

# 中国冰川 1 号产适冷蛋白酶耐冷菌的分离鉴定及产酶条件

史劲松<sup>1</sup> 吴奇凡<sup>1</sup> 许正宏<sup>1,2</sup> 陶文沂<sup>1,2\*</sup>

(江南大学<sup>1</sup> 生物工程学院<sup>2</sup> 教育部工业生物技术重点实验室 无锡 214036)

**摘 要:** 从中国冰川 1 号样品分离获得一株产适冷蛋白酶耐冷菌株 SYP-A2-3, 鉴定为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。该菌生长温度范围为 0~38℃, 最适生长温度 25℃, 而最适产酶温度为 15℃。所产蛋白酶为中性金属蛋白酶, 最适催化温度为 42℃, 低温催化活力较高, 适宜作用 pH 为 7.0~8.5, SDS-PAGE 测定的分子量为 34.2kD。SYP-A2-3 产酶条件的研究结果显示酪蛋白是较好的氮源, 葡萄糖、淀粉是较好的碳源, 产酶最佳 pH 为 6.5~7.0, 在优化的条件下, 15℃摇瓶产酶达到 3800U/mL, 5L 发酵罐通气培养产酶达 4800U/mL。

**关键词:** 适冷蛋白酶, 耐冷菌, 蜡状芽孢杆菌

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2005)02-0258-06

地球自然生态系统中存在很多异常寒冷的环境, 如极地、雪山、冰海或海洋深部区域, 能够在这样的环境下正常生长的微生物称适冷微生物(Cold-adapted microorganisms)。适冷微生物属极端微生物(Extremophiles)范畴, 是低温生态系统的主要成员, 并且是食物链中的重要构成环节之一。目前研究已初步揭示了适冷微生物在分子水平上、能量与物质代谢机制、细胞膜结构、蛋白质合成机制等方面与常温微生物均有较大的差异<sup>[1-2]</sup>。在应用研究领域, 主要集中在冷适酶类(如适冷蛋白酶、适冷淀粉酶、适冷脂肪酶等)、特定代谢产物(如不饱和脂肪酸)及低温环境修复等方面。由于适冷蛋白酶具有较高的低温催化效率和低热稳定性, 使其在日化产品、食品加工等行业具有较高的开发应用价值。近年来, 国内外从极地海洋的适冷微生物中已发现一些产低温蛋白酶菌株并开展了较为深入的研究, 相对而言, 陆地高寒环境下的适冷微生物研究较少。本文报道了从新疆“中国冰川 1 号”雪山微生物样本中分离并鉴定的一株产适冷蛋白酶菌株 *Bacillus cereus* SYP-A2-3 及其产酶条件的研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品和菌株** 样品来源于新疆的“中国冰川 1 号”。蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus* SYP-A2-3)是从

上述样品中分离并保藏的低温蛋白酶产生菌株。

**1.1.2 培养基和试剂** :PYG 培养基:每升含蛋白胨 5g, 酵母粉 10g, 葡萄糖 10g, CaCl<sub>2</sub> 0.2g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 1g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4g, NaCl 5g, pH 7.2。筛选培养基:每升含淀粉 10g, 酵母粉 5g, 酪蛋白 10g, 琼脂 20g, pH 7.0。斜面培养基:每升含蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, NaCl 10g, 琼脂 20g, pH 7.0。种子培养基:每升含葡萄糖 10g, 蛋白胨 5g, 酵母粉 5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 1g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g, NaCl 5g, pH 7.0。基础发酵培养基:每升含葡萄糖 10g, 酵母粉 4g, 酪蛋白 10g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, pH 7.0。上述培养基配置后于 100 kPa 灭菌 20 min。实验用酵母粉、蛋白胨为进口分装, 酪蛋白为上海化学试剂公司产品, 其他生化试剂及化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 产低温蛋白酶菌株的筛选

