

# 弹性蛋白酶发酵过程中发酵液紫外吸收光谱的研究

杨天佑<sup>1,2</sup>, 罗江卫<sup>1</sup>, 刘仁明<sup>1</sup>, 李宗伟<sup>1</sup>, 李宗义<sup>1</sup>, 秦广雍<sup>1\*</sup>, 霍裕平<sup>1</sup>

1. 郑州大学河南省离子束生物工程重点实验室, 河南 郑州 450052  
2. 河南科技学院生命科技学院, 河南 新乡 453003

**摘要** 研究了弹性蛋白酶发酵过程中发酵液紫外吸收光谱的变化, 分析比较了发酵液吸收光谱的变化与细菌生长以及发酵产酶过程之间的联系。结果表明, 弹性蛋白酶发酵液紫外吸收光谱的变化与菌体生长以及弹性蛋白产酶过程存在密切联系。紫外吸收光谱技术可以用于检测发酵液中有有机氮源消耗以及弹性蛋白酶的动态变化, 研究为检测弹性蛋白酶发酵的动态过程提供一种比较新颖的方法, 为建立紫外光谱技术在线检测发酵过程奠定了基础。

**关键词** 吸收光谱; 发酵液; 弹性蛋白酶

中图分类号: O433.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-0593(2007)09-1780-04

## 引言

发酵液中各种营养物质的浓度, 特别是碳氮比, 会直接影响菌体的生长和代谢产物的积累<sup>[1]</sup>。在线检测发酵液各组分浓度变化对了解菌体的生长规律和优化生产过程极为重要。但由于发酵液组成复杂、具有生物活性、各组分含量不断变化、发酵过程需保持无菌等特点造成在线检测发酵液比较困难, 目前多使用操作繁琐的离线检测分析<sup>[2]</sup>。近几年, 随着检测仪器的精密化和数据处理技术的迅速发展, 发酵过程在线检测的研究逐渐深入, 一些新兴的检测技术应运而生, 如红外光谱技术<sup>[3]</sup>、荧光分析法、离子敏场效应晶体管技术、核磁共振技术、生物传感器技术<sup>[4]</sup>、质谱分析技术、色谱分析技术等。这些检测手段都具有自身的优点, 在不同程度上都能反映发酵过程的变化信息, 但也都有自身的局限性, 不能完全反映发酵的动态过程, 发酵动态过程的检测还有待各种检测技术的深入研究、相互渗透合作以及新技术的研究开发<sup>[5]</sup>。

弹性蛋白酶发酵中所用原料主要包括碳源(葡萄糖)、氮源(包括豆饼粉和酵母粉)等, 其中豆饼粉的主要成分为蛋白质。发酵过程中微生物不断消耗原料, 同时释放弹性蛋白酶, 发酵液中蛋白质组分的组成和含量在不断发生改变<sup>[6,7]</sup>。组成蛋白质氨基酸的芳香族氨基酸, 如苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸, 都含有苯环共轭 $\pi$ 键系统, 在紫外区都有光吸收能

力<sup>[8,9]</sup>。因此, 检测发酵液的紫外光谱变化有助于掌握发酵液中有有机氮源消耗以及弹性蛋白酶的动态变化<sup>[10]</sup>。本文研究了弹性蛋白酶发酵过程中发酵液紫外吸收光谱的变化, 及其与菌体生长以及产酶过程之间的联系, 旨在为检测弹性蛋白酶发酵的动态过程提供一种方便快捷的新型检测方法, 为今后建立紫外吸收光谱技术在线检测发酵过程奠定基础。

## 1 实验材料

### 1.1 产酶菌株及培养基

产酶菌株为芽孢杆菌 *Bacillus* sp. EA9(本实验室筛选获得)。

种子培养基(/L): 牛肉膏 4 g、蛋白胨 6 g、酵母膏 2 g、NaCl 5 g, pH 7.0。

发酵培养基(/L): 葡萄糖 20 g、酵母提取物 15 g、豆饼粉 1 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g、MgSO<sub>4</sub> 2 g pH 7.0。

### 1.2 试剂

1% 刚果红-弹性蛋白悬液、0.2 mol·L<sup>-1</sup> 硼酸缓冲液(pH 7.4)、0.7 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液(pH 6.0)、双蒸水。

