

## 研究报告

## 铜绿假单胞菌产蛋白酶的发酵条件优化

孙倩<sup>1</sup> 张文姣<sup>1</sup> 闫巧娟<sup>2</sup> 江正强<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

(2. 中国农业大学工学院 北京 100083)

**摘要:**【目的】鉴定一株来源于酱油曲能够分泌蛋白酶的铜绿假单胞菌 CAU342A, 优化其产蛋白酶的发酵条件。【方法】采用形态学观察、16S rRNA 基因序列比对和生理生化方法鉴定菌株 CAU342A; 通过碳源、氮源、初始 pH、温度、表面活性剂及发酵时间的单因素优化和正交试验获得最适发酵条件。【结果】菌株 CAU342A 被鉴定为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 其最适发酵产酶条件为(质量体积比): 3%酒糟, 1.5%酵母浸提物, 0.05%吐温-80, 0.5% NaCl, 0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.04% MnSO<sub>4</sub>, 培养基初始 pH 7.5, 30 °C 培养 72 h。在最适发酵条件下, 该菌株最大产酶水平达到 2 653.5 U/mL。蛋白酶酶谱分析表明该菌株能够产生至少 4 种具有蛋白酶活性的同工酶, 其中两个主要酶谱带对应分子量分别为 32 kD 和 50 kD。【结论】铜绿假单胞菌 CAU342A 高产蛋白酶, 具有很大的工业应用潜力。

**关键词:** 铜绿假单胞菌, 蛋白酶, 液体发酵, 优化

Optimization of protease production by *Pseudomonas aeruginosa*SUN Qian<sup>1</sup> ZHANG Wen-Jiao<sup>1</sup> YAN Qiao-Juan<sup>2</sup> JIANG Zheng-Qiang<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

(2. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** [Objective] To identify a protease producing bacterium CAU342A isolated from soy sauce koji and optimize the fermentation conditions for protease production. [Methods] Strain CAU342A was identified based on its morphological characters, 16S rRNA gene sequence, physiological and biochemical characteristics. The fermentation conditions for protease production by strain CAU342A were optimized using the one-factor-at-a-time method and orthogonal test. [Results] Strain CAU342A was identified as *Pseudomonas aeruginosa*, and the optimal fermentation conditions were obtained as follows: 3% vinasse, 1.5% yeast extract, 0.05% Tween-80, 0.5% NaCl, 0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.04% MnSO<sub>4</sub>, the initial pH was 7.5 and incubation temperature was 30 °C for 72 h. Under the optimized fermentation conditions, the highest protease activity of 2 653.5 U/mL was achieved. The protease zymogram analysis showed that at least 4 proteases were secreted into the fermentation broth, and two major bands had molecular masses of 32 kD and 50 kD, respectively. [Conclusion] The

**Foundation item:** National Science Fund for Distinguished Young Scholars (No. 31325021)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-10-62737689; Fax: 86-10-82388508; E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn

**Received:** January 17, 2016; **Accepted:** April 25, 2016; **Published online** (www.cnki.net): June 06, 2016

**基金项目:** 国家杰出青年基金项目(No. 31325021)

**\*通讯作者:** Tel: 86-10-62737689; Fax: 86-10-82388508; E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn

**收稿日期:** 2016-01-17; **接受日期:** 2016-04-25; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-06-06

high-level production of protease by *Pseudomonas aeruginosa* CAU342A enables its potential industrial applications.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, Protease, Liquid fermentation, Optimization

蛋白酶是催化蛋白质水解的一类酶,也是用途最广泛的酶制剂之一,主要用于酿酒、酱油、洗涤剂、制革、医药等领域<sup>[1]</sup>。与动、植物来源的蛋白酶相比,微生物蛋白酶来源广、易培养、产量高、价格低廉,同时下游处理相对简单,易于实现工业化生产。许多芽孢杆菌、链霉菌及霉菌都是蛋白酶的主要产生菌和研究对象,在工业上有着重要的应用价值<sup>[1]</sup>。

假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)细菌是一类革兰氏阴性菌,属于  $\gamma$ -变形杆菌纲(Proteobacteria),广泛存在于自然界中。部分假单胞菌为条件致病菌,但仍然具有很高的研究价值<sup>[2-7]</sup>。近年来研究表明,假单胞菌,特别是铜绿假单胞菌是性能优良的脂肪酶产生菌<sup>[2]</sup>,该菌产生的脂肪酶在碱性条件下具有活性,在生物柴油和药物合成中有着独特的应用价值。同时,铜绿假单胞菌是生物表面活性剂鼠李糖脂的常用菌株,对其发酵条件的优化、鼠李糖脂的性能研究较为深入<sup>[3]</sup>。铜绿假单胞菌还可产生抗菌物质,在防控植株病害方面具有开发潜力<sup>[4]</sup>。此外,铜绿假单胞菌可产多种蛋白酶,国内外学者对此已有一些研究。在不同来源、底物、pH 和温度等条件下,铜绿假单胞菌产蛋白酶情况不同。杨光焱等<sup>[5]</sup>从皮革厂土样中筛选到一株产胶原蛋白酶(16 U/mL)的铜绿假单胞菌可消化小牛皮。李勃等<sup>[6]</sup>从土壤中分离得到的铜绿假单胞菌可产蛋壳分解酶(ESM protease),该菌在 30 °C、pH 8.0 条件下对鸡蛋壳内膜具有明显的分解能力(31 U/mL)。朱春节等<sup>[7]</sup>则从豆豉样品中得到一株可产纤溶酶的铜绿假单胞菌,推测该酶为天冬氨酸蛋白酶,是一种新型的豆豉纤溶酶。Oh 等<sup>[8]</sup>从土壤中筛选到的铜绿假单胞菌 (21.2 U/mL)对虾蟹壳的脱蛋白作用显著。多数报道的铜绿假单胞菌产蛋白酶在中性至碱性条件下,在酸性条件下也有报道可产酸性蛋白酶<sup>[9]</sup>。这些研究表明铜绿假单

