

深海适冷菌 SM913 产生的低温蛋白酶*

陈秀兰¹ 张玉忠¹ 王运涛¹ 高培基¹ 栾惕武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)

摘要 从 1 855 m 深的深海泥样中分离纯化得到 200 多株分泌蛋白酶的适冷菌, 其中 3 株产低温蛋白酶, 本文对其中一株 *Pseudo monas* sp. SM913 (P. SM913) 生长的适冷性和它产生的蛋白酶的适低温特性进行了研究。该菌株能够在 0 °C 下正常生长, 其最适生长温度为 15 °C, 最高生长温度为 35 °C。为一株适冷菌。该菌株所产蛋白酶的比合成速率在 10 °C 时最高, 催化酪蛋白水解的最适温度为 35 °C, 在 0 °C 仍具有 3% 的酶活力。最适 pH 为 8.0。该蛋白酶的热稳定性很低, 在 40 °C 保温 10 min 即丧失 85% 的活力, 40 °C 时的半衰期为 6 min, 为一典型的低温酶。抑制剂试验表明, 该蛋白酶为金属蛋白酶。

关键词 深海, 适冷菌, 低温蛋白酶

极端环境下微生物的生长特性及其适应极端环境的机制是目前微生物学研究的热点。低温菌是极端微生物之一, 据 Margsin R. T. 等 1991 年的报道, 这

* 863 计划海洋生物技术主题资助项目 8190202 号。

收稿日期: 2000-11-14; 修回日期: 2000-11-20

是一群生活在永久低温环境下的细菌,分为嗜冷菌和适冷菌两大类,它们都能够在 0℃下正常繁殖生长,前者的最适生长温度都在 16℃以下,后者最适生长温度在 20℃左右。深海环境由于终年低温,因而存在着一个低温生态系统,包括多种低温动物和微生物。目前,深海生物多样性和生物资源开发是一个正在兴起的热点。有许多新的生物种类、新药物和新酶等资源有待于研究和开发。深海低温生物经过长期的进化适应,有着适应低温环境的特殊结构与代谢机制。它们所产的酶在低温下有着比中温酶更高的催化效率。根据 Margsin R. T. 等 1991 年的定义,通常把最适催化温度在 30℃左右,在 0℃左右仍有一定催化效率的酶称为低温酶。低温酶在许多行业中具有很高的应用价值。

蛋白酶是目前应用最多的一种酶。但目前所用的基本上都是中温酶,最适酶活温度一般在 50℃左右,而由低温菌产生的低温蛋白酶的最适酶活温度基本都在 40℃以下,而且,菌的最适产酶温度一般都在 25℃以下^[3,4]。因此,低温蛋白酶应用在食品、洗涤剂、化妆品、水产饲料等工业上,有着中温蛋白酶无法取代的优越性。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酶学研究。已从海水、嗜冷的鱼类和贝类以及高山、南北极泥土等样品中分离到产低温蛋白酶的菌株^[4,5]。一些低温蛋白酶已经分离纯化,对其中一些酶的结构和适冷机制也进行了研究^[5],有的已应用到洗涤剂的生产中。但到目前为止,尚未见有从深海泥样中分离到产低温蛋白酶菌株的报道。本实验室与中科院海洋所合作,从 1 855 m 深的海底泥样中分离到 200 多株产蛋白酶的低温菌,其中 3 株为产低温蛋白酶的低温菌。经过筛选比较后,对 P. SM913 菌株的生长与产酶特性、酶学性质进行了初步的研究。

1 材料和方法

1.1 样品采集

由中国科学院海洋研究所地质研究室用科学一号考察船采自日本冲绳槽海域 25°56' N, 125°09' E, 深度为 1 855 m 的海底泥样。

1.2 培养基

1.2.1 斜面 LB 培养基 牛肉膏 1.0%, 鱼蛋白胨 0.3%, 琼脂 2.0%, 陈海水, pH 7.5。

1.2.2 筛选培养基 配方同文献 [3]。用陈海水代替蒸馏水, pH 7.5。

1.2.3 双基固体平板筛选培养基 配方与制作参考 Montville 等 1983 年的方法。

1.2.4 生长与产酶培养基 参考 Margsin R. T. 等 1991 年的方法略加修改。乳糖 0.5%, 甘油 0.5%, 豆粕汁 6%, 酵母汁 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%, KH_2PO_4 0.025%, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.25%, $NaCl$ 3%, pH 7.5。

