

水解胶原蛋白对枯草芽胞杆菌生长的影响

李霞¹, 祝德义¹, 曾维才², 田翠翠¹, 廖学品^{1,2}, 石碧^{1,2}

(1. 四川大学生物质与皮革工程系, 成都 610065;

2. 四川大学皮革化学与工程教育部重点实验室, 成都 610065)

摘要: 本文测定了不同氮源(水解胶原蛋白 CH、蛋白胨、明胶、硝酸钠、氯化铵)对枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)生长的影响;考察了 CH 和玉米浆的不同配比对枯草芽胞杆菌生长的影响;研究以 CH 为氮源时,不同碳源对枯草芽胞杆菌生长的影响;考查 CH 对其它细菌发酵的影响. 研究发现,在 CH 为氮源条件下,枯草芽胞杆菌的发酵过程可顺利进行,且微生物的生物量可保持在较高水平;同玉米浆相比,CH 能使枯草芽胞杆菌达到较高的生物量;以 CH 为氮源时,淀粉比葡萄糖、蔗糖更有利于枯草芽胞杆菌的生长;除了枯草芽胞杆菌以外,大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 15489)和地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis* CICC 20031)也能有效利用 CH. 这表明,在实验条件下水解胶原蛋白(CH)可以作为多种微生物发酵的氮源.

关键词: 发酵; 水解胶原蛋白(CH); 生物量; 枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*); 氮源

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)06-1386-05

Effect of collagen hydrolysate on the growth of *Bacillus subtilis*

LI Xia¹, ZHU De-Yi¹, ZENG Wei-Cai², TIAN Cui-Cui¹, LIAO Xue-Pin^{1,2*}, SHI Bi²

(1. Department of Biomass and Leather Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. The Key Laboratory of Leather Chemistry and Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: The influences of CH and other nitrogen sources, the proportion of CH and corn steep liquor, and the different carbon sources at the present of CH on the growth of *Bacillus subtilis* were significantly explored. Furthermore, the effect of CH as nitrogen source on the fermentation for several bacteria was also investigated. With a positive effect on the biomass of *Bacillus subtilis*, CH was observed to be a suitable nitrogen source for the microbial fermentation. Comparing with corn steep liquor, CH exhibited a strong ability to improve the growth of *Bacillus subtilis* and keep its biomass in a high level. However, starch was a better carbon source than glucose and sucrose for the growth of *Bacillus subtilis* with the present of CH. Moreover, CH showed the significant value to be used as the nitrogen source for the growth of *Escherichia coli* (ATCC 15489) and *Bacillus licheniformis* (CICC 20031). This suggests that CH possesses the potential to be utilized as a nitrogen source for the growth of multiple microorganisms in the fermentation industry.

Keywords: Fermentation; Collagen hydrolysate (CH); Biomass; *Bacillus subtilis*; Nitrogen source

1 引言

胶原蛋白是细胞外基质的结构蛋白,主要存在于动物的结缔组织、皮、骨骼、肌腱、内脏细胞间质、韧带、血管等部位中,是世界上资源量最大的可再生动物生物物质之一^[1,2]。由于其具有生物相容性、生物安全性及生物稳定性^[3]等,在化妆美容、医药、食品等行业均有广泛的应用^[4]。水解胶原蛋白是胶原蛋白部分水解得到的产物,相较于胶原蛋白而言,水解胶原蛋白的分子量较小,而溶解性、起泡性、乳化性和吸水性等性质则有显著改善^[5]。研究表明,蛋白质进行酶水解后,其功能和营养特性得到显著提高^[6]。水解胶原蛋白含有丰富的多肽和氨基酸,理论上可作为一种营养成分,有效地促进微生物的生长。Vasileva-Tonkova 报道了水解胶原蛋白在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),都柏林沙门氏菌(*Salmonella dublin*),以及金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等微生物生长中的影响^[7],发现水解胶原蛋白可以作为蛋白胨的低成本替代物用于微生物的培养。然而,目前关于水解胶原蛋白作为工业微生物发酵原料的研究还未见报道。水解胶原蛋白的氨基酸组成与其它蛋白存在显著差异,其甘氨酸和脯氨酸含量达到50%以上。因此研究水解胶原蛋白作为氮源对微生物生长及发酵过程的影响具有重要的理论意义和实际应用价值。

枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)是一类常见的革兰氏阳性杆菌,可以产生内生芽胞,生长速度快,通常被认为是安全无害(GRAS, generally recognized as safe)、无致病性的^[8]好氧细菌。枯草芽胞杆菌能分泌多种酶,如蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶^[9]等,同时也可以产生多种天然小分子或高分子化合物,如乙偶姻、2,3-丁二醇^[10]等,具有良好的发酵基础,用途十分广泛。

本文主要考察水解胶原蛋白对枯草芽胞杆菌生长的影响,在此基础上,进一步研究水解胶原蛋白对一些常见微生物生长的影响,为其在发酵领域的开发利用提供实验基础。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌种 枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*),实验室保存;地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis* CICC 20031),购于中国工业微生物菌种保藏管理中心;大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC

15489),购于美国标准菌种收藏中心。

2.1.2 主要试剂 水解胶原蛋白(Collagen hydrolysate, CH),重均分子量 M_w 为 4.5 kD,数均分子量 M_n 为 2.5 kD,分子量分布指数 M_w/M_n 为 1.8(实验室自制)。明胶,分子量 30~50kD,山东宝恩集团,食品级;玉米浆,阿拉丁试剂,试剂级;可溶性淀粉,氯化铵,硝酸钠,磷酸氢二钾等为国产分析纯;酵母提取物、牛肉膏等为国产生物试剂。

2.1.3 主要仪器 UV-1800PC 紫外可见光分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),GL-20G-C 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),Viscotek 270maxTM凝胶渗透色谱仪(英国马尔文仪器有限公司),ZWY-1102C 恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司),LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂),HH·B11-BS-II 电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械有限公司)等。

2.1.4 培养基 1)斜面培养基:LB培养基:胰蛋白胨 1%,酵母提取物 0.5%,氯化钠 1%,琼脂粉 1.5~2.0%,pH 7.0。2)种子培养基:淀粉 1%,牛肉膏 1%,蛋白胨 0.3%,CH 0.3%,玉米浆 0.4%,氯化钠 0.5%,磷酸氢二钾 0.1%,pH 7.0。3)SH-1培养基:淀粉 0.3%,CH 1%,氯化钠 0.5%,磷酸氢二钾 0.1%,pH 7.0。

2.2 方法

2.2.1 不同氮源对枯草芽胞杆菌生长的影响 在SH-1培养基的基础上,将其中的CH依次替换为蛋白胨、明胶、硝酸钠、氯化铵,以SH-1为对照。将由种子培养基活化增殖后的枯草芽胞杆菌以合适的接种量分别接种到这几种不同氮源的培养基中,然后于37℃,180r/min摇瓶培养60h。分别于0h、12h、24h、36h、48h、60h取适量的发酵液,并稀释相应的倍数,用紫外可见分光光度计测定发酵液在600nm处的光密度(OD_{600})^[11];用酸度计测定各发酵液在60h的pH。

2.2.2 水解胶原蛋白和玉米浆的不同配比对枯草芽胞杆菌生长的影响 在SH-1培养基的基础上,将其中的淀粉浓度提高到2%,其他条件不变,即为SH-2培养基。将SH-2培养基中1%的CH依次替换为0.7%CH+0.3%玉米浆、0.3%CH+0.7%玉米浆,以SH-2为对照。将由种子培养基活化增殖后的枯草芽胞杆菌以合适的接种量,分别接种到这三种培养基中,于37℃、180r/min摇瓶培养72h。分别于0h、12h、24h、36h、48h、60h、72h取适

量的发酵液,测定发酵液的 OD_{600} .