胞菌蛋白酶具有很大的开发潜力。但目前国内学者对该菌天然发酵产蛋白酶的条件研究较少,国外研究集中于高产菌株的筛选、培养基的优化及发酵条件的控制等方面,而目前发酵产酶活力普遍偏低,筛选高产蛋白酶的菌株对后期酶的分离、纯化、应用和生产都具有重要意义。

本实验室从酱油曲样品中筛选得到一株高产蛋白酶的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) CAU342A,并采用单因素优化和正交试验法对该菌株液体发酵产蛋白酶的条件进行了优化,分析其粗酶液中蛋白情况,以期为其蛋白酶的分离纯化、性质及应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和试剂

TU-1800PC 紫外可见分光光度计,北京普析通用有限公司;DK-S24 电热恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;GL-20B 冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;恒温振荡培养箱,太仓实验设备厂;PB21 型 pH 计,德国赛多利斯;Zeiss Axioskop 20 型光学显微镜,德国蔡司公司。

酪蛋白(Casein),Sigma 公司;低分子量标准蛋白样品,TaKaRa 公司;酵母浸提物、胰蛋白酶,英国 Oxoid 公司;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 培养基组成

筛选培养基(g/L):脱脂奶粉 20.0,琼脂 20.0, pH 自然。 $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。

摇瓶发酵培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母浸提物 5.0,葡萄糖 20.0,氯化钠 5.0,磷酸氢二钾 7.0,磷酸二氢钾 3.0,硫酸锰 0.4, pH 自然。 $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。

### 1.3 菌株筛选及鉴定

将酱油曲样品用无菌水稀释后,涂布于筛选培养基平板,置于 35 °C 培养箱中培养。挑选有明

显透明圈的菌落,划线分离纯化。将划线后长出的单菌落接入摇瓶发酵培养基中进行产酶复筛,35 °C 恒温摇床 200 r/min 培养 3 d,10 000 r/min 离心 5 min 后取发酵上清液测定蛋白酶活力。将酶活力较高的菌株保存并鉴定。

培养菌株 1–2 d,观察菌落形态。革兰氏染色后用光学显微镜观察细菌形态。提取菌株基因组 DNA,测定 16S rRNA 基因序列并在 GenBank 中进行 BLAST 比对,使用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树。按照伯杰氏细菌鉴定手册<sup>[10]</sup>的方法,对目标菌株进行生理生化鉴定。

#### 1.4 发酵产酶条件的优化

利用单因素法优化铜绿假单胞菌液体发酵产蛋白酶的条件。在摇瓶发酵培养基的基础上,分别以 2% (质量体积比)的麸皮、酒糟、脱脂棉粉、葡萄糖、蔗糖、乳糖和可溶性淀粉作为单一碳源,35 °C、200 r/min 培养 3 d,考察碳源对产酶的影响。选取最适碳源,研究碳源浓度对产酶的影响。选定碳源后,分别选取 1% (质量体积比)的蛋白胨、酵母浸提物、大豆蛋白胨、大豆粉、豆粕、脱脂奶粉、干酪素、尿素和硫酸铵作为单一氮源,35 °C、200 r/min 培养 3 d,考察氮源对铜绿假单胞菌 CAU342A 产蛋白酶的影响。选定氮源种类后,研究氮源浓度对产酶的影响。选取最适碳源和氮源,对二者浓度设计 2 因素 3 水平正交试验,35 °C、200 r/min 培养 3 d,确定最佳碳氮比。

确定最佳碳氮比后,考察培养基初始 pH (6.0–9.0)、温度(20–45 °C)和不同表面活性剂对产酶的影响。最后在优化后的最适条件下培养菌株,考察产酶历程,确定最适发酵时间。

#### 1.5 酶活力及蛋白含量的测定

总蛋白含量测定:Lowry 法<sup>[11]</sup>,以牛血清蛋白为标准蛋白。

蛋白酶活力测定:采用 GB/T 23527-2009。1 mL 粗酶液与 1 mL 酪蛋白溶液在 40 °C 条件下保温 10 min 后,加入 2 mL 三氯乙酸终止反应,

12 000 r/min 离心 3 min,取 1 mL 上清液加入 5 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和 1 mL Folin 试剂,40 °C 保温 20 min,于 660 nm 处测定吸光值。以先加入三氯乙酸终止反应的酶液作为对照。每分钟水解酪蛋白产生 1  $\mu\text{g}$  酪氨酸所需的酶量,定义为 1 个酶活力单位(U)。

#### 1.6 SDS-PAGE 及酶谱分析

聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):Laemmli 法<sup>[12]</sup>。分离胶浓度为 12.5% (质量体积比),浓缩胶浓度为 4.5% (质量体积比),考马斯亮蓝 R-250 染色显示蛋白带。低分子量标准蛋白:磷酸酶 b (Phosphorylase b, 97.2 kD)、牛血清蛋白(Albumin, 66.4 kD)、卵清蛋白(Ovalbumin, 44.3 kD)、碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, 29.0 kD)、胰蛋白酶抑制剂(Trypsin inhibitor, 20.1 kD)和  $\alpha$ -乳白蛋白( $\alpha$ -Lactalbumin, 14.3 kD)。

