

南极微生物产低温蛋白酶菌株的筛选、分子鉴定及部分酶活特性

王全富^{1,2}, 缪锦来², 李光友², 侯艳华³, 王国栋²

(1. 中国海洋大学 生命科学学院, 山东 青岛 266003; 2. 国家海洋局第一海洋研究所 海洋生物活性物质重点实验室, 山东 青岛 266061; 3. 哈尔滨工业大学, 山东 威海 264209)

摘要:从南极获得的260株低温细菌中筛选到107株具有蛋白酶活性菌株,其中5株菌所产蛋白酶的活性高于45 U/mL。对其进行16S rRNA基因序列的同源性和系统发育分析,结果表明,菌株NJ276、NJ5-9、NJ16-70、NJ345属于假交替单胞菌属(*Pseudalteromonas*),NJ341属于科尔韦氏氏属(*Colwellia*)。对其中NJ276、NJ341、NJ16-70、NJ345这4株产蛋白酶南极嗜冷菌的生长及分泌蛋白酶的部分酶活特性进行研究,结果表明:(1)4株菌最适生长、产酶温度均为10℃左右;培养2~5 d,嗜冷菌生长、产酶量一直处于较高的状态。(2)4株南极嗜冷菌分泌的蛋白酶的酶活反应最适pH值为9。(3)菌株NJ276、NJ5-9分泌的蛋白酶最适酶活温度为50℃;菌株NJ341、NJ345分泌的蛋白酶最适酶活温度为40℃;在0℃时蛋白酶活性是最高活性的30%左右,蛋白酶热稳定性较差,因此菌株NJ341、NJ345分泌的蛋白酶属于低温蛋白酶。

关键词:16S rRNA; 嗜冷菌; 蛋白酶; 筛选; 南极

中图分类号:Q94 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)04-0437-08

从低温微生物中筛选新的生物活性物质已成为目前的研究热点。低温酶是由低温微生物产生,由于在低温环境下具有较高的酶活性,因而在许多需要低温催化的行业中具有潜在的应用价值^[1]。由于低温蛋白酶是低温酶的重要组成部分,因而对低温蛋白酶的研究也越来越深入,在低温蛋白酶结构与功能及应用等方面均已有了研究^[2-5],但大多数研究只限于单一菌种,很少对不同菌属分泌低温蛋白酶进行研究。本实验从南极海冰和土壤中筛选到多株产低温蛋白酶的嗜冷菌,对其中几株菌进行16S rRNA分子鉴定,并对4株菌的生长与产酶特性和酶学性质进行初步研究,以期对南极微生物低温酶的适冷机制研究及其在生物工程、海洋药物、轻工业、食品加工等工业上的应用研究提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源与发酵培养基

菌株采自于2001~2002年中国第18次南极考察期间的海水、海冰样品。经分离、纯化后的微生物菌种共260株,保存于国家海洋局第一海洋研究所

生物活性物质重点实验室。

发酵培养基为2116培养基,配方为:蛋白胨5 g;酵母粉1 g;用过滤海水定容至1 000 mL,pH 7.0~7.5,121℃下湿热灭菌20 min。

1.2 产低温蛋白酶菌株的筛选

筛选培养基:干酪素5 g;琼脂7.5 g;用蒸馏水定容至500 mL,pH 7.0~7.5,121℃下湿热灭菌20 min,每培养皿加入15 mL。

菌株筛选以牛津杯水解酪蛋白平板法。按10%接种量接入50 mL 2116液体培养基中,于8℃培养,以140 r/min转速,振荡120 h后,以12 000 r/min离心15 min。取菌株上清液接种于牛津杯酪蛋白平板上,20℃培养48 h后倒入10%三氯乙酸溶液,用游标卡尺测定水解圈大小。复筛培养条件为在20℃培养96 h后测定水解圈大小。

1.3 蛋白酶部分活性的测定

按10%接种量接入50 mL 2116液体培养基中,培养120 h后,以12 000 r/min离心15 min,上清液为试验的蛋白酶粗酶液。蛋白酶活性采用Folin法测定^[6]。用50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液

收稿日期:2004-11-26; 修订日期:2005-02-21。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(40406003)。

