

两株放线菌的鉴定及产酶条件和酶学性质初探

郭艳^{1,2}, 杨文清^{1,2}, 刀娅^{1,2}, 胡斌^{1,2}, 曹艳茹^{1,2*}

(1. 昆明学院 生命科学与技术系, 云南 昆明 650214;

2. 云南省高校特色生物资源开发与利用重点实验室, 云南 昆明 650214)

摘要:对分离到的两株放线菌 KC198 和 KC266 进行鉴定、产酶条件和粗酶性质研究。经 16S rDNA 系统进化分析发现, KC198 为 *Actinorectispora* sp., KC266 为 *Kibdelosporangium* sp.。同时考察了发酵培养基和产酶时间对两株菌产蛋白酶的影响, 并对两株菌的粗酶性质进行研究。试验表明, KC198 和 KC266 在酵母膏-蛋白胨培养基中发酵产酶较好, 且分别在发酵第 7 d 和第 8 d 酶活较高; 两株菌的蛋白酶酶活在 28℃ 时达最高; KC198 和 KC266 分别在 pH 值为 8.9 和 10.0 时酶活最佳。研究结果可为工业酶制剂的生产提供菌种来源。

关键词:放线菌; 鉴定; 蛋白酶; 产酶条件; 酶学性质

中图分类号:Q939.132 **文献标识码:**A **文章编号:**1674-5639(2017)06-0107-05

DOI:10.14091/j.cnki.kmxyxb.2017.06.024

Identification of Two Actinomycete Strains and Study on Fermentation Conditions and Enzymatic Properties

GUO Yan^{1,2}, YANG Wenqing^{1,2}, DAO Ya^{1,2}, HU Bin^{1,2}, CAO Yanru^{1,2*}

(1. Department of Life Science and Technology, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214;

2. Key laboratory of Special Biological Resource Development and Utilization of Universities in Yunnan Province, Kunming, Yunnan, China 650214)

Abstract: The isolated two strains KC198 and KC266 have been studied to get identification, enzyme-producing condition and crude enzymatic properties. After 16S rDNA system evolution analysis, we found that the strain KC198 belonged to genus *Actinorectispora* and KC266 belonged to genus *Kibdelosporangium*. Meanwhile, the fermentation medium and enzyme-producing time affecting the production of protease were observed and their crude enzymatic properties were studied. The experiment showed that the optimum fermentation medium is Yeast extract peptone medium for two strains, the fermentation time for KC198 is 7 days and KC266 is 8 days. The optimum temperatures for two strains are both 28℃ which the enzymatic activity was the highest. The optimum pH value is 8.9 for strain KC198 and 10.0 for KC266, respectively. These provide bacteria source for industrial enzyme production.

Key words: actinomycete; identification; protease; enzyme-producing condition; enzymatic properties

21 世纪是基因的世界,也是酶的世界。酶通过降低反应的活化能从而加快反应速率,与其他非生物催化剂不同的是,酶具有高度的专一性,只催化特定的反应或产生特定的构型。随着科技的发展,酶这一高

效生物催化剂在工业和人们的日常生活中发挥着越来越重要的作用。我国酶制剂工业的递增速度约为每年 10%^[1],酶制剂现已被广泛应用到食品、医药、环境、畜牧业、工业、能源等众多领域^[2]。在众多的工业

收稿日期:2017-08-04

基金项目:云南省应用基础研究计划资助项目(2013FZ096);昆明学院云南省高校特色生物资源开发与利用重点实验室开放基金资助项目(GXK2015);云南省高校优势特色重点学科(生态学)建设资助项目;国家自然科学基金资助项目(31300012,31660002);国家级大学生创新创业训练计划资助项目(201611393004)。

作者简介:郭艳(1994—),女(彝族),云南红河人,本科生,主要从事生物科学研究。

* **通讯作者:**曹艳茹(1983—),女,内蒙古乌海人,副教授,博士,主要从事微生物教学及研究, E-mail: yanrucao3@aliyun.com.

