

地衣芽孢杆菌胞外蛋白酶的纯化及特性分析

曹煜成^{1,2} 李卓佳¹ 吴灶和² 冯娟¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州 510300; 2. 湛江海洋大学水产学院, 湛江 524000)

摘要: 研究不同条件对地衣芽孢杆菌 De 株产生胞外蛋白酶的量及其酶活性的影响, 结果表明在 pH 为 7.4—8.2 范围内, 温度为 30℃ 时, 培养 8—12h 的菌株所分泌胞外产物中的蛋白酶活性最高。实验先以半透膜法收集芽孢杆菌的胞外产物, 然后再经过硫酸铵沉淀过夜、Sephadex G-100 凝胶层析和 DEAE-Cellulose 离子交换层析及聚丙烯酰胺凝胶电泳等四个步骤的分离纯化后, 可以得到含有 3 种主要蛋白质 (BLP1、BLP2、BLP3) 成分的胞外蛋白酶, 其分子量分别为 66.2KD、31.0KD 及约 20.1KD, 所得纯化蛋白酶的蛋白浓度为 0.7734g/mL, 蛋白回收率为 11.66%。实验还发现, 纯化的胞外蛋白酶在 100℃ 下作用 30min, 仍可保持其活力, 可见具有相当的热稳定性, 而其酶活最佳的 pH 和温度条件分别为 7.8 和 45—65℃。酶活抑制实验显示 EDTA、铜、钴、镁离子等均可成为其酶活抑制因子; 而丝氨酸蛋白酶抑制剂甲基磺酰氟 (PMSF)、铁、锰、钡、钙离子等对酶活性没有明显影响; 锌则会令之酶活性其部分丧失。

关键词: 地衣芽孢杆菌; 胞外产物; 纯化; 特性分析

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2006)03-0262-07

近年来, 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 作为一种微生物制剂广泛应用于水产养殖业中, 它和其他种类的芽孢杆菌、光合细菌等有益微生物共同作用, 可有效地改善养殖水体的生态环境, 并促进养殖生物的生长和发育^[1,2]。李卓佳等人研究了芽孢杆菌制剂对对虾养殖水体中的细菌、浮游藻类、浮游动物及其他一些环境因子如生物好氧量、化学好氧量、硫化物和氨氮浓度水平等的影响, 科学地评价了芽孢杆菌制剂对养殖生态环境的改良作用。地衣芽孢杆菌的胞外产物具有很强的蛋白酶^[3]、脂肪酶^[4]、淀粉酶^[5]活性, 国内外也有不少对其胞外酶研究的相关报道。Sogard 报道^[6], 地衣芽孢杆菌有较强的胞外酶活性, 可降解某些复杂的植物性碳水化合物如果胶、羧甲基纤维素、多聚半乳糖醛酸等。吴铁林^[7]等用地衣芽孢杆菌 20386 株研制成“整肠生”, 经实践证明它能调节肠道菌群和治疗一些肠道疾病。但就地衣芽孢杆菌的胞外产物在水产应用方面的研究则尚未见有报道, 本文对分离自对虾养殖水体中的地衣芽孢杆菌 De 株所产生的胞外蛋白酶 (Extracellular protease, ECPase) 进行研究, 从它的提取

纯化到理化特性均都进行了系统地分析, 为地衣芽孢杆菌胞外产物在水产上的应用提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 菌种 地衣芽孢杆菌 De 株是由中国水产科学研究院南海水产研究所健康养殖中心分离保存菌株。其形态呈杆状, 规格为 1.6—2.8 μ m × 0.6—0.8 μ m, 格兰氏染色为阳性, 在营养琼脂培养基上菌落不透明, 表面粗糙, 边缘呈毛发状。能分泌一定量的胞外酶物质。

1.2 细菌的培养 将 De 接种于营养琼脂斜面上, 32℃ 下培养 12h, 用经高压灭菌的生理盐水制备菌悬液 (浓度为 2.8 × 10⁸ CFU/mL)。用无菌涂布棒将 0.5mL 的菌悬液涂布于表面覆盖有玻璃纸的营养琼脂培养基上, 32℃ 下培养 12h, 即可用于提取胞外产物了。