1.2.5 摇瓶产酶培养基 玉米粉 2%, 麸皮 1%, 豆粕 2%, Na_2HPO_4 0.4%, K_2PO_4 0.03%, $CaCl_2$ 0.1%, 陈海水, pH 7.5。

1.3 蛋白酶活力测定

参考张树政^[1]的方法。反应时间 10 min, 酶活力为在一定温度下, 每分钟催化酪蛋白水解生成 1 mg 酪氨酸的酶量为 1 个单位(U)。

2 结果与分析

2.1 产低温蛋白酶的耐冷菌的分离

将约 2 g 的泥样放入有玻璃珠的 50 ml 的无菌海水中, 将泥样用玻璃珠振荡打散, 在 10℃下 80 r/min 振荡 10 h。取上清用无菌海水稀释后涂筛选培养基平板, 10℃下培养 2 d, 共挑取有酪蛋白分解圈的菌 200 多株, 平板分离纯化, 然后保藏在 LB 斜面培养基上。将得到的产蛋白酶的低温菌株接种于摇瓶培养基, 50 ml/500 ml 三角瓶, 12℃, 200 r/min, 振荡培养 72 h。

培养液离心, 上清液分别加入 3 个双基固体筛选培养基平板上的小孔中, 每孔 25 μ l, 分别放在 20, 30, 40℃下保温 12 h。保温后比较同一株菌的酶液在不同温度下的分解圈的大小。结果表明, 所有菌株在 20℃下的分解圈都小于 30℃与 40℃的分解圈, 有 3 株菌 30℃的分解圈大于 40℃的分解圈, 有 14 株菌 30℃的分解圈与 40℃的分解圈几乎相同, 其余菌株均为 40℃下的分解圈最大。取 30℃下的分解圈大于 40℃下的分解圈的 3 株菌, 测定其在 15~55℃下的蛋白酶活性, 结果表明, 在底物酪蛋白浓度为 2%, pH 为 9 时的最适酶活温度均为 35℃(图 1), 通过比较这几株菌的产酶量, 酶的热稳定性等, 选用 P. SM913 菌株做进一步的研究。

2.2 P. SM913 的菌株特征与鉴定

P. SM913 的菌落为圆形, 光滑, LB 培养基上呈土黄色, 稍粘, P. SM913 菌株的特征见表 1。为一杆状革兰氏阴性菌, 大小为 (1.2~1.6) μ m \times 0.5 μ m, 初步鉴定为 *Pseudomonas* 属。

2.3 温度对 P. SM913 菌株生长与产酶的影响

P. SM913 的自然生长环境温度为 5℃。P. SM913 在 0℃时在液体 LB 中进行表面静止培养时, 50 h 左右进入指数生长期, 120 h 达到 0.84 (OD₆₁₀)。采用生长与产酶培养基在不同的温度下进行摇瓶培

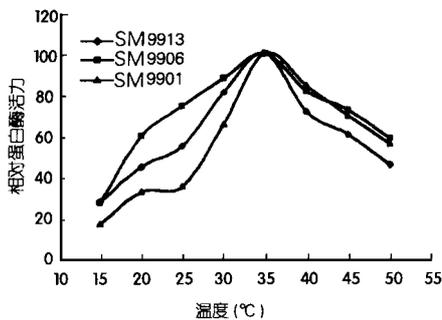


图1 3株低温菌所产蛋白酶在不同温度下的酶活力比较
Fig.1 Comparison of relative activity of protease from three psychrotrophic strains incubated at different temperature

养, 结果表明, P. SM9913 能够生长的最高温度为 35 °C, 在 5 ~ 20 °C 范围内, P. SM9913 在不同温度下随时间的生长和蛋白酶的合成状况如图 2 所示。细菌的最适生长与酶合成温度一般分别由其比生长速率和酶合成比速率来表征。由 Malthus 方程 $N_t = N_0 e^{\mu t}$ 求解出比生长速率

$$\mu = \frac{\ln N_t / N_0}{t - t_0}$$

(N_0, N_t 分别指在 t_0, t 时菌的生长量; μ 为比生长速率)

