

文章编号:1673-1689(2005)04-0042-05

中性蛋白酶芽孢杆菌 BX-4 产酶条件 及部分酶学性质

肖怀秋¹, 林亲录^{1,2}, 李玉珍¹, 赵谋明²

(1. 湖南农业大学 食品科技学院, 湖南 长沙 410128; 2. 华南理工大学 食品与生物工程学院, 广东 广州 510640)

摘要: 采用稀释平板分离法从土壤中分离到一株产中性蛋白酶芽孢杆菌 BX-4。通过单因素碳、氮源以及正交试验确定了最佳产酶培养基配方, 同时还研究了起始 pH 值、金属离子、接种量对产酶的影响以及温度、pH 值、金属离子以及表面活性剂对酶稳定性的影响; 以最佳培养基为发酵培养基, 于 37 ℃、160 r/min 振荡培养 48 h, 酶活达 2 519.35 U/mL; 该酶最适作用温度为 55 ℃, 最适作用 pH 值为 7.5, 在 pH 7.5 缓冲体系中, 55 ℃反应 60 min 后仍有 50% 的酶活力。Ca²⁺ 和表面活性剂对酶有一定的激活作用, 但激活作用不明显。

关键词: 中性蛋白酶; 芽孢杆菌; 正交试验; 酶稳定性

中图分类号: TQ 920

文献标识码: A

Studies on Protease Production Conditions and Enzyme Characterizations of Neutral Protease-Producing Strain *Bacillus* BX-4

XIAO Huai-qiu¹, LIN Qin-lu^{1,2}, LI Yu-zhen¹, ZHAO Mou-ming²

(1. Food Science and Technology School, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Food and Biology Technology School, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A strain producing neutral protease was obtained from soil by diluted plated method and was named BX-4. Optimal fermentation medium was obtained through studying carbon resources, nitrogen resources and implementing orthogonal experiment. The effects of initial pH, metal ions and inoculum amount on protease production and the effects of temperature, pH surface-active agent on protease stability were studied. Protease activity reached 2 519.35 U/mL under the conditions of 37 ℃, 160 r/min, 48 h in the optimal fermentation medium. The optimal acting temperature and pH of this enzyme are 55 ℃ and 7.5 respectively. Protease could maintain half-life at 55 ℃ incubation for 60 minutes in 7.5 buffer solution; Ca²⁺ and surface active agent could activate protease activity but the effect is not so obvious.

Key words: neutral protease; *bacillus*; orthogonal experiment; protease stability

收稿日期: 2004-09-30; 修回日期: 2004-11-23.

基金项目: 长沙市科技局科技攻关项目(K032035-12)资助课题.

作者简介: 肖怀秋(1981-), 男, 苗族, 湖南邵阳人, 食品生物技术硕士研究生.

万方数据

中性蛋白酶是最早发现并广泛应用于工业化生产的蛋白酶制剂,可用于皮革脱毛、畜禽血液蛋白质水解、酒和饮料的澄清以及医药治疗等领域^[1~4]。目前,国内外关于中性蛋白酶的研究也相当多^[5~8]。微生物培养基的组成及产酶条件在很大程度上对蛋白酶的产生起着决定性的作用^[9]。因此,通过单因素碳、氮源试验以及正交试验确定了最佳产酶培养基配方,同时还研究了起始 pH 值、金属离子、接种量对产酶的影响以及温度、pH 值、金属离子和表面活性剂对酶稳定性的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种 供试菌株 BX-4 为作者所在课题组从土壤中分离纯化得到,初步鉴定为芽孢杆菌(*Bacillus*)。

1.1.2 培养基 牛肉膏蛋白胨培养基;发酵培养基(g/dL):玉米粉 2,豆饼粉 3,麸皮 3, KH_2PO_4 0.03, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.4, ZnCl_2 0.1, pH 值调节至 8.0。

1.2 方 法

1.2.1 发酵条件 接种 50 mL 已活化的菌种于灭菌发酵培养基(300 mL)中,于 37 °C、160 r/min 摇床培养 48 h。

1.2.2 蛋白酶活性测定方法 Folin-酚法^[10]。

1.2.3 金属离子配制 称取相应量的 MgSO_4 , NaNO_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, KNO_3 , CaCl_2 , ZnCl_2 , 配成 0.1 mol/L 的 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 Fe^{3+} 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 。

