

产弹性蛋白酶枯草芽孢杆菌发酵条件研究

吴琦¹, 刘书亮², 张娟²

1(四川农业大学生命科学与理学院, 四川 雅安, 625014)

2(四川农业大学信息与工程技术学院, 四川 雅安, 625014)

摘要 筛选确定了枯草芽孢杆菌 BEM01 产弹性蛋白酶培养基的碳源和氮源分别是葡萄糖和干酪素, 吐温-80 能刺激菌株生长和产酶。采用三因素三水平 $L_9(3^3)$ 正交试验优化了液体培养基葡萄糖、干酪素和吐温-80 的浓度。结果表明, 优化后的产酶培养基为: 葡萄糖 2%, 干酪素 2%, 吐温 0.01%, KH_2PO_4 0.2%, MgSO_4 0.01%。优化后的发酵条件: 发酵液初始 pH 为 7.5, 装样 20 mL/300 mL 三角瓶, 按 3% 接种种子液, 接种龄 24 h, 37℃ 180 r/min 振荡培养 36 h, 菌株产弹性蛋白酶峰值为 59 U/mL, 较优化前酶活提高了 31%。

关键词 枯草芽孢杆菌, 弹性蛋白酶, 培养基, 发酵条件

弹性蛋白酶(EC3.4.4.7, Elastase)是一种以水解弹性硬蛋白(elastin)为特征的蛋白质水解酶, 它可从动物胰脏提取或由微生物发酵制得^[1]。目前, 弹性蛋白酶主要作为治疗高血脂症、防治动脉粥样硬化的生化药物, 疗效确切, 安全可靠。同时, 其广谱蛋白水解活性显示其在食品工业中具有广阔的应用前景, 具有较高的商业价值^[2,3]。我国该产品的生产主要从胰脏提取, 由于脏器资源利用受限制, 胰弹性蛋白酶供不应求。利用微生物生产弹性蛋白酶不仅能够提供足够的治疗用药物酶, 也能为开拓该酶其他方面的应用提供充足的酶源, 如降解环境中猪、牛产品加工后的难降解废物, 肉的嫩化和化妆品行业等, 具有广阔的应用前景。

本研究从选育出的产弹性蛋白酶枯草芽孢杆菌紫外诱变株 BEM01 出发, 对其培养基成分和发酵条件进行优化, 以期获得高产量的弹性蛋白酶, 为开发工业用酶提供试验依据^[4]。

1 材料与方法

1.1 菌株

枯草芽孢杆菌紫外诱变株 BEM01, 由四川农业大学农产品加工与贮藏工程省级重点实验室提供。

1.2 主要药品试剂

弹性蛋白(elastin)、地衣红-弹性蛋白(orcin-elastin)(Sigma); 蛋白胨、牛肉浸膏、酵母膏、果糖、蔗糖、胰蛋白胨、吐温-80 均为生化或分析纯试剂。

1.3 培养基

种子液体培养基(质量分数, %): 葡萄糖 1.0, 蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.5, K_2HPO_4 0.2, MgSO_4 0.01, pH7.0。

基础发酵培养基(质量分数, %): 葡萄糖 0.5, 干酪素 2.5, 酵母膏 0.2, K_2HPO_4 0.2, MgSO_4 0.01, pH7.0。

培养基经湿热高压灭菌 15 min, 备用。

1.4 方法

1.4.1 弹性蛋白酶活力测定

按照 Sachar^[5] 的方法进行测定。在此条件下, 水解 1 mg 地衣红-弹性蛋白所需的酶量定义为 1 个弹性蛋白酶活力单位。

1.4.2 生物量的测定

发酵液稀释 50 倍后用 7200 型分光光度计在波长 600 nm 处测定吸光度。

1.4.3 优化前的摇瓶发酵曲线

种龄为 24 h 的种子液, 按 5%(v/v) 接种到含有 30 mL 培养液的 300 mL 三角瓶中, 37℃, 180 r/min 振荡培养, 定时检测菌体生物量和发酵液酶活力。