作者简介:王全富(1976-),男,博士生,从事极端环境生物活性物质研究。E-mail:QuanfuWang@163.com

通讯作者:缪锦来。E-mail:miaojinlai@163.com

配置的2%酪蛋白为底物。用50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)将酶液稀释合适的倍数。取1 mL稀释的酶液,在40℃下保温1 min,加入同样温度的底物1 mL,在40℃下反应10 min后,加入2 mL 10%三氯乙酸终止反应。在40℃下保温15 min后,12 000 r/min离心15 min,取1 mL上清液加入5 mL 0.4 mol/L 碳酸钠,混匀加入1 mL 福林试剂,混匀后在40℃保温20 min,然后用分光光度计测定660 nm处OD值。以灭活酶样品为对照。标准曲线用不同浓度的酪氨酸来制定,酶活力定义为在40℃下,每毫升酶液每分钟催化酪蛋白水解生成1 μ g 酪氨酸的酶量为1个单位(U/mL)。

1.4 蛋白酶部分酶活特性的测定

1.4.1 蛋白酶活最适 pH 将粗酶液在各 pH 的缓冲液为 NaAc/HAc (pH 5.0); $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 6.0~7.0); Tris-HCl (pH 8.0~9.0),以及 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ (pH 10.0~12.0) 4℃保存2 h后测定酶活性。蛋白酶活性测定同1.3,底物的缓冲液相应替换。

1.4.2 蛋白酶的热稳定性 将粗酶液分别在30℃、40℃、50℃、60℃4个温度条件下依次水浴保温10 min、20 min、30 min、40 min、50 min,然后放入冰水化合物中,与未被保温处理的酶活性相比较,测定蛋白酶残留活性。蛋白酶活性测定同1.3。

1.5 温度对菌株的生长和产酶影响的测定

按10%接种量接入50 mL 2116 液体培养基中,在0~25℃6个温度梯度下培养,96 h后取样,菌株的生长在540 nm测定吸光值,以接种后培养基作对照,产酶采用蛋白酶活性测定同1.3。

1.6 16S rRNA 基因序列测定与系统发育树分析

1.6.1 细菌总 DNA 的提取 按照CTAB方法^[7]。

1.6.2 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增 采用细菌16S rRNA 基因的通用引物,引物序列为:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和5'-GGTTAC-CTTGTTACGACTT-3'。PCR反应体系为20 μ L,包括:1 $\times$ PCR 缓冲液,1.6 mmol/L MgCl_2 ,4 $\times$ dNTP 混合物各100 μ mol/L,引物各1.0 μ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶1个单位,模板DNA 1 μ L。PCR反应条件为:94℃,5 min;94℃,1 min;53℃,1 min;72℃,1 min 30 s,30个循环;72℃延伸10 min。

1.6.3 16S rRNA 基因文库的构建 以上海华舜DNA纯化试剂盒对PCR产物进行回收纯化,克隆

到pMD18-T质粒载体上,并转化大肠杆菌感受态细胞,然后进行阳性克隆的筛选;用北京赛百盛质粒纯化试剂盒提取阳性克隆的质粒并进行酶切鉴定;酶切后质粒送交上海华大基因测序公司完成测序工作。测序引物为通用引物。

1.6.4 16S rRNA 基因序列测定与系统进化关系的分析 将所测定 NJ276、NJ341、NJ5-9、NJ16-70、NJ345 这5株细菌的16S rRNA 基因序列(大约1.5 kb),同 GenBank 数据库中选取的与菌株亲缘关系较近16S rRNA 基因序列,用 BioEdit 软件的多序列比对排列 (clustalw multiple alignment) 进行序列比对;用 DNASTar 软件进行序列相似性比较;系统发育分析采用 Mega2 软件的邻接法 (neighbor-joining method) 进行;通过自举分析 (boot-strap) 进行置信度检测,自举数据集为1 000次。

2 结果与分析

2.1 南极微生物产蛋白酶菌株的筛选

260株南极微生物产蛋白酶的初筛结果表明,有107株菌产生非常明显酪蛋白水解圈,说明这些菌株均分泌胞外蛋白酶,占总筛选菌株的41.15%。将107株菌进行复筛,结果表明,蛋白酶水解圈直径在15~20 mm 的有44株,20~25 mm 的有30株,25~30 mm 的有13株。测定上清液中蛋白酶活性发现,NJ276、NJ341、NJ5-9、NJ16-70、NJ345 这5株菌产蛋白酶活性高于45 U/mL,其中3株菌产蛋白酶活性高于50 U/mL。筛选部分结果见表1。在复筛过程中发现蛋白酶的水解圈大小与上清液测定的蛋白酶活力呈极显著正相关 ($R^2 = 0.8256$)。这表明,水解酪蛋白平板法是筛选产低温蛋白酶微生物可行的方法。鉴于 NJ276、NJ341、NJ5-9、NJ16-70、NJ345 这5株南极嗜冷菌产蛋白酶的活性较高,对其进行菌属分子鉴定、系统发育树分析并对除 NJ5-9 菌株外的生长及产蛋白酶的粗酶活性特性进行研究。

