

海洋低温 BS041208 菌株选育及发酵培养基的研究(I)

迟乃玉^{1,2} 张庆芳¹ 蹇少华¹ 唐 乾^{1,2} 袁玉莲¹

1(大连大学生物工程学院, 大连, 116622) 2(大连大学生物有机化学重点实验室, 大连, 116622)

摘 要 以从渤海和黄海分离出的 400 株在低温条件下生长良好的菌株为出发菌株, 利用常规筛选方法筛选出 2 株低温蛋白酶产生菌 (*Bacillus subtilis*)。经 UV、DES、NTG、EMS、LiCl 单独及复合诱变, 选育出一株 (BS041208) 蛋白酶高产突变株。通过单因素实验, 确定了 BS041208 菌株蛋白酶发酵培养基为: 玉米淀粉糖 0.7%, 豆饼粉 1.6%, K_2HPO_4 0.8%, KH_2PO_4 0.6%。该突变株低温蛋白酶产量为 867.5 U/mg。

关键词 *Bacillus subtilis*, 低温蛋白酶, 选育

海洋是生命的起源, 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℃。由海洋嗜冷菌和海洋耐冷菌产生的低温酶具有以下 3 个方面的生物学特性: 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, 海洋微生物达 0.1~2 亿种, 但被人们认识的还不足 1%。由于海洋低温酶的分布广泛性、生物学多样性和广泛应用性, 它已经成为 21 世纪世界各国研究的热点, 英、美、法、日等国关于海洋低温酶的研究已经取得长足发展, 而我国与此相关的研究则刚起步^[1,2]。文中以渤海和黄海微生物为研究对象, 意在开发海洋低温微生物酶制剂, 文中就海洋低温蛋白酶生产菌株的选育及最适发酵培养基方面的研究结果进行了报道。

1 材料与方法

1.1 菌 种

8 株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 由大连大学生物工程学院分离自渤海和黄海。

1.2 培养基和培养方法

1.2.1 斜面培养基

营养肉汁培养基。

1.2.2 种子培养基

蛋白胨 1.0%, 玉米浆 0.6%, 尿素 0.3%, K_2HPO_4 0.5%。

1.2.3 发酵培养基

玉米淀粉糖 0.7%, 豆饼粉 1.6%, K_2HPO_4 0.8%, KH_2PO_4 0.6%。

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, 12℃ 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, 12℃ 培养 2 d, 取培养液于 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 8 株具有产生蛋白酶能力的菌株, 初步鉴定为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 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 03184 和 03249 为诱变的出发菌株。

表 1 *Bacillus subtilis* 低温蛋白酶产生菌初筛

菌株	03111	03184	03210	03237	03249	03386	03412	03428
蛋白酶活性 /U·mg ⁻¹	3.6	73	5.7	9.5	86.3	12.3	4.8	13

2.2 低温蛋白酶产生菌选育谱系

以 03184 和 03249 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 578 U/mg 的高产菌株 BS041208。

从图 1 可以看出, BS041208 突变株较出发菌株 (03184 和 03249) 产低温蛋白酶能力分别增加了

第一作者: 博士, 副教授。

收稿日期: 2006-02-24

7.92 倍和 6.67 倍。

429 个菌株	蛋白酶活性(U/mg)
↓ 初筛,复筛	
03184 和 03249	73, 86.3
↓ UV, DES, NTG(单项)	
030608	128
↓ UV + DES, UV + NTG	
030946	192
↓ DES, NTG	
041023	356
↓ UV, EMS	
041148	489
↓ LiCl	
BS041208	578

图 1 *Bacillus subtilis* 低温蛋白酶产生菌选育谱系

2.3 BS041208 菌株产低温蛋白酶遗传稳定性

将 BS041208 菌株连续进行 15 代传代,从第 5 代起每间隔 1 代,在 500 mL 三角瓶中,装入 120 mL 培养基,进行低温蛋白酶发酵产酶实际测定,结果见图 2。

