

嗜碱芽孢杆菌 XE22-4-1 碱性弹性蛋白酶发酵条件的研究*

肖昌松 吕 健 田新玉 李向前 周培瑾

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要:从西藏天然碱湖中筛选到一株产碱性弹性蛋白酶(alkaline elastase)菌株,最适生长 pH 为 10.0,经鉴定为 *Bacillus* sp.,编号 XE22-4-1。该菌产酶最适碳源为 2% 葡萄糖,氮源为 0.25% 酵母粉,豆饼粉对发酵产酶有促进作用。2 L 发酵罐实验表明,溶解氧是影响该菌株产酶的重要因素。通过提高通气量和改变搅拌速度,该菌株可在发酵 48 h 内达到产酶高峰,酶活力最高达 266 u/mL。

关键词:碱性弹性蛋白酶,芽孢杆菌,发酵条件

中图分类号:TQ925+.2 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 05-0611-06

弹性蛋白酶(Elastase EC 3.4.21.36)是一种肽链内切酶,以分解一般蛋白水解酶难以水解的弹性蛋白(Elastin)为特征。在动物体内,其含量水平与动脉粥样硬化症有关^[1]。因此,该酶主要用作治疗高血脂症、防治动脉粥样硬化的药物^[2]。另外,由于该酶能够高度专一水解结缔组织中的胶原和硬蛋白,而不破坏其它成分,达到肉类软化而不失其口味的目的,优于目前普遍使用的肉类软化剂^[3],因此,在食品加工领域也有广泛的应用前景。

弹性蛋白酶主要存在于动物胰脏中,在微生物类群中也广有分布^[4]。目前,国内该酶的生产局限于从动物胰脏中提取,由于脏器资源有限,其应用受到很大限制。因此,利用微生物发酵大规模工业化生产弹性蛋白酶具有重要的现实意义,不仅能推动该酶在医药领域中的应用,更能为开拓该酶在其它方面的应用提供充足的酶源。我们从西藏碱湖分离到一株弹性蛋白酶高产菌株,在摇瓶实验基础上,进行了 2 L 发酵罐发酵条件的研究,以探讨其工业化生产的可行性。

1 材料和方法

1.1 菌种

嗜性芽孢杆菌 XE22-4-1,分离自西藏地区天然碱湖。

1.2 培养基及培养方法

1.2.1 基础培养基^[5]:成份 A:葡萄糖 10 g,大豆蛋白胨 5 g,酵母粉 5 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, NaCl 5 g,以蒸馏水定容至 800 mL(固体培养基另加 15 g 琼脂粉);成份 B: Na_2CO_3 10 g,以蒸馏水定容至 200 mL。成份 A、B 单独灭菌(0.055 MPa/30 min),用前混

* 国家科技部“九五”攻关项目(96-C03-02-04)

作者简介:肖昌松(1951-),男,湖北省武汉人,中国科学院微生物研究所副研究员,1983~1984 年赴日本东京大学从事细菌化学分类研究,1991~1993 年赴美国肯塔基大学从事生物降解研究,现在主要从事极端环境微生物和腐蚀微生物学方面的研究。

收稿日期:2000-10-23,修回日期:2001-01-18

匀。

1.2.2 发酵培养基:成份 A:葡萄糖 20 g,豆饼粉 5 g,酵母粉 2.5 g, K_2HPO_4 0.75 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, NaCl 20 g,以上成份以蒸馏水定容至 800 mL;成份 B: Na_2CO_3 10 g,以蒸馏水定容至 200 mL。成份 A、B 单独灭菌(0.055MPa/30 min),用前混匀。

1.2.3 种子液培养方法:50 mL 种子培养基接种平板活化菌体,250 r/min,37 °C 摇瓶培养 2 d。

1.3 粗酶制备

将细菌发酵液离心(10 000 r/min, 10 min),收集去菌体发酵液,进行硫酸铵分级盐析(30%~65%饱和度),沉淀溶于 0.05 mol/L pH 9.0 硼酸缓冲液中,即为粗酶液。

