

陈钰泉,刘玉婷,仇敏,等. 植物皂素提取液对枯草芽孢杆菌发酵表达蛋白酶与果胶酶的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(11):322-326.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.11.073

植物皂素提取液对枯草芽孢杆菌发酵表达蛋白酶与果胶酶的影响

陈钰泉,刘玉婷,仇敏,邱杰,谢文佩,吴东美,谭强

(广西中医药大学药学院,广西南宁 530001)

摘要:通过在植物皂素液中添加不同浓度植物(川芎、旱莲草、香附、白芷、当归、黄芪)提取混合液及葡萄糖,测定植物皂素发酵液中枯草芽孢杆菌共表达蛋白酶、果胶酶活性。直接发酵时,发酵液中蛋白酶、果胶酶活性分别在发酵 32、24 h 时达到最大值,分别为 3 984、227 U/ml;添加 5% 混合植物提取液后,发酵液中蛋白酶活性下降了 37.55%,果胶酶活性提高了 3.83 倍;当皂素提取液中的植物提取液添加量提高至 10% 后,发酵液中蛋白酶活性最大值下降了 66.59%;果胶酶活性最大值提高了 4.94 倍。当以添加 5% 葡萄糖的皂素提取液作为发酵基质进行发酵时,发酵液中蛋白酶、果胶酶活性分别在发酵 40、8 h 时达到最大值,分别为 2 451、1 390 U/mL;当在添加 5% 葡萄糖的皂素提取液中添加 5% 混合植物提取液后,发酵液中蛋白酶活性最大值降低 61.32%,果胶酶活性最大值提高 5.54%;当在添加 5% 葡萄糖的皂素提取液中添加 10% 混合植物提取液后,发酵液中蛋白酶活性最大值降低 33.37%,果胶酶活性最大值提高 30.65%。当直接在皂素提取液中添加植物提取液而不添加葡萄糖时,植物提取液添加量的提高对果胶酶活性有促进作用,对蛋白酶活性有抑制作用;当在皂素提取液中添加 5% 葡萄糖时,植物提取液添加量的提高同样利于果胶酶活性的提高。

关键词:果胶酶;蛋白酶;皂素;发酵;枯草芽孢杆菌

中图分类号:S188⁺.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)11-0322-05

植物来源的皂苷包括三萜皂苷和甾体皂苷,因其水溶液振摇后可产生持久性似肥皂溶液的泡沫而得名^[1]。在自然界中,三萜皂苷主要分布于无患子科、豆科、茶科、菊科、五加科、桔梗科、远志科、伞形科、葫芦科等植物中;而甾体皂苷主要分布在百合科、薯蓣科、玄参科、姜科、豆科等植物中。无患子、茶饼和艾草中都含有丰富的三萜皂苷^[1-4],这类皂苷属于一种优良的非离子表面活性剂,具有较好的去污洗涤能力及体外抗菌杀虫、抗氧化活性,易于生物降解,在临床上主要被应用于各类杀虫止痒以及出血症、内科、妇科等疾病的治疗。

川芎为伞形科植物川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort)的干燥根茎,始载于《神农本草经》,其性温,味辛、微苦,具有活血行气、祛风止痛的功效^[5],临床上常被用于治疗胸痹心痛、胸胁刺痛、跌扑肿痛、月经不调、头痛、风湿痹痛等疾病^[6]。旱莲草(*Herba ecliptae*),别称墨旱莲^[7],为菊科鳢肠的干燥地上部分,具有促使毛发生长、降低血脂、止血、免疫调节等药理作用^[8]。香附为莎草科植物莎草(*Cyperus rotundus* L.)的干

燥根茎,具有疏肝解郁、理气宽中、调经止痛的功效,临床上常被用于治疗肝郁气滞、胸胁胀痛、疝气疼痛、乳房胀痛、月经不调等疾病^[9]。白芷(*Angelica dahurica*)^[10],为伞形科植物,具有发散风寒、通窍止痛、燥湿止带、消肿排脓等功效^[11]。当归为伞形科植物当归[*Angelica Sinensis* (Oliv.) Diels]的干燥根,具有补血活血、调经止痛、润肠通便的功效^[12],主要被用于月经不调、血虚头痛、肠燥便难、崩漏、跌扑损伤等疾病的治疗^[13]。黄芪为豆科植物蒙古黄芪[*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao]或膜荚黄芪[*Astragalus membra-na-ceus* (Fisch.) Bge.]的干燥根,归脾肺二经,具有补中益气、健脾益肺、托毒生肌的功效^[14-15]。