用酶中,蛋白酶(Protease)属于水解酶类,是催化蛋白质肽键水解的一类酶的总称.它将蛋白质分解为游离氨基酸或多肽,是一种重要的工业酶制剂,在生产生活中占有举足轻重的地位,约占酶制剂市场的60%^[3],对我国经济的发展起着重要的作用.

目前,我国已应用于生产的蛋白酶品种有21种^[4],在工业、环保、医药、农业和食品等行业广泛使用.蛋白酶种类繁多,按其发挥催化反应的最适pH值,分为酸性、中性和碱性蛋白酶;根据其获取的来源,蛋白酶可以分为动物蛋白酶、植物蛋白酶以及微生物蛋白酶^[5].从1945年Jag等人发现了微生物碱性蛋白酶后,微生物蛋白酶在接下来的几十年中得到了较为全面、快速地发展.据有关统计^[6],微生物蛋白酶在全球蛋白酶的销售额中大约占了40%的份额.微生物蛋白酶可以分为细菌蛋白酶、真菌蛋白酶和病毒蛋白酶.当前工业上投入使用的大部分蛋白酶主要为中性和碱性蛋白酶,都来源于细菌.实验研究^[7]表明,目前已发现的产生胞外蛋白酶的细菌主要有枯草杆菌、大肠杆菌、芽孢杆菌、弧菌等,其中用于蛋白酶工业生产最主要的菌株是芽孢杆菌.随着20世纪90年代后期基因工程的出现,发酵工程的发展及发酵设备的更新,微生物已逐渐成为工业酶制剂获取的主要渠道.由于微生物具有繁殖速度快、易于大批量生产、种类繁多、酶品种较齐全等特点,加之其胞外酶易纯化、大大降低了生产成本^[8]等优点,因此其具有其他蛋白酶来源无法比拟的优势.

但相对国外而言,我国的蛋白酶工业研究还有很多需要改进的方面,如微生物资源开发力度不够、酶的种类和品种少且单一、酶作用范围较窄、酶活力低、价格高、酶市场供不应求、大多为粗品有待进一步分离纯化等^[9].因此,在生产技术不断提高的基础上,寻找和开发新型微生物蛋白酶资源,筛选和研究新的优质产酶菌株,仍然具有重要的科研和应用价值.在前期试验中,本研究小组从稀土矿样品中分离获得2株产蛋白酶能力较强的放线菌,本文对这两株菌进行鉴定,优化其发酵条件,并对其酶学性质进行研究,可为微生物酶资源开发利用提供理论依据,同时也为工业酶资源提供新的微生物菌种研究资源.

1 材料与方法

1.1 菌种来源

放线菌菌株 KC198 和 KC266 分离自稀土矿

样品.

1.2 试验方法

1.2.1 菌株鉴定

将 KC198 和 KC266 培养后获取菌体,按曹艳茹等人^[10]的方法进行菌株 16S rRNA 基因的系统进化分析及鉴定.

1.2.2 蛋白酶活初筛

鉴定蛋白酶时,在固体培养基中加入脱脂牛奶,造成浑浊、不透明的培养基背景.将待测菌株接种后,如有蛋白酶产生,将蛋白质分解利用,形成透明圈.如不产生蛋白酶,则不会形成透明圈.

1.2.3 产酶条件优化

本试验主要从发酵时间和培养基类型两方面进行产酶条件优化.培养基采用了酵母膏-蛋白胨培养基和脱脂奶粉培养基,通过从接种第3d开始每天取发酵液,在上述两种培养基上打孔加入发酵液,置于在28℃恒温培养箱中,分别记录3,4,5,6h的水解圈大小,根据产生的水解圈大小,确定较优发酵培养基和最佳发酵时间.

1.2.4 酶活性质初探

在确定最佳产酶条件后,将 KC198 和 KC266 接种至产酶较好的培养基即酵母膏-蛋白胨液体培养基中,分别在 KC198 和 KC266 的最适发酵时间收集发酵液,冻干制成粗酶粉,采用福林酚法测定酶活力.

1) 最适 pH 值的测定. 配制 pH 为 7.1, 7.5, 8.0, 8.5, 8.9, 9.5, 10.0, 10.3, 10.6 的 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液,以不同 pH 缓冲液配制 2% 酪蛋白底物,在温度为 28℃ 的恒温水浴锅中测定酶液在上述不同 pH 条件下的活力以确定菌株酶液的最适反应 pH.