蛋白酶酶谱:参照姜微波<sup>[13]</sup>的方法并稍作改动。分离胶中加入 0.1%的明胶作为底物,电泳完成后,将分离胶在复性缓冲液[2.5% Triton-X100 (曲拉通), 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5]中浸洗 2–3 次,每次 5–10 min,再将分离胶置于缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5)中,37 °C 放置进行酶反应 3 h。经考马斯亮蓝 R-250 染色和脱色处理的凝胶背景颜色为深蓝色,蛋白酶反应部位颜色变浅。

#### 1.7 数据分析

试验数据采用 Excel 软件[Microsoft® Office Excel® 2007 (12.0.4518.1014)]进行分析,试验中各发酵条件的优化均做 3 次平行,取 3 次结果的平均值。

## 2 结果与分析

#### 2.1 菌株筛选及鉴定

从酱油曲样品中筛选到多个产生明显透明圈的菌株。经过分离纯化及摇瓶复筛,菌株 CAU342A 表现出较强的产蛋白酶能力,初始酶活力达到 912 U/mL,且产酶稳定。该菌株的 16S rRNA 基因序列全长为 1 424 bp,序列比对结果表明该菌株与假单胞菌属菌株的相似性为 99%。利用软件 MEGA

4.0 构建系统发育树, 如图 1 所示, CAU342A 与假单胞菌属的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 之间亲缘关系最为接近。

细菌 CAU342A (GenBank 登录号: KX025106) 在 35 °C 培养 2 d 的菌落形态见图 2A, 该菌略呈圆形, 微凸起, 表面光滑湿润, 半透明, 边缘为波状。该菌分解脱脂奶粉能力强, 形成明显透明

圈, 2 d 已基本分解完全, 并产生色素, 使平板呈灰绿色。在光学显微镜下观察其细胞形态, 见图 2B, 该菌为革兰氏阴性菌, 菌体较小, 呈短杆状, 单个或多个形成短链, 能运动, 不产生芽孢。其生理生化特征(表 1)与朱春节等<sup>[7]</sup>报道的铜绿假单胞菌特征一致。综合鉴定该菌株为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。

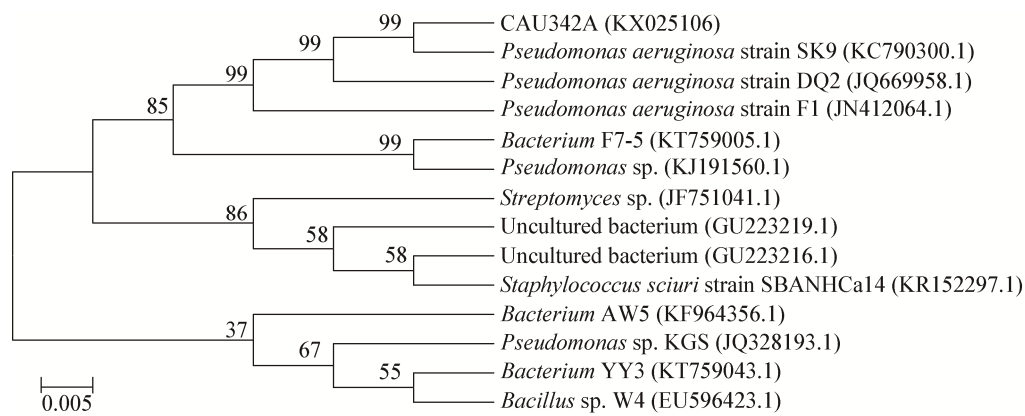


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 CAU342A 系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of strain CAU342A based on 16S rRNA gene sequence

注: 括号中的序号代表菌株的 GenBank 登录号; 分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类到一起的几率; 标尺刻度代表 0.5% 的序列差异。

Note: Numbers in parentheses represent the sequence's accession number in GenBank; The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap; Bar: 0.5% sequence divergence.

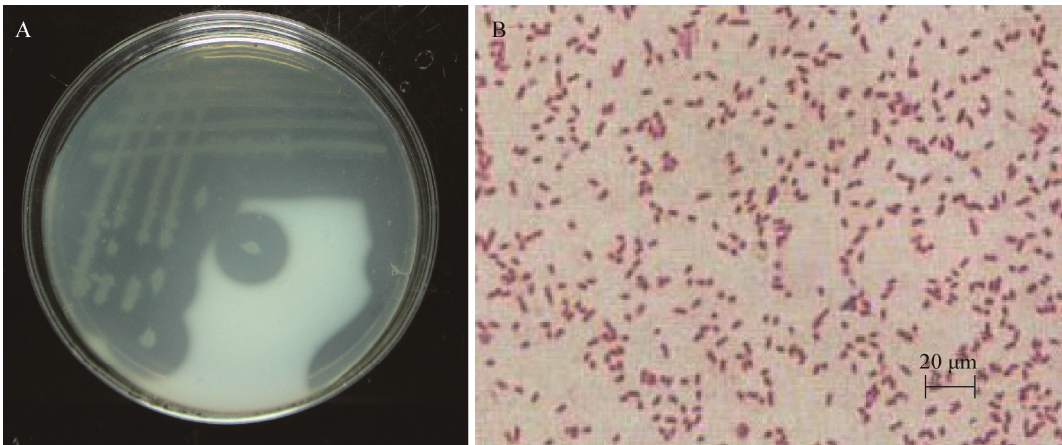


图 2 CAU342A 在 35 °C 生长 2 d 的菌落形态(A)和 100 倍光学显微镜下形态(B)

Figure 2 Colonemorphologies of CAU342A at 35 °C for 2 d (A) and morphologies on 100× optical microscope (B)

表 1 菌株 CAU342A 的形态及生理生化特征  
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain CAU342A

指标 Index	CAU342A
细胞形态 Morphology	杆状
革兰氏染色 Gram-categorization	阴性
产芽孢 Spore	—
精氨酸双水解酶 Arginine double enzyme hydrolysis	+
蔗糖 Sucrose	—
乳糖 Lactose	—
甘露醇 D-Vmannose	+
葡萄糖 Glucose	+
木糖产酸 Xylose acids	+
氧化酶 Oxidase	+
吡咯产生 Benzpyrole	—
柠檬酸盐 Citrate	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+

注：+：阳性或能够利用；—：阴性或不能利用。

Note：+：Positive or can be used；—：Negative or can not be used.

