

利用淀粉的碱性蛋白酶工程菌的培养条件*

冯耀宇¹ 杨文博² 何志敏¹

(¹天津大学化学工程研究所 天津 300072) (²南开大学微生物学系 天津 300071)

自 70 年代开始,国内曾筛选出短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) 289、209 两株产碱性蛋白酶的菌株。由于这两个菌株以葡萄糖为速效碳源,菌株产碱性蛋白酶的能力受培养基中总糖的制约,且两株菌易受短小芽孢杆菌烈性噬菌体 pp₁-pp₁₀ 的感染,因而不利于作为碱性蛋白酶制剂生产用菌。作者已从制革厂毛泥池中分离得到一株碱性蛋白酶产生菌——短小芽孢杆菌 c172,该菌株对 pp₁-pp₁₀ 噬菌体不敏感,对地衣芽孢杆菌 pL₁ 噬菌体亦无交叉感染,是野生型的噬菌体抗性菌株^[1]。c172 菌无淀粉酶基因,仍以葡萄糖为碳源。为解除培养基中总糖含量对 c172 菌株产碱性蛋白酶的不利影响,采用原生质体转化手段将带有淀粉酶(Amy)、卡那霉素抗性(Km^r)和氯霉素抗性(Cm^r)基因的 pBX 96 质粒导入 c172 菌株中,获得了 c172(pBX 96)转化子。该转化子能够以玉米粉为碳源,经 Amy 基因编码的糖化型 α -淀粉酶水解玉米粉后,水解物可为菌体生长和生产碱性蛋白酶持续提供碳源。本文报道 c172(pBX 96)转化子碱性蛋白酶发酵条件的研究结果。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

短小芽孢杆菌 c172(pBX 96)转化子是以 c172 菌株为受体菌,通过原生质体转化手段导入 pBX 96 质粒后构建而成的工程菌株^[1]。

c172 菌株是从制革厂毛泥池中分离出的产碱性蛋白酶的野生型菌株,其表型特征为:利用葡萄糖和淀粉酸水解糖产生碱性蛋白酶,不利用淀粉质碳源,抗 pp₁-pp₁₀ 和 pL₁ 噬菌体感染。

pBX 96 质粒,1.85 kb,由取自 *B. megaterium* AS 1.127 的 Amy、Km^r 和 Cm^r 基因构成^[2]。

1.2 基本培养基(%)

玉米粉 5, 豆饼粉 3, Na₂HPO₄ 0.4, KH₂PO₄ 0.03, MgSO₄ · 7H₂O 0.02, CaCl₂ 0.3, Na₂CO₃ 0.35, pH 8.5~9.0, 1.5kgf/cm² 灭菌 30 min。接种前加入经细菌滤器灭菌的 Km, 终浓度为 20 μ g/ml。

1.3 分析方法

碱性蛋白酶活力测定: Folin-酚法,按轻工业部颁标准 QB746-81 进行。

发酵液还原糖的测定: 3,5-二硝基水杨酸法^[3]。

2 结果和讨论

2.1 不同碳源对碱性蛋白酶活力的影响

在基本培养基中分别用不同碳源代替玉米粉,其余成分不变。培养后测酶活力,结果如表 1。玉米淀粉、薯干粉的效果均不如玉米粉,糊精与玉米粉相近,可溶性淀粉最佳。但考虑到工业生产中原料价格因素,应以玉米粉作碳源最佳。对玉米粉的添加量做了进一步考查,以 6% 用量为佳,结果见表 2。

