

极端微生物产碱性蛋白酶菌株的筛选及发酵条件研究*

张锐 曾润颖*

(国家海洋局第三海洋研究所海洋生物工程重点实验室 厦门 361005)

摘要:从深海的38份水样和泥样中筛选到一株产蛋白酶的菌株DY-A,其最适生长温度为10℃,能适应较大范围的pH值和盐度。此菌株只在酵母膏存在的情况下产酶,不利用单一氮源,最适产酶条件为:pH10.0,10℃,接种量0.5%,200r/min摇床培养48~72h。粗酶液的最适作用温度为40℃,最适pH值为10,在pH9~12内稳定,是一碱性蛋白酶。

关键词:极端微生物,嗜冷菌,碱性低温蛋白酶,发酵条件

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)04-0005-05

ISOLATION OF A DEEP-SEA STRAIN THAT PRODUCES ALKALINE PROTEASE AND STUDIES ON ITS FERMENTATION CONDITION

ZHANG Rui ZENG Run-Ying

(Key laboratory of Marine Biotechnology, The Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005)

Abstract: From 38 pieces of deep-sea samples, a strain, DY-A, which produces protease was isolated. It can grow at a wide range of pH and salt concentration and best at 10℃. The strain produced maximum protease activity after growth at 10℃, initial pH 10.0 and inoculation volume 0.5% for 48~72h on a shaker by speed of 200r/min. The optimum pH and temperature for the protease activity production are pH 10.0 and 40℃. The enzyme is alkaline protease. Some other properties of the strain and the protease were discussed in detail.

Key words: Extremophile, Psychrophile, Alkaline protease, Fermentation condition

蛋白酶是一种应用很广泛的工业用酶,它在制革、纺织、洗涤、医药和食品等行业中有重要的地位^[1]。有关蛋白酶的研究也已经有了悠久的历史^[2],但对深海极端微生物产蛋白酶的研究却鲜有报道。深海微生物处于极端的物理、化学和生态环境中,经过长期的自然选择,它们形成了极为特殊的生理结构和代谢机制,同时还产生了许多具有特殊性质的生物活性物质^[3]。由于深海极端微生物采样、培养的困难等多种因素的影响,国内外对极端微生物研究还处于起步阶段。所以,对深海极端微生物及其所产活性物质的研究有极为重要的理论意义和实践意义。我们从水深4000~6000m的大洋深海样品中筛选到11株具有较强蛋白酶活力的菌株,选择编号为DY-A的菌株做进一步的试验。

* 中国大洋矿产资源研究开发协会资助项目 (No. DY95-02-20)

** 通讯联系人

收稿日期:2000-05-22,修回日期:2000-09-26

1 材料与方 法

1.1 样品采集

1997年和1998年由 中国大洋矿产资源研究开发协会的“大洋一号”科学考察船采集泥样及水样共38份。

1.2 培养基

斜面培养基：蛋白胨1g，牛肉膏0.5g，NaCl 0.5g，琼脂1.5g，pH8.5，定容1L。

2216E培养基：蛋白胨0.5g，酵母膏0.1g，自然海水（经过滤后使用）1L，pH8.5。

平皿筛选培养基：酪蛋白1g，酵母膏0.2g，琼脂1.5g，自然海水（经过滤后使用）1L，pH10。

摇瓶发酵培养基：酪蛋白1g，酵母膏0.2g，自然海水（经过滤后使用）1L，pH10。

1.3 菌种分离

按常规菌种稀释分离方法进行分离^[4]。

1.4 蛋白酶活力测定

Folin 试剂显色法^[5]。以1mL酶液在40℃，pH10，每分钟水解酪蛋白产生1 μ g酪氨酸所需的酶量定义一个酶活力单位(u)。

1.5 试剂与仪器

酵母膏(Yeast Extract)为Oxoid公司产品，蛋白胨(Tryptone)为BBI进口分装，酪蛋白(Casein)购自中国医药上海试剂站，低温摇床(4℃~60℃)是NewBrunswick Scientific公司制造，AIC UV-9100型分光光度计购自北京瑞利分析仪器公司。

2 结 果

2.1 产蛋白酶菌株的分离

将采集到的水样稀释，泥样用无菌水浸泡取上清后，涂布在2216E培养基平板上，4℃冰箱培养，挑取单个菌落划线于筛选培养基平板，4℃冰箱培养3~4d，挑取透明圈直径大于1cm的11株菌株纯化，镜检，保种。

2.2 复筛

将初步筛选获得的菌株接入摇瓶发酵培养基中，10℃，200r/min摇床培养48~72h，测定酶活，经反复比较后，选用编号为DY-A的菌株为实验菌株。

DY-A号菌株的采样数据为：站位：ES9803；地理位置：西经145°23.8'，北纬8°22.5'；水深5225m；样品为无结核硅质黏土，颜色较黑，质地较硬；时间：1998年8月22日9时10分。

