

海洋低温蛋白酶菌株发酵条件的研究 (II)

迟乃玉^{1,2} 张庆芳¹ 王晓辉³ 窦少华¹ 郑学仿^{1,2}

(大连大学生物工程学院 大连 116622)¹ (大连大学生物有机化学重点实验室 大连 116622)²

(沈阳农业大学生物技术学院 沈阳 110161)³

摘要: 建立了海洋低温蛋白酶菌株 (*Pseudomonas alcaligenes* 简称为 Pa040523) 发酵最适 pH 值、温度、时间、接种量、通气量分别为 5.5、12℃、72 h、7%、170 mL; 在最适发酵条件下, Pa040523 菌株 50L 发酵罐中低温蛋白酶活性为 1,976.2 U/mg。

关键词: *Pseudomonas alcaligenes*, 低温蛋白酶, 发酵条件

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-106-04

Study on Fermentation conditions of a Marine Low Temperature Acid Protease High-production Strain from *Pseudomonas alcaligenes*

CHI Nai-Yu^{1,2} ZHANG Qing-Fang¹ WHANG Xiao-Hui³ DOU Shao-Hua¹
ZHENG Xue-Fang^{1,2}

(College of Bioengineering, Dalian University, Dalian 116622) ¹

(Key Laboratory of Bio-organic Chemistry, Dalian University, Dalian 116622) ²

(College of Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161) ³

Abstract: The fermentation conditions of high Marine low temperature acid protease producing strain Pa040523 were determined in this Paper. The optimum conditions of producing Marine low temperature acid protease were: initial pH 5.5, temperature 12℃, culture time 72 h, inoculum size 7%, aeration 170 ml. Under the optimum conditions, the Marine low temperature acid protease yield of Pa040523 up to 1,976.2 U/mg in 50 L fermentor.

Key words: *Pseudomonas alcaligenes*, Marine low temperature acid protease, Fermentation conditions

海洋是生命的起源; 占地球总面积的 70%; 具有高盐、高压、低温、低光照、寡营养等特点; 90% 的海水平均温度为 5℃ 或更低, 深海的温度一般为 3℃ ± 1℃, 海洋是世界上最大冷藏库。由海洋嗜冷菌和海洋耐冷菌产生的低温酶具有以下 3 个方面生物学特性: ①低温高催化效率; ②高效结构柔顺性; ③热不稳定性。使其在应用上比中温酶、高温酶更有优势; 在农业、环境、食品加工、添加剂等领域蕴藏巨大的应用潜力。据推测海洋微生物可达 0.1 ~ 2 亿种, 但被人们认识的还不足 1%, 由于海洋低温酶分布广泛性、生物学多样性和广泛应用性已经成为 21 世纪世界各国研究的热点, 英、美、法、日等国海洋低温酶的研究已经取得长足发展, 而我国有关低温酶的研究起步较晚、相关的研究报道较少^[1,2]。本文是针对渤海和黄海微生物分布为研究对象, 意在开发海洋低温微生物酶制剂, 本文就海洋低温蛋白酶生产菌株最适发酵条件方面的研究结果作以报道。

1 材料与方法

1.1 菌种

Pa040523 菌株, 大连大学生物工程学院从渤海和黄海分离选育。

1.2 培养基和培养方法

1.2.1 斜面培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基。

1.2.2 种子培养基: 葡萄糖 11 g, 尿素 4 g, 磷酸氢二钾 1 g, 玉米浆 26 g, 定容至 1L。

1.2.3 发酵培养基: 玉米淀粉糖 18 g, 尿素 6 g, 磷酸氢二钾 6 g, 磷酸二氢钾 3 g, 定容至 1L。

1.2.4 培养方法: 在 100 mL 三角瓶中, 装入 30mL 种子培养基, 接入斜面菌种, 10℃ 培养 48 h, 作为液体种子。在 500 mL 三角瓶中, 装入 120 mL 发酵产蛋白酶的培养基, 10℃ 培养 3 d, 取培养液 4,000 r/min 离心, 上清液即为蛋白酶粗酶液, 测定蛋白酶活性。

1.3 分析方法

1.3.1 蛋白酶活性测定方法: Folin-酚法测定酶活。

1.3.2 生物量测定: 100 mL 发酵液, 4,000 r/min 离心 20 min, 蒸馏水清洗 2 次, 60℃ 烘干, 称重。

2 结果与分析

2.1 培养液起始 pH 值对 Pa040523 菌株低温蛋白酶产量的影响

调整发酵培养基的起始 pH 值分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0, Pa040523 菌株低温蛋白酶液体发酵, 结果见图 1。

实验结果表明 (图 1), pH 值达到 5.5 时, 低温蛋白酶产量达到最大值 982.5 U/mg; 当 pH 值再增加, 低温蛋白酶产量开始下降。

2.2 培养时间对 Pa040523 菌株低温蛋白酶产量的影响

在优化条件下, 研究了培养时间对 Pa040523 菌株低温蛋白酶产量的影响, 实验结果见图 2。

实验结果表明, 随培养时间增加, Pa040523 菌株低温蛋白酶产量增加; 当培养时间达到 72 h 时, Pa040523 菌株低温蛋白酶产量达到最大值 1,149.6 U/mg; 当培养时间再增加时, 低温蛋白酶产量略有下降。

