

海产品中蛋白酶产生菌的选育及产酶条件研究*

李爱芬¹ 孙祖莉² 陈敏² 刘玉田² 周百成³(¹ 暨南大学水生生物研究中心 广州 510632)(² 烟台大学生物化学系 烟台 264005)(³ 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 从海产品虾和蟹中分离出蛋白酶产生菌共 37 株, 其中 YM07 菌株蛋白酶生产活力较高, 为 194.6 U/mL。以 YM07 为出发菌株, 通过物理和化学方法复合诱变, 获得了 YM079 号菌株。对其产酶条件的研究结果表明: 它的最适产酶温度为 35 ℃, 最适生长 pH 为 7.0, 经过 190 r/min 摇床培养 36~40 h, 其产酶活力为 240 U/mL, 比出发菌株的产酶活力提高了 22%。该菌株经发酵的粗酶液最适作用 pH 为 7.0, 最适作用温度是 45 ℃, 是一种中温型中性蛋白酶。

关键词 海产品, 蛋白酶, 诱变, 产酶条件

中图分类号 Q93 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)09-0041-03

海产品中鱼、虾、贝、藻等所含的蛋白质、矿物质及维生素是陆生生物所不能比拟的^[1], 研究表明, 海洋生物中含有大量对人体有益的生物活性物质。甲壳素是海洋生物中含量丰富且具有重要生物活性的一种天然多糖, 甲壳素及其衍生物在许多领域已有极其广泛的用途, 尤其是在医疗和药物制剂方面。另外, 甲壳素作为功能性健康食品, 具有明显的抗癌、降血脂和降血压的作用。

目前, 甲壳素的生产主要从虾和蟹壳中提取, 其传统生产工艺主要包括酸碱处理脱钙、蛋白质和脂肪, 漂洗干燥等。由于虾蟹壳中残留较高含量的蛋白质(20%以上), 因此, 在生产中要消耗大量的酸和碱。这样以来, 不仅虾蟹壳中残留的蛋白质没有得到利用而浪费, 更重要的是大量酸碱及含蛋白质的生产废液的排放严重污染周边环境及海域, 影响其他养殖业和沿海旅游业的发展。这些问题在甲壳素生产中普遍存在, 严重制约着甲壳素产业的可持续健康发展。

本研究选择具有高效蛋白酶活性的微生物为工程菌对甲壳素生产工艺进行改进和优化, 用高效工程菌对甲壳素进行生物处理, 以缩短生产周期, 减轻生产废液对环境的污染, 并开发出较高附加值且具有虾蟹风味的功能食品, 进一步为甲壳素的二代、三代产品的研究开发奠定良好的基础。本文主要报道了蛋白酶产生菌的选育和产酶条件的优化。

1 材料和方法

1.1 样品来源

虾和蟹的下脚料购于烟台市莱山区烟台大学农贸市场。

1.2 培养基

斜面培养基(%) : 蛋白胨 1.0, 牛肉膏 1.0, NaCl 0.5, 琼脂 2.0, pH7.0; 富集培养基(%) : 蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.5, 牛肉膏 1.0, NaCl 0.5, pH7.0; 种子培养基(%) : 葡萄糖 1.0, 蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.5, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.02, Na₂CO₃ 1.0, pH7.0; 初筛培养基(%) : 干酪素 1.0, L-酪氨酸 0.005, Na₂HPO₄·12H₂O 0.28, MgSO₄·7H₂O 0.05, NaCl 0.016, FeSO₄ 0.0002, 琼脂 2.0, pH7.0; 发酵培养基(%) : 可溶性淀粉 4.0, 酵母膏 0.5, 牛肉膏 1.0, 蛋白胨 1.5, NaCl 0.5, K₂HPO₄·3H₂O 0.53, NaH₂PO₄·2H₂O 0.03, Na₂CO₃ 0.056, pH7.0。

* 山东省科学技术攻关项目 991164502 号。

第一作者: 李爱芬, 出生于 1963 年, 博士, 副教授, 主要从事水生生物学与海洋生物技术研究。E-mail: tlf@jnu.edu.cn

收稿日期: 2002-09-09; 修回日期: 2003-05-20

1.3 培养条件

1.3.1 菌种分离 取一定量的样品在富集培养基中振荡培养 36 h, 将富集培养液用生理盐水稀释, 涂布于酪素琼脂培养基平板上, 37 °C 培养 48 h, 观察并记录水解圈和菌落直径的大小。将目的菌的菌落挑起, 接斜面培养基, 37 °C 培养 24 h 后, 置 4 °C 冰箱保存。