1.4.4 发酵培养基的优化

单因素试验优化菌株 BEM01 产酶培养基的碳源、氮源和生长因子, 三因素三水平正交($L_9 3^3$)试验(每个处理 3 次重复)优化产酶培养基的组成和配比。

1.4.5 发酵条件的优化

对培养基初始 pH 值、装液量、接种量、接种龄、诱导因子和培养温度等条件进行研究, 优化发酵条件, 测定菌株 BEM01 的产酶曲线。

2 结果与分析

2.1 优化前的摇瓶发酵曲线

第一作者: 博士, 副教授。

收稿日期: 2008-07-07, 改回日期: 2008-09-01

在基础发酵培养基中,菌株 BEM01 在 72 h 内的发酵曲线见图 1。发酵 0~18 h,生物量和产酶活性迅速上升,发酵 18 h 时,产酶量达到峰值 45.9 U/mL。发酵 18~60 h,生物量缓慢增加,而酶活缓慢下降。此后,生物量和产酶活性趋于稳定。pH 测定表明,在发酵 6 h 内,培养液 pH 值呈中性偏酸,随后缓慢上升;发酵 24~72 h,pH 值从 8.5 上升到 9.36。

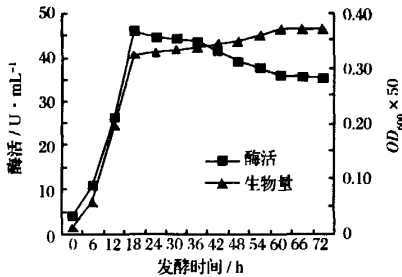


图 1 菌株 BEM01 优化前的产酶曲线

2.2 培养基的优化

2.2.1 碳源对产酶量的影响

分别以 2%葡萄糖、果糖、蔗糖、可溶性淀粉和麸皮为碳源,培养 18 h 后测定酶活和生物量(表 1)。结果表明,碳源为葡萄糖时,菌株 BEM01 的生物量居中,但产酶量最高,然后酶活依次为果糖>蔗糖>可溶性淀粉>麸皮,确定葡萄糖为培养基的碳源。

表 1 不同碳源对产酶量的影响

碳源	生物量 OD ₆₀₀ × 50	酶活 /U · mL ⁻¹
葡萄糖	0.317	46.99
果糖	0.327	39.89
蔗糖	0.321	35.52
可溶性淀粉	0.303	29.51
麸皮	0.158	27.87

2.2.2 氮源对产酶量的影响

分别以 2%干酪素、胰蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、蛋白胨和 NH₄NO₃ 为氮源,培养后测定酶活和生物量见表 2。结果表明,干酪素作为氮源时,生物量和产酶量均最高,然后依次为牛肉膏>酵母膏>蛋白胨>胰蛋白胨>NH₄NO₃,确定 2%干酪素为氮源。

表 2 不同氮源对产酶量的影响

氮源	生物量 OD ₆₀₀ × 50	酶活 /U · mL ⁻¹
干酪素	0.332	47.5
胰蛋白胨	0.176	31.15
酵母膏	0.206	31.69
牛肉膏	0.211	39.89
蛋白胨	0.187	25.68
硝酸铵	0.035	16.94

2.2.3 吐温-80 对产酶量的影响

吐温-80 作为表面活性剂,可通过增强细胞通透性的作用,提高分泌蛋白的表达量。分别加入质量分数为 0%,0.01%,0.02%,0.05%,0.1%和 0.2%的吐温-80 进行摇瓶发酵。结果表明,0.02%吐温-80 时,产酶量和生物量最大,OD₆₀₀ 为 0.225(×50),酶活 49.18 U/mL。

