

中性蛋白酶发酵工艺优化研究

李永泉 朱志成 李向晟

姚 恕 郑连英

(杭州大学生物科技系, 杭州 310028)

(浙江大学化工系, 杭州 310027)

摘要 采用正交试验, 对枯草芽孢杆菌 HD401 中性蛋白酶深层发酵工艺进行了优化, 结果表明: 较优发酵培养基为玉米粉 5%、豆饼粉 3%、麸皮 4%、 Na_2HPO_4 0.4%、 KH_2PO_4 0.03%; 在发酵中期流加蚕蛹水解液 5%、植酸钙 0.2%、吐温-80 0.1%, 对发酵后期有较大的调控作用。采用优化工艺, 在 2L 发酵罐中进行验证试验, 酶活达 13200u/ml, 比原工艺提高了 164%。

关键词 枯草芽孢杆菌, 中性蛋白酶, 发酵

1 材料和方法

1.1 菌种

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) HD401, 花生地土壤中分离得到, 经激光等诱变剂诱变而成。用基本发酵培养基发酵酶活 5000u/ml。

1.2 培养基

斜面培养基(%): 牛肉膏 0.5, 蛋白胨 1.0, NaCl 0.5, 琼脂 1.5—2.0。种子培养基(%): 豆饼粉 3, 玉米粉 2, 麸皮 3, Na_2HPO_4 0.4, KH_2PO_4 0.03, 自然 pH 值。

基本发酵培养基(%): 豆饼粉 3.0, 玉米粉 4.0, 麸皮 2.5, Na_2HPO_4 0.4, KH_2PO_4 0.03, 自然 pH 值。

1.3 发酵条件

发酵温度 $29 \pm 1^\circ\text{C}$; 风量控制为 0—8h $1:0.4 \text{ vvm}$, 8—20h $1:0.6 \text{ vvm}$, 20h 以后 $1:0.8 \text{ vvm}$ ^[1]; 10h 以后产生大量泡沫, 用浙江大学化工厂生产的 PPE 消泡剂消泡。

1.4 酶活定义、测定

40°C , pH7.0—7.2 条件下, 每分钟水解酪素产生 $1\mu\text{g}$ 酪氨酸所用的酶量定义为一个酶活单位。酶活测定用 Folin 法^[2]。

1.5 蚕蛹水解液制作

蚕蛹 100 份, 水 600 份, 调 pH 至 12, $1.5 \times 10^5 \text{ Pa}$ 蒸汽水解 1h。

2 结果与讨论

2.1 发酵培养基优化试验

以基本发酵培养基为基础, 以玉米粉、豆饼粉、麸皮为试验因素, 磷酸盐浓度和其他条件保持不变, 选用 $L_9(3^4)$ 进行摇瓶正交试验, 转速 220r/min, 发酵时间 48h。

分析试验结果可知 (表 1), C/N 比在 $2.8:1$ — $2.9:1$ 范围内变动, 对蛋白酶产量影响不大, 这和文献报道最适 C/N 比在 $2.6:1$ — $2.9:1$ 是一致的^[3]。培养基采用低碳氮比有利于蛋白酶的合成, 碳氮比过高, 碳源的分解代谢阻遏效应会抑制发酵酶系, 造成酶活降低。

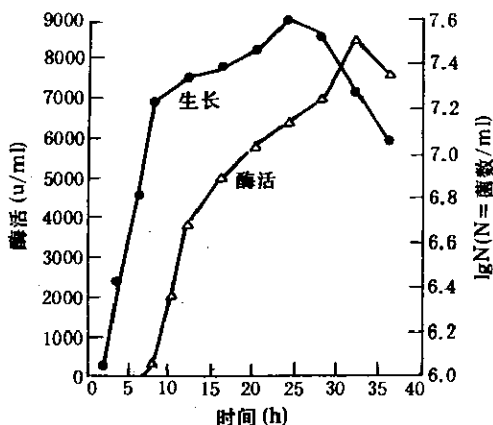


图 1 HD401 生长和产酶曲线

培养基中固含物百分比对产酶影响较大,一般要求固含物不超过12%,固含物过高会造成发酵液粘度增加,溶氧量不足,不利于菌体正常生长和分泌产物。从极差分析可知,较优

的发酵培养基为:玉米粉5.0%,豆饼粉3.0%,麸皮4.0%。上述试验结果在2L罐上验证,产酶比较稳定,5批平均结果为8522u/ml。其菌体生长和产酶曲线见图1。

表1 培养基优化正交试验极差分析

编号	试验因素			C/N	固含物百分比(%)	酶(u/ml)
	玉米粉(%)	豆饼粉(%)	麸皮(%)			
1	5.5	3.5	4.0	2.5:1	13.00	5632
2	5.5	3.0	3.0	2.9:1	11.50	8140
3	5.5	2.5	2.5	3.4:1	10.50	5148
4	5.0	3.5	2.5	2.4:1	11.00	6160
5	5.0	3.0	4.0	2.8:1	12.00	8096
6	5.0	2.5	3.0	3.2:1	11.5	6424
7	4.5	3.5	3.0	2.3:1	11.00	4312
8	4.5	3.0	2.5	2.6:1	10.00	6820
9	4.5	2.5	4.0	3.1:1	11.00	7480
K1	6307	5368	7069			
K2	6893	7685	6292			
K3	6206	6350	6042			
极差 R	687	2317	1027			

