

卡拉胶固定粘质赛氏菌产碱性蛋白酶的研究

冯立* 陈向东 彭珍荣

(武汉大学生物学系, 武汉 430072)

摘要 将粘质赛氏菌 (*Serratia marcescens*) 包埋于卡拉胶中, 发现 2.5% 的卡拉胶适于固定该菌产碱性蛋白酶。固定化细胞在其较适宜产酶培养基中发酵, 酶活力一般可达 400u/ml, 在卡拉胶中添加 3% 玉米粉和 1% 豆饼粉或 2% 砂子制备固定化细胞, 其产酶能力分别提高了 25% 和 23.9%; 固定化细胞颗粒越小, 其产酶能力越高。采用摇瓶半连续发酵, 其产酶半衰期为 14 次 (24 小时为一个周期); 而用环流器进行半连续发酵, 其产酶半衰期为 52 次 (12 小时为一个周期), 产酶效率分别比游离细胞摇瓶发酵的产酶效率高 11.8% 和 45.07%, 而环流器半连续发酵的产酶效率比摇瓶半连续发酵高 29.7%。

关键词 固定化细胞, 卡拉胶, 粘质赛氏菌, 碱性蛋白酶

粘质赛氏菌所产碱性蛋白酶分子量^[1]比芽孢菌所产碱性蛋白酶分子量 2×10^4 ^[2] 大得多, 该酶在食品及医药工业上有着广泛的应用前景^[3]。特别是 Maeda H. 的实验表明: 它可能成为一种新的十分有效的抗癌药物, 在美国已申请专利^[4,5]。但粘质赛氏菌产酶活力低^[1], 尚未见工业生产的报道。利用我们实验室筛选到的产碱性蛋白酶高的粘质赛氏菌, 固定于卡拉胶中, 研究各种条件对固定化细胞产酶的影响, 并用环流器对固定化细胞进行了半连续发酵, 以期改善发酵工艺, 提高产酶效率。

1 材料与方方法

1.1 菌种及药品

粘质赛氏菌 *Serratia marcescens* S₃ 菌株, 为本实验室分离鉴定; 卡拉胶为湛江市第一食品厂生产; 其它药品均为市售。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 (%): 胰蛋白胨 1; 酵母膏 1; NaCl 0.5; 琼脂 1.7。

1.2.2 发酵培养基: STY 培养基 (%): K₂HPO₄ 0.208; KH₂PO₄ 0.15; (NH₄)₂SO₄ 0.05; NaCl 0.01; CaCl₂ 0.0025; MgSO₄ · 7H₂O 0.02; 胰蛋白胨 1; 酵母膏 1。S 培养基 (%): K₂HPO₄ 0.208; KH₂PO₄ 0.15; (NH₄)₂SO₄ 0.05; CaCl₂ 0.0025; NaCl 0.01; MgSO₄ · 7H₂O 0.02; 胰蛋白胨 2; 酵母膏 2; 明胶 1; 酸水解酪蛋白 0.5。

1.3 方法

1.3.1 固定化细胞的制备: (a) 卡拉胶固定化细胞的制备: 将卡拉胶悬浮于 100ml 生理

* 现在武汉蓝宝微藻生物技术公司工作。
本文于 1992 年 4 月 16 日收到。

盐水中, 灭菌后冷却至 45℃, 与湿菌体充分混匀后, 倒入平皿, 凝固后放入 28℃ 温箱中干燥 5 小时, 切成小块, 于 2% KCl 溶液中硬化过夜, 洗涤后备用。(b) 卡拉胶中添加某些物质制备固定化细胞: 砂子、玉米粉、豆饼粉用 80 目筛子筛过后, 碾磨成粉状; 明胶不加处理, 这些物质加入卡拉胶中, 灭菌后, 按前述方法制备。

