

产蛋白酶枯草杆菌的选育及应用研究

I. 菌种筛选及产酶条件初步试验

李传友 张其玖*

(中国科学院微生物研究所, 北京)

摘要 从沟泥等土样中分离筛选到四株蛋白酶高产菌株,进行了产酶条件复筛试验,其中枯草杆菌 N1025 在 45℃ 摇瓶培养 24 小时酶活可达 3400u/ml, 该酶具有良好的脱丝胶性能。此菌培养温度高, 生长周期短, 具有较大的生产潜力。

关键词 枯草杆菌蛋白酶; 蚕丝脱胶

60 年代初为了改进脱丝胶的质量, 我国蛋白酶脱丝胶的研究取得了一些进展^[1,2], 并成功地实现了工业应用。为了进一步提高蛋白酶的质量, 特别是为了适应南方高温的特点, 我们筛选到了一株高产优良菌株——枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) N1025, 它具有适于高温培养、生长时间短、酶产量高、酶制剂质量优良以及酶脱丝胶性能好等优点。

材料与amp;方法

1. 样品: 沟泥等土壤样品。

2. Folin 试剂: 按 Lowry 等人的方法配制^[3]。

3. 酪氨酸(层析纯), 酪蛋白(B. D. H 产品), 其它试剂均为国产分析纯试剂。

4. 3xd 改良斜面培养基及培养方法: Na₂HPO₄ 0.3g, KH₂PO₄ 4.5g, NH₄Cl 1g, 酪素水解蛋白 6.8g, 葡萄糖 12g, 琼脂 24g, 水 1000ml。1kg/cm² 高压蒸汽灭菌 30 分钟, 接种后 37℃ 保温 24 小时。

* 现在单位: 中国科学院生物物理所

5. 筛选培养基及培养方法: 玉米粉 5%、黄豆饼粉 1%, Na_2HPO_4 0.2%, ZnSO_4 0.0005%, 用自来水配制, 自然 pH, 150ml 三角瓶装 30ml, 37°C 摇床培养 36 小时。培养液经离心取上清液即为粗酶液。

6. 酶活测定方法, 根据文献 [4] 略作改变: 0.5% 酪蛋白 2.0ml (含 0.1M pH7.5 磷酸缓冲液) 置 37°C 水浴中预热 5 分钟, 加入稀释 50—120 倍的酶液 1.0ml, 37°C 保温 15 分钟, 加入 10% 三氯乙酸 3.0ml 停止反应。静置 15 分钟, 离心取上清液 1.0ml, 加 0.55M Na_2CO_3 5.0ml, 1N 酸度的 Folin 试剂 1.0ml, 37°C 保温发色 10 分钟, 在 650nm 比色。对照为以水代替酶液平行处理。用酪氨酸 (50—500 μg) 作标准曲线。

酶活单位计算: 以每分钟释放出 1.0 μg 酪氨酸的酶量定义为一个酶活单位 (u)。

$$1\text{ml 酶液的酶活单位} = \frac{nA}{t}$$

n: 酶液稀释倍数

A: 根据比色读数从标准曲线上查到的酪氨酸 μg 数

t: 酶解时间(分)

结 果

(一) 初筛

样品用水适当稀释后, 划线涂抹于含有 1% 酪蛋白的 3xd 改良培养基平皿上, 37°C 培养 24 小时, 培养基表面即长成菌落。将具有透明圈的菌落以稀释法进一步分离, 初选出 N1025、N1039、SH1012 及 yol 四株具有较高酶活性的菌株。

(二) 复筛

1. 培养基不同对比对产酶的影响: 初筛得到四株较高酶活菌株在不同配比的培养基中于 37°C 摇床培养 36 小时, 结果见表 1。

从表 1 看出, N1025 菌以 16、10、9 号培养基的酶活性较高; N1039 菌在 10、14、7、2、1、17 号培养基的酶活性较高; SH1012 菌以 9、8、2、3、10 号培养基的酶活性较高; yol 以 10 号培

