

嗜碱性芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究

II. 诱变株选育及产酶条件

邱秀宝 袁影 戴宏 于颖

(中国科学院微生物研究所,北京)

嗜碱性的短小芽孢杆菌 R115 (*Alkaliphilic Bacillus pumilus*) 经 0.4mg/ml 亚硝基胍和 0.4 μ g/ml 利福平处理,获得一株具有高产稳产碱性蛋白酶的变异株 (B45), 产酶活力由 2803u/ml 提高到 6000u/ml (28 $^{\circ}$ C测定), 该诱变株的最适产酶条件为起始 pH10.5—11.0, 温度 30—35 $^{\circ}$ C, 培养时间 52—54h. 0.4—0.6% K_2HPO_4 可增加酶的产量。

关键词 嗜碱性芽孢杆菌;碱性蛋白酶

碱性蛋白酶最早发现在猪胰脏中, 1945年瑞士 Dr. Jaag 等发现了微生物碱性蛋白酶^[1], 可用于洗涤剂和皮革脱毛。近20年来对碱性蛋白酶的研究更加广泛^[1-9], 主要来源于地衣芽孢杆菌, 枯草芽孢杆菌等。我国碱性蛋白酶的研究近几年才有所发展^[10-12], 主要应用于加酶洗衣粉, 但品种单一。目前酶制剂厂及洗涤剂工业均迫切要求多品种生产, 特别对常温洗涤用酶更加需要, 1975年日本中岛基雄等已从沙门氏杆菌属中筛选到一株 B3038 产低温蛋白酶菌株, 在 pH 10 时最适温度为 27 $^{\circ}$ C。我们报道了嗜碱性短小芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究结果^[12], 在此基础上, 对原菌种进行诱变, 得到诱变株 B45, 本文报道诱变株选育及产酶条件。

材料和方法

(一) 菌种

嗜碱性短小芽孢杆菌 R115 (*Alkaliphilic Bacillus pumilus*) R115

(二) 培养基

1. 牛肉汁斜面: 牛肉汁中添加蛋白胨 1%, NaCl 0.5%, 葡萄糖 0.5%, 琼脂 1.5%,

pH 7.5—7.8。

2. 平板培养基: 同上, 补加 0.5% 酵母膏。

3. 牛肉汁液体培养基: 同牛肉汁斜面, 但不加琼脂。250ml 三角瓶装 25ml, 或在 18 × 20cm 试管中装 8ml, 1.05kg/cm² 灭菌 30min。

4. 摇瓶培养基: 采用豆饼粉-麸皮培养基, 每 250ml 三角瓶装 25ml。

(三) 诱变剂

亚硝基胍 (MNNG, 瑞典产品); 利福平 (意大利产, 简称 Ref); 甲酰胺 (北京化工厂产品)。

(四) 活力测定

Folin 试剂显色法。

结果和讨论

(一) 菌种诱变和选育

1. 菌种选育程序: 出发菌株 (R115) 自然分离 4 次 → W1-A37 → 亚硝基胍处理 → M51 → 自然分离 → M51-22 → 抗利福平处理 → L147 → 自然分离 → B45。

本文于 1988 年 9 月 6 日收到。

2. MNNG 诱变: 将培养好的纯菌细胞用不同浓度 (0.2—4mg/ml) 的 MNNG 于 30℃ 处理 30min, 用无菌生理盐水洗净细胞, 常规稀释到 10^{-3} — 10^{-6} /ml, 取 0.05 ml 涂布于分离培养基平板上, 30℃ 培养 24h, 共分离到产酶活力高的菌株 140 株。以 0.4mg/ml 剂量为最好, 得到的高产菌株占 30% (表 1)。

表 1 MNNG 诱变结果

Table 1 The result of mutation by MNNG

菌号 Strain number:	活力 Activity (u/ml)
W1-A37	3763.2
M8	3916.8
M33	4032.0
M35	4032.0
M36	4204.8
M39	4224.0
M51	4200.0
M52	3993.6
M58	3916.8
M104	3878.4
M116	4492.8

W1-A37 经 MNNG 诱变后平均活力达 4080u/ml, 最高活力为 4492.8u/ml, 平均提高 8.4%, 最高 19.4%。正变率达 7.1%。将其中活力较高的 M116、M36、M39 和 M51 分别进行自然分离及反复筛选, 其中 M51-22 活力达 4531.2u/ml。