采用 PYG 培养基将上述微生物样品在 4℃培养 1 周后, 随机挑选单菌落并点种在酪蛋白平板上 15℃培养 3d 后, 挑选有透明圈的菌落经划线分离后获得单菌落, 接种于斜面培养基保存, 并分别进行摇瓶复筛。

### 1.3 菌种鉴定

**1.3.1 生长特性**:在温度梯度仪(Model TN-3, Advantec)上设置从 0~60℃的温度梯度测定生长温度特性, 使用含 0.5%~10%(W/V)NaCl 的种子培养基培养测定 NaCl 生长浓度范围。

基金项目: 国家“863 计划”(2001AA214101)

\* 通讯作者。Tel 86-510-5862412, E-mail: wuytao@sytu.edu.cn

作者简介: 史劲松(1971-)男, 江苏泗阳人, 高级工程师, 博士研究生, 研究方向为微生物发酵工程。E-mail: shijs@163.com

收稿日期: 2004-07-16, 修回日期: 2004-11-18

**1.3.2 生理生化试验** 按照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)方法进行碳源利用试验、氮源利用试验、甲基红试验(Methyl Red test, MR)、乙酰甲醇试验(Vagex-Proskauer, V-P)、触酶试验等各项试验。

**1.3.3 16S rDNA 序列扩增和序列分析** 扩增用引物为通用引物,正向引物 P1(27F):5'-GAGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3',反相引物 P2(1541R):5'-AAGGA GGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR 产物测序由上海基康生物技术有限公司完成,所测序列进入 GenBank 数据库进行相似性分析。

## 1.4 摇瓶和发酵罐产酶培养方法

斜面种子活化后接入种子培养基,培养 20h,按 2%接种量接入基础发酵培养基进行产酶培养。摇瓶培养采用旋转式摇床(上海欣蕊, HYG-II 型),250mL 三角瓶装 30mL 培养基,转速为 200r/min。发酵罐培养采用瑞士比欧公司 Bioengineering 5L 自控发酵罐,装液量为 4L,转速 400r/min,通气量 4L/min。无特殊说明,培养温度均采用 15℃。细胞生物量以培养液在 562 nm 的光密度值( $OD_{562}$ )表示。

## 1.5 产酶条件研究

**1.5.1 适宜产酶温度** 使用基础发酵培养基分别在 15℃、20℃、25℃ 下进行摇瓶,其他条件同 1.4。

**1.5.2 适宜初始 pH** 配制初始 pH 在 4.0~10.5 范围内的发酵培养基,按照 1.4 节的方法摇瓶发酵,考察培养过程中 pH 变化,测定 24h、48h 酶活及菌浓。

**1.5.3 氮源影响试验** 分别以酪蛋白、大豆粉、花生饼粕、蛋白胨及硫酸铵作为氮源,每种氮源添加量设 1%、2%、3%、5% 组,其他成分同基础发酵培养基。

**1.5.4 碳源影响试验** 分别以葡萄糖、可溶性淀粉、玉米粉、蔗糖为碳源,每种碳源添加量设 1%、2%、3% 组,其他成分同基础发酵培养基。

## 1.6 蛋白酶活力测定

采用改进的紫外法测定蛋白酶酶活。缓冲体系使用 pH 7.5 的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液,反应终止液(TCA)配方:0.11mol/L 三氯乙酸,0.22mol/L 醋酸钠,0.33mol/L 乙酸。稀释酶液 1mL 与 2mL 1.2% 酪蛋白液在 35℃ 反应 30min 后,使用 2mL TCA 进行终止(对照样在反应前先加 TCA),10min 后经滤纸过滤,于 275 nm 测定滤液吸光值( $A_{275}$ )。酶活定义为上述条件下,以酪蛋白为底物,每分钟催化产生 1 $\mu$ g 酪氨酸的酶量为一个蛋白酶活力单位(U)。