1.2.4 BX-4 发酵条件的研究

1) 最佳碳源试验:以 4 g/dL 葡萄糖、蔗糖、玉米粉和可溶性淀粉为碳源,0.5 g/dL 蛋白胨为氮源,在上述成分中加入 0.4% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.03% KH_2PO_4 、0.1% CaCl_2 ,将 pH 值调至 8.0,进行发酵培养,离心去除菌体,测定上清液蛋白酶活力,以酶活力高低作为指标。

2) 最佳氮源试验:以玉米粉作为碳源,在发酵培养中加入 4 g/dL 的豆饼粉、牛肉膏、蛋白胨、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 、 NaNO_3 作为氮源,培养基其它成分及培养条件均相同。

3) 碳氮源正交试验设计:以玉米粉作为碳源,以豆饼粉作为氮源,外加麸皮提供生长因子,通过正交试验确定最佳产酶培养基配方。

4) 金属离子对产酶的影响:在发酵培养基中添加 0.1 mol/L 不同金属离子,然后进行发酵培养,测定上清液蛋白酶活力,以蛋白酶活力为指标。

5) 接种量对产酶的影响:分别接种体积分数 1%、2%、3%、4%、5% 已活化菌种于发酵培养基中发酵培养,发酵终止后离心取上清液测定蛋白酶活力。

6) 起始 pH 值对产酶的影响:将发酵培养基调成不同 pH 值,灭菌、接种、发酵培养并测定蛋白酶活力。

1.2.5 酶学性质研究

1) 酶最适作用温度的研究 将稀释粗酶液分别于 44, 45, 50, 55, 60, 65, 70 °C 下反应,测定蛋白酶活力。以温度为横坐标,相对酶活为纵坐标作图。

2) 酶最适 pH 值的研究:分别配制不同 pH 值(3.0~10.0)的 1% 的干酪素溶液,按 Folin-酚法^[10]进行蛋白酶活力测定,以 pH 值为横坐标,以相对酶活为纵坐标作图(其中 pH 值 3.0~5.0 的溶液由 Na_2HPO_4 —柠檬酸缓冲液配制, pH 值 6.0~8.0 的溶液由磷酸缓冲液配制, pH 9.0 的溶液由硼酸缓冲液配制, pH 10.0 和 pH 10.5 由硼砂—NaOH 缓冲液配制)。

3) 酶热稳定性的研究:取稀释粗酶液于 55 °C 恒温水浴锅中分别保温 10, 20, 30, 40, 50, 60 min, 然后测定其残存酶活力,以时间为横坐标,相对酶活为纵坐标作图。

4) pH 值对酶热稳定性试验:将 1 mL 酶液用 pH 7.5 缓冲液稀释到 100 mL,于 55 °C 分别保温 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 min, 然后测定其残存蛋白酶活力,以保温时间为横坐标,相对酶活为纵坐标作图。

5) 金属离子对酶稳定性的影响:在稀释酶液中加入 0.1 mol/L 的不同金属离子 1 mL,保温 30 min,测定蛋白酶活力,以金属离子为横坐标、蛋白酶活力为纵坐标作图。

6) 表面活性剂对酶性质的影响:在稀释粗酶液中加入不同体积的表面活性剂 Tween-80(1~5 mL),于 40 °C 保温 30 min,然后测定其蛋白酶活力。以 Tween-80 添加量为横坐标,酶活力为纵坐标作图。

2 结果与分析

2.1 发酵条件对产酶的影响

2.1.1 不同碳源对产酶的影响 不同碳源对产酶的影响见表 1。从表 1 可以看出,以玉米粉作为培养基碳源时,蛋白酶活力最高,故选用玉米粉作为培养基碳源。

2.1.2 不同氮源对产酶的影响 不同氮源对产酶

的影响见表 2.

