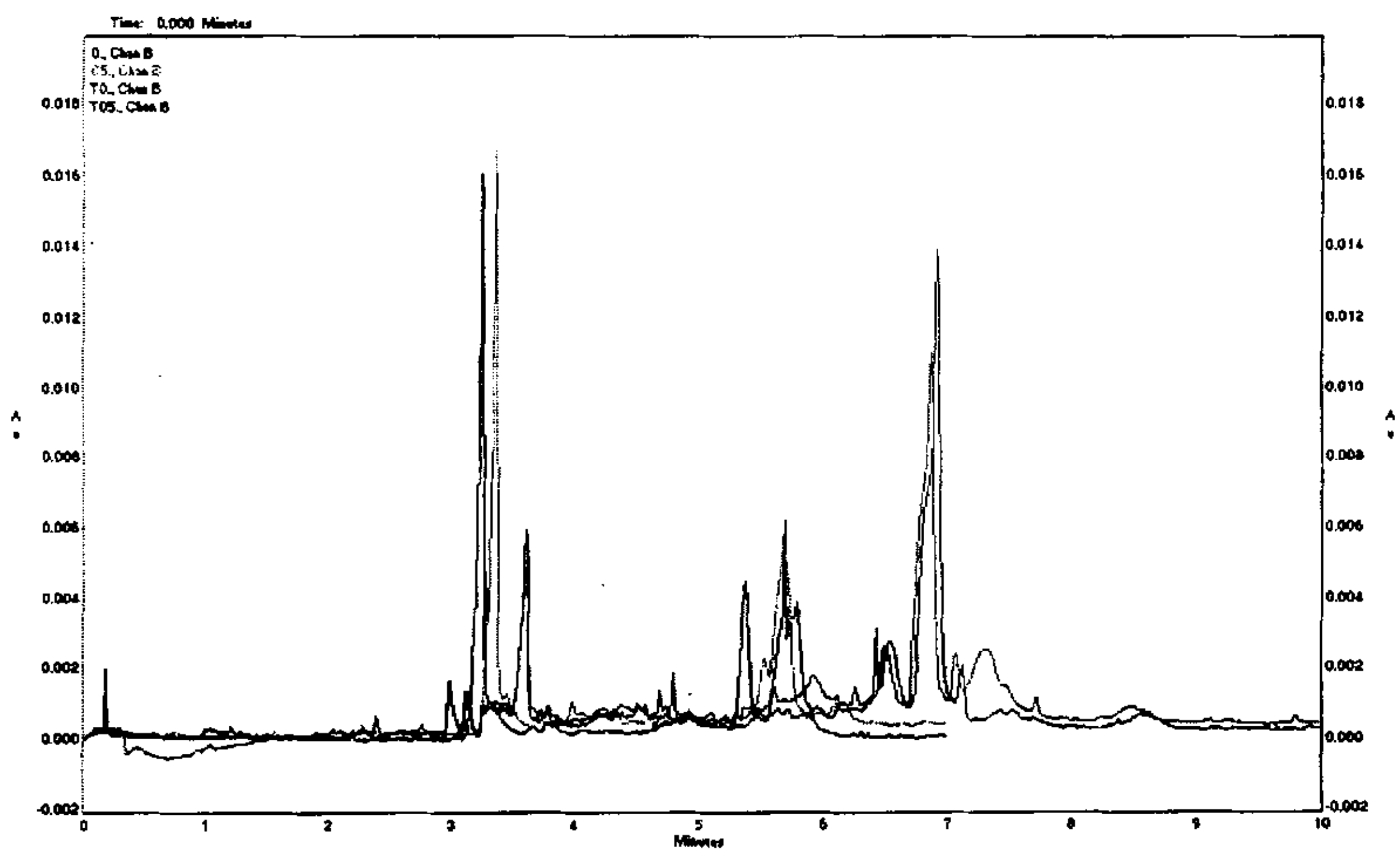


图 4-7 海藻糖对 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶纯酶毛细管电泳行为的影响
Fig. 4-7 Effect of trehalose on the HPCE of the pure cold-adapted protease

