

海洋低温蛋白酶菌株选育及发酵培养基的研究 (I)

迟乃玉^{1,2} 张庆芳¹ 王晓辉³ 窦少华¹ 郑学仿^{1,2}

(大连大学生物工程学院 大连 116622)¹ (大连大学生物有机化学重点实验室 大连 116622)²
(沈阳农业大学生物技术学院 沈阳 110161)³

摘要: 以渤海和黄海分离出 400 多株在低温条件下生长良好的菌株为出发菌株, 利用常规筛选方法选出 2 株低温蛋白酶产生菌 (*Pseudomonas alcaligenes*)。经 UV、DES、NTG、EMS、LiCl 单独及复合诱变, 选育出一株 (Pa040523) 蛋白酶高产突变株。通过单因素实验, 确定了 Pa040523 菌株蛋白酶发酵培养基为: 玉米淀粉糖 1.8%, 尿素 0.6%, 磷酸氢二钾 0.6%, 磷酸二氢钾 0.3%。该突变株低温蛋白酶产量为 940.8 U/mg。

关键词: *Pseudomonas alcaligenes*, 低温蛋白酶, 选育

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2006) 01-0114-04

The Screening of the Marine Low Temperature Acid Protease Strain from *Pseudomonas* and Its Optimal Fermentation Medium (I)

CHI Nai-Yu^{1,2} ZHANG Qing-Fang¹ WHANG Xiao-Hui³ DOU Shao-Hua¹ ZHENG Xue-Fang^{1,2}

(College of Bioengineering, Dalian University, Dalian 116622)¹

(Key Laboratory of Bio-organic Chemistry, Dalian University, Dalian 116622)²

(College of Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)³

Abstract: Two Marine low temperature acid protease producing strains were obtained from more than 400 *Pseudomonas*, which isolated from marine. A marine low temperature acid protease producing mutant (Pa040523) was bred through multiple mutagenesis (UV, DES and NTG etc). Through orthogonal experiment, the optimal condition was given for producing marine low temperature acid protease of Pa040523. The suitable medium was that corn syrup, 1.8%; urea, 0.6%; K₂HPO₄, 0.6%; KH₂PO₄, 0.3%. The production of marine low temperature acid protease was 940.8 U/mg.

Key words: *Pseudomonas alcaligenes*, Marine low temperature acid protease, Screening

海洋是生命的起源, 占地球总面积的 70%, 具有高盐、高压、低温、低光照、寡营养等特点。90% 的海水平均温度为 5℃ 或更低, 深海的温度一般为 3℃ ± 1℃, 海洋是世界上最大冷藏库。由海洋嗜冷菌和海洋耐冷菌产生的低温酶具有以下 3 个方面生物学特性: ①低温高催化效率; ②高效结构柔顺性; ③热不稳定性。使其在应用上比中温酶、高温酶更有优势; 在农业、环境、食品加工、添加剂等领域蕴藏巨大的应用潜力。据推测海洋微生物可达 0.1 ~ 2.0 亿种, 但被人们认识的还不足 1%, 由于海洋低温酶分布广泛性、生物学多样性和广泛应用性已经成为 21 世纪世界各国研究的热点, 英、美、法、日等国海洋低温酶的研究已经取得长足发展, 而我国有关低温酶的研究起步较晚、相关的研究报道较少^[1]。本文是针对渤海和黄海分布的微生物为研究对象, 意在开发海洋低温微生物酶制剂, 本文就海洋低温蛋白酶生产菌株选育及最适发酵培养基方面的研究结果作以报道。

1 材料与方法

1.1 菌种

9株产碱假单胞菌 (*Pseudomonas alcaligenes*) 由渤海和黄海分离, 大连大学生物工程学院保存。

1.2 培养基和培养方法

1.2.1 斜面培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基。

1.2.2 种子培养基: 葡萄糖 11g, 尿素 4g, 磷酸氢二钾 1g, 玉米浆 26g, 定容至 1L, pH 自然。

1.2.3 发酵培养基: 玉米淀粉糖 18g, 尿素 6g, 磷酸氢二钾 6g, 磷酸二氢钾 3g, 定容至 1L, pH 自然。

1.2.4 培养方法: 在 100 mL 三角瓶中, 装入 30 mL 种子培养基, 接入斜面菌种, 10℃ 培养 48 h, 作为液体种子。在 500 mL 三角瓶中, 装入 120 mL 发酵产蛋白酶的培养基, 10℃ 培养 2 d, 取培养液 4,000 r/min 离心, 上清液即为蛋白酶粗酶液, 测定蛋白酶活性。

