

一株蛋白酶产生菌的筛选及酶学性质研究

李林珂,高玉千,崔 锦,马向东*

(河南农业大学生命科学学院,河南 郑州 450002)

摘要:从牛奶场采集的土壤样品中筛选得到1株蛋白酶的高产菌株,经鉴定为枯草芽孢杆菌,其蛋白酶活力可达682.5U/ml。研究表明:酶反应最适温度为55℃,最适pH值为8.5。

关键词:蛋白酶;枯草芽孢杆菌;分离;筛选

中图分类号: TQ952⁺.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)03-0050-03

近年来,随着饲料工业的迅猛发展,在饲料中应用的酶制剂种类越来越多,并且取得了良好的喂养效果。在畜禽饲料中添加蛋白酶能够提高一些难以水解消化的蛋白质利用率,如血粉蛋白、膨化羽毛粉蛋白等。在家禽饲料和幼龄家畜饲料中添加是为了弥补体内蛋白酶的分泌不足,加速动物对蛋白质的分解消化吸收,提高蛋白质饲料利用率,降低粪便中含氮物质的排出,减少对环境的污染,提高畜禽生产性能。蛋白酶种类繁多,广泛存在于微生物中,1945

年,瑞士 Dr. Jagg 等首先发现并报道了微生物蛋白酶^[1]。蛋白酶提供了有潜力的处理各种食品工业、家庭生活废弃物的方法,它可变废为宝,提供大量的鱼或家畜的饲料,如 Dalew^[2]报道了一种使用枯草杆菌蛋白酶处理家禽屠宰场废弃羽毛的方法,它可使羽毛变为高蛋白质的饲料添加剂。近年来,我国科学工作者在蛋白酶方面进行了不懈的探讨,但是目前存在的蛋白酶种类仍过于单一^[3],已开发出的蛋白酶制剂尚不能满足国产饲用蛋白酶的需要,主

收稿日期:2005-11-27

基金项目:河南省科技攻关重点项目(0323013500)

作者简介:李林珂(1983-),男,河南漯河人,在读硕士研究生,主要从事微生物分子生物学研究。

通讯作者:马向东(1961-),男,湖北宜昌人,副教授,博士,主要从事微生物教学与研究工作。

表3 真空渗入浸染对芽生长的影响

浸染方式	≥2mm 芽率 (%)	≥5mm 芽率 (%)
普通浸染	31	17
真空渗入浸染(真空度 0.04MPa)	50	38

注:≥2mm 芽率=(≥2mm 芽的叶盘数/总出芽叶盘数)×100%;
≥5mm 芽率=(≥5mm 芽的叶盘数/总出芽叶盘数)×100%

3 结论

本研究显示,真空渗入浸染比普通浸染提高了烟草转化率,分化芽多、健壮;而获得较高转化率的关键是:控制合适的真空恢复常压时间。真空恢复常压时间为180s时,转化率最高;少于180s时,进气快,细胞物质外渗,叶细胞易受伤害,同时叶盘上会附有过多的农杆菌抑制叶盘的生长;恢复常压时间超过180s,起不到真空渗入的作用,转化率低。真空度在0.04MPa时,转化率最高,但与0.08MPa差异不明显,这与权瑞党等人^[8]的研究结果不同,可能是因为试验材料不同所致。不同的真空泵型号

以及外植体材料不同要求的真空恢复常压时间是否不同,有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 杨成丽,刘树楠,周吉源,等.高效烟草遗传转化体系的建立及甜蛋白基因的导入[J].生物技术,2004,14(2):9-11.
- [2] 郭丽红,陈善娜,龚明.根瘤农杆菌法转化烟草的条件探索[J].云南大学学报,2003,25(2):148-152.
- [3] 刘艳军,杨静慧,杨恩芹,等.提高农杆菌基因转化率方法的研究[J].西南农业大学学报,2003,25(2):144-146,171.
- [4] 巩振辉, Milner J J, 何玉科.拟南芥基因转移新方法—真空渗入法的研究[J].西北植物学报,1996,16(3):277-283.
- [5] 曹传增,刘凡,赵泓,等.影响不结球白菜真空渗入转基因频率的几个因素[J].华北农学报,2003,18(3):35-38.
- [6] 张广辉,巩振辉,薛万新,等.大白菜和油菜真空渗入遗传转化法初探[J].西北农业大学学报,1998,26(4):1-4.
- [7] 闫新甫.转基因植物[M].北京:科学出版社,2003.87-89.
- [8] 权瑞党,尚梅,张举仁.农杆菌介导的玉米自交系愈伤组织转化条件的优化[J].植物生理与分子生物学报,2003,29(3):245-250.

