

# 压力脉动固态发酵微生物蛋白质及机理的研究

付小果<sup>1,2</sup> 陈洪章<sup>2\*</sup>, 李宏强<sup>2</sup>, 马润宇<sup>1</sup>

(1. 北京化工大学可控化学反应科学与技术基础教育部重点实验室, 北京 100029;

2. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

**摘要:** 研究了固态发酵微生物蛋白质的提取和纯化条件, 以及压力脉动对固态发酵微生物蛋白质的影响, 初步探讨了压力脉动固态发酵的作用机理。结果表明, 在发酵后的酶曲中, 加入 Tris-HCl 提取液, 得到的胞内蛋白质的量较多, FPA 酶活与 CMCase 酶活回收率分别为 83.6% 与 67%, 纯化效果较好。从压力脉动外界周期刺激固态发酵干酶曲中提取的蛋白质与从未加周期刺激的微生物中提取的相比, 胞内蛋白质的质量提高了 34.63%, FPA 酶活降低了 22.22%, CMCase 酶活降低了 38.65%, 而胞外蛋白质的质量、FPA 酶活和 CMCase 酶活分别提高了 17.75%、60.08% 和 21.17%。压力脉动固态发酵 5d 的微生物胞外蛋白质的酶活, 与静态固态发酵 6d 的相当, 发酵周期缩短。压力脉动外界周期刺激使蛋白质组分有所变化, 减少了分子量约为 80400 的组分, 但增加了分子量约为 28520 的组分。

**关键词:** 压力脉动; 固态发酵微生物; 蛋白质

**中图分类号:** TQ93

固态发酵是一种古老的发酵方式。对固态发酵的研究<sup>[1]</sup>, 主要集中在发酵反应器的改进、发酵微生物的生长代谢以及发酵过程的参数控制这几个方面, 但是从分子水平探讨固态发酵微生物的作用机理的研究还未见报道。

基于改进固态发酵技术的压力脉动固态发酵反应器, 通过反应器内空气的压力脉动改善了发酵过程中的传热和传质, 使固态发酵技术进入一个新的阶段。该反应器中空气的脉动使微生物的外界环境形成了一个复杂的周期刺激源, 对微生物的生长和代谢等方面产生了积极影响<sup>[2]</sup>。在本文中, 成分复杂的固态发酵微生物里的蛋白质被提取和纯化, 从分子水平研究了压力脉动对固态发酵微生物蛋白质的影响。建立了固态发酵微生物蛋白质的提取和纯化方法, 进而对压力脉动固态发酵分子作用机理进行初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

将绿色木霉 号移接在 10% 麸皮的斜面<sup>[3]</sup>。

种子液为 Mandels 盐<sup>[3]</sup>, 含 1% 麸皮和 0.15% 蛋白胨。30℃, 150 r/min 培养 2 d。

固态发酵培养基含 4 g 汽爆麦草<sup>[4]</sup>、1 g 麸皮和 12.5 mL 液体营养盐 (1.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.6% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 和 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)。121℃ 下灭菌 30 min。接种 3 mL 种子液, 拌匀, 分别在 30℃ 恒温培养箱中常规静态固态发酵和反应器中压力脉动周期刺激固态发酵<sup>[5]</sup>。

### 1.2 实验方法

**胞外蛋白质的提取** 参照文献<sup>[6]</sup>。

**胞内蛋白质的提取** 将提取胞外蛋白质后过滤得到的酶曲放入研钵, 加入适量的液氮, 研磨成细粉末; 加入一定体积的提取缓冲液, 在冰浴条件下继续研磨, 匀浆。4℃, 10000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 4℃ 下保存, 备用。

**纤维素酶活测定** 将提取得到的上清液稀释适当倍数, 按工业微生物手册<sup>[7]</sup>测定滤纸酶活 (FPA 酶活) 与羧甲基纤维素酶活 (CMCase 酶活)。

**蛋白质纯化** 上清液中加入不同体积的丙酮, 在 -20℃ 沉淀一定时间。升温至 4℃, 10000 r/min

收稿日期: 2005-09-25

基金项目: 国家“973”计划 (2004CB719700); 中国科学院知识创新工程重点方向性项目 (KJ CX2-SW-206); 国家“863”计划 (2003AA514203)