* 天津市自然科学基金资助项目。

表1 不同碳源对蛋白酶活力的影响

碳 源	活力 (U/ml)
湖 精	5242
玉米淀粉	3931
薯 干 粉	3604
可溶性淀粉	6442
玉 米 粉	5351

表2 玉米粉含量与酶活力的关系

玉米粉 (%)	酶活力 (U/ml)
4	4893
5	5020
6	5360
7	5120

2.2 不同氮源对碱性蛋白酶活力的影响

测试了不同氮源对c172(pBX 96)转化子碱性蛋白酶活力的影响,见表3。速效无机氮源对产酶有显著影响,与有机氮源相比,活力明显低下。这可能是由于 NH_4^+ 和 NO_3^- 被快速利用后造成培养基中 pH 下降或升高后对菌体产酶不利所致。此外,无机氮源只能为菌体提供氮元素,尚需转化成氨基酸才能合成蛋白酶;而有机氮源则可以直接为菌体提供氨基酸。因此,无机氮源不利于产酶。

表3 不同氮源对酶活力的影响

氮 源 (3%)	酶活 (U/ml)	氮 源 (3%)	酶活 (U/ml)
豆饼粉	5236	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	2232
鱼 粉	5246	NH_4NO_3	1970
肉 胨	5334	KNO_3	1924
鱼蛋白胨	5284	NaNO_3	2101
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2185	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1970
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	2400	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	1839
NH_4Cl	1839		

在有机氮源中,豆饼粉与鱼粉、肉胨、鱼蛋白胨相比蛋白酶活力相近。鉴于蛋白酶的工业发酵均以豆饼粉作为廉价的氮源原料,实验对不同用量的豆饼粉作了考查,c172(pBX 96)转化子发酵培养基中以4%的豆饼粉为宜。

2.3 镁盐的选择

曾有文献报道^[4],减少培养基中的 SO_4^{2-} 浓度对产酶有利,建议用氯化物代替硫酸盐,考虑到自来水中含有少量的 SO_4^{2-} ,故建议用蒸馏水来配制培养基。我们用 0.06% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 代替 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Mg^{2+} 摩尔浓度一致)进行实验,结果表明,0.06% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 效果较佳。不过用蒸馏水配制酶活提高效果并不显著,因而将培养基中 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 改为 0.06% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,培养基仍用自来水配制。

2.4 培养基中添加少量葡萄糖

c172(pBX 96)转化子是在无淀粉酶基因的c172受体株中导入糖化型 α -淀粉酶基因而构建成的。当少量的转化子接入摇瓶后,为使转化子在产生糖化型 α -淀粉酶分解培养基中的玉米粉之前得以增殖,在摇瓶培养基中添加少量葡萄糖以考查添加葡萄糖的可行性。添加葡萄糖后酶活显著提高。可见,先保证菌体生长,然后再利用 pBX 96 编码的淀粉酶来水解培养基中的玉米粉,从而为菌体提供碳素营养,对菌体的大量增殖和蛋白酶的合成与分泌是有利的。葡萄糖的添加量以 0.1% 为宜。

2.5 初始 pH 值的选择

环境中的 pH 值是影响微生物生长的重要因素之一。就产酶的菌株而言,对培养基的初始 pH 值更为

敏感^[5]。通过添加不同浓度的 Na_2CO_3 调节初始 pH 值以考查 c172(pBX 96) 转化子的产酶能力。

已报道的 pBX 96 质粒性质的研究^[6]表明, 该质粒产糖化型 α -淀粉酶的最适 pH 为 6.0, 而我们在进行 c172 受体菌产蛋白酶实验时发现, c172 菌株产碱性蛋白酶的最适 pH 为 9.0。两种不同类型的酶在 pH 值要求上相差较大, 为使导入的 Amy 基因得以表达, 既能水解培养基中的玉米粉生成葡萄糖, 提供转化子所需要的碳源, 又能使转化子大量分泌蛋白酶, 需要兼顾两类酶对 pH 值的要求, 初始 pH 为 7.0 时对菌体生长和分泌两类酶还是适宜的。

