

实验11

碱性蛋白酶高产菌株的筛选及酶活测定

孔召玉

kongzhaoyu@hotmail.com

南昌大学生命学院

一、目的要求

- 学习利用选择性培养基从自然界分离胞外蛋白酶生产菌的方法、摇瓶液体发酵基本技术和酶活力测定基本方法。

二、实验原理

- 产胞外蛋白酶菌株在牛奶培养基上生长后，可在其菌落周围产生明显的蛋白水解圈；水解圈与菌落的直径比常用作判断该菌株蛋白酶生产能力的初筛依据。
- 由于不同种类的蛋白水解酶都能在牛奶平板上形成水解圈，且产生水解圈能力强的菌株不一定是碱性蛋白酶高产菌株。
- 因而通过初筛得到的菌株还须发酵培养，并对发酵液中的蛋白酶活力进行定性定量测定分析——即复筛后，才有可能获得碱性蛋白酶高产菌株。

- *Folin*试剂与酚类化合物（*Tyr*、*Trp*、*Phe*）在碱性条件下发生反应会形成蓝色化合物，用蛋白酶水解酪蛋白生成含酚基的氨基酸可与*Folin*试剂发生呈色（蓝色）反应，通过分光光度计比色测定可知酶活大小。

三、实验器材

3.1 菌株

从自然界筛选分离获得的蛋白酶产生菌株

3.2 试剂

蛋白胨、酵母粉、脱脂奶粉、琼脂、干酪素、三氯醋酸、 NaOH 、 Na_2CO_3 、Folin试剂、硼砂、酪氨酸、蒸馏水等

3.3 仪器

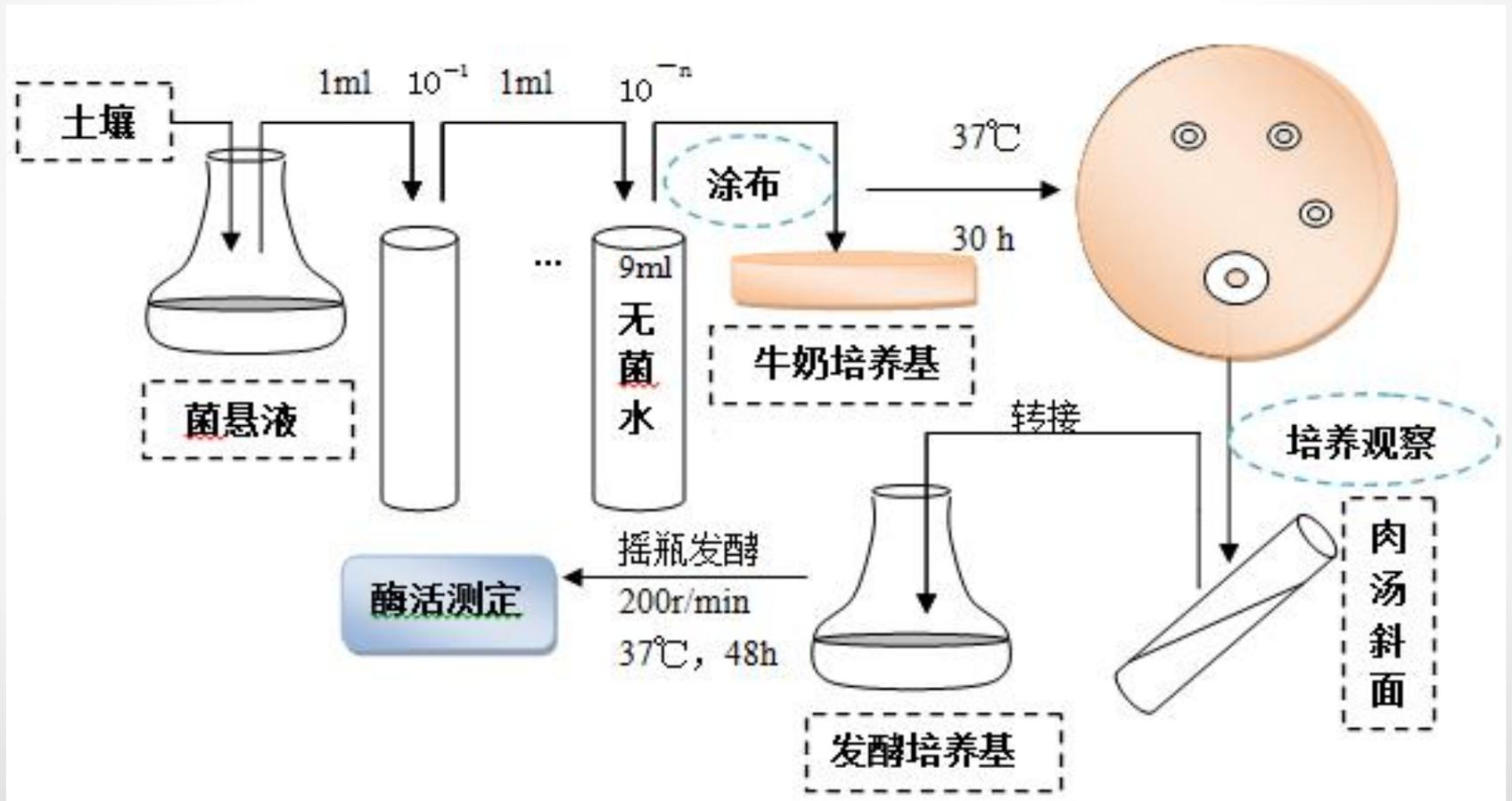
分光光度计、水浴锅、摇床、灭菌锅、三角烧瓶、试管、涂布棒、玻璃搅拌棒等

3.4 培养基

牛奶平板（分离培养基）、发酵培养基

四、操作步骤

4.1 选择培养基分离蛋白酶产生菌流程



4.1.1 本次实验各组选取 10^{-2} - 10^{-4} 稀释度样品做分离实验，每个稀释度取0.2 ml菌悬液于牛奶平板上作涂布分离，平等双样。（需6个平板）

4.1.2 从每个稀释度分离培养物（平等）中选取一个具有最大蛋白水解圈的菌株划接斜面（平行双样），做好标记。