本试验通过在植物皂素液中添加川芎、旱莲草、香附、白芷、当归、黄芪等多种植物提取液,考查多种植物提取液对枯草芽孢杆菌发酵皂素提取液共表达蛋白酶、果胶酶活性的影响,以期工业化发酵皂素提取液制备洗涤剂提供依据。

1 材料

1.1 试剂与仪器

福林酚、三氯乙酸、酪蛋白、果胶、牛血清白蛋白、蛋白胨、牛肉膏、琼脂粉、一水硫酸锰购于天津市大茂化学试剂厂。

TDZS-WS 型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);HH-4 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);759S 型紫外分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司);G48661F 型移液枪(德国艾本德股份公司);BSA224S 型分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];YXQ-LS-50SII 立式蒸汽压力灭菌柜(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

收稿日期:2018-02-28

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360213);广西自然科学基金(编号:2014GXNSFAA118176、2012GXNSFAA276037);南宁市科技计划(编号:20131062);硕士研究生科研创新项目(编号:YJS201608);中国-东盟传统医药发展研究中心资助项目。

作者简介:陈钰泉(1991—),男,广西北流人,硕士研究生,研究方向为药物新剂型、新制剂的研制与开发。E-mail:912497554@qq.com。

通信作者:谭强,博士,教授,主要从事药物新剂型、新制剂的研制与开发研究。E-mail:tan20111102@163.com。

1.2 试验菌株

枯草芽孢杆菌 CICC23083 购于商城北纳创联生物科技有限公司。

2 方法

2.1 多种植物提取液的制备

川芎提取液的提取方法参照文献[16],旱莲草提取液的提取方法参照文献[17],香附提取液的提取方法参照文献[18],白芷提取液的提取方法参照文献[19],当归提取液的提取方法参照文献[20],黄芪提取液的提取方法参照文献[21],将各提取液浓缩至 1 g/mL,4 ℃ 保存备用。

2.2 发酵基质的准备

按照质量比分别为 90%、5%、5% 称取适量无患子、艾草、茶籽粕,在 60 ℃ 条件下以 1 g : 18 mL 的固液比在 pH 值为 9 的水溶液中提取 3 h。经 2 810 r/min 离心 10 min,取上清液,将川芎、旱莲草、白芷、黄芪、香附、当归提取液等体积混合后,在皂素提取液的上清液中分别添加 5%、10% 该混合植物提取液作为发酵基质,以不添加混合植物提取液的皂素提取液为直接发酵基质。

2.3 酶液的制备

向发酵基质中接种 5% 枯草芽孢杆菌菌液进行发酵,每 8 h 取发酵液在 4 000 r/min 下离心 10 min,取上清液,为粗酶液。

2.4 蛋白酶活性测定

在 1 mL 酪蛋白(1%)底物中加入 1 mL 粗酶液,在 40 ℃、pH 值为 7 的条件下反应 10 min 后加入 2 mL 三氯乙酸(0.4 mol/L)终止反应,用紫外分光光度计在 680 nm 处测定溶液的吸光度。以 1 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸需要的酶量为 1 个活性单位^[22]。

2.5 果胶酶活性测定

在 25 mL 比色管中加入 1 mL 果胶溶液(1%),50 ℃ 预热 10 min,加入 2 mL pH 值为 5 的缓冲溶液和 1 mL 粗酶液,在 50 ℃ 条件下反应 30 min,迅速加入 4 mL 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂,在 100 ℃ 条件下水浴 5 min,取出后迅速用流水冷却以终止显色反应,在 540 nm 处测定溶液吸光度。以 1 mL 酶液在 50 ℃、pH 值为 5.0 的条件下,1 min 分解果胶产生 1 μg D-半乳糖醛酸需要的酶量为 1 个酶活性单位^[23]。