2.2.3 不同碳源对枯草芽胞杆菌生长的影响 在 SH-2 培养基的基础上,将其中的淀粉依次替换为葡萄糖、蔗糖,以 SH-2 为对照.将由种子培养基活化增殖后的枯草芽胞杆菌以合适的接种量,分别接种到这三种培养基中,于 37°C 、 $180\text{r}/\text{min}$ 摇瓶培养 48h,测定各发酵液的 OD_{600} 及 pH.

2.2.4 水解胶原蛋白对几种细菌发酵的影响 在 SH-2 培养基的基础上,将其中的淀粉的浓度提高到 4%,其他条件不变,即为 SH-3 培养基.将由种子培养基活化增殖后的枯草芽胞杆菌、大肠杆菌、地衣芽胞杆菌分别接种到各自的 SH-3 培养基中,于 37°C 、 $180\text{r}/\text{min}$ 摇瓶发酵 48h,测定各发酵液的 OD_{600} .

2.2.5 统计学分析 每组实验重复操作三次,采用 Origin 8.5 进行数据处理,用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,显著性差异 $P < 0.05$.

3 结果与分析

3.1 不同氮源对枯草芽胞杆菌生长的影响

pH 是反映微生物在一定环境条件下代谢活动的综合指标,微生物对营养物质的吸收会导致 pH 的改变^[12].各发酵培养基在 60h 的 pH 如图 1A 所示.各培养基的初始 pH 均为 7.0,经过 60h 的发酵后,碳、氮源为淀粉/CH 培养基的 pH 有显著的提升,这在一定的程度上表明 CH 可以被枯草芽胞杆菌利用.其中淀粉/CH 的 pH 明显高于淀粉/明胶,这表明枯草芽胞杆菌对 CH 和明胶的利用是存在显著差异的.在无机氮源中,淀粉/氯化铵

的 pH 相对较低,淀粉/硝酸钠的 pH 相对较高,这主要是因为氯化铵为生理酸性物质,而硝酸钠为生理碱性物质^[13].

氮源为培养微生物过程中不可或缺的营养成分,微生物对不同氮源的利用机制存在差异^[14].由图 1B 可知,枯草芽胞杆菌的生物量在以淀粉/CH 为碳氮源的摇瓶培养基(SH-1)中,呈现出一种先增大、后减小、再增大、再减小的趋势,并在 48h 出现最大的生物量,很明显在此培养基中微生物出现了二次生长现象.在发酵前期,枯草芽胞杆菌主要以淀粉作为碳源,以 CH 作为氮源,但由于淀粉含量比较少,所以到发酵后期淀粉几乎被耗尽,则此时 CH 可能既作为碳源,又作为氮源,因此微生物进行了二次生长.但由于在发酵后期,各种代谢产物的积累、发酵液的 pH 升高等,使得微生物的生长环境变差,所以到 60h 时微生物的生物量有一定的下降.在利用大分子蛋白或多肽时,微生物通常需要分泌胞外蛋白酶,将这些大分子氮源分解成分子量较小的短肽和氨基酸^[15].枯草芽胞杆菌在淀粉/CH 培养基的生物量明显高于其在淀粉/明胶培养基,这可能是因为 CH 的分子量比明胶要小得多,所以更容易被微生物利用.

在以淀粉/氯化铵为培养基的条件下,微生物的生物量在 60h 内呈现出了先缓慢增长,接着快速增长,最终达到稳定状态的现象,菌体处于迟缓期的时间较淀粉/CH 长.淀粉/硝酸钠培养基中枯草芽胞杆菌的生物量整体都比较小,菌体生长缓慢,这表明硝酸钠可能不适合单独作为枯草芽胞杆菌的氮源.