2.3 DY-A号菌株的细菌学鉴定

2.3.1 形态特征：油镜下细胞呈短杆状，圆端，单个排列。菌体大小为1.2~1.5 μ m \times 0.2~0.3 μ m。平板划线培养3d后菌落呈圆形，直径0.5cm左右，表面光滑有光泽，边缘整齐，稍有隆起，颜色为浅乳白色，半透明，在筛选培养基平板上可产生2cm左右的透明圈。摇瓶中发酵培养，幼龄时呈乳白色，后逐渐变为土黄色，直至红褐色。有较强烈臭味。

2.3.2 生化特性：革兰氏染色为阴性，可在培养平板盐度高达45‰时及pH值为11时生

长。其生长随温度的变化见图1。

由图1可以看出, DY-A号菌株在37℃完全不生长, 30℃及20℃时其生长曲线的稳定期比较短暂, 10℃时其菌体浓度和稳定期维持时间都较为理想, 所以DY-A号菌株为一嗜冷菌^[6]。

2.4 产酶条件试验

2.4.1 碳源试验: 在发酵培养基中加入不同的碳源, 浓度为1%, 于10℃, 200r/min培养72h, 测酶活力, 结果见表1, 菌株DY-A不利用半乳糖和木糖, 虽然对葡萄糖, 淀粉, 蔗糖, 乳糖, 麦芽糖, 果糖和甘露糖有不同程度的利用, 但均无酶活产生, 只有利用酵母膏才可产生较高酶活力。

表1 各种碳源对产酶的影响

碳源	菌体生长	酶活力 (u/mL)
葡萄糖	+	0
淀粉	++	0
蔗糖	++	0
乳糖	+	0
麦芽糖	++	0
半乳糖	-	0
果糖	+	0
甘露糖	+	0
木糖	-	0
酵母膏	+++	55.43

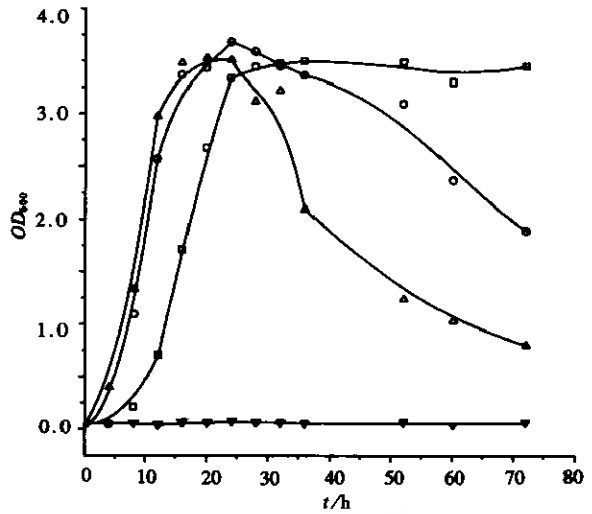


图1 DY-A菌株在不同温度下的生长曲线

—□— 10℃, —○— 20℃, —△— 30℃, —▽— 37℃

2.4.2 氮源试验: 在发酵培养基中加入不同的氮源, 浓度为0.5%, 碳源为淀粉, 10℃, 200r/min培养72h, 测酶活力, 见表2, 菌株DY-A不利用除蛋白胨外的其他氮源, 同时表明, 在没有酵母膏存在的情况下, 菌体利用蛋白胨但不产生蛋白酶。

表2 各种氮源对产酶的影响

氮源	菌体生长	酶活力 (u/mL)
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	0
NH ₄ CL	-	0
KNO ₃	-	0
NH ₄ NO ₃	-	0
尿素	-	0
蛋白胨	++	0

2.4.3 起始pH值对产酶的影响: 配制发酵培养基, 用5%的NaOH调至不同的pH值, 10℃, 200r/min培养48h, 发现, DY-A号菌株的最适产酶起始pH为10.0, 在pH9~11的范围内均有较高酶活, 当pH超过12时, 菌体生长和产酶量明显降低。

2.4.4 培养时间和温度对产酶的影响: 发酵培养基pH值调至10.0, 分别在10℃, 20℃和30℃培养112h, 测酶活, 结果见图2。可见, 30℃时菌体虽然生长但是无酶活产生, 在10℃及20℃时, 其酶活变化趋势和生长曲线的变化趋势基本吻合。

2.4.5 接种量对产酶的影响: 将培养36h的液体种子按不同接种量接入摇瓶发酵培养基, 10℃, 200r/min培养48h, 实验表明, 接种量在0.2%~0.4%时菌株DY-A产酶量最高, 大于1%时产酶能力有明显降低。

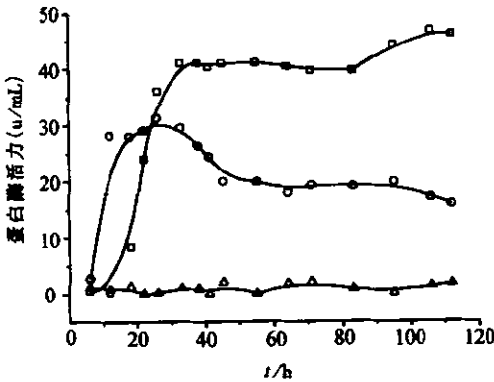


图2 培养时间和温度对产酶的影响
—□—10℃, —○—20℃, —△—30℃

2.4.6 金属离子对产酶的影响: 发酵培养基中加入 0.04% 的各种金属离子, 10℃, 200r/min 培养 48h, 测酶活力, 见表 3, Ca^{2+} , Mg^{2+} 可促进菌株 DY-A 的产酶, Fe^{3+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Na^+ , Li^+ 则对蛋白酶的产生无太大影响; Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 则抑制 DY-A 菌体生长。这与普通碱性蛋白酶产生菌的性质类似^[7]。