2.6 洗涤效果测定

以 25% 黄油、25% 猪油、50% 花生油配比,另加 5% 甘油酯配制人工污垢,称量涂抹人工污垢前后的干净培养皿底座的质量,用发酵液洗涤涂抹有人工污垢的培养皿底座后称质量,以评价发酵液的洗涤性能^[24]。洗涤性能计算公式:

$$Y = (m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100\%。$$

式中:Y 表示洗涤性能; m_0 表示涂抹人工污垢前培养皿底座的质量; m_1 表示涂抹人工污垢后培养皿底座的质量; m_2 表示用发酵液洗涤涂抹有人工污垢的培养皿底座后干净培养皿底座的质量。

3 结果与分析

3.1 枯草芽孢杆菌发酵皂素提取液共表达蛋白酶和果胶酶活性

从图 1-A 可以看出,以皂素提取液为发酵基质,接种枯

草芽孢杆菌发酵 24 h 时,发酵液达到最大生物量,并在发酵 24 ~ 48 h 内维持相对稳定的生物量,表明植物皂素提取液富含可以满足枯草芽孢杆菌生长的营养物质。在发酵过程中,果胶酶活性随时间的变化趋势与生物量相似。在发酵 24 h 时,发酵液中果胶酶活性达到最大值,为 227 U/mL,此后果胶酶活性开始下降,并在发酵 32 ~ 48 h 内保持稳定水平。然而,蛋白酶活性随时间的变化趋势与果胶酶不一样。蛋白酶活性在最初发酵的 16 h 内较小,在发酵 16 ~ 32 h 范围内迅速增大,且在发酵 32 h 时达到最大值,为 3 984 U/mL。此后,蛋白酶活性开始下降,发酵 40 h 时,蛋白酶活性为 3 069 U/mL。因此,蛋白酶活性的峰值滞后于生物量及果胶酶活性。

在皂素提取液中添加 5% 混合植物提取液,接种枯草芽孢杆菌进行发酵,考察 5% 混合植物提取液对枯草芽孢杆菌发酵不添加葡萄糖的皂素液共表达蛋白酶、果胶酶活性的影响,结果见图 1-B。

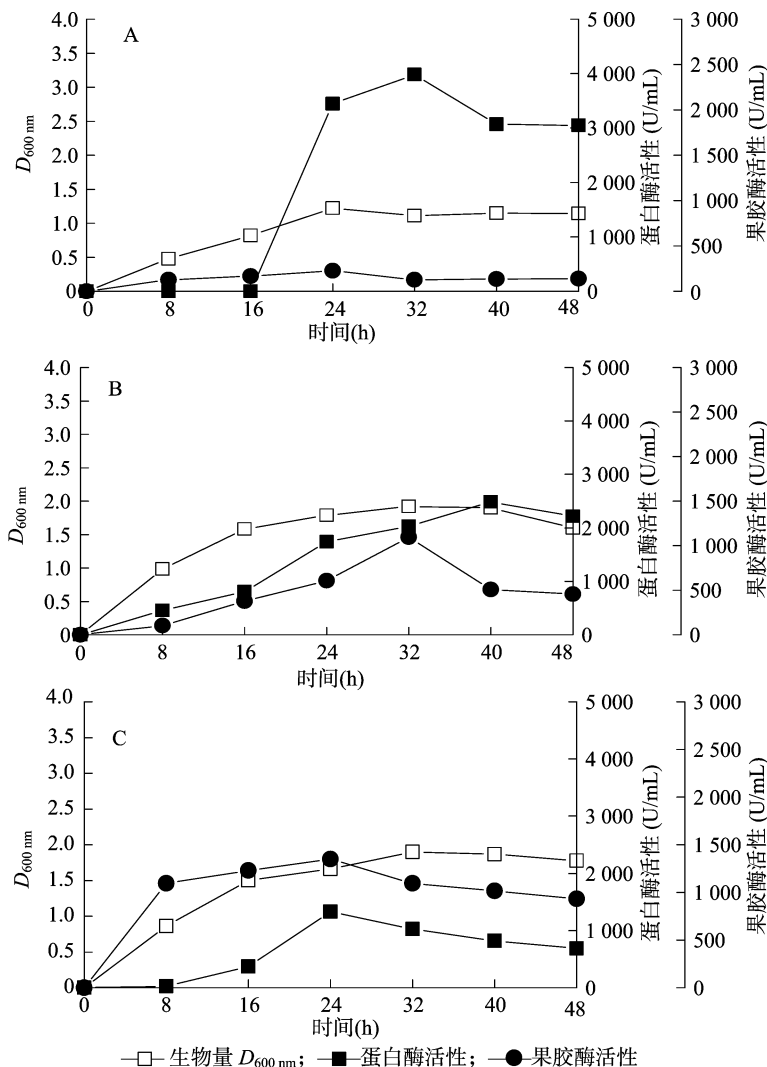
从图 1-B 可以看出,在发酵 0 ~ 32 h 内,发酵液生物量随着时间的延长而增大,发酵 32 h 后,生物量开始逐渐降低。蛋白酶、果胶酶活性随着生物量的增长而增大。蛋白酶、果胶酶活性分别在发酵 40、32 h 时达到最大值,分别为 2 488、1 097 U/mL。蛋白酶活性的最大值比果胶酶延迟 8 h。与直接发酵相比,添加 5% 混合植物提取液后,发酵液中蛋白酶活性的最大值下降了 37.55%,果胶酶活性的最大值提高了 3.83 倍。

