

文章编号: 1001-7453(1999)02-0023-05

假单胞菌 JW12 脂肪酶的补料分批发酵

陈守文, 徐 柔, 章克昌

(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘要: 研究了假单胞菌 JW12 脂肪酶在 2 L 和 25 L 容积发酵罐的补料分批发酵工艺. 通过调整碳源补加速率, 控制产酶期发酵液 PH 在 8.2 左右, 能有效提高脂肪酶的酶活和表观生产率. 在 25 L 标准发酵罐中, 连续补加吐温-80, 最高脂肪酶酶活为 $129.2 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$, 表观生产率为 15.91.

关键词: 假单胞菌; 脂肪酶; 补料分批发酵

中图分类号: TQ925.6 文献标识码: A

补料分批发酵是在分批培养过程中间歇或连续地补加新鲜培养基的培养方法^[1]. 由于补料分批发酵能够调节发酵培养基中的营养物质浓度, 一方面可以避免某种营养成分由于初始浓度过高而出现底物抑制或阻遏现象, 另一方面能防止某些限制性营养成分在培养过程中被耗尽而影响细胞的生长和产物的形成. 自 20 世纪初开始用于酵母生产以来, 补料分批发酵技术已广泛应用于抗生素、氨基酸、酶制剂、有机酸等的生产领域. 从资料所报道的研究结果看, 采用补料发酵工艺的脂肪酶酶活远高于分批发酵工艺的脂肪酶酶活. 以葡萄糖为碳源的 2 L 罐培养 *Pseudomonas* 生产脂肪酶, 流加培养与未补加培养相比, 脂肪酶产生水平由 $0.173 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 升至 $0.8 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ ^[2]. 通过优化培养 *Pseudomonas aeruginosa* EF2 产脂肪酶的条件, 表明在吐温-80 限量流加培养以及低比生长速率的连续培养中, 脂肪酶活力均可达到最大^[3]. 在培养 *Pseudomonas fluorescens* 的生产过程中, 监测 CO_2 释放速率以估测碳源橄榄油的需求, 或依据浊度自动补加橄榄油和 Fe 离子, 使发酵液的橄榄油底物和细胞中 Fe 离子浓度都处于半缺陷状态^[4,5]. 在各自最优的橄榄油与流加速率比值下, 发酵液的脂肪酶酶活从间歇发酵的 $200 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 分别跃升至 $1980 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 和 $5600 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$. 与传统间歇发酵相比, 补料分批发酵中, 脂肪酶的表观生产率和产率大幅度提高.

在以假单胞菌 JW12 为研究对象、吐温-80 为碳源的摇瓶发酵实验中发现, 高浓度吐温-80 抑制菌体的生长, 脂肪酶表观生产率随着吐温-80 浓度的提高而降低^[6]. 这是由于吐温-80 的分解产物油酸阻遏脂肪酶的产生^[7]. 为了克服高浓度发酵底物吐温 80 对菌体生长的

收稿日期: 1998-03-02; 修订日期: 1999-04-26

基金项目: 国家“九五”攻关项目(96-C03-02-02)

作者简介: 陈守文(1968 年 3 月生), 男, 湖北大冶人, 工学博士, 华中农业大学副教授.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

抑制,即克服高浓度产物油酸对脂肪酶产生的阻遏,本实验中研究了补加吐温-80 或菜油的工艺.找出控制补加吐温-80 或菜油的规律,达到既能保证菌体正常生长又能诱导脂肪酶产生的目的.

1 材料与方 法

1.1 菌种

假单胞菌 JW12 由无锡轻工大学再生资源实验室筛选保藏菌种.

1.2 培养基

种子培养基组成(g/L 或 mL/L): 橄榄油 5,玉米浆 20,蛋白胨 5, K_2HPO_4 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5; pH8.5.

发酵培养基组成(g/L 或 mL/L): 豆饼粉 20,玉米浆 20, $NaNO_3$ 10, K_2HPO_4 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1, 泡敌 0.5; 变化碳源成分.

1.3 培养方法

取一环活化的斜面种子至种子培养基中,培养 14 h 后以 1% 的接种量转接至发酵培养基,其中 2 L 或 25 L 容积发酵罐装填系数为 70%. 30℃ 下发酵一定时间后开始补加碳源,观察不同补加模式对发酵的影响. 2 L 罐的通气速率为 $1.1 \sim 2.2 L/(L \cdot min)$, 转速为 $400 \sim 1000 r/min$. 25 L 罐的通气速率为 $0.67 L/(L \cdot min)$, 转速为 $400 r/min$.

1.4 脂肪酶活力测定

以酸碱滴定法测定,参照文献[8].

取 100 mL 的三角瓶两只(样品瓶和空白瓶),分别加 4% PVA 橄榄油乳化液 4 mL 和 $0.05 mol/L$ 、pH 9.0 的甘氨酸缓冲液 5 mL,置 40℃ 水浴内预热 5~10 min. 在样品瓶中加入 1 mL 酶液,立即计时,反应 15 min 后立即加入 95% 的乙醇 15 mL 中止反应. 空白瓶先加入乙醇,其余同样品瓶. 以酚酞为指示剂,用 $0.05 mol/L$ 的 NaOH 溶液滴定样品和空白至终点,记录所消耗的体积之差. 在 40℃、pH 9.0 的条件下,1 min 内脂肪酶水解脂肪产生 $1 \mu mol$ 游离脂肪酸所需的酶定义为一个活力单位($\mu mol/min$)

1.5 表观生产率的计算

表观生产率= 脂肪酶酶活/ $W_{有效碳源}$

其中吐温-80 中含有的有效碳源(油酸)的百分比为 21.5%.