1.3.2 发酵培养 取斜面菌种 2~4 环接入种子培养基, 37 °C 振荡培养 24 h, 以 20% 的接种量转接于发酵培养基, 37 °C 摇床培养 48 h, 测发酵液的酶活。

1.4 蛋白酶活力测定

采用 Folin 酚法^[2]。以 1 mL 酶液在 37 °C pH7.0 的条件下, 水解酪蛋白每 min 产生 1 μg 酪氨酸所需的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

1.5 诱变育种

采用紫外线和硫酸二乙酯(DES)复合诱变法^[3]。

1.6 初筛

将待测菌株用灭菌的牙签点接到酪素琼脂平板上, 37 °C 培养 24 h, 测量其水解圈和菌落直径。

2 结果与讨论

2.1 蛋白酶菌株的分离与筛选

在酪素琼脂培养基平板上共有 37 株菌产生透明的水解圈, 表明这些微生物都是分泌胞外蛋白酶的产酶菌。经测定, 水解圈的直径在 0.65~1.7 cm 之间, 菌落大小在 1~1.25 mm 之间。通过计算酪蛋白水解圈直径与菌落直径的比值, 挑选比值较大的菌落 20 株进行分离纯化, 保藏于斜面培养基上。纯化后的 20 株菌经初筛, 获得了 3 株产酶活力较高的菌株, 分别编号为 YM07、YM14 和 YM18。在油镜下这 3 株细菌细胞均呈杆状, 单个排列, 菌落为乳白色, 表面粗糙, 有皱褶。革兰氏染色结果为阳性细菌。

2.2 复筛

表 1 pH 对 YM079 号菌株产酶活力的影响

Tab.1 Effect of the pH on the protease activity excreted by the YM079 strain

pH	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
酶活力(U/mL)	110.2	105.8	217.4	239.7	206.7	139.5	71.2

pH6.5~7.5 范围内均有较高的产酶活力。当发酵液的初始 pH 超过 8.5 时, 菌体的生物量和产酶活力都明显降低。

2.4.2 培养温度对产酶活力的影响 选用 pH7.0 的发酵培养基, 分别在 25、30、35、40、45 °C 和 190 r/min 的条件下培养 48 h, 测得发酵液的酶活见表

将初步筛选获得的 3 株产酶活力较高的细菌经活化后接入摇瓶发酵培养基中, 37 °C 190 r/min 培养 48 h, 其发酵液经 10 000 r/min 离心 15 min, 测上清液的蛋白酶活力。结果如图 1 所示, YM07 的产酶活力最高, 为 194.6 U/mL, YM14 的产酶活力最低, 为 91.0 U/mL, YM18 居中, 是 137.3 U/mL。根据上述复筛结果, 选择 YM07 为出发菌株进行诱变育种。

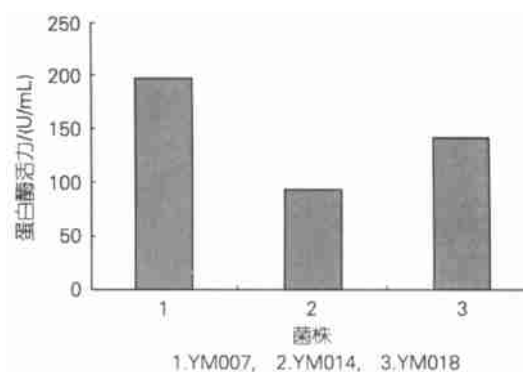


图 1 3 株菌的蛋白酶活力

Fig.1 The protease activity of excreted by the 3 bacteria strains

2.3 诱变育种

采用 UV 和 DES 复合诱变 YM07 号菌株, 得到了 57 株突变体。经过初筛、复筛, 选出了一株产酶活力较高的菌株, 编号为 YM079, 产酶活力为 236.9 U/mL, 比原始出发菌株的产酶活力提高了 22%。

2.4 菌株摇瓶发酵培养条件的研究

2.4.1 发酵液初始 pH 对产酶活力的影响 分别配制不同 pH 的培养基, 在 37 °C 和 190 r/min 的条件下培养 48 h, 测定发酵液的酶活, 结果见表 1。从表 1 可看到, YM079 号菌株的最适产酶 pH 为 7.0, 在