表 1 培养基不同对比对产酶的影响

编 号	培 养 基 成 份 (%)					酶 活 性 (u/ml)			
	玉米粉	豆饼粉	山芋粉	玉米胚芽粉	麸 皮	N1025	N1039	SH1012	yol
1	5.0	1.0				120	1157	710	65
2	4.0	2.0				265	1217	1323	652
3	3.0	3.0				550	658	1260	798
4	2.0	4.0				473	108	427	525
5	1.0	5.0				400	60	278	488
6	3.34	0.66				374	1039	548	67
7	5.0	1.0				80	1233	58	40
8	6.67	1.33				60	926	1326	106
9	4.0	2.0				1260	980	1480	486
10	3.0	3.0				1288	1388	1087	840
11			4.0	2.0		380	700	1041	162
12			3.0	3.0		240	860	555	283
13			2.0	4.0		400	1060	775	
14	4.0	2.0			1.0	320	1240	844	208
15	4.0	1.0			2.0	468	1100	405	289
16	3.0	2.0			2.0	1520	1060	278	578
17	4.0			2.0	2.0	1214	1120	185	35

1. 7 号培养基用蒸馏水配制, 并加入 0.05% CaCl_2 、0.05% MgSO_4 , 其余培养基均以自来水配制, 自然 pH, 37°C 摇床培养 36 小时。

2. 9—17 号培养基另加入 0.2% K_2HPO_4 、0.0005% ZnSO_4 , 自然 pH, 37°C 摇床培养 34 小时。

培养基较好,但活性均不如前三者。看来9、10号培养基对这些菌都有较广泛的适应性。根据不同培养时间的预备试验得知,在相同条件下培养,N1025的酶活高峰期比其他三株菌提早10小时以上。N1025菌在16号培养基中活性较高,但培养物极为粘稠,给后工艺带来较大困难。因此,N1025的条件试验大多采用9号培养基。

2. pH对产酶的影响: N1025菌在不同pH的培养基中于37℃培养,测定不同生长期的酶活性,结果见图1。

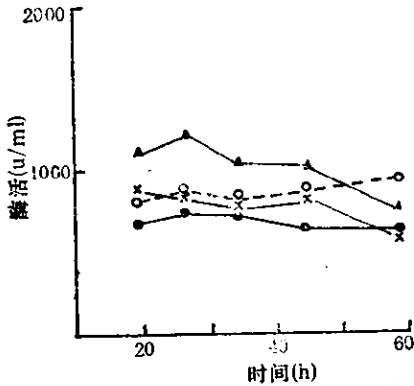


图1 培养基 pH 对产酶的影响

●——● pH6 ○——○ pH7
▲——▲ pH8 ×——× pH9

从图1看出,pH8的培养基较好,培养19小时酶活就达到较高水平,26小时到达产酶高峰期。

3. 温度对 N1025 菌产酶的影响: 提高培

表2 温度对产酶的影响

培养时间 (h)	培养温度	
	37℃	45℃
16	1179	2366
24	1200	3340
36	1260	1911

用9号培养基, pH7.5-8, 摇床培养

表3 N1025 酶的脱丝胶活性

酶 (30u/ml)	炼减率(%)	外观
S114	24.60	白而软,有光泽
N1025	24.75	白而软,有光泽
CK	21.70	不白,硬,无光泽

预处理: 0.1% Na₂CO₃ 80℃ 处理 15 分钟。

酶处理: 酶溶于 0.02M pH7.5 磷酸缓冲液中, 52℃ 反应 60 分钟, 浴比为 1:5。

养温度到 45℃ 可以大幅度地提高酶的产量, 这是 N1025 菌的显著特性之一。

从表2看出,在45℃培养16小时,酶活为37℃培养的2倍;在45℃培养24小时,酶活为37℃培养的2.7倍。曾在500l(投料200l)罐上45℃培养20小时(补料一次),酶活可达5700u/ml。

4. N1025 酶脱蚕丝胶的活性: 经过初步的产酶条件考察,N1025菌具有较大的工业生产潜力。通过脱丝胶试验证明,它具有良好的脱丝胶性能,结果见表3。

从表3看出,N1025酶脱丝胶能力与S114相当^[2]。

讨 论

N1025菌在pH8、45℃培养,16小时就达到较高酶活水平,24小时达到产酶高峰期。酶产量高,生产周期短,利于设备周转及降低成本。通过蚕丝脱胶试验,证明脱胶能力适中,酶脱胶的蚕丝质地柔软、洁白而有光泽。因此,此菌在酶制剂的生产和应用方面,都具有较大的潜力。

参 考 文 献

- [1] 李禄先、邱秀宝: 微生物, 2(6): 267-274, 1960.
- [2] 李禄先等: 微生物学报, 11(2): 174-184, 1965.
- [3] Lowry, O. H. et al.: J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.
- [4] Greenberg, D. M.: Plant Proteolytic Enzymes, in Methods in Enzymology II, p55, 1955.