### 1.3 仪器

TU-1901 分光光度计(北京普析), Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司), 低温超速离心机(美国 BECKMAN COULTER), 无菌操作台(安泰公司), 水浴振荡器。

收稿日期: 2006-05-16, 修订日期: 2006-08-26

基金项目: 国家“973”课题项目(2004CB719604)资助

作者简介: 杨天佑, 1978年生, 郑州大学河南省离子束生物工程重点实验室博士研究生, e-mail: yangtianyout2004@163.com \* 通讯联系人

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

## 2 实验方法

### 2.1 发酵液的获得

将斜面菌种接入种子培养基, 37 °C, 250 r·min<sup>-1</sup>培养 8 h, 然后以 4% 的接种量转入发酵培养基中 37 °C, 250 r·min<sup>-1</sup>培养 56 h, 每隔 4 h 取 2 mL 发酵液进行以下研究。

### 2.2 弹性蛋白酶发酵液紫外吸收光谱的测定

取适量发酵液, 4 °C, 8 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min, 取上清, 双蒸水稀释 30 倍进行紫外光谱扫描, 其参比为双蒸水。分光光度计参数设定: 中速扫描, 扫描范围 220~320 nm, 采样间隔 1 nm, 光谱带宽 0.1 nm。

### 2.3 弹性蛋白酶活性测定方法

采用 Sachar<sup>[11,12]</sup>法加以改进, 将 1 mL 适当稀释的上清与 1 mL 的 1% 刚果红弹性蛋白悬液加入 1 mL pH 7.4 的 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 硼酸缓冲液中, 55 °C 水浴振荡反应 1 h。然后

以 2 mL pH 6.0 的 0.7 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液终止反应, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 2 min, 取上清于 495 nm 处测定 OD 值。相同条件下测定的单位体积发酵液弹性蛋白酶相对酶活反映了发酵液中弹性蛋白酶的含量。

### 2.4 发酵过程中菌体浓度的测定<sup>[13]</sup>

取培养不同时间的发酵液加双蒸水稀释 20 倍, 以同样稀释 20 倍没有接种的培养基为空白对照, 600 nm 测定 OD 值, 以 OD 值表示菌体浓度的大小。

## 3 实验结果

### 3.1 弹性蛋白酶发酵过程中发酵液紫外吸收光谱的变化

弹性蛋白酶发酵 56 h 内发酵液在 220~320 nm 紫外吸收光谱的变化情况见图 1; 发酵液紫外吸收的波峰位置( $\lambda_{max}$ )以及吸收强度(Abs)见表 1。