## 2.2 CAU342A 液体发酵产蛋白酶条件的优化

**2.2.1 碳源对菌株液体发酵产蛋白酶的影响：**碳源对铜绿假单胞菌 CAU342A 发酵产蛋白酶的影响见表 2。当以酒糟为单一碳源时，铜绿假单胞菌 CAU342A 发酵产蛋白酶活力最高，达到 1 343.9 U/mL。其次为麸皮(1 001.2 U/mL)和乳糖(961.3 U/mL)。以脱脂棉粉、蔗糖和可溶性淀粉为单一碳源时，铜绿假单胞菌 CAU342A 产蛋白酶活力较低。

实验进一步研究了酒糟的浓度对铜绿假单胞菌 CAU342A 产蛋白酶的影响，结果如图 3 所示。实验表明，随着酒糟浓度的增加，蛋白酶活力增加；当酒糟浓度为 2.5% 时，蛋白酶活力最高，为 1 436.6 U/mL；而后随着酒糟浓度的增加，蛋白酶活力开始下降。因此选含量为 2.5% 的酒糟作为碳源。

**2.2.2 氮源对菌株液体发酵产蛋白酶的影响：**氮源对铜绿假单胞菌 CAU342A 发酵产蛋白酶的影响见表 3。不同氮源对该菌产蛋白酶的影响不同，其

表 2 碳源种类对铜绿假单胞菌 CAU342A 产蛋白酶的影响  
Table 2 Effect of carbon sources on protease production by *Pseudomonas aeruginosa* CAU342A

碳源 Carbon source	蛋白酶活力 Protease activity (U/mL)
麸皮 Wheat bran	1 001.2±30.0
酒糟 Vinasse	1 343.9±40.3
脱脂棉粉 Degreasing cotton	709.6±21.3
葡萄糖 Glucose	916.8±27.5
蔗糖 Sucrose	712.7±21.4
乳糖 Lactose	961.3±28.8
可溶性淀粉 Soluble starch	707.4±21.2

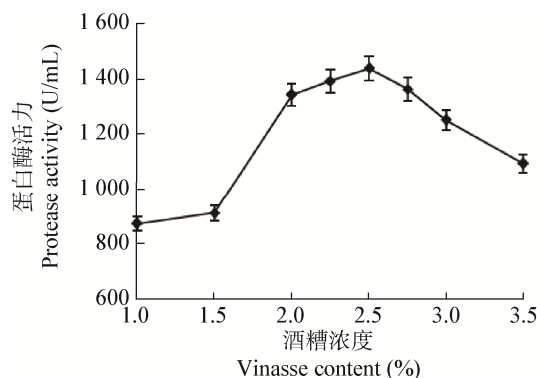


图 3 酒糟浓度对铜绿假单胞菌 CAU342A 产蛋白酶的影响

Figure 3 Effect of vinasse content on protease production by *Pseudomonas aeruginosa* CAU342A

表 3 氮源种类对铜绿假单胞菌 CAU342A 产蛋白酶的影响  
Table 3 Effect of nitrogen sources on protease production by *Pseudomonas aeruginosa* CAU342A

氮源 Nitrogen source	蛋白酶活力 Protease activity (U/mL)
酵母浸提物+蛋白胨 Yeast extract+Peptone	1 442.1±43.3
酵母浸提物 Yeast extract	1 637.7±49.1
蛋白胨 Peptone	1 580.5±47.4
大豆蛋白胨 Soybean peptone	882.9±26.5
大豆粉 Soybean meal	1 113.4±33.4
豆粕 Soybean pulp	1 057.7±31.7
脱脂奶粉 Defatted milk powder	1 075.8±32.3
干酪素 Casein	1 456.9±43.7
尿素 Urea	778.2±23.3
硫酸铵 Ammonium sulfate	522.8±15.7

中以酵母浸提物为氮源时产蛋白酶最高，活力为 1 637.7 U/mL。同时考察了酵母浸提物浓度对产酶的影响，结果如图 4 所示。实验表明当酵母浸提物浓度为 1.5%时酶活力最高，为 1 720.6 U/mL；之后，随着酵母浸提物浓度增大，酶活力逐渐下降。氮源的类型和性质影响酶的合成和分泌，酵母浸提物营养成分丰富，可为微生物发酵提供全面均衡的营养。

2.2.3 最佳碳氮比的确定：以酒糟为碳源，酵母浸提物为氮源，设计 2 因素 3 水平正交试验，确定最佳碳氮比。正交试验因素和水平及试验方案和结果分析见表 4。

表 4 正交试验结果分析表明，氮源(酵母浸提物)浓度对产酶影响较碳源(酒糟)大，随着氮源浓度增大，产酶量先升高后降低，碳源浓度对产酶量影响相对较小。由极差分析可知，各因素对铜绿假单胞菌产蛋白酶的影响作用大小为 B>A，产

