

嗜冷性海洋微生物产蛋白酶的研究

邱秀宝 李彤 戴宏 袁影

(中国科学院微生物研究所, 北京)

摘要 从 210 株海洋细菌中筛选出 30 株产蛋白酶活力较高的菌株。以 N_1 为出发菌, 用 UV 诱变处理, 获得突变株。其中的 N_{1-35} , 菌株最适生长温度为 20℃; 在 21℃ 下培养 44 小时, 产酶最高。酶反应最适温度为 50℃, 最适 pH 8.0。30℃ 以下酶活稳定。

关键词 嗜低温; 海洋细菌; 蛋白酶

从海水等样品中分离产蛋白酶的细菌, 1972 年国外就有报道, 已将海洋细菌产生的蛋白酶分离纯化并进行了酶性质研究^[1-5]。最近日本学者从海洋中分离出一株产蛋白酶细菌, 且已付诸生产应用。国内至今尚未见到此类报道。作者于 1986 年在青岛、厦门的海水、海泥、海鱼等样品中分离出 210 株产蛋白酶的细菌, 并对这些菌进行了产酶能力复筛。再经紫外线诱变, 筛选到一株酶活性较高的菌株 N_{1-35} 。对此菌株进行了发酵条件及酶学性质的研究。

材料与方 法

(一) 材料

取自青岛、厦门海域的海水、海泥、海鱼等。

(二) 方法

1. 蛋白酶活性的测定

(1) 1ml 酶液加 1ml 2% 的酪蛋白, 分别在两种温度 (20℃、40℃) 水浴中反应 10 分钟, 加 2ml 0.4mol/L 的三氯乙酸终止反应。以死酶样品为对照。过滤后用 Folin 比色法^[6]测定酪蛋白水解物。取 1ml 清液, 加入 5ml 0.4mol/L 的碳酸钠和稀释三倍的 Folin 试剂, 40℃ 水浴保温 10 分钟, 波长 680nm 下比色, 测 OD 值。

(2) 水解酪蛋白平板法: 用蒸馏水配制酪蛋白平板 (1% 干酪素 + 2% 琼脂)。将直径 6mm 的滤纸片蘸取 0.05ml 发酵液贴于平板上培养 48 小时, 倒入 10% 三氯乙酸溶液, 比较水解圈直径大小。

2. 培养基: 液体培养基 2216^[7]; 斜面培养基 2216 加 2% 琼脂。

结 果

(一) 菌种的筛选及育种

1. 初筛: 将菌种接入 2216 培养基, 20℃ 摇床培养 52 小时。将酪蛋白平板分别调至 pH7 和 pH9。用水解酪蛋白平板的方法分别放置

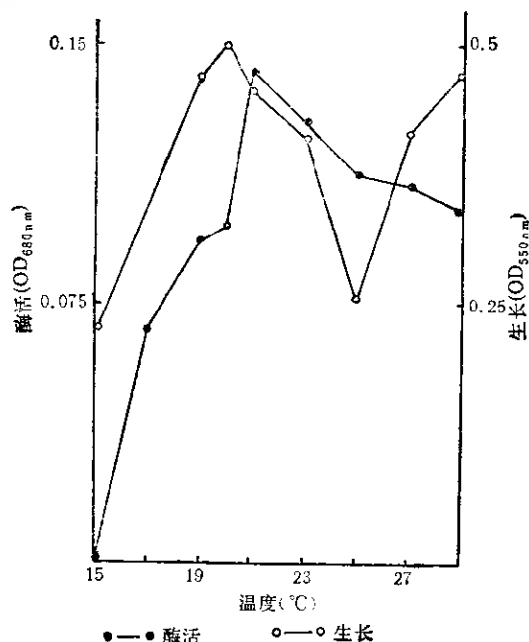


图 1 温度对 N_{1-35} 菌生长及产酶的影响

厦门第三海洋所倪纯治、林燕顺等同志协助采集海洋菌并提供部分菌种, 特此感谢。

20℃ 和 40℃ 培养箱中培养 48 小时, 比较不同温度下中性及碱性蛋白酶的活性(其中 40℃ 测定的样品稀释 3 倍)。

初筛结果表明, 210 株来源不同的海洋低温菌均有产蛋白酶的能力, 但活性高的(水解圈直径 2.0cm 以上)只有 30 株占总数的 14.3%。

2. 复筛: 将上述 30 株菌进行复筛, 方法同初筛。在 20℃ 条件下, pH7 和 pH9 水解圈直径在 2.0—2.5cm 的各有 5 株。40℃、pH7 和 pH9 条件下, 水解圈在 2.0—2.5cm 的分别有 13 株和 10 株。