要是由于菌种酶活力低, 生产成本低, 因而其饲料营养研究有待于进一步深入展开。本研究报道了 1 株蛋白酶高产菌株的筛选、鉴定、产酶条件及酶学性质的研究情况。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为 4 份土壤样品, 采自郑州奶牛场(A)、河南农业大学校园(B)、郑州郊区菜园(C)、杜邦大豆蛋白公司厂区(D)。(1)分离培养基(%): 豆粕粉 40, 脱脂奶 10, 琼脂 1.5, 自然 pH。(2)种子培养基(%): 葡萄糖 1.0, 蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.5, KH_2PO_4 0.1, MgSO_4 0.02, Na_2CO_3 1.0, 自然 pH。(3)发酵培养基(%): 豆粕粉 40, 自然 pH。其他试剂为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 样品采集 选取采集地点地表植被根系周围的土壤, 首先除去地表浮土, 然后挖取 2~5 cm 深的土壤样品, 每个样品约取 500 g, 装入灭菌后的塑料袋内, 4℃冰箱中保存。

1.2.2 菌株分离 4 份土壤样品每份取样 10 g 置于已加入 90 ml 无菌生理盐水的三角瓶中, 220 r/min 旋转摇床, 20 min 后取稀释土样分别涂布于分离培养基表面, 37℃培养 24 h, 肉眼选出能产生透明圈的菌株。

1.2.3 菌株初筛 大试管(2.0 cm×20 cm)内装 5 ml 液体发酵培养基, 分别接入上述分离菌株, 37℃条件下 220 r/min 旋转摇床培养 48 h, 发酵液经 3 500 r/min 离心后, 以 0.5 cm 直径圆形滤纸片沾上清液贴于酪蛋白平板上, 于 30℃保温 24 h, 然后用直尺测蛋白酶水解圈直径, 根据平板上水解圈直径和菌落直径的比值(R/r), 选出能产生较大水解圈的菌株。

1.2.4 摇瓶发酵培养 将初筛得到的菌株经斜面活化后, 接一环于种子培养基(30 ml/250 ml 三角瓶)中, 37℃条件下 220 r/min 振荡培养 12 h, 按 1.5%的转种量转接至发酵培养基(30 ml/250 ml 三角瓶)中, 37℃继续振荡培养 48 h, 3 500 r/min 离心 30 min, 取上清液测碱性蛋白酶活力。

1.2.5 蛋白酶活力测定 按轻工业部部颁标准方法^[4]测定蛋白酶的活力。酶活定义: 1ml 酶液在 pH8.5, 50℃下, 每分钟水解酪蛋白产生 1μg 酪氨酸的酶量为一个酶活力单位, 以“U/ml”表示。

1.2.6 菌种鉴定 采用细菌形态染色观察及生理

生化反应对菌株进行鉴定^[5]。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶产生菌的分离

在 37℃培养 24 h 后, 在分离培养基上可以观察到一部分菌株周围产生肉眼可见的水解圈。从 4 份土样中共挑选出 127 个菌株, 其中 A、B、C、D 土样中各自选出 34, 16, 28, 49 个菌株。

