

嗜碱性芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究

1. 菌种分离、筛选及发酵条件的研究

邱秀宝 程秀兰 袁影

(中国科学院微生物研究所,北京)

摘要 从38份土样中筛选到一株嗜碱性短小芽孢杆菌 R 115,能在 pH 10 以上的环境中生长,并在 pH 10 条件下产生较高的碱性蛋白酶。酶反应的最适 pH 为 10.5,最适温度 45℃;在 pH 12 条件下最适温度为 28℃。

关键词 嗜碱性;蛋白酶,短小芽孢杆菌

碱性蛋白酶的研究已有很久的历史,但对嗜碱性芽孢杆菌产生的碱性蛋白酶至今未见报道。据文献记载^[1-3]60年代初曾有人研究过在常温下产生的碱性蛋白酶。1981年 NOVO 研究所 Nielosen 报道一株枯草杆菌碱性蛋白酶,在常温下测得的蛋白酶活力比地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶活力高^[4],但均非嗜碱性菌所产生。本试验室获得的嗜碱性芽孢杆菌可以在 pH 11—11.5 条件下生长。这种特殊微生物产生的酶可应用于常温洗涤、常温染色等方面。

材料与方 法

(一) 土样来源

广西 25 份,武汉 6 份,山东 4 份,广东 3 份,共计 38 份。

(二) 培养基

1. 菌种保藏转代培养基(%) : 蛋白胨 1,牛肉膏 0.5, NaCl 0.5, 琼脂 1.5, pH 7.2。

2. 平皿分离培养基(%) : 脱脂奶粉 5,淀粉 1,蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.5, KH_2PO_4 0.1, MgSO_4 0.02, 琼脂 1.5, pH 9.0。

3. 摇瓶发酵培养基(%) : 蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.5, 淀粉 1, 牛肉膏 1, KH_2PO_4 0.1, MgSO_4 0.02, pH 9.2

(三) 菌种分离

常规土壤稀释分离法。

(四) 优良菌种筛选

将菌种分别接入摇瓶液体培养基(用 2.5 ×

20cm 大试管分装,每支装 8 ml), 210 rpm 摇床培养(30℃) 48 小时。用 Folin 法和血红蛋白平皿法测定蛋白酶活力。

(五) 酶活力测定

1. Folin 试剂显色法^[5], 28℃ 下测定。

2. 血红蛋白平皿测水解圈法: 用 0.05 M pH 10.5 硼砂-NaOH 缓冲液配制 1% 血红蛋白和 1% 琼脂做成平皿,用 0.5 cm 直径的圆形滤纸片沾菌液,贴在平皿上,每个平皿贴 6 个。28—30℃ 培养 48 小时。观察每个样品的水解圈,用尺量其直径。挑出圈大的菌落,接入斜面保存。

(六) 菌体生长

将发酵液用蒸馏水稀释 100 倍,在 72 型分光光度计上 500 nm 测透光度。

(七) 试剂来源

可溶性淀粉为浙江省菱湖淀粉厂产品;酵母膏为上海酵厂产品;蛋白胨, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为北京红星化工厂产品;琼脂为青岛海洋渔业公司水产品加工厂产品;淡奶粉为北京市牛奶公司西郊乳品厂产品;牛碳氧血红蛋白为上海东风试剂厂产品。

结 果

(一) 菌种分离

由于样品分离采用了专一性底物平板分离

袁执乾同志曾参加大量菌种分离工作,蔡妙英同志帮助鉴定菌种,特此一并致谢。

法, 所以从第一步分离中就筛去了大量不产碱性蛋白酶的菌落。从 38 份土样中分离到 339 株产碱性蛋白酶菌种, 其中霉菌 10 株。

(二) 初筛结果

339 株菌种分别在发酵培养基中培养后, 在 28℃ 下用血红蛋白平皿法测水解圈大小, 选出产蛋白酶活力高的菌种, 其中水解圈直径在 2.4cm 以上的有 24 株。结果见表 1。

表 1 产碱性蛋白酶 (28℃ 条件下) 菌株初筛结果

水解圈直径 (cm)	株数	比例 (%)
2.4—2.5	24	7.1
2.0—2.3	43	12.7
1.5—2.0	71	20.9
1.5 以下	201	59.3

(三) 复筛结果

将初筛获得的 133 株菌进行摇床培养反复多次比较, 最后有 14 株产酶活力稳定, 而且活力较高, 其中 115 号菌活力最高, 在 28℃ 下测定活力达 500 u/ml 以上, 结果见表 2。

表 2 产碱性蛋白酶菌种复筛结果

菌株号	来源	生长 (500nm) 透光度 (%)	透明圈 (cm)	酶活力 (u/ml)
51	武汉	41.4	2.3	155.1
61	武汉	7.3	2.2	215.0
63	武汉	20.8	1.3	49.15
95	广西	6.9	2.3	325.1
98	武汉	7.1	2.3	328.3
102	广西	21.7	1.3	151.3
106	广西	28.7	2.1	206.1
115	广西	25.2	2.3	506.9
122	广西	31.5	1.7	206.1
135	广西	21.6	2.1	145.9
179	广西	19.6	1.9	44.8
182	广西	30.9	1.8	81.2
186	广西	22.3	1.5	1.1
296	广东	14.4	2.2	186.9