表 1 不同碳源对产酶的影响

Tab. 1 The effects of various carbon resources on protease-producing

碳源种类	终 pH 值	蛋白酶活力/ (U/mL)
可溶性淀粉	7.92	271.56
葡萄糖	5.15	230.64
蔗糖	4.50	287.22
玉米粉	5.65	368.72

表 2 不同氮源对产酶的影响

Tab. 2 The effects of various nitrogen resources on protease-producing

氮源种类	终 pH 值	蛋白酶活力/ (U/mL)
NaNO ₃	7.26	342.24
KNO ₃	8.00	126.48
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.00	81.84
豆饼粉	7.53	452.96
牛肉膏	5.96	230.64
蛋白胨	5.90	63.24

从表 2 可以看出,以 4 g/dL 豆饼粉作氮源时酶活最高(452.96 U/mL). 其次为 NaNO₃,达342.24 U/mL,其可能作用机理是:由于 Na⁺ 能引起细胞膜内外渗透压的改变,而微生物蛋白水解酶大部分为胞外酶,膜内外渗透压的改变有利于酶从膜内往外运输;也有可能是因为细胞膜内外渗透压的变化使细胞膜通透性增强,有利于打破细胞内酶合成的反馈平衡,从而提高发酵上清液中蛋白酶的产量. 另外,蛋白胨对产酶的阻遏作用可能是由于代谢产物的阻遏所引起的^[11].

2.1.3 不同碳氮比对产酶的影响 碳氮比正交试验因素水平表见表 3. 碳氮比正交试验设计表见表 4.

表 3 碳氮比正交试验因素水平表

Tab. 3 The orthogonal experiment design factors and level table of carbon and nitrogen ratios

水平	因 素		
	A(玉米粉 g/dL)	B(豆饼粉 g/dL)	C(麸皮 g/dL)
1	2	2	1
2	4	3	3

表 4 碳氮比正交试验设计表 L₄(2³)

Tab. 4 The orthogonal experiment design for carbon and nitrogen ratios L₄(2³)

试验号	1 A	2 B	3 A×B	4 C	5 A×C	6 B×C	7 e	蛋白酶活力/ (U/mL)
1	1	1	1	1	1	1	1	1 229.52
2	1	1	1	2	2	2	2	1 357.62
3	1	2	2	1	1	2	2	1 208.17
4	1	2	2	2	2	1	1	1 421.67
5	2	1	2	1	2	1	2	1 309.58
6	2	1	2	2	1	2	1	1 202.83
7	2	2	1	1	2	2	1	1 245.83
8	2	2	1	2	1	1	2	1 293.57
K ₁ [*]	5 216.98	5 099.55	5 126.54	4 993.10	4 934.09	5 254.34	5 099.85	
K ₂ [*]	5 051.81	5 169.24	5 142.25	5 275.69	5 334.70	5 014.45	5 168.94	
k ₁ [*]	1 304.25	1 274.89	1 281.64	1 248.28	1 233.52	1 313.59	1 274.96	Σ=10 268.79
k ₂ [*]	1 262.95	1 292.31	1 285.56	1 318.92	1 333.68	1 253.61	1 292.23	
极差 R	41.30	17.42	3.92	70.64	100.16	59.98	17.27	
优化方案	A ₁	B ₂	C ₂					

备注:K_i^{*} 为各因素第 i 水平在实验中对应的实验指标之和,k_i^{*} 为 K_i^{*} 的平均值,极差 R 为最大值与最小值之差.

由正交表可以看出,因素 C 对产酶影响最为显著,因素 A 次之,因素 B 影响最小。由极差 R 可以看出,麸皮、玉米粉为重要因素。各因素对产酶作用大小次序为: $C > A > B$ 。优化组合为: $A_1 B_2 C_2$; 优化方案: 2 g/dL 玉米粉、3 g/dL 豆饼粉、3 g/dL 麸皮,另加 0.4 g/dL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/dL KH_2PO_4 , 0.1 g/dL ZnCl_2 , pH 调节至 8.0。后续研究均采用此配方。

2.1.4 金属离子对产酶的影响 金属离子对产酶的影响,见图 1。

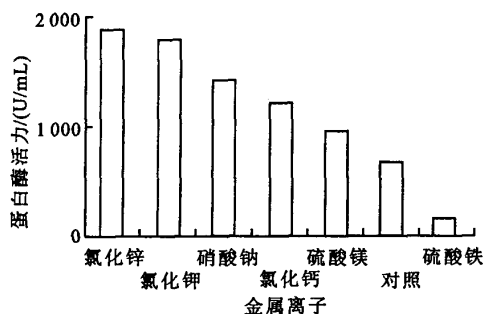


图 1 金属离子对产酶的影响

Fig. 1 The effect of metal ions on protease production

从图 1 可以看出,除 Fe^{3+} 外,所有的金属离子对产蛋白酶均有激活作用,其中以 Zn^{2+} 对产酶激活作用最强,酶活达 1800 U/mL 以上。因此,在后续研究中均在发酵培养基中添加 ZnCl_2 作为产酶促进因子。