3. 紫外线诱变育种: 诱变出发菌株 N₁₀。采用紫外线常规诱变方法。诱变后的筛选方法同初筛。从 52 株突变株获得酶活性高的 10 株。其中以 N₁₋₂ 及 N₁₋₃₅ 号菌株为最好。

(二) 发酵条件试验

1. 培养温度对生长及产酶的影响: 以 N₁₋₃₅ 菌为试验菌株, 在不同温度下培养 52 小时, 将发酵液稀释 10 倍, 550nm 下测光密度为生长指标。20℃ 反应 10 分钟, 用 Folin 比色法测酶活力。结果表明, N₁₋₃₅ 号菌在 20℃ 生长最好, 21℃ 产酶活力最高(图 1)。

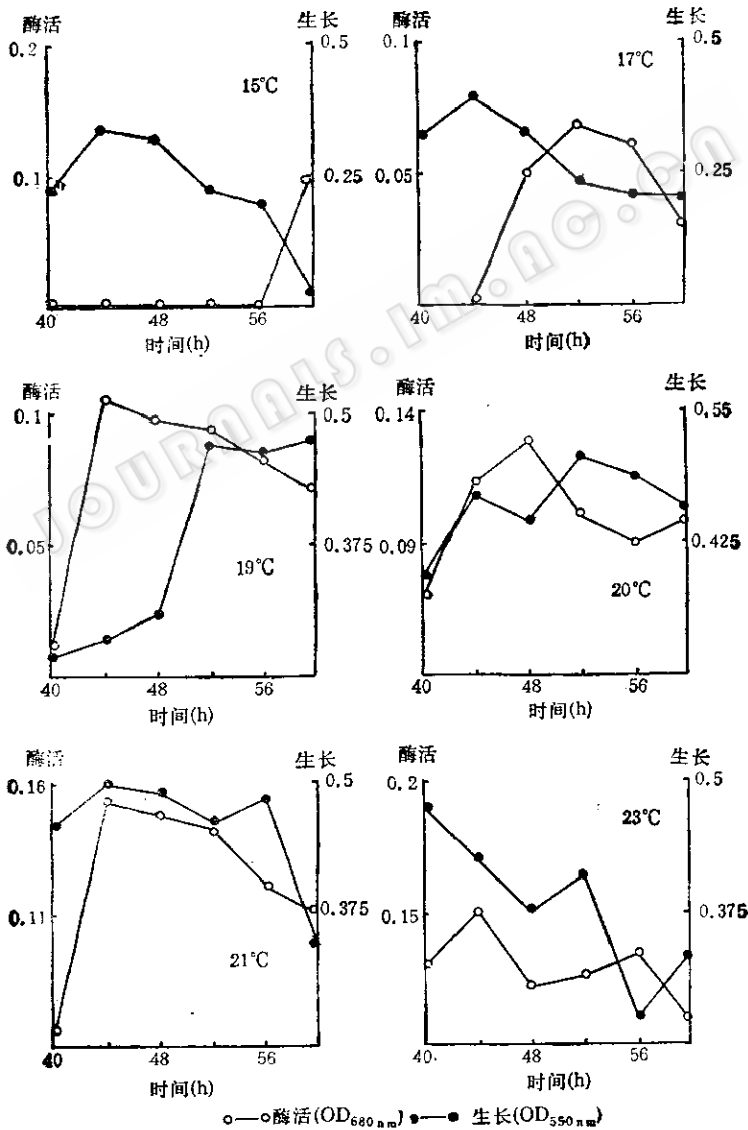


图 2 不同温度下培养时间对生长及产酶的影响

2. 培养时间对生长及产酶的影响: 在不同温度下培养, 产酶和生长是不同步的。温度较低时, 产酶活力达到最高的时间较长, 而温度升高, 达到最高酶活的时间较短(图 2)。

3. 不同氮源对生长及产酶的影响: 含不同氮源的培养基, 20℃ 摇床培养 48 小时, 发酵液稀释 10 倍, 550nm 测生长, Folin 比色法测酶活力。

