

产碱性蛋白酶的嗜热菌株筛选及发酵条件研究

杨冠东,杜少平,杨础华,黄 琼

(广州市微生物研究所,广东 广州,510250)

摘 要 在河南商丘盐碱地堆肥土壤样中分离到1株产碱性蛋白酶的嗜热菌株SR-15,经鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。摇瓶发酵研究表明,其适宜培养条件为:玉米粉40 g/L,黄豆粉40 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, NaCl 10 g/L, K_2HPO_4 1.0 g/L,起始pH10.0,培养温度45℃,摇瓶转速190 r/min,250 mL三角瓶的装液量100 mL,48h后发酵液酶活为1180 U/mL。

关键词 碱性蛋白酶,枯草芽孢杆菌(*Bacillus Subtilis*),发酵条件

产碱性蛋白酶的微生物在自然界分布广泛。梅承芳^[1]等人从内蒙古的盐碱湖泊中筛选到1株产碱性蛋白酶菌株,产酶活力为350U/mL,刘成圣^[2]等人从海洋弧菌(*Vibrio pacini*)X4B-7分离纯化得到分子量为27 ku、等电点为8.7的碱性蛋白酶。由于大多数从自然界分离的微生物所产碱性蛋白酶存在着酶活力低、耐热性差等缺陷,在工业化应用中受到限制。

本研究从商丘地区的高温堆肥中分离得到1株高产碱性蛋白酶的嗜热菌株SR-15,通过形态、生理生化特征、全自动菌种鉴定仪鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),并对其培养基组成、发酵条件进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 土 样

取自商丘地区高温堆肥的表层土壤。

1.1.2 试 剂

酵母粉购自Oxoid公司,BUG培养基、TSA培养基、GN/GP-IF接种液购自Biolog公司,酪蛋白为进口分装,其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基(g/L)

分离培养基:蛋白胨10,葡萄糖5,琼脂5,pH6.7。

酪蛋白培养基:酪蛋白15 g, Na_2HPO_4 2 g, NaCl 5g,琼脂15 g,pH10.0。

斜面培养基:蛋白胨10,酵母粉5, NaCl 15,琼脂15,pH10.0。

种子培养基:葡萄糖5,蛋白胨10,酵母粉10, NaCl 15, K_2HPO_4 1.0, MgSO_4 0.4,pH10.0。

发酵基础培养基:葡萄糖10,蛋白胨10,牛肉膏10, NaCl 15, K_2HPO_4 1.0, MgSO_4 0.4, pH10.0。

1.1.4 主要仪器

SW-CJ-1F型超净工作台(苏净集团),DMLB2数码荧光显微镜(德国莱卡公司),752型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器公司),Biolog Microstation系统(Biolog公司),20L全自动发酵罐(上海洋格生物工程设备有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 菌株的筛选

将土样与无菌生理盐水混合后,取上清液涂布于分离培养基平板,于55℃培养72h。生长的单菌落点种于酪蛋白培养基平板,于55℃培养48h。将初筛获得的水解透明圈大的菌株接种到种子培养基中,55℃摇瓶培养20h,然后再接种到发酵基础培养基,55℃摇瓶培养50h,测发酵液酶活。

1.2.2 碱性蛋白酶活性检测

采用紫外分光光度法^[3],乘以换算系数E换算为福林法酶活。酶活力单位的定义:1 mL酶液在40℃、pH10.5的条件下,每分钟水解酪素产生1μg酪氨酸所需的酶量为1个活力单位(U)。

1.2.3 菌株鉴定

1.2.3.1 生理生化特征鉴定

按照《伯杰细菌鉴定手册》^[4]、《常见细菌系统鉴定手册》^[5]有关章节进行初步鉴定。

1.2.3.2 Biolog全自动菌种鉴定仪鉴定^[6]

(1)平板纯培养:用木制接种棒挑取保存的待鉴定菌种,在BUG+M+T琼脂平板上划十字接种,30℃培养16~24 h。

(2)制备菌悬液:挑取培养好的菌落转移至无菌

第一作者:硕士,高级工程师。

收稿日期:2008-07-02,改回日期:2008-08-04

试管,移取 3~5 mL GN/GP-IF 接种液加至其中,制成乳白色悬浊液。在浊度计上调整菌悬液浊度在 28% T±3%。

(3)鉴定:用 8 道移液器取菌悬液加至 96 孔鉴定板的微孔,每个孔加 150 μ L 菌悬液,30℃ 培养 4~6 h,放入读数仪读取结果。

1.2.4 摇瓶发酵

将试管斜面保存的菌株 SR-15 挑取 1 环,加入种子培养基,45℃ 培养 20h,再按 5% 的接种量接种至发酵培养基,45℃ 培养 48h 后,取样测定酶活。