2.1.5 起始 pH 值对产酶的影响 从图 2 可以看出,培养基起始 pH 值对产酶有极大的影响。pH 8.0 时对产酶最为有利,酶活力达到 2519.35 U/mL,因此产酶最适起始 pH 值为 8.0。

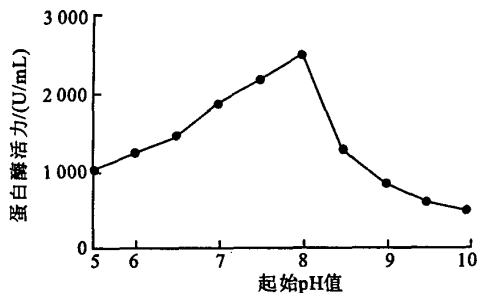


图 2 起始 pH 值对产酶的影响

Fig. 2 The effect of initial pH on protease production

2.1.6 不同接种体积分数对产酶的影响 由图 3 可以看出,接种体积分数对产酶影响不大。接种体积分数为 2% 时,酶活最高,所以最佳接种体积分数为 2%。

2.2 酶稳定性研究

2.2.1 酶最适作用温度 将稀释粗酶液分别于不

同温度下反应一段时间,测定其蛋白酶活力,结果见图 4。

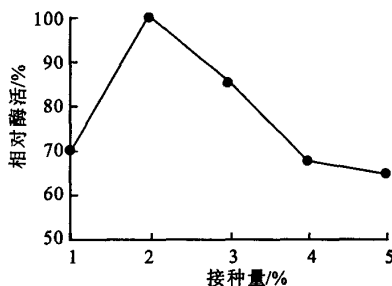


图 3 接种体积分数对产酶的影响

Fig. 3 The effect of inoculum on protease production

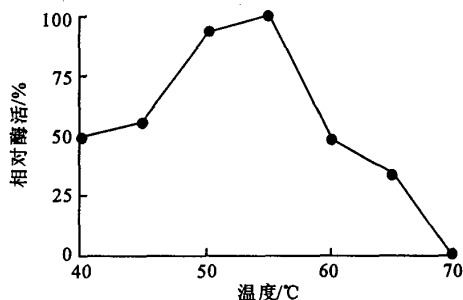


图 4 酶最适作用温度

Fig. 4 The optimal acting temperature of the enzyme

从图 4 可以看出,55 °C 酶活性最高,在 45~60 °C 有较好的稳定性,酶最适作用温度为 55 °C。

2.2.2 酶最适作用 pH 值 将稀释粗酶液于不同 pH 值的缓冲液体系中反应一段时间,然后测定其蛋白酶活力,结果见图 5。从图 5 可以看出,在 pH 7.5 时反应体系中酶活力最高,因此酶最适作用 pH 值为 7.5。

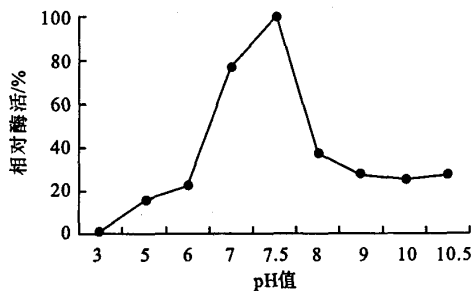


图 5 酶最适作用 pH 值

Fig. 5 The optimal of acting pH the enzyme

2.2.3 酶热稳定性试验 将酶液于 55 °C 保温 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 min 后,按 Folin-酚^[10]法测定蛋白酶活力,结果见图 6。

从图 6 可见,酶的热稳定性较好。在 55 °C 保温 45 min 仍保持近 50% 活力,当保温时间延长至 60 min 或更长时,酶活力急剧下降甚至失去活力。