表2 调控试验结果

试验条件					试验结果		
罐号	A (%)	B (%)	C (%)	空列	T ₁ (u/ml)	T ₂ (u/ml)	两次和 T
1	0.1	0.1	1	1	8360	8800	17160
2	0.1	0.5	5	2	10208	8800	19008
3	0.1	1	10	3	4180	4752	8932
4	0.2	0.1	10	2	6600	7040	13640
5	0.2	0.5	1	3	12100	9900	22000
6	0.2	1	5	1	12408	12100	24508
7	0.4	0.1	5	3	11660	13024	24684
8	0.4	0.5	10	1	5500	6160	10560
9	0.4	1	10	2	7480	7920	15400
k1	45100	55484	54560	52228			
k2	60148	51568	68200	48048			
k3	50644	48840	33132	55616			

A. 植酸钙; B. Tween-80; C. 蚕蛹水解液

三种基本成份中影响较大的是豆饼粉,影响最不显著的是玉米粉。豆饼粉能促使蛋白酶分泌,这可能与微生物在土壤中长期适应分解天然有机氮化合物这一特性有关;麸皮富含各种生长因子,能促进菌体生长,麸皮量不足则

限制菌体增殖,从而降低酶产量。玉米粉主要提供碳源,在一定碳氮比的范围内对枯草杆菌产酶影响不大。

2.2 发酵过程调控

从图1可知,菌体生长过稳定期(22.5—

26.5h)后,随着菌体的衰减,产酶上升到最高点(32h),仅稳定几个小时后即迅速衰减,且26h后上升的幅度不高,仅17.6%。此种状况对工业发酵不利,难以控制放罐时间。为此应对发酵过程进行调控,使菌体生长延滞期增长,产酶期持续增长一段时间。本研究采取的对策

是在发酵中期(20h)流加植酸钙、吐温-80、蚕蛹水解液。试验方法仍采用L₉(3⁴)摇瓶正交试验,试验结果见表2。

经各因素自由度和平方和的分解,得到下面的方差分析表^[7]。

表3 方差分析表

变异来源	自由度	平方和	方 差	F	F0.05	F0.01
区组	1	67222	67222			
A 因素	2	19305792	9652986	12.21*	4.46	8.65
B 因素	2	3717765	1858883	2.35	4.46	8.65
C 因素	2	104165189	52082595	65.88*	4.46	8.65
空列 e1	2	4790309	2395155	3.03	4.46	8.65
误差 e2	8	6324483	790560			

注：“*”表示差异极显著

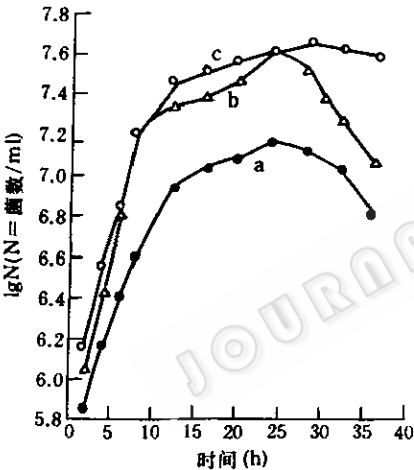


图2 不同培养基下的生长曲线
a. 基本培养基, b. 优化培养基,
c. 优化培养基, 补料

从表3可见A因素,C因素对酶活产生极显著的影响。方差分析可知,最优补料液配比为蚕蛹水解液5% 植酸钙0.2%、吐温-80 0.1%。

蚕蛹水解液富含各种氨基酸和生长因子,对发酵中后期促进菌体继续生长、产酶高峰期延后起了重要作用。但蚕蛹水解液过多,所含某些氨基酸浓度过高,对发酵产生抑制作用。文献报道,脯氨酸、异亮氨酸、谷氨酸、天门冬氨酸对枯草菌蛋白酶合成有强烈的抑制作用

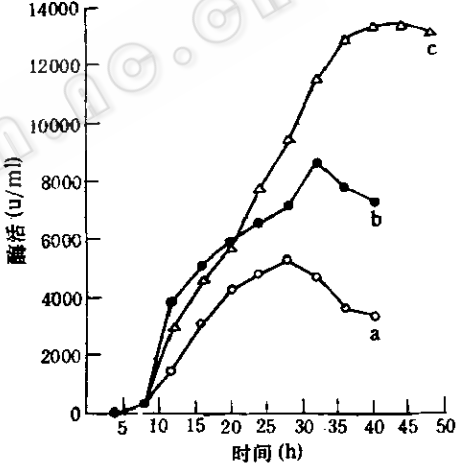


图3 不同培养基下的产酶曲线
a. 基本培养基, b. 优化培养基,
c. 优化培养基, 补料

用^[4]。另外,流加蚕蛹水解液过多,使碳氮比显著下降,从而也影响了菌体产酶。

植酸钙既提供生长因子肌醇,又提供Ca²⁺。肌醇能改善细胞膜通透性利于胞外蛋白酶分泌。李传友等人对枯草杆菌N₁₀₂₅研究表明Mg²⁺、Ca²⁺、Fe²⁺对产酶有促进作用^[5],而章亭州等对BS₃₂₁₀研究表明Ca²⁺对蛋白酶合成有抑制作用^[4]。本实验表明Ca²⁺含量低有激活作用,Ca²⁺含量高对产酶有抑制作用。笔者认为:由于中性蛋白酶活性中心是Zn²⁺^[6],Ca²⁺含量