1.4 分析方法

1.4.1 酶活力测定方法:按 Sacher 方法^[6],1 mL 酶液与 20 mg 地衣红—弹性蛋白(orcin-elastin)在 1 mL 0.05 mol/L pH 9.0 硼酸缓冲液体系中于 55 °C 水浴保温 1 h,不时振荡。以 2 mL 0.7 mol/L pH 6.0 磷酸缓冲液终止反应,10 000 r/min 离心 10 min,上清液于 590 nm 处测光吸收。定义 20 mg 地衣红—弹性蛋白(orcin-elastin)完全水解后,590 nm 处测得光吸收值(OD 值)的一半为 10 个酶活力单位^[3]。

1.4.2 酪蛋白酶活力分析:按 Hagihara^[7]方法,1 mL 酶液与 5 mL 1.2% 的酪蛋白溶液混合,于 55 °C 保温 10 min 后加入 5 mL 三氯乙酸溶液(Trichloroacetic acid 简称 TCA),混匀后于 55 °C 继续保温 30 min。悬液以滤纸过滤,于 275 nm 处测定滤液的光吸收。酶液加入 TCA 溶液后再加底物,以此做为对照。定义在上述反应体系中每分钟释放 1 μ g 酪氨酸为 1 个酪蛋白酶活力单位。

1.4.3 弹性蛋白和胶原的水解:1 mL 酶液与 20 mg 底物在 1 mL 0.05 mol/L pH 9.0 硼酸缓冲液体系中于 55 °C 水浴保温 1 h,不时振荡,以 2 mL TCA 溶液终止反应,混匀后于 55 °C 继续保温 30 min。10 000 r/min 离心 10 min,上清液于 275 nm 处测定光吸收。

1.4.4 糖含量测定方法:3,5 二硝基水杨酸法^[8]。

1.5 仪器与试剂

Beckman ϕ 71 型 pH 计。HP 公司 8452A 型紫外-可见光分光光度计。NBS 公司 G24、G25 型振荡摇床及 BioFlo 自动控温 2 L 发酵罐。弹性蛋白、地衣红—弹性蛋白(orcin-elastin)、胶原(Collagen)均购自 Sigma 公司。酪蛋白购自 Serva 公司。酵母粉为 Oxoid 产品。豆饼粉为自制。猪胰弹性蛋白酶(pancreatic elastase)分别购自 Sigma 公司和常州生化药厂。其余试剂均为国产分析纯。

2 结果

2.1 菌种筛选

从西藏和内蒙古地区天然碱湖样品分离的 225 株嗜碱菌中,在含弹性蛋白固体培养基上 37 °C 培养 2 d 后,获得能水解弹性蛋白的菌株 23 株。利用地衣红—弹性蛋白(orcin-elastin)为底物测定培养液水解弹性蛋白的酶活力,菌株 XE22-4-1 的产酶量最高,可达 14.6 u/mL,故选取它作为供试菌株。该菌株分离自西藏地区班戈湖,pH 生长范围为 7.0~12.0,最适生长 pH 为 10.0,属兼性嗜碱菌,经鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。

2.2 发酵培养基的优化

2.2.1 碳氮源的选择:改变基础培养基碳源、氮源的种类和浓度,摇瓶振荡培养后测定酶活力。结果列于表 1 和表 2,最适宜菌株 XE22-4-1 产酶的碳源为 2% 葡萄糖,氮源为 0.25% 酵母粉。

表 1 碳源对产酶的影响

Table 1 Effect of carbon source on elastase production		
Carbon source	Concentration/ %	Relative activity/ %
Glucose	0.5	82.2
	1.0	93.5
	2.0	100
	2.5	86.7
Lactose	1.0	63.5
Sucrose	1.0	51.7
Mannose	1.0	47.1
Dixtrin	1.0	27.3
Soluble starch	1.0	86.7

表 2 氮源对产酶的影响

Table 2 Effect of nitrogen source on elastase production		
Nitrogen source	Concentration/ %	Relative activity/ %
Soy peptone	0.50	33.2
Casein	0.50	11.3
Beef extract	0.50	20.7
Yeast extract	0.10	75.4
	0.25	100.0
	0.50	56.6
	1.00	14.5

