

# 地衣芽孢杆菌固态发酵麻疯树饼粕产蛋白酶 及其酶学性质

吴远根<sup>1,2\*</sup> 詹深山<sup>1</sup> 吴洁<sup>1</sup> 徐晓宝<sup>1</sup> 杜亚菲<sup>1</sup> 郭云兰<sup>1</sup> 王超<sup>1</sup> 邱树毅<sup>1</sup>

(1. 贵州大学贵州省发酵工程与生物制药重点实验室 贵州 贵阳 550003)

(2. 上海交通大学环境科学与工程学院 上海 200240)

**摘 要:** 利用地衣芽孢杆菌作为出发菌株, 以提油后的麻疯树饼粕作为培养基, 采用固态发酵方式生产蛋白酶。控制培养基湿度为 125%, 添加 10% 的乳糖和 5% 的蛋白胨, 30°C 条件下发酵 3 d, 蛋白酶产量达到最大值(7465 U/g)。酶学性质研究表明, 蛋白酶最适作用 pH 为 5–6, 最适催化温度为 55°C, 最大催化速度  $V_{\max}$  为 0.0324  $\mu\text{mol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$ ,  $K_m$  值为 0.0531 mmol/L。有机溶剂对酶活力有明显促进作用, 10% (V/V) 甲醇和 5% (V/V) 乙醇可以使酶活力分别提高 13.55% 和 70.9%。Mg<sup>2+</sup> 可以使蛋白酶活力提高 42.54%, 而 Hg<sup>2+</sup> 却使酶彻底失活。

**关键词:** 麻疯树饼粕, 地衣芽孢杆菌, 蛋白酶, 固态发酵, 酶学性质

## Production and Characterization of Protease from *Bacillus licheniformis* in Solid-state Fermentation Using Deoiled *Jatropha curcas* Seed Cake as Substrate

WU Yuan-Gen<sup>1,2\*</sup> ZHAN Shen-Shan<sup>1</sup> WU Jie<sup>1</sup> XU Xiao-Bao<sup>1</sup> DU Ya-Fei<sup>1</sup>  
GUO Yun-Lan<sup>1</sup> WANG Chao<sup>1</sup> QIU Shu-Yi<sup>1</sup>

(1. Guizhou Province Key Laboratory of Fermentation Engineering and Biopharmacy, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550003, China)

(2. School of Environmental Science & Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** Solid-state fermentation was employed to produce protease by *Bacillus licheniformis* using deoiled *Jatropha curcas* seed cake as substrate. The optimal conditions of protease production were studied. Maximum protease production (7465 U/g of dry substrate, U/g) was obtained at 125% substrate moisture, a growth period of 3 days, supplementation with 10% (wt) of lactose and 5% (wt) of peptone. The results of protease analysis showed that the optimal temperature and pH were 55°C and 5–6, respectively. The  $V_{\max}$  and  $K_m$  of protease produced by *Bacillus licheniformis* were 0.0324  $\mu\text{mol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$  and 0.0531 mmol/L, respectively. Organic solvent can enhance protease activity. In comparison with control, the activities were increased by 13.55% and 70.9% when the protease was solved by 10% (V/V) of methanol and 5% (V/V) of

基金项目: 教育部“春晖”计划项目(No. Z2007-1-52017); 贵州省科学技术基金项目(No. 黔科合 J 字[2007]2035); 国家大学生创新性实验计划项目(No. 2008017)

\* 通讯作者: Tel: 86-851-4732861; ✉: ygwu@gzu.edu.cn

收稿日期: 2009-09-19; 接受日期: 2009-11-02

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

ethanol, respectively.  $Mg^{2+}$  enhanced protease activity by 42.54% while  $Hg^{2+}$  damaged protease and entirely inactive its activity.

**Keywords:** *Jatropha curcas* seed cake (JCSC), *Bacillus licheniformis*, Solidstate fermentation (SSF), Protease, Protease characterization

麻疯树是一种抗旱耐瘠的多用途速生树种,它不但是保水固土、防止沙化、增殖有机土质、建造防护林的优良造林材料,而且是生产生物能源、生物农药、生物医药、生物饲料的主要原料<sup>[1]</sup>。麻疯树种子中含有丰富的油脂(其种仁含油量高达 60%),主要成分为油酸(41.3%)、亚油酸(31.4%)和棕榈酸(19.5%),是制备生物柴油的理想原料<sup>[2]</sup>。以麻疯树果生产生物柴油是缓解石油枯竭的有效途径之一,目前已经成为研究生产生物柴油的一个活跃方向。

