

嗜碱菌碱性蛋白酶菌株的筛选

程丽娟 来航线 霍克光*

(西北农业大学 陕西杨凌 712100)

摘 要

自新疆、宁夏、陕西采集了45份盐碱地区土壤,分离筛选到一株碱8菌株,经初步鉴定属于蜡状芽孢杆菌(*Bac. cereus*)。该菌在pH9以上的培养基上生长、产酶;于37℃、pH10、种龄14h、接种量1%、发酵48h的条件下,酶活稳定,酶活力达1089u/ml。

关键词 嗜碱性;蛋白酶;蜡状芽孢杆菌

特种微生物资源的开发利用,是近20年来备受人们关注的问题。分布于自然界高碱环境下的某些微生物就是其中之一。由于它们经受了长期的自然选择和驯化,具有与普通微生物不同的生理生化特性,特别是产某些特殊酶类,如碱性蛋白酶,若应用于洗涤、制革、处理工业废弃物,进行盐碱土改良等,无疑具有重要理论意义和应用价值^[1,2]。

1 材料与方 法

1.1 样品来源

采自新疆、宁夏、陕西等地的重盐碱土壤45份。

1.2 培养基

菌种斜面培养基:肉汁—胨培养基加入酵母膏0.5%,pH调为10。

分离培养基(%):可溶淀粉1.0g,酵母膏0.5g,蛋白胨0.5g, K_2HPO_4 0.1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02g,脱脂奶粉5.0g,pH为10。

发酵培养基(%):于分离培养基中加入牛肉膏1.0g,pH为9。

酪素水解培养基(%):脱脂奶粉5.0g,琼脂1.5g。

1.3 菌种分离纯化

常规土壤稀释分离法。

1.4 菌种筛选

1.4.1 初筛 酪素水解法^[3]。于牛奶平板上以点滴法接种,培养1、3、5天,观察菌落形成、发育与形成酪素水解圈之大小,挑选目标菌移接于菌种斜面培养基上保存。

1.4.2 复筛 Folin法^[4],接种初筛菌株于液体发酵培养基中(250ml三角瓶装量25ml),置

* 西北农业大学九四届毕业生。

旋转式摇床上(转速 240-280 转/分),振荡培养 48h,离心取清液,即粗酶液。以 Folin 试剂显色法测定酶活。在 $\lambda 680\text{nm}$ 下用 721 型分光光度计比色测定。

2 结果

2.1 菌种分离与初筛

用强碱性培养基从 45 份土样中分离出 29 株嗜碱性细菌菌株。经酪素水解试验,获得有分解酪蛋白能力的菌株 19 株,其中水解圈直径大于 2.0cm 的有 10 株,占参试菌株 65.5%。

2.2 复筛

将初筛所得的 10 株菌进行发酵试验,反复比较,选出了 7 株产酶稳定、酶活较高的菌株(表 1),其中碱 8 菌株较突出,故对碱 8 菌株做进一步探讨。

表 1 产碱性蛋白酶菌株的复筛结果

菌株号	来源	水解圈(cm)	酶活力(u/ml)	发酵液 pH
B-2	新疆	2.0	47.79	9
D-2	新疆	2.3	53.48	9
1-1	陕西大荔	2.4	53.46	9
8-①	陕西大荔	2.5	70.44	9-10
11-1	陕西大荔	2.1	47.78	9
碱-7	宁夏平罗	2.3	61.00	9
碱-8	宁夏平罗	>9	836.47	9-10

2.3 碱 8 菌株的细菌学鉴定^[5,6]

2.3.1 形态特征 细胞杆状,有成链状,两端钝圆,营养体大小为 $1.25 \times 2.45 - 4.38\mu\text{m}$,芽孢中生,椭圆状、大小为 $0.92 \times 2.68\mu\text{m}$,无荚膜,周生鞭毛, G^+ 菌。在肉汁一胨平板上的菌落圆形,较大(约 1cm),色淡黄,表面平坦,但不光滑,呈麻点,具蜡质光泽,边缘正齐,不透明。

