

利用石油发酵柠檬酸的菌体生产碱性蛋白酶

上海新型发酵厂 复旦大学生物系微生物教研组
上海市工业微生物研究所

用正构烷烃发酵柠檬酸的培养液中,约有2—3%的酵母菌体产生。这些菌体一般当作废渣处理。为变废为宝,我们初步研究了用正构烷烃发酵柠檬酸后的酵母菌体发酵生产碱性蛋白酶。

一、石油酵母菌体成份分析

为了解石油发酵柠檬酸的菌体(解脂假丝酵母PC711)作为发酵原料的可能性,我们对其化学成份进

表1 PC711 菌体的化学组成*

成 份	粗 蛋 白	还 原 糖	脂溶性物质	粗 纤 维
含 量 %	38.2—40.0	23.0—25.0	9.6—12.7	7.4—8.6

* 测定样品经过烘干磨细,含水量为7.4—8.4%。

行了分析,结果见表1。

由表1看出,PC711 菌体含有较多的蛋白质和相当数量的糖,有代替粮食作为发酵原料的可能。

二、石油酵母的处理方法

用正构烷烃发酵柠檬酸的终了发酵液,经离心或板框压滤,取其菌体,加入与湿菌体量相等的自来水,和相当于湿菌体量5%的食盐,在自然pH(pH3左右)下,维持55—60℃,经4—5天,每天搅拌3—4次,使其自溶。然后,加热煮沸。实验过程中,还比较了不自溶的菌体和中性条件下自溶的菌体作原料生产碱性蛋白酶的效果,结果,以自然pH(即pH3左右)条件下自溶的菌体应用于碱性蛋白酶的生产效果最好。

三、生产碱性蛋白酶培养基中石油酵母用量的选择

生产碱性蛋白酶,用地衣芽孢杆菌 2709 作为生产菌株,发酵培养基只加湿酵母的自溶物,调 pH7.5—8.0。在 250 毫升三角瓶中装 30 毫升培养基。接种后在 28—30℃ 振荡(往复摇床,100 次/分,冲程 8 厘米)培养 3 天,取終了发酵液用福林比色法测定碱性蛋白酶活性。

在上述条件下,探讨了碱性蛋白酶发酵培养基中石油酵母自溶物的适宜用量。结果如图 1 所示,在折合湿酵母用量分别为 8.4%、16.7%、25%、33.3%、41.7% 情况下,碱性蛋白酶发酵单位以 33.3% 酵母用量为最高,酵母用量为 25% 时,蛋白酶活力已接近 4000 单位。

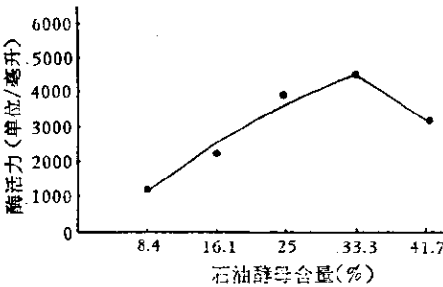


图 1 石油酵母添加量对产蛋白酶的影响
注:湿酵母 8.4%、16.2%、25%、33.3%、41.7% 分别相当于干物质 3.3%、6.6%、10%、13.3%、16.6%。

四、石油酵母生产碱性蛋白酶的主要影响因素

由于石油发酵柠檬酸以正构烷烃为碳源,以硫酸铵为氮源,因此在石油酵母中,往往有正构烷烃和硫酸铵残留。尤其在柠檬酸发酵不彻底或是压滤不完全的情况下,这两种物质和柠檬酸的夹杂量就更明显。为了探讨正构烷烃、硫酸铵及柠檬酸对发酵生产碱性蛋白酶的影响,进行了如下试验。

(一) 正构烷烃残留量对产酶的影响

采用柠檬酸发酵较彻底、压滤较好、总酸残留量低于 0.45% 的石油酵母作为发酵生产碱性蛋白酶的碳、氮源,在培养基中分别加入正构烷烃 0.5%、1% 和 2%,在同样发酵条件下,比较了碱性蛋白酶生成单位。表 2 说明,在蛋白酶发酵培养基中,正构烷烃加入量超过 0.5% 时,碱性蛋白酶生成单位就明显下降,正构烷

烃含量在 0.5% 以下,蛋白酶的生成单位与对照(不加正构烷烃)相同。

表 2 正构烷烃含量对产酶的影响				
正构烷烃加入量 (%)	0.5	1	2	0
酶活力 (单位/毫升)	5145	4454	3993	5145

(二) 硫酸铵残留量对产酶的影响

仍采用发酵较好、压滤彻底、总酸残留量低于 0.45% 的石油酵母作为发酵生产碱性蛋白酶的碳、氮源,在培养基中分别加入 0.05%、0.1%、0.2%、0.5% 硫酸铵,比较了所产生碱性蛋白酶的活力单位,结果见图 2。实验证明,以石油酵母作原料发酵生产碱性蛋白酶时,硫酸铵的加入会使酶的活力单位显著下降。

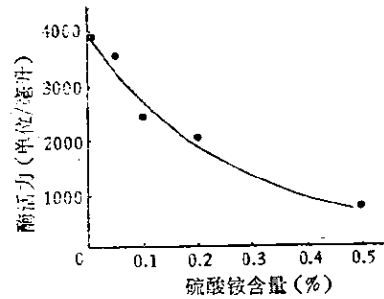


图 2 硫酸铵含量对产酶的影响

(三) 柠檬酸残留量对产酶的影响

将石油发酵柠檬酸菌体,用 1 倍体积的水进行稀释,离心洗涤两次,然后冲稀至原来体积,自溶后配成酸度为 0.5% 的培养基。分别加入柠檬酸,制成含酸量为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 的培养液,在同样发酵条件下,比较了产生碱性蛋白酶的活力单位。结果如图 3 所示,柠檬酸含量对蛋白酶合成影响很大,酶活力随着酸度增加而显著下降。

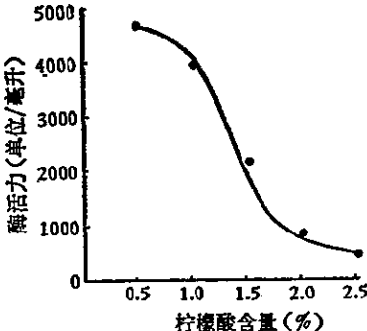


图 3 柠檬酸含量对产酶的影响

五、降低石油酵母中过量柠檬酸的方法

(一) 碳酸钙沉淀法

碳酸钙和柠檬酸、异柠檬酸反应能生成柠檬酸钙和异柠檬酸钙。柠檬酸钙溶解度在室温和溶液 pH4—5 左右的条件下,在 0.2% 以下, pH 越高溶解度愈小,因此碳酸钙可以使柠檬酸钙沉淀。我们在总酸为 2.1% 的培养基中,加入 1.5% 碳酸钙进行沉淀,产生蛋白酶的活力单位可达 4960 单位/毫升。

(二) 离心洗涤法

将石油发酵柠檬酸的菌体,用等量水稀释,搅匀制成悬浮液,于 2000 转/分离心 20 分钟。如此重复洗涤两次,即可进行自溶,用于蛋白酶的生产。