2.2.4 碳源、氮源和吐温-80 浓度对产酶量的影响

在基础发酵培养基中,用葡萄糖、干酪素、吐温-80 进行正交试验(L₉3³),拟求得 3 者的适合浓度,结果采用极差分析。发酵培养基优化结果和极差分析、各因素水平与指标的关系、酶活与生物量的关系、酶活与 pH 值的关系见表 3。结果表明,以弹性蛋白酶产酶量为发酵条件优化选择的依据,培养基成分影响力由大到小排列顺序为:葡萄糖>干酪素>吐温-80。该实验的最优组合是 A₂B₂C₁,即:葡萄糖 2%,干酪素 2%,吐温 0.01%。

表 3 发酵培养基正交试验(L₉(3³))结果及极差分析

编号	葡萄糖 (A)	干酪素 (B)	吐温-80 (C)	酶活 /U · mL ⁻¹	生物量 (OD ₆₀₀ × 50)	pH
1	1(1%)	1(1%)	1(0.01%)	38.81	0.280	8.45
2	1	2(2%)	2(0.02%)	41.04	0.298	8.64
3	1	3(3%)	3(0.03%)	43.27	0.268	8.57
4	2(2%)	1	3	42.18	0.237	7.96
5	2	2	1	50.35	0.256	8.03
6	2	3	2	45.46	0.237	8.11
7	3(3%)	1	2	38.83	0.233	7.24
8	3	2	1	37.85	0.245	7.23
9	3	3	3	40.44	0.239	7.11
K ₁	123	119.7	126.9			
K ₂	137.8	129.1	125.2			
K ₃	117	129	125.7			
\bar{K}_1	41	39.9	42.3			
\bar{K}_2	45.9	43.03	41.7			
\bar{K}_3	39	43	41.9			
R	6.9	3.1	0.4			

2.3 发酵条件的优化

2.3.1 发酵液初始 pH 对产酶量的影响

按上述优化后的发酵培养基,调节初始 pH6~11,测定对产酶量的影响,结果见图 2。由图 2 知在此 pH 范围内,产酶活性波动较小。pH 7.5 时,产酶量和生物量均达到最大,酶活为 50.82U/mL。

2.3.2 装液量对产酶量的影响

在 2.3.1 的基础上,培养基 pH 7.5,测定在 300 mL 三角瓶中以不同装量对产酶的影响,结果见图 3。由图 3 知装液量为 20 mL 时,产酶量和生物量均达到最大,酶活为 51.37 U/mL。

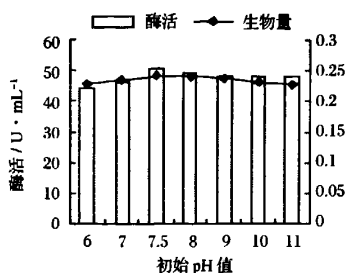


图2 初始pH对产酶量的影响

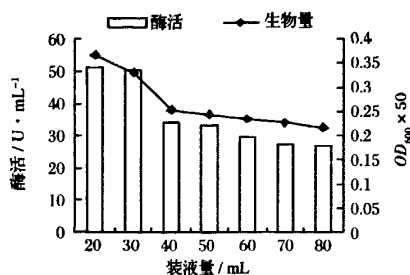


图3 装液量对产酶量的影响

2.3.3 接种量对产酶的影响

在2.3.2的基础上,装量20 mL/300 mL,按1%、3%、5%和7%的接种量接种种子液,优化接种量,见图4。结果表明,接种量为7%时生物量最大;接种量为3%时,产酶量最高为52.46 U/mL。

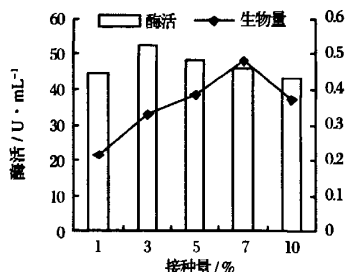


图4 接种量对产酶量的影响

2.3.4 接种龄对产酶的影响

在2.3.2的基础上,按3%的接种量接种,分别接入12 h、16 h和24 h种龄的种子液,优化接种龄,见图5。结果表明,种子液接种龄为24 h时,产酶量和生物量均达到最大,酶活为52.46 U/mL。