伴随着麻疯树的广泛种植和生物柴油的批量生产,麻疯树果提油后将会产生大量的麻疯树饼粕。据统计,云、贵、川三省已规划面积约 80 万公顷麻疯树原料基地,未来 10 年三省规划种植面积超过 2500 万公顷<sup>[3]</sup>。据相关部门估计,中国未来麻疯树的种植面积至少在 3000 万亩以上,每年会产生 1170 万吨麻疯树废弃饼粕。许多研究证实饼粕中含有较多的蛋白质,富含苏氨酸、缬氨酸、亮氨酸等多种必需氨基酸,具有较高的营养价值<sup>[4]</sup>。然而麻疯树饼粕含有一定量的抗营养因子<sup>[5]</sup>,且蛋白质往往与脂类等物质结合,因而限制了饼粕的利用。如果将饼粕直接排放,不仅会造成资源的极大浪费,而且会污染周围的环境。因此,如何利用好麻疯树饼粕是一个急需解决的问题。

固态发酵技术具有对原料和设备要求低、能源消耗低、不会产生废水等优点,被广泛运用于各种农作物废弃物的循环再利用。为了提高麻疯树种子的综合利用效率,本文以地衣芽孢杆菌作为发酵菌株,通过固态发酵方式,利用提油麻疯树饼粕来生产蛋白酶。本文主要考察了各种发酵条件对蛋白酶产量的影响,并较为系统地研究了酶学性质,以期蛋白酶酶的广泛使用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

提油后的麻疯树饼粕(带壳)由黔西南康达生物能源技术有限公司(兴义,贵州)提供,使用前先经粉碎机充分粉碎,并用 40 目筛子筛分,得到颗粒大

小均匀的麻疯树饼粕粉。地衣芽孢杆菌(CICC 10037)购于中国工业微生物菌种保藏管理中心(北京),使用前先进行了复活。聚乙二醇(PEG)-20000 购于 Solarbio 公司,透析袋(截留分子量 14000)购于北京经济宏达生物技术有限公司。其它试剂均为市售分析纯试剂。

### 1.2 主要仪器

SPX-250B-Z 生化培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); 722S 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); ZD-85 A 恒温振荡器(常州澳华仪器有限公司); DZKW-4 电子恒温水浴锅(上海市科析试验仪器厂); SW-CJ-LFD 洁净工作台(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); TDL-5 离心机(北京安卓科学仪器厂); GMSX-280 手提式压力蒸汽消毒器(北京市永光明医疗仪器厂); BCD-168K/A 冰箱(海尔公司)。

### 1.3 主要培养基

种子培养基: 马铃薯蔗糖(PDA)培养基。将活化后的地衣芽孢杆菌接种至 PDA 培养基,在 30℃ 恒温条件下振荡培养 48 h 后即种子菌液。

固态发酵培养基: 准确称取 10 g 干麻疯树饼粕粉加到 150 mL 三角瓶中,使用前  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

### 1.4 固态发酵方法

将种子菌液按 10%接种量接种到固体发酵培养基中,控制一定的湿度(25%、50%、75%、100%、125%、200%)、添加不同碳源和氮源,在自然 pH 条件下于 30℃ 恒温条件下静置发酵一定时间(1、2、3、4、5、6、7 d)。

### 1.5 蛋白酶的提取、测定与纯化

蛋白酶的提取与测定参考吴远根等<sup>[6]</sup>的报道。准确称取一定量(3–5 g)的发酵饼粕置于三角瓶中,加入 50 mL PBS 缓冲溶液(pH 7.2),在漩涡混合器上充分混合均匀。将上述混合液于 4000 r/min 条件下离心 10 min,收集上清液后进行超滤(0.2  $\mu$ m),进一步除去残留的固体颗粒,最后用 PBS 缓冲溶液将滤液定容到 50 mL 后进行酶活性测定。收集离心所

得固体残渣,于 110°C 干燥 24 h 后称重(精确到 0.001 g)。饼粕提取液中蛋白酶活性的测定以酪蛋白作为蛋白酶反应底物,以单位时间水解酪蛋白形成酪氨酸的量来反映酶活性,具体操作参照 SB/T 10317-1999 “蛋白酶活力测定法”。1 U 蛋白酶活力表示在 40°C 条件下每分钟水解酪蛋白产生 1  $\mu\text{g}$  酪氨酸的酶量。固态发酵产蛋白酶的产量用“U/g 干培养基”(以下简称 U/g)来表示。蛋白酶的盐析参考赵丛<sup>[7]</sup>的报道,先向酶液中添加 30%的硫酸铵,使杂蛋白沉淀,离心后取其上清液,然后向上清液中添加 70%的硫酸铵,使蛋白酶沉淀。将沉淀取出溶解于磷酸盐缓冲液,而后装入透析袋,于 4°C 冰箱中透析 24 h,最后将酶液用 PEG-20000 浓缩。