根据此公式利用图 2 中的数据求出该菌的比生长速率 μ_M 。蛋白酶的比合成速率 μ_E (即单位重量菌体内酶的合成速率 (h^{-1})) 可根据下面公式计算。

$$\mu_E = \frac{1}{N} \cdot \frac{dN}{dt}$$

表 1 P. SM9913 菌株的形态和生化特征

Tab.1 Morphological and biochemical characteristics of strain P. SM9913

形态特征	结果	生化特征	结果
形状	杆状	色素	黄色
革兰氏染色	-	氧化酶	+
芽孢	-	过氧化氢酶	+
鞭毛	单根/极生	V.P. 试验	-
运动性	+	M.R. 试验	-
		明胶液化	+
		需氧性	+

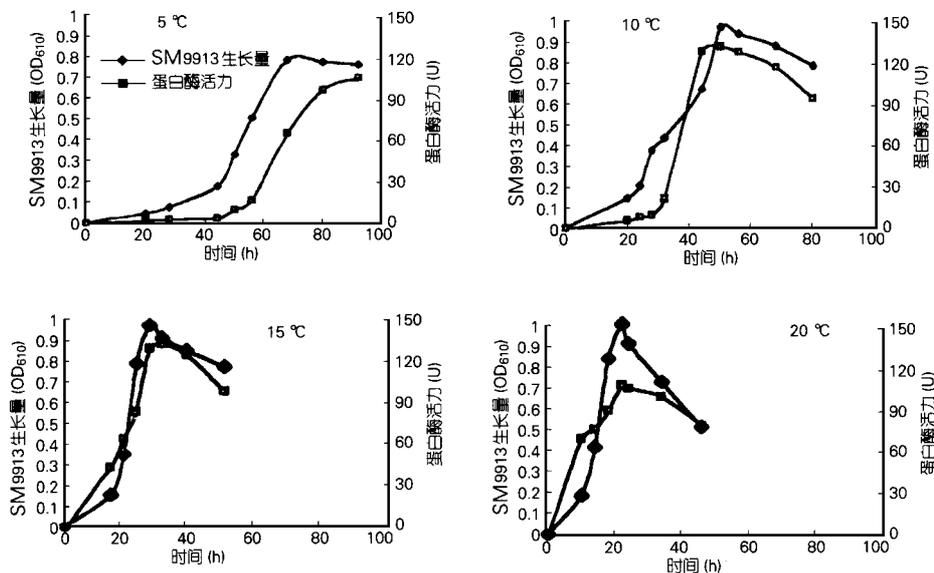


图 2 菌株 P. SM9913 在不同温度下的生长状况和蛋白酶合成状况

Fig.2 Growth curve and protease secretion curve of strain P. SM9913 at different temperature

根据此公式利用图 2 中的数据求出蛋白酶的比合成速率 μ_E 。P. SM9913 在不同温度下的比生长速率

和蛋白酶的比合成速率如图 3 所示。从图 3 可以看出, P. SM913 菌株在 15 °C 左右生长速率最高, 在 10 °C 左右酶合成速率最高。而产中温蛋白酶的中温菌一般在 30 °C 以上生长速率和酶合成速率最高。这表明, P. SM913 具有适低温的特征。根据 Mbrita 等 1975 年对低温菌的定义和分类, 该菌株为适冷菌。

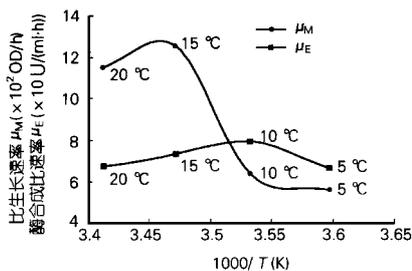


图 3 温度对菌株 P. SM913 的生长速率和蛋白酶合成速率的影响(数据来自图 2)

Fig. 3 Effect of temperature on the specific growth rate and the specific protease synthesis rate of strains P. SM913 (Data derived from Fig. 2)

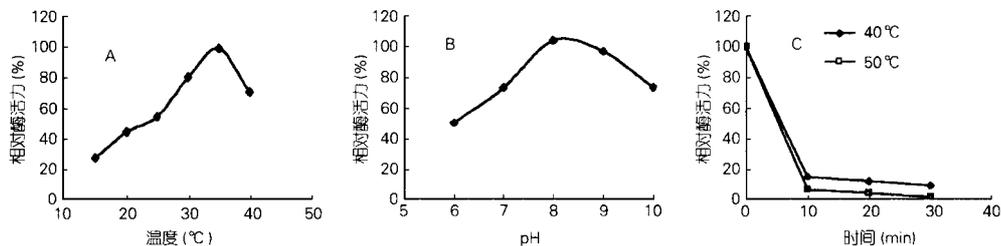


图 4 温度和 pH 对蛋白酶酶活和稳定性的影响

Fig. 4 Effects of temperature and pH on the activity of the protease excreted by strains P. SM913