表 1 不同氮源培养基对生长及产酶的影响

培养基成分	生长 OD _{550nm}	酶活性 OD _{550nm}
5%蛋白胨	0.327	0
5%酵母膏	0.683	0
5%牛肉膏	0.393	0
5%硫酸铵	0.029	0
5%氯化铵	0.015	0
2216	0.228	0.159

前五种培养基添加其它成分均为: 5% 葡萄糖和 0.01% 磷酸铁

表 1 的结果表明, 该菌不能利用无机氮源, 但可以利用有机氮源。其中以酵母膏对菌体生长最有利。但除 2216 培养基以外, 其它氮源不能产酶。

(三) 酶的性质

1. 温度对酶活性的影响: 在不同温度下测酶活性。图 3 结果表明, 酶在 50℃ 的条件下活性达到最高。

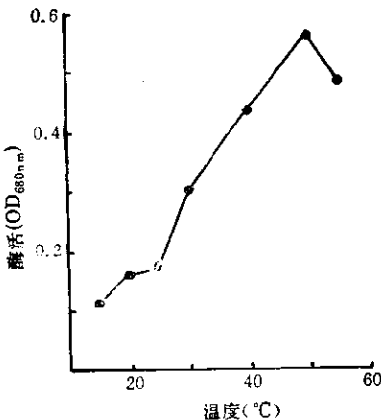


图 3 温度对酶活性的影响

2. 温度对酶稳定性的影响: 20℃摇床培养 52 小时, 在不同的温度中保温不同的时间,

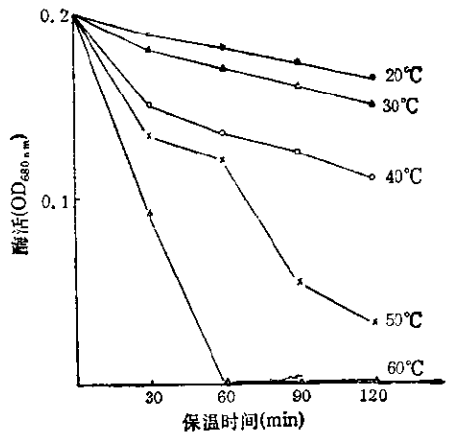


图 4 温度对酶稳定性的影响

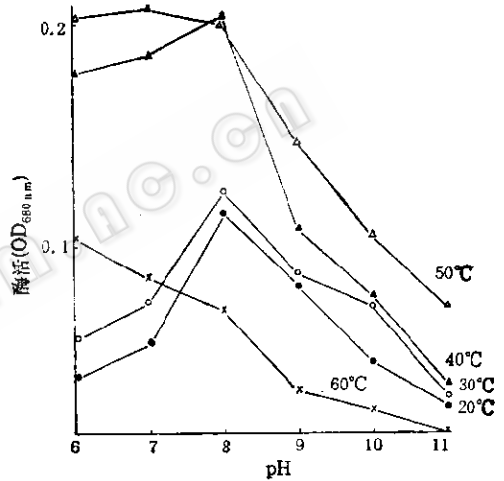


图 5 pH 对酶活性的影响

20℃比色法测活力。从图 4 可以看出, 酶活性随温度的升高和保温时间的延长而降低。

3. pH 对酶活性的影响: 20℃摇床培养 52 小时, 在不同的 pH 条件下用 Folin 比色法测定酶活性。图 5 表明, 在 20、30、40℃ 时, 酶反应最适 pH 值在 8 左右, 随反应温度的升高, 对高 pH 的耐受能力下降。

讨 论

我们所选育的海洋细菌 N₁₋₃₅ 产生的蛋白酶最适反应温度为 50℃, 所产酶在 pH8 的条件下, 20℃ 时的活性约为 40℃ 时的 50%。而从土壤中分离的细菌产的蛋白酶, 在适宜 pH 条件下, 20℃ 时的活性只有 40℃ 时的 25%。由

此认为, 海洋细菌产生的低温碱性蛋白酶的含
量比陆生菌的高。这只是初步观察结果, 有待
于进一步验证。

参 考 文 献

1. Nobou Kato et al: *Agr. Biol. Chem.*, 36(7): 1177—

1184, 1972.

2. Nobou Kato et al: *Agr. Biol. Chem.*, 36(7): 1185—
1192, 1972.

3. Nobou Kato et al: *Agr. Biol. Chem.*, 38(1): 103—
109, 1974.

4. 邱秀宝: 微生物学报, 24(1): 66—73, 1984.

5. 薛廷耀编译: 海洋细菌学, 科学出版社, 北京, 1962.