## 1.6 酶学性质研究

将 PEG-20000 浓缩后的酶液用去离子水稀释至所需体积,用于酶学性质研究。考察不同催化温度(35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C)、pH (3、4、5、6、7、8)、有机溶剂和金属离子对酶活力的影响,并研究蛋白酶催化动力学性质。

# 2 结果与讨论

## 2.1 发酵时间对蛋白酶产量的影响

发酵时间是发酵过程中必需确定的重要参数。发酵时间过短,则达不到理想的蛋白酶产量;发酵时间过长,则生产周期变长,而且还容易滋生杂菌。图 1 为麻疯树饼粕经地衣芽孢杆菌发酵不同时间后的蛋白酶产量。可以看出,随着发酵时间的延长,蛋白酶活性呈现快速增加趋势,此过程一直持续到发酵的第 3 天,达到最大蛋白酶产量(2581 U/g),随后蛋白酶活力逐步下降。发酵后期造成蛋白酶活性下降的主要原因是麻疯树饼粕中的营养成分逐渐被耗竭,而培养基缺乏足够营养将不利于微生物代谢产酶。

发酵时间的长短主要取决于微生物的生长和代谢速度,此外还取决于培养基的营养成分及内部环境。不同微生物产蛋白酶的最佳发酵时间不同。细菌由于生长速度快,适应能力强,所以其产蛋白酶的最佳时间较短,一般只有 2–3 d<sup>[8]</sup>;真菌生长速度比较慢,其最佳产酶时间较长,往往需要 5 d 以上<sup>[9]</sup>。图 1 结果表明,地衣芽孢杆菌利用麻疯树饼粕产蛋白酶的最佳时间为 3 d。另外,不同发酵方式对产酶时间也有很大影响。章海锋报道了地衣芽孢杆

菌在液态发酵 30 h 后达到最大产酶量<sup>[10]</sup>。一般液态发酵比固态发酵产酶快,主要原因是液态发酵时,微生物更容易利用营养物质和释放代谢产物,但液态发酵后会产生大量的废水,不利于后期处理。

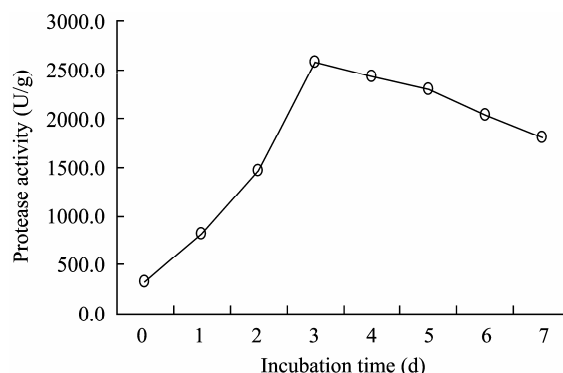


图 1 发酵时间对蛋白酶产量的影响

Fig. 1 Effect of incubation time on protease production in SSF using JCSC as substrate

## 2.2 相对湿度对蛋白酶产量的影响

培养基湿度是固态发酵必需考虑的一个重要因素,其显著影响微生物的生长和代谢相关酶的活性。为了考察培养基湿度对蛋白酶产量的影响,实验用去离子水将培养基湿度分别调控成 50%、75%、100%、125%、150%和 200%,于 30°C 条件下恒温恒湿发酵 3 d,并测定了发酵饼粕中的蛋白酶活力,结果如图 2 所示。可以看出,培养基湿度为 125%时,发酵饼粕中的蛋白酶含量达到最大值(4534 U/g),比未调湿度的酶活提高了 75.67%,这一结论比白地霉产蛋白酶所需的最适湿度高<sup>[6]</sup>,主要的原因是发酵菌株的差异所致。相比而言,霉菌发酵产酶对水的需求量较少。Chellappan 等报道了小孢侧齿霉固态发酵产蛋白酶的最适湿度为 60%<sup>[11]</sup>。