4.1.3 从各（平行）斜面中选一支取样接种于发酵培养基中（平行双样）进行摇瓶发酵培养。同时用标样作对照。（需6个锥形瓶）

4.1.4 从各发酵培养物中取样进行酶活测定，记录测定结果。

4.2 酶活力标准曲线制作

4.2.1 配制酪氨酸0—100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 标样.

4.2.2 取上述标样1 ml与5 ml Na_2CO_3 (0.4 mol/l) 和1 ml Folin试剂混合, 40°C水浴显色30 min。

4.2.3 取样品置5 cm比色杯中, 于680 nm测定吸收峰并绘制标准曲线, 求出光密度为1时相当的酪氨酸质量 (μg), 即*K*值。

发酵培养基



9 ml 发酵液

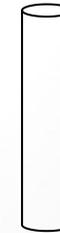
离心管



配平、离心12000 rpm, 20 min

2 ml 上清液

2 ml 上清液



空白对照

样品

所需器材（每组）：

1、离心管（10 ml，6支）：
清洗干净，蒸馏水冲洗干净
烘干；

2、试管（10 ml，24支）：
清洗干净，蒸馏水冲洗干净
烘干；

3、漏斗6个：清洗干净，蒸
馏水冲洗干净烘干；

4、滤纸等

• 4.3 酶活力的测定

空白对照	样品
发酵液（或其稀释液）2ml	发酵液（或其稀释液）2 ml
0.4 M 三氯醋酸 6 ml	2% 酪蛋白 2 ml
2% 酪蛋白 2 ml	40°C水浴保温 10 min
	0.4 M 三氯醋酸 6 ml
静置15 min，使蛋白质沉淀完全，然后用滤纸过滤，滤液应清亮，无絮状物	
滤液1 ml	
0.4 M Na ₂ CO ₃ 5 ml	
Folin试剂 1 ml	
40°C水浴保温 20 min，于680 nm处测OD值	