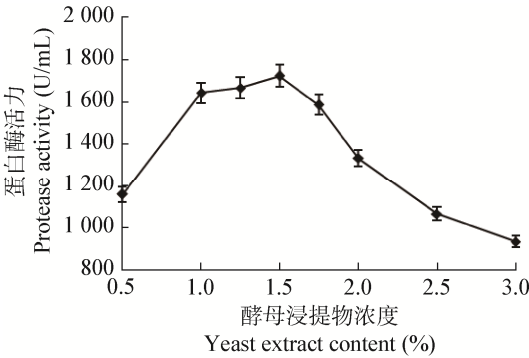


图 4 酵母浸提物浓度对铜绿假单胞菌 CAU342A 产蛋白酶的影响

Figure 4 Effect of yeast extract content on protease production by *Pseudomonas aeruginosa* CAU342A

酶最优组合为 B<sub>2</sub>A<sub>3</sub>，经验证，此条件下的蛋白酶活力为 1 754.5 U/mL，高于其他试验组，因此使用 B<sub>2</sub>A<sub>3</sub> 作为最佳氮源和碳源，即当酵母浸提物浓度为 15 g/L (1.5%)，酒糟浓度为 30 g/L (3%)时，产酶量最高，此时碳氮比为 2:1。

表 4 碳源和氮源配比正交试验设计及结果分析					
Table 4 Results and analysis of orthogonal test for carbon and nitrogen sources					
试验号 Experiment number	A 酒糟质量浓度 Concentration of vinasse (g/L)	B 酵母浸提物质量浓度 Concentration of yeast extract (g/L)	C 空列 1 Empty 1	D 空列 2 Empty 2	蛋白酶活力 Protease Activity (U/mL)
1	1 (20)	1 (10)	1	1	689.5±20.7
2	1	2 (15)	2	2	1 474.2±47.2
3	1	3 (20)	3	3	1 319.4±42.6
4	2 (25)	1	2	3	736.6±22.1
5	2	2	3	1	1 341.1±37.2
6	2	3	1	2	1 438.7±40.1
7	3 (30)	1	3	2	1 143.6±34.3
8	3	2	1	3	1 752.5±52.6
9	3	3	2	1	1 473.3±44.2
均值 1 Mean value 1	1 161	857	1 294	1 261	
均值 2 Mean value 2	1 172	1 523	1 228	1 352	
均值 3 Mean value 3	1 456	1 410	1 268	1 270	
极差 Range	295	666	66	91	
主次顺序 Order		B>A			
优水平 Optimum level	A <sub>3</sub>	B <sub>2</sub>			
优组合 Optimum group		B <sub>2</sub> A <sub>3</sub>			



**2.2.4 培养基初始 pH 对菌株液体发酵产蛋白酶的影响:** 随着初始 pH 的升高, 铜绿假单胞菌 CAU342A 发酵液蛋白酶活力增大, 当初始 pH 为 7.5 时, 菌株产酶量最高, 达到 1 856.2 U/mL (图 5)。培养基初始 pH 在 6.5–8.0 之间变动时, 铜绿假单胞菌 CAU342A 产酶活力保持在较高水平。当初始 pH 小于 6.5 和大于 8.0 时, 酶活力降低明显。初始 pH 过高或过低都会使微生物的生命活动减弱, 代谢产物累积增加。

**2.2.5 温度对菌株液体发酵产蛋白酶的影响:** 温度对铜绿假单胞菌 CAU342A 液体发酵产蛋白酶的影响较大(图 6)。当温度为 30 °C 时菌株产酶量最高, 达到 2 373.0 U/mL。培养温度降低至 25 °C 或升至 40 °C 时, 酶活力有所下降, 为最高酶活力的

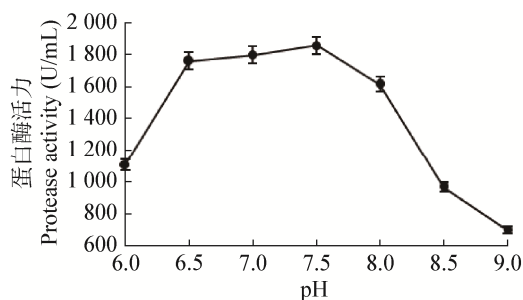


图 5 培养基初始 pH 对铜绿假单胞菌 CAU342A 产蛋白酶的影响

Figure 5 Effect of initial pH on protease production by *Pseudomonas aeruginosa* CAU342A

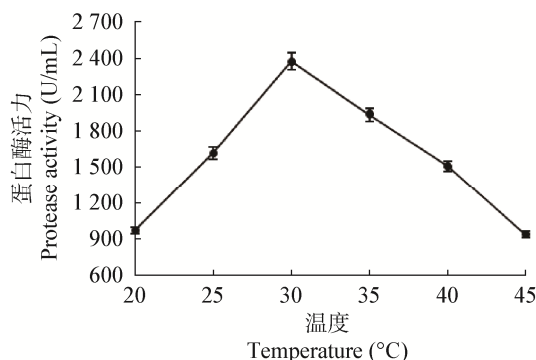


图 6 培养温度对铜绿假单胞菌 CAU342A 产蛋白酶的影响

Figure 6 Effect of temperature on protease production by *Pseudomonas aeruginosa* CAU342A

65%左右。当温度进一步降低到 20 °C 或升高到 45 °C 时, 产酶量显著降低。

**2.2.6 表面活性剂对菌株液体发酵产蛋白酶的影响:** 添加表面活性剂对铜绿假单胞菌 CAU342A 产蛋白酶的影响见表 5。添加吐温-80 对该菌发酵产酶有促进作用, 蛋白酶活力达到 2 480.0 U/mL。十二烷基硫酸钠(SDS)对该菌产酶无太大影响, 曲拉通 X-100、吐温-20 和羧甲基纤维素钠(CMC)则对该菌产酶有一定的抑制作用。同时考察了不同浓度的吐温-80 对产酶的影响, 结果如图 7 所示。实验表明当吐温-80 浓度为 0.05%时酶活力最高, 为 2 617.1 U/mL, 随着吐温-80 浓度的增大, 酶活力逐渐下降。