1.2.5 20L 全自动发酵罐发酵^[7]

20L 全自动发酵罐装液量为 14 L,转速调到 200 r/min,通气量为 110 L/h,pH 值为 10.0,添加花生油作为消泡剂。以 5% 的接种量将菌种接入灭菌后的发酵罐,每 4 h 取样测 OD₆₀₀ 和酶活性。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

初筛获得有透明圈的菌株 41 株,分别命名为 SR-1~SR-41。经过复筛后,其中 SR-15 产酶活性最高为 370U/mL。

2.2 菌株鉴定

2.2.1 生理生化特征鉴定

用中国工业微生物菌种保藏管理中心购买的标准菌株地衣芽孢杆菌(CICC10037)和枯草芽孢杆菌(CICC10033)作为对照菌,生化试验结果见表 1。

表 1 菌株生理生化特性

生理生化特性	地衣芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	菌株 SR-15
革兰氏染色	+	+	+
芽孢椭圆	+	+	+
孢囊膨大	-	-	-
过氧化氢酶	+	+	+
淀粉水解	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	+
酪素水解	+	+	+
VP 反应	+	+	+
明胶液化试验	-	-	-
丙酸盐利用	+	-	-
厌氧生长	+	-	-
葡萄糖产气	-	-	-
产酸:			
葡萄糖	+	+	+
甘露醇	+	+	+
木糖	+	+	+

注:“+”为阳性,“-”为阴性。

通过结果初步判断为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

2.2.2 Biolog 全自动菌种鉴定仪鉴定

使用 GP 鉴定微平板,培养 22h 后放入读数仪读

数,系统显示相似性(SIM)为 0.8,可能性(PROB)为 99%,位距(DIST)为 0.12,最终鉴定结果是枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

2.3 发酵培养基的研究

2.3.1 碳源对发酵产酶的影响

以 5 种碳源(浓度为 4%)作为唯一发酵碳源,发酵产酶结果见表 2。结果表明,以 4% 的玉米粉为发酵碳源,产酶能力最佳,达到 996 U/mL。

表 2 碳源对产酶的影响

碳源(浓度 4%)	酶活/U·mL ⁻¹
可溶性淀粉	876
葡萄糖	548
蔗糖	604
玉米粉	996
麦芽糖	738

2.3.2 有机氮源对发酵产酶的影响

以 5 种有机氮源(浓度为 4%)作为唯一发酵氮源,发酵产酶结果见表 3。结果表明,黄豆粉为最佳发酵氮源,酶活为 1 028 U/mL。

表 3 有机氮源对产酶的影响

有机氮源(浓度 4%)	酶活/U·mL ⁻¹
酪素	490
蛋白胨	756
玉米粉	620
黄豆粉	1 028
牛肉膏	460

2.3.3 金属离子对产酶的影响

添加 0.04% 的 6 种金属离子,对产酶的影响结果见表 4。结果表明,对产酶活大小的影响顺序为: Mg²⁺>K⁺>Ca²⁺>Zn²⁺>Fe²⁺>Cu²⁺,Mg²⁺ 对产酶的促进作用最大,酶活为 972 U/mL。

表 4 金属离子对产酶的影响

金属离子(浓度 0.04%)	酶活/U·mL ⁻¹
Mg ²⁺	972
Ca ²⁺	642
K ⁺	860
Fe ²⁺	456
Zn ²⁺	514
Cu ²⁺	76

2.3.4 培养基优化正交试验

选取玉米粉作碳源、黄豆粉作氮源、Mg²⁺ 作金属离子,添加一定浓度的 NaCl 调节培养基渗透压,同时加入 1.0 g/L K₂HPO₄ 作为缓冲剂,利用 L₉(3⁴) 正交试验表来确定最佳培养基,结果见表 5。结果表明,在考察的 4 个因素中,对产酶影响的大小关系为 玉米粉>黄豆粉>Mg²⁺>NaCl,其中玉米粉的影响

最显著。通过培养基的优化试验,选出产酶能力最佳的培养基配比为玉米粉 40 g/L、黄豆粉 40 g/L、Mg-SO₄ 0.5 g/L、NaCl 10 g/L、K₂HPO₄ 1.0 g/L,酶活达 1 172 U/mL。