2.2.4 pH 值对酶热稳定性的影响 将 1 mL 粗酶液用 pH 7.5 缓冲液稀释到 100 mL 并于 55 ℃ 分别保温 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 min, 然后测定其蛋白酶活力。从图 7 可以看出, 在此反应体系中, 酶保温 60 min 后仍有 50% 的活力, 保温时间继续延长到 70 min 时, 因热变性酶活急剧降低。

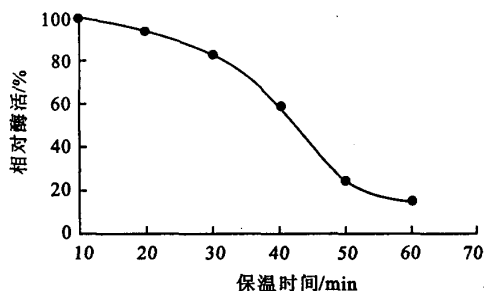


图 6 酶的热稳定性

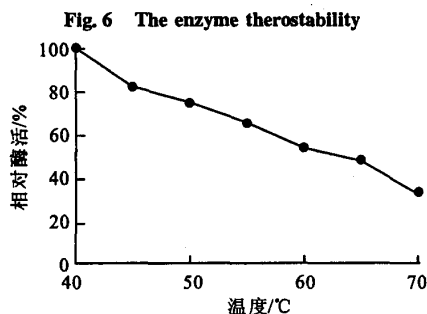


图 7 pH 值对酶热稳定性的影响

Fig. 7 The effect of pH on enzyme thermostability

2.2.5 金属离子对酶稳定性的影响 在稀释粗酶液中加入 0.1 mol/L 不同的金属离子 1 mL, 保温 30 min, 然后按 Folin-酚法^[10] 测定蛋白酶活力, 结果见图 8。

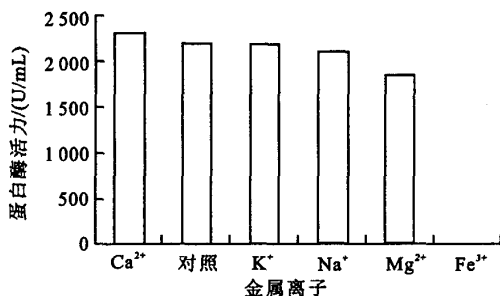


图 8 金属离子对酶稳定性的影响

Fig. 8 The effect of metal ions on enzyme stability

从图 8 可以看出, Ca^{2+} 对酶有一定的激活作用和稳定作用。 Fe^{3+} 对酶有强烈的抑制作用, 其作用机理有待进一步研究。

2.2.6 表面活性剂对酶稳定性的影响 向稀释粗酶液中加入不同体积的 Tween-80, 保温 30 min, 测定其蛋白酶活力, 结果见表 5。

表 5 表面活性剂对酶稳定性的影响

Tab. 5 The effect of surface-active agent on enzyme stability

Tween-80 添加量/mL	酶活力/(U/mL)
1	1 163.60
2	1 179.61
3	1 200.96
4	1 222.31
5	1 286.36
空白	1 147.58

表面活性剂对蛋白酶有激活作用。当添加量为 5 mL 时, 酶活达 1 286.36 U/mL, 比空白提高了近 12.09%。可能作用机理为: 表面活性剂有利于增强细胞膜的通透性。一般来讲, 微生物蛋白水解酶为胞外酶, 膜通透性的增强有利于蛋白酶从膜内往外运输, 因此提高了发酵液中蛋白酶的产量。

3 结 论

综上所述, BX-4 最佳产酶培养基配方为: 玉米粉 2 g/dL、豆饼粉 3 g/dL、麸皮 3 g/dL、 KH_2PO_4 0.03 g/dL、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/dL、 ZnCl_2 0.1 g/dL, pH 8.0, 最佳接种体积分数为 2%, 起始 pH 值为 8.0。 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 对产酶有激活作用, 其中以 Zn^{2+} 、 K^+ 对产酶影响最大, Fe^{3+} 对产酶有强烈的阻遏作用。该酶最适作用温度为 55 ℃, 最适作用 pH 值为 7.5, 酶热稳定性较好。在 pH 7.5 缓冲体系中, 55 ℃ 反应 60 min 仍有 50% 的酶活力。 Ca^{2+} 对酶有稳定作用及一定激活作用, 但作用效果不太明显。表面活性剂 Tween-80 对酶也有一定的激活作用。试验研究表明, BX-4 是一株很好的产中温中性蛋白酶菌株。

参考文献:

- [1] 李泰明, 徐秀兰. ASL 398 中性蛋白酶固定化条件的初步研究[J]. 药物生物技术, 1998, 5(4): 214-218.
- [2] 陈武勇, 辜海兵, 秦涛, 等. 中性蛋白酶水解铬革屑的研究[J]. 中国皮革, 2001, 30(21): 2-5.

