

渤海湾浅表海水中产低温蛋白酶适冷菌的筛选*

陈秀兰¹ 张玉忠¹ 高培基¹ 张武昌² 王 荣²

(¹ 山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

(² 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 从渤海湾浅表海水中分离到 150 株产蛋白酶的低温菌, 对其中 5 株产蛋白酶活力较高的菌株的生长特征和其所产蛋白酶的酶学性质进行了研究。这 5 株菌的最适生长温度都在 20 ~ 25 °C, 最高生长温度都在 35 ~ 40 °C, 属于典型的适冷菌。这 5 株菌中, SM908 的产酶活力最高, 为 320 U/ml。这 5 株菌所产蛋白酶的最适酶活温度均为 35 ~ 40 °C。最适 pH 在 7.0 ~ 9.0 范围内, 为中性或碱性蛋白酶。这些蛋白酶的热稳定性普遍较低, SM908 所产蛋白酶的热稳定性最高, 在 50 °C 保温 20 min 仍具有 42.9% 的酶活。这些低温蛋白酶在洗涤剂、饲料、食品等工业上将可能有应用价值。

关键词 海水, 适冷菌, 低温蛋白酶

 蛋白酶是目前应用最多的酶, 占工业水解用酶的 60% 左右。目前工业上应用的蛋白酶多为中温蛋白酶, 最适产酶温度在 30 ~ 35 °C, 最适酶活温度在 50 °C 左右。已广泛应用于洗涤剂、饲料、皮革、食品加工等行业中^[1]。低温酶是指最适催化温度在 30 °C 左右, 在 0 °C 左右仍有一定催化效率的一类酶。低温蛋白酶一般由低温菌产生, 它具有产酶温度低, 最适酶活温度低, 在低温下具有更高的催化效率等特点, 因而在洗涤剂、饲料、皮革、食品加工等工业上应用有着中温蛋白酶无法取代的优越性。也越来越受到人们的重

视。自 70 年代以来, 世界上已有许多实验室在从事低温蛋白酶的研究。已从海水、嗜冷鱼类和贝类以及高山、南北极的泥土等样品中分离到产低温蛋白酶的菌株^[2,3]。不同来源的低温菌种类不同, 产生的低温蛋白酶在性质上也不同, 一些低温蛋白酶已经得到了纯化, 有的已应用到洗涤剂生产中。

* 海洋生物技术 863 资助项目 819-02-02 号; 国家自然科学基金资助项目 49790010 号。

收稿日期: 2000-07-06; 修回日期: 2000-07-18

低温菌生活在终年低温的环境下,分嗜冷菌和适冷菌两类。它们都能够在 0℃ 下正常生长繁殖。前者的最适生长温度在 16℃ 以下,后者的最适生长温度一般为 20℃ 左右。高纬度海水由于常年温度较低,因而是分离适冷菌的理想样品。作者与中科院海洋所合作,从渤海湾采来的海水中分离 150 株产蛋白酶的适冷菌,对其中 5 株产酶高的菌株的生长特征与粗酶性质进行了比较研究。

1 材料和方法

1.1 样品采集

由中科院海洋研究所在渤海湾 119°15′ ~ 121°35′ E, 37°45′ ~ 38°45′ N 范围内,水深 15 ~ 45 m 的深度内,于 1999 年 5 月上旬采取海水样品 10 个。

1.2 培养基

1.2.1 LB 培养基 常规 LB 培养基,用陈海水配制,pH7.5。

1.2.2 筛选培养基 参考文献 [3],用陈海水代替蒸馏水,pH7.5。

1.2.3 发酵培养基 玉米粉 2%,麸皮 1%,豆粕 2%,Na₂HPO₄ 0.4%,KH₂PO₄ 0.03%,CaCl₂ 0.1%,陈海水 pH7.5。

1.3 蛋白酶活力测定

采用 Folin 酚法^[1]。以 2% 酪蛋白为底物。酶活力为在一定温度下,每分钟催化酪蛋白水解生成 1 μg 酪氨酸的酶量为 1 个单位。

2 结果与分析

2.1 海水细菌的富集与产蛋白酶低温菌的筛选

将海水样品用无菌微孔滤膜 (φ0.2 μm) 富集,富集后的滤膜浸入 LB 液体海水培养基 500 ml 三角瓶,每瓶装 50 ml 培养液,15℃ 150 r/min,振荡培养 24 h,将富集培养基 1 ml 用无菌海水稀释后涂筛选培养基平板,15℃ 培养 48 h,结果发现共有 150 多株菌有酪蛋白分解圈,表明它们都是分泌胞外蛋白酶的低温菌。测定酪蛋白分解圈直径与菌落直径的比径,挑选比值大的菌落 15 株,用平板分离纯化后,保藏于 LB 固体斜面上。将 5 株比值最大的菌株分别编号为 SM9903a,SM9903w,SM9907,SM9908,SM9909。通过染色鉴定发现,这 5 株菌均为杆状革兰氏阴性菌。