2.2 5株产蛋白酶嗜冷菌16S rRNA 基因序列和系统发育学分析

对5株南极产蛋白酶嗜冷菌的16S rRNA 基因序列相似性的比较结果表明:菌株 NJ276、NJ5-9、NJ16-70、NJ345 序列同 *Pseudalteromonas agarivorans* 序列相似性分别为98.1%、97.8%、97.4%、96.9%,菌株 NJ341 序列同 *Cobacteriella piezophila* 序列相似性为94.8%,与未鉴定菌株 *Gamma proteobacterium*

UMB7C 相似性是 96.7%。从图 1 系统进化树可见,从南极产蛋白酶菌株中筛选到的 5 株嗜冷菌都属于细菌中最大的类群— γ -proteobacteria 亚群。其中菌株 NJ276、NJ5-9、NJ16-70、NJ345 均属于交单胞菌目 (Alteromonadales), 交替

单胞菌科 (Alteromonadaceae), 假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*); 菌株 NJ341 属于交替单胞菌目 (Alteromonadales), 交替单胞菌科 (Alteromonadaceae), 科尔韦氏氏属 (*Colwellia*)。

表 1 南极微生物产蛋白酶菌株部分筛选结果

Tab.1 Screening of protease from Antarctic microorganism

菌株 Strain	水解圈直径/mm Diameter		蛋白酶活性/(U·mL ⁻¹) Protease activity
	初筛 First Screening	复筛 Second Screening	
NJ 276	24.00	28.20	58.58
NJ 341	23.00	31.40	58.31
NJ 5-9	22.75	30.00	54.92
NJ 16-70	26.25	27.60	46.96
NJ 345	21.75	28.30	45.17
NJ 272	24.00	26.90	43.33
NJ 308	19.50	26.80	40.17
NJ 545	23.50	29.50	37.30
NJ 274	22.00	27.10	29.25
NJ 43	25.00	26.20	23.70
NJ 297	22.00	26.90	23.60

一般认为, 16S rRNA 基因序列同源性低于 97%, 可以认为属于不同种; 同源性小于 95%, 可以认为属于不同属。因此菌株 NJ276、NJ345、NJ5-9、NJ16-70 应归属于假交替单胞菌属, 种尚未确定。对菌株 NJ341 聚类分析表明, 该菌株为与科尔韦氏氏属 7 个已经鉴定的种亲缘关系最近, 并且和科尔韦氏氏属聚在一起, 但与鉴定种有明显分支, 并且与已知种 *Colwellia piezophila* 序列最大相似性为 94.8%, 推断其可能是科尔韦氏氏属中的新种。

2.3 4 株南极嗜冷菌产蛋白酶及部分酶学特性

2.3.1 不同温度对 4 株产蛋白酶南极嗜冷菌生长及产蛋白酶的影响 4 株南极嗜冷菌在 0~20℃ 均能生长, 最适生长温度为 10℃; 在 25℃ 4 株菌均不能生长。Morita^[8] 根据生长温度的上限不同, 对嗜冷菌 (psychrophile) 和适冷菌 (psychrotrophic) 进行了区分: 嗜冷菌是指温度低于 0℃ 时能生长, 最适生长温度低于 15℃, 高于 20℃ 则不能生长; 适冷菌是指在 0℃ 能够生长, 但最适生长温度在 20~30℃ 的一类微生物。由定义看出, 4 株产蛋白酶菌株都属于嗜冷菌。从产酶温度来看, 4 株南极嗜冷菌在 0~20℃ 都能分泌蛋白酶, 其中菌株 NJ345、NJ276、