1.3 胞外产物蛋白质含量测定 将牛血清白蛋白 (Amresco) 作为标准蛋白^[8], 以 Bradford 方法测得胞外蛋白酶的蛋白质含量。

收稿日期: 2005-01-07 修订日期: 2005-05-20

基金项目: 广东省重大科技专项 (A3050304) 资助

作者简介: 曹煜成 (1979—), 男, 硕士, 研究方向为微生物制剂的作用机理

通讯作者: 李卓佳, E-mail: jlyz609@hotmail.com

1.4 消化平板法检测胞外产物的酶活性 分别配制含有淀粉(0.2%)、卵黄(10%)、脱脂牛奶(3%)、明胶(0.4%)等琼脂平板。其中淀粉营养琼脂培养基的成分为:牛肉膏、蛋白胨、可溶性淀粉及琼脂粉;卵黄营养琼脂培养基的成分为:卵黄液、蛋白胨、牛肉膏及琼脂粉;脱脂奶琼脂培养基的成分为:脱脂奶粉和琼脂粉;Frazier 明胶琼脂培养基的成分为:明胶、牛肉膏、蛋白胨、葡萄糖、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 及琼脂粉。各种培养基均于 $121^\circ C$ 高压灭菌 15min, 倒平板, 待冷却后再在平板上用直径为 0.3mm 的打孔器打孔, 各孔分别加入 15 μ L 菌液, 然后在 $32^\circ C$ 下恒温培育 24h, 观测所形成的消化透明圈的情况。

1.5 偶氮酪蛋白底物法测定 ECPase 的酶活性 参考 Allan 和李焕荣的方法^[9,10], 用偶氮酪蛋白(Azocasein)底物法测定 ECPase 的酶活性, 其中以每分钟水解 Azocasein OD₄₄₀ 变化 0.01 为一个酶活单位, 用沸水浴灭活 1h 的样品作为空白对照。

1.6 提取 ECPase 最佳条件的确定 分别用 pH2.2 的碳酸氢钠—柠檬酸缓冲液, pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液以及 pH11.0 的甘氨酸—氢氧化钠缓冲液调节固体培养基 pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.6、9.0、10.1、11.3。然后将预先准备好的菌悬液涂布其上(每个平板涂布 0.5mL 菌悬液), 再于 $32^\circ C$ 下培养 24h, 用底物法测定各个 pH 条件下所分泌的 ECPase 的酶活性。

把菌悬液涂布在最佳 pH 的营养琼脂培养基上, 再分别将之培养于 $30^\circ C$ 、 $35^\circ C$ 、 $40^\circ C$ 、 $45^\circ C$ 、 $50^\circ C$ 等不同温度条件下。24h 后用底物法分别测定所分泌的 ECPase 的酶活性大小。

将培养了 12h 的 De 接种于 pH 7.4 的营养琼脂培养基上, 在 $32^\circ C$ 下分别培养 12h、24h、36h、48h、60h。用底物法测定 ECPase 酶活性, 从而确定产生 ECPase 酶活性最高的菌株培养时间。

分别用 50%、60%、70%、80%、90%、100% 的饱和硫酸铵沉淀粗提的 ECPase, $4^\circ C$ 下静止过夜, 再用 10000r/min 离心 30min, 去上清, 用少许 50mmol/L pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液溶解沉淀, 透析浓缩后用底物法测定样品的酶活性。

1.7 ECPase 的分离提取 将 De 接种于营养琼脂斜面上, $32^\circ C$ 下培养 12h, 用经高压灭菌的生理盐水制备菌悬液(浓度为 2.8×10^8 CFU/mL)。用无菌涂布棒将 0.5mL 的菌悬液涂布于表面覆盖有玻璃纸的营养琼脂培养基上, $32^\circ C$ 下培养 12h, 取出玻璃纸, 用 3mL Tris-HCl 缓冲液(pH7.4, 50mmol/L)将玻璃纸上的菌和

ECPase 洗下来, 然后在 $4^\circ C$ 下 10000r/min 离心 30min。上清液用 0.22 μ m 的纤维素酯滤膜过滤除菌, 即可得到粗提的 ECPase^[11]。