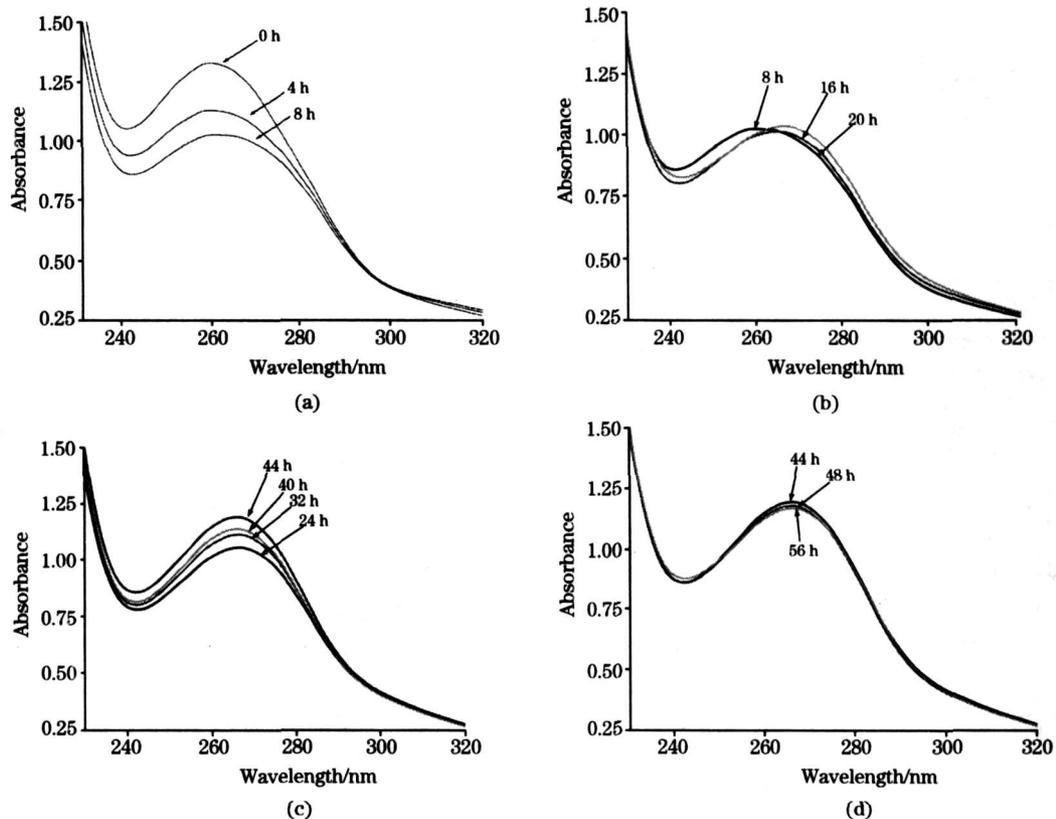


Fig 1 The changes of fermentation liquid's absorption spectra in fermentation

Respectively show the fermentation liquid's absorption spectra in

(a): 0, 4, 8 h; (b): 8, 16, 20 h; (c): 24, 32, 40, 44 h; (d): 44, 48, 56 h four fermenting phases

图 1 中(a)为发酵 0, 4, 8 h 时发酵液的紫外吸收情况。结合表 1 所示可以看出: 发酵前 8 h, 发酵液紫外吸收的  $\lambda_{max}$  在 259 nm 左右没有变化, 只是其吸收强度显著下降, Abs 由 1.329 降为 1.026, 说明了发酵前 8 h 内发酵液中没有新物质

成分的生成, 只是原有组分的消耗。图 1 中(b)为发酵 8, 16, 20 h 时发酵液的紫外吸收光谱结合表 1 可以看出发酵液紫外吸收的  $\lambda_{max}$  由 260 nm 位移至 267 nm, 其吸收峰的位置红移了 7 nm 左右, 说明了在该发酵时间内发酵液中的氨基酸,

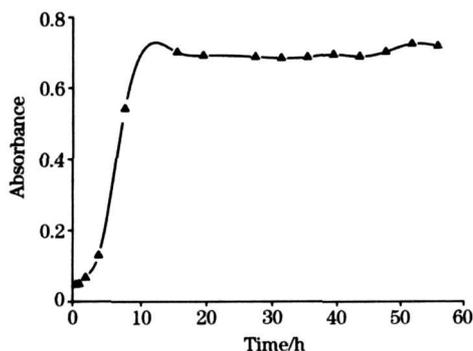
特别是芳香族氨基酸如色氨酸和酪氨酸的组成以及含量发生变化, 可能有新物质的产生。图 1 中 (c) 为发酵 24, 32, 40, 44 h 时发酵液的紫外吸收情况, 可以看出在发酵 20~44 h, 发酵液紫外吸收的  $\lambda_{\max}$  稳定在 266 nm 左右, 其吸收强度在逐渐上升, 如表 1 所示, Abs 由 1.038 升为 1.195, 说明了发酵产生的新物质的含量在不断升高。图 1 中 (d) 为发酵末期 44, 48, 56 h 时发酵液的紫外吸收变化情况, 结合表 1 可以看出发酵液紫外吸收的  $\lambda_{\max}$  虽然没变, 但是其吸收强度却有所下降, 可能是新物质的含量降低造成的。

**Table 1** The  $\lambda_{\max}$  and absorption intensity of fermentation liquid at different fermenting times

发酵时间/h	峰位/ $\lambda_{\max}$ (nm)	吸收强度(Abs)
0	259	1.329
4	259	1.129
8	260	1.026
12	263	1.014
16	265	1.016
20	267	1.038
24	267	1.060
28	266	1.056
32	266	1.118
36	266	1.134
40	266	1.142
44	266	1.195
48	266	1.179
56	267	1.168