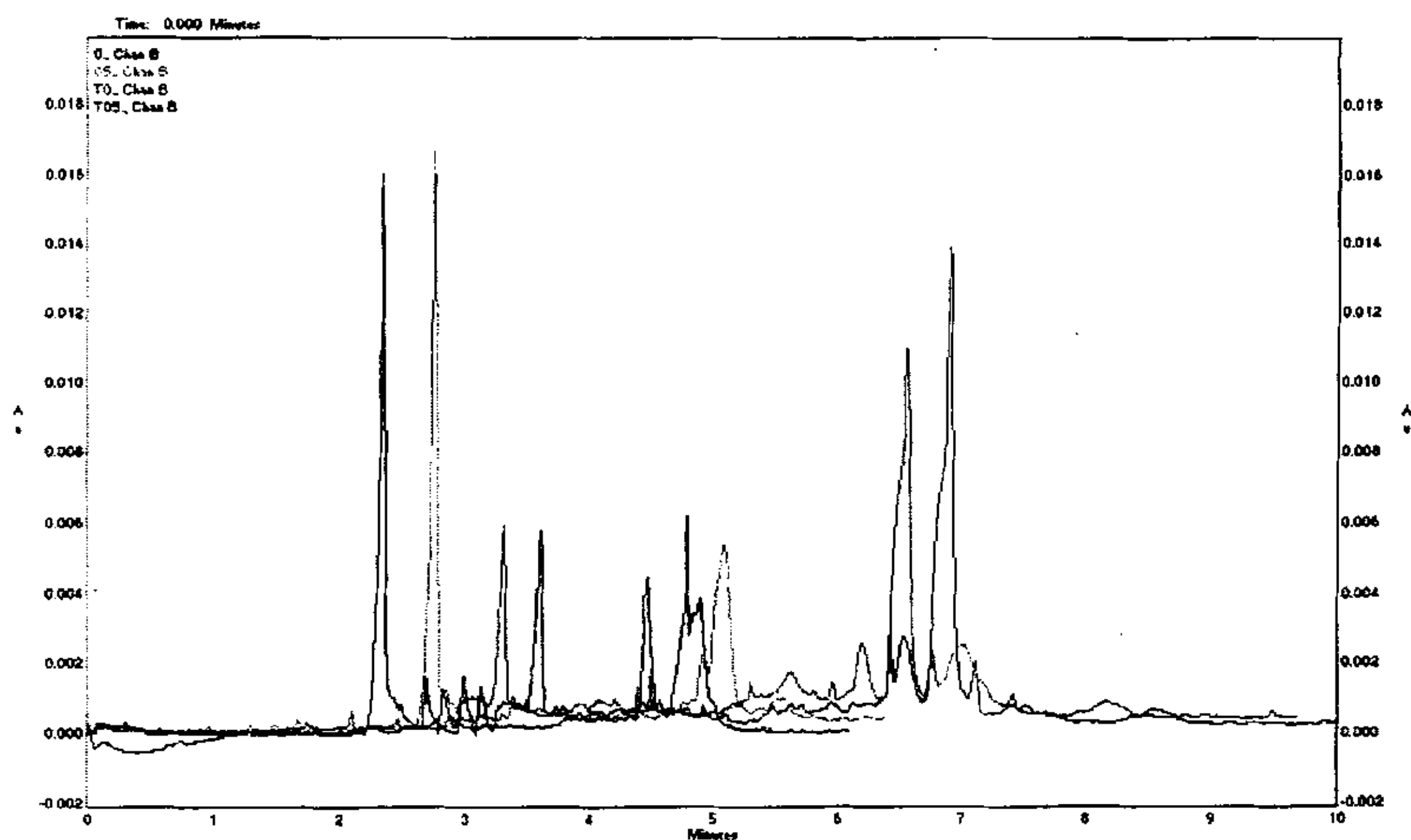


图 4-8 海藻糖对 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶纯酶毛细管电泳行为的影响 (X offset=-0.3)

Fig. 4-8 Effect of trehalose on the HPCE of the pure cold-adapted protease (X offset=-0.3)