1.8 ECPase 的纯化 用 Sephadex G-100 凝胶层析, 将初步收集到的 ECPase 加入层析柱中(1.0 \times 40cm)用 Tris-HCl 缓冲液(20mmol/L, pH7.2)洗脱, 流速为 0.5mL/min。洗脱的同时用核酸蛋白检测仪测定蛋白质在 280nm 的吸光值, 绘制蛋白洗脱曲线并测定其蛋白含量。最后将所收集的样品经透析浓缩处理以提高样品的蛋白浓度。

把经过 Sephadex G-100 凝胶层析、浓缩的样品加入 DEAE-Cellulose 柱中(2.0 \times 30cm)用 50mmol/L pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液和 0—1mol/L NaCl 梯度洗脱, 测定蛋白于 280nm 的吸光值, 所收集样品经透析浓缩处理后测定其蛋白含量和酶活性。

最后将纯化好的 ECPase 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 把凝胶中蛋白质含量较高的主要条带分别切割下来, 置于小管中搅碎, 用 50mmol/L pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液在 $4^\circ C$ 下浸泡 48h, 待凝胶中的蛋白质充分渗入缓冲液后, 吸取一定量的样品用底物法测定其酶活性。

1.9 对 ECPase 理化特性的分析 参考李焕荣的方法^[9]分析 pH、温度、金属离子及酶抑制剂对 ECPase 活性的影响。分别用 pH2.2 的碳酸氢钠—柠檬酸缓冲液, pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液以及 pH11.0 的甘氨酸—氢氧化钠缓冲液配制 pH 值分别为 2.5、4.0、5.0、6.0、7.6、9.0、10.1、11.3 的缓冲液 pH 梯度系。然后分别与纯化的 ECPase 作用, 测定酶活的变化曲线。

经过纯化的 ECPase 于 $55^\circ C$ 、 $100^\circ C$ 下分别处理 5min、10min、20min、35min、50min, 用底物法测定其酶活性。将 ECPase 分别于 $0.5^\circ C$ 、 $3.5^\circ C$ 、 $15.0^\circ C$ 、 $31.8^\circ C$ 、 $50.7^\circ C$ 、 $62.0^\circ C$ 、 $71.1^\circ C$ 、 $82.0^\circ C$ 、 $91.3^\circ C$ 下处理 1h, 再测定其酶活性, 绘制酶活性变化曲线。

将浓度为 1mmol/L 的 $CoCl_2$ 、 $ZnSO_4$ 、 $MnCl_2$ 、 $BaCl_2$ 、 $FeCl_3$ 、 $CuSO_4$ 及 $MgCl_2$ 等金属盐溶液分别和 ECPase 作用, $32^\circ C$ 下处理 0.5h, 再用底物法测定其酶活性。对照组为不加金属盐的 ECPase 样品, 空白则为经过沸水浴灭活的样品。

粗提 ECPase 和纯化 ECPase 分别与 50mmol/L 的金属螯合剂乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)、25mmol/L 的丝氨酸蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF), $32^\circ C$ 下作用 30min, 以底物法测定其酶活性。对照组为不经处理的 ECPase, 空白则为经过沸

水浴灭活的样品。

2 结果

2.1 地衣芽孢杆菌 ECPase 的提取与纯化

De 株在 pH 低于 5.0 或高于 10.0 的条件下所产生的 ECPase 均较少且酶活性也较低,而在 pH 处于 6.0—9.5 的范围内所产生的 ECPase 酶活性较高,当 pH 为 6.0—9.0 时 ECPase 的产量呈现一个上升的趋势,在 9.0 时候达到最高峰,以后便渐渐下降了。所以综合考虑各方面的影响因素选择 pH7.4—8.2 的条件下培养细菌是最为理想的(图 1)