在皂素提取液中添加 10% 混合植物提取液,接种枯草芽孢杆菌进行发酵,考察 10% 混合植物提取液对枯草芽孢杆菌发酵不添加葡萄糖的皂素液共表达蛋白酶、果胶酶活性的影响,结果见图 1-C。

由图 1-C 可知,在发酵 0 ~ 32 h 内,皂素发酵液生物量随着时间的延长而增大;在发酵时间为 32 ~ 48 h 时,皂素发酵液生物量略有下降。蛋白酶、果胶酶活性最初随着生物量的增大而提高,并在发酵 24 h 后达到最大值,分别为 1 331、1 348 U/mL。与直接发酵相比,当皂素提取液中的植物提取液提高至 10% 后,发酵液中蛋白酶活性达到最大值的时间缩短了 8 h,最大值下降了 66.59%;果胶酶活性最大值提高了 4.94 倍。

3.2 枯草芽孢杆菌发酵添加 5% 葡萄糖的皂素提取液共表达蛋白酶、果胶酶活性

从图 2-B 可以看出,在皂素提取液中添加 5% 葡萄糖后,枯草芽孢杆菌生物量在发酵 48 h 后达到最大值。与不添加葡萄糖直接以皂素提取液进行发酵(图 2-A)相比,添加 5% 葡萄糖后,发酵液中枯草芽孢杆菌的生物量峰值明显推迟了。发酵液中蛋白酶活性随时间的变化趋势与直接发酵皂素提取液类似。在发酵前 16 h 中,蛋白酶活性处于较低的水平,此后不断增加,并在发酵 40 h 时达到最大值,为 2 451 U/mL,比直接发酵降低了 38.48%。表明在皂素提取液中添加 5% 葡萄糖可为枯草芽孢杆菌提供足够的能量物质来维持较长时间的繁殖。然而,果胶酶活性随时间的变化趋势与直接发酵皂素提取液不同。在添加 5% 葡萄糖后,果胶酶活性的最大值为 1 390 U/mL,比直接发酵皂素提取液高 5.12 倍。表明葡萄糖对果胶酶活性有较大的影响,这种可消



A. 直接发酵; B. 添加 5% 混合植物提取液的皂素提取液; C. 添加 10% 混合植物提取液的皂素提取液

图1 枯草芽孢杆菌发酵皂素提取液共表达蛋白酶、果胶酶活性

化的碳水化合物可作为枯草芽孢杆菌新陈代谢的主要能量来源,优先为枯草芽孢杆菌表达与分泌果胶酶提供能量和物质,最终导致蛋白酶的表达相对缺乏。

在添加 5% 葡萄糖的皂素提取液中添加 5% 混合植物提取液后,接种枯草芽孢杆菌进行发酵,结果如图 2 - C 所示。

由图 2 - C 可知,在发酵 0 ~ 32 h 内,皂素发酵液生物量随着时间的延长而增大,并在发酵 32 h 时达到最大值。蛋白酶、果胶酶活性随着生物量的增大而提高,并在发酵 32 h 时达到最大值,分别为 948、1 467 U/mL。表明与以添加 5% 葡萄糖的皂素提取液作为发酵基质相比,进一步添加 5% 混合植物提取液后,发酵液中果胶酶活性的最大值提高 5.54%,蛋白酶活性的最大值降低 61.32%。