表 5 培养基优化正交试验表

实验号	因素				酶活 /U·mL ⁻¹
	玉米粉 /g·L ⁻¹	黄豆粉 /g·L ⁻¹	MgSO ₄ /g·L ⁻¹	NaCl /g·L ⁻¹	
1	20	20	0.3	10	454
2	20	40	0.4	15	662
3	20	60	0.5	20	926
4	40	20	0.4	20	950
5	40	40	0.5	10	1 172
6	40	60	0.3	15	1 084
7	60	20	0.5	15	858
8	60	40	0.3	20	876
9	60	60	0.4	10	950
均值 1	681	754	805	859	
均值 2	1 069	903	854	868	
均值 3	895	987	985	917	
极差	388	233	181	59	
偏差平方和	22 6616	83 378	52 323	5 963	
F 比	1.462	0.538	0.338	0.038	

2.4 发酵条件的研究

2.4.1 培养基初始 pH 值对产酶的影响

不同起始 pH 值对产酶的影响结果见图 1。在 pH 值 9.5~10.5,产酶活力比较稳定, pH 值 10.0 时,酶活最高为 1 158 U/mL。

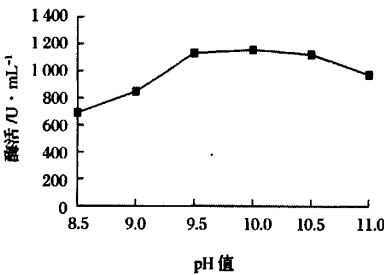


图 1 起始 pH 值对产酶的影响

2.4.2 发酵温度对产酶的影响

不同温度对产酶影响结果见图 2。结果表明,发酵温度在 40~45℃ 时酶活比较稳定,其中 45℃ 时酶活最高为 1 174 U/mL。

2.4.3 通气量对产酶的影响

(1)不同摇瓶转速对发酵液酶活影响结果见图 3。转速为 190 r/min 时酶活最高为 1 176 U/mL。转速过低,发酵液溶氧不够,菌体生长不好。转速过快,菌体生长过快,但不利于蛋白酶的产生。

(2) 250 mL 三角瓶内不同装液量对产酶的影响结果见图 4。250 mL 三角瓶的适合装液量为 100~

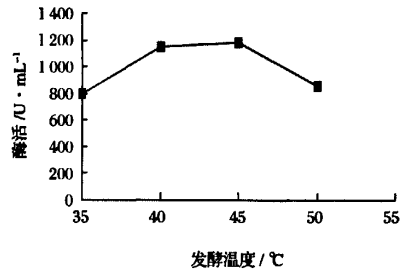


图 2 发酵温度对产酶的影响

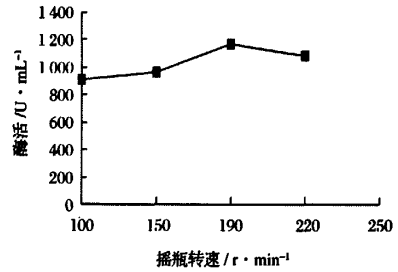


图 3 摇瓶转速对产酶的影响

125 mL,其中 100 mL 时酶活最高为 1 142 U/mL。装液量过多,发酵液溶氧不够,菌体生长不旺盛。装液量过少,虽然菌体生长迅速,但可能分解的大量代谢物抑制了蛋白酶的产生。

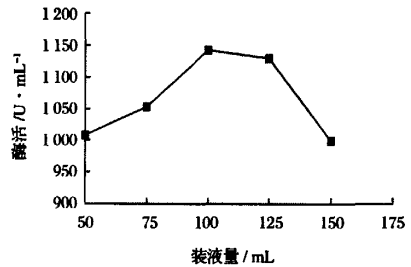


图 4 装液量对产酶的影响

2.4.4 生长曲线和产酶曲线的测定

将菌种加入优化培养基,在最适条件下培养,每 4 h 取样测 OD₆₀₀ 和酶活性,结果见图 5。该菌株在 8h 左右进入对数生长期,20h 左右进入稳定期。稳定期后,酶活迅速增加,48h 时到达最大值 1 180 U/mL,之后开始下降。