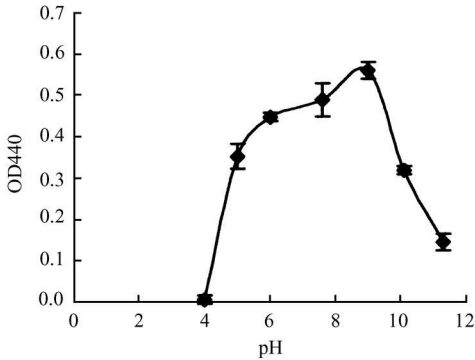


图 1 培养基 pH 对 ECPase 生物活性的影响

Fig. 1 Effect of medium pH on activity of ECPase

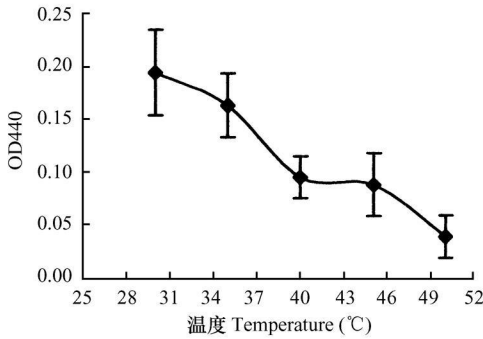


图 2 生长温度对 ECPase 生物活性的影响

Fig. 2 Effect of culture temperature on activity of ECPase

从结果看,该菌在 30℃ 所产生的 ECPase 的量最大,随着温度的不断上升其产量逐渐下降,在 30—40℃ 间其下降趋势较为明显,但在 40—50℃ 间其下降趋势就相对较为平缓,所以在后继的实验过程中选择以 30℃ 培养细菌最为合适。(图 2)

细菌产生 ECPase 的量随时间的变化而呈现一个下降的趋势,培养了 12h 的菌的 ECPase 产量最高,而在 12—36h 间其下降趋势明显,在 36—60h 间下降趋势就相对变得较为平缓。可能该菌在度过其

对数期和平稳期后,产生 ECPase 的量就会大幅度的下降。因此选择 12—18h 是较为合适的。(图 3)

用不同饱和度的硫酸铵沉淀粗提的 ECPase,然后用底物法测定其 OD440。发现用饱和度为 50%—60% 的硫酸铵来盐析的胞外产物的活性较高。当硫酸铵的饱和度大于 70% 时其活性就会处于一个较低的水平。故选择饱和度为 50%—60% 硫酸铵来盐析 ECPase 是最为合适的。(图 4)

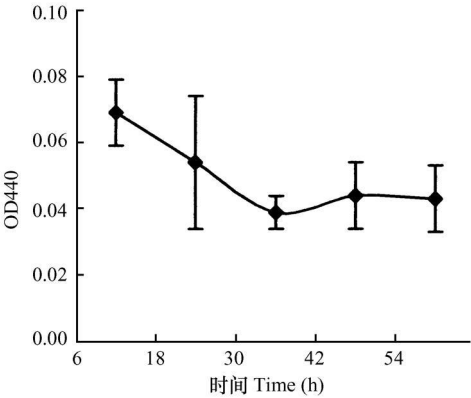


图 3 生长时间对 ECPase 生物活性的影响

Fig. 3 Effect of culture time on activity of ECPase

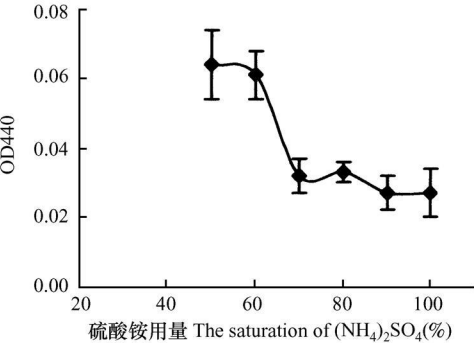


图 4 沉淀 ECPase 所用硫酸铵饱和度对其生物活性的影响

Fig. 4 Effect of (NH₄)₂SO₄ saturation on activity of ECPase

经硫酸铵沉淀、透析的 ECPase 相继进行 Sephadex G-100 凝胶层析和 DEAE-Cellulose 离子交换层析,再用 Bradford 法测得蛋白回收率分别为 83.59% 和 11.66%。两次层析洗脱均形成三个峰,其中一个特别显著,另外两个则较为平缓,不太明显。(表 1、图 5、6)。

用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 ECPase 中一些主要的蛋白质分子,将图 7 中 20.1KD 附近的 BLP1 蛋白、间于 31.0KD 和 43.0KD 间的 BLP2 蛋白及 66.2KD 附近的 BLP3 蛋白从聚丙烯酰胺凝胶中切割下来,搅碎后用缓冲液浸泡,使蛋白质从胶中渗透出来,然后用底物法测得它酶活性是纯化胞外产物的 25.97%。