2.2 温度对菌株生长的影响

测定 5 株菌在不同温度下的生长状况表明,所选 5 株菌在 0 ~ 2℃ 都能生长,SM9903a,SM9903w,SM9908 的最高生长温度为 40℃,SM9907,SM9909 的最高生长温度为 35℃,这 5 株菌的最适生长温度均在 20 ~ 25℃ (表 1)。这些特征表明,这 5 株菌均属于适冷菌。

表 1 5 株菌的最适生长温度和最高生长温度

Tab.1 The optimum and the highest growth temperature for the selected 5 bacteria strains

菌株	最适生长温度 (℃)	最高生长温度 (℃)
SM9903a	25	40
SM9903w	20	40
SM9907	20	35
SM9908	20	40
SM9909	25	35

2.3 蛋白酶产酶活力的比较

将 SM9903a,SM9903w,SM9907,SM9908,SM9909 5 株菌于 12℃ 摇瓶培养,500 ml 三角瓶,每瓶装 50 ml 培养液,200 r/min,60 h 后,12 000 r/min 离心 15 min,测上清液中蛋白酶活力。结果如图 1 所示,5 株菌的产酶活力各不相同,SM9908 的蛋白酶产酶活力最高,达 320 U/ml。SM9909 最低,产酶量为 125 U/ml。由于这些菌都是野生菌株,未经过诱变,因此产酶活力普遍较低。

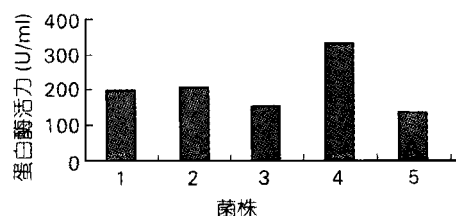


图 1 5 株菌的蛋白酶产酶活力

Fig.1 The protease activity of excreted by the 5 bacteria strains
1: SM9903a, 2: SM9903w, 3: SM9907, 4: SM9908, 5: SM9909

2.4 蛋白酶酶学性质

2.4.1 最适酶活温度 中温蛋白酶的最适酶活温度一般都在 40℃ 以上,目前工业上所用的蛋白酶的最适酶活温度一般都在 50℃ 左右。而从渤海湾分离到的 5 株适冷菌中,SM9903a 和 SM9909 所产蛋

表 2 温度对 5 株菌所产蛋白酶活力的影响

Tab.2 Effect of the temperature on the activity of protease excreted by the 5 bacteria strains

菌株	酶活力 (U/ml)						
	15 ℃	20 ℃	25 ℃	30 ℃	35 ℃	40 ℃	45 ℃
SM9903a	64.5	89.6	136.0	191.4	226.3	218.8	201.3
SM9903w	41.8	70.9	125.6	174.3	202.2	209.7	189.2
SM9907	16.6	26.4	45.3	74.1	104.0	137.7	94.4
SM9908	47.2	75.3	108.6	154.3	199.7	207.2	187.5
SM9909	30.1	42.4	69.1	89.8	127.6	94.3	82.6

白酶的最适酶活温度均为 35 ℃,其余 3 株为 40 ℃(表 2)。由此看来,低温菌由于生存环境温度较低,经过长期的进化适应,其生理代谢机制也可能发生变化,为了更好地利用环境中的资源,它们分泌的胞外蛋白酶的最适酶活温度也较低。

2.4.2 最适 pH 用 pH6.0~10.0 的缓冲液稀释酶液,加入相同 pH 的底物进行反应,测定 5 株菌所产蛋白酶在不同 pH 下的酶活。结果表明,SM- 9908

表 3 pH 对 5 株菌所产蛋白酶活力的影响

Tab.3 Effect of the pH on the protease activity excreted by the 5 bacteria strains

菌株	酶活力 (U/ml)				
	pH				
	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
SM9903a	142.55	215.88	230.72	180.46	167.46
SM9903w	160.5	172.22	182.10	174.28	137.60
SM9907	54.38	82.75	127.72	111.24	42.44
SM9908	207.64	323.38	229.01	219.18	88.99
SM9909	133.49	142.14	160.68	217.54	117.01

表 4 温度对 5 株菌所产蛋白酶的稳定性的影响

Tab.4 Effect of the temperature on the stability of the protease excreted by 5 bacteria strains

菌株	残留酶活 (%)			
	40 ℃保温		40 ℃保温	
	10 min	20 min	10 min	20 min
SM9903a	98.3	77.5	54.4	34.2
SM9903w	96.9	83.1	59.2	39.8
SM9907	92.7	63.6	16.2	13.8
SM9908	96.6	88.4	66.4	42.9
SM9909	87.8	73.4	54.5	35.8

在 pH7.0 时酶活最高,为中性蛋白酶; SM- 9903a, SM- 9903 w, SM- 9907 在 pH 为 8.0 时酶活最高。而 SM9909 在 pH9.0 时酶活最高,为碱性蛋白酶(表 3)。海水 pH 一般为 7.5~8.0,从本文的结果来看,海洋细菌分泌的胞外蛋白酶的最适 pH 与环境 pH 相差不大,这可能也是细菌对环境长期进化适应的结果。