2.4.5 20 L 全自动发酵罐发酵

20 L 全自动发酵罐发酵结果见图 6。全自动发酵罐发酵,在 20h 就达到最大生长量,比摇瓶发酵提前了 4h。产酶时间加快,酶活也有较大提高,在 40h 就达到 1 392 U/mL,比摇瓶发酵缩短了 8h。

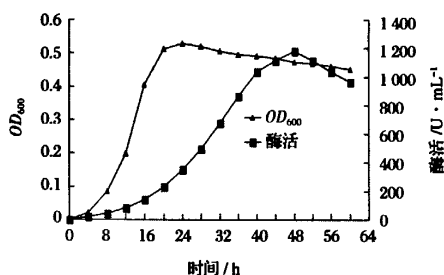


图5 摇瓶发酵菌种生长及产酶过程

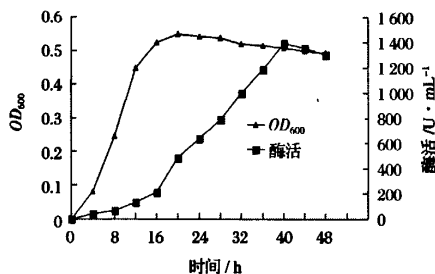


图6 全自动发酵罐发酵菌种生长及产酶过程

3 讨论

(1)从采集的土壤样品中通过初筛和复筛,获得了菌株SR-15,它能耐高温,产碱性蛋白酶相对较高为370U/mL。经形态、生理生化特性、全自动菌种鉴定仪鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

(2)通过培养基优化的单因子和正交试验,其优化培养基配比为:玉米粉40 g/L、黄豆粉40 g/L、 $MgSO_4 \cdot 0.5$ g/L、NaCl 10 g/L、 K_2HPO_4 1.0 g/L,最适培养条件为起始pH10.0、培养温度45℃、摇瓶转速190 r/min、250 mL三角瓶的装液量100 mL。利用此培养基在最适培养条件下做摇瓶发酵实验,在48h时测得最大酶活为1180 U/mL。

Screening of Thermotolerant Alkaline Protease Producing Strain and Study on the Fermentation Conditions

Yang Guandong, Du Shaoping, Yang Chuhua, Huang Qiong

(Guang Zhou Microbe Research Institute, Guangzhou 510250, China)

ABSTRACT A thermotolerant alkaline protease producing strain SR-15 from compost soil in Shangqiu was identified as *Bacillus Subtilis*. The study on fermentation showed that the optimum condition for the protease production consisted of 40 g/L corn flour, 40 g/L soybean, 0.5 g/L $MgSO_4$, 10 g/L NaCl, 1.0 g/L K_2HPO_4 , the original pH for 10.0, rate of shaking flask with 100mL liquid in a 250mL flask was 190 r/min. After fermentation for 48h at 45℃, the enzyme activity was 590U/mL.

Key words alkaline protease, *Bacillus subtilis*, study on fermentation

(3)在摇瓶发酵的基础上,初步研究了20L全自动发酵罐的发酵实验。在发酵40h时测得最大酶活为1392U/mL,与摇瓶发酵相比发酵时间大大缩短,酶活也有较大增加。

薛林贵^[8]等人对地衣芽孢杆菌原生质体进行紫外诱变,使酶活由原来的1104 U/mL提高至22080 U/mL。唐学明^[9]等人通过基因重组,得到菌株BP071,产酶活力达24480U/mL。在下一步研究中,我们将通过物理、化学、生物技术等多种方法对菌株SR-15进行选育,使其产酶能力进一步提升,为工业化生产打下基础。

参考文献

- 梅承芳,江晓路,牟海洋,等等. 碱湖高产碱性蛋白酶菌的选育和产酶条件研究[J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35(4): 613~617
- 刘成圣,刘晨光,刘万顺,等. 海洋弧菌碱性蛋白酶的分离纯化及部分性质研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(5): 734~740
- 田栖静,康永璞,等. 中国食品工业标准汇编—工业酶制剂通用试验方法. QB/T 1803~1993. 北京: 中国标准, 2000
- R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯等. 伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984. 325~328
- 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 62~63
- 程池,杨梅,李金霞,等. Biolog微生物自动分析系统—细菌鉴定操作规程的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 50~54
- 易有金,罗坤,柏连阳,等. 烟草内生细菌B-001菌株5L发酵罐最佳发酵条件[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2007, 33(6): 747~750
- 薛林贵,冯清平. 紫外诱变原生质体选育碱性蛋白酶高产菌株的研究Ⅲ: 诱变株的选育及其产酶条件的研究[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 1997, 33(2): 72~78
- 唐雪明,王正祥,邵蔚蓝,等. 碱性蛋白酶工程菌发酵条件及重组酶的纯化和性质的研究[J]. 生物工程学报, 2002, 18(6): 729~734