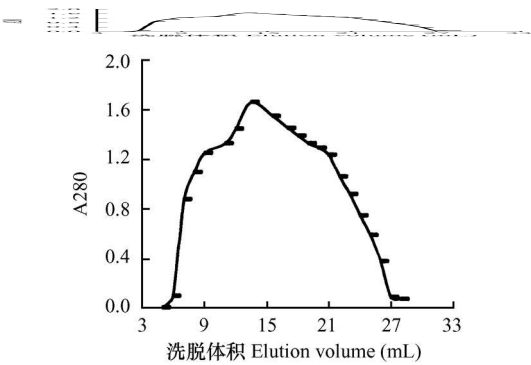


图5 Sephadex G-100 凝胶层析蛋白洗脱曲线
Fig. 5 Sephadex G-100 chromatography of the ECPase

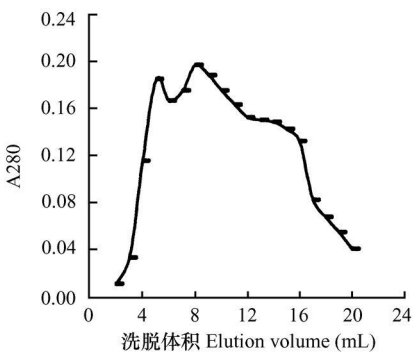


图6 DEAE-Cellulose 离子交换层析蛋白洗脱曲线
Fig. 6 DEAE-Cellulose chromatography of the ECPase

2.2 ECPase 的理化特性

2.2.1 ECPase 的检测 用牛血清白蛋白配制浓度为 1mg/ mL 的蛋白质溶液, 并以此作为标准蛋白, 将之稀释为不同浓度后再与 Bradford 工作液充分混合均匀, 测定其 OD595, 建立标准曲线求得线性回归方

程。(图 8) 从而便于以后用相同的方法测得胞外蛋白酶的 OD595 并在标准曲线上求出其蛋白质含量。

从实验结果来看 De 株的胞外产物中具有淀粉酶、蛋白酶和卵磷脂酶等多种酶活性, 其中又以酪蛋白酶活性较为显著(表 2)。

表 1 纯化 ECPase 的蛋白含量
Tab.1 Protein content of the pure ECPase

	粗提胞蛋白外酶 Crude ECPase	Sephadex G-100层析纯化样品 Purified ECPase by Sephadex G-100 chromatography	DEAE-Cellulose 层析纯化样品 Purified ECPase by DEAE-Cellulose chromatography
OD595	0. 107	0. 094	0. 037
蛋白含量 Protein content(μg/ mL)	6. 655	5. 563	0. 773
蛋白回收率 Protein recovery rate (%)		83. 59%	11. 66%

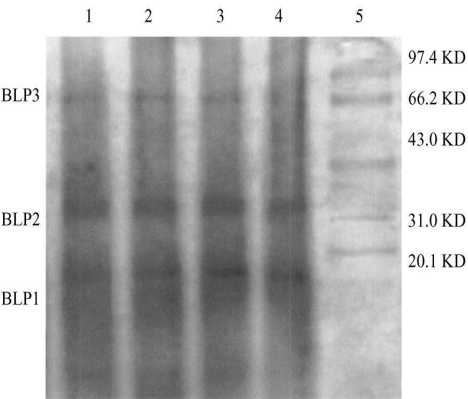


图7 纯化 ECPase 的 PAGE 图谱
Fig. 7 PAGE electrophore-togram of the purified ECPase
1、2、3、4. 纯化的 ECPase 样品 purified ECPase sample 5. Marker

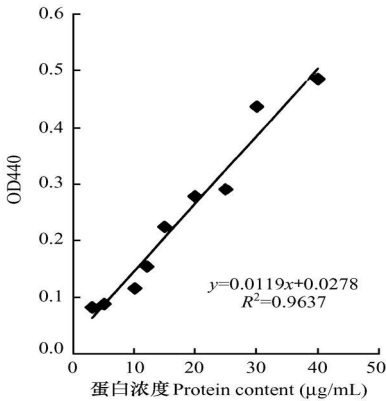


图8 用 Bradford 法建立的蛋白质标准曲线
Fig. 8 Standard curve of protein content using Bradford method

表 2 地衣芽孢杆菌 De 株的胞外产物的酶活性
Tab. 2 Enzymatic activity of extracellular products of *B. licheniformis* strain De