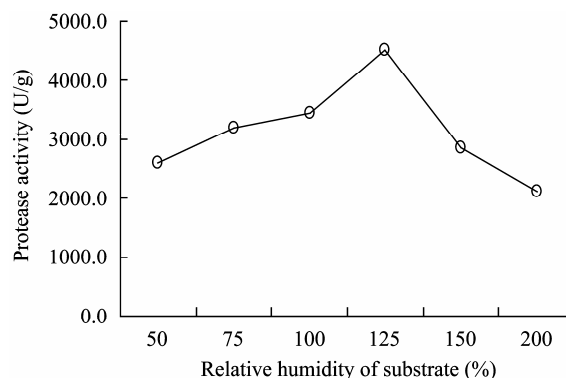


图 2 相对湿度对蛋白酶产量的影响

Fig. 2 Effect of moisture levels on protease production in SSF using JCSC as substrate

一般认为培养基湿度主要影响培养基的内部环境。培养基湿度太小时, 饼粕不能全部润湿和充分润胀, 因而不利于微生物的生长和代谢产酶。培养基湿度太大时, 很多水以液体形式存在, 容易形成水膜, 不利于氧的传递, 因而也影响了微生物的生长代谢, 其蛋白酶产量较少。

### 2.3 碳源对蛋白酶产量的影响

碳源对于微生物的生长极其重要, 不但提供了微生物生命活动所需的能量, 并且提供了合成产物的碳架。麻疯树饼粕中的粗蛋白含量大约为 23%, 而糖类成分只有 7%<sup>[5]</sup>, 碳氮比严重失调, 不利用微生物的生长和产酶, 因此需要加入额外的碳源。在发酵实验中, 我们分别加入不同量的葡萄糖和乳糖, 并考察了它们对固态发酵产蛋白酶的影响, 结果如图 3 所示。

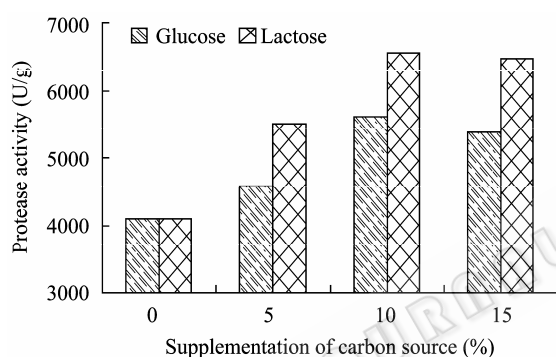


图 3 添加不同碳源对蛋白酶产量的影响

Fig. 3 Effect of different carbon source on protease production in SSF using JCSC as substrate

由图 3 可知, 不管是添加葡萄糖还是添加乳糖, 都能增加蛋白酶的产量, 但这二者中以添加乳糖效果最好, 此结论与 Mahanta 等<sup>[12]</sup>的报道一致。添加 10%乳糖后, 蛋白酶产量达到最大值(6564 U/g), 比未添加碳源的酶产量增加了 60.53%。添加 10%葡萄糖也能使蛋白酶产量增加 37.25%。进一步增大碳源添加量后, 蛋白酶产量反而有所降低, 这与文献的报道类似<sup>[6]</sup>。这种现象的主要原因可能是, 乳糖和葡萄糖都属于微生物能快速利用的碳源, 当其被地衣芽孢杆菌快速利用后, 会产生一些有机酸等物质, 在短时间内会改变培养基的微环境, 最终影响了菌体生长和蛋白酶活性。文献报道了地衣芽孢杆菌液态发酵产蛋白酶, 出现菌体二度生长现象<sup>[10]</sup>, 分析原因也是葡萄糖在被利用后产生了有机酸。

### 2.4 氮源对蛋白酶产量的影响

微生物细胞中大约含氮 5%–13%, 是微生物细胞蛋白和核酸的主要成分。氮素对微生物的生长发育有着重要的意义。微生物利用它在细胞内合成氨基酸和碱基, 进而合成蛋白质、核酸等细胞成分, 以及含氮的代谢产物。为了考察氮源对固态发酵产酶的影响, 实验分别选用有机氮(蛋白胨)和无机氮(氯化铵和硝酸钠)作为氮源添加。考虑到麻疯树饼粕中含有丰富的氮素, 我们确定氮源添加量为 2%与 5%, 测定结果如图 4 所示。

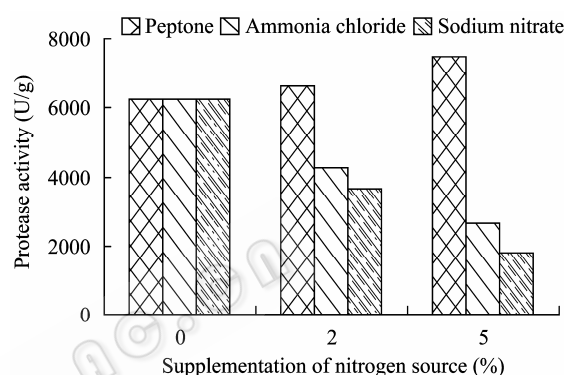


图 4 添加不同氮源对蛋白酶产量的影响

Fig. 4 Effect of different nitrogen source on protease production in SSF using JCSC as substrate