(下转第 56 页)

2) 试验结果表明,在最佳工艺条件下连续提取2次,总蒽醌、游离蒽醌的提取率分别达91.91%,96.48%,明显优于常规煎煮法和乙醇回流法。

将超声波萃取技术应用于大黄中有效成分的提取,将给生产带来极大便利,可以节省大量时间和溶剂,从而降低生产成本,提高经济效益。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2000年版)[M]. 北京:化学工业出版社,2000.
- [2] 庞国明,郭炳新. 实用专病专方临床大全[M]. 北京:中国中医药出版社,1994.
- [3] 李秀才. 大黄的研究进展[J]. 中国药学杂志,1998,33(10):581—584.
- [4] Foust C M. Mysteries of rhubarb: Chinese medicinal rhubarb through the ages[J]. *Pharm Hist*, 1994, 36(4): 155—159.
- [5] Uchibayashi M. Rhubarb in the east and the west[J]. *Yakushigaku Zasshi*, 2001, 36(2): 171—174.
- [6] 张永红. 影响大黄提取液中蒽醌含量的条件探讨[J]. 兰州医学院学报,1996,22(2):27—29.
- [7] 罗得顺,蔡鸿生,苏玮. 几种提取方法对大黄蒽醌含量的影响[J]. 中药通报,1987,12(5):286—288.
- [8] 王新春,侯世祥. 正交实验数据的极差分析于多元线性回归对比对大黄提取工艺优化影响[J]. 中成药,2002,24(10):742—746.
- [9] 邹华彬,吴波杜,杜爱琴,等. 中药大黄中羟基蒽醌类成分的分离[J]. 化学分析计量,2002,11(1):13—15.
- [10] 郭澄,张纯. 正交实验法优选大黄醇回流提取工艺[J]. 药学实践杂志,1996,14(1):31—32.
- [11] 郭孝武. 超声技术在中草药成分提取中的应用[J]. 中草药,1993,24(10):548—549.

(责任编辑:朱明)

(上接第46页)

- [3] 唐兵,周林峰,陈向东,等. 嗜热脂肪芽孢杆菌高温中性蛋白酶的产生条件及酶学性质[J]. 微生物学报,2000,40(2):188—192.
- [4] 李水泉,姚恕. 中性蛋白酶发酵工艺优化研究[J]. 微生物学通报,1995,22(3):155—154.
- [5] Dolashka Pavlina, Georgieva Dessislava N. A novel thermostable neutral protease from *Saccharomonospora canescens*[J]. *Biocim Biophys Acta*, 1998, 1382(2): 207—216.
- [6] Lu S F, Chang P P. A thermostable neutral protease from *Pseudomonas aeruginosa* CCRC 15541[J]. *Lett Appl Microbiol*, 1996, 22(1): 5—9.
- [7] Takii Yukio, Urata Yoshimi. Thermostable neutral protease resembling thermolysin derived from *Bacillus brevis* MIB001[J]. *Norike Biosci Biotechnology Biochem*, 1998, 62(5): 1028—1030.
- [8] 陈启和,何国庆. 弹性蛋白酶产生菌的筛选及其发酵条件的初步研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2003,29(1):59—64.
- [9] 吴继星,谢天健,陈辑力,等. 苏云金杆菌 85-10-6(5)发酵培养基的筛选[J]. 微生物学通报,1988,15(6):254—256.
- [10] 姜锡瑞,段钢. 新编酶制剂实用技术手册[M]. 北京:中国轻工出版社,2002.
- [11] Dubnan D A. Microbial enzymes [J]. *Microbial Biology of Bacillus*, 1982, (1): 331—363.

(责任编辑:李春丽)