3. 抗利福平突变株选育: 将培养 16h 的 M51-22 纯细胞, 用生理盐水稀释成 10^{-1} — 10^{-5} /ml, 涂布于含有 0.1—1.0 μ g/ml 不同浓度的利福平平板上, 结果在含 0.6 μ g/ml 以下的利福平平板上均出现抗株, 随着浓度加大而抗性减小。以 0.4 μ g/ml 利福平正变率最高, 占 29 株正变株中 13.24%, L147 号菌的活力最高。再经多次分离纯化获得 B45, 活力达 6000u/ml (表 2)。通过 MNNG 及利福平抗株筛选使酶活力提高

2.14 倍, 比原始菌株提高 11.8 倍。

表 2 MNNG 诱变株及抗利福平菌株的筛选结果

Table 2 The result of selection on mutation

菌号 Strain number	处理方法 Method of treatment	活力 Activity (u/ml)	提高倍数 Times
R115	野生菌	506	—
W1-A37	自然分离	2803.2	5.54
M51-22	0.4mg/ml MNNG	4531.2	8.95
L147	0.4 μ g/ml Ref	5222.4	10.32
B45	自然分离	6000	11.85

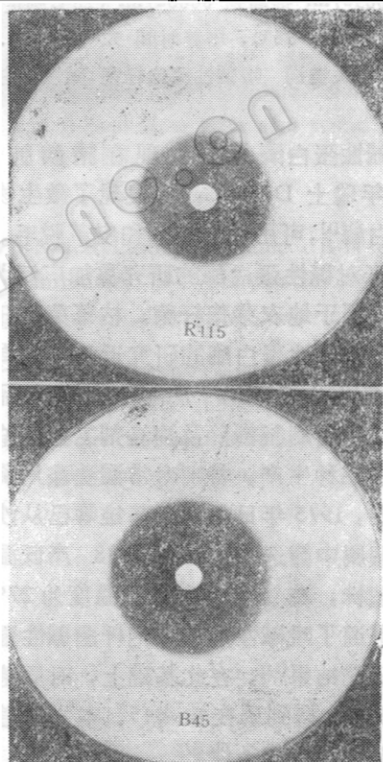


图 1 R115 和 B45 对 1% 酪蛋白水解能力的比较
Fig. 1 Comparison of proteolytic activity on casein plate

4. 酪蛋白平板水解活性的比较: 将 R115 及 B45 分别在牛肉汁液体培养基中 30℃ 培养 48h, 用直径为 0.5cm 滤纸片吸取等量酶液, 放入平板中心, 30℃ 放置 24 h, 观察水解圈大小, B45 水解酪蛋白的能

力明显大于 R115 (图 1)。

(二) 菌株及菌落的形态特征

1. 菌体形态的电镜观察: 将原始菌株 R115 及诱变株 B45 在牛肉汁液体培养基中培养 16h, 制铜网, 在电镜下观察(图 2 和图版 I-A)。这两株菌均生周生鞭毛, 在同样放大倍数下 ($\times 6000$), B45 的菌体大于 R115 并具有黑色颗粒状内含物, 而 R115 体内未见。

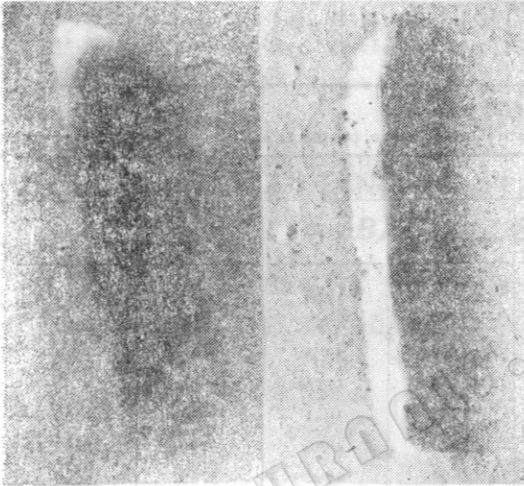


图 2 培养 24h 的细胞电镜观察

Fig. 2 Observation of cell for culture 24h by EM

1. R115 ($\times 15000$); 2. B45 ($\times 12000$)

2. 菌落形态比较: 将 R115 及 B45 分别在牛肉汁平板和 BPY 平板培养基上 30°C 培养 24h (结果见图版 I-B)。R115 菌落小, 边缘整齐, 而 B45 菌落大, 边缘呈明显的花纹状。