由图 4 可知, 往培养基中添加 5%蛋白胨后, 蛋白酶产量达到最大值(7465 U/g), 比未添加组提高 19.14%。与之形成鲜明对比的是, 添加氯化铵和硝酸钠后, 蛋白酶产量显著下降, 而且添加量越大, 蛋白酶活越低。添加 5%的氯化铵和硝酸钠后, 蛋白酶产量分别只有 2644 U/g 和 1784 U/g, 比未添加氮源组下降 1.37 倍和 2.51 倍。造成这种现象的主要原因是, 无机氮源容易被微生物快速利用, 氯化铵属于生理酸性氮源, 而硝酸钠属于生理碱性氮源, 它们被快速利用后, 会引起 pH 出现很大波动, 因而也就影响了地衣芽孢杆菌生长和蛋白酶活力。而蛋白胨属于有机氮源, 微生物只能缓慢利用, 在这过程中微生物会通过自身的适应和调控能力, 来缓解微环境的变化。另外蛋白胨在利用过程中会产生能量, 这也会促进微生物的生长。就总体情况而言, 麻疯树饼粕中的氮素能够满足地衣芽孢杆菌生长和产酶需要。

### 2.5 蛋白酶酶学性质的研究

提取的蛋白酶液经盐析、透析和 PEG-20000 浓

缩后, 其酶活力达到 270652 U/mL。为了便于酶学性质研究, 取小部分浓缩后的酶液进行稀释, 稀释后的酶液活力为 262 U/mL。

**2.5.1 pH 对蛋白酶活力的影响:** 蛋白酶的催化作用与反应液的 pH 有很大的关系, 每一种酶都有其各自适宜的 pH 值范围和最适 pH 值。只有在适宜 pH 范围内, 酶才能显示其催化活性, 在最适 pH 条件下酶催化反应速度才能达到最大。pH 影响酶催化作用, 主要是由于在不同 pH 值条件下, 酶分子和底物分子中基团的解离状态发生改变, 从而影响酶分子的构象以及酶和底物的结合能力和催化能力。而在极端 pH 值条件下, 酶分子的空间结构发生改变, 从而引起酶的变形失活。因此通过实验找到蛋白酶催化反应的最适 pH 有着非常重要的意义。

实验分别配制不同 pH (4、5、6、7、8) 的 1% 酪蛋白溶液, 添加到酶液中, 并测定相应的酶活力, 其结果如图 5 所示。

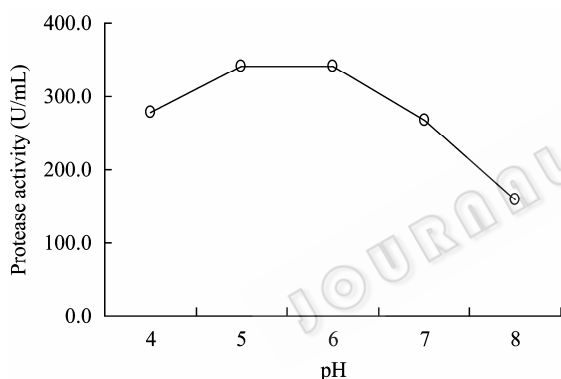


图 5 pH 对蛋白酶活力的影响

Fig. 5 Effect of different pH on protease activity of *Bacillus licheniformis*

由图 5 可知, 当反应液 pH 为 4 时, 蛋白酶活力为 278 U/mL。pH 为 5-6 时, 蛋白酶催化活力达到最高值(341 U/mL)。进一步增大反应液 pH 后, 蛋白酶活力显著下降, 说明酶分子渐渐被破坏。上述结果表明, 地衣芽孢杆菌所产蛋白酶最适催化 pH 为 5-6。

**2.5.2 催化温度对蛋白酶活力的影响:** 每种酶都有其最适宜的温度范围和最适温度, 在最适温度条件下, 酶的催化反应速度达到最大。蛋白酶是一种生物大分子, 其化学本质为蛋白质。当催化反应温度过高, 酶分子会变性而丧失活性。因此, 确定出蛋白酶的最适催化温度对于蛋白酶的应用非常有必要。