**2.2.7 培养时间对菌株液体发酵产蛋白酶的影响:** 确定各发酵条件的最适参数后, 考察发酵时间对铜绿假单胞菌 CAU342A 液体发酵产蛋白酶的影响, 结果如图 8 所示。菌株在优化后的发酵条件下,

表 5 表面活性剂对铜绿假单胞菌 CAU342A 产蛋白酶的影响

Table 5 Effect of surfactants on protease production by *Pseudomonas aeruginosa* CAU342A

表面活性剂 Surfactant	蛋白酶活力 Protease activity (U/mL)
对照 Control	2 368.9±71.1
曲拉通 X-100 Triton X-100	1 925.5±57.8
吐温-80 Tween-80	2 480.0±74.4
吐温-20 Tween-20	1 669.4±50.1
十二烷基硫酸钠 SDS	2 303.7±69.1
羧甲基纤维素钠 CMC	1 488.6±44.7

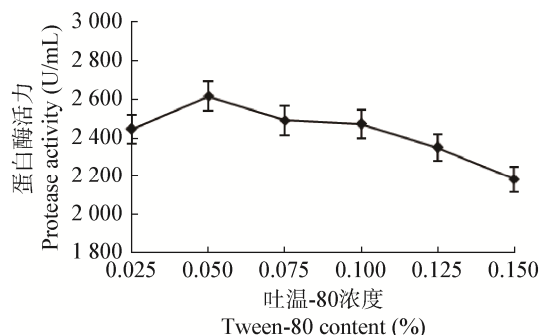


图 7 吐温-80 浓度对铜绿假单胞菌 CAU342A 产蛋白酶的影响

Figure 7 Effect of Tween-80 content on protease production by *Pseudomonas aeruginosa* CAU342A

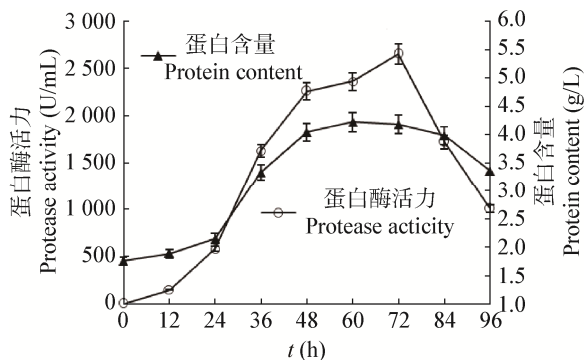


图8 培养时间对铜绿假单胞菌 CAU342A 产蛋白酶的影响  
Figure 8 Effect of fermentation time on protease production by *Pseudomonas aeruginosa* CAU342A

24 h 即已开始产酶, 发酵 72 h 时酶活力可达 2 653.5 U/mL, 蛋白含量为 4.22 g/L。之后, 随着培养时间的增加, 酶活力下降, 发酵 96 h 时酶活力降至 1 008.1 U/mL, 蛋白量也降为 3.36 g/L, 可能是发酵液中的蛋白酶水解了发酵所产生的其他蛋白。

### 2.3 铜绿假单胞菌 CAU342A 产蛋白酶的 SDS-PAGE 及酶谱分析

铜绿假单胞菌 CAU342A 在优化后的培养基条件下发酵 3 d, 其粗酶液的 SDS-PAGE 及蛋白酶酶谱见图 9。该菌在以酒糟为碳源的情况下, 酶谱中

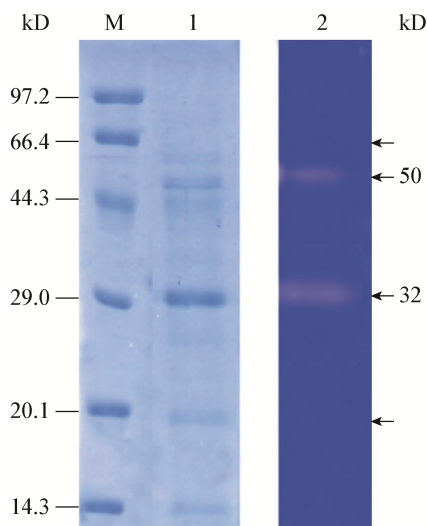


图9 铜绿假单胞菌 CAU342A 粗酶液 SDS-PAGE 及酶谱  
Figure 9 SDS-PAGE and zymogram of the crude extract from *Pseudomonas aeruginosa* CAU342A

注: M: 低分子量标准蛋白; 1: 粗酶液; 2: 蛋白酶谱。

Note: M: Low molecular weight marker; 1: Crude extract; 2: Protease zymogram.