	淀粉酶 Amylase	明胶酶 Gelatinase	卵磷脂酶 Lecithinase	酪蛋白酶 Caseinase
消化圈直径 Diameter/ mm	31. 8	32. 0	30. 8	34. 9

2.2.2 pH 对 ECPase 活性的影响 ECPase 在不同 pH 条件下 32℃ 水浴恒温作用 1h, 用底物法测定其 OD440, 绘制酶活变化曲线。可知纯化 ECPase 的最适 pH 约为 7.0—8.0。而当 pH 低于 4.5 或高于 9.0 时, 酶活性就会受到很大的影响, 处于一个较低的水平。(图 9)

2.2.3 温度对 ECPase 活性的影响 经过纯化的 ECPase 于 pH7.8 条件下, 55℃、100℃ 分别处理 5min、10min、20min、35min、50min, 发现 ECPase 在 55℃ 下作用 50min, 其活性并没有大幅度的下降, 但在 100℃ 下处理 30min 后其活性则基本丧失了。将 ECPase

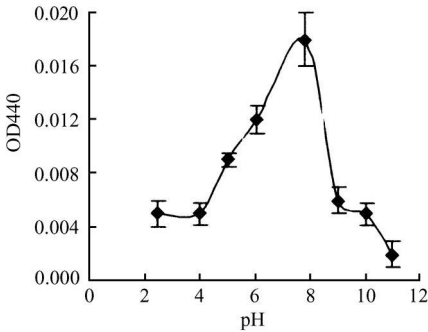


图9 pH 对 ECPase 活性的影响
Fig. 9 Effect of pH on activity of ECPase

分别置于不同的温度条件下处理 1h, 绘制其酶活性变化曲线, 得知酶活性于 45—65℃ 时最佳, 可见其对热有相当的稳定性。(图 10)

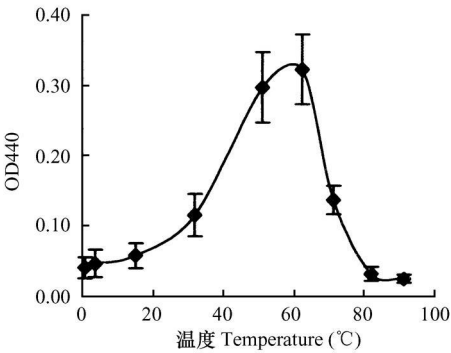


图 10 温度对 ECPase 活性的影响
Fig. 10 Effect of temperature on activity of ECPase

2.2.4 金属离子对 ECPase 活性的影响 将铜、钴、锰、铁、锌、钡、钙、镁等金属盐类分别与 ECPase 作用, 32℃ 下处理 0.5h, 再用底物法测定其酶活性。其中铜、钴、镁等离子可抑制胞外产物的酶活性; 而锌则抑制其部分的酶活性; 铁、锰、钡、钙离子对 ECPase 的酶活性没有什么影响或有增强的作用(表 3)。

表 3 金属离子对 ECPase 活性的影响
Tab. 3 Effects of metal anions on activity of ECPase

	对照 Contrast	Cu ²⁺	Co ²⁺	Mn ²⁺	Fe ³⁺	Zn ²⁺	Ba ²⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
OD440	0.087	0.055	0.037	0.102	0.083	0.063	0.086	0.086	0.056
酶活性 Enzyme activity / %		63.22	42.53	117.24	95.40	72.41	98.85	98.85	64.37

2.2.5 酶抑制剂对 ECPase 活性的影响 粗提 EG-Pase 和纯化 ECPase 分别与 50mmol/L 的金属螯合剂乙二胺四乙酸二钠(EDTA_Na₂)、25mmol/L 的丝氨酸蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF), 32℃ 下作用 30min, 再用底物法测定其酶活性。结果 EDTA 使得纯化的 ECPase 活性降低 73.17%, 使粗提的则下降 83.16%。用 PMSF 处理的样品无论是纯化的还是粗提的均对酶活性影响不大, 纯化样品仅下降 1.05%, 粗提的则下降 5.26%。

3 结论

通常芽孢杆菌多能分泌高活性的胞外酶系^[6,12], 且其胞外酶可帮助消化促进吸收^[13,14,15], 同时还可降

解水体中的有机残余物, 并迅速转化为无机物, 有效地促进养殖水体的生态良性循环^[16,17]。然而, 芽孢杆菌无论是作为养殖水体生态环境的改良剂还是作为畜禽、水产饲料中的添加剂^[18], 其生长、产酶及所产生胞外产物的生物学活性均与各种外界因素的影响有密切的关系。