1.3.2 发酵液中游离菌体浓度的测定: 采用比浊法, 波长 600nm。

1.3.3 发酵培养: (a) 摇瓶半连续发酵: 一次发酵后, 取出胶粒或菌体, 洗净, 转到新鲜发酵培养基中, 如此循环使用, 不断进行下去。(b) 环流器中的半连续发酵: 环流器的装配和使用参见文献 [6]。经过增殖培养 24 小时的固定化细胞颗粒装在环流柱中, 以适量培养液充当环流液, 每环流 12 小时, 更换一次培养液。

1.3.4 蛋白酶活力的测定: 采用轻工部部颁标准 QB 747—80 所述方法进行。

2 结果与分析

2.1 载体浓度的选择

用不同浓度的卡拉胶制备固定化细胞颗粒, 发酵培养基为 STY。采用摇瓶半连续发酵, 结果表明: 卡拉胶浓度选择 2.5% 为宜 (表 1)。以下实验均采用此浓度。

2.2 营养因素对固定化细胞产酶的影响

在改进的 STY 培养基 (含有 2% 胰蛋白胨, 2% 酵母膏) 的基础上, 添加几种氮源, 结果表明: 所添加的几种氮源对固定化细胞的产酶都有利, 其中以添加 1% 明胶, 0.5% 酸水解酪蛋白产酶最高 (表 2), 命名为 S 培养基。

此外, 在卡拉胶中加入某些营养因子共同制备固定化细胞, 在 S 培养基中进行分批发酵, 结果表明: 卡拉胶中添加明胶共同制备固定化细胞对产酶不利; 而添加豆饼粉与玉米粉后, 酶活力则上升 25%。这表明载体中添加营养物质也较大地影响了固定化细胞的产酶能力。

表 1 载体浓度的选择
Table 1 Selection of carrier concentration

Conc. of carrier (%)	Stability of beads	Cell conc in medium*	Protease activity in medium (u/ml)
1	Repeated 3 times	0.64	96.38
2.5		0.32	128.62
3	Repeated more than	0.14	81.84
3.5	5 times	0.1	52.85
4		0.1	42.08

* The medium was diluted 10 times

2.3 载体中添加砂子对固定化细胞产酶的影响

将砂子添加到卡拉胶中共同制备固定化细胞, 在 S 培养基中分批发酵, 结果表明: 2% 砂子加入后, 酶活力提高了 23.9%; 而 3% 砂子加入后, 酶活力则降低了; 添加砂子共同制备固定化细胞, 对固定化细胞菌体渗漏的影响不明显 (表 3)。

表 2 几种氮源对蛋白酶产生的影响
Table 2 The effect of some nitrogen source on protease production

Nitrogen source (%)	Protease activity (u/ml)
Gelatin 1.0	253.4
Caseinhydrolysate 0.5	254.8
Gelatin 1.0; caseinhydrolysate 0.5	382.7
Skimmed milk 1.0	152.6
Gelatin 1.0; caseinhydrolysate 0.5 skimmed milk 1.0	296.0
Peptone 1.0	216.8
Gelatin 1.0; caseinhydrolysate 0.5; pepton 1.0	278.6
Casein 1.0	245.4
Gelatin 1.0; caseinhydrolysate 0.5; casein 1.0	312.4
Comparison	138.4

表 3 载体中添加砂子对固定化细胞产酶的影响
Table 3 The influence of adding sands to carrier on protease production

Conc. of adding sands (%)	Cell conc. in medium *	Protease activity (u/ml)
0	0.324	399.2
1.0	0.330	412.5
2.0	0.326	483.5
3.0	0.318	376.8

The medium was diluted 10 times.