NJ341 最适产酶温度是 10℃, 而 NJ16-70 最适产酶温度为 15℃ (图 2)。

2.3.2 4 株产蛋白酶南极嗜冷菌生长和产酶曲线

南极嗜冷菌 NJ276、NJ341、NJ16-70、NJ345 培养 2 d 后, 生长达到指数生长后期并逐渐进入稳定期, 5 d 后开始下降。4 株南极嗜冷菌产酶曲线不相同: 菌株 NJ341、NJ345 在培养 3 d 时产酶量达到最高值, 而菌株 NJ276、NJ16-70 培养 4~5 d 达到最高值; 此后 NJ341 分泌蛋白酶保持较高水平, 而另外 3 株的蛋白酶含量略有下降。这表明, 培养液中蛋白酶含量与菌体的生物量呈正相关关系, 即当菌体生长进入指数生长后期时, 蛋白酶开始产生并分泌至胞外, 随后酶继续产生, 表现为培养液中酶的含量迅速升高; 当菌体生长达到稳定期后, 菌株便不再继续产生蛋白酶, 表现为培养液中酶的含量基本维持恒定 (图 3)。

2.3.3 4 株南极嗜冷菌分泌蛋白酶的酶学特性

(1) pH 对蛋白酶活力的影响 南极嗜冷菌 NJ345、NJ276、NJ341、NJ16-70 分泌的蛋白酶在 pH 5.0~12.0 时均有活性, 且在 pH 8.0~9.0 表现出较高活性, 属于碱性蛋白酶 (图 4)。

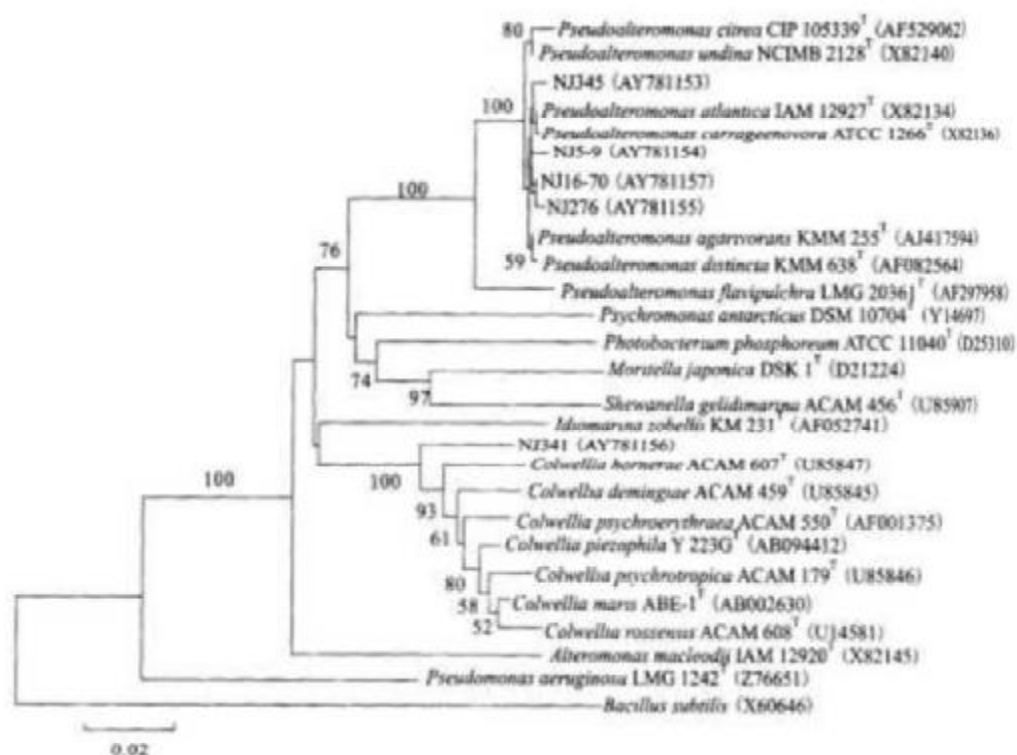


图1 5株产蛋白酶南极嗜冷菌和相关菌株序列的16S rRNA基因序列的邻接法系统发育树
(结点处数字为bootstrap值括号内为序列登录号)

Fig.1 Phylogenetic tree showing the relationships of five strains of Antarctic psychrophilic bacteria producing protease with the sequences of relating genera constructed by the neighbour-joining method and based on 16S rRNA gene sequences. Scale bars correspond to a 2% different in nucleotide sequence. Bootstrap values are shown at the branch points, submission number of the relating genera is available as supplementary data in IJSEM Online