## 1.7 酶分离纯化和纯度检测

**1.7.1 粗酶提取** 发酵液经 12000r/min 冷冻离心 10min,上清液加入硫酸铵至饱和度 85%,离心收集

沉淀,以 3~5 倍 pH 7.2 的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液复溶,离心弃去不溶物,透析并浓缩,冻干获得粗酶。

**1.7.2 离子交换层析** 阴离子树脂为 DEAE Sephadex Fastflow,缓冲体系为 pH 9.0 的 30 mmol/L Tris-HCl。采用 0~1 mol/L NaCl 梯度洗脱(2mL/min),收集酶峰组份。

**1.7.3 凝胶层析** 使用 Pharmacia 的 AKTA Explorer 蛋白质纯化系统,凝胶介质为 Superdex G-75,缓冲体系为 pH 7.2 的 50 mmol/L Tris-HCl,上样量为 2 mL,蛋白质浓度 15 mg/mL。洗脱 1.3 倍柱体积,收集酶峰组份并冻干保存。上述分离纯化操作在 4℃ 低温室进行。

**1.7.4 酶纯度检测** 采用 SDS-PAGE(Mini Protean, BIO-RAD)进行分析,分离胶浓度 12%,浓缩胶浓度 5%,考马斯亮蓝(R250)染色,根据低分子量标准相对迁移率计算出酶蛋白分子量。

## 1.8 酶学性质研究

**1.8.1 酶最适温度测定** 按照 1.6 酶活测定方法,在 0~75℃ 范围内每隔 5℃ 测定不同温度下酶表征活力,以相对酶活绘制酶催化温度曲线。

**1.8.2 酶适宜 pH 测定** 分别以不同 pH 的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液配置 1.2% 酪蛋白溶液,作为测定酶活力的底物,按照 1.6 方法测定酶活,以相对酶活绘制酶催化的 pH 曲线。

**1.8.3 金属离子对酶活力影响** 分别配制含 1mmol/L 金属离子的 1.2% 酪蛋白溶液作为底物溶液,按照 1.6 方法测定各种离子体系下的酶活,以不加金属离子的为对照,计算相对酶活。

**1.8.4 抑制剂对酶活的影响** 在底物酪蛋白溶液中分别加入蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)和金属离子络合剂乙二胺四乙酸(EDTA)二钠,测定 0.1~1mmol/L 浓度范围内的抑制情况。上述实验使用的酶液均为分离纯化获得的纯酶。

## 2 结果

### 2.1 产蛋白酶耐冷菌株的筛选

通过透明圈筛选和摇瓶复筛,获得一株在低温培养条件下能够产生胞外蛋白酶的菌株,纯化分离后命名为 SYP-A2-3。

### 2.2 SYP-A2-3 形态和生理生化特性

SYP-A2-3 为革兰氏阳性杆菌,两端平圆,成对或者短链状排列,大小为(0.8~1.0) $\mu$ m $\times$ (2.5~3.5) $\mu$ m,无鞭毛(图 1)。在产芽孢培养基上生长 30h 可观察到芽孢形成,呈卵圆形,中生或近中生。该菌

好氧或兼性厌氧,生长温度范围为 0~38℃,最适生长温度 25℃。适宜生长 pH 范围 5.5~9.5,耐 NaCl 浓度为 8%,在 1%~2% NaCl 浓度下生长较好。该菌可较好利用葡萄糖、果糖、木糖、阿拉伯糖、麦芽糖、蔗糖、棉子糖、淀粉等碳源,能够利用硫酸铵、蛋白胨。V-P 试验、MR 试验、触酶试验、明胶液化试验呈阳性,吲哚试验及硫化氢产生试验呈阴性。

该菌 16S rDNA 全长序列为 1479 bp,与 ATCC 14579 相似度为 99%,结合形态特征和生理生化特性,将其鉴定为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。



图 1 SYP-A2-3 透射电镜照片(20000×)

Fig. 1 Photograph of SYP-A2-3 by TEM (20000×)