2.4 固定化细胞颗粒大小对产酶的影响

将卡拉胶切成体积不等的方形颗粒,在 S 培养基中进行分批发酵,结果表明:卡拉胶固定化细胞颗粒的大小明显地影响固定化细胞产酶,颗粒越小,酶活力越高,但是,1×1×1mm 的颗粒,循环使用时,酶

活力与颗粒的机械稳定性都下降较快,2×2×2mm 的颗粒既能保持酶产量,同时对颗粒的机械强度影响不明显,因此,选择该体积制备固定化细胞。

2.5 固定化细胞的半连续发酵和游离细胞分批发酵的比较

在摇瓶分批发酵的条件下,固定化细胞产酶量较游离细胞的产酶量(440u/ml)略低,但达到产酶高峰所需时间比游离细胞要少约 12 小时,且发酵液中游离菌体浓度低得多(图 1)。

在摇瓶半连续发酵条件下,游离细胞发酵产酶半衰期为 3 次(36 小时为一个周期),固定化细胞发酵产酶半衰期为 14 次(24 小时为一个周期)(图 2)。固定化细胞在产酶半衰期 14 次内其产酶效率 μ_1 为:

$$\mu_1 = \Delta E_1 / T = (394 + 408 + 380 + \dots + 251 + 239 + 185) / (14 \times 24) = 13.67 \text{ u/ml} \cdot \text{h}$$

而游离细胞分批发酵的产酶效率 μ_2 为:

$$\mu_2 = E_2 / T = 440 / 36 = 12.22 \text{ u/ml} \cdot \text{h}$$

μ_1 比 μ_2 高 11.8%。可见固定化细胞半连续发酵较游离细胞分批发酵产酶效率更高。

2.6 环流半连续发酵

用环流器进行固定化细胞的半连续发酵,酶活力一般 12 小时达最高,每日可更换两

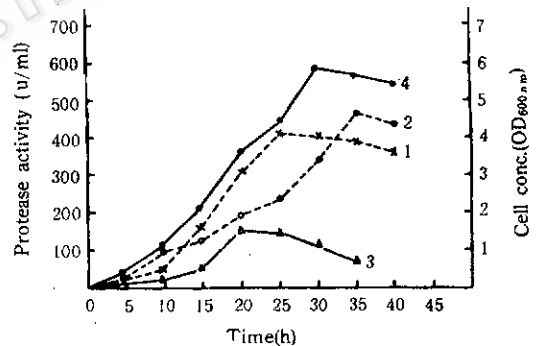


图 1 固定化细胞及游离细胞在发酵过程中酶活力及游离细胞浓度变化

Fig. 1 Variations of protease activity and concentration of free cells in the fermentation processes of immobilized cells and free cells

1. Immobilized cells (protease activity)
2. Free cells (protease activity)
3. Immobilized cells (cells concentration)
4. Free cells (cells concentration)

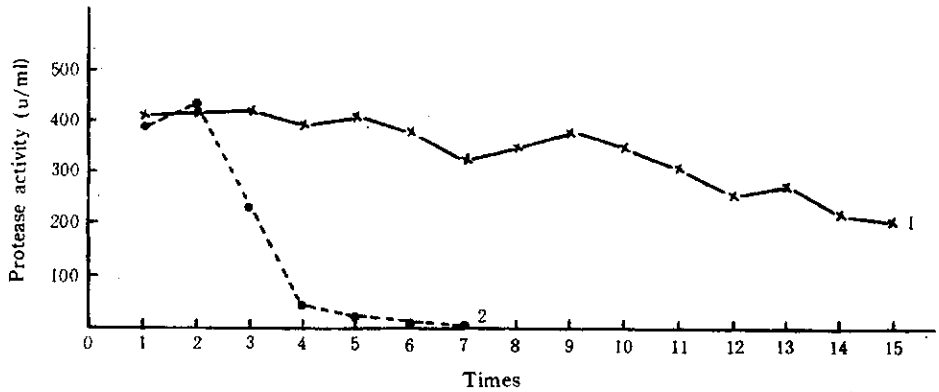


图 2 游离细胞及固定化细胞摇瓶半连续发酵产酶变化

Fig. 2 Variations of protease production of free cells and immobilized cells in flashing simicontinuous fermentation