1.3 分析方法

1.3.1 蛋白酶活性测定方法: Folin-酚法测定酶活。

1.3.2 生物量测定: 100 mL 发酵液, 4,000 r/min 离心 20 min, 蒸馏水清洗 2 次, 60℃ 烘干, 称重。

2 结果与讨论

2.1 菌种分离

将样品用灭菌陈海水逐级稀释, 涂平板, 分离得到 400 多菌株, 经明胶琼脂平板初筛, 蛋白酶发酵复筛, 选出 9 株具有产生蛋白酶能力的菌株, 经初步鉴定, 为产碱假单胞菌 (*Pseudomonas alcaligenes*), 其中有 2 株产蛋白酶能力相对较高, 且稳定性好, (见表 1)。因此, 以 03167 和 03208 为诱变的出发菌株。

表 1 低温蛋白酶产生菌初筛

菌株	03108	03167	03197	03208	03232	03277	03396	03403	03417
蛋白酶活性 (U/mg)	9.5	128.0	6.5	109.0	4.8	7.3	11.2	3.9	55.6

2.2 低温蛋白酶产生菌选育谱系

以 03167 和 03208 菌株为诱变的出发菌株, 经物理 (UV), 化学 (DES、NTG、EMS、LiCl) 及复合诱变, 选育出蛋白酶产生能力达 694 U/mg 的高产菌株 Pa040523。

从图 1 可以看出, Pa040523 突变株较出发菌株 (03167 和 03208) 产低温蛋白酶能力分别增加了 5.42 倍和 6.36 倍。

2.3 Pa040523 菌株产低温蛋白酶遗传稳定性

将 Pa040523 菌株连续进行 13 代传代, 每间隔一代, 在 500 mL 三角瓶中, 装入 100 mL 培养基, 进行低温蛋白酶发酵产酶实际测定, 结果见图 2。

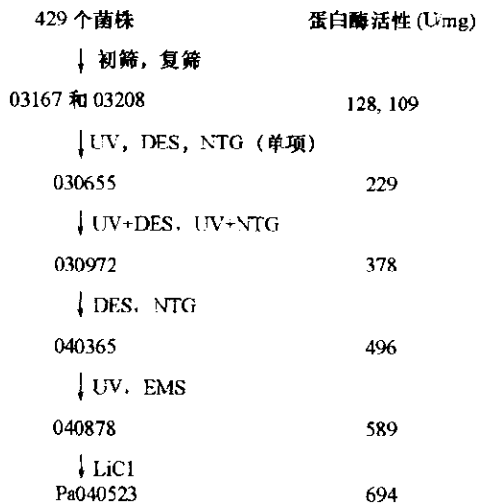


图 1 低温蛋白酶产生菌选育谱系

实验结果表明(图2), Pa040523 菌株产低温蛋白酶遗传性能是稳定的。

2.4 碳源对 Pa040523 菌株低温蛋白酶产量的影响

Pa040523 菌株低温蛋白酶发酵, 控制玉米淀粉糖含量, 实验结果见图3。

由图3可以看出, 玉米淀粉糖用量对 Pa040523 突变株酶产量影响较大, 当发酵液中玉米淀粉糖含量达到 1.8% 时, 酶产量达到 728.70 U/mg。因此, Pa040523 菌株低温蛋白酶发酵玉米淀粉糖最适用量为 1.8%。

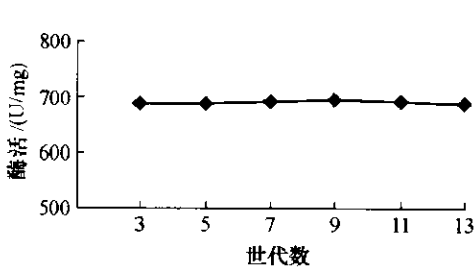


图2 Pa040523 产酶遗传稳定性

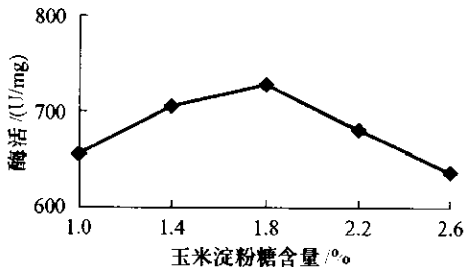


图3 碳源对 Pa040523 菌株酶产量的影响

2.5 氮源对 Pa040523 菌株低温蛋白酶产量的影响

碳源含量为 1.8% 时, 控制尿素含量, Pa040523 低温蛋白酶液体发酵, 结果见图4。实验结果表明, 当尿素含量达到 0.6% 时, 酶产量达到最大值 803.4 U/mg; 之后尿素含量再增加, 酶产量开始下降, 这是由于碳氮比例失调所致。因此, 确定 Pa040523 低温蛋白酶液体发酵尿素加入量为 0.6%。