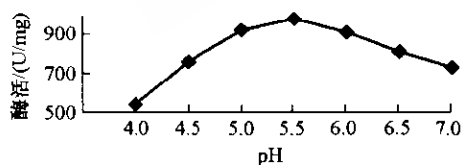


图 1 pH 值对 Pa040523 菌株低温蛋白酶产量的影响

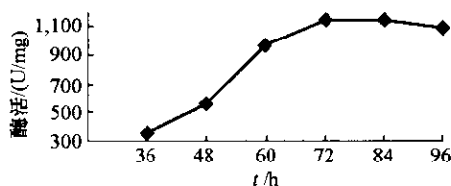


图 2 培养时间对 Pa040523 菌株低温蛋白酶产量的影响

2.3 培养温度对 Pa040523 菌株低温蛋白酶产量的影响

对 Pa040523 菌株低温蛋白酶发酵温度进行研究, 实验结果见图 3。

实验结果 (图 3) 表明, 培养温度为 12℃ 时, Pa040523 菌株液体低温蛋白酶发酵产量达到最大值 1,498.2 U/mg。因此, 确定 Pa040523 菌株低温蛋白酶液体发酵最适温度为 12℃。

2.4 接种量对 Pa040523 菌株低温蛋白酶产量的影响

接种量对发酵产量影响较大。接种量对 Pa040523 菌株低温蛋白酶液体发酵影响, 实验结果见图 4。

由图 4 可以看出, 当接种量达到 7% 时, Pa040523 菌株低温蛋白酶产量达到最大值 1,646.8 U/mg。

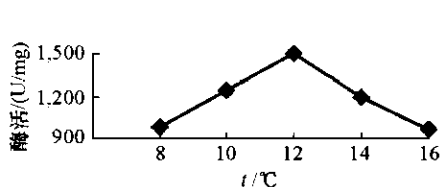


图3 培养温度对 Pa040523 菌株低温蛋白酶产量的影响

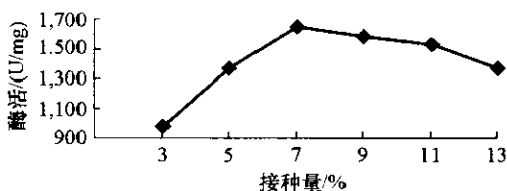


图4 接种量对 Pa040523 菌株低温蛋白酶产量的影响

2.5 通气量对 Pa040523 菌株低温蛋白酶产量的影响

在 500 mL 三角瓶中装入不同体积的发酵液, 考察通气量对 Pa040523 菌株低温蛋白酶液体发酵影响, 实验结果见图 5。

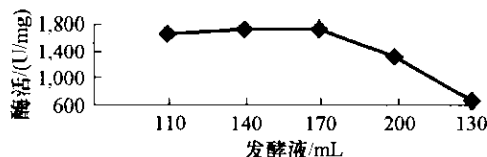


图5 通气量对 Pa040523 菌株低温蛋白酶产量的影响

由图 5 可以看出, 当装液量达到 170 mL 时, 通气量能满足 Pa040523 菌株需要, 低温蛋白酶产量达到最大值 1,732.6 U/mg。

2.6 Pa040523 菌株低温蛋白酶发酵

按发酵培养基^[3]、发酵条件优化后的条件, 进行 Pa040523 菌株低温蛋白酶 50 L 发酵放大实验, 发酵罐内装 30 L 发酵培养基, 4 M

HCl 自动流加控制 pH 值 5.5, 发酵 72 h。Pa040523 菌株 50 L 低温蛋白酶发酵, 酶产量为 1,976.2 U/mg。

3 讨论

蛋白酶是一类重要的工业用酶, 已广泛用于食品、洗涤、皮革、饲料等领域。目前应用的蛋白酶主要为中温蛋白酶, 酶的最适作用温度一般在 50℃ 左右^[4]。然而低温蛋白酶的研究始于 70 年代, 主要倾向于低温碱性蛋白酶和低温中性蛋白酶的研究, 有关低温酸性蛋白酶研究较少^[5,6]。由于低温蛋白酶有着接近自然环境温度的最适反应温度, 对热敏感等特点, 使其具有中、高温蛋白酶无法取代的优越性, 使其在食品、化妆、废物处理、皮革、饲料等领域具有广泛的应用前景^[7,8]。虽然低温蛋白酶在许多领域有着比中、高温蛋白酶更好的应用前景, 但由于低温蛋白酶的研究起步较晚, 还没有得到象中温蛋白酶那么广泛与深入的研究, 因此目前在工业上的应用还有很多空白处。国外如日本、美国等国家, 低温蛋白酶已被用于洗涤、食品等行业^[5,7]。目前低温蛋白酶的研究已经引起世界各国学者们的关注。随着对低温蛋白酶研究的深入, 将会有更多行业应用低温蛋白酶。经多年研究实践表明, 本文报道的 Pa040523 菌株低温蛋白酶酶产量虽然不是处于国内外的领先水平, 但 Pa040523 菌株生长和培养条件要求粗放, 是一株很有生产潜力的菌株。

参考文献

- [1] 孙 谧. 海洋水产研究, 2001, 21 (4): 1~10.
- [2] Davail S. J Biol Chem, 1994, 269 (26): 17448~17453.
- [3] 迟乃玉, 张庆芳, 王晓辉, 等. 微生物学通报, 2006, 33 (1): 114~117.
- [4] 张树政. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社, 1984. 387~449.
- [5] Kamata Y. J Jpn Soc Food Sci Technol, 1992, 39: 102~105.
- [6] Margesin R. J Biotech. 1994, 33: 1~14.
- [7] Margesin R. J Basic Microbio, 1991, 31: 377~383.
- [8] Vazquez S C. Polar Bio, 1995, 15 (2): 131~135.