- 碱性蛋白酶活力单位 U ，以每毫升或每克样品在 40°C ， $\text{pH}11$ （或其他碱性 pH ）条件下，每分钟水解酪蛋白所产生的酪氨酸质量（ μg ）来表示。

$$U = K \times A \times N \times 10/10$$

- 式中： K ——由标曲求出光密度为1时相当的酪氨酸质量（ μg ）
- N ——稀释倍数
- A ——样品 OD 值与空白对照 OD 值之差
- $10/10$ ——因测定中吸取的滤液是全部滤液的 $1/10$ ，而酶反应时间为 10 min

五、实验报告

菌株编号	菌落直径	蛋白水解圈直径	蛋白水解圈直径/菌落直径比值	发酵液中的酶活力			
				1	2	3	平均酶活
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
对照							

六、思考题

- 1、在选择平板上分离获得蛋白酶产生菌的比例如何？试结合采样地点进行分析。
- 2、在选择平板上形成蛋白透明水解圈大小为什么不能作为判断菌株产蛋白酶能力的直接证据？试结合你初筛和复筛的结果进行分析。

蛋白酶产生菌筛选实验每组所需准备物品

- 每5-6位同学一组，共五组，每组所需准备的实验物品：

一、土壤样品1份（约10 g）

家畜饲养、屠宰等动物性蛋白丰富的地点土壤中筛选获得高产蛋白酶菌株的概率更大，若条件许可，建议尽量选择这样的地方进行采样。

二、培养基

1、牛奶平板

普通牛肉膏蛋白胨固体培养基中添加终质量浓度为1.5%的牛奶。

1.1 牛肉膏蛋白胨培养基 (1000ml) (300ml/组)

本次实验用量

牛肉膏	3克	0.9克
蛋白胨	10克	3.0克
NaCl	5克	1.5克
琼脂	20克	6.0克
水	1000ml	
300ml		

pH 7.0-7.2, 121°C灭菌20min

其中100ml分装到7支试管中制备斜面, 另外200ml (量筒定量) 装入1个三角瓶中。

1.2 脱脂奶粉用水溶解后单独灭菌 (0.06MPa, 30min), 再与加热熔化的牛肉膏蛋白胨培养基混合铺平板。每组配制20ml 15%的奶粉母液, 分装到2支试管中。
(10ml/支)

2、发酵培养基

本次实验用量 (450ml/组)

玉米粉	4%	18克
黄豆饼粉	3%	13.5克
Na_2HPO_4	0.4%	1.8克
KH_2PO_4	0.03%	0.135克

pH 9.0 (配制3mol/L NaOH调pH), 0.1MPa灭菌
20min。

玉米粉、黄豆饼粉不溶于水，培养基配制过程中加热煮沸、pH调节及分装到三角瓶等环节应注意到玻璃搅拌棒不断搅拌，以保证培养基均匀、一致。

分装7个三角瓶，60 ml/个。

3、试剂

- 三氯醋酸 (0.4mol/L) 1000ml
- Na_2CO_3 (0.4mol/L) 1000ml
- 2%酪蛋白 500ml
- 0.5 mol/L NaOH 200ml
- pH11硼砂 - NaOH缓冲液: 硼砂 9.54g溶于500ml水中, NaOH 2g溶于500ml水中, 等量混合
- 3mol/L NaOH 200ml

2%酪蛋白: 称取2 g干酪素, 用少量0.5 mol/L NaOH润湿后适量加入pH11硼砂 - NaOH缓冲液, 加热溶解, 定容至100 ml, 4°C冰箱中保存, 使用期不超过一周。

用于湿润干酪素的NaOH量不宜过多, 否则会影响配制溶液的pH;加热溶解过程中可使用玻璃棒不断碾压干酪素颗粒, 帮助其溶解。

三、器皿

- 1.锥形瓶 250ml (1只)、150 ml (7只)、300 ml (1只) 9只【7只装发酵培养基, 1只装90ml水(装入少量玻璃株), 1只装200ml牛肉膏蛋白胨培养基】
- 2.平皿 90cm 7个
- 3.试管 16×160 14支(7支斜面, 5支各装9ml稀释水, 2支装奶粉)
- 4.移液管 1ml 6支
- 5.涂布器 2根
- 6. 玻璃搅拌棒 1根