### 2.3 SYP-A2-3 的蛋白酶特性

采用离子交换层析和凝胶层析可实现 SYP-A2-3 胞外蛋白酶的纯化,SDS-PAGE 获得单一条带(图 2)根据标准蛋白条带的相对迁移率,计算该酶分子量为 34.2 kD。酶学性质初步研究表明,其适宜作用 pH 范围为 7.0~8.5,最适温度为 42℃。该蛋白酶在 0℃ 仍具有催化能力,25℃ 时酶活力相当于最高酶活的 60%,其低温催化活力较大,具有适冷酶的特征。金属离子  $Mn^{2+}$  对该酶有激活作用,而  $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Co^{2+}$  对其活性有一定的抑制作用。该酶活性基本不受丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 的抑制,但受 EDTA 强烈抑制(表 1),初步认为该酶属中性金属蛋白酶。

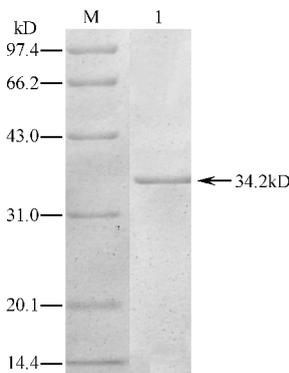


图 2 纯化获得的 SYP-A2-3 胞外蛋白酶电泳图谱

Fig. 2 SDS-PAGE of the purified extracellular protease produced by SYP-A2-3  
M. Marker ;1. SYP-A2-3.

表 1 金属离子和抑制剂对蛋白酶活力的影响

Table 1 Metal ions and inhibitors effects on the activity of the protease

| Ion or inhibitor /mmol/L | Relative activity /% | Ion or inhibitor /mmol/L | Relative activity /% |
|--------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|
| $Al^{3+}$                | 92.6                 | $Mg^{2+}$                | 1 99.4               |
| $Ba^{2+}$                | 102.5                | $Pb^{2+}$                | 1 94.3               |
| $Ca^{2+}$                | 104.3                | $Zn^{2+}$                | 1 100.8              |
| $Cu^{2+}$                | 82.4                 | PMSF                     | 0.1 94.3             |
| $Co^{2+}$                | 88.9                 | PMSF                     | 0.5 92.6             |
| $Fe^{2+}$                | 97.9                 | PMSF                     | 1 88.8               |
| $Fe^{3+}$                | 92.3                 | EDTA                     | 0.1 18.9             |
| $Hg^{2+}$                | 87.9                 | EDTA                     | 0.3 11.4             |
| $Mn^{2+}$                | 110.0                | EDTA                     | 0.5 5.6              |

### 2.4 温度和 pH 对 SYP-A2-3 生长和产酶的影响

以基础发酵培养基进行摇瓶产酶实验,研究 SYP-A2-3 在 15℃、20℃、25℃ 的产酶情况。结果表明,低温培养能够获得较高的酶量,15℃ 摇瓶在 60h 产酶达到 2500U/mL。较高的培养温度有利于菌体生长,也使产酶高峰提前,20℃ 和 25℃ 条件下培养时产酶高峰期分别为 45h 和 30h,但产酶水平则显著低于 15℃(20℃ 为 2000U/mL,25℃ 为 1500U/mL)(图 3-A)。当培养温度为 30℃ 时无蛋白酶活检出。

培养基初始 pH 在 6.5~8.5 范围内,SYP-A2-3 都能够较好地生长并产酶(图 3-B)。培养过程中,菌体生长对培养体系的 pH 表现出调节作用,反映在对数生长阶段,体系 pH 基本维持在 6.3~6.8,初始 pH 值高的呈现下降,初始 pH 低的表现为上升,其原因是氮源中蛋白质分子被降解释放出具有缓冲作用较强的氨基酸或小分子肽类。进入发酵后期,随着氮源物质逐渐被利用,蛋白酶开始大量合成,体系 pH 逐渐上升,发酵结束时达到 8.0~8.5,且 pH 值大小与产酶水平呈现出正相关性。由于对数生长