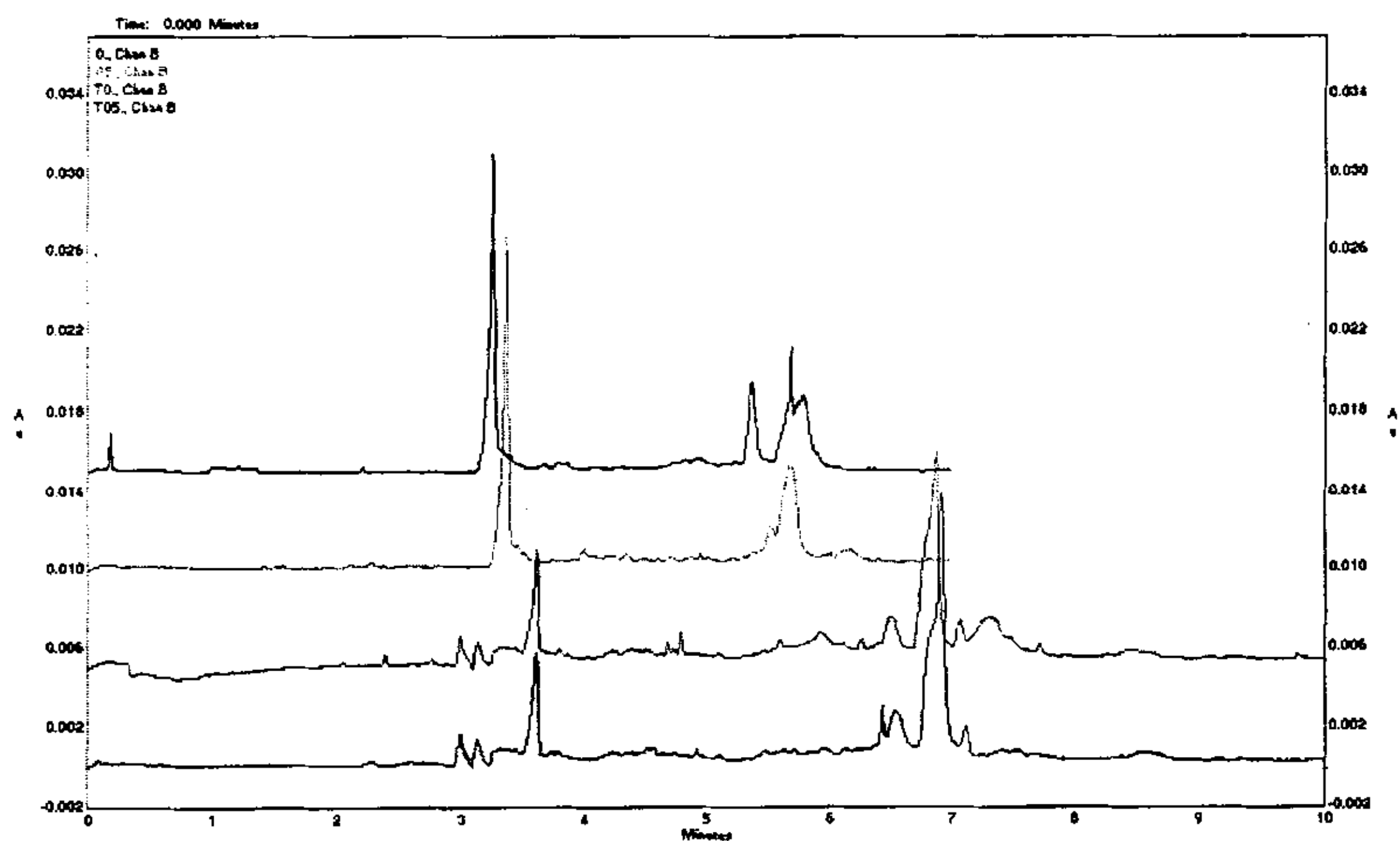


图 4-9 海藻糖对 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶纯酶毛细管电泳行为的影响 (Y offset=0.005)

Fig. 4-9 Effect of trehalose on the HPCE of the pure cold-adapted protease (Y offset=0.005)