(四) 115 号菌株细菌学鉴定^[6-7]

1. 形态特征: 革兰氏阳性, 细胞杆状, 圆端, 单个排列。营养体大小为 0.6—0.7 × 1.2—1.6 μm。孢子中生, 椭圆, 无荚膜。

2. 生理特征: 培养液中生长均一, 长厚的菌膜, 混浊, 有沉落物产生。有 V. P 反应。不

水解淀粉。在 7% NaCl 中生长。不作用亚硝酸盐。在 pH 10—11 中能生长。根据 Bergey 细菌学鉴定手册第 8 版查得为嗜碱性的短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus*。在碱性蛋白酶的生产菌中这类菌未见文献报道, 是新发现的产碱性蛋白酶的菌种。

(五) 最适产酶条件

1. 种龄对产酶的影响: 采用发酵培养基, 每瓶接不同种龄的种子培养液 1 ml, 30℃ 培养 48 小时。结果表明, 种龄以 12 小时为最适 (图 1)。

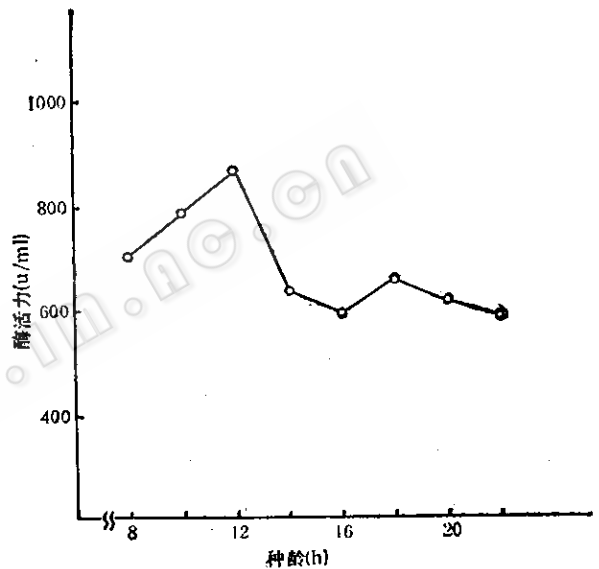


图 1 种龄对产酶的影响

2. 接种量对产酶的影响: 将种龄为 12 小时的种子液, 按不同接种量接入摇瓶培养基, 30℃ 摇床培养 48 小时。结果表明, 以 1% 接种量为最好; 0.5—4% 之间虽有差别但差别不大。但接种量超过 4% 酶产量显著下降 (图 2)。

3. pH 对产酶的影响: 将培养基调节成 6 种不同 pH 值, 按种龄 12 小时接种量为 0.8% 接入不同 pH 摇瓶, 然后在 30℃ 下培养 48 小时。结果表明, pH 10 最好; 在 pH 11 情况下, 仍能生长并产酶 (图 3)。

4. 培养时间对产酶的影响: 培养 12 小时的种子液按 0.8% 接种量接入摇瓶培养基,

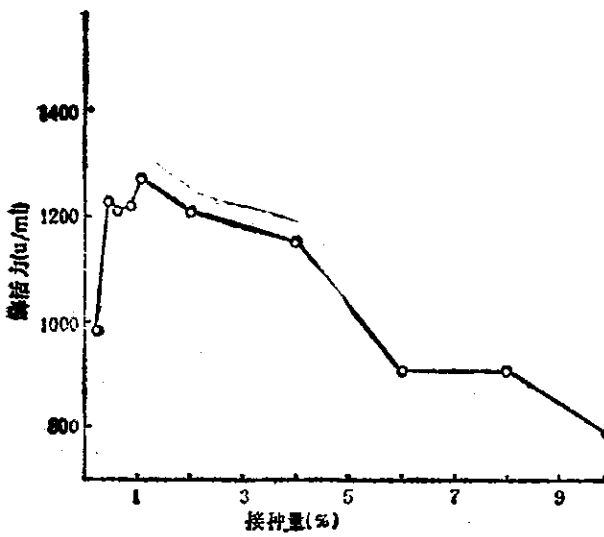


图2 接种量对产酶的影响

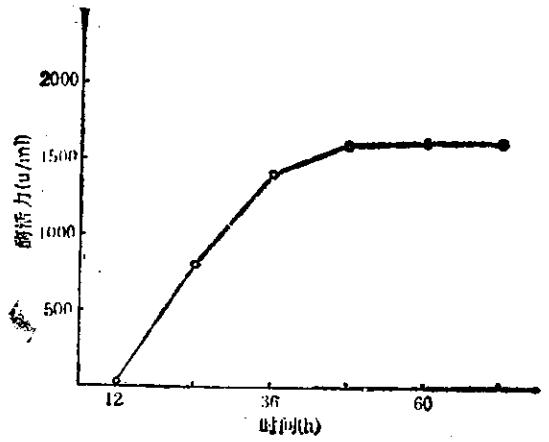


图4 培养时间对产酶的影响

30℃ 摇床培养不同时间。结果表明，培养时间以 48 小时为最好，延长时间酶活也不再增加(图 4)。

表3 培养温度对产酶的影响 (u/ml)