2) 反应最适温度的测定. 分别以 KC198 和 KC266 的最适 pH 缓冲液配制 2% 酪蛋白底物,设置恒温水浴锅水温为 20, 30, 40, 50℃,分离菌株采用的温度为 28℃,通过分别测定酶液在不同温度下的活力来确定该酶液的最适反应温度.

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定结果

经 16S rRNA 基因的系统进化分析,菌株 KC198 和 KC266 分别是 *Actinorectispora* 属和 *Kibdelosporangium* 属的两株菌,其系统发育分析如下图 1 和图 2.

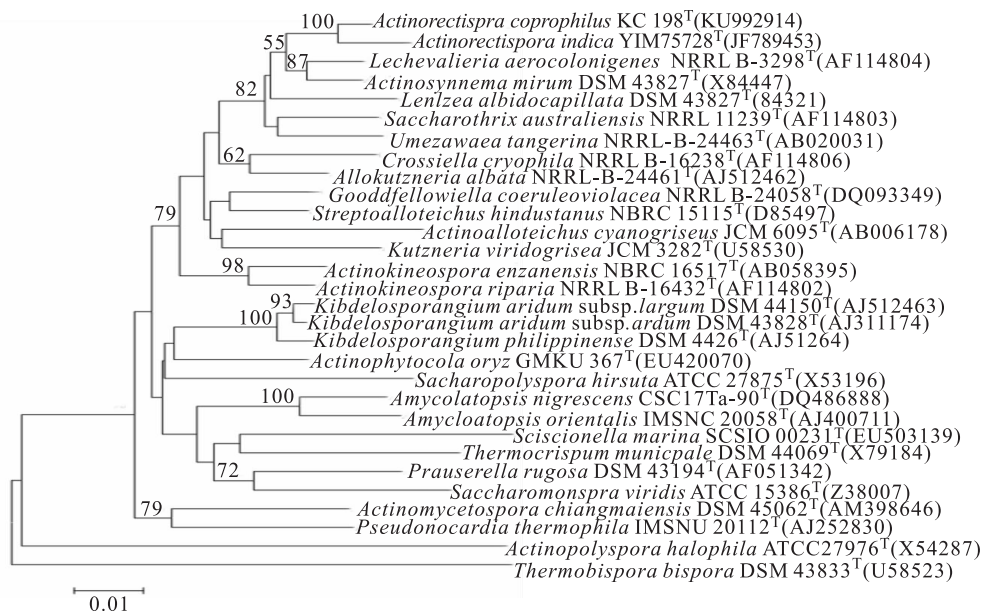


图1 以菌株KC198的16S rDNA同源性构建的系统发育树

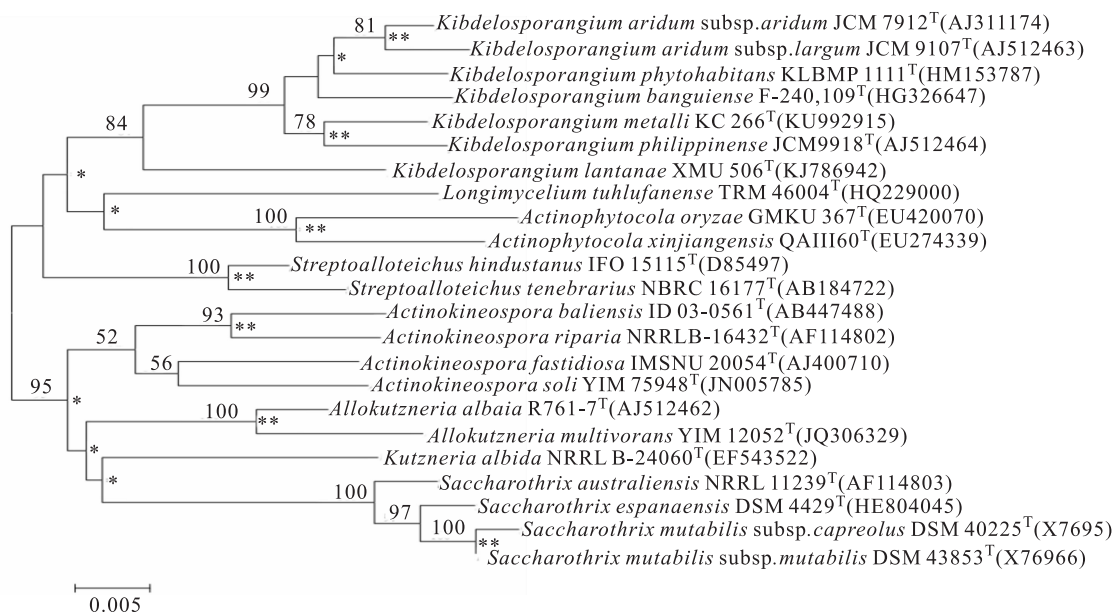


图2 以菌株KC266的16S rDNA同源性构建的系统发育树

2.2 蛋白酶活初筛结果

经初筛,KC198 和 KC266 在培养基上的透明圈直径分别达到 3.0 cm 和 1.8 cm(图 3),且长势较好.因此,继续对 KC198 和 KC266 的产蛋白酶条件进行优化.



图3 蛋白酶鉴定

2.3 产酶条件优化结果