制剂。在酶的稀释液中分别加入终浓度为 5 mmol 的 EDTA, 1 mmol PMSF, 1 mmol O-P 后测定酶活性, 结果表明 PMSF 对 P. SM913 所产蛋白酶活完全不抑制, 而 EDTA 可抑制 86.5%, O-P 可抑制 48.0% (表 2), 说明该蛋白酶不是丝氨酸蛋白酶, 而很可能是金属蛋白酶。但是, 金属螯合剂 EDTA 与 O-P 不能完全抑制其活性, 说明其中还可能其他的蛋白酶成分, 有待于纯化后确定。

4 讨论

建立了一种筛选产低温蛋白酶菌株的简便有效

2.4 P. SM913 菌株所产低温蛋白酶的酶学特性

2.4.1 最适酶活温度 在底物酪蛋白浓度为 2%, pH9.0 下, 测定 P. SM913 所产蛋白酶在 15 ~ 55 °C 范围内不同温度下的酶活。结果表明, 该蛋白酶在这个条件下的最适酶活温度为 35 °C (图 4A)。测定 P. SM913 所产蛋白酶在 0 °C 的酶活表明, 该蛋白酶在 0 °C 仍具有 3% 的酶活力。

2.4.2 最适 pH 用 pH6.0 至 pH10.0 的不同的缓冲液稀释酶液, 分别加入相应 pH 的 2% 的酪蛋白, 在 35 °C 下测定酶活力, 结果表明, P. SM913 所产蛋白酶在 pH8.0 时的酶活最高 (图 4B)。

2.4.3 热稳定性 将酶液在 40 °C 与 50 °C 下分别保温不同时间, 然后测定残留酶活。P. SM913 所产蛋白酶对热非常敏感, 在 40 °C 时的半衰期为 6 min。在 40 °C 与 50 °C 下保温 10 min, 残留酶活仅为最大酶活的 15.2% 和 6.8% (图 4C)。

2.5 抑制剂对酶活的影响

根据反应中心的不同, 蛋白酶可分为金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶等, 不同的抑制剂可抑制不同类型的蛋白酶, 苯甲基黄酰氟 (PMSF) 为丝氨酸蛋白酶的抑制剂, 而 EDTA、邻菲罗啉 (O-P) 为金属蛋白酶的抑

的方法, 利用此法从 1 855 m 深的海底淤泥中, 分离得到的 200 多株产蛋白酶的低温菌。尽管这些低温菌都能在低温 (12 °C) 下良好生长, 但这些菌株所产的蛋白酶的最适酶活温度差异较大。海洋是一个开放的环

表 2 蛋白酶抑制剂对 P. SM913 所产蛋白酶活力的影响
Tab.2 Effects of inhibitors on the activity of the protease excreted by P. SM913

抑制剂	终浓度 (mmol/L)	残留蛋白酶活力 (%)
EDTA	5	13.5
O-P	1	52.1
PMSF	1	100.5

境,在深海海底的低温生态环境中生长的低温菌,有些可能起源于海底生态环境,有些可能来自海洋的表面或来自大气、河流等,在深海海底生存的微生物,在长期的适应进化中,都形成了能够在低温下生长的特性,这是生存所必需。但所产的蛋白酶的特性并不尽相同。过去通常习惯把低温菌和低温酶相提并论,但现在看两者的关系并不象以前认为的那样密切。如作者分离到的200多株产蛋白酶低温菌中,仅3株产低温蛋白酶,其余产的都不是典型的低温蛋白酶。说明蛋白酶分子的适应进化与菌株生长的适应进化是不同步的。

在以前的报道中,只是对产低温蛋白酶的低温菌在不同温度下的生长量和蛋白酶活性进行了研究,由此推断菌株的最适生长温度和产酶温度^[5]。但采用生长量和蛋白酶活性反映菌株的最适生长温度和最适产酶温度并不十分准确^[2]。本文以菌株在不同温度下的比生长速率和蛋白酶的比合成速率为指标,对P. SM913的最适生长温度和最适产酶温度进行了详细的研究,结果表明,P. SM913的最适生长温度为15℃,最适产酶温度为10℃。运用这种方法得出的最适生长温度和最适产酶温度比较准确。