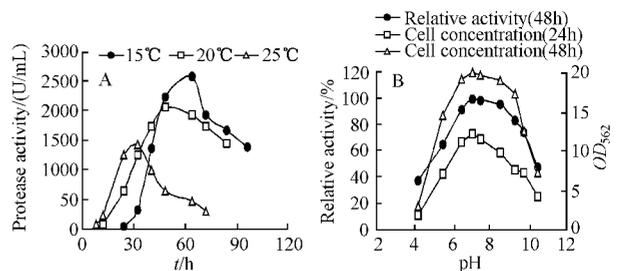


图 3 温度和初始 pH 对 SYP-A2-3 产酶的影响

Fig. 3 Effect of the temperature and initial pH on the cell growth and protease production by SYP-A2-3

阶段 pH 的自我调节作用是有一定限度的,并考虑到高 pH 下酶稳定性降低的特点,为避免发酵后期上升太高,初始 pH 适宜控制在 6.5~7.0。

## 2.5 氮源和碳源对 SYP-A2-3 产酶的影响

实验研究了酪蛋白、蛋白胨、豆粕、花生饼粉及硫酸铵对发酵产酶的影响(图 4-A)。以 2% 酪蛋白为氮源产酶最高,其次是 1% 的硫酸铵和蛋白胨。豆粕、花生饼粉等植物性蛋白原料廉价易得,是工业化生产蛋白酶常用原料,但并不适合 SYP-A2-3 低温蛋白酶的合成。

SYP-A2-3 能够较好地利用葡萄糖、果糖和可溶性淀粉发酵产酶,对二糖(蔗糖、麦芽糖)的利用效果不佳,图 4-B 为发酵培养 48 h 时的产酶情况,1% 的碳源添加量均优于 2% 和 3% 的添加量。

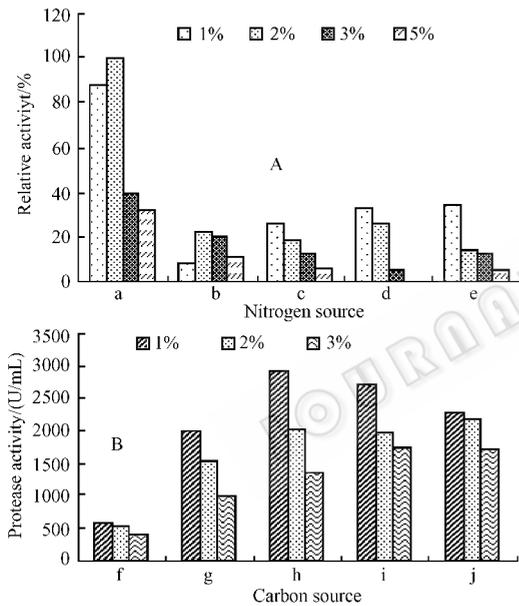


图 4 氮源(A)和碳源(B)对 SYP-A2-3 菌摇瓶产酶的影响

Fig. 4 The effect of different nitrogen source (A) and different carbon source (B) on the protease production by SYP-A2-3

a: Casein (Shanghai); b: Bean flour; c: Peanut flour; d: Polypeptone (Japan); e: Ammonium sulphate; f: Sucrose; g: Maltose; h: Fructose; i: Glucose; j: Starch.

## 2.6 发酵罐产酶研究

根据上述研究结果,对基础发酵培养基进行改进,通过摇瓶发酵进行验证,获得较为优化的发酵培养基配方:每升含葡萄糖 10g,酵母粉 3g,酪蛋白 20g,  $MgSO_4$  0.2g,  $K_2HPO_4$  3g,  $NaH_2PO_4$  3g,  $CaCl_2$  0.5g, pH 7.2。利用该培养基 15℃ 摇瓶培养 60h 产酶达到 3800 U/mL,同时使用上述培养基,在 5L 自控发酵罐进行放大实验,图 5 显示产酶曲线、菌体生长曲线