在添加 5% 葡萄糖的皂素提取液中添加 10% 混合植物提取液后,接种枯草芽孢杆菌进行发酵,结果如图 2 - D 所示。

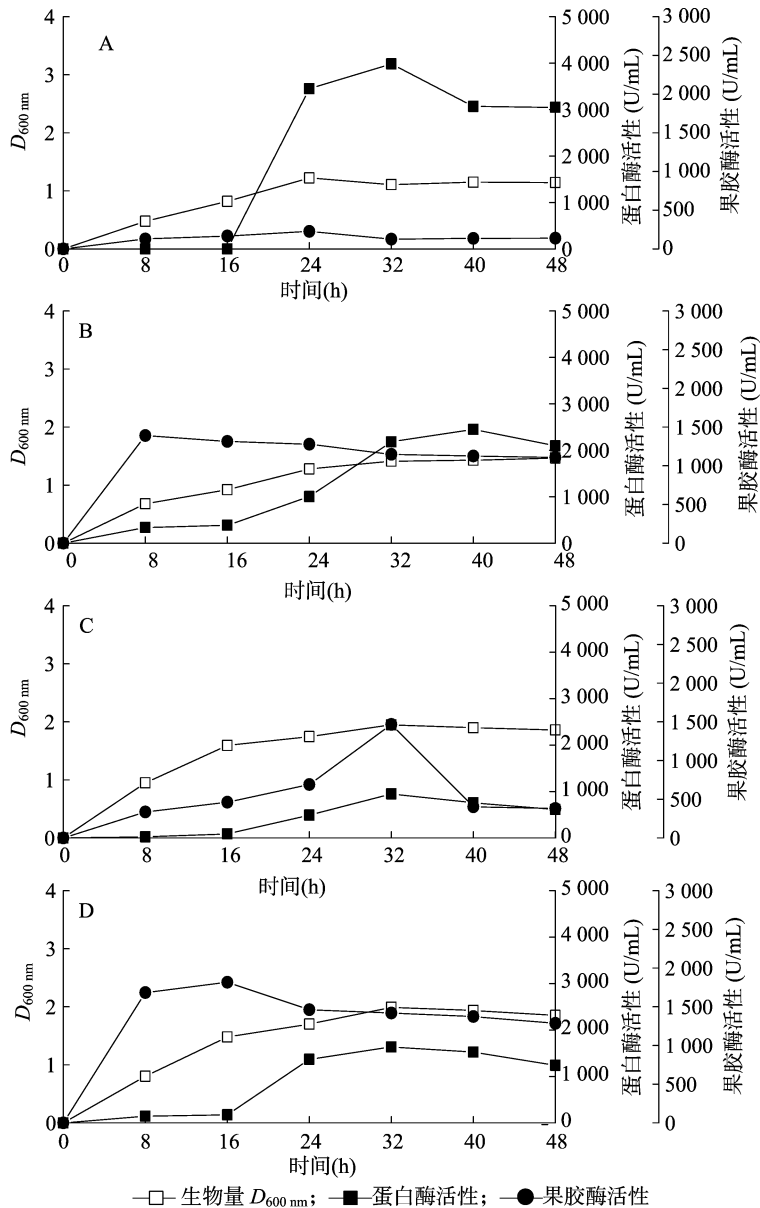
由图 2 - D 可知,在发酵 0 ~ 32 h 内,皂素发酵液生物量随着时间的延长而增大;在发酵时间为 32 ~ 48 h 时,皂素发酵液生物量略有下降。果胶酶、蛋白酶活性在一定范围内随着生物量的增大而提高,并在发酵 16 h 时,果胶酶活性

达到最大值,为 1 816 U/mL;发酵 32 h 时,蛋白酶活性达到最大值,为 1 633 U/mL。结果表明,与以添加 5% 葡萄糖的皂素提取液作为发酵基质相比,进一步添加 10% 混合植物提取液后,发酵液中蛋白酶活性最大值降低 33.37%,果胶酶活性最大值提高 30.65%。