### 3.2 弹性蛋白酶发酵中菌体浓度以及产酶量的变化

弹性蛋白酶发酵 56 h 内菌体浓度的变化见图 2。

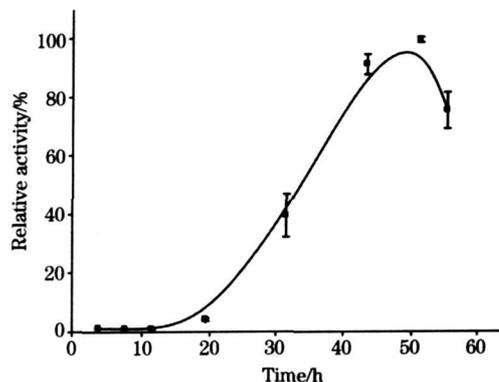


**Fig 2** The changes of cell's concentration in fermentation

由图 2 可以看出, 2~10 h 为细菌生长的指数期。该时期细胞生长速率最大、酶系活跃、代谢旺盛, 发酵液中的各营养成分消耗较为显著<sup>[8]</sup>, 发酵液中各种营养物质的浓度, 特别是碳氮比都将发生显著改变, 其中有机氮源物质豆饼粉的含量以及所占比例的变化将会影响其紫外吸收光谱。

弹性蛋白酶发酵过程中发酵液相对酶活的变化, 见图 3。发酵前 12 h 主要为细菌生长阶段(见图 2), 基本不产生弹性蛋白酶。图 3 显示, 弹性蛋白酶发酵 0~12 h 发酵液的相对酶活几乎为 0; 发酵 20 h 时开始检测到发酵液中存在弹

性蛋白酶, 但相对酶活较低; 在发酵 20~44 h 内, 弹性蛋白酶的酶活迅速增加, 说明发酵液中弹性蛋白酶的浓度迅速上升。发酵的最后阶段 44~56 h 内, 所检测到发酵液的相对酶活降低了, 可能是由于发酵末期弹性蛋白酶产量降低以及部分降解所致。



**Fig 3** The changes of elastase's relative activity in fermentation

## 4 分析与讨论

结合菌体生长以及发酵产酶过程, 可以看出弹性蛋白酶发酵过程中发酵液紫外吸收光谱呈现以上变化的原因。

(1) 0~8 h 内发酵液紫外吸收的波峰位置基本没有变化, 只是其吸收强度显著下降, 是由于该时间段为细菌生长处于指数期, 细胞代谢旺盛, 大量消耗发酵液中各营养成分, 导致氮源物质豆饼粉的含量显著降低, 所以发酵液的紫外吸收强度显著下降<sup>[14]</sup>。

(2) 发酵 8~20 h 内发酵液紫外吸收的波峰位置发生了位移, 是由于该时间段发酵产生了新物质弹性蛋白酶, 新蛋白的产生使得发酵液中氨基酸的组成和结构发生了改变, 特别是芳香族氨基酸如色氨酸和酪氨酸的含量发生变化导致了发酵液紫外吸收光谱发生了改变<sup>[15]</sup>。

(3) 发酵 20~44 h 时发酵液紫外吸收强度显著升高, 因为该时间段刚好是发酵液酶活迅速增加的时期, 发酵液中弹性蛋白酶含量不断增加导致了紫外吸收强度的逐渐升高。

(4) 发酵末期, 由于部分弹性蛋白酶的降解致使发酵液紫外吸收强度下降, 因此, 为了酶的高产高收, 发酵时间至 44~52 h 应即时停止发酵, 分离提取产物酶。