第一作者: 女, 1978 年生, 硕士生

\*通讯联系人

E-mail: hzchen@home.ipe.ac.cn

离心 20 min, 除去上清液。用适量的缓冲液溶解沉淀, 在  $-20^{\circ}\text{C}$  下保存, 备用。

蛋白质的浓度测定按 Bradford 的方法<sup>[8]</sup>进行, 用牛血清白蛋白做标准曲线。

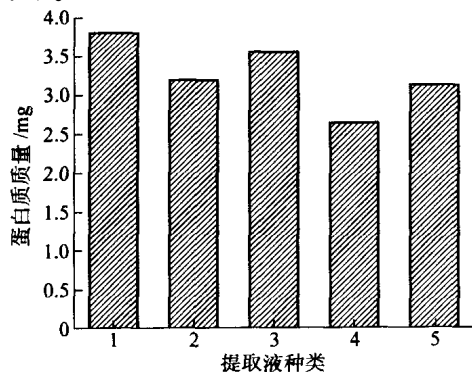
蛋白质的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳 (SDS-PAGE) 按 Marshak 的方法<sup>[9]</sup>进行, 分离胶质量分数 ( $T$ ) 为 12%, 交联度 ( $C$ ) 为 2.6%, 浓缩胶  $T$  为 4%,  $C$  为 2.6%。用考马斯亮蓝 R250 对凝胶进行染色。用高甲醇脱色液 (含 7.5% 冰醋酸和 45.4% 甲醇) 脱色 2~3 h, 至大部分蓝色褪尽后, 再用低甲醇脱色液 (含 7.5% 冰醋酸和 5% 甲醇) 脱色 4~6 h 或过夜, 使之完全脱色。

## 2 结果与讨论

### 2.1 胞内蛋白质的提取

#### 2.1.1 不同种类提取液对胞内蛋白质提取的影响

从同一批发酵的酶曲, 分别取相同的质量, 加入不同种类但体积相同的提取液, 研磨提取胞内蛋白质。离心, 取上清液测定蛋白质质量浓度, 比较不同提取液从单位质量干酶曲中提取得到的蛋白质的质量 (见图 1)。



1—0.1 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液, 0.15 mol/L 氯化钠, 5 mmol/L EDTA, 2%  $\beta$ -巯基乙醇; 2—0.1 mol/L pH 6.4 磷酸盐缓冲液; 3—0.1 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液; 4—0.2 mol/L pH 4.8 柠檬酸盐缓冲液; 5—0.1 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液, 2%  $\beta$ -巯基乙醇

图 1 不同提取液对胞内蛋白质提取的影响

Fig. 1 Effect of different buffers on intracellular protein extraction

图 1 表明, 用上述几种提取液从单位质量干酶曲提取得到的蛋白质质量, 以加入二胺四乙酸 (EDTA) 以及 Na 盐的弱碱性提取液提取得到的最多 (3.802 mg), 较弱碱性的 pH 7.2 的磷酸盐提取液的 3.556 mg, 提高了 7%; 而较未加 EDTA 与 Na 盐的

Tris-HCl 提取液的 3.122 mg, 提高了 24.98%。提取缓冲液中加入金属离子螯合剂 EDTA, 去除了缓冲液中金属离子的影响; 低浓度的 NaCl, 由于盐溶作用, 有助于蛋白的提取。

2.1.2 不同体积的提取液对胞内蛋白质提取的影响 在 1 g 酶曲中加入不同体积的溶有 EDTA 与钠盐的提取液, 研磨提取胞内蛋白质, 离心, 取上清测定蛋白质质量浓度, 比较不同体积提取液从单位质量干酶曲提取得到的蛋白质质量 (见图 2)。

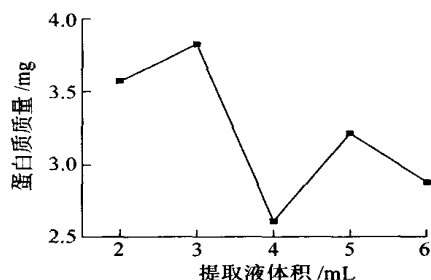


图 2 不同体积提取液对胞内蛋白质提取的影响

Fig. 2 Effect of different volumes of buffer on intracellular protein extraction

从图 2 可知, 提取液的体积不同, 蛋白质的提取率不同。在单位酶曲中, 加入 3 mL 提取液, 可提取得到蛋白质 3.828 mg, 而加入 2 mL 提取液, 只得到蛋白质 3.574 mg, 其他体积所得更低。