及体系 pH 变化情况。菌体生长在 24h 左右到达平衡期,较摇瓶实验提前了约 6h,同时细胞浓度也高于摇瓶发酵。蛋白酶的合成在 60h 达到 4800U/mL,与摇瓶发酵相比,产酶周期基本一致,但产酶水平明显高于摇瓶发酵实验。分析该菌的菌体生长及产酶情况发现,其蛋白酶的合成属于 II 型发酵模式,即部分生长耦联型。

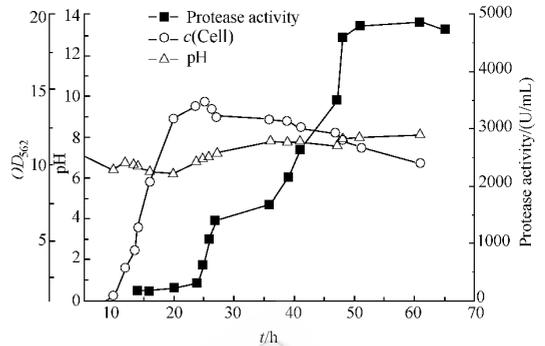


图 5 SYP-A2-3 在 5 L 罐上发酵过程曲线

Fig. 5 The progress of SYP-A2-3 fermentation in 5 L stirred jar

## 3 讨论

实验从中国冰川 1 号雪山微生物样本中分离获得一株产适冷蛋白酶菌株(SYP-A2-3),并鉴定为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。根据 Morita<sup>[4]</sup>对嗜冷菌(Psychrophile)和耐冷菌(Psychrotrophs)的定义,SYP-A2-3 能够在 0~5℃ 下缓慢生长,在 15~20℃ 下快速生长,并大量合成胞外蛋白酶,表明它是一株来源于陆地高寒生态环境下的产蛋白酶耐冷菌。*Bacillus cereus* 变种较多,Doroshenko<sup>[5]</sup>对 504 株 *B. cereus* 菌株进行了细致研究,发现在生长特征和胞外蛋白酶合成方面差别很大,SYP-A2-3 与模式菌株<sup>[3]</sup>的差异主要表现在生长和产酶特性方面,这是冰川高寒环境对其长期选择进化的结果,关于 *B. cereus* 的冷适应性目前尚没有相关报道,而对于 *B. cereus* 的所产的蛋白酶报道则主要集中在中温蛋白酶方面<sup>[6-8]</sup>。SYP-A2-3 与源于海洋的 *B. cereus* KCTC3676<sup>[9,10]</sup>相比,其最适生长温度和最佳产酶温度均较低,NaCl 的耐受浓度(8%)也低于海洋细菌,所合成的胞外金属蛋白酶在低温下也具有较高的催化能力。进一步比较来源于海洋和源于陆地高寒地带的 *B. cereus* 在蛋白酶的合成机制以及构效关系上的区别,对揭示耐冷机制和进化历程有重要意义。