## 5 结束语

本研究为利用紫外吸收光谱技术检测发酵过程提供了新思路, 为检测生物酶发酵过程提供一种方便快捷的新手段。该研究目前还处于摇瓶阶段的离线检测状态, 但是, 结合当今发酵液组分在线检测的研究, 只要连续自动地从发酵罐中取出发酵液样品, 经过一个过滤或渗析装置除去菌体, 然后经过一个紫外光谱检测系统就可以对样品实现非原位在线检测分析, 目前的研究为紫外吸收光谱技术在线检测发酵过程提供了依据。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] LI Zong-yi(李宗义). Industrial Microbiology(工业微生物学). Beijing: China Science Technology Press(北京: 中国科学技术出版社), 2000, 233.
- [ 2 ] JIAN Hua-li, WU Zhen-qiang, LIANG Shi-zhong(蹇华丽, 吴振强, 梁世中). Letters in Biotechnology(生物技术通讯), 2001, 12(1): 75.
- [ 3 ] QIU Jiang, PAN Hong-chun, HAN Chong-jia, et al(邱江, 潘红春, 韩崇家, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1999, 19(6): 831.
- [ 4 ] WANG Jing-yan, ZHU Sheng-geng, XU Chang-fa(王镜岩, 朱圣庚, 徐长法). Biochemistry 3rd ed(生物化学·第3版). Beijing: Higher Education Press(北京: 高等教育出版社), 2002. 145.
- [ 5 ] WANG Le-xin, ZHAO Zhi-min, YAO Hong-bing, et al(王乐新, 赵志敏, 姚红兵, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(6): 980.
- [ 6 ] GE Xiang-hong, ZHAO Yuan-li, ZHANG Feng-qiu, et al(葛向红, 赵元黎, 张凤秋, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(7): 841.
- [ 7 ] Sachar L A. Proc. Soc. Expeti. Biol. Med., 1955, 90: 323.
- [ 8 ] CHEN Qi-he, HE Guo-qing, WU Ying-long(陈启和, 何国庆, 邬应龙). Journal of Zhejiang University(Agriculture and Life Sci.)(浙江大学学报·农业和生命科学), 2003, 29(1): 59.
- [ 9 ] ZHAO Yuan-li, ZHANG Feng-qiu, GE Xiang-hong, et al(赵元黎, 张凤秋, 葛向红, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(8): 907.
- [ 10 ] YANG Hai-lin, LÜ Xia-fu, WANG Long-gang, et al(杨海麟, 吕霞付, 王龙刚, 等). China Condiment(中国调味品), 2003, (10): 16.
- [ 11 ] GAO Chang, GAO Shu-xian, LI Hua, et al(高畅, 高树贤, 李华, 等). Sino-Overseas Grapevine and Wine(中外葡萄与葡萄酒), 2002, (5): 56.
- [ 12 ] WANG Li-min, CHEN Lin-hai, WANG Yan-ping, et al(王利敏, 陈林海, 王雁萍, 等). Journal of Henan Agricultural Sciences(河南农业科学), 2006, (6): 43.
- [ 13 ] CHEN Qi-he, HE Guo-qing, WU Ying-long(陈启和, 何国庆, 邬应龙). Journal of Zhejiang University(Agriculture and Life Sci.), 2003, 29(1): 59.
- [ 14 ] YAN Zi-ying, WU Guo-xiong, ZHANG Wei-qin, et al(颜子颖, 吴国雄, 张维钦, 等). Acta Microbiologica Sinica(微生物学报), 1995, 35(1): 50.
- [ 15 ] CHEN Shuang-xi, ZHOU Qian, GUO Yuan-qi, et al(陈双喜, 周潜, 郭元圻, 等). Journal of East China University of Science and Technology(Natural Science Edition)(华东理工大学学报·自然科学版), 2006, 32(1): 28.

## The Study of Fermentation Liquid's Absorption Spectra in Elastase Fermentation

YANG Tian-you<sup>1,2</sup>, LUO Jiang-wei<sup>1</sup>, LIU Ren-ming<sup>1</sup>, LI Zong-wei<sup>1</sup>, LI Zong-yi<sup>1</sup>, QING Guang-yong<sup>1\*</sup>, HUO Yan-ping<sup>1</sup>

1. Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. Life Science and Technology College, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China

**Abstract** The present article studied the fermentation liquid's absorption spectra, bacteria growth period and elastase<sup>2</sup> production in elastase fermentation, and compared and analyzed the their relation. The results show that the changes in the absorption spectra were closely related with bacteria growth and elastase<sup>2</sup> production. The UV spectroscopic technique is helpful for detecting the change of the organic nitrogen base and enzyme. The study offers a new method to detect fermentation process and is basic for detecting fermentation process on line by UV spectroscopic technique.

**Keywords** Absorption spectrum; Fermentation liquid; Elastase

(Received May 16, 2006; accepted Aug. 26, 2006)

\* Corresponding author