### 2.2 蛋白质的纯化

由于固态发酵微生物中不仅有发酵产生的纤维素酶, 而且有成分复杂的固体基质, 因此提取的蛋白质, 是非常不纯的粗蛋白, 不利于蛋白质的定量与定性分析; 另外溶在粗蛋白中的色素等杂质, 使其颜色呈现深褐色, 也不利于电泳等下一步实验的进行。丙酮等有机溶剂在低温下可使多数蛋白质溶解度降低并沉淀析出, 而很多杂质却不能析出, 所以可采用丙酮低温沉淀初步纯化粗蛋白。

2.2.1 丙酮沉淀不同时间对蛋白纯化的影响 从发酵 2 d 的微生物的粗蛋白液体, 取体积相同的 9 份, 加入相同体积倍数的丙酮 (如 5 倍), 在  $-20^{\circ}\text{C}$  分别沉淀 0.5~4.5 h。4  $^{\circ}\text{C}$ , 10000 r/min 离心 20 min, 用与粗蛋白液体同样体积的缓冲液溶解沉淀, 测定纯化后的蛋白质的质量浓度。比较丙酮沉淀不同时间内从单位体积的粗蛋白液体中沉淀析出的蛋白质的质量 (见图 3)。

从图 3 看出, 当沉淀时间为 2 h, 沉淀析出的蛋白质最多 (2.655 mg), 较 2.5 h 提高了 2.6%。

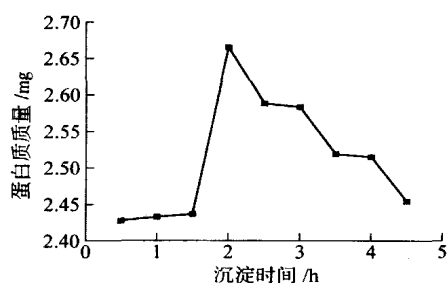


图3 丙酮沉淀不同时间对蛋白纯化的影响

Fig. 3 Effect on protein purification of precipitation with acetone for different periods of time

**2.2.2 不同体积丙酮对蛋白质纯化的影响** 取 8 份体积相同的同一批粗蛋白液体,加入 1~8 倍体积的丙酮,在  $-20^{\circ}\text{C}$  沉淀 2 h。升温至  $4^{\circ}\text{C}$ , 10000 r/min 离心 20 min,去除上清液,用与粗蛋白液体同样体积的缓冲液溶解沉淀,测定纯化后的蛋白质质量浓度。比较不同体积倍数的丙酮从单位体积粗蛋白液体中沉淀析出的蛋白质质量(见图 4)。

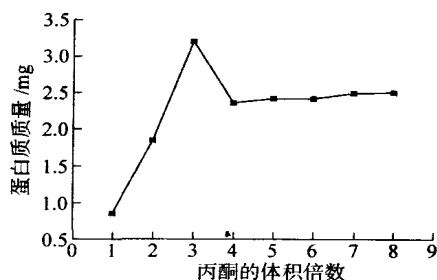


图4 不同体积丙酮对蛋白质纯化的影响

Fig. 4 Effect of different volumes of acetone on protein purification

从图 4 可知,加入 3 倍体积的丙酮,从单位体积粗蛋白液体中沉淀析出的蛋白质质量(3.199 mg),较其它倍数的高。加入 1~2 倍体积的丙酮不能将粗蛋白液体中的蛋白质完全沉淀下来;而加入 4~8 倍体积丙酮,沉淀析出的蛋白质的质量约为 2.360~2.497 mg。

由此得到蛋白质的纯化条件,即:提取的粗蛋白液体加入 3 倍体积的丙酮, $-20^{\circ}\text{C}$  下沉淀 2 h。

**2.2.3 丙酮纯化对纤维素酶活性的影响** 酶的纯化效果,一般以提取的酶的活性的回收率及比酶活性提高的倍数来衡量。

以单位质量干酶曲为原料,提取的胞内粗酶液的 FPA 酶活性为  $0.293\ \mu\text{mol/s}$ ,纯化后为  $0.245\ \mu\text{mol/s}$ ,活性回收率约为 83.6%;而粗酶液的 CMCase 酶活性为  $9.54\ \mu\text{mol/s}$ ,纯化后为  $6.392\ \mu\text{mol/s}$ ,