培养时间 (h) \ 培养温度 (°C)	30	35	37	40
44	4400	3760	3080	2640
48	3600	3760	2960	2400
52	3600	3280	3120	2400
56	4480	3360	3240	2320
60	4320	4080	3280	2320
72	4000	3280	3080	2240

表 3 的结果表明，培养温度以 30℃ 为最好，随温度上升产酶量减少。

6. 酶反应温度与 pH 的关系：用 30℃ 摇床培养 52 小时发酵液，在冷冻离心机中 13000 r/min 离心 15 分钟，得酶液，用 pH 10.5 及 12.0 的硼砂—NaOH 缓冲液稀释，分别用相应 pH 值的酪蛋白 (pH 10.5—12) 测活力，结果见表 4。

表4 酶反应的最适温度与 pH 的关系

温度 (°C) \ pH	10	15	20	28	35	40	45	50
10.5	930 u/ml	1360	1800	3120	4320	6240	8480	7200
11.5	700	900	1300	2320	3520	3120	1520	2800
12.0	320	220	660	1500	1200	0	0	0

结果表明，在 pH 10.5 时酶的最适反应温

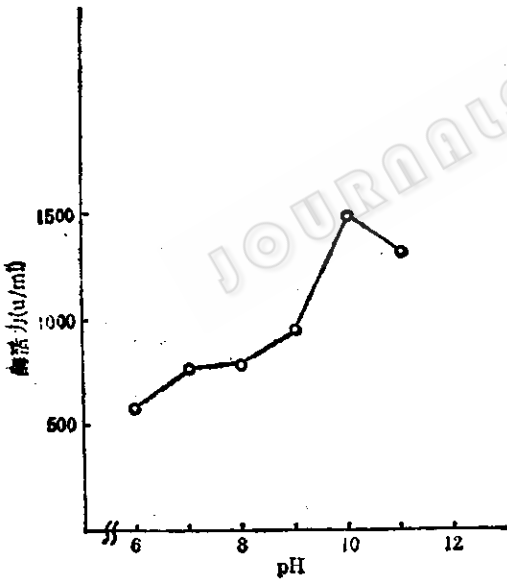


图3 pH 对产酶的影响

5. 培养温度对产酶的影响：将培养 24 小时种子液，接种到摇瓶培养基中，每瓶接 0.25 ml，在不同温度的摇床上 (NBSC 公司产) 350 rpm 培养不同时间，比较培养温度对产酶的影响。结果见表 3。

度为 45℃, 在 pH 12 时酶的最适反应温度为 28℃。这说明, 酶的最适反应温度与 pH 的变化有关, 随着 pH 上升酶的稳定性下降, 对温度的敏感性提高, 所以 pH 的升高, 反应最适温度下降。因此是一种适宜温度低的碱性蛋白酶。日本中岛基雄 1975 年发表的 B-3038 菌株产生的碱性蛋白酶在 pH 10 时最适温度为 27℃, 在 pH 8 时最适温度为 40℃, 与我们的结果相一致, 均属低温碱性蛋白酶。

讨 论

R 115 号菌是从广西桂平糖厂甘蔗渣中分离到的菌株, 在碱性环境中生长良好, 产酶高, 当培养基 pH 升到 11 以上时仍能生长, 属嗜碱性菌。在 pH 10.5 时酶反应最适温度为 45℃, 在 pH 12 时最适温度为 28℃, 是一种低温耐碱的蛋白酶, 可应用于常温洗涤。

由于酶的动力学决定了酶的性质, 因此我们认为, 欲得到一种在低温下反应速度最快, 而在温度升高时反应速度下降的低温蛋白酶菌是很难找到的。但是要找到一株低温菌则较为容易。而低温菌所产生的酶也并非低温酶。至于如何提高低温下酶的活力, 及低温酶的性质等均需作进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Nobuo Kato et al.: *A. B. C.*, 36(7): 1177, 1972.
- [2] Nobuo Kato et al.: *A. B. C.*, 38(1): 103, 1974.
- [3] 中岛基雄等, 特许公报昭和 50 年 5 月 8 日, 11997 号。
- [4] Niclosen M. H. et al.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58(5): 644—649, 1981.
- [5] 邱秀宝, 程秀兰: 微生物学报, 24(1): 66—73, 1984.
- [6] Buchanan, K. E. and N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed. Baltimore, p. 533—534, 1974.
- [7] R. E. 戈登等著(蔡妙英等译): 芽孢杆菌属, 农业出版社, p. 107—108, 47—49, 1983.