出现至少 4 条具有蛋白酶活性的同工酶条带。其中有 2 条主带, 表明其活性较高, 对应蛋白的分子量为 32 kD 和 50 kD。

### 3 讨论

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是假单胞菌属的代表菌株, 除可用于产鼠李糖脂、脂肪酶和抗菌物质等, 还可发酵产蛋白酶, 且不同菌株产酶情况差异较大<sup>[14]</sup>。铜绿假单胞菌虽为潜在的条件致病菌, 但其发酵液具有高蛋白酶活力, 对蛋白酶的开发和应用具有重要的意义, 同时也可通过条件控制及对其重组酶的研究加强该菌在工业上的应用<sup>[4,7]</sup>。

通过单因素和正交试验优化了铜绿假单胞菌 CAU342A 液体发酵产蛋白酶的条件。氮源对铜绿假单胞菌 CAU342A 发酵产蛋白酶影响较为显著, 有机氮源比无机氮源更有利于提高菌株的产酶活力, 其中酵母浸提物的效果最适, 其次是蛋白胨, 以干酪素为氮源时也有较高酶活力, 利用无机氮源时仍具有较强的产酶能力。氮源为微生物提供构成细胞所需的氨基酸、核酸和蛋白质等物质, 同时也是蛋白酶的诱导物。不同菌株对氮源的利用和产蛋白酶情况不同, 铜绿假单胞菌利用有机氮源可高产蛋白酶。Kumar 等<sup>[15]</sup>报道的铜绿假单胞菌发酵产蛋白酶以牛肉膏为最适氮源, 利用无机氮源硝酸铵时酶活力最低。Gupta 等<sup>[16]</sup>报道了以酵母浸提物和干酪素作为复合有机氮源促进铜绿假单胞菌 PseA 产蛋白酶。Zambare 等<sup>[17]</sup>研究发现铜绿假单胞菌 MCM B-327 以蛋白胨和大豆粉复合作为氮源时产蛋白酶活力最高, 而利用干酪素或无机氮源时产酶量很低。碳源提供微生物生长繁殖所需的能源和碳成分, 对比了 7 种不同碳源对铜绿假单胞菌 CAU342A 产蛋白酶的影响(表 2), 发现该菌利用酒糟为碳源时产酶量最高, 其次为麸皮和乳糖。不同铜绿假单胞菌利用碳源产蛋白酶无明显规律。Kumar 等<sup>[15]</sup>和 Ariole 等<sup>[18]</sup>报道了葡萄糖为铜绿假单胞菌发酵产蛋白酶的最佳碳源。而 Zambare 等<sup>[17]</sup>研究发现铜绿假单胞菌 MCM



B-327 发酵时添加葡萄糖对酶活力产生严重的抑制作用,可能是产生了葡萄糖效应。Meena 等<sup>[19]</sup>研究固体发酵铜绿假单胞菌产碱性蛋白酶时利用麦麸作为碳源酶活力最高。Oh 等<sup>[8]</sup>和 Gupta 等<sup>[16]</sup>报道的铜绿假单胞菌分别以乳糖和甘油为碳源时蛋白酶活力最高。本研究中酒糟作为复杂碳源,其营养物质含量丰富,能满足菌株生长和产酶需要。

培养基的初始 pH 对微生物的发酵具有重要作用,铜绿假单胞菌 CAU342A 的产酶最适 pH 为 7.5,在 pH 6.5–8.0 之间保持较高的产酶能力,与 Gupta 等<sup>[16]</sup>和 Zambare 等<sup>[17]</sup>报道的铜绿假单胞菌发酵产蛋白酶条件(最适 pH 7.0)相近。两株来源于动物肠道<sup>[15,18]</sup>和一株筛选自土壤<sup>[20]</sup>的铜绿假单胞菌发酵产蛋白酶的最适 pH 较高(pH 9.0)。发酵温度对产酶的影响研究表明,铜绿假单胞菌 CAU342A 具有较广的产酶温度范围(25–40 °C),其最适培养温度为 30 °C,温度在 20–45 °C 时仍具有一定的产酶能力。大多已报道的铜绿假单胞菌最适产酶温度在 30–40 °C 之间<sup>[9,15-18,20-21]</sup>,少数菌株需要更高的发酵温度(45 °C)<sup>[19]</sup>。表面活性剂是具有亲水基和疏水基的离子或非离子化合物,能够改变细胞表面的疏水性和极性性质,改变细胞膜的通透性,有助于菌体胞外酶的分泌和其与底物的接触,从而提高微生物产酶量<sup>[22]</sup>。研究表明,添加表面活性剂是影响微生物产酶的一种方法。张志波等<sup>[22]</sup>发现 0.05% 的吐温-80 对一株筛选自堆肥的铜绿假单胞菌产蛋白酶有促进作用,使其产酶活力提高了 65%。本研究中,吐温-80 对铜绿假单胞菌 CAU342A 产蛋白酶有一定的促进作用,而吐温-20 等表面活性剂则对其活性产生抑制。在发酵时间对产酶历程的影响中,发现铜绿假单胞菌 CAU342A 在发酵 24 h 时即有蛋白酶活力(583.1 U/mL),在 72 h 时达到产酶高峰(2 653.5 U/mL),随后活力逐渐降低。与 Zambare 等<sup>[17]</sup>报道的铜绿假单胞菌 MCMB-327 (72 h, 395 U/mL)相比,CAU342A 具有更高的产酶活力。