将纯化后的稀释酶液分别在 35°C、40°C、45°C、

50°C、55°C、60°C、65°C 和 70°C 条件下与酪蛋白反应, 测定相应的酶活力, 结果如图 6 所示。当催化温度为 35°C, 蛋白酶活力只有 185 U/mL。随着催化温度的升高, 蛋白酶活力显著增大。当催化温度为 55°C 时, 蛋白酶活力达到最大值(882 U/mL), 比 35°C 时的酶活性提高了 3.77 倍。随着催化温度的进一步增加, 蛋白酶活力逐渐下降, 特别是反应温度超过 65°C 后, 蛋白酶活性显著降低, 这说明酶分子开始变性。所以蛋白酶的最适催化温度为 55°C。

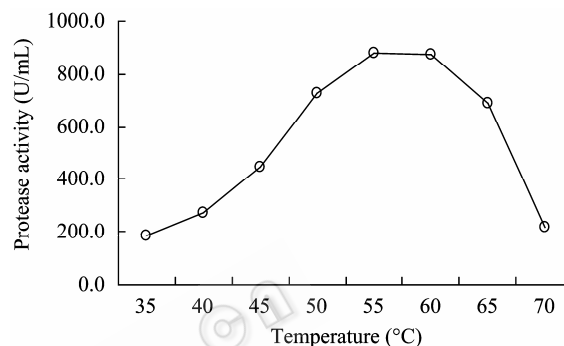


图 6 催化温度对蛋白酶活力的影响

Fig. 6 Effect of different temperature on protease activity of *Bacillus licheniformis*

**2.5.3 有机溶剂对蛋白酶活力的影响:** 在有机溶剂中, 酶分子的结构和功能与其在水溶液中相比有很大的差异。通常有机溶剂对酶类有抑制剂作用, 但也有一些报道认为, 有机溶剂可能影响酶构象, 从而改变酶对目标底物反应的活性。因而研究有机溶剂对酶活性的影响, 可以为蛋白酶的广泛使用提供参考。

将稀释酶液按 1:1 体积比分别与一定浓度的甲醇和乙醇溶液充分混合, 最终有机溶剂的浓度(体积比)分别为 0% (去离子水)、5%、10%、15%、20% 和 25%。将上述混合液置于 37°C 水浴锅中充分作用 1 h, 最后检测蛋白酶活性, 结果如图 7 所示。

由图 7 可知, 在没有有机溶剂存在时, 蛋白酶活力为 251 U/mL。当乙醇浓度为 5% 时, 蛋白酶活力达到最大值 429 U/mL, 比对照组提高了 70.9%。初志战<sup>[13]</sup>等人也报道将木瓜蛋白酶置于 10% 乙醇溶液后, 其水解酪蛋白的活性有显著上升。随着乙醇浓度的增大, 蛋白酶活力逐渐下降, 但其活性仍高于对照组。当乙醇浓度超过 25% 后, 则蛋白酶活力比对照组小。对甲醇而言, 随着浓度的增加, 蛋白酶活力渐渐升高, 在浓度达到 10% 时, 蛋白酶活力达

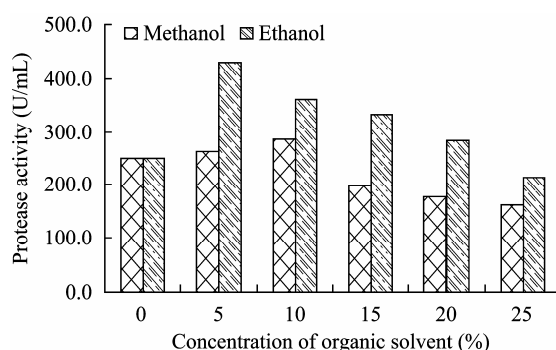


图7 有机溶剂对蛋白酶活力的影响

Fig. 7 Effect of organic solvent on protease activity of *Bacillus licheniformis*

到最大值 285 U/mL, 比对照组提高了 13.55%。进一步加大甲醇浓度后, 则蛋白酶活力明显下降。上述结果表明, 低浓度的乙醇和甲醇对酶活性有明显促进作用, 其中乙醇对酶活性增效作用更明显。而高浓度的有机溶剂对酶活性明显有抑制作用, 分析原因可能是在高浓度有机溶剂中, 酶分子构象可能发生改变, 进而影响其对底物的亲和力和活性。有关有机溶剂种类、浓度及其它因素与蛋白酶分子的构效关系还需进一步深入研究。