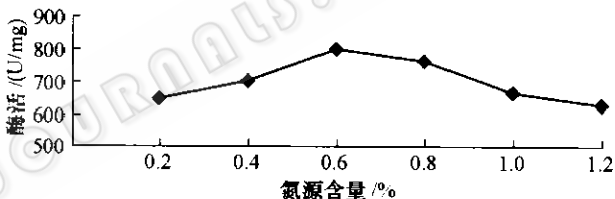


图4 氮源对 Pa040523 突变株产酶的影响

2.6 磷酸氢二钾对 Pa040523 菌株低温蛋白酶产量的影响

在碳源玉米淀粉糖含量为 1.8%、氮源尿素含量为 0.6% 的低温酶液体发酵培养基中, 控制磷酸氢二钾含量 Pa040523 低温酶液体发酵, 结果见图5。

实验结果表明, 磷酸氢二钾含量达到 0.6% 时, Pa040523 菌株酶产量达到最大值 866.4 U/mg。因此, Pa040523 低温酶液体发酵磷酸氢二钾最适添加量为 0.6%。

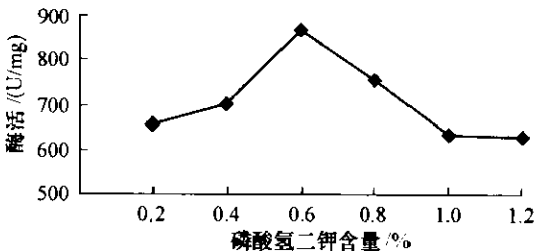


图5 磷酸氢二钾对 Pa040523 菌株酶产量的影响

2.7 磷酸二氢钾对 Pa040523 菌株低温蛋白酶产量的影响

在控制氮源、碳源、磷酸氢二钾浓度为最优的情况下,调整磷酸二氢钾在发酵培养基中的不同含量进行 Pa040523 菌株低温蛋白酶发酵,实验结果见图6。

实验结果表明,0.3%的磷酸二氢钾含量时,Pa040523 菌株低温酶发酵产量达到最大值 940.8 U/mg。因此,Pa040523 菌株低温蛋白酶发酵磷酸二氢钾添加量为 0.3%。

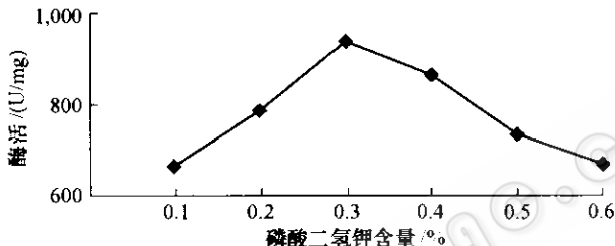


图6 磷酸二氢钾对 Pa040523 菌株酶产量的影响

3 讨论

海洋低温酶的研究已经引起世界各国学者的高度重视,低温蛋白酶研究涉及到的菌种主要有: *Pseudom*, *Bacillus* 和 *Flavobacterium* 等,而且主要倾向于低温碱性蛋白酶和低温中性蛋白酶的研究,有关低温酸性蛋白酶研究较少^[2-4]。本文报道的是渤海分离到的低温蛋白酶产生菌 Pa040523,是一株假单胞菌,产生的低温蛋白酶初步鉴定为酸性蛋白酶,是一株很有研究价值和应用潜力的菌株。在上述研究的基础上,又对 Pa040523 菌株低温蛋白酶发酵的最适 pH、温度、时间、接种量等因素进行了研究,建立了 Pa040523 菌株低温蛋白酶发酵的最适条件,在最适条件下进行了 50 L 放大实验,拟在另文中报道。

参考文献

- [1] 孙 谡. 海洋水产研究, 2001, 21 (4): 1~10.
- [2] Davail S. J Biol Chem, 1994, 269 (26): 17448~17453.
- [3] Kamata Y. J Jpn Soc Food Sci Technol, 1992, 39: 102~105.
- [4] Vazquez S C. Polar Bio, 1995, 15 (2): 131~135.