2.2.2 添加豆饼粉对产酶的影响:在芽孢杆菌生产弹性蛋白酶的研究中发现^[9],豆饼粉对产酶有较大的促进作用。本研究也考察了添加豆饼粉对菌株 XE22-4-1 产碱性弹性蛋白酶的影响。结果发现,添加 0.5% 豆饼粉显著促进细胞产酶,由初筛菌株的 14.6 u/mL 提高至 31.4 u/mL。另外,有报道采用大豆酸性水解物代替豆饼物,亦对芽孢杆菌产弹性蛋白酶有促进作用^[10]。

2.2.3 NaCl 和 Na₂CO₃ 浓度对产酶的影响:在以 2% 葡萄糖、0.5% 豆饼粉、0.25% 酵母粉为碳氮源的发酵培养基中,分别改变 NaCl 和 Na₂CO₃ 的浓度,结果(图 1~2)表明,最适于该菌株产酶的 NaCl 和 Na₂CO₃ 浓度分别为 2% 和 1%,起始 pH 为 10.0。

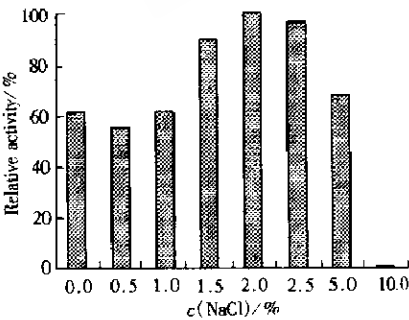


图 1 NaCl 浓度对发酵产酶的影响

Fig.1 Effect of NaCl on elastase production

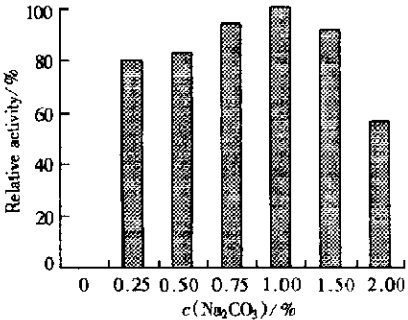


图 2 Na₂CO₃ 浓度对发酵产酶的影响

Fig.2 Effect of Na₂CO₃ on elastase production

2.2.4 接种量对产酶的影响:将液体种子分别按照不同的接种量接入发酵培养基中,培养后测酶活力。实验结果显示,接种量对菌体发酵产酶影响不大。

2.2.5 通气量对产酶的影响:在 250 mL 摇瓶中分别装入 25 mL、50 mL 和 75 mL 上述优化

的发酵培养基,按 1% 接种量接种,振荡培养 48 h 后酶活力分别为 219 u/mL、173.5 u/mL 和 165.3 u/mL。可见,菌株 XE22-4-1 产弹性蛋白酶需要有足够的通气量。

2.3 2 L 发酵罐产酶条件的优化

为探索大规模发酵生产的可行性,我们将碱性弹性蛋白酶的发酵从摇瓶水平提升至 2 L 发酵罐水平,以探索其在扩大培养中适宜的发酵产酶条件。

2.3.1 通气量和搅拌速度对 2 L 发酵罐发酵产酶的影响:摇瓶实验表明,通气量对该菌发酵产酶有很大影响。在 2 L 发酵罐发酵实验中,我们通过改变搅拌速度和通气量来改变发酵时的溶解氧,考察其对产酶的影响。由表 3 可以看出,通气量和搅拌速度提高,产酶水平也明显提高,表明溶解氧对该菌产酶至关重要。考虑到要保持一定的装液量及搅拌力对细胞的剪切作用,2 L 发酵罐发酵实验采用 500 r/min, 1:1 vvm 通气量为宜。

表 3 通气量和搅拌速度对发酵产酶的影响

Table 3 Effect of aeration and mixing speed on elastase production		
Aeration /(vvm)	Mixing speed /(r/min)	Maxium enzyme activity/(u/mL)
1:0.5	300	10.58
1:1	350	80.3
1:1	400	113.0
1:1	500	120.0