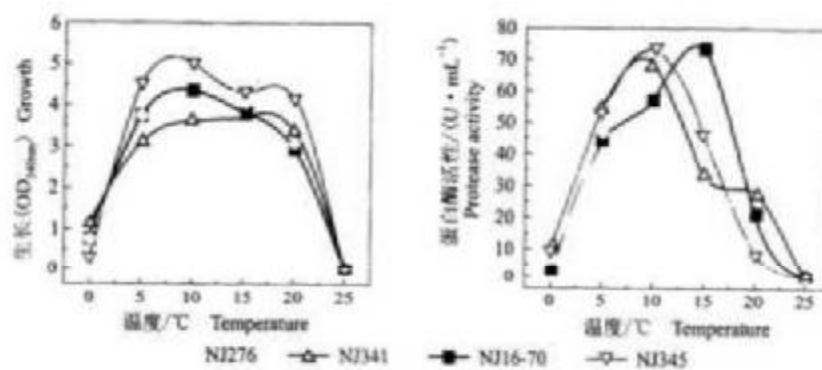


图2 温度对4株南极嗜冷菌生长与产蛋白酶的影响

Fig.2 Effects of temperature on growth and protease from four Antarctic psychrophilic bacteria

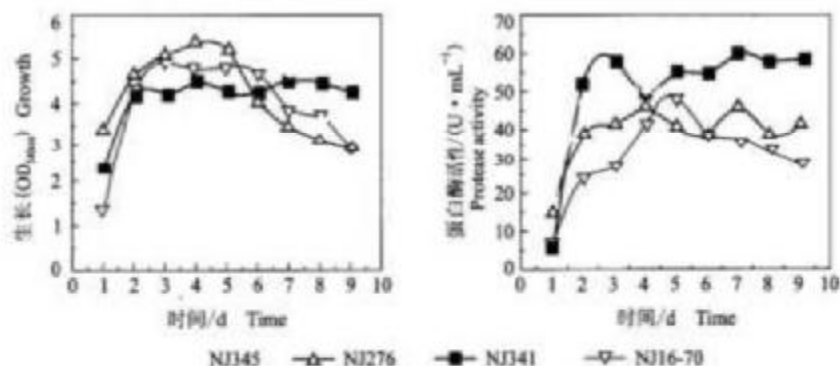


图3 4株产蛋白酶嗜冷菌生长和产蛋白酶曲线

Fig.3 Curves of growth and protease from four Antarctic psychrophilic bacteria

(2)温度对蛋白酶活力的影响 南极嗜冷菌 NJ276、NJ341、NJ16-70、NJ345 所分泌的蛋白酶最适酶活温度不相同:菌株 NJ341、NJ345 产蛋白酶的最适酶活温度大约在 40℃,而菌株 NJ276、NJ16-70 产蛋白酶最适酶活在 50℃左右。菌株 NJ341、NJ345 分泌的蛋白酶在 0℃时的蛋白酶活性为最高

活性的 30%。据 Margesin 的定义^[9],通常把最适催化温度在 35℃左右且在 0℃左右仍有一定催化效率的酶,称为低温酶,这表明菌株 NJ341、NJ345 分泌的胞外蛋白酶属于低温蛋白酶;NJ16-70、NJ276 分泌的胞外蛋白酶接近中温蛋白酶(图 4)。

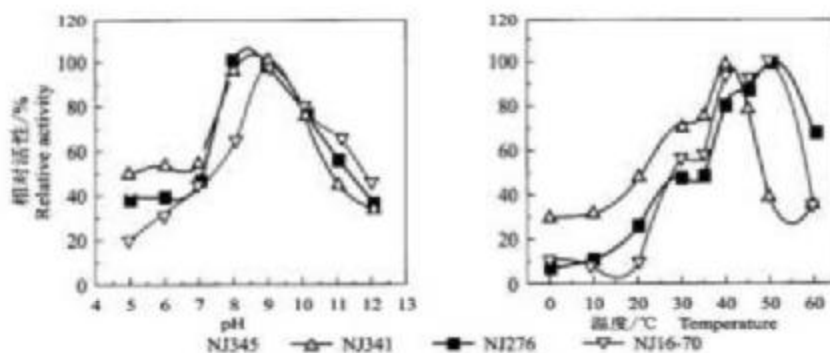


图4 pH、温度对4株南极嗜冷菌产蛋白酶活性影响

Fig.4 Effects of pH and temperature on activities of protease from four Antarctic psychrophilic bacteria

