

嗜盐性低温海洋细菌碱性蛋白酶的研究

I. 菌株分离和发酵条件

邱秀宝 赵前* 刘辉*

(中国科学院微生物研究所, 北京)

纪伟尚 徐怀恕

(青岛海洋大学海洋生物系, 青岛)

摘要 自海水、海泥和海洋鱼体取样, 经 2216, 培养基和酪蛋白培养基复合培养, 初步获得产蛋白酶活力较高的海洋低温细菌, 并对其进行不同发酵条件的试验, 以了解菌株的生长、产酶和其它环境因子之间的相互关系。本试验证明在 pH 7.0、温度 15—20℃、盐度 30—40‰ 的情况下, 菌株生长并产酶, 培养 48 小时, 产酶最高, 最终 pH 为 8.0—8.5。

关键词 嗜盐细菌; 蛋白酶

有关海洋微生物的研究已非常广泛、深入, 但对其代谢产物及利用方面的报道不多。1972 年 Nabuo Kato 等报道了产蛋白酶海洋细菌的研究^[1-3]。而这方面国内尚未见报道。为了广泛地开发利用海洋生物资源, 我们对青岛市胶州湾海区海洋细菌的产蛋白酶菌株进行了分离、筛选。

材料和方法

(一) 材料

1. 海水样品: 取自青岛市黄岛码头、小青岛码头沿岸。

2. 海泥样品: 取自青岛市黄岛码头, 小青岛沿岸泥滩。

3. 海鱼样品: 在青岛市胶州湾口外锚地张网捕获, 包括以下几种: 青鳞鱼 (*Harengula zunasi*), 小带鱼 (*Trichiurus muticus*); 日本枪乌贼 (*Loligo japonica*); 蛸 (*Octopus sp.*)。

(二) 方法

1. 菌种分离: 以划线法、稀释平板法进行菌株分离、纯化。

2. 培养基: 2216 培养基、酪蛋白平板培养基^[2]。

3. 酶活力测定方法: Folin-酚试剂比色法^[4]。

4. 生长测定: 比浊法。

结果与讨论

(一) 菌种分离与筛选

1986 年 5 月中旬, 共采集样品 61 个, 其中鱼样 25 个, 水样、泥样 10 个, 其它海洋生物样品 26 个。共分离 279 株菌, 其中自鱼样 110 株, 水样、泥样 72 株, 其它样 97 株。经初筛, 得到 26 株产蛋白酶活力较高的菌株, 将这 26 株菌进行摇瓶培养复筛。其中, No. 136, No. 139, No. 141, No. 145 四株菌初、复筛平均活性最高, No. 105, No. 128, No. 145, No. 173 等菌株初、复筛结果较为一致(表 1)。选取 No. 105, No. 141 两株菌进行发酵条件试验。

(二) 发酵条件试验

1. 起始 pH 对产酶的影响: 培养基起始 pH 值 < 6 时, 菌株生长被抑制, 最终 pH 值与起始 pH 值相近。起始 pH 值 > 6 时, 菌株生长正常, 最终 pH 值一般为 8—8.5 左右。起始 pH 值对菌株产蛋白酶活性影响很大(图 1), 起始 pH 为 7 时, 酶活性最高: No. 105 为 208u/ml, No. 141 为 240u/ml。起始 pH 为 6—7 时, 生长最好, 培养后最终 pH 值最大。两株菌测定结果的趋势一致。

2. 盐度对产酶的影响: 盐度变化对菌株生

* 原山东海洋学院海洋生物系 1986 年应届毕业生。

表1 产蛋白酶海洋细菌筛选结果

菌株号 No.	透明圈直径 (cm)			菌株号 No.	透明圈直径 (cm)		
	初筛	复筛	平均值		初筛	复筛	平均值
30	2.7	1.5	2.10	128	2.5	2.0	2.25
31	2.5	1.5	2.00	130	2.5	1.9	2.20
33	2.5	1.8	2.15	131	2.7	1.3	2.00
34	2.9			132	2.7	1.5	2.10
37	2.5	1.7	2.10	134	3.0	1.5	2.25
38	2.5	1.4	1.95	136	3.5	1.7	2.60
69	2.5	1.3	1.90	137	2.7	1.8	2.25
70	2.9	1.6	2.25	139	3.5	1.7	2.60
78	2.6	1.4	2.00	141	3.2	1.6	2.40
79	2.5	1.8	2.15	145	2.5	2.4	2.45
105	2.5	2.0	2.25	146	2.6	1.4	2.00
113	2.7	1.9	2.30	173	2.5	2.2	2.35
121	2.7	1.6	2.15				