从本实验对地衣芽孢杆菌 De 株产生 ECPase 的分析看, 该菌在 pH 为 6.0—9.0 范围内, 其 ECPase 产量较高, 至 pH9.0 时可达到最高峰, 可见其对 pH 条件的适应性还是较强; 就温度的影响而言, 该菌在 30℃ 附近时候所产酶量最大, 而其所产生的 ECPase 则在 45—65℃ 有较高的酶活性, 且在 100℃ 下处理近 30min 其酶活性方才基本丧失, 证明其对热有相

当的稳定性; 再看金属离子对 ECPase 活性的影响, 发现只有铜、钴、镁等少数几种离子可以抑制其酶活性, 而铁、锰、钙等离子则无影响。可见地衣芽孢杆菌及其所产生的 ECPase 确实适宜在缺氧发酵状态下被利用于降解养殖池塘底泥中的有机残余物, 促进水体生态的良性循环。

然而该实验过程中提取、纯化 ECPase 的方法未尽完善, 所以获得的纯化 ECPase 的量也较少, 当菌悬液浓度为 2.8×10^8 CFU/mL, 冻干质量为 48.96 mg/mL 时, 所纯化得到的胞外产物的蛋白含量仅为 15.46 μ g/mL。由于目前国内外对芽孢杆菌胞外酶的研究多集中于其应用性方面的研究, 而对其理化特性方面的系统研究却鲜见报道, 因此有关地衣芽孢杆菌所产生胞外产物的其他更详尽的信息, 还有待更进一步的研究。

参考文献:

- [1] Zhang Q, Li Z J, Chen K D. The effects of microbiological compound on ecological factors in culture water[J]. *J Shanghai Fisheries university*, 1999, **8**: 43—47[张庆, 李卓佳, 陈康德. 复合微生物对水体生态因子的影响. 上海水产大学学报, 1999, **8**: 43—47]
- [2] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture[J]. *Aquaculture*, 1999, **160**: 177—203
- [3] Pinar calik, Esra Bilir, G zide calik, *et al.* Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002, **31**: 685—697
- [4] Maitin V, Kavitha R, Umesh-Kumar S. Properties of an extracellular amylase purified from a *Bacillus* species[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2001, **17**: 823—826
- [5] Mulalo B N, Hugh George P, Andr van T, *et al.* Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipase[J]. *Enzyme and Microbial Technology*. 2001, **28**: 705—712
- [6] Sogard H, Demark T S. Microbials for feed beyond lactic acid bacteria[J]. *Feed International*, 1990, **11**(4): 32—38
- [7] Guo X H. The basis and application of probiotics[M]. Beijing: Beijing Science and Technology Press. 2002, 32—34 [郭兴华. 益生菌基础与应用. 北京: 北京科学技术出版社. 2002, 32—34]
- [8] Chen X G. Study on vaccines against *Vibrio harveyi* in estuary cod (*Epinephelus coioides*) [D]. Master papers of Shanghai Fisheries university, 2003, 31—33 [陈献稿. 斜带石斑鱼哈氏弧菌疫苗研究 [D]. 上海水产大学硕士学位论文, 2003, 31—33]
- [9] Li H R, Chen H Q, Lu C P. Purification and characterization of extracellular protease ECPase54 from *Aeromonas hydrophila* [J]. *J Nanjing Agriculture University*. 1996, **19**(3): 88—94 [李焕荣, 陈怀青, 陆承平. 嗜水气单胞菌胞外蛋白酶 ECPase54 的纯化及特性分析. 南京农业大学学报, 1996, **19**(3): 88—94]
- [10] Allan B J, Stevenson R M W. Extracellular virulence factors of *a* in fish infections [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1981, **27**: 1114—1122
- [11] Li H R. Selection, inhibitory activities and application in culture of *Penaeus japonicus* of marine probiotics [D]. Doctor papers of Ocean University of Qingdao, 2001, 48—66 [李会荣. 海洋有益菌的筛选、抑菌作用及其在日本对虾养殖中的应用. 青岛海洋大学博士学位论文, 2001, 48—66]
- [12] Wellington C A N, Meire L L M. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. [J]. *Brazilian journal of microbiology*, 2004, **35**: 91—96
- [13] Mi Z Q, Xie J, Pan B D, *et al.* Relationship among the phytoplankton, physicochemical factors and shrimp disease in intensive shrimp farming pond[J]. *J Shanghai Fisheries university*, 1999, **8**(4): 304—308 [米振琴, 谢骏, 潘德博, 等. 精养虾池浮游植物、理化因子与虾病的关系. 上海水产大学学报, 1999, **8**(4): 304—308]
- [14] Ding X, Li Z J, Chen Y Q, *et al.* Effects of probiotics on growth and activities of digestive enzymes of *Penaeus vannamei* [J]. *J Fishery Sciences of China*, 2004, **11**(6): 581—585 [丁贤, 李卓佳, 陈永青等. 芽孢杆菌对凡纳对虾生长和消化酶活性的影响. 中国水产科学, 2004, **11**(6): 581—585]
- [15] Huang X H, Li C L, Zheng L, *et al.* Effects of the immobilized microalgae on the Quantity dynamics of *Vibrio* in the Shrimp ponds[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(5): 684—688 [黄翔鹤, 李长玲, 郑莲, 等. 固定化微藻对虾池弧菌数量动态的影响. 水生生物学报, 2005, **29**(5): 684—688]
- [16] Huang Xianghu, Li Changling, Liu Chuwu, *et al.* Studies on two microalgae improving environment of shrimp pond and strengthening anti-disease ability of *Penaeus vannamei* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26**(4): 342—347 [黄翔鹤, 李长玲, 刘楚吾, 等. 两种微藻改善虾池环境增强凡纳对虾抗病力的研究. 水生生物学报, 2002, **26**(4): 342—347]
- [17] Qi Z, Yang J P. Application of microbiological preparation and microalgae in aquaculture [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(1): 85—89 [祁真, 杨京平. 几种微生物制剂和微藻在水产养殖中的应用. 水生生物学报, 2004, **28**(1): 85—89]