2.3.2 发酵时间内 pH、糖含量、菌量及产酶之间的关系:图 3 显示该菌株在 2 L 发酵罐发酵实验中,发酵 64 h 内各参数的变化情况。在发酵期间,发酵液的 pH 值先下降后又上升,这一现象与日本学者 Horikoshi 的研究报道相一致^[11];产酶高峰期出现在菌体生长的对数后期,表明该酶是在菌体生长后期产生并分泌;糖含量变化与菌体生长状况基本一致,但该菌在生长后期出现二度生长现象,这可能与该菌不同时期的碳源利用有关。

表 4 2 L 发酵罐连续发酵 5 批次实验结果

Table 5 Result of continuous 5 batches fermentation in a 2 L stirred tank		
Batch No.	The time achieving maxium enzyme activity/h	Maximum enzyme activity /(u/mL)
1	41	189
2	46	198
3	36	266
4	42	249
5	46	254

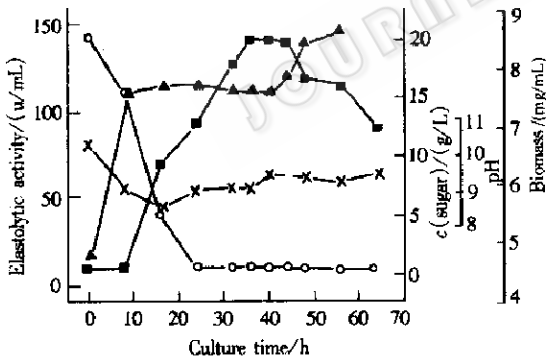


图 3 2 L 发酵罐产酶过程曲线

Fig.3 The course of elastase production in a 2 L stirred tank

× — × pH of broth; ○ — ○ Content of sugar;
▲ — ▲ Biomass; ■ — ■ Elastolytic activity.

260 u/mL,产酶高峰在 40 h 左右出现。表明该菌株在此发酵条件下发酵产酶稳定,放罐时间在 40 h 左右较适宜。

2.3.3 优化发酵条件下连续 5 批次发酵结果:在上述优化条件下,连续发酵 5 批次,结果如表 4 所示,最高产酶单位稳定在 190 ~

2.4 粗酶性质

2.4.1 最适反应 pH: 在不同 pH 的 0.1 mol/L 硼酸缓冲液 (pH8.0 ~ 9.5) 和 0.1 mmol/L NaHCO₃-NaOH 缓冲液 (pH9.5 ~ 11.0) 中, 按标准方法测定酶活力, 以最高酶活力为 100%。结果(图 4)表明, 该酶的最适反应 pH 为 9.0, 属碱性蛋白酶。

2.4.2 最适反应温度: 在 0.05 mol/L pH8.0 硼酸缓冲液中, 分别在不同温度下, 按标准方法测定酶活力, 以最高酶活力为 100%。结果(图 5)表明, 该酶的最适反应温度为 55 ℃。

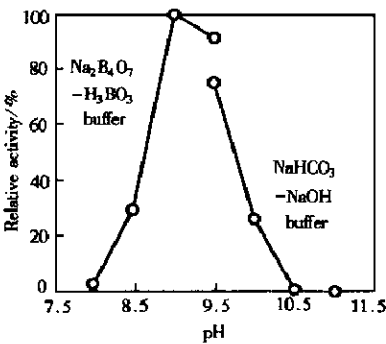


图 4 酶的最适反应 pH

Fig.4 Effect of pH on the enzyme activity

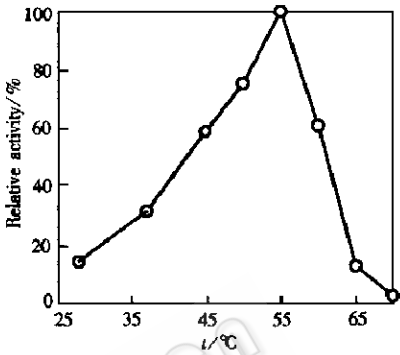


图 5 酶的最适反应温度

Fig.5 Effect of temperature on the enzyme activity

2.4.3 对弹性蛋白和胶原的水解能力: 以对酪蛋白(casein)的相对酶活力为标准, 考察该酶对弹性蛋白和胶原的水解特异性, 并分别与 Sigma 公司和常州生化药厂(商品名: Changsheng®)生产的猪胰弹性蛋白酶做比较。结果(表 5)表明, 菌株 XE22-4-1 产生的碱性弹性蛋白酶与 Sigma 公司生产的猪胰弹性蛋白酶性质相似, 而与常州生化药厂生产的猪胰弹性蛋白酶不同。菌株 XE22-4-1 产生的碱性弹性蛋白酶, 易于水解弹性蛋白, 水解能力是水解胶原的 3 倍。