2.2 蛋白酶产生菌的初筛

分离出来的菌株在酪蛋白平板上生长, 水解圈直径和菌落直径的比值(R/r)大于 3 的菌株共有 9 株, 列于表 1。

表 1 产蛋白酶菌株的初筛

水解圈直径和菌落直径的比值(R/r)	菌株数	比例(%)
> 4.1	1	0.79
3.6~4.0	5	3.9
3.1~3.5	3	2.4
2.6~3.0	46	36.3
2.1~2.5	58	45.7
< 2.0	14	11.0

2.3 蛋白酶产生菌的复筛

将表 1 中所列的 9 株细菌分别接种到发酵培养基中, 发酵培养后取上清液, 测定蛋白酶活力, 结果见表 2。从表 2 可知, 来自郑州市奶牛场的 A—19 菌株酶活力最高, 达到 682.5 U/ml, 且在重复试验的过程中, 该菌株产生的酶活力较稳定, 因此, 选择 A—19 菌株作为出发菌株, 进一步对其进行细菌学鉴定和酶学性质研究。

表 2 产蛋白酶菌株的复筛

菌株号	酶活力(U/ml)	菌株号	酶活力(U/ml)
A—19	682.50	C—15	91.50
A—09	61.50	C—03	80.90
A—21	298.70	D—26	439.50
B—14	92.00	D—12	20.00
C—23	30.50		

2.4 A—19 菌株的细菌学鉴定

形态特征: A—19 菌落为乳白色, 不透明, 表面光滑, 边沿不整齐, 呈锯齿状。斜面上菌层厚度中等。镜检观察为短直杆状, 大小 0.2~0.25μm×0.7~1.0μm, 芽孢端生, 形状椭圆。

生化特征: 菌体具有运动性; 革兰氏染色阳性; V.P 试验阳性; 厌氧条件下, 在洋菜培养基上不生长; 7%NaCl 中能生长; 葡萄糖发酵产气阳性; 能分解酪素; 淀粉水解为阳性; 作用于硝酸盐。

根据各项指标的检测结果, 依照《伯杰氏细菌鉴

定手册^[3], 可以认为, 筛选到的 A-19 号菌为枯草芽孢杆菌。

2.5 菌株培养及最佳产酶时间的确定

把 A-19 号菌种接种于摇瓶发酵培养基中, 220 r/min 旋转摇床, 37℃培养, 每隔 6h 取样测定 OD₆₆₀, 得出菌种的生长密度曲线和产酶活力曲线, 结果如图 1、图 2。

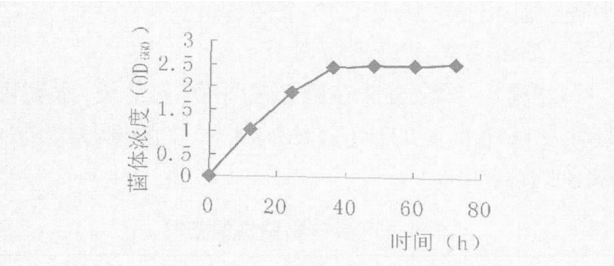


图 1 菌体浓度随时间的变化

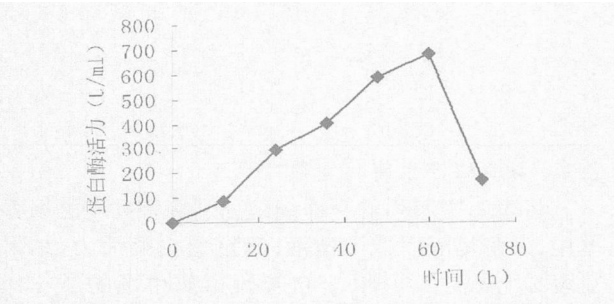


图 2 酶活力随时间的变化

图 1 显示, 菌体在 40h 内迅速上升, 以后处于稳定期, 稳定期 30h 以后开始衰亡。据试验中测定, 在培养初期, pH 值略有下降, 24h 后 pH 上升, 培养 72h 时, pH 达 9.0。据图 2 可以看出, 随着发酵时间的推移, 该菌产生的蛋白酶活力逐渐上升, 在 60h 时酶活力达到最高峰 682.5 U/ml, 随后酶活力开始迅速下降。综合图 1、图 2 可以得出结论: 产酶与菌体生长同步进行, 该酶生物合成类型属于同步合成型。