目前国内对铜绿假单胞菌产蛋白酶发酵条件

的报道较少,相关研究主要集中在其产鼠李糖脂和脂肪酶的发酵条件优化、弹性蛋白酶的克隆表达和性质等方面<sup>[2-3]</sup>。国外已有一些不同来源铜绿假单胞菌发酵优化产蛋白酶的报道<sup>[15-21]</sup>,其中在以酪蛋白为底物测定酶活力的研究中,Meena 等<sup>[19]</sup>和 Zambare 等<sup>[17]</sup>报道的铜绿假单胞菌经过发酵优化后,蛋白酶活力分别达到 582.3 U/mL 和 395 U/mL。Gupta 等<sup>[16]</sup>从土壤中分离得到铜绿假单胞菌 PseA,其发酵产蛋白酶活力在 24 h 时达到 1 601 U/mL。本研究的铜绿假单胞菌 CAU342A 产蛋白酶水平经优化后在 72 h 时达到 2 653.5 U/mL,达到相同酶活定义下的最高产酶水平,在蛋白酶相关研究与应用方面具有很大的潜力。此外,该菌粗酶液的 SDS-PAGE 及酶谱显示其能产生至少 4 种蛋白酶,分子量在 19–65 kD 之间,2 条主带分别为 32 kD 和 50 kD,同已报道的来源于铜绿假单胞菌的蛋白酶<sup>[8,17]</sup>(58.8 kD 和 56 kD)和纤溶酶<sup>[7]</sup>(34 kD)有所不同,具有进一步研究的价值。本文为深入分析铜绿假单胞菌的产蛋白酶特性、蛋白酶的多样性及其在工业领域应用提供了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Niyonzima FN, More S. Detergent-compatible proteases: microbial production, properties, and stain removal analysis[J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2015, 45(3): 233-258
- [2] Qu W, Shao L, Song LF, et al. Screening of lipase-producing strain in oil field and optimization of the lipase producing conditions[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(16): 4002-4006 (in Chinese)  
曲威, 邵露, 宋丽芬, 等. 油污土壤中脂肪酶产生菌的筛选及产酶条件优化[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(16): 4002-4006
- [3] Zhang XS, Xu DJ. Optimization of seed culture, carbon and nitrogen conditions of rhamnolipid producing strains[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2013, 11(5): 38-43 (in Chinese)  
张祥胜, 许德军. 产鼠李糖脂菌株种子培养条件和 C、N 源的优化[J]. 生物加工过程, 2013, 11(5): 38-43
- [4] Qiao TM, Zhang J, Zhao F, et al. Study on optimization of fermentation conditions of *Pseudomonas aeruginosa* and its antibacterial substances[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2014, 38(5): 45-50 (in Chinese)  
谯天敏, 张静, 赵芳, 等. 铜绿假单胞菌发酵条件优化及抗菌物质研究[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2014, 38(5): 45-50
- [5] Yang GY, Xie J, Xu N, et al. Isolation and characterization of collagenolytic enzyme-producing strain from rotten hides and

- primary analysis of the enzyme property[J]. Microbiology China, 2004, 31(5): 43-48 (in Chinese)
- 杨光垚, 谢君, 徐宁, 等. 具胶原蛋白酶活性铜绿假单胞菌的筛选[J]. 微生物学通报, 2004, 31(5): 43-48
- [6] Li B, Dang Y, Ma Y, et al. Purification and N-terminal amino acid sequencing of the ESM protease isolated from an eggshell membrane-degrading bacteria[J]. Microbiology China, 2008, 35(8): 1182-1185 (in Chinese)
- 李勃, 党永, 马瑜, 等. 蛋壳内膜分解菌所产蛋白酶的纯化及其 N-末端氨基酸序列测定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(8): 1182-1185
- [7] Zhu CJ, Tang ZH, Xie XZ. Study on a new strain producing novel *Douchi* fibrinolytic enzyme[J]. Genomics and Applied Biology, 2011, 30(1): 7-15 (in Chinese)
- 朱春节, 汤祝华, 谢秀祯. 一株新的豆豉纤溶酶产生菌的研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(1): 7-15
- [8] Oh YS, Shih IL, Tzeng YM, et al. Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27(1/2): 3-10
- [9] Saravanan D. Scouring potential of mesophile acidic proteases of *Pseudomonas aeruginosa* for grey cotton fabrics[J]. Journal of the Institution of Engineers (India): Series E, 2012, 93(2): 75-81
- [10] Holt JG. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 9th Edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994: 190-255
- [11] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265-275
- [12] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685
- [13] Jiang WB. Improvement in assay of protease activity by gel electrophoresis[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2002, 19(5): 607-610 (in Chinese)
- 姜微波. 凝胶电泳分析蛋白酶活性的技术改进[J]. 植物学通报, 2002, 19(5): 607-610
- [14] Andrejko M, Zdybicka-Barabas A, Janczarek M, et al. Three *Pseudomonas aeruginosa* strains with different protease profiles[J]. Acta Biochimica Polonica, 2013, 60(1): 83-90
- [15] Kumar RS, Duraipandian P, Shankar T, et al. Optimization of alkalophilic protease production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the gut of *Penaeus monodon*[J]. World Journal of Fish and Marine Sciences, 2011, 3(5): 371-375
- [16] Gupta A, Khare SK. Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 42(1): 11-16
- [17] Zambare V, Nilegaonkar S, Kanekar P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization[J]. New Biotechnology, 2011, 28(2): 173-181
- [18] Ariole CN, Ilegu E. Alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the gut of *Pila ovata*[J]. Journal of Global Biosciences, 2013, 2(5): 126-131
- [19] Meena P, Tripathi AD, Srivastava SK, et al. Utilization of agro-industrial waste (wheat bran) for alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* in SSF using Taguchi (DOE) methodology[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2013, 2(3): 210-216
- [20] Akujobi CO, Odu NN, Olorundu SI, et al. Production of protease by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* isolated from abattoir environment[J]. Journal of Research in Biology, 2012, 2(2): 77-82
- [21] Kumar AG, Swarnalatha S, Sairam B, et al. Production of alkaline protease by *Pseudomonas aeruginosa* using proteinaceous solid waste generated from leather manufacturing industries[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(6): 1939-1944
- [22] Zhang ZB, Zeng GM, Shi JG, et al. Effect of Tween-80 and rhamnolipid on the production of protease from *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2006, 26(7): 1152-1158 (in Chinese)
- 张志波, 曾光明, 时进钢, 等. Tween-80 和鼠李糖脂对铜绿假单胞菌及枯草芽孢杆菌产蛋白酶的影响[J]. 环境科学学报, 2006, 26(7): 1152-1158