**2.5.4 金属离子对蛋白酶活力的影响:** 几乎 1/3 的酶催化活性需要金属离子。金属离子可以通过多种途径参加催化过程, 如通过结合底物为反应定向, 以及通过可逆的改变金属离子的氧化态调节氧化还原反应。金属离子的催化作用往往和酸催化作用相似, 有些金属离子不止带一个正电荷, 作用比质子要强。在中性 pH 溶液中,  $H^+$  的浓度很低, 但金属离子却非常容易维持一定浓度, 从而赋予酶稳定的催化活性。因此, 考察不同金属离子对蛋白酶活性的影响, 对酶的广泛应用至关重要。

本实验考察了 1 价、2 价、3 价及重金属离子对蛋白酶活性的影响。将浓度为 50 mmol/L 的 KCl、NaCl、ZnSO<sub>4</sub>、CuSO<sub>4</sub>、HgCl<sub>2</sub>、Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 和 Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 溶液与酶液按 1:9 体积比充分混合, 使金属离子在酶液中的终浓度为 5 mmol/L。将上述混合液置于 37°C 水浴锅中充分作用 1 h, 最后检测蛋白酶活性, 结果如图 8 所示。

由图 8 可知, K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>对酶有明显的促进作用, 其酶活性分别比对照组提高了 30.94%、13.92%和 42.54%。其它金属离子对酶均有钝化作用,

特别是 2 价铜离子、3 价铁和铝离子、以及重金属汞和铅离子, 几乎使酶彻底失活, 其中尤以 Hg<sup>2+</sup>对蛋白酶的钝化作用最强。经过 Hg<sup>2+</sup>作用后, 蛋白酶彻底失活。

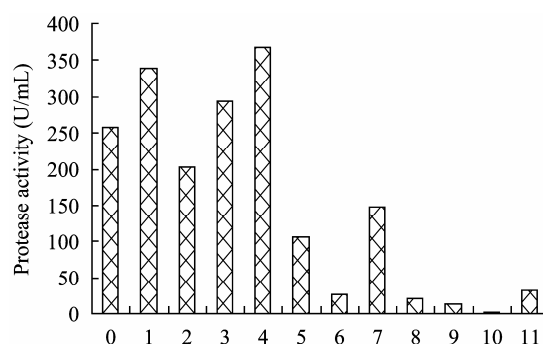


图8 金属离子对蛋白酶活力的影响

Fig. 8 Effect of metal ions on protease activity of *Bacillus licheniformis*

Note: 0: Control; 1: K<sup>+</sup>; 2: Na<sup>+</sup>; 3: Ca<sup>2+</sup>; 4: Mg<sup>2+</sup>; 5: Fe<sup>2+</sup>; 6: Cu<sup>2+</sup>; 7: Zn<sup>2+</sup>; 8: Al<sup>3+</sup>; 9: Fe<sup>3+</sup>; 10: Hg<sup>2+</sup>; 11: Pb<sup>2+</sup>.

**2.5.5 蛋白酶的催化动力学测定结果:** 酶催化反应动力学一般以 Michaelis-Menten 方程表示, 即  $v = V_{\max}[S]/(K_m + [S])$ 。式中[S]代表底物浓度,  $K_m$  值是当酶促反应速率达到最大反应速率一半时的底物浓度, 它是酶的特征常数, 可以通过  $K_m$  值来鉴别酶的种类。

将 1 mL 酶液在最适催化条件下与不同浓度的酪蛋白(0.5、2.5、5、7.5、10、12.5、15 mg/mL)反应, 并测定蛋白酶催化反应速度, 以底物浓度倒数为横坐标, 以反应速度倒数为纵坐标, 所得结果如图 9 所示。

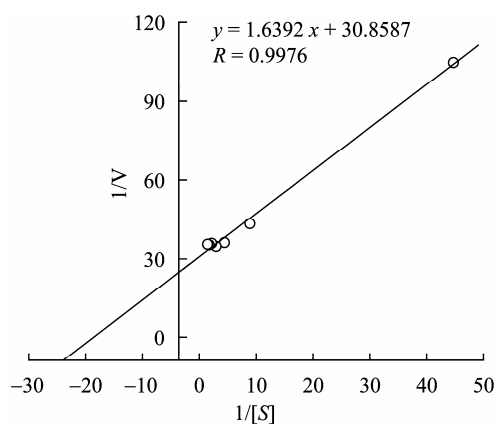


图9 蛋白酶催化动力学曲线

Fig. 9 Lineweaver-Burk plot for  $K_m$  and  $V_{\max}$  values of protease in the presence of different concentrations of casein