1) 对不同发酵时间和不同发酵培养基的菌液进行蛋白酶粗酶活初步鉴定,KC198 的产酶条件探究结果如图 4 所示.

根据透明圈直径大小与酶活力高低呈正相关,比较图 4 在两种培养基中的酶液所形成的透明圈大小可知,KC198 在酵母膏-蛋白胨培养基中生长所产酶活性较高;针对发酵时间,KC198 在培养 4~6 d 的发酵液产生的透明圈较小,蛋白酶活性较弱,在 7 d 透明圈最大,酶活达到最高,在培养 8~9 d 后,仍然有较高蛋白酶活性,但已逐渐减弱,据此确定最佳的培养时间为 7 d.

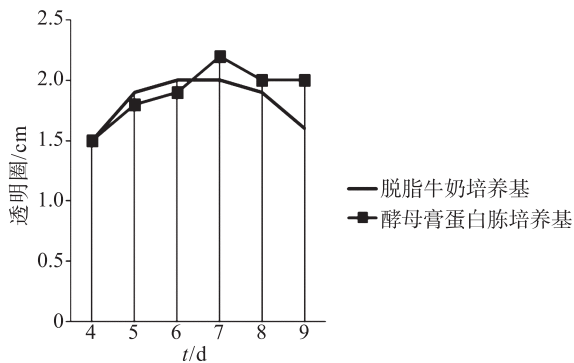


图4 不同培养时间及培养基上KC198的产酶情况

2) 对不同发酵时间和不同发酵培养基的菌液进行蛋白酶粗酶活初步鉴定, KC266 的产酶条件探究结果如图 5 所示。

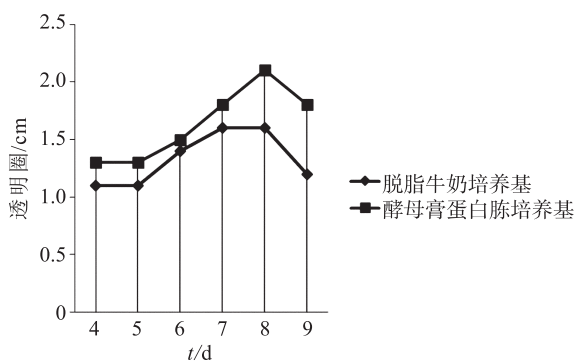


图5 不同培养时间及培养基对KC266产酶的影响

菌株 KC266 在酵母膏-蛋白胨培养基中生长所产酶活性较高;对于发酵时间, KC266 在培养 4~7 d 的发酵液产生的透明圈较小, 蛋白酶活性较弱, 在 8 d 透明圈最大, 酶活达到最高, 在培养 9 d 后, 蛋白酶活性减弱, 据此确定最佳的发酵时间为 8 d。