回收率约为 67%。

从图 5 看出,提取的胞内蛋白质,其 FPA 比酶活性纯化前为  $13.6\ \text{nmol/s}\cdot\text{mg}$ ,丙酮纯化后为  $46.0\ \text{nmol/s}\cdot\text{mg}$ ,纯化倍数为 3.38 倍,而 CMCase 比酶活性纯化前为  $0.44\ \mu\text{mol/s}\cdot\text{mg}$ ,纯化后为  $1.2\ \mu\text{mol/s}\cdot\text{mg}$ ,纯化倍数为 2.73 倍。

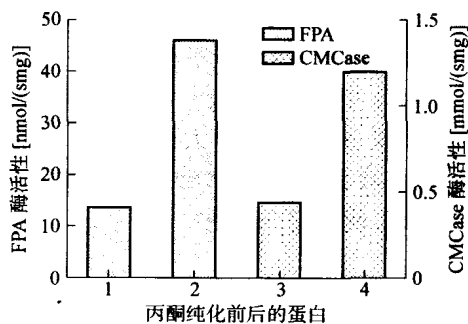


图5 丙酮纯化对酶活性的影响(1、3 为丙酮纯化前蛋白;2、4 为丙酮纯化后蛋白)

Fig. 5 Effect on enzyme activity of protein purification with acetone (1, 3 before purification with acetone; 2, 4 after purification with acetone)

## 2.3 压力脉动周期刺激对固态发酵微生物蛋白质的影响

将静态固态发酵与压力脉动固态发酵所得的微生物以上述蛋白质的提取和纯化条件提取其蛋白质,分别测定蛋白质的质量浓度、FPA 酶活以及 CMCase 酶活。比较两种发酵方式下,在 7 d 的发酵周期内,从单位质量干酶曲提取的蛋白质的质量、FPA 酶活以及 CMCase 酶活,结果如图 6、图 7 和图 8 所示。

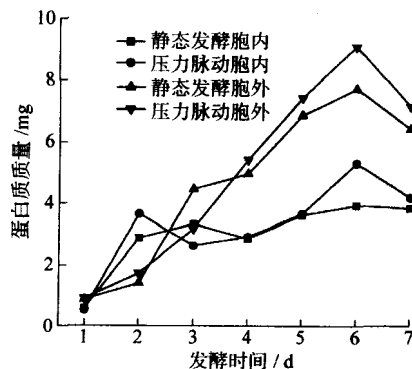


图6 压力脉动周期刺激对固态发酵微生物蛋白质质量的影响

Fig. 6 Effect of periodical dynamic changes of air on protein mass in microorganisms during solid-state fermentation

图 6 表明,从单位质量干酶曲中提取的蛋白质

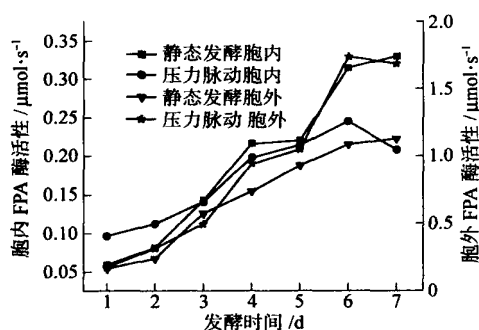


图 7 压力脉动周期刺激对固态发酵微生物 FPA 酶活的影响

Fig. 7 Effect of periodical dynamic changes of air on FPA enzyme activity in microorganisms during solid-state fermentation

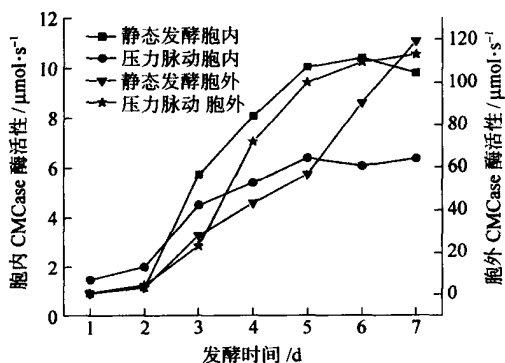


图 8 压力脉动周期刺激对固态发酵微生物 CMCase 酶活的影响

Fig. 8 Effect of periodical dynamic changes of air on in microorganisms during solid-state fermentation