影响 SYP-A2-3 产酶水平的主要因素是温度和

氮源。尽管 SYP-A2-3 适宜生长温度在 25℃ 左右,但适宜产酶温度是 15℃,其原因是适冷酶的热不稳定性。细胞向环境分泌酶的同时,体系中的酶也在不断的失去活性,因而产酶过程是一个动态的积累,较高的培养温度将导致失活速度的加快,从提高产酶水平角度,应该选择低温培养。但低温培养也将带来发酵周期的延长。此外,温度可能起到调控蛋白酶合成的作用, Sam 等<sup>[9]</sup>发现 *Bacillus cereus* KCTC3676 在较高温度培养(37℃)和低温培养(20℃)时,菌体所合成的是结构和功能上有差异的不同蛋白酶。通过蛋白酶活性电泳(Native PAGE)对 SYP-A2-3 培养过程进行检测,尚没有发现该现象。氮源既是菌体生长的营养物质,又作为酶诱导表达的前体物质,是发酵产酶的一个重要优化条件。有机氮源和无机氮源对产酶水平有较大的影响,而且不同来源的有机氮,以及在供给浓度上的差异,都会直接影响发酵过程。初始培养基中低分子量氮(如无机氮源、氨基酸、寡肽等)和高分子量的氮(蛋白质、多肽等)二者的比例是一个关键性指标,前者是速效氮,可使菌体得到快速生长,后者的代谢起到维系生长和诱导产酶作用。发酵培养基中的酵母粉能提供部分速效氮源,也同时提供生物素和微量元素等复杂营养。在利用粗料氮源时,适当增加酵母粉可提高产酶量,对豆粕进行适度水解处理也能够提高其利用效果,增加产酶量,这为粗料发酵提供一个优化的思路。碳源的添加量主要影响产酶周期,碳源浓度的提高将使菌体前期生长表现出一定的抑制,产酶时间滞后。菌体生长过程中对底物氮源的降解以及代谢产物的生成均对培养体系的 pH 起到一定的调节作用,因而初始 pH 只要控制在适宜的范围内,都对发酵产酶不造成太大的影响,但考虑到该蛋白酶在高 pH 环境下半衰期短的特点,应避免发酵后期的 pH 上升太大。在摇瓶发酵中,通过增加磷酸盐含量提高体系的缓冲能力来避免发酵后期 pH 的快速上升,在发酵罐上,可通过酸液的流加进行 pH 控制,但在流加方式和控制策略上需作进一步研究。

冷适蛋白酶因其在食品、环保及日化行业中的所具有的潜在应用前景开始受到人们的广泛关注,

我国一些研究机构也积极开展冷适蛋白酶生产菌株的筛选工作<sup>[11,12]</sup>。本文报道的 SYP-A2-3 菌在初步优化的条件下,酶活达到了 4800 U/mL,作为一株未经诱变改良的野生菌,其产酶水平相对较高,下一步优化工作将集中在氮源的供给模式、碳氮比以及 pH 控制策略等方面,并深入探讨 *B. cereus* SYP-A2-3 的产酶机制。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Nicholas J R. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles*, 2000, 4: 83 - 90.
- [ 2 ] Hanna-Kirsti S L, Nils P W, Arne O S. Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins. *Eur J Biochem*, 2000, 267 (4): 1039 - 1049.
- [ 3 ] Buchanan R E, Gibbons N E. Berger's manual of determinative bacteriology( eighth edition ). Baltimore: The Williams & Wilkins Company Press, 1974.
- [ 4 ] Morita R Y. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol Rev*, 1975, 39: 144 - 167.
- [ 5 ] Doroshenko E V, Loiko N G, Il'inskaia O N, et al. Characteristics of *Bacillus cereus* dissociants. *Mikrobiologiya*, 2001, 70(6): 811 - 819.
- [ 6 ] Sidler W, Kumpf B, Peterhans B, et al. A neutral protease produced by *Bacillus cereus* with high sequence homology to thermolysin: production, isolation and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1986, 25: 18 - 24.
- [ 7 ] Wetmore D R, Wong S L, Roche R S. The role of the pro-sequence in the processing and secretion of the thermolysin-like neutral protease from *Bacillus cereus*. *Mol Microbiol*, 1992, 6: 1593 - 1604.
- [ 8 ] Grass G, Schierhorn A, Sorkau E, et al. Camelysin is a novel surface metalloproteinase from *Bacillus cereus*. *Infect Immun*, 2004, 72(1): 219 - 228.
- [ 9 ] Sam S K, Young J K, Rhee I K. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674. *Arch Microbiol*, 2001, 175(6): 458 - 461.
- [ 10 ] Kim S S, Park Y, Rhee I K, et al. Influence of temperature, oxygen, m-chlorophenylhydrazine, cerulenine, and quinacrine on the production of extracellular proteases in *Bacillus cereus*. *Microbiol Biotech*, 2000, 10: 103 - 106.
- [ 11 ] 陈秀兰, 张玉忠, 王运涛, 等. 深海适冷菌 SM9913 产生的低温蛋白酶. *海洋科学*, 2001, 1: 4 - 9.
- [ 12 ] 孙 谧, 王跃军, 张云波, 等. 一株产低温碱性蛋白酶嗜冷海洋细菌 YS-9412-130 的分离和培养条件研究. *海洋水产研究*, 2000, 21(4): 1 - 5.