2.4.3 热稳定性 将 5 株菌所产的蛋白酶在 40 ℃和 50 ℃下分别保温 10 min 和 20 min,然后测定残留酶活。结果如表 4 所示,5 株菌所产蛋白酶的热稳定性各不相同。SM- 9908 所产蛋白酶热稳定性最好,在 40 ℃和 50 ℃下保温 20 min,残留酶活分别为

73.4%, 35.8%。而 SM- 9907 所产蛋白酶对热最敏感,在 40 ℃和 50 ℃下保温 20 min,残留酶活分别为 63.6%和 13.8%。低温酶为了在低温下保持较高的催化效率,一般具有很强的柔顺性和很弱的刚性,这种结构特征也导致了酶的稳定性较低。

3 讨论

高纬度海水终年温度较低,因而存在着大量低温微生物。本文从渤海湾浅表水层中分离到一批能在 15 ℃下良好生长的适冷菌。其中 5 株高产蛋白酶菌株的最适生长温度均为 20~25 ℃,最高生长温度为 35~40 ℃。这比一般的中温菌的最适与最高生长温度都低,而与渤海湾浅表水层的温度比较一致。适冷菌广泛存在于海洋中,是海洋生态系统中的主要分解者。在海水、鱼、贝中都分离到产蛋白酶的适冷菌^[2,3],它们在海洋生态系统中氮的循环中起着重要作用。产低温蛋白酶的菌除了从海洋中分离到以外,还从高山和南极的泥土中分离到。从种类上看,主要为 *Pseudomonas* 属, *Xanthomonas* 属, *Aeromonas* 属, *Atteromonas* 属, *Shewanella* 属, *Bacillus* 属等^[2~4]。这些适冷菌所产蛋白酶的最适酶活温度一般都在 30~40 ℃,但也有 50~60 ℃。本文中 5 株菌所产蛋白酶的最

适酶活温度均为 35 ~ 40 ℃。从本文结果与发表的结果可以看出,低温菌所产蛋白酶的最适酶活温度均高于其生存的环境温度和其最适生长温度,这说明菌的进化与酶的进化可能是不同步的,而且低温菌可能是由中温菌进化来的。

蛋白酶是洗衣粉中的重要用酶。目前洗衣粉中所用的酶均为中温碱性蛋白酶,最适 pH9.0 左右,最适酶活温度 50 ℃左右。但由于洗衣机的普遍使用,目前洗衣的发展趋势是使用自来水洗涤,而自来水的温度一般不超过 30 ℃,因此,洗衣粉中的中温蛋白酶由于水温低,酶活很小,效率很低,用量大。本文筛选到的 SM9909 菌株所产蛋白酶的最适酶活温度 35 ℃,最适 pH9.0。如果用这种低温蛋白酶代替洗衣粉中的中温蛋白酶,可以提高效率,节省用量。因此低温蛋白酶在

洗涤工业中有着很好的应用前景。另外在饲料、化妆品、牙膏等工业中也有着很好的利用价值。

参考文献

- 1 张树政. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社, 1984. 387 ~ 449.
- 2 Shibata M. *et al.*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1997, 61: 710 ~ 715
- 3 Hoshino T. *et al.*. *Letters in Applied Microbiology*, 1997, 25: 70 ~ 72
- 4 Kulakova L. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 611 ~ 617
- 5 Gerday C. *et al.*. *Biochimica et Biophysica*, 1997, 1342: 119 ~ 131

(本文编辑: 刘珊珊)

SELECTION OF THE PROTEASE-EXCRETED PSYCHROTROPHILIC BACTERIA STRAINS FROM THE SHALLOW SEA WATER IN BOHAI BAY

CHEN Xiulan¹ ZHANG Yurzhong¹ GAO Peiji¹ ZHANG Wurchang² WANG Rong²

(¹ State Key Lab of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, 250100)

(² Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Received: Jul. 6, 2000

Key Words: Sea water, Psychrotrophic bacteria, Psychrotrophic proteases

Abstract

150 protease-excreted psychrotrophic bacteria strains were isolated from the shallow sea water in Bohai Bay, and the characteristics of the growth and the properties of the excreted protease of the selected 5 strains were further studied. The optimum and highest growth temperatures were 20-25 ℃ and 35-40 ℃, respectively, which showed that the 5 strains were psychrotrophiles. Strain SM908 had the highest excreted protease activity, which was 320 U/ml. The optimum temperatures of the protease for casein hydrolysis were 35-40 ℃, and the optimum pH were 7.0-9.0. Therefore, the proteases belonged to neutral or alkaline protease. All these proteases had lower stability. Among of them, the protease excreted by strain SM908 had the relatively best stability, which remained 42.9% activity after incubated at 50 ℃ for 20 minutes. These psychrotrophic proteases have great potential in the industries of detergent, fodder, food.