(三) 发酵条件的研究

1. 起始 pH 对产酶的影响: 将摇瓶培养基分装于 250ml 三角瓶中, 每瓶 25ml; pH 分别调到 8—13, $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$ 灭菌 30min。培养结果表明, B45 可在极碱性环境中生长, 最适 pH 为 10.5—11.0。

2. 种龄对产酶的影响: 将 B45 菌接入牛肉汁培养基中, 30°C 培养不同时间, 然

后将不同种龄的菌种接入摇瓶培养基中, 接种量为 4%, 30°C 摇床培养 48h。结果表明, 种龄在 12h 以上对产酶影响不大。

3. 磷酸盐对产酶的影响: 在豆饼粉培养基中加入不同磷酸盐, 比较对产酶的影响(结果见表 3)。0.4—0.6% K_2HPO_4 与 0.03% NaH_2PO_4 配合使用产酶效果最好。

4. 表面活性剂对产酶的影响: 在豆饼粉培养基中加入不同浓度的表面活性剂, 比较产酶的影响(表 4)。用 0.03% J.F.C. 使产酶量提高 26%。

5. 培养时间对产酶的影响: 将 B45 接入豆饼粉培养基中, 于 30°C , 摇床 ($184\text{r}/\text{min}$) 培养不同时间, 比较最适产酶时间(表 5)。在 pH 10.5 条件下, 最适培养时间为 54h, pH 高产酶时间推迟。

6. 通气量对产酶的影响: 将不同体积的豆饼粉培养基分装于 250ml 三角瓶中, 接种后 30°C 摇床培养 52h。实验证明风量对产酶影响不大。

7. 培养温度对产酶的影响: 将接种好的摇瓶培养基在不同温度 (25, 30, 35, 40°C) 下 $300\text{r}/\text{min}$ 培养 52h, 常规法测活力, 培养温度以 $30\text{—}35^{\circ}\text{C}$ 为最佳(图 3)。

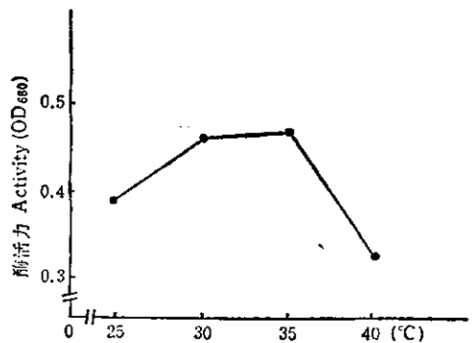


图 3 培养温度对产酶的影响

Fig. 3 Effect of culture temperature on enzyme production

8. 金属离子对产酶的影响: 在豆饼粉培养基中加入 0.04% 不同离子, 30°C 培

表3 不同磷酸盐对产酶的影响

Table 3 Effect of different phosphate on the enzyme production

No.	K_2HPO_4 (%)	KH_2PO_4 (%)	NaH_2PO_4 (%)	Na_2HPO_4 (%)	Activity (u/ml)
1	0.1	0.03	0	0	4300.8
2	0.2	0.03	0	0	4300.8
3	0.4	0.03	0	0	4608.0
4	0.6	0.03	0	0	5068.8
5	0.8	0.03	0	0	4769.3
6	0.1	0	0.03	0	5068.8
7	0.2	0	0.03	0	5145.6
8	0.4	0	0.03	0	5606.4
9	0.6	0	0.03	0	5700.0
10	0.8	0	0.03	0	4992.0
11	0	0	0.03	0.4	3686.4
12	0	0.03	0	0.4	3763.2

表4 表面活性剂对产酶的影响

Table 4 Effect of surfatants on enzyme production

表面活性剂名称 Surfactant	活力 Activity (u/ml)	表面活性剂浓度 Surfactant conc.(%)				
		0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
洗衣粉	3600	3600	3680	4000	3360	3600
吐温	4160	4160	3840	4400	3680	3840
AlbegalB	3680	3680	3760	3920	3600	4480
拉开粉	4240	4240	3600	3120	2800	3360
OD ₁₀	4080	4080	3760	3840	3920	4000
J.F.C.	3520	3520	3680	4960	3760	3600
平平加	3840	3840	3600	4080	3760	3680
胰加漂	3680	3680	4080	3920	3760	3680
柔软剂 FC	3920	3920	4000	3840	3920	3760
对照	3920	3920	3920	3920	3920	3920