过高可能会部分取代活性中心 Zn^{2+} , 从而使蛋白酶活性降低。脯氨酸等有机酸对中性蛋白酶的抑制, 除了抑制发酵酶系外, 和 Zn^{2+} 的螯合反应也起了一定的作用。

吐温是一种表面活性剂, 一方面它能改善菌体细胞膜的通透性, 同时在发酵过程中有消泡作用, 更重要的是由于其和菌体的表面作用, 使得溶氧增大。由于发酵过程通风量控制得较好, 这种作用就不显著。从成本考虑, 实际生产上可不加吐温。

2.3 2L 罐对比发酵试验

综上所述, 枯草芽孢杆菌 HD-401 中性蛋白酶发酵优化工艺为:

培养基 (%): 玉米粉 5、豆饼粉 3、麸皮 4、 Na_2HPO_4 0.4、 KH_2PO_4 0.03, 自然 pH 值, 发酵温度 30℃。

风量控制: 0—8h, 1: 0.4vvm; 8—20h, 1: 0.6vvm; 20h 以后, 1: 0.8vvm。

20h 时流加补料: 动物蛋白水解液 5%、植酸钙 0.2%、Tween80 0.1%。

在其他条件相同前提下 (a) 基本发酵培养基, (b) 优化培养基和 (c) 优化培养基流加补料在 2L 罐中进行对比发酵试验, 其菌体生长和产酶动力学曲线见图 2、图 3。

从图中发现, 当培养基 C/N 不适时, 发酵后期菌体生长稳定期较短, 衰减迅速, 从造成产酶增长期亦很短 (见图 2、图 3 中的 a 曲线); 当 C/N 比较合适时, 则菌体生长稳定期增

长, 使得产酶增长期亦增长 (见图 2、图 3 中的 b 曲线); 当中期流加补料时, 产酶的高峰期延长并有一个较长的稳定期。

由此可以清楚地看出, 枯草杆菌胞外蛋白酶的合成是由胞内蛋白 mRNA 控制的。当菌体生长速率降低, 营养限制作用发生, 抑制了 rRNA 的合成, 使得胞内蛋白 mRNA 合成降低; 这一作用的净结果使更多的核心 RNA 聚合酶有效地与胞外蛋白酶专一的 P 因子结合, 从而引起胞外蛋白 mRNA 合成增加而使得胞外蛋白酶合成增加。笔者认为蛋白酶基因的表达受到诸多因素的影响, 如外界条件的改变, 激活因子的存在等等, 同时还可能存在一种类似滴定效应的多元调控机制^[8]。从发酵动力学类型考虑, 中性蛋白酶发酵应属于 Gaden (I) 型^[9]。

参 考 文 献

- [1] 姜铁强. 工业微生物, 1978, 8 (2): 12.
- [2] 郭杰炎. 微生物的酶, 北京: 科学出版社, 1987.
- [3] 史济平, 徐志芳, 钮君健, 等. 工业微生物, 1990, 20 (1): 11.
- [4] 章亭州, 许光辉. 微生物学杂志, 1991, 10 (1): 6.
- [5] 李传友, 张其玖. 微生物学通报, 1988, 15: 12.
- [6] Kornberg H L, Soutar A K. J Biochem, 1973, 134: 489.
- [7] 裴洪平. 生物统计学, 杭州: 浙江教育出版社, 1991.
- [8] 陈超平, 贾盘兴. 微生物学报, 1992, 19 (2): 102.
- [9] Gaden E L. Biotech and Biology, 1959, 1: 413.

STUDY ON THE OPTIMIZATION OF NEUTRAL PROTEINASE FERMENTATION PROCESS

Li Yongquan Zhu Zhicheng Li Xiangsheng

(Hangzhou University, Hangzhou 310028)

Yao Shu Zheng Lianying

(Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract By study on the fermentation conditons of the *Bacillus Subtilis* HD-401 which Produced neutral proteinase, the experimental results showed that the most suitable culture medium was

contained 5% maize flour, 3% been cable, 4% wheat bron, 0.4% Na_2HPO_4 and 0.03% KH_2PO_4 . The control of this process was concentrated on adding silkworm chrysalis hydrolyzat, plant acid calcium and Tween-80 at 20hours by orthogonal experiment, Enzyme activity could raise to 13200 u/ml by adding 0.5% silkworm chrysalis hydrolyzat, 0.2% plant acid calcium and 0.1% Tween-80 in 2L fermentor.

Key words *Bacillus subtilis*, Neutral proteinase, Fermentation process