2.6 不同 pH 值和温度对蛋白酶活力的影响

提取酶液, 在不同 pH 值和不同温度下测定蛋白酶的活力大小, 结果见图 3、图 4。

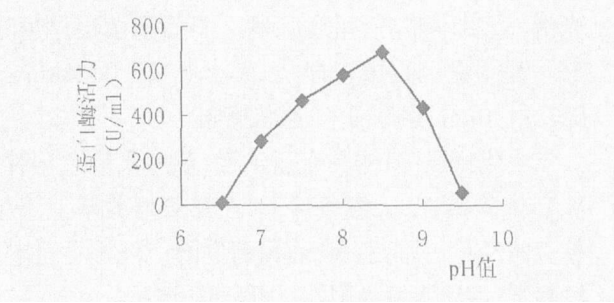


图 3 酶活力随 pH 值的变化

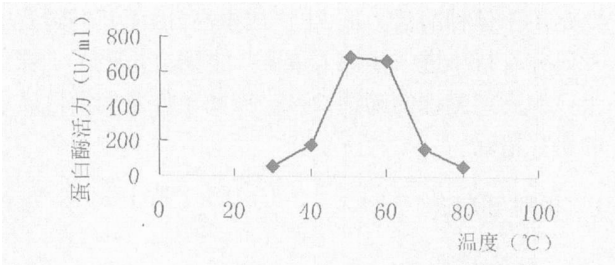


图 4 酶活力随温度的变化

由图 3 可知, pH 6.5 时酶活力非常低, 随着 pH 值的上升, 酶活力也逐步提高, 在 pH 值 8.5 时蛋白酶的活力达到最高, 随后酶活力开始迅速下降, 在 pH 7.5~9 的偏碱性范围内均有较高的酶活力。图 4 显示, 从 30℃开始酶活一直增强, 并在 55℃时达到最高, 在 50~60℃这一范围内蛋白酶活较高并且很稳定, 超过 60℃后, 酶活急剧下降。

2.7 蛋白酶的热稳定性

将粗酶液用 pH 7 的磷酸缓冲液适当稀释后, 分别放在 40℃、50℃、60℃、70℃中保温 30 min, 再在 55℃下测定其残余酶活力。40℃、50℃保温后, 活力几乎没有损失; 60℃保温仍保留 43% 的酶活力; 超过 60℃稳定性下降, 70℃10 min 活力全部丧失。说明该酶具有一定的热稳定性。

3 讨论

蛋白酶制剂目前已在饲料生产加工中得到应用。在饲料中添加蛋白酶制剂能促进畜禽对养分的消化、吸收, 提高饲料的利用率, 促进生长。蛋白酶制剂也可用于动物生产中, 对提高其生产性能将起很大的作用。如蛋白酶用于乳猪、仔猪、生长猪、蛋鸡、肉鸡、水产动物等饲料中, 可得到明显的效果。

本试验通过对菌株的初筛、鉴定、产酶条件及酶学性质 4 个方面进行研究, 确定了 1 株蛋白酶高产菌株枯草芽孢杆菌 A-19。另外, 我们计划从 A-19 菌株出发, 利用分子生物学手段, 对蛋白酶进行进一步的优化, 进一步提高其酶活力, 增强它在饲料加工过程中的稳定性, 使其作为酶制剂尽快在饲料产业中应用。

参考文献:

[1] 薛林贵. 我国碱性蛋白酶的应用及研究进展[J]. 微生物学通报, 1997, 24(6): 370-371.
[2] Dalev P G. Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrat[J]. Bioresource Technol 1994 (48): 265-267.
[3] 方海红, 胡好远, 黄红英, 等. 微生物碱性蛋白酶的研究进展[J]. 微生物学通报, 2002, 29(2): 57-59.
[4] ZB X 66030-87, 中华人民共和国专业标准蛋白酶活力测定法[S].
[5] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册(第 8 版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984.