的质量,在 7 d 的发酵周期内,发酵 6 d 的微生物中得到的蛋白量最多。从压力脉动外界周期刺激固态发酵 6 d 的微生物的单位质量干酶曲提取得到的胞内和胞外蛋白质的质量分别为 5.31 和 9.09 mg,比从静态常规发酵 6 d 得到的分别提高了 34.63 % 和 17.75 %,因此压力脉动提高了发酵微生物蛋白质的质量。从压力脉动固态发酵 5 d 的微生物与从静态固态发酵 6 d 的微生物中提取的蛋白质质量相当,压力脉动改善了发酵的条件,缩短了发酵的周期。

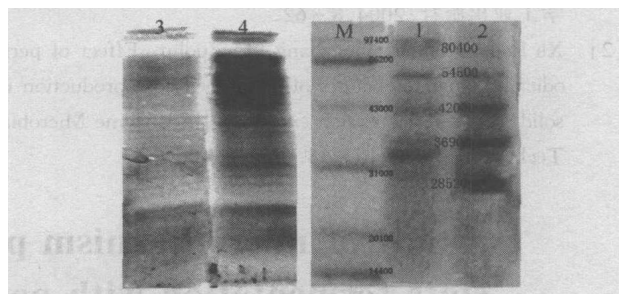
从图 7 和图 8 可以看出,两种发酵方式的酶活的增长趋势基本相同。压力脉动周期刺激使胞外蛋白质酶活较未加刺激的提高,但胞内蛋白质酶活却稍有降低。发酵 6 d,压力脉动固态发酵所得单位质量干酶曲的胞外 FPA 酶活和 CMCase 酶活分别为  $1.739 \mu\text{mol/s}$  和  $109.592 \mu\text{mol/s}$ ,而胞内 FPA 酶活与 CMCase 酶活分别为  $0.245 \mu\text{mol/s}$  和  $6.072$

$\mu\text{mol/s}$ 。两种发酵方式中,7 d 的发酵周期内,压力脉动固态发酵 5 d 的胞外蛋白质的酶活与静态固态发酵 6 d 的相当。同样发酵 6 d,相对后者则提高了 21.17 %。另外,酶活的测定验证了蛋白提取和纯化方法的可行性。

## 2.4 SDS-PAGE 电泳

将纯化前后的蛋白质进行 SDS-PAGE 分析。

从图 9 看出,丙酮纯化可去除大部分的杂蛋白。发酵 4 d,压力脉动周期刺激固态发酵微生物的组分,较未加刺激的微生物蛋白质组分有所变化,减少了相对分子质量约为 80400 的组分,但增加了相对分子质量约为 28520 的组分。



M—标准蛋白;1—静态 4 d 纯化后;2—压力脉动 4 d 纯化后;3—静态 4 d 纯化前;4—压力脉动 4 d 纯化前

图 9 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 9 SDS-PAGE of extracted protein

## 2.5 压力脉动外界周期刺激固态发酵分子作用机理的初步探讨

在 7 d 的发酵周期内,发酵 6 d 的微生物中得到的蛋白量最多。从压力脉动外界周期刺激固态发酵 6 d 的单位质量干酶曲提取的胞内蛋白质,其质量、FPA 酶活、CMCase 酶活分别为 5.3 mg、 $0.245 \mu\text{mol/s}$ 、 $6.392 \mu\text{mol/s}$ ,较从未加周期刺激的微生物提取的,质量提高了 34.63 %,FPA 酶活降低了 22.22 %,CMCase 酶活降低了 38.65 %;而提取得到的胞外蛋白质的质量、FPA 酶活、CMCase 酶活分别为 9.09 mg、 $1.739 \mu\text{mol/s}$ 、 $109.592 \mu\text{mol/s}$ ,较从未加周期刺激的微生物提取的,分别提高了 17.75 %、60.08 %、21.17 %。SDS-PAGE 电泳显示,压力脉动周期刺激固态发酵微生物,较未加刺激的微生物蛋白质组分有所变化。