3.3 洗涤效果

由图 3 可知,直接以皂素提取液为发酵基质,用枯草芽孢杆菌进行发酵 16 h 后,皂素发酵液的洗涤效果没有明显增加,这可能与果胶酶活性较低 (≤ 170 U/mL) 和蛋白酶活性很低有关。然而,在发酵 24 h 时,发酵液中蛋白酶活性急剧增大,达到 3 446 U/mL,果胶酶活性达到最大值 (227 U/mL),此时,皂素发酵液的洗涤效果得到明显提高。与发酵前皂素提取液的洗涤效果相比,经枯草芽孢杆菌发酵 32 h 后的皂素提取液洗涤效果提升了 8.18 百分点,此时,蛋白酶活性达到最大值,为 3 984 U/mL,同时果胶酶表现出相对较高的活性。

在皂素提取液中添加 5% 葡萄糖后,以枯草芽孢杆菌进行发酵,结合图 3 与图 2 - B 可以看出,发酵 8 h 后发酵液中果胶酶活性达到最大值 (1 390 U/mL),发酵液中的蛋白酶活



A. 直接发酵(同图 1-A); B. 添加 5% 葡萄糖的皂素提取液; C. 添加 5% 葡萄糖、5% 混合植物提取液的皂素提取液; D. 添加 5% 葡萄糖、10% 混合植物提取液的皂素提取液

图2 枯草芽孢杆菌发酵 5% 葡萄糖皂素提取液共表达蛋白酶和果胶酶

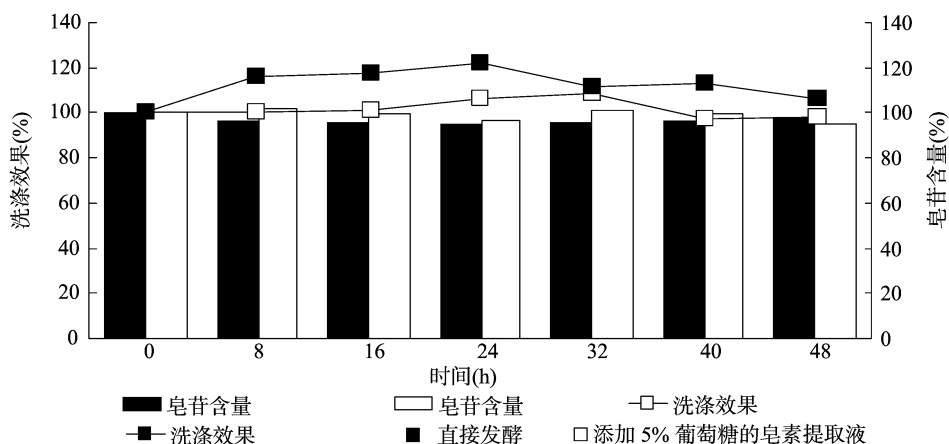


图3 发酵过程洗涤效果的变化

性在发酵 24 h 后也明显增大(1 004 U/mL)。然而,当发酵至 32 h 时,果胶酶活性开始明显减小(1 146 U/mL),同时洗涤效果也开始明显下降。从这些结果可以推论出,提高蛋白酶、果胶酶活性可以在一定程度上提高皂素提取液的洗涤效果。同时提示,将蛋白酶和果胶酶应用于纯植物皂素洗涤剂中可以避免化学洗涤剂带来的环境污染问题。

从图 3 可以看出,无论是直接以皂素提取液为发酵基质,还是以添加 5% 葡萄糖的皂素提取液作为发酵培养液,经枯草芽孢杆菌发酵后,发酵液中的皂素浓度都没有明显变化。表明枯草芽孢杆菌和发酵条件对皂素提取液中的皂素浓度没有明显影响。