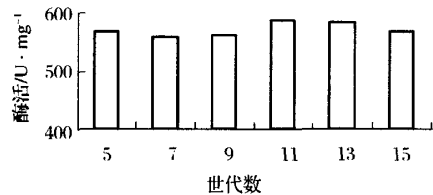


图 2 BS041208 产酶遗传稳定性

实验结果表明(图 2), BS041208 菌株产低温蛋白酶遗传性能稳定。

2.4 碳源对 BS041208 菌株低温蛋白酶产量的影响

BS041208 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。

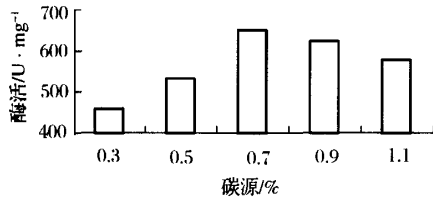


图 3 碳源对 BS041208 菌株酶产量的影响

由图 3 可以看出,玉米淀粉糖用量对 BS041208 突变株酶产量影响较大,当发酵液中玉米淀粉糖含量达到 0.7% 时,酶产量达到 648.30 U/mg。因此, BS041208 菌株低温蛋白酶发酵玉米淀粉糖最适用量为 0.7%。

2.5 氮源对 BS041208 菌株低温蛋白酶产量的影响

碳源含量为 0.7% 时,控制豆饼粉含量, BS041208 低温蛋白酶液体发酵,结果见图 4。

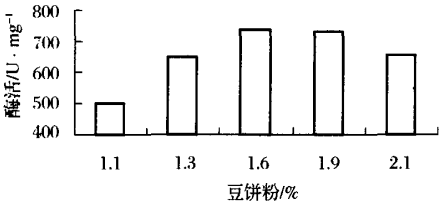


图 4 氮源对 BS041208 菌株酶产量的影响

实验结果(图 4)表明,当豆饼粉含量达到 1.6% 时,酶产量达到最大值 734.7 U/mg;之后豆饼粉含量再增加,酶产量开始下降,这是由于碳氮比例失调所致。因此,确定 BS041208 低温蛋白酶液态发酵豆饼粉加入量为 1.6%。

2.6 K₂HPO₄ 对 BS041208 菌株低温蛋白酶产量的影响

在碳源,玉米淀粉糖含量为 0.7%、氮源,豆饼粉含量为 1.6% 的低温酶液体发酵培养基中,控制 K₂HPO₄ 含量, BS041208 菌株低温酶液体发酵,结果见图 5。

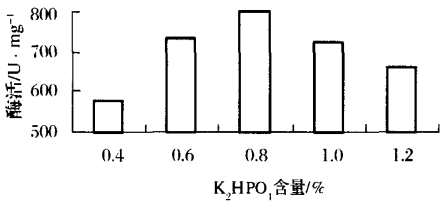


图 5 K₂HPO₄ 对 BS041208 菌株酶产量的影响

实验结果(图 5)表明, K₂HPO₄ 含量达到 0.8% 时, BS041208 菌株酶产量达到最大值 798.3 g/L。因此, BS041208 低温酶液体发酵 K₂HPO₄ 最适添加量为 0.8%。

2.7 K₂HPO₄ 对 BS041208 菌株低温蛋白酶产量的影响

在控制氮源、碳源、K₂HPO₄ 浓度为最优的情况下,调整 K₂HPO₄ 在发酵培养基中的不同含量, BS041208 菌株低温蛋白酶发酵实验结果见图 6。

实验结果(图 6)表明, K₂HPO₄ 的含量为 0.6%, BS041208 菌株低温酶发酵产量达到最大值 867.5 U/mg。因此, BS041208 菌株低温蛋白酶发酵 K₂HPO₄ 添加量为 0.6%。