2.3.2 生理特性 肉汁液体培养中生长均一。水解淀粉和酪素。在 7% NaCl 中生长,在 pH9-11 中能生长且产酶。经参照《一般细菌常用鉴定方法》鉴定,依据《芽孢杆菌属》进行分类,初步认定该菌株为蜡状芽孢杆菌。

2.4 产酶条件测试

2.4.1 种龄、接种量与 pH 对产酶的影响

以种龄 12 与 14h 的培养体,按 1%、2%、4% 的接种量,分别接入 pH 为 9、10、11 的发酵液中,在 28℃ 下振荡培养 48h,测酶活。其结果列于表 2。

表 2 种龄、接种量、pH 对酶活的影响

种龄(h)	接种量(%)	pH 值	蛋白酶活力(u/ml)
12	1	9	883.1
		10	979.0
		11	891.2
	2	9	889.3
		10	991.2
		11	934.3
14	4	9	863.8
		10	984.3
		11	877.8
	1	9	907.8
		10	1012.1
		11	964.1
2	9	898.9	
	10	999.2	
	11	957.9	
4	9	878.7	
	10	989.6	
	11	921.8	

表2表明,碱8菌株在pH10时产酶活性最好;接种量以2%时的酶活最高;而种龄虽对酶活有一定影响,但不显著。在pH为10,接种量为1%,种龄在14h时,该菌株酶活可达1012.4u/ml。

2.4.2 温度对酶活的影响

将种龄14h的种子液,以1%接种量接入pH10的发酵液中,分别在30、35、37、40℃温度下,振荡培养48h,测其酶活。结果(表3)表明,该菌株产酶最佳温度为37℃。

2.4.3 培养时间对酶活的影响

将培养14h的种子液以1%接种量接入pH为10的发酵液中,37℃下振荡培养。分别培养12、24、36、48、60、72h。其酶活测定结果见表4。

表3 温度对酶活的影响

温度(℃)	30	35	37	40
酶活力(u/ml)	947.3	964.9	1062.9	938.6

表4 培养时间对酶活的影响

培养时间(h)	12	24	36	48	60	72
酶活力(u/ml)	53.7	891.0	907.8	1089.7	1081.1	983.4

由表4可知,在37℃,pH为10条件下,以48h发酵时间的酶活最高。时间延长酶活无增加趋势。

综上所述,从宁夏平罗重盐碱土中分离筛选到的产碱性蛋白酶较强菌株——碱8号,经细菌学鉴定,属于蜡状芽孢杆菌(*Bac. cereus*);该菌株在本试验条件下,37℃、pH10、经48h发酵,获得了一定量的碱性蛋白酶,其酶活稳定,酶活力能达1089u/ml,是常温条件下产酶较好的有效菌株,可作为良好的种质材料进一步培养并开发应用。

参 考 文 献

- [1] 王大珍,极端环境微生物及其应用,生态学进展,1989,6(2):79-81。
- [2] 陈淑阴,郑连爽,嗜碱性细菌研究进,微生物通报,1991,18(3):166-169。
- [3] 张纪忠主编,微生物分类学,复旦大学出版社,1990,第103页。
- [4] 贾士儒、赵树欣、刘红英,碱性蛋白酶产生菌嗜碱性芽孢杆菌的筛选,食品与发酵工业,1991,5:28-31。
- [5] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著,一般细菌常用鉴定方法,科学出版社,1978,110-120,127-129,187-191。
- [6] R. E. 戈登等著(蔡妙英等译),芽孢杆菌属,农业出版社,1983,47-49,107-180。

《根际研究法》已正式出版

中国科学院南京土壤研究所刘芷宇等编著的《根际研究法》已由江苏科技出版社出版。全书共16章,内容包括:根际显微形态观察法,养分原位测定法,根系分泌物检测法,根际微生物和酶测定法等。该书(精装本)每册定价26元。需要购买的单位和个人可与中国科学院南京土壤研究所许曼丽同志联系。