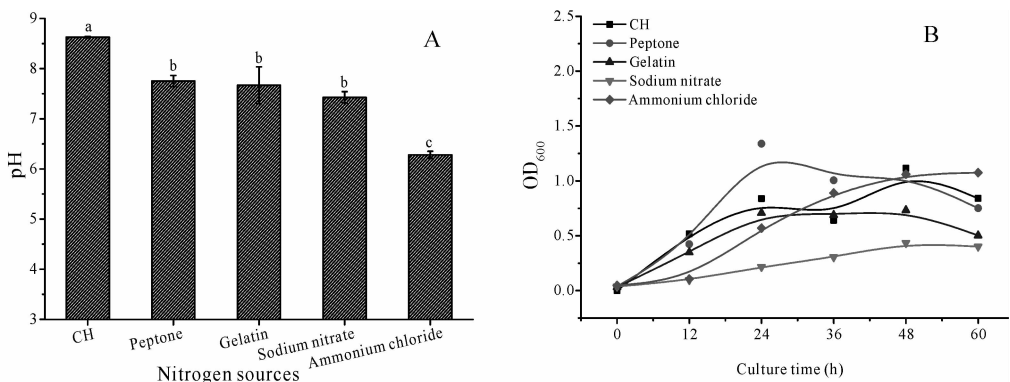


图 1 不同氮源对枯草芽胞杆菌生长的影响

A. 不同氮源的发酵培养基在 60h 的 pH; B. 不同氮源对枯草芽胞杆菌生长过程的影响.注:图中不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著.

Fig. 1 Influence of different nitrogen sources on the growth of *Bacillus subtilis*

A. The pH value of five different culture media at 60h; B. Influence of different nitrogen sources on the time course of *Bacillus Subtilis* growth. Note: Different letters mean significant difference at $P < 0.05$ level.

3.2 水解胶原蛋白和玉米浆的不同配比对枯草芽胞杆菌生长的影响

玉米浆是一种常见的氮源,含有丰富的氨基酸(丙氨酸、谷氨酸、缬氨酸等)、还原糖、磷、微量元素和生长素^[16],有利于微生物的生长^[17].在以碳源为2%淀粉,氮源为1%CH的SH-2培养基的基础上,将其中的氮源按一定比例替换成玉米浆.各发酵液光密度的测定结果如图2所示,枯草芽胞杆菌在这三种培养基上的生物量整体都比较高,尤其是与图1B相比更加明显.培养基中的碳源和氮源的比例会影响微生物的生长^[18],SH-2相对于SH-1而言,淀粉的含量由0.3%提高到了2%,碳源和氮源的比例也由0.3:1提高到了2:1,这表明适当的提高碳源与氮源的比例可以促进枯草芽胞杆菌的生长.

对比枯草芽胞杆菌在1号(SH-2,1%CH)、2号(0.7%CH+0.3% Corn steep liquor)、3号(0.3%CH+0.7% Corn steep liquor)这三种培养基中的生长趋势,发现2号培养基相对于1号而言,微生物处于稳定期的生物量有所提高,而3号培养基相对于2号而言,稳定期的生物量并无较大提升.且枯草芽胞杆菌在12h和24h于1号培养基培养的生物量较高,迟缓期最短.可见,同玉米浆相比,CH也能使枯草芽胞杆菌达到较高的生物量.

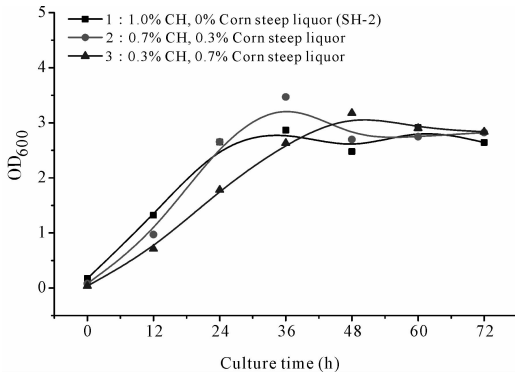


图2 水解胶原蛋白和玉米浆的不同配比对枯草芽胞杆菌生长过程的影响

Fig. 2 Influence of different proportion of CH and corn steep liquor on the time course of *Bacillus subtilis* growth

3.3 CH为氮源时不同碳源对枯草芽胞杆菌生长的影响

不同的碳源对微生物培养基pH的影响不同,三种培养基在48h的pH如图3A所示.各培养基的初始pH为7.0,经过48h的摇瓶培养之后,各培养基的pH相差较大.其中碳源为葡萄糖和蔗糖的培养基的pH都较低,这可能是因为葡萄糖和蔗糖都是微生物比较容易利用的碳源,所以在发酵的过程中,很容

易加速菌体的呼吸,从而使得培养基的溶氧量不足,以至于一些中间代谢产物(如乙酸、丙酮酸、乳酸等)大量积累,使得pH下降^[13].与其他培养基相比,碳源为淀粉的培养基(SH-2)在48h的pH和发酵前相差不大.对枯草芽胞杆菌而言,过低的pH会影响其生长.因此,当以CH为氮源时,以淀粉为碳源是合适的,这与光密度的测试结果(图3B)相符.