低温酶一般具有产酶的最适低温度,最适酶活低温度,在低温下催化效率高,但热稳定性差等特征^[6]。Magesin等1991年从海拔2100m的高山泥土中分离的低温菌 *Xanthomonas maltophilia* 产生的低温碱性金属蛋白酶,最适酶活温度50℃,最适pH值8.0,在40℃下保温1h,酶活性下降5%。该高山低温菌产生的蛋白酶特性与中温菌差异不大。Shibata等^[4]报道,从海洋贝壳中分离的低温菌 *Aeromonas* sp. No.3696产生的产低温碱性金属蛋白酶,最适酶活温度40℃,最适pH8.5~9.0,40℃下15min,酶活下降20%。Hoshino等^[3]从海洋冷水鱼的消化道中分离的低温菌

Pseudomonas 产生的金属蛋白酶最适酶活温度为25℃,40℃下1h,酶活丧失75%,是目前已经报道的低温金属蛋白酶中酶活最大酶活温度最低、热稳定性最差的蛋白酶。但该蛋白酶的最适pH7.0,为中性金属蛋白酶。从深海淤泥中分离的耐冷菌P. SM913所产的低温蛋白酶,最适酶活温度35℃,最适pH9.0,酶活性被EDTA所抑制,是目前报道的酶活温度最低的碱性金属蛋白酶。该蛋白酶热稳定性非常差,40℃下10min,酶活即丧失85%,较Hoshino等^[3]报道的低温中性金属蛋白酶的热稳定性还差,是目前报道的金属蛋白酶中热稳定性最差的蛋白酶,这可能与该菌株长期生活在低温(5℃)环境中有关,深海淤泥是分离低温微生物与低温酶的良好材料。有关P. SM913所产低温蛋白酶的分离纯化、酶学特性及嗜冷机制正在进一步研究之中。

深海微生物资源是目前国际上极端微生物研究的热点之一^[6],本文从深海淤泥中筛选到产低温蛋白酶的耐冷菌,并对其生长与产酶特性和粗酶性质做了初步研究,为今后低温酶的嗜冷机制研究及其在水产、洗涤剂、化妆品、皮革、食品等工业上的应用研究奠定基础。

参考文献

- 1 张树政. 酶制剂工业. 北京:科学出版社,1984. 387-449
- 2 高培基,曲音波,钱新民等. 微生物生长与发酵工程. 济南:山东大学出版社,1990. 1-41
- 3 Hoshino T. et al. . *Letters in Applied Microbiology*, 1997, 25: 70-72
- 4 Shibata M. et al. . *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1997, 61 (4): 710-715
- 5 Kulakova L. *Appl. Entom. Microbiol.*, 1999, 65(2): 611-617
- 6 Gerday C. et al. . *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, 1342: 119-134

PSYCHROTROPHILIC ALKALINE PROTEASE FROM A DEEP SEA PSYCHROTROPHILIC Strain *Pseudomonas* sp. SM913

CHEN Xiu-lan¹ ZHANG Yu-zhong¹ WANG Yun-tao¹ GAO Pei-ji¹ LUAN Xi-wu²

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

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

Received: Nov. 14, 2000

Key Words: Deep sea, Psychrotrophile, Psychrotrophic protease

Abstract

More than 200 psychrotrophic strains excreting protease were isolated from 1855 meter deep sea silt and were puri-

field. 3 strains of them excreted psychrotrophic protease. The psychrotrophic characteristics of the protease excreted by one of the three strains — *Pseudomonas* sp. SM913 (P.SM913) were preliminarily studied. Strain P. SM913 could grow at 0 °C. The optimum temperature for growth was about 15 °C. And the highest temperature for growth was 35 °C, which suggested that strain P. SM913 was psychrotrophic. The highest specific synthetic rate of the protease occurred at about 10 °C. The optimum temperature of the protease for casein catalysis was 35 °C, and the highest protease activity for casein catalysis was at pH 8.0. The protease was susceptible to heat treatment, and the half time for the decrease of protease activity was 6 minutes when incubated at 40 °C. These results showed that this protease was psychrotrophic. The activity of the protease was inhibited by EDTA, indicating that this protease belonged to metal protease. (本文编辑:刘珊珊)