3 讨论

海洋低温酶的研究已经引起世界各国学者的高

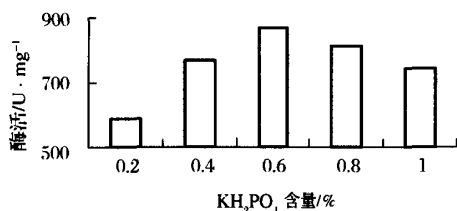


图6 KH₂PO₄对BS041208菌株酶产量的影响

度重视,低温蛋白酶研究涉及到的菌种主要有:*Pseudomonas*, *Bacillus* 和 *Flavobacterium*,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^[3~5]。文中报道的是从渤海分离到的低温蛋白酶产生菌BS041208,是一株枯草芽孢杆菌,产生的低温蛋白酶经初步鉴定,为酸性蛋白酶,

是一株很有研究价值和应用潜力的菌株。

参考文献

- 1 李艳华,张利平.海洋微生物资源的开发与利用[J].微生物学通报,2003,30(3):113~115
- 2 陈秀兰,张玉忠,高培基.低温蛋白酶的研究进展与应用前景[J].工业微生物,2001,31(1):52~57
- 3 Davail S. Cold A daptation of proteins[J]. J Biol Chem, 1994, 269(26):17448~17453
- 4 Kulakova L. Cold active serine alkaline protease from the psychrotrophic bacterium shewanella strain Ac 10: Gene cloning and enzyme purification and characterization[J]. Apple Environ Microbiol, 1999, 65:611~617
- 5 Feller G. Molecular adaptation of enzyme from psychrophilic organism[J]. Comp Biochem Physiol, 1997, 118A:495~499

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

Chi Naiyu^{1,2} Zhang Qingfang¹ Dou Shaohua¹ Tang Qian^{1,2} Yuan Yulian¹

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

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

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(BS041208) 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 BS041208. The suitable medium was that corn syrup,0.7 %;soymeal,1.6 %;K₂HPO₄,0.8 % ;KH₂PO₄,0.6 % . The production of marine low temperature acid protease was 867.5 U/mg.

Key words *Bacillus subtilis*, marine low temperature acid protease, screening

信息窗

仪器信息网VIP会员中心全面改版

仪器信息网VIP会员中心(<http://www.instrument.com.cn/vip>)全面改版完成,本次改版不但以全新的页面与广大网友见面,而且还新增了服务功能,以使VIP会员能够对自己在仪器信息网的活动进行集中管理,新增功能如下:

一、订单管理。VIP可以在这里对自己的“购书订单”、“培训帐户”(暂未开通)、“《仪器快讯》索阅”等进行管理。

二、我的仪器展。VIP可以收藏自己感兴趣的仪器产品和仪器厂家,并且可以管理自己给仪器厂商的留言。

三、资料管理。VIP可以在这里上传文章资料,并且对已上传的资料进行管理。

四、求购信息。VIP可以在这里发布求购信息,并且对已发布的求购信息进行管理,如删除过期的求购信息。

五、二手仪器。VIP可以在这里发布二手仪器信息,并且对已发布的二手仪器信息进行管理,如删除过期的二手仪器信息。

六、简历管理。VIP可以在这里上传简历、修改简历,查看到最新招聘信息,并可以收藏自己感兴趣的职位。

七、站内短信。VIP可以随时收发站内短信,就象用OUTLOOK管理自己的Email一样方便。

八、我的论坛。VIP可以定制感兴趣的论坛、查看自己感兴趣的最新200帖、查看自己发表过的帖子、管理自己发表的求助帖和悬赏帖、管理自己在论坛上上传的附件。

VIP会员可在以下位置登录(或注册):1)仪器信息网首页(<http://www.instrument.com.cn>)左上角的“VIP会员服务专区”;2)网上仪器展览首页(<http://www.netshow.com.cn>)右上角的“VIP用户区”;3)VIP中心首页(<http://www.instrument.com.cn/vip>)。

大家在使用过程中如果感到有任何不便,或者还有需要增加的功能,请与本网VIP会员客服中心联系。电话010-51654077-23、22、13,或发Email至VIP@instrument.com.cn。