表5 培养时间对产酶的影响

Table 5 Effect of cultural time on enzyme production

培养时间 Time (h)	活力 Activity (u/ml)	培养基 pH Medium pH	
		10.5	11
24	0		0
36	598.4		0
48	2431	1346.4	
50	2356.2	2169.2	
52	2917.2	2917.2	
54	4263.6	3403.4	
56	3777.4	3291.2	
58	3590.4	3440.8	
60	3889.6	3553	
72	3814.8	3702.6	

养 52h, 比较各种离子对产酶的影响。K⁺、Mg²⁺ 对酶的产生均有促进, 而 Cu²⁺ 对酶有明显抑制作用, Fe³⁺ 和 Na⁺ 无影响。

9. 接种量对产酶的影响: 将培养 24h 的液体种子, 按 1—5% 不同量分别接入豆饼粉培养基中, 30℃ 摇床培养 52h。以 4% 接种量为最好, 2—5% 均可采用。

讨 论

嗜碱性芽孢杆菌 B45 具有耐强碱的特点, 在 pH 11—13 环境中仍能生长, 它是一个很有价值的生产菌。所产的酶对 Fe³⁺

不敏感,对生产设备的选型有益,某些表面活性剂也有利于酶的释放和产生。

参 考 文 献

- [1] Rose, A. H.: *Economic microbiology*, Academic press, London, 5:51—72, 1980.
- [2] 伊藤万藏等: *药理学杂志*, 88(12): 1583—1590, 1968.
- [3] Lenard, K. et al.: *Biotechnology and Bioengineering*, 7: 213—249, 1970.
- [4] Horikoshi, K. et al.: *C. A.*, 74(3): 63198u 1971.
- [5] 嶋村睦夫等: 特许公报, 昭和46, 42956, 1971.
- [6] 福本寿一郎等: 特许公报, 4501, 1972.
- [7] Ohaca, T. et al.: *Agr. Biochem.*, 36(10): 1797, 1972.
- [8] Hagashi, K. et al.: *Agr. Biochem.*, 36(10), 1755, 1972.
- [9] Nielsen, M. H, et al.: *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 58(55):644—649,1981.
- [10] 橋本洋一: 蛋白质核酸酵素, 28(11): 1220, 1983.
- [11] 水沢清: 化学と生物, 12(5): 311, 1974.
- [12] 邱秀宝等, 微生物学通报, 15(3): 101—104, 1988.
- [13] Aunstrup, K. et al.: *C. A.*, 78(13): 82948n, 1973.
- [14] 人木佐明等: 特许公报, 19874, (1),1975.
- [15] Tohru, K. et al.: *Agr. Biochem.*, 49(3): 693—698, 1985.
- [16] 中岛基雄等: 特许公报,昭和 50-11997,1975.
- [17] 朱孔生等: 食品与发酵工业, 5(1—5): 1981.
- [18] 胡学智: 酶制剂工业(张树政主编), 科学出版社,北京, p. 387—449, 1984.

STUDY ON ALKALINE PROTEINASE FROM ALKALIPHILIC *BACILLUS PUMILUS*

II. RESEARCH ON THE SELECTION OF HIGH PRODUCING STRAIN AND THE CONDITIONS FOR ENZYME PRODUCTION

Qiu Xiubao Yuan Ying Dai Hong Yu Ying

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A mutant strain B45 with high yield of alkaline proteinase and stability was obtained from alkaliphilic *Bacillus pumilus* R115 by treatment of 0.4 mg/ml MNNG and 0.4 µg/ml Rifampicin. The enzyme activity was improved from 2803 u/ml to 6000 u/ml (assayed at 28°C). The optimum conditions for enzyme production were: initial pH 10.5—11.0, 30°C

for 52—54 h. 0.4—0.6% K₂HPO₄ had a positive effect on the enzyme production.

Key words

Alkaliphilic *Bacillus pumilus*; Alkaline proteinase

图 版 说 明

Explanation of plate

图版 I-A 鞭毛的电镜观察

Plate I-A Observation of flagellum by EM

1. R115 (×12000); 2. B45(×8000)

图版 I-B. 左: 在牛肉汁平板培养基上生长的菌落

Plate I-B. Left: Colony on the Beef

Extract medium

1. B45; 2. R115

右: 在 BPY 培养基上生长的菌落

Right: Colony on the BPY medium

3. B45; 4. R115