(3)4株南极嗜冷菌分泌蛋白酶的热稳定性 研究结果表明,NJ276、NJ341、NJ16-70、NJ345 这4株嗜冷菌产生的蛋白酶对热的稳定性不相同,在 30℃条件下保温对4株嗜冷菌产蛋白酶的活性影响不大。但随着处理温度的升高,菌株 NJ341、NJ345 分泌的蛋白酶热稳定性较差,NJ341 分泌的蛋白酶半衰期为 40℃保温 50 min,50℃保温 10 min

蛋白酶活性基本消失;NJ345 分泌的蛋白酶在 40℃保温 50 min 蛋白酶相对活性为最高酶活性的 80%。菌株 NJ276、NJ16-70 分泌的蛋白酶半衰期为 50℃保温 15 min,在 60℃保温 10 min 蛋白酶活性基本丧失。NJ341、NJ345 分泌的低温蛋白酶,与 NJ276、NJ16-70 分泌蛋白酶相比热稳定性较差,这也是低温酶的一个重要特征(图 5)。

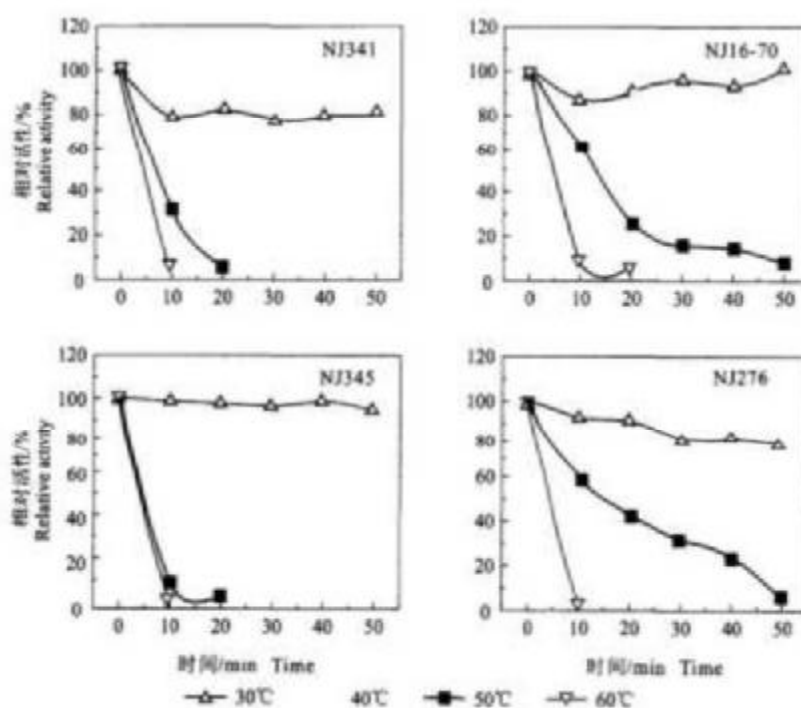


图5 温度对4株南极嗜冷菌产蛋白酶的稳定性影响

Fig.5 Effects of temperature on stability of protease from four Antarctic psychrophilic bacteria

3 讨论

3.1 低温微生物产低温蛋白酶的筛选

尽管大多数的低温蛋白酶已经从嗜冷菌、适冷菌中分离出来,但很少对不同菌株分泌的蛋白酶特性进行研究。本实验从260株南极微生物中筛选到107株具有蛋白酶活性菌株,占总筛选菌株的41.15%,其中5株南极嗜冷菌产蛋白酶活性高于45 U/mL。对NJ276、NJ341、NJ16-70、NJ345这4株产蛋白酶南极嗜冷菌生长及分泌蛋白酶部分酶活特性的研究发现,4株嗜冷菌的生长、产酶及分泌蛋白酶的酶学特性存在差异,这与一些学者的研究结果相一致^[2,9-10]。生长在南极低温环境下的嗜冷菌和适冷菌为了适应低温环境,使代谢系统中的酶在低温下保持较高活性,并且它的最适酶活温度比相应中温酶低,这可能与低温微生物经过长期的进化,形成了适应低温环境的特殊结构与代谢机制有关。本研究表明,菌株NJ341、NJ345分泌的蛋白酶最适反应温度在40℃,在0℃时的蛋白酶活性为其最高活性的30%左右,而中温蛋白酶的最适催化温度一