表 5 对弹性蛋白和胶原的水解能力

Table 5 Hydrolysis of elastin and collagen

Enzyme	Relative activity ^a	
	elastin/casein	collagen/casein
Alkaline elastase(XE22-4-1)	1.921	0.657
Pancreatic elastase(Sigma)	1.309	0.400
Pancreatic elastase(Changsheng®)	0.498	1.181

^a Hydrolysis activity was assayed as described in Materials and Methods. Data were expressed as a ratio of hydrolysis activity.

3 讨论

目前有关微生物产弹性蛋白酶的研究, 仅限于摇瓶培养水平, 所报道的最高酶产量为 165 u/mL^[9]。本研究筛选得到的碱性弹性蛋白酶产生菌 *Bacillus* XE22-4-1, 经培养基及发酵条件优化, 在 2 L 发酵罐发酵实验中, 最高产酶达到 266 u/mL, 为目前国内外报道的产弹性蛋白酶最高的菌株, 具有广阔的工业应用前景。所产碱性弹性蛋白酶与脏器来源弹性蛋白酶一样, 具有较广的底物水解专一性^[2], 且更易于水解弹性蛋白。

由于溶解氧对菌株 XE22-4-1 发酵产酶影响很大,在更大规模的生产中,应充分考虑增大通气量,以致提高酶产量,从而实现该酶的工业化生产,解决脏器资源有限对该酶应用的制约。

参 考 文 献

- [1] Balo J, Bango I. *Acta Physiol Sci Hung*, 1952,3:317.
- [2] 陈新谦.新编药理学.第 12 版.北京:人民卫生出版社,1988.327.
- [3] Takagi H, Kondou M, Hisatsuka T, *et al.* *J Agri Food Chem*, 1992, 40:2364 ~ 2368.
- [4] Morihara K, Tsuzuki H. *Arch Biochem Biophys*, 1967, 120:68 ~ 78.
- [5] Horikoshi K. *Microorganisms in Alkaline Environments*. Tokyo:Kodansha Ltd, 1991.5 ~ 6.
- [6] Sachar L A, Winter K K, Sicher N, *et al.* *Proc Soc Exp Biol Med*, 1955, 90:323 ~ 326.
- [7] Hagihara B, Matsubara H, Nakai M, *et al.* *J Biochem*, 1958,45:185 ~ 194.
- [8] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术.第二版.北京:高教出版社,1997.1 ~ 3.
- [9] Tsai Y C, Juang R Y, Yamasaki M, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54:3156 ~ 3161.
- [10] Takagi H, Tsai Y C, Nakanori S, *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1995,59:1591 ~ 1592.
- [11] Horikoshi K. *Microorganisms in Alkaline Environments*. Tokyo:Kodansha Ltd,1991.29 ~ 31.

FERMENTATION CONDITIONS FOR PRODUCTION OF ALKALINE ELASTASE BY ALKALIPHILIC *BACILLUS* XE22-4-1 *

Xiao Changsong Lu Jian Tian Xinyu Li Xiangqian Zhou Peijin

(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*)

Abstract: A extracellular alkaline elastase producing bacterial strain *Bacillus* XE22-4-1, with the optimum pH of 10.0 for its growth, was isolated and screened from alkali lake of Tibet. 2% glucose and 0.25% yeast extract are respectively the appropriate carbon and nitrogen source on elastase production. Soymeal can promote elastase production. The fermentation conditions in a 2 L stirred tank were investigated. the results have revealed that the dissolved oxygen is the most effective factor on elastase production. The maximum elastolytic activity reached 266 u/mL among 48 hours of fermentation by combination of enhancing aeration and changing the mixing speed.

Key words: Alkaline elastase, *Bacillus* sp., Fermentation conditions

* Supported by Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development(96-C03-02-04)