2.3.5 温度对产酶的影响

在2.3.4的基础上,接种龄为24 h的种子液,分别在25、30、37和45℃培养,优化培养温度,见图6。结果表明,37℃时,产酶量和生物量均达到最大,酶活为52.46 U/mL。

2.3.6 发酵条件优化后菌株发酵过程的测定

优化培养基和发酵条件后的产酶曲线见图7。

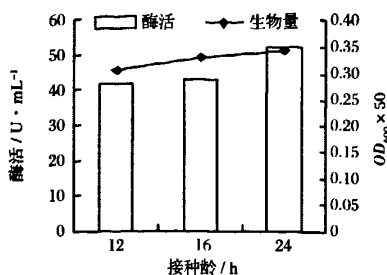


图5 接种龄对产酶量的影响

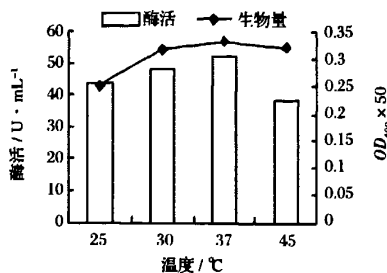


图6 温度对产酶量的影响

发酵0~18 h,生物量上升迅速;发酵18~54 h,菌体比优化前此阶段生长速率略大,生物量持续增加;发酵54~72 h,生物量增加缓慢。发酵36 h时,产酶量达到峰值59 U/mL,比优化前推迟18 h,酶活提高了31%。pH测定表明,在发酵6 h内pH值呈中性偏酸;发酵6~10 h,发酵液pH呈中性;发酵24~72 h, pH值从8.11上升到9.01,比优化前有所降低。

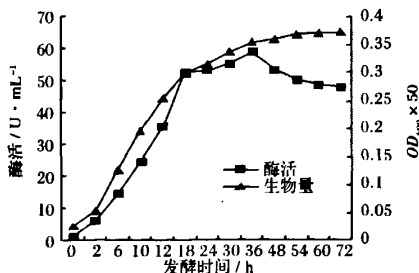


图7 菌株BEM01优化后的产酶曲线

3 讨论

国外关于微生物弹性蛋白酶的研究较早,其中以Janda等人^[6]分离到的*V. cholerae* non-O1弹性蛋白酶产酶能力最高,酶活高达1 000 U/mL。国内,1990年代初颜子颖等^[2]报道产弹性蛋白酶芳香黄杆菌之后,迄今已有多株弹性蛋白酶微生物产生菌的报道^[7~10],并通过优化培养基和发酵条件提高菌株产酶能力^[9~16]。本文优化后的产酶量为59 U/mL,处于中等水平。这种差距,除由不同菌种产酶能力的差

异以及摇瓶发酵与发酵罐发酵的差异引起外,对弹性蛋白酶的活力单位定义、酶活测定条件,特别是底物偶联染料的不同,均对酶活测定值有一定影响。

本研究通过优化试验确定了弹性蛋白酶产生菌株 BEM01 的发酵培养基组成为:碳源 2%葡萄糖,氮源 2%干酪素,表面活性剂 0.01%吐温-80,0.2%的 K_2HPO_4 和 0.01%的 $MgSO_4$ 。优化后的发酵条件为:初始 pH7.5,装液量为 20 mL/300 mL 三角瓶,接种量 3%,接种龄 24 h,培养温度 37℃。在此条件下,培养 36 h,发酵液产酶活力从初始的 45.9 U/mL 增加到 59 U/mL,提高了 31%。在此基础上,本课题组已对该菌株的弹性蛋白酶进行了分离纯化和酶学性质研究。结果显示,该菌株胞外分泌蛋白较单一,经过 $(NH_4)_2SO_4$ 和葡聚糖凝胶 G-100 纯化后,即可得到电泳纯的酶蛋白(另文报道)。此外,该菌株在液体培养条件下产酶迅速,培养周期短,拟进行的高密度上罐发酵研究可望进一步提高产酶量。因此,枯草芽孢杆菌 BEM01 具有较好的应用开发前景。