## 3 结 论

在两种不同的发酵方式下,微生物的蛋白质从产量、酶活和组成都产生了变化。压力脉动固态发酵与常规的静态固态发酵相比,压力脉动成为一个

差异性的外界周期刺激源。微生物为了适应这种差异性的外界周期刺激作用,蛋白质的组成发生改变,表现为胞内蛋白酶活的降低,而一些特异性的蛋白被诱导合成,表现为胞外蛋白酶活的提高。从发酵产量的提高,可看出这种刺激作用产生的诱导蛋白有利于微生物的生长,提高了发酵的产率。SDS-PAGE 的电泳结果也初步证实了两种发酵方式下,蛋白质组分的差异性,但这些差异蛋白的具体性质与功能还有待进一步的研究。

### 参 考 文 献

- [1] 陈洪章,徐建.现代固态发酵原理及应用[M].北京:化学工业出版社,2004,8-62.
- [2] Xu Fujian, Chen Hongzhang, Li Zuohu. Effect of periodically dynamic changes of air on cellulose production in solid-state fermentation enzyme [J]. Enzyme Microbial Tech, 2002, 30: 45-48.
- [3] Mandels M, Sternberg D. Recent advance in cellulase technology [J]. Ferment Technol, 1976, 54:267-286.
- [4] Qu Yinbo, Chen Hongzhang. SCP from steam exploded hemicellulose by trichospore [J]. J Ferment Bioeng, 1992, 73: 386-396.
- [5] 李宏强,陈洪章.固态发酵的参数周期变化及对微生物发酵的影响[J].生物工程学报,2005,21(3):440-445.
- [6] 徐福建,陈洪章,李佐虎.纤维素酶气相双动态固态发酵[J].环境科学,2002,23(3):53-58.
- [7] 诸葛建,王正祥.工业微生物实验技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,1997,209-213.
- [8] Bradford M. An rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principles of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [9] 马歇克 D R, 门永 J T, 布格斯 R R, 等.蛋白质纯化与鉴定实验指南[M].北京:科学出版社,1999,249-262.

## Study of microorganism protein and mechanism in solid state fermentation with periodical dynamic changes of air

FU Xiao-guo<sup>1,2</sup> CHEN Hong-zhang<sup>2</sup> LI Hong-qiang<sup>2</sup> MA Run-yu<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Science and Technology of Controllable Chemical Reactions, Ministry of Education, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; 2. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract:** The effect of varying the extraction and purification conditions for the microorganism protein obtained from solid state fermentation and the effect of periodical dynamic changes of air on the protein have been studied. The mechanism of solid-state fermentation with periodical dynamic changes of air is also discussed. The results show that when Tris-HCl buffer was added to the solid-state fermentation system, the maximum amount of intracellular protein. The recovery ratio of FPA activity is 83.6%, while the recovery ratio of CMCase activity is 67%. Compared with static solid state fermentation, periodic dynamic changes of air afford a higher protein mass; from ca. 1 g of fermentation microorganism, 5.3 mg of intracellular protein (an increase of 34.6%) and 9.09 mg of extracellular protein (an increase of 17.8%) were obtained on the sixth day of the fermentation. The FPA enzyme activity and CMCase enzyme activity of the extracellular protein are 1.739  $\mu\text{mol/s}$  and 109.592  $\mu\text{mol/s}$  respectively, which represent increases of 60.1% and 21.2% over the corresponding values for static solid state fermentation. The FPA enzyme activity and CMCase enzyme activity of the intracellular protein are 0.245  $\mu\text{mol/s}$  and 6.392  $\mu\text{mol/s}$  respectively, which represent decreases of 22.2% and 38.7% over the corresponding values for static solid state fermentation. The enzyme activity of the microorganism extracellular protein in solid-state fermentation with periodic dynamic changes of air on the fifth day is nearly equal to that on the sixth day without periodic dynamic changes of air, so that the period of fermentation can be shortened. The SDS-PAGE experiments suggest that pulsating air pressure stimulation leads to a decrease in the amount of protein component with relative molecule mass of about 80400, and an increase in the amount of the the protein component with relative molecular mass of about 28520.

**Key words:** periodical dynamic changes of air; microorganism in solid state fermentation; protein