由图 9 可知, 双倒数图呈直线, 回归方程拟合度很好, 所以蛋白酶对酪蛋白的催化降解反应遵循米氏动力学方程。根据回归方程  $y = 1.6392x + 30.8587$  可知, 将  $x = 0$  带入方程, 可以算出  $1/V_{\max} = 30.8587$ , 所以蛋白酶的最大催化速度  $V_{\max} = 0.0324 \mu\text{mol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$ 。将  $y = 0$  带入方程, 可以算出  $-(1/K_m) = -18.8255$ , 所以蛋白酶的米氏常数  $K_m = 0.0531 \text{ mmol/L}$ 。

### 3 结论

(1) 控制培养基相对湿度为 125%, 并添加 10% (wt)乳糖和 5% (wt)蛋白胨, 在此条件下于 30℃ 恒温发酵 3 d, 地衣芽孢杆菌产蛋白酶达到最大值, 为 7465 U/g。发酵产生的蛋白酶分别经过提取、盐析、透析和浓缩, 最终酶活力达到 270652 U/mL。

(2) 酶学性质研究结果表明, 蛋白酶的最适催化温度为 55℃, 最适作用 pH 值为 5–6, 最大催化速度  $V_{\max}$  为  $0.0324 \mu\text{mol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$ , 米氏常数  $K_m$  为  $0.0531 \text{ mmol/L}$ 。有机溶剂对酶活有明显促进作用, 5% (V/V)乙醇可以使酶活力提高 70.9%, 10% (V/V)甲醇可以使酶活力提高 13.55%。 $\text{Mg}^{2+}$ 可以使蛋白酶活力提高 42.54%, 而  $\text{Hg}^{2+}$ 使酶彻底失活。

(3) 本文研究结果表明, 固态发酵麻疯树饼粕生产蛋白酶在技术上是可行的, 采用地衣芽孢杆菌发酵产酶的效果较好, 酶活力和酶的适用性都比较高。伴随麻疯树生物柴油的批量生产, 越来越多的废气饼粕会产生。由于蛋白酶应用广泛, 市场需求量大, 所以利用麻疯树废弃饼粕产蛋白酶是一个不错的选择, 其不但可以提高麻疯树资源的综合利用效率, 间接降低麻疯树生物柴油的生产成本, 而且还可以在在一定程度上减少了由于废弃饼粕任意排放而造成的环境污染。

### 参 考 文 献

- [1] 林娟, 周选围, 唐克轩, 等. 麻疯树植物资源研究概况. 热带亚热带植物学报, 2004, **12**(3): 285–290.
- [2] Akintayo ET. Characteristics and composition of *Parkia biglobbossa* and *Jatropha curcas* oils and cakes. *Biore-source Technology*, 2004(92): 307–310.
- [3] 闵恩泽, 姚志龙. 近年生物柴油产业的发展——特色、困境和对策. 化学进展, 2007, **19**(8): 1050–1059.
- [4] Makkar HPS, Aderibigbe AO, Becker K. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, **62**(2): 207–215.
- [5] Herrera JM, Siddhuraju P, Becker K. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *Food Chemistry*, 2006(96): 80–89.
- [6] 吴远根, 吴兴娅, 吴洁, 等. 固态发酵麻疯树饼粕产蛋白酶的研究. 中国酿造, 2009, **204**(3): 27–30.
- [7] 赵丛, 张敏, 王建玲, 等. 枯草芽孢杆菌 ZC-7 中性蛋白酶的分离纯化及酶学性质研究. 中国生物工程杂志, 2007, **27**(10): 28–33.
- [8] Battan B, Sharma J, Kuhad RC. High-level xylanase production by alkaliphilic *Bacillus pumilus* ASH under solid-state fermentation. *World Journal of Microbiological Biotechnology*, 2006(22): 1281–1287.
- [9] Gianni P, Pierre G, Lisbeth O. Production and partial characterization of arabinoxylan-degrading enzymes by *Penicillium brasilianum* under solid-state fermentation. *Applied Microbiological Biotechnology*, 2006(72): 1117–1124.
- [10] 章海锋, 阮晖, 刘婧, 等. 地衣芽孢杆菌 ZJUEL31410 产胞外弹性蛋白酶的分批发酵研究. 中国食品学报, 2009, **9**(1): 130–136.
- [11] Chellappan S, Jasmin C, Basheer SM, et al. Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 2006, **41**(4): 956–961.
- [12] Mahanta N, Gupta A, Khare SK. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresource Technology*, 2008, **99**(6): 1729–1735.
- [13] 初志战, 黄卓烈, 巫光宏, 等. 乙醇溶液对木瓜蛋白酶催化活性的影响. 热带亚热带植物学报, 2005, **13**(4): 329–312.