参 考 文 献

- 唐宝英,朱晓慧. 微生物弹性蛋白酶研究概况[J]. 工业微生物,1998,28(1):40~44
- 颜子颖,关国雄. 微生物发酵生产药用弹性蛋白酶[J]. 中国医药工业杂志,1991,22(10):469~472
- 刘小杰,陈启和,孙 桥. 弹性蛋白酶的研究进展[J]. 中国食品添加剂,2004,(4):29~32
- 柯娜,肖昌松. 微生物产生的弹性蛋白酶研究现状[J]. 微生物学通报,2002,29(4):91~94
- Sachar, L A, Winter K K, Sicher N, et al. Photometry method for estimation of elastase activity[J]. Proc Soc Ex-peti Biol Med, 1955, 90(2): 323~326
- Janda J M, Abbott S L, Khashe S. Identification and initial characterization of elastase activity associated with *Vibrio cholerae*[J]. Current Microbiology, 1999, 39(2): 73~78
- 孙 岸,刘宇峰,王金英. 枯草杆菌弹性蛋白酶高产菌株的筛选与鉴定[J]. 生物技术,2001,11(2):30~32
- 张 娟,刘书亮,吴 琦,等. 产弹性蛋白酶芽孢杆菌的筛选与鉴定[J]. 四川农业大学学报,2007,25(3):253~256
- 陈启和,何国庆,邬应龙. 弹性蛋白酶产生菌的筛选及其发酵条件初步研究[J]. 浙江大学学报,2003,29(1):59~64
- 王娟丽,王以强,李奠础. 弹性蛋白酶生产菌种的筛选及发酵条件的研究[J]. 生物技术,2005,15(5):24~26
- 肖昌松,吕 健,田新玉,等. 嗜碱芽孢杆菌 XE22-4-1 碱性弹性蛋白酶发酵条件的研究[J]. 微生物学报,2001,41(5):611~616
- 李洪军,贺稚非,陈宗道,等. 假单胞菌 SWU-M 生产弹性蛋白酶发酵条件的研究[J]. 中国食品学报,2004,4(4):29~33
- He G Q, Chen Q H, Ju X J, et al. Improved elastase production by *Bacillus* sp. EL31410 — further optimization and kinetics studies of culture medium for batch fermentation[J]. J Zhejiang Univ. SCI, 2004, 5(2):149~156
- 姚勇芳,李洪军. 弹性蛋白酶高产菌株摇瓶发酵条件优化研究[J]. 食品与机械,2006,22(1):18~21
- 陈启和,何国庆. 产弹性蛋白酶 EL314CF10 菌株种子培养基优化的研究初报[J]. 食品与发酵工业,2007,28(10):13~17
- 罗江卫,王雁萍,李培春,等. 弹性蛋白酶产生菌发酵条件的研究[J]. 工业微生物,2008,38(1):37~40

Study on Fermentation Conditions for Elastase Produced by *Bacillus subtilis*

Wu Qi¹, Liu Shuliang², Zhang Juan²

1(College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

2(College of Information & Engineering Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

ABSTRACT The fermentation conditions were optimized in order to improve elastase production of *Bacillus subtilis* strain BEM01. The suitable carbon source and nitrogen source were sugar and casein, respectively, and tuween-80 was helpful to increase biomass and enzyme activity. Three-factor three-level orthogonal experiment was used to optimize the concentration of sugar, casein and tuween-80. The optimal liquid medium consisted of 2% sugar, 2% casein, 0.01% tuween-80, 0.2% KH_2PO_4 and 0.01% $MgSO_4$. The optimum culture conditions were: initial pH 7.5, medium volume 20 mL in 300 mL flask, inoculation volume 3%, seed age 24 h and agitation speed 180 r/min. After incubation at 37℃ for 36 h, the elastase activity reached a maximum of 59 U/mL, which is 31% higher than before.

Key words *Bacillus subtilis*, elastase, medium, fermentation condition