在确定了最佳发酵时间和产酶较高的发酵培养基的基础上, 获取发酵液, 制备成粗酶粉, 供酶活性测定使用。

2.4 酶活性测定结果

2.4.1 酶活最适 pH 测定结果

在其他因素不变的条件下, 将蛋白酶粗酶与不同 pH 下的底物反应 10 min, 检测酶活性。根据 OD 值作出 KC198 和 KC266 的酶活最适 pH 曲线, 如图 6 和图 7。

由上图 6 可以看出, 菌株 KC198 在 pH 7.1~8.5 时, 随 pH 的增大, 蛋白酶的活力不断提高; 当 pH 达 8.9 时酶活也达最高; 之后随着 pH 增大, 蛋白酶的活力显著降低。说明 KC198 酶活最适反应 pH 值为 8.9, 该菌株蛋白酶粗酶属于碱性蛋白酶。

由图 7 可以看出, 菌株 KC266 在 pH 7.1~10.0

时, 随 pH 的增大, 蛋白酶的活力不断提高; 当 pH 达 10.0 时酶活也达最高; 之后随着 pH 增大, 蛋白酶的活力显著降低。说明 KC266 酶活最适反应 pH 值为 10.0, 该菌株的蛋白酶粗酶属于碱性蛋白酶。

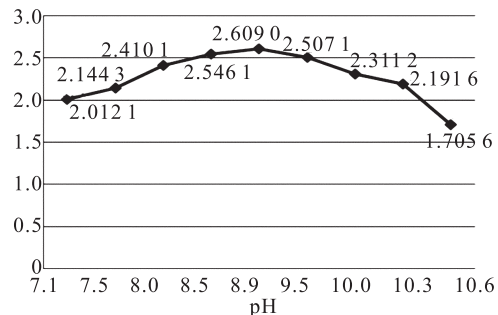


图6 KC198在不同pH下的酶活力

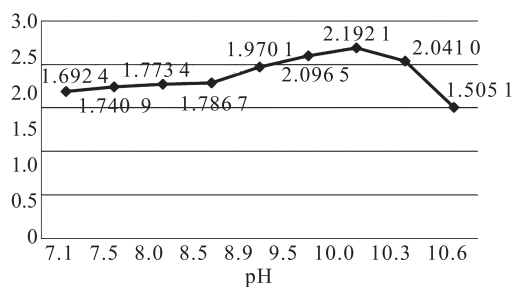


图7 KC266在不同pH下的酶活力

2.4.2 蛋白酶活最适温度测定结果

在其他各参数不变的情况下, 分别在不同的温度下让蛋白酶粗酶和底物反应 10 min, 检测蛋白酶活性大小, 根据 OD 值作出 KC198 和 KC266 的酶活最适温度曲线如图 8。

由图 8 可知, KC198 和 KC266 的蛋白酶最适催化反应温度均为 28℃, 此时 OD 值最大, 即酶的催化反应活性最高; 两株菌在 30℃ 及以上时酶的活性受高温的抑制而下降。

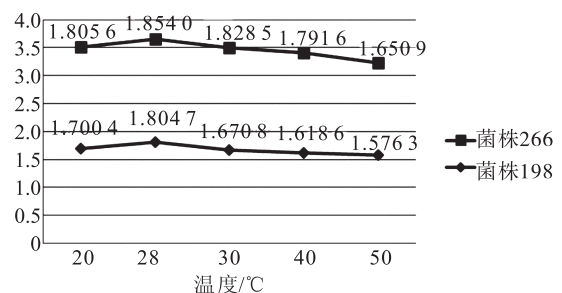


图8 温度对两株菌酶活性的影响

3 结论与讨论

本试验主要对两株产蛋白酶的菌株进行了基于 16S rRNA 基因的系统发育分析鉴定, 确立了两株菌分属于 *Actinorectispora* 和 *Kibdelosporangium* 属。蛋白