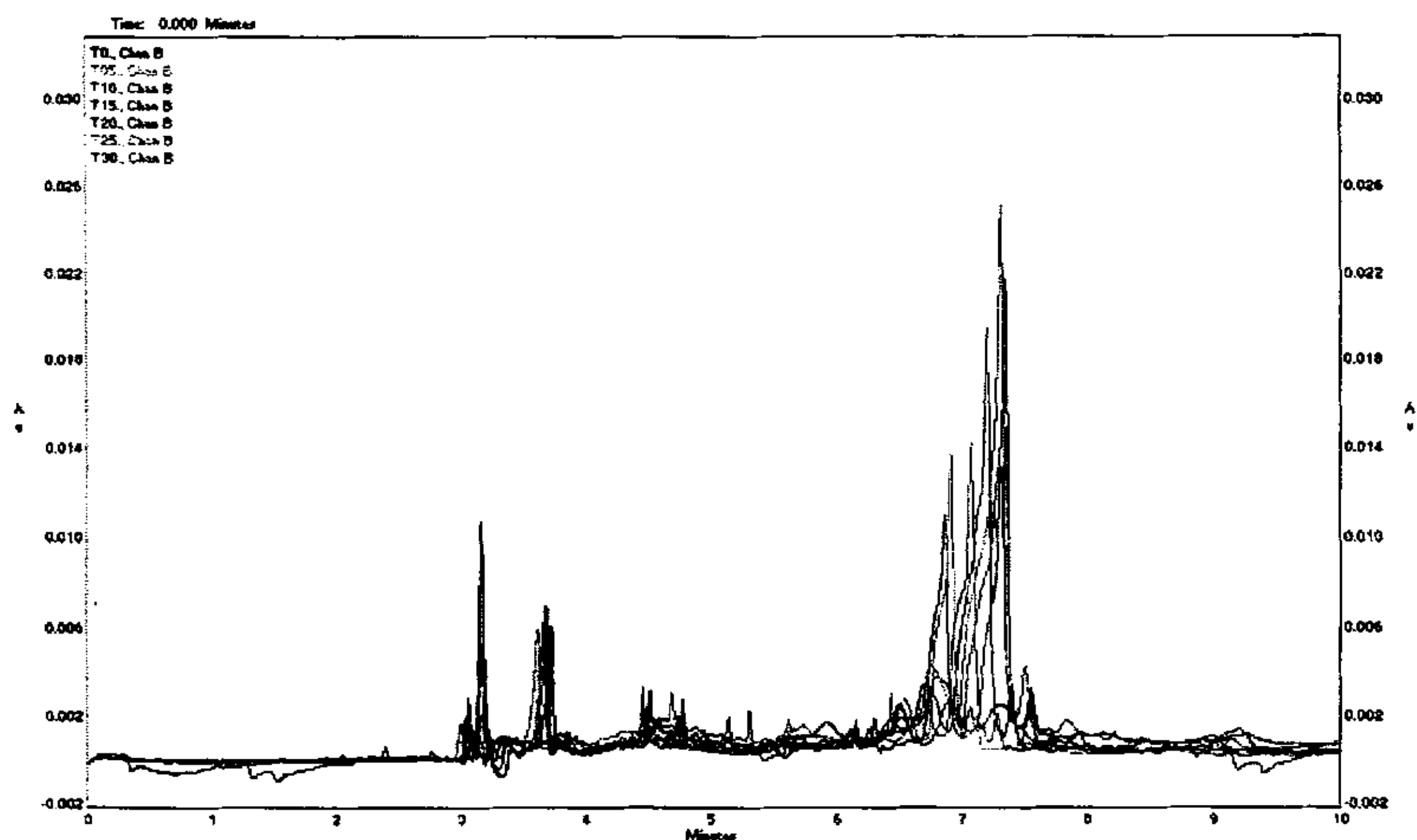


图 4-10 海藻糖存在情况下 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶纯酶 40℃ 下保温过程的毛细管电泳图
谱

Fig. 4-10 HPCE of the pure cold-adapted protease incubated at 40℃ with the presence of trehalose

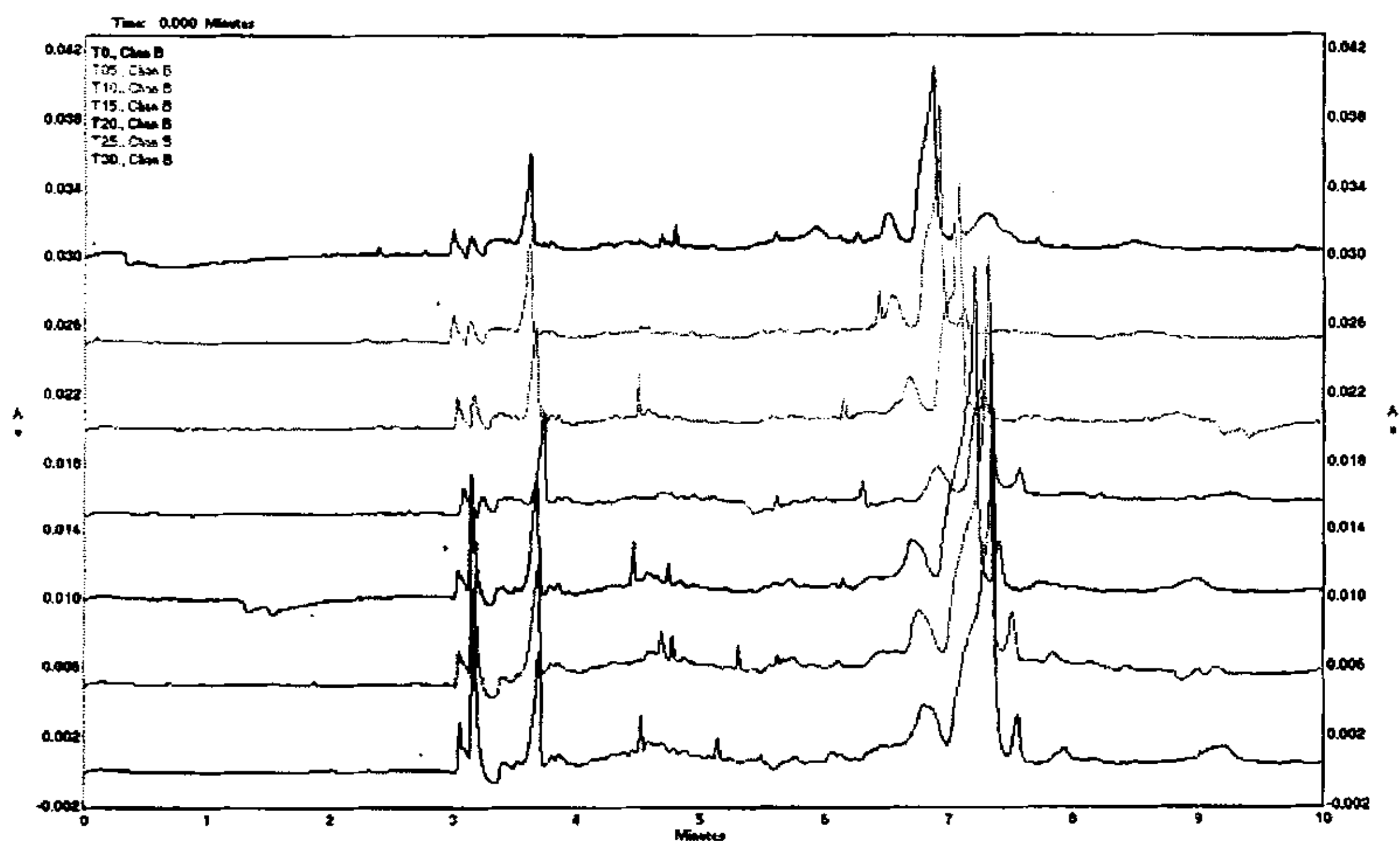


图 4-11 海藻糖存在情况下 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶纯酶 40℃ 下保温过程的毛细管电泳图
谱