淀粉、葡萄糖、蔗糖^[19]均为工业发酵中常见的碳源,由图3B可知,在三种不同的碳源条件下,培养枯草芽胞杆菌48h,以淀粉为碳源的生物量高于蔗糖,而葡萄糖最低.这进一步表明,在以CH为氮源的情况下,淀粉比葡萄糖和蔗糖更有利于枯草芽胞杆菌的生长,更适合作为此培养基的碳源.

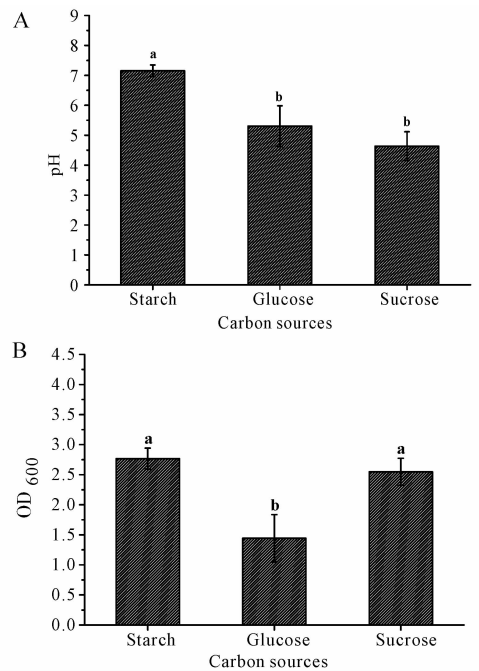


图3 CH为氮源时不同碳源对枯草芽胞杆菌生长的影响

A. 不同碳源的发酵培养基在48h的pH; B. 枯草芽胞杆菌在不同碳源条件下培养48h后的OD₆₀₀.注:图中不同字母表示在P<0.05水平差异显著.

Fig. 3 Influence of different carbon sources on the growth of *Bacillus subtilis*

A. The pH value of three different culture media at 48h; B. Comparison of the OD₆₀₀ of *Bacillus subtilis* at 48h with different carbon sources. Note: Different letters mean significant difference at P<0.05 level.

3.4 水解胶原蛋白对几种细菌发酵的影响

除了枯草芽胞杆菌以外,大肠杆菌、地衣芽胞杆菌^[20]均为常见的微生物.由图4可知,三种细菌分别在SH-3培养基中培养48h后,均能达到较高的生物量.这表明CH是一种良好的氮源,具有广泛适用性.但是,不同的微生物对CH的利用能力和程度存在显著的种间差异.进一步分析发现,枯

草芽胞杆菌在 SH-3 中的生物量比它在 SH-1、SH-2 中都要高,这再次表明适当的提高碳源与氮源的比例,有利于枯草芽胞杆菌的生长。

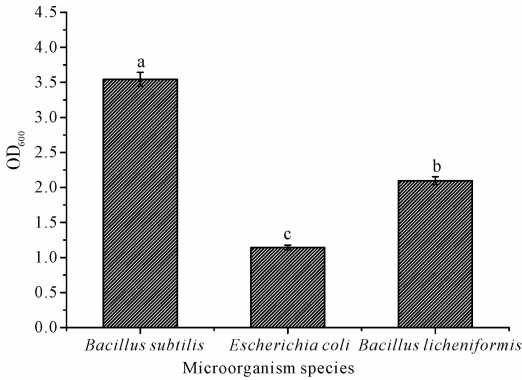


图 4 比较三种细菌在 SH-3 培养基培养 48h 的 OD₆₀₀
注:图中字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Fig. 4 Comparison of the OD₆₀₀ of three types of bacteria at 48h under the culture condition of SH-3 medium

Note: Different letters mean significant difference at $P < 0.05$ level.