酶初筛结果表明,菌株 KC198 和 KC266 都有较好的蛋白酶活性.在此基础上,对 KC198 和 KC266 进行产酶条件的优化,主要对发酵培养基和发酵时间进行探究,结果表明,KC198 和 KC266 两株菌分别在发酵第 7 d 和第 8 d 酶活较高,且适合在酵母膏-蛋白胨培养基中发酵产酶.在最适产酶条件下获得粗酶液,并对其进行酶学性质探究,探究方法是采用紫外分光光度法在 680 nm 波长处测定不同质量浓度的酪氨酸溶液的 OD 值并绘制标准曲线,然后利用福林酚法测定该酶活性,最后以酪蛋白为底物对所产蛋白酶粗酶进行了酶学性质探究,主要探究酶活最适 pH 值及最适温度.结果显示,KC198 的酶活最适 pH 为 8.9,为碱性蛋白酶,而该酶最适温度为 28℃.KC266 的酶活最适 pH 为 10.0,仍为碱性蛋白酶,且该酶最适温度也为 28℃.

目前我国酶资源短缺,本研究可为工业生产蛋白酶制剂提供宝贵的菌种资源,同时对微生物资源的开发利用具有科研和现实意义.此外,对两株菌最佳产酶条件和蛋白酶粗酶酶学性质的初探,可为分离纯化得到 KC198 和 KC266 两株菌的蛋白酶纯酶提供参考数据,也可为其在实际生产中的研发与应用提供理论依据.

[参考文献]

- [1] 王睿,刘桂超.论我国酶制剂工业的发展[J].畜牧与饲料科学,2011,32(1):68-69.
- [2] KUMAR C G, TAKAGI H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint[J]. Biotechnology Advances, 1999,17(7):561-594.
- [3] 王俊英,侯小歌,张杰,等.酒曲中高蛋白酶产生菌筛选及酶学性质研究[J].中国酿造,2012,31(4):33-36.
- [4] 代玉梅.蛋白酶高产菌株的筛选鉴定及酶学性质研究[D].青岛:青岛大学,2008.
- [5] 许树钦.产蛋白酶海洋细菌的筛选及其酶学性质的研究[D].厦门:厦门大学,2013.
- [6] 杨胜远,陆兆新.微生物低温碱性蛋白酶的研究进展[J].食品与发酵工业,2004,30(4):93-95.
- [7] 刘连盟.菌寄生真菌纤维齿梗孢蛋白酶基因克隆与表达[D].泰安:山东农业大学,2008.
- [8] 李婵娟,王婧,杨洁.蛋白酶产生菌的筛选、鉴定及酶学性质研究[J].湖北农业科学,2015,54(19):4794-4797.
- [9] 吴洁,吴远根,张远,等.黄曲霉固态发酵麻疯树饼粕产蛋白酶及其酶学性质研究[J].安徽农业科学,2010,38(4):1681-1683.
- [10] 曹艳茹,姜怡,李有龙,等.孟加拉虎粪便放线菌的分离及其多样性[J].微生物学报,2012,52(7):816-824.

(上接第 106 页)

[参考文献]

- [1] 杨念慈.浅谈油用玫瑰花的品种及其应用[J].香料与香精,1982(4):8-12.
- [2] 叶为继,章德华.香精与调香[J].精细化工,1984(2):29-34.
- [3] 庄丽亚.玫瑰精油化学成分及其功能性研究[D].杭州:浙江大学,2012.
- [4] 单银花,王志祥,张丰.玫瑰精油提取与纯化工艺研究进展[J].精细与专用化学品,2008(16):15-17.
- [5] 马希汉,王永红,尉芹.玫瑰精油提取工艺研究[J].林产

化学与工业,2004,24(8):80-84.

- [6] 戴琳,单银花,王志祥.超临界 CO₂ 萃取玫瑰精油的工艺优化[J].食品工业科技,2015,36(3):266-269.
- [7] 黄俊魏,唐琳,陈浩.超声波分级提取玫瑰精油和色素的工艺优化[J].食品安全质量检测学报,2015,6(6):2123-2130.
- [8] 任艳奎,许松林,栾礼侠.应用分子蒸馏技术分离提纯玫瑰精油[J].应用化工,2005,34(8):509-512.
- [9] 王晓霞,魏杰,刘劲芸,等.云南食用玫瑰精油化学成分的 GC/MS 分析及其应用研究[J].云南大学学报(自然科学版),2011,33(S2):414-417.