(Y offset=0.005)

Fig. 4-11 HPCE of the pure cold-adapted protease incubated at 40℃ in the presence of trehalose

(Y offset=0.005)

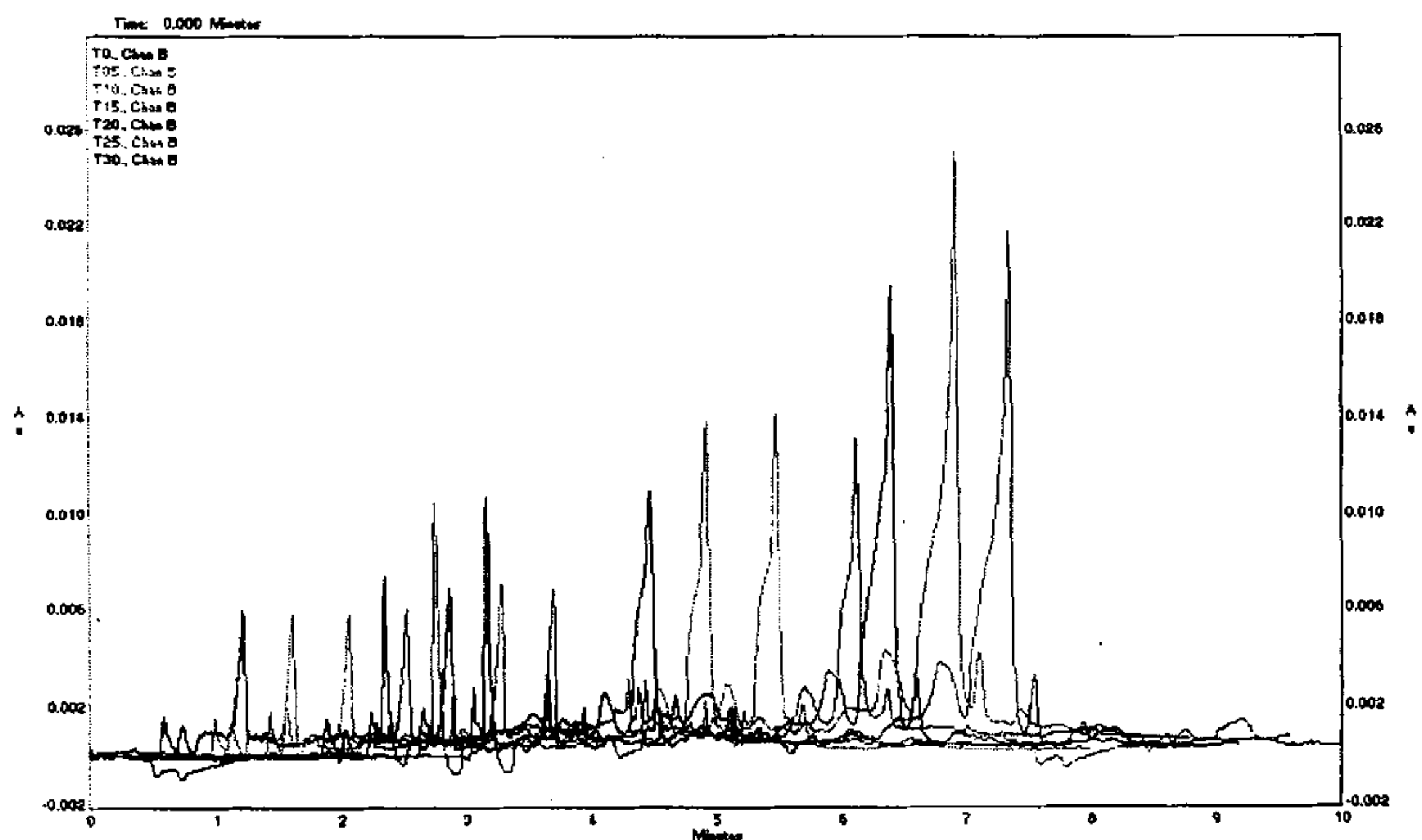


图 4-12 海藻糖存在情况下 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶纯酶 40℃ 下保温过程的毛细管电泳图
谱

(X offset=-0.4)

Fig. 4-12 HPCE of the pure cold-adapted protease incubated at 40℃ in the presence of trehalose

(X offset=-0.4)