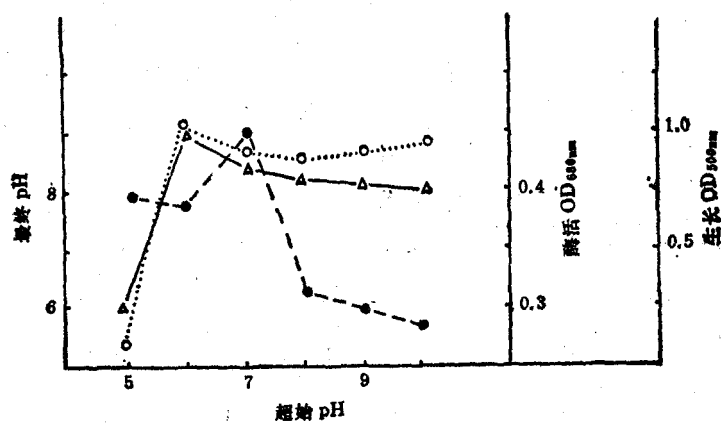


图1 培养基起始 pH 对细菌 No. 105 生长及产酶的影响 (48h)
△最终 pH; ●酶活 OD 值; ○生长 OD 值

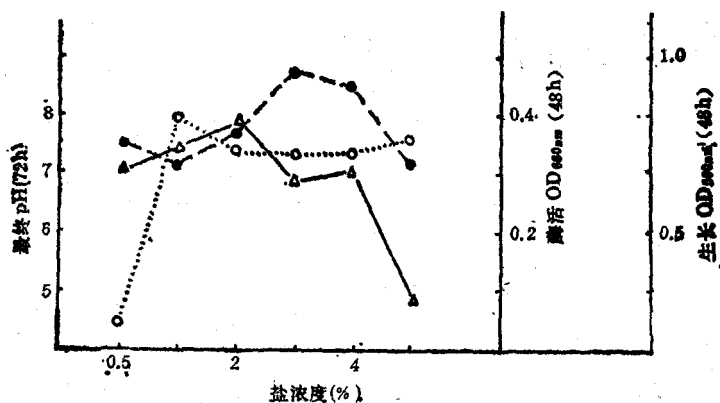


图2 培养基中盐浓度对 No. 105 菌株生长与产酶的影响
△最终 pH 值; ●酶活 OD 值; ○生长 OD 值

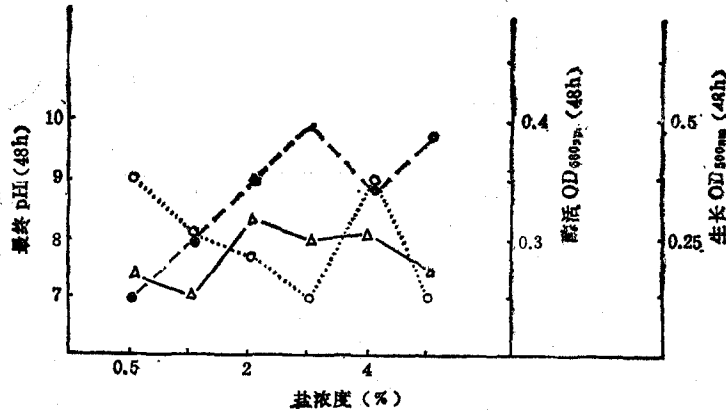


图3 培养基中盐浓度对 No. 141 菌株生长与产酶的影响
△最终 pH 值; ●酶活 OD 值; ○生长 OD 值

长、最终 pH 值和酶活有显著影响。No. 105 在盐度低于 0.5% 时, 生长受抑制, 盐度高时 (>5%) 生长正常(图 2)。No. 141 则在低盐度时(0.5%), 生长正常; 高盐度时(5%), 生长受抑制。盐度为 3% 时, 两株菌酶活性最高 (No. 105 192u/ml, No. 141 110u/ml)。

3. 培养时间对产酶的影响: 培养时间的不同, 对最终 pH 值影响不大, 基本上在 8—8.5 之间, 培养 48 小时时, 酶活性最高 (两株菌均为 160u/ml)。

讨 论

1. 两株菌来源不同 (No. 105 自青鳞鱼样, No. 141 自泥样)。但通过试验可初步断定它

们是同一类产蛋白酶细菌, 其基本性状相似。

2. 菌株易于在中性或偏碱性环境生长。偏酸时, 对生长, 酶活都有抑制作用。

3. 从两株菌对 pH 值变化及盐度变化的适应情况可知, 在接近自然海水的 pH, 盐度条件下, 能够较好地生长和产酶。

参 考 文 献

1. Nobuo Kato et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 36(7):1177—1184, 1972.
2. Nobuo Kato et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 36(7): 1183—1192, 1972.
3. Nobuo Kato et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 38(1): 103—109, 1974.
4. 邱秀宝等: *微生物学报*, 24(1): 66—73, 1984.

全国电子探针定量分析及标准样品应用研讨会

“全国电子探针定量分析及标准样品应用”第二次研讨会于 5 月 23 至 29 日在杭州举行。会议的主要内容为: 探针定量分析方法, 标准样品的制备和使用, 在生物医学、金属、矿物、石油等领域中的应用及国际最新动态。

微束分析技术(包括电子探针)是近代高速发展的科学技术产物, 是一门新兴的学科技术。电子探针即是将聚焦至直径约为 0.1—1 μ m 的电子束轰击样品, 然后用能谱仪或波谱仪分析样品产生的特征 X 射线的能量或波长, 以确定样品的化学成分。电子探针第一次实现了对材料的微区进行原位元素成分定量分析, 而对整个分析科学带来了巨大的影响。

由于近年来电镜生物制样技术及电镜 X 射线显微分析技术的发展, 电子探针在生物试样的定量分析技术应用有了较快的发展。在细胞学、生理学、病理学、细胞化学和卫生学等学科, 目前国内外正进行活跃的研究和应用。

电子探针, X 射线显微分析技术可用于组织细胞、亚细胞结构的元素分析, 也可用于微生物所含元素的微区原位定量分析, 因此在微生物学领域有广阔的应用前景。

(谢家仪 供稿)