2.5 粗酶液的性质

2.5.1 最适温度: 分别在不同温度下进行酶反应, 见图 3。酶的最适温度为 40℃, 在 35℃ ~ 45℃ 内酶活力较高。

表 3 金属离子对产酶的影响

金属离子	菌体生长	酶活力 (u/mL)
空白	++	35.6
Ca^{2+}	++	45.0
Ca^{2+}	-	0
Fe^{3+}	+	38.4
Ba^{2+}	++	38.1
Mg^{2+}	++	44.9
Cu^{2+}	-	0
Mn^{2+}	+	31.7
K^+	++	32.7
Zn^{2+}	-	0
Li^+	++	33.1
Na^+	++	35.7

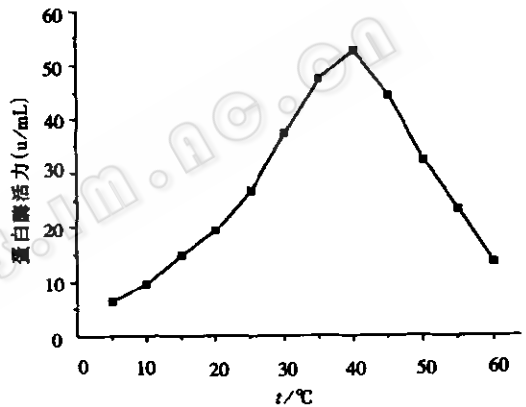


图3 酶的最适温度

2.5.2 热稳定性: 将粗酶液在不同温度的水浴中保温 1.5h, 然后进行酶反应, 结果表明, 此酶在 0 ~ 30℃ 内保温 1.5h 后酶活力稳定, 40℃ 下酶活剩余 54.6%, 50℃ 剩余 16.2%, 60℃ 下则基本丧失全部活力。

2.5.3 最适 pH 值: 用不同 pH 的缓冲液配制底物溶液, 进行酶反应。结果表明, 此蛋白酶的最适 pH 为 10.0, 在 pH9 ~ 12 的碱性范围内均有较高的酶活力。

3 讨论

实验表明: DY-A 号菌株是一株嗜冷, 耐碱的深海极端细菌, 它的一些生理生化特性和产酶的性质与相关文献报道的普通蛋白酶产生菌有明显的不同^[7,8], 从碳源及氮源试验可以推测在酵母膏中有 DY-A 号菌株产蛋白酶的必须因子, 细菌不能利用多种碳源及氮源与其所处的极端环境有关。菌株在 10℃ 时的产酶较高可能是此温度下菌体较多或蛋白酶比较稳定的原因, 但也有可能是温度对蛋白酶的产生有低温诱导或高温抑制的结果。虽然 DY-A 所产生的蛋白酶的最适温度在 40℃, 但是此蛋白酶在低温下的相对酶活却较高。参考国内外的有关蛋白酶的文献^[8,9], 此菌株还可能适于用做研究低温蛋

白酶的出发菌株,而且,DY-A菌株是一深海极端微生物,这在理论研究中具有重要价值。我们计划从DY-A菌株及其所产的碱性蛋白酶出发,利用分子生物学方法,研究极端微生物在生理生化、活性物质产生机理等方面与普通微生物的差别。而且,通过生物工程手段,有希望将其应用于常温洗涤等生产实践。

致谢 国家海洋局第三海洋研究所陈兴群副研究员、林荣澄副研究员帮助采样,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 唐兵,周林峰,陈向东,等. 微生物学报, 2000, 40 (2): 188-192.
- [2] 邱秀宝,高东,王颖达. 微生物学报, 1994, 34 (4): 293-300.
- [3] Brown J R, Donlitle W F. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, 61: 436-502.
- [4] 范秀容,李广武,沈萍. 微生物学实验. 北京:高等教育出版社, 1996.
- [5] 陈曾婵,刘兢,罗丹. 生物化学实验. 合肥:中国科技大学出版社, 1994.
- [6] 李广武,郑从义,唐兵. 低温生物学. 长沙:湖南科学技术出版社, 1998.
- [7] 郑淑敏,余茂效. 微生物学报, 1988, 28 (3): 249-256.
- [8] Hoebino T, Ishizaki K, Sakamoto T, et al. *Letter in Applied Microbiology*, 1997, 25: 70-72.
- [9] 邱秀宝,程秀兰,袁影. 微生物学通报, 1988, 15 (3): 101-104.
- [10] Feller G, Lebassy O, Genday C. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 1163-1165.