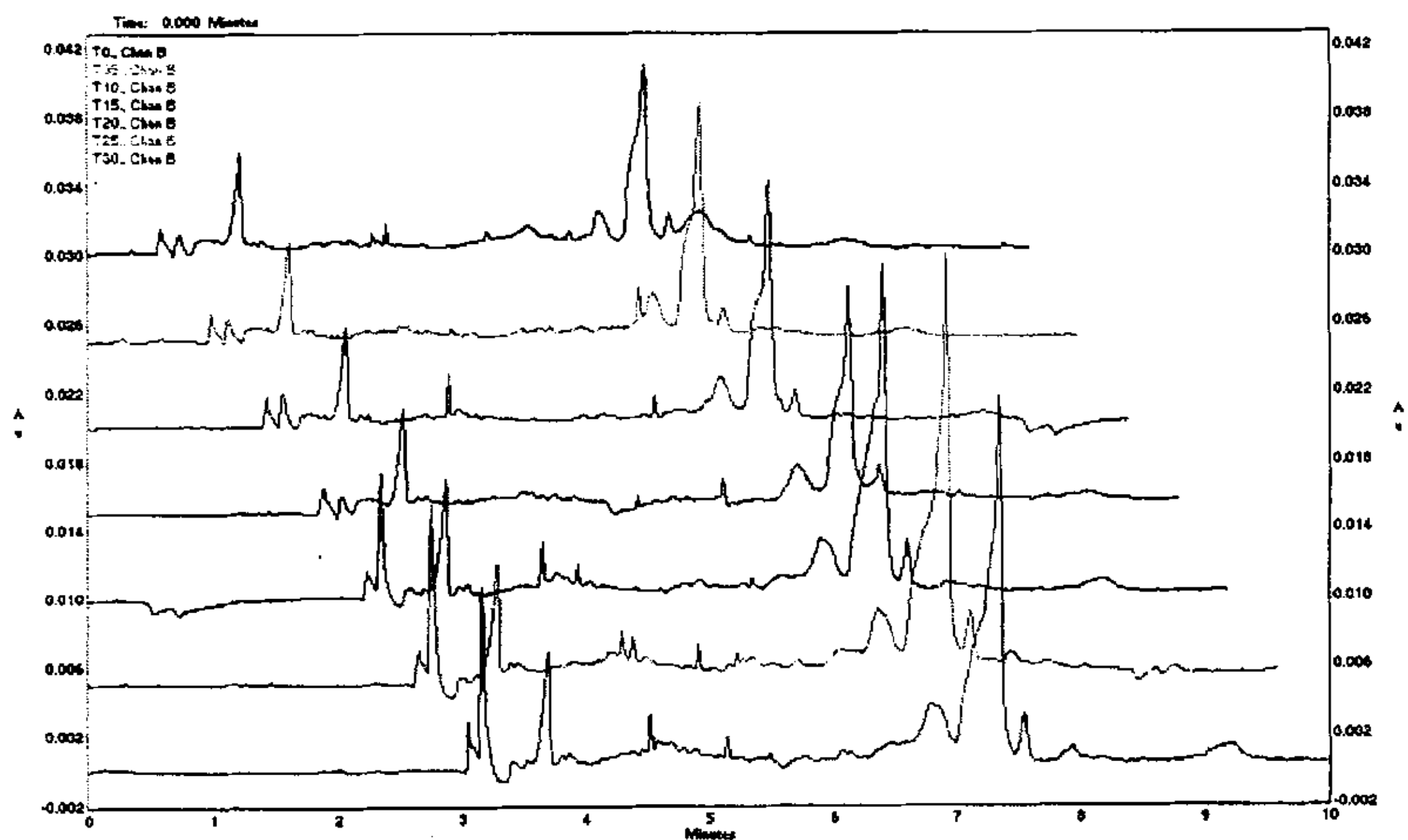


图 4-13 海藻糖存在情况下 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶纯酶 40℃ 下保温过程的毛细管电泳图
谱 (X offset=-0.4, Y offset=0.005)

Fig. 4-13 HPCE of the pure cold-adapted protease incubated at 40℃ in the presence of trehalose

(X offset=-0.4, Y offset=0.005)

表 4-2 40℃下海藻糖对 P.sp.SM9913 适冷蛋白酶纯酶稳定性保护的毛细管电泳图谱分析
Table 4-2 HPCE data process results of the effect of trehalose on the pure cold-adapted protease
incubated at 40℃

保温时间 (min)	Tris 吸收峰面积 (A_{tris})	酶蛋白吸收峰面积 (A_{enzyme})	$A_{\text{enzyme}} / A_{\text{tris}}$
0	17896	93995	5.25
5	17694	114208	6.45
10	18150	124808	6.88
15	18301	108760	5.94
20	23714	194267	8.19
25	23958	244451	10.20
30	23376	246241	10.53