4 结 论

1) 水解胶原蛋白 CH 可以作为培养枯草芽胞杆菌的一种良好的氮源。明胶也是一种胶原水解物,但 CH 与之相比具有较小的分子量,更有利于枯草芽胞杆菌的生长,这表明水解胶原蛋白的分子量会影响微生物的生长。

2) 在以 CH 为氮源的情况下,淀粉比葡萄糖和蔗糖更有利于枯草芽胞杆菌的生长,也更适合作为该培养基的碳源。同时,适当的提高碳源和氮源的比例,有利于促进枯草芽胞杆菌的生长。

3) 除了枯草芽胞杆菌以外,大肠杆菌和地衣芽胞杆菌均能利用 CH,但不同的微生物对 CH 的利用存在显著的种间差异性。

参考文献:

[1] Brodsky B, Persikov A V. Molecular structure of the collagen triple helix[J]. *Advances in protein chemistry*, 2005(70): 301.

[2] Nagai T, Suzuki N. Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins[J]. *Food Chemistry*, 2000, 68(3): 277.

[3] Shoulders M D, Raines R T. Collagen structure and stability[J]. *Annual review of biochemistry*, 2009, 78: 929.

[4] Lee C H, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen[J]. *International journal of pharmaceuticals*, 2001, 221(1): 1.

[5] Denis A, Brambati N, Dessauvages B, *et al.* Molecular weight determination of hydrolyzed collagens [J]. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22(6): 989.

[6] Zhuang Y, Hou H, Zhao X, *et al.* Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish (*Rhopilema esculentum*) on mice skin photoaging induced by UV irradiation[J]. *Journal of food science*, 2009, 74(6): 183.

[7] Vasileva T E, Nustorova M, Gushterova A. New protein hydrolysates from collagen wastes used as peptone for bacterial growth[J]. *Current microbiology*, 2007, 54(1): 54.

[8] Hong H A, Huang J M, Khaneja R, *et al.* The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics[J]. *Journal of applied microbiology*, 2008, 105(2): 510.

[9] Konsula Z, Liakopoulou K M. Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis* [J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39(11): 1745.

[10] Zhang X, Bao T, Rao Z, *et al.* Two-stage pH control strategy based on the pH preference of acetoin reductase regulates acetoin and 2, 3-butanediol distribution in *Bacillus subtilis*[J]. *PloS one*, 2014, 9(3): 1.

[11] 熊焰, 吴鹏, 尤芳芳, 等. 一株中度嗜盐菌 *Halomonas* sp. NY-011 的分离与鉴定[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2008, 45(5): 1239.

[12] 陈坚, 堵国成. 发酵工程原理与技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012: 103.

[13] 俞俊棠, 唐孝宣, 邬行彦等. 新编生物工艺学(上册)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 101.

[14] Fisher S H, Sonenshein A L. Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*[J]. *Annual Reviews in Microbiology*, 1991, 45(1): 107.

[15] Geisseler D, Horwath W R, Joergensen R G, *et al.* Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms-a review[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(12): 2058.

[16] Liggett R W, Koffler H. Corn steep liquor in microbiology[J]. *Bacteriological reviews*, 1948, 12(4): 297.

[17] Yang T W, Rao Z M, Zhang X, *et al.* Effects of corn steep liquor on production of 2, 3-butanediol and acetoin by *Bacillus subtilis* [J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48(11): 1610.

[18] Lopez J L C, Pérez J A S, Sevilla J M F, *et al.* Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33(2): 270.

[19] 金敏, 王忠彦, 胡承, 等. 产胶原酶地衣芽胞杆菌菌种的分离、筛选及发酵条件研究[J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2000, 37(5): 764.

[20] Hadj A N, Agrebi R, Ghorbel F B, *et al.* Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(4): 515.