2. 由表 2 可以看出, YM079 菌株产酶的最适培养温度为 35 °C, 在 30 °C 发酵培养时, 产酶活力也较高, 超过 40 °C 时, 产酶活力明显下降。

2.4.3 培养时间对产酶活力的影响 将活化的种子培养基接入 pH7.0 的发酵培养基中, 35 °C 和 190 r/min 的摇床条件下培养 60 h, 在不同发酵时间(每隔

研究报告 REPORTS

6 h) 测定发酵液的酶活, 结果如图 2。从图 2 可以看出, 培养时间在 36 ~ 42 h 之间酶活最高。

表 2 培养温度对 YMD79 号菌株产酶活力的影响

Tab.2 Effect of the temperature on the protease activity excreted by the YMD79 strain

温度(℃)	25	30	35	40	45
酶活力(U/mL)	163.4	210.3	232.5	103.5	36.2

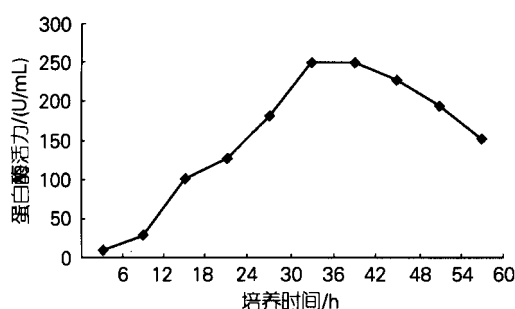


图 2 培养时间对 YMD79 号菌株产酶活力的影响

Fig.2 Effect of the culture time on the protease activity of YMD79 strain

2.5 粗酶液的性质

2.5.1 最适作用 pH 值 用不同 pH 的 Tris-硼酸缓冲液配制酪蛋白溶液, 在 37℃ 水浴中进行酶反应。结果表明, 该菌株产生的蛋白酶的最适作用 pH 为 7.0, 在 pH 6.5 ~ 7.5 范围内均有较高的酶活力。

2.5.2 最适作用温度 选用 pH 7.0 的酪蛋白溶液, 分别在 30、35、40、45、50、55℃ 条件下进行酶反应, 结果表明, YMD79 菌株产生的蛋白酶的最适作用温度为 45℃, 属于中温型蛋白酶。虾蟹壳是海产品加工后的下脚料, 含有较高的蛋白质。开发利用这些低值的海洋资源, 提高其附加值, 是海洋生物技术领域的重要研究内容。利用微生物发酵工程和酶工程, 对虾蟹壳综合开发和利用, 降低环境污染, 使其中的蛋白质变废为宝, 生产出易于消化吸收的氨基酸、肽类和其它生物活性物质, 是水产品综合利用的一条可行的思路。

参考文献

- 1 梁惠, 张秀珍, 刘晖, 等. 山东省常见海产品蛋白质氨基酸含量分析. 海洋科学, 1999(6): 25-28
- 2 张树政. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社, 1984. 387-449
- 3 沈萍, 范秀容, 李广武主编. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1999. 26-46

STUDIES ON THE SCREENING OF PROTEASE-EXCRETED STRAINS FROM SEA FOOD AND ITS FLASK CULTURE CONDITIONS

LI Ai-Fen¹ SUN Zhi-Li² CHEN Min² LIU Yur-Tian² ZHOU Bai-Cheng³

(¹ Research Center of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou, 510632)

(² Department of Biochemistry, Yantai University, Yantai, 264005)

(³ Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Received: Sep., 9, 2002

Key Words: Sea food, Protease, Mutagenesis, Protease-excreted condition

Abstract

37 protease-excreted bacteria strains were isolated from the sea food crab and shrimp, among of them, YMD07 strain had higher excreted protease activity, that was 194.6 U/mL. A mutant strain named YMD79 was obtained from AS007 through multiple mutagenesis (Ultraviolet and DES). Then the several factors influencing the protease production were investigated by flask culture. The results showed that the optimum temperature and pH were 35℃ and 7.0 respectively. In above conditions, the protease-excreted activity was 240 U/mL after 190 min liquid culture for 36 ~ 40 h. Comparing with YMD07, the activity of YMD79 increased 20%. The optimum temperature of the protease was 35 ~ 45℃, and the optimum pH was 6.5 ~ 8.0. It belonged to neutral protease. (本文编辑: 张培新)