4.3 讨论

关于海藻糖对生物分子的保护作用机理, 人们进行了大量探索, 提出了种种假说。目前, 主要有两种假说解释海藻糖稳定生物分子的机理, 一种称为“水替代”假说, 另一种称为“玻璃态”假说(刘传斌, 王崇霞 1998)。^①“水替代”假说。“水替代”假说认为, 海藻糖能与生物分子形成氢键, 替代维持生物分子空间结构所必需的水分子。Crowe JH 等(1984)根据海藻糖存在条件下干态磷脂与水合磷脂物理性质相似这一事实, 提出了“水替代”假说来解释海藻糖对干态生物膜的保护作用。水是维持生物膜结构和功能完整性的一个十分重要的成分, 通常情况下, 膜磷脂的极性头部都有一定程度的水化, 基团头部被这些分子相互隔离。当磷脂脱水时, 基团头部的填充密度将增加, 从而也增加了碳氢链间的范德华力, 这导致在某一温度时, 脱水脂类是凝胶相, 而水化脂类在同一温度是液晶相。也就是说, 与水化脂相比较, 作为构成生物膜主要成分的磷脂酰胆碱(PC)脱水后相转变温度 T_c 升高(T_c 为 PC 的烃链由凝胶相转变为液晶相时的温度)。因此, 细胞膜在一定温度下脱水时, 处于液晶相的磷脂酰胆碱会随着脱水的进行转变为凝胶相, 从而造成磷脂酰胆碱、其它脂类和膜内蛋白质的横向相分离。在这一过程中, 如果磷脂酰胆碱由液晶相转变为凝胶相的行为被阻止, 膜的损伤就可以减轻甚至消除。海藻糖就有这种阻止相转变的作用。海藻糖抑制相转变的可能机制是干燥脱水时海藻糖取代了生物膜结构中水的位置, 海藻糖的羟基和磷脂的头部基团之间形成氢键, 这些氢键替代了原有的脂和水之间的氢键, 阻止了膜磷脂头部的相互靠近, 从而降低了磷脂的相转变温度, 稳定了生物膜的结构和功能。对于蛋白质, “水替代”假说认为, 生物体中的大分子均被一层水

膜包围保护着，这层薄的水膜是维持其结构和功能必不可少的物质基础。干燥时水膜的除去，将导致这些大分子物质发生不可逆变化。干燥过程中若有海藻糖存在，海藻糖可在生物分子的失水部位与这些分子形成氢键，使其在缺水条件下仍能保持原有结构，而不丧失活性。Carpenter 和 Crowe (1989) 对傅立叶红外转换 (FTIR) 数据的研究，是对这一假说的有力支持。②“玻璃态”假说 (Colaco 等 1992)。如果海藻糖水溶液在室温下干燥，则溶液的粘度就会随着浓度的增加而增大，当浓度足够大且糖的结晶不会发生时，海藻糖—水混合物就会玻璃化，这时海藻糖所处的状态称为玻璃态。研究表明，单糖、双糖、多羟基化合物以及结构蛋白质、酶都能显示玻璃行为，只是玻璃化转变温度 (T_g) 不同。玻璃态物质既具有固体的行为，又具有流体的行为，它的粘度很大，约为 $10^{12} \text{Pa} \cdot \text{s}$ 。在这么高粘度的流体中，即使存在固体晶核，由于横向扩散速度极慢，短期内也不会有结晶出现。事实上，玻璃态糖能稳定存在几年。另外，由于玻璃化，高粘度使分子扩散受阻，导致玻璃态物质干燥速率变得极其缓慢，结果使其水含量增加，这对再水化有利。“玻璃态”假说认为，当干燥生物活性物质时，海藻糖紧密地包住相邻近的分子，形成一种在结构上与玻璃状的冰相似的碳水化合物玻璃体。由于这种非晶体结构的扩散系数很低，故在这种结构中分子运动和分子变性反应非常微弱，能够使生物分子维持一定的空间结构。目前，这两种假说还不能完全解释现有实验现象，如海藻糖与葡萄糖对限制性内切酶稳定性的影响的显著差别是与“水替代”假说不符的；同样，“玻璃态”假说也有一些不能解释的问题，如高温下海藻糖对生物制品的稳定性问题等。

近年来海藻糖研究的不断深入以及一些新的测定技术的应用，为海藻糖稳定性保护机理的阐明提供了一些新的实验数据。Branca 等 (1999, 2002) 利用超音速技术、拉曼衍射、核磁共振以及中子衍射等方法研究了海藻糖水溶液时发现，海藻糖—水体系具有对温度以及浓度变化的结构敏感性。海藻糖加入到水中，会导致水分子氢键四面体网络结构的破坏，使得水分子形成类似于超冷水的低密度构象，因此也就降低了可结冰水的数量。海藻糖由于其结构的柔韧性，便会取代水分子结合包围在生物结构表面，起到稳定作用。Elias ME 和 Elias AM (1999) 对海藻糖水溶液的密度、摩尔体积、热膨胀系数、粘度、玻璃态转化温度进行研究时也发现了这一问题。Ken-ichi Akao 等 (2001) 利用红外光谱研究

了海藻糖无水形态特性，发现海藻糖无水形态 II (anhydrous form II) 在温和条件（室温，相对湿度 40%）下很容易吸湿转化为二水晶体，也就是形态 I。海藻糖无水形态 II 是将海藻糖二水晶体放置在真空 50℃48 小时获得的，区别于无水形态 III（无水产品，熔点 215℃）。同时发现，水溶液中的海藻糖易于与周围的水分子发生相互作用，海藻糖所有羟基基团同时作为质子供体和受体，与周围的水分子形成氢键，作者将这种构象称为“开放状态”（open state），易于吸收水分子。处于无水形态 II 的海藻糖分子吸收水分子之后相互之间靠氢键彼此连接，然后一分子海藻糖紧密结合两个水分子，形成二水晶体，变为“闭合状态”（close state），这种构象变化有点类似于酶与底物结合过程中的诱导契合效应。海藻糖在冻干的生物物质中以无水形态 II 存在，说明无水形态 II 对生物活性物质的稳定性保护具有重要作用。作者认为，如果冻干的海藻糖—生物物质样品中存在海藻糖无水形态 II，则水分子很容易被吸收到形态 II 中，形成海藻糖二水晶体，从而不会导致玻璃化区域玻璃态转变温度的降低，避免了贮存稳定性的降低。