1. Immobilized cells, 2. Free cells

次培养基，其产酶如图 3 所示，它的产酶半衰期为 52 次（12 小时为一个周期），这比摇瓶半连续发酵半衰期长。固定化细胞环流半连续发酵在其半衰期内，产酶效率 μ_3 为：

$$\mu_3 = \Delta E_s / T = (274 + 281 + 276 + \dots + 159 + 150 + 145) / (52 \times 12) = 17.73 \text{ u/ml} \cdot \text{h}$$

μ_3 比 μ_2 约高 45.07%，比 μ_1 约高 29.7%，这说明，用环流器进行固定化细胞的半连续发酵，其产酶效率高于固定化细胞摇瓶半连续发酵和游离细胞分批发酵。

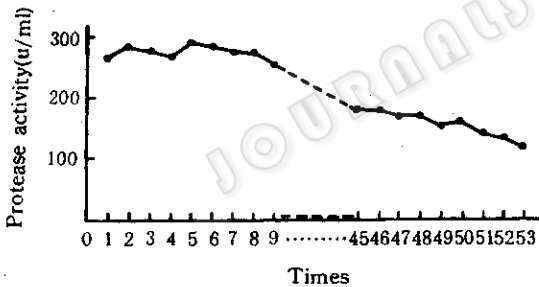


图 3 固定化细胞环流半连续发酵产酶变化

Fig. 3 Variation of protease production of immobilized cells in apparatus of liquid cycling fermentation

粘质赛氏菌碱性蛋白酶分子量大，在固定化过程中遇到的关键问题是产物扩散，Vuillemand 等人^[1]将粘质赛氏菌固定于海藻酸钙凝胶中，他们发现发酵液中酶活力随着发酵液中菌浓度的增大而增大，发酵液中菌浓度很高，推测发酵液中的酶是由游离菌体产生而不是由固定化细胞颗粒内部菌体产生的，究其原因，是由于酶分子量太大，难于从固定化载体中扩散出来。而在我们的研究中发现，卡拉胶固定化细胞发酵液中游离菌体浓度较低，当菌浓度最高时，发酵液酶活

力并不是最高，菌浓度下降后，酶活力还呈上升的趋势（图 1），这表明，固定化颗粒内产生的酶能分泌到培养液中，与 Vuillemand 等推测发酵液中的酶是由游离菌体产生的结论是不一致的。对固定化颗粒内部结构的观察发现，经发酵后，颗粒内部菌体浓度增大，胶体自身结构变得疏松（图略），这种变化可能会使酶能较为容易地从固定化细胞颗粒内扩散出来。

参 考 文 献

- [1] Vuilleumard J C *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1988, 27: 432—431.
[2] Boyer P D *et al.* The Emzyme, 1977 3: 721—796.
[3] Vuilleumard J C *et al.* Emzyme Microb Technol, 1988, 10: 2—8.
[4] Maeda H *et al.* Cancer Research, 1987, 47: 563—566.
[5] Maeda H *et al.* US Patent 4844897, 1989.
[6] Peng Z R *et al.* System Appl Microbilol, 1987, 9: 370—311.

Study on Alkaline Protease Production by Immobilized *Serratia marcescens* in Carrageenan

Feng Li, Chen Xiangdong, Peng Zhenrong

(Dept. of Biology, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract The strain *Serratia marcescens* S₃ was immobilized in carrageenan to produce alkaline protease and the optimum concentration of carrageenan was 2.5%. Under the optimum culture conditions, the protease activity reached about 400u/ml. By adding 1% soybean meal and 3% corn meal or 2% sands to carrageenan, 25% and 23.9% higher protease activities could be realized. The half life of producing proteasee by immobilized cells was 14 times (24h percycle) in culture flask simicontinuous fermentation, and 52 times (12h per cycle) in liquid cycling apparatus fermentation, The efficiencies of producing protease in these two processes were 11.8% and 45.07% higher than that by free cells in culture flask batch fermentation. Moreover, the efficiency of producing protease in liquid cycling appartus fermentation was 29.7% higher than that in culture flask simicontinuous fermentation.

Key words Immobilization, alkaline protease, *Serratia marcescens*, carrageenan