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR
PROTEASE OF *BACILLUS LICHENIFORMIS*

CAO Y- Cheng^{1,2}, LI Zhuo-Jia¹, WU Zao-He² and FENG Juan¹

(1. South China Sea Fisheries Institute, Guangzhou 510300; 2. Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524000)

Abstract:The research of *Bacillus* as a kind of probiotic for aquatic animals is increasing with the demand for environment-friendly aquaculture, like biocontrol when the treatment is antagonistic to pathogens or bioremediation when water quality is improved. The *Bacillus licheniformis* strain De isolated from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultural ponds can produce many kinds of extracellular enzyme, moreover, the activity of extracellular protease is very high. Therefore, the study was carried out to collect its extracellular protease and the physicochemical characters of the enzyme were investigated. The extracellular protease of the strain De was collected followed the semipermeable membrane method and was purified followed a four-step purification procedure, including ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-100 gel filtration chromatography, anion-exchange chromatography on DEAE-cellulose and polyacrylamide gel electrophoresis. The activities of extracellular protease was tested by the Azocasein digestion method. As results showed that extracellular protease secreted by strain De obtained a higher enzymatic activity when it was cultivated 12—18h at 30 °C and pH 7.4—8.2. Three predominant protein of the extracellular products BLP1, BLP2, BLP3 were obtained, whose molecular mass measured by polyacrylamide gel electrophoresis respectively were 66.2KD, 31.0KD and rough 20.1KD. The protein content of purified extracellular protease was 0.773μg/mL, comparatively, its purified protein recovery rate was 11.66%. Moreover, the optimum pH and temperature of the extracellular protease was found to be 7.8 and 45—65 °C. The extracellular protease is thermophilic, since full biological activity is retained after heating at 100 °C for 30min. Enzyme testing for inhibition of the extracellular protease indicated that only EDTA, Cu²⁺, Co²⁺ and Mg²⁺ can inhibit enzymatic activity, but PMSF, Fe³⁺, Mn²⁺, Ba²⁺, Ca²⁺ can not, and Zn²⁺ can inhibit enzymatic activity to some extent.

Key words: *Bacillus licheniformis*; Extracellular proteases; Purification; Characterization