从这些研究中我们可以看出，海藻糖在水溶液中有很强水合作用，而作为适冷酶来讲，其结构的特殊性使得酶分子的疏水性减弱，亲水性增强（Marshall 1997），因此，适冷酶在水溶液中易于与海藻糖相结合，其驱动力是二者都具有亲水性作用。Guifu Xie（1997）等对海藻糖稳定核糖核酸酶 A 的研究支持了这一说法。Wyman 连接分析表明，海藻糖优先与天然蛋白而不是解折叠蛋白结合，在核糖核酸酶 A 变性时更多的海藻糖分子从蛋白质结构域中被排出，说明酶蛋白变性解构时，内部疏水性基团暴露出来，使得酶蛋白亲水性降低，从而导致与海藻糖的结合减弱。这也说明了海藻糖与酶蛋白之间的结合并非以氢键为主。我们更倾向于认为海藻糖是通过对酶的整体结构也就是酶蛋白天然构象的稳定而实现保护作用的，这样既稳定了蛋白，同时又不会对酶发挥正常的催化活性产生影响。

4.4 本章小结

- (1) 本章利用高效毛细管电泳高效、快速的特点，实时地检测了 *P.sp.*SM9913 适冷蛋白酶纯酶 40℃下的自溶动态过程以及海藻糖对酶蛋白保温自溶过程的稳定性保护情况。
- (2) 根据 HPCE 检测数据，结合国外近年来的实验数据、研究结果，对海藻

糖稳定酶蛋白活性的机制进行了分析, 推测海藻糖对酶分子的稳定性保护作用是通过与酶蛋白整体结构的结合而实现的。这种结合作用的驱动力来自于酶蛋白表面的亲水性以及海藻糖强的水合特性, 海藻糖与酶蛋白之间似乎不存在强的氢键作用。

4.5 参考文献

1. 刘传斌, 王崇霞. 海藻糖的性质及其广阔应用前景. 中国微生态学杂志, 1998, 10(6): 377-379
2. Crowe JH, Crowe LM, Chapman D (1984) Infrared spectroscopic studies on interactions of water and carbohydrates with a biological membrane. Arch Biochem Biophys. 232(1): 400-407
3. Carpenter JF, Crowe JH (1989) An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. Biochemistry. 28(9): 3916-3922
4. Colaco C, Sen S, Thangavelu M, Pinder S, Roser B (1992) Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. Biotechnology (NY). 10(9): 1007-1011
5. Ken-ichi Akao, Yusei Okubo, Naoki Asakawa, Yoshio Inoue, Minoru Sakurai (2001) Infrared spectroscopic study on the properties of the anhydrous form II of trehalose. Implications for the functional mechanism of trehalose as a biostabilizer. Carbohydrate Research. 334: 233-241
6. Branca C, Magazu S, Maisano G, Migliardo P, Tettamanti E (1999) On the bioprotective effectiveness of trehalose: ultrasonic technique, Raman scattering and NMR investigations. Journal of Molecular Structure. 480-481: 133-140
7. Branca C, Magazu S, Migliardo F, Migliardo P (2002) Destructuring effect of trehalose on the tetrahedral network of water: a Raman and neutron diffraction comparison. Physica A. 304: 314-318
8. Elias ME, Elias AM (1999) Trehalose + water fragile system: properties and glass transition. Journal of Molecular Liquids. 83: 303-310
9. Ken-ichi Akao, Yusei Okubo, Naoki Asakawa, Yoshio Inoue, Minoru Sakurai (2001) Infrared spectroscopic study on the properties of the anhydrous form II of

trehalose. Implications for the functional mechanism of trehalose as a biostabilizer. Carbohydrate Research. 334: 233-241

10. Marshall Craig J (1997) Cold-adapted enzymes. Tibtech. 15: 359-364
11. Guifu Xie, Serge N, Timasheff (1997) The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. Biophysical Chemistry. 64: 25-43

致 谢

感谢我的导师张玉忠教授三年来对我学习和生活的关心指导。张老师渊博的知识、求实创新的学术态度、兢兢业业的工作精神、正直高尚的人品给我留下了深刻的印象，并将对我以后的人生产生积极深远的影响，这笔宝贵的精神财富将会使我受益终生。

感谢本实验室的陈秀兰老师在实验及论文写作中给予的细致指导，感谢孙彩云老师在实验仪器方面给予的指导和帮助，感谢实验室全体兄弟姐妹在这三年中的关心、支持和帮助。

感谢所有本文所涉及文献之作者，并对他们在科学领域所进行的探索及取得的成就表示深深的敬意。

感谢所有帮助过我的老师和同学！