4 结论

多种植物皂素提取液中富含果胶,这些果胶与溶液中的蛋白类物质结合后容易发生絮凝沉淀,从而导致皂素提取液性能极不稳定。因此,本研究以共表达蛋白酶和果胶酶的枯草芽孢杆菌 CICC23083 为发酵菌株,对多种植物皂素提取液进行发酵,考察川芎、早莲草、香附、白芷、当归、黄芪等多种植物提取液对枯草芽孢杆菌发酵产酶的影响。结果表明,当直接在皂素提取液中添加植物提取液而不添加葡萄糖时,植物提取液添加量的提高对蛋白酶活性有抑制作用,对果胶酶活性有促进作用,这可能表明,蛋白酶作为枯草芽孢杆菌的内源性酶,当培养液中富含足够供枯草芽孢杆菌生长繁殖的营养物质时,枯草芽孢杆菌优先利用这些营养物质合成自身生长繁殖需要的菌体蛋白,导致枯草芽孢杆菌优先分泌果胶酶,而不是内源性蛋白酶;当在皂素提取液中添加 5% 葡萄糖时,植物提取液添加量的提高不利于蛋白酶活性的提高,同时利于果胶酶活性的提高。

本研究明确了枯草芽孢杆菌对添加不同量混合植物提取液的皂素提取液发酵效果,为以混合植物为原料的生物发酵技术和纯中药发酵产品开发奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 匡海学. 中药化学[M]. 北京:中国中医药出版社,2004.
- [2] 黄素梅,王敬文,杜孟浩,等. 无患子总皂苷的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(1):354-356.
- [3] 周红宇,杨 德. 茶皂素水酶法提取工艺及纯化方法[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):362-364.
- [4] 周 峰,秦路平,连佳芳,等. 艾叶的化学成分、生物活性和植物资源[J]. 药学实践杂志,2000,18(2):96-98,103.
- [5] 张晓琳,徐金娣,朱玲英,等. 中药川芎研究新进展[J]. 中药材,2012,35(10):1706-1711.
- [6] 金玉青,洪远林,李建蕊,等. 川芎的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药与临床,2013,4(3):44-48.
- [7] 过七根,陈 昱,李汉全,等. 早莲草多糖的提取及其抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2016,28(12):1989-1994,1964.
- [8] 过七根. 传统中药早莲草的研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(24):12026-12027.
- [9] 黄凯玲,肖 刚,黄建红,等. 香附化学成分及药理作用研究进展[J]. 右江民族医学院学报,2014,36(3):491-492.
- [10] 朱艺欣,李宝莉,马宏胜,等. 白芷的有效成分提取、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国医药导报,2014,11(31):159-162,166.
- [11] 吴媛媛,蒋桂华,马逾英,等. 白芷的药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2009,20(3):625-627.
- [12] 宫文霞,周玉枝,李 肖,等. 当归抗抑郁化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药,2016,47(21):3905-3911.
- [13] 夏 泉,张 平,李绍平,等. 当归的药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2004,15(3):164-166.
- [14] 刘德利,包华音,刘 杨. 近 5 年黄芪化学成分及药理作用研究进展[J]. 食品与药品,2014,16(1):68-70.
- [15] 邱勇波,刘 锦,武 飞. 黄芪化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国疗养医学,2011,20(5):435-436.
- [16] 苏秀兰,赵 宇,杨倚麟. 川芎有效成分提取及体外抗氧化性能探究[J]. 广州化工,2017,45(1):69-72.
- [17] 王雪梅,张建胜,戴 云,等. 早莲草总黄酮的提取及其体外抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(2):356-358.
- [18] 曹 玫,张 洪. 正交试验法优化香附总黄酮提取工艺[J]. 广东药学院学报,2010,26(5):473-476.
- [19] 索建兰,袁佳妹. 白芷的提取工艺[J]. 光谱实验室,2012,29(3):1620-1623.
- [20] 韦 玮,龚苏晓,张铁军. 当归多糖的提取纯化工艺研究[J]. 中草药,2009,40(增刊1):137-139.
- [21] 高宛莉,杜瑞卿. 黄芪多糖提取工艺研究[J]. 农技服务,2012,29(8):962-963.
- [22] Rai A K, Sanjukta S, Chourasia R, et al. Production of bioactive hydrolysate using protease, β -glucosidase and α -amylase of *Bacillus* spp. isolated from *kinema* [J]. Bioresour Technol, 2017, 235:358-365.
- [23] 乌日娜. 以纤维素基固定果胶酶及其定向处理造纸 DCS 的研究[D]. 广州:华南理工大学,2014:52-53.
- [24] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 衣料用洗涤剂去污力及循环洗涤性能的测定:GB/T 13174—2008[S]. 北京:中国国家标准化管理委员会出版社,2008.