般为50~60℃,在0℃时的蛋白酶只有最高活性的1%或者没有活性。但也有些研究报道指出,一些生长在寒冷环境中的微生物分泌蛋白酶活性通常表现更高的最适温度,如Hamamoto等^[11]研究*Pseudomonas fluorescens* 114分泌碱性蛋白酶的最大酶活在40~45℃;Margesin等^[9]研究菌株*Xanthomonas maltophilia*分泌蛋白酶的最适酶活为在50℃;曾胤新等^[12]从南、北极低温海洋细菌中分离到的蛋白酶的最适酶活温度为55℃。本研究筛选到最适反应温度为50℃的两株嗜冷菌NJ276和NJ16-70。因此,在产低温蛋白酶的菌株,需要比较所产蛋白酶在不同温度下的酶活,以及酶的热稳定性,才能鉴定为产低温蛋白酶的菌株。

3.2 产低温蛋白酶嗜冷菌的菌属分类地位

目前,从分离产低温蛋白酶嗜冷菌的菌属来看,主要为*Pseudomonas*,其次是*Xanthomonas*, *Aeromonas*, 而*Alteromonas*、*Shewanella*、*Bacillus*和*Sphingomonas*属也有少量报道。本研究对5株产蛋白酶的南极细菌进行16S rRNA分子鉴定,菌株NJ16-70、NJ276、NJ5-9、NJ345均归属于假交替单胞

菌属、NJ341 属于科尔韦氏氏属。Bowman 等^[13]也利用 16S rRNA 分子鉴定,发现南极海冰中细菌种群的主要部分是 *Proteobacteria* 类群,其中嗜冷菌 (psychrophiles) 也包含科尔韦氏氏属;从硅藻聚合物分离可培养微生物的 29% 菌群是假交替单胞菌属。特别指出的是,科尔韦氏氏属是新建立的属,在 GenBank 中科尔韦氏氏属的已知种的资源只有 7 个。本研究对分泌低温蛋白酶的嗜冷菌 NJ341 进行系统发育分析发现,NJ341 在 100% 的置信度聚类在科尔韦氏氏属,但不能和其中任何一个已经鉴定的种聚在一起,并且与已知种 *Colwellia piezophila* 序列最大相似性为 94.8%,推断 NJ341 可能是科尔韦氏氏属的新种。这与 Ivanova^[14]研究紫细菌 *Proteobacteria* 种群系统发育时,提出 16S rRNA 基因序列相似性在 93% 或以上为划分属的有效指标的结论相一致,但尚需菌株的外部形态、生理生化、脂肪酸分析,以及 DNA (G+C) mol% 测定和 DNA 同源性杂交作进一步鉴定。而关于 *Colwellia* 属产低温蛋白酶的研究在国内外研究中还尚未见报道。

本实验从南极微生物中筛选到产蛋白酶活性较高的 4 株嗜冷菌 NJ276、NJ341、NJ16-70、NJ345,其分泌的蛋白酶在 0~50℃、pH 5.0~12.0 均有活性,这就为反应环境为室温、pH 为中性条件下的水产等工业生产提供潜在的应用前景,同时热不稳定性低温蛋白酶可以应用于烘烤食品的添加剂及食品加工与贮藏。而关于嗜冷菌 *Colwellia* sp. NJ341、*Pseudoalteromonas* sp. NJ345 分泌低温蛋白酶的分离纯化、酶学特性、适冷机制以及菌株 NJ341 新种的鉴定等正在进一步研究之中。

参考文献:

- [1] Margolin R, Schinner F. Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology [J]. J Biotechnol, 1994, 33: 1-14.
- [2] Mariana T, Marsena P, Halina K, et al. A cold adapted extracellular serine proteinase of the yeast *Leucosporidium antarcticum* [J]. Extremophiles, 2003, 435-442.
- [3] Devail S, Feller G, Narinx E, et al. Cold adaptation of proteins. Purification, characterization and sequence of the heat-labile subtilisin from the antarctic psychrophile *Bacillus TA41* [J]. Biol Chem, 1994, 269: 17 448-17 453.
- [4] Vazquez S C, Rios Merino L N, MacCormack W P, et al. Protease producing Psychrotrophic bacteria isolated from Antarctica [J]. Polar Biol, 1995, 15: 131-135.
- [5] 陈秀兰, 张玉忠, 王运涛, 等. 深海嗜冷菌 SM9913 产生的低温蛋白酶 [J]. 海洋科学, 2001, 25 (1): 4-9.
- [6] Chakrabarti S K, Matsumura N, Rana R S. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2) [J]. Curr Microbiol, 2000, 40: 239-244.
- [7] Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. Current protocols in molecular biology [M]. New York: J Wiley & Sons, 1987. 2.10-2.12.
- [8] Morita R Y. Psychrophilic bacteria [J]. Bacteriol Rev, 1975, 39: 144-167.
- [9] Margolin R, Palma N, Krauseder F. Protease of psychrotrophic bacteria isolated from glaciers [J]. Basic Microbiol, 1991, 31: 377.
- [10] Saana C V, Silvia H C, Walter F M. Extracellular proteins from eight psychrotolerant antarctic strains [J]. Microbiol Res, 2004, 159: 157-166.
- [11] Hanamoto T, Kaneda M, Horikoshi K, et al. Characterization of a protease from a psychrotroph *Pseudomonas fluorescens* 114 [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 3 878-3 880.
- [12] 曹胤新, 陈波. 极区低温海洋细菌及其产酶情况的初步研究 [J]. 生物技术, 2002, 12(1): 10-12.
- [13] Bowman J P, McCannan S A, Brown M V, et al. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 3 068-3 078.
- [14] Ivanova E P, Flavies S, Christen R. Phylogenetic relationships among marine *Alteromonas*-like proteobacteria: extended description of the family *Alteromonadaceae* and proposal of *Pseudoalteromonadaceae* fam. nov., *Colwelliaceae* fam. nov., *Shewanellaceae* fam. nov., *Moritellaceae* fam. nov., *Ferrimonadaceae* fam. nov., *Idiomarinaceae* fam. nov. and *Psychromonadaceae* fam. nov. [J]. Internat J Syst Evol Microb, 2004, 54: 1 773-1 788.

Characterization, screening and molecular classification of low-temperature-protease strains from Antarctic microorganism

WANG Quan-fu^{1,2}, MIAO Jin-lai², LI Guang-you², HOU Yan-hua³, WANG Guo-dong²

(1. College of Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Key Laboratory of Marine Bioactive Substances, State Ocean Administration, Qingdao 266061, China; 3. Harbin Institute of Technology, Weihai 264209, China)

Abstract: The continental Antarctica is considered the unique, mostly pristine and extreme environment, thus it would be the new and potential sources of low-temperature enzymes from Antarctic microorganism. In this study, bacteria samples were isolated from the sea ice and sea water in Antarctica during 2001–2002. These strains were purified and conserved in the Key Laboratory of Marine Bioactive Substances, State Ocean Administration (SOA) of China. One hundred and seven strains producing protease were screened from 260 strains of Antarctic psychrotrophic bacteria, among which proteolytic activity of five strains was more than 45 U/mL. The 16S rRNA gene sequences homology and phylogenetic analysis of the five Antarctic psychrotrophic bacteria showed that NJ276, NJ5-9, NJ16-70 and NJ345 belonged to the described genus *Pseudoalteromonas* and NJ341 belonged to genus *Colwellia*. The growth and the protease characteristics of four Antarctic psychrotrophic bacteria were studied, and the results showed that the optimal temperature for growth and protease production of the four strains was about 10 °C. Their growth and protease producing were still high during 2–5 days of incubation. The maximum proteolytic activity occurred at pH 9 for the four Antarctic psychrotrophic bacteria. The optimal temperature of protease action for Strains NJ276 and NJ5-9 was about 50 °C, however, the optimal temperature of protease action of Strains NJ341 and NJ345 was about 40 °C, and their proteolytic activity under 0 °C exhibited nearly 30% of the maximum activity, but their thermal stabilities were weaker. These results indicated that proteases from NJ341 and NJ345 were low-temperature protease.

Key words: 16S rRNA; psychrophilic bacteria; protease; screening; Antarctic

Corresponding author: MIAO Jin-lai. E-mail: miaojinlai@163.com