## Identification of psychrotrophs SYP-A2-3 producing cold-adapted protease from the No. 1 Glacier of China and study on its fermentation conditions

SHI Jin-song<sup>1</sup> WU Qi-fan<sup>1</sup> XU Zheng-hong<sup>1,2</sup> TAO Wen-yi<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup> School of Biotechnology, <sup>2</sup> Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract** : The psychrotrophs SYP-A2-3 producing the cold-adapted protease has been isolated from the bacterial samples collected from the No. 1 Glacier of China and identified as *Bacillus cereus* according to its morphological and physiochemical characteristics and 16s rDNA gene sequence analysis. It could grow between 0°C and 38°C while its optimal growth temperature was 25°C and the optimal temperature for its protease production was 15°C. The cold-adapted protease was identified as neutral metallo-protease, the molecular weight was 34.2kD shown by SDS-PAGE, the optimal pH and temperature for activity was 7.0 ~ 8.5 and 42°C, respectively. Various fermentation conditions of its protease production were also investigated. The results showed that casein was the best nitrogen source while glucose and starch were suitable carbon source for its protease production. The initial pH of fermentation broth ranged from 6.5 to 7.0 was optimal. Under optimized conditions, the protease activity produced by SYP-A2-3 could reach 3800 U/mL and 4800 U/mL conducted in shaking flask and 5 L stirred jar experiment, respectively.

**Key words** : Cold-adapted protease, Metallo-protease, Psychrotrophs, *Bacillus cereus*

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development ( 001AA214101 )

\* Corresponding author. Tel : 86-510-5862412 ; E-mail : wytao@sytu.edu.cn

Received date : 07-16-2004

### 2005 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

| 序号 | 会议名称   | 筹办单位   | 时间               | 人数  | 地点  | 联系人  |
|----|--|--|------------------|-----|-----|--|
| 1  | 2005 年中国工业微生物学术研讨会   | 中国微生物学会工业微生物专业委员会                            | 4 月              | 100 | 天津  | 王洪玲、杨华<br>022-60273281                             |
| 2  | 中国微生物学会人兽共患病原学专业委员会会议和中国人兽共患病杂志编辑委员会会议                           | 中国微生物学会人兽共患病原学专业委员会                          | 4 月              | 100 | 福建  | 万康林<br>010-61739438                                |
| 3  | 全国各省市自治区微生物学会秘书长会议   | 中国微生物学会                                      | 5 月              | 50  | 北京  | 王旭<br>010-62554677                                 |
| 4  | The 3rd International Symposium on Bio-control and Biotechnology | 中国微生物学会农业微生物专业委员会<br>湖北武汉华中农业大学农业微生物学国家重点实验室 | 5 月<br>10 ~ 13 日 | 150 | 武汉  | Dr. Liu Ziduo or<br>Miss Meng Ying<br>027-87283455 |
| 5  | 第五届国际工业微生物与生物技术学术研讨会   | 中国微生物学会分子微生物学及生物工程专业委员会                      | 6 月              | 200 | 上海  | 朱春宝 陈代杰<br>021-62479808x323                        |
| 6  | 第八次全国环境微生物学术研讨会  | 中国微生物学会环境微生物专业委员会                            | 8 月              | 100 | 哈尔滨 | 李顺鹏<br>025-4396314                                 |
| 7  | 资源微生物技术学术研讨会   | 中国微生物学会基础微生物专业委员会                            | 4 月/5 月          | 80  | 济南  | 曲音波 陈冠军<br>0531-8364429                            |

( 转接 274 页 )