2.6 摇瓶发酵动态

根据上述实验结果, c172(pBX 96) 转化子摇瓶发酵的最佳配方为 (%): 玉米粉 6, 豆饼粉 4, Na_2HPO_4 0.4, KH_2PO_4 0.03, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.06, CaCl_2 0.3, Na_2CO_3 0.25, pH = 7.0, $1.5 \text{ kgf} / \text{cm}^2$ 灭菌 30 min, 葡萄糖 $0.5 \text{ kgf} / \text{cm}^2$, 20 min 单独灭菌。接种前补加葡萄糖和经细菌滤器灭菌的 Km, 终浓度分别为 0.1% 和 $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ 。

发酵过程中的酶活力、pH 值及残糖的变化见图 1。

接种后数小时 pH 值降到 6.0~6.5 左右, 经大约 4 h 的滞留后回升, 在 pH 回升的同时, 酶活性急速上升, pH 升至 8.5~9.0 时, 酶活性达到顶峰。同时, 在整个发酵过程中, 单糖含量维持在 1.0%~1.4% 之间, 比较稳定的单糖含量对转化子产酶有利。

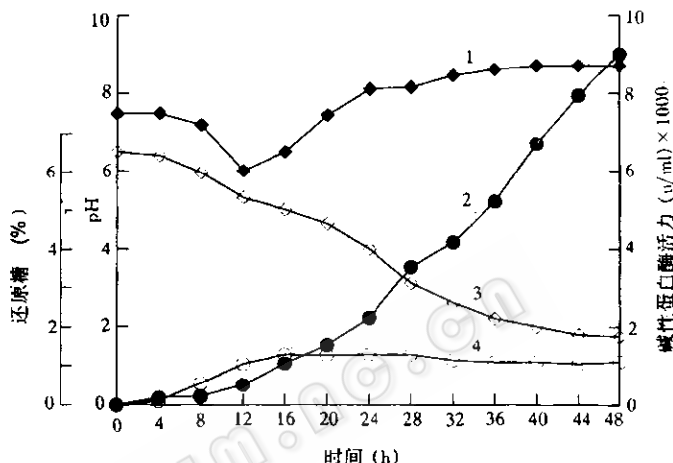


图1 c172(pBX 96) 转化子摇瓶发酵动态

1. pH值; 2. 酶活力; 3. 总糖; 4. 残糖。

参 考 文 献

- [1] 杨文博, 冯耀宇. 微生物学通报, 1994, 21(5): 273~278.
- [2] 吕向阳, 蒋如璋, 王桂芬, 等. 遗传学报, 1991, 18(2): 185~192.
- [3] 北京大学生物化学教研室编. 生物化学实验指导. 北京: 人民教育出版社, 1983. 22~24.
- [4] Uzkuernas A, Ciurlys T, Zukiene V. Liet TSR Mokslu Akad Darb (Russ), 1972, (3), 167~173.
- [5] 张树政, 伦世仪, 朱庆裴, 等. 酶制剂工业(下). 北京: 科学出版社, 1984. 399.
- [6] 杨丽珠, 马明, 王诚一, 等. 生物化学杂志, 1993, 9(2): 141~145.

FERMENTATION CONDITIONS OF ENGINEERING STRAIN UTILIZING STARCH FOR PRODUCTION OF ALKALINE PROTEINASE

Feng Yaoyu¹ Yang Wenbo² He Zhimin¹

(¹Chemical Engineering Research Center, Tianjin University, Tianjin 300072)

(²Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract The highest activity of alkaline proteinase produced by *Bacillus pumilus* c172(pBX 96) transformant was 9 000 U / ml in shaking flask where corn meal and bean cake meal were carbon and nitrogen sources, respectively. The enzyme activity was raised under the conditions of initial pH 7.0, MgCl₂ instead of MgSO₄, and glucose (0.1%) in the substrate. The fermentation of c172(pBx 96) transformant was carried out with parameters of pH, reducing sugar, total sugar and enzyme activity.

Key words *Bacillus pumilus*, Fermentation, Alkaline proteinase