2 结果与分析

2.1 2 L 罐发酵过程间歇补加吐温-80 对发酵的影响

摇瓶间歇补加发酵实验结果表明^[6],通过补加吐温-80 可显著提高脂肪酶的发酵单位和表观生产率. 因此选择 2 L 容积台式发酵罐,研究在该罐中吐温-80 的补加对发酵的影响. 初始碳源为吐温-80,其质量浓度为 $0.5 g/dL$. 分别在发酵第 6, 12, 7, 24 小时,补加吐温-80,每次补加量为 0.5%. 发酵过程曲线见图 1.

从图 1 中可以看出,在发酵第 6 小时,由于补加了吐温-80,导致 pH 从 8.22 急剧下降,至第 24 小时又开始回升至 7.94,此阶段脂肪酶酶活缓慢升高. 在第 24~27 小时的短暂时间内,pH 升至 8.41,脂肪酶酶活急剧上升,最高脂肪酶酶活达 $60.6 \mu mol/(min \cdot mL)$,表观生产率为 14.09;在第 27 小时以后,pH 继续升高,脂肪酶酶活略有下降,然后随着菌体的自

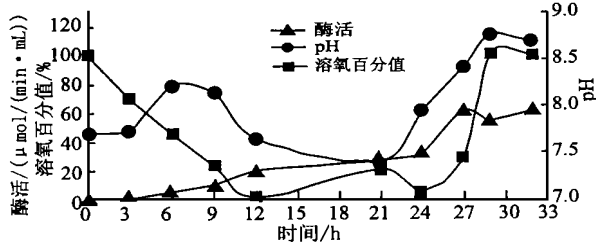


图1 2 L 罐间歇补加吐温-80 对发酵的影响

溶而提高. 以上实验结果表明, 菌体生产期的发酵液在 pH 值大于 8 时, 才大量产生脂肪酶. 接着考察了在初始发酵培养基中添加油酸对菌株产酶影响的试验, 表明油酸的加入显著推迟了菌株的脂肪酶的生产^[7]. 据推测, 在低 pH 发酵状态时, 发酵液中存在足够量的吐温-80 分解产物——油酸, 阻遏了菌体

脂肪酶的大量产生, 表明发酵液的 pH 值和产酶有很强的相关性.

2.2 2 L 罐发酵过程连续补加吐温-80 对发酵的影响

在 2 L 罐间歇补加工艺的研究中发现, 间歇补加吐温-80 时, 可导致发酵液的 pH 值急剧下降. 脂肪酶的产生受吐温-80 分解产生大量油酸的阻遏, 实际生产脂肪酶的高峰期很短. 为了克服油酸的阻遏, 选用连续流加吐温-80 工艺, 初始碳源为吐温-80, 质量浓度 0.5 g/dL, 发酵 6 h 后, 开始连续流加吐温-80, 流加速率根据 pH 控制. 发酵结束后吐温-80 的总补加量为 1%, 观察连续流加吐温-80 对发酵的影响, 结果见图 2.

从图 2 中可以看出, 当发酵液的 pH 在 8.2 ~ 8.37 时, 脂肪酶酶活得到大幅度的提高. 在第 21 小时达到最大值, 脂肪酶酶活为 $89.9 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$, 表观生产率为 27.0. 以上实验结果表明, 连续补加吐温-80, 可减缓吐温-80 的产物对菌株产酶的阻遏效果, 提高脂肪酶的产量.

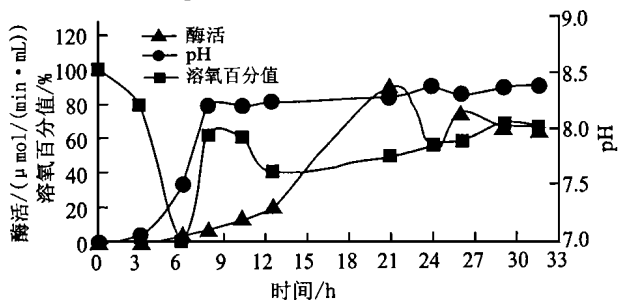


图2 2 L 罐连续补加吐温-80 对发酵的影响

2.3 25 L 容积标准发酵罐连续补料对发酵的影响

当完全以吐温-80 作为碳源, 上 25 L 罐发酵易导致产生大量泡沫, 引起发酵液溢罐(实验数据略), 因此吐温-80 不适宜作为上罐发酵的基础原料. 因此选用菜油为出发碳源(初始质量浓度为 0.5 g/dL), 研究不同碳源连续补料对发酵的影响.

2.3.1 25 L 容积标准发酵罐连续补加菜油对发酵的影响

通过 2 L 罐的补加工艺的研究发现, 菌体产酶的最适 pH 为 8.2. 因而通过检测发酵液的 pH 值控制菜油的流加速率, 确保发酵液的 pH 在 8.2 左右. 在第 15 小时时, 开始补加菜油, 发酵结束后菜油的总补加量为 1.7%, 发酵过程曲线见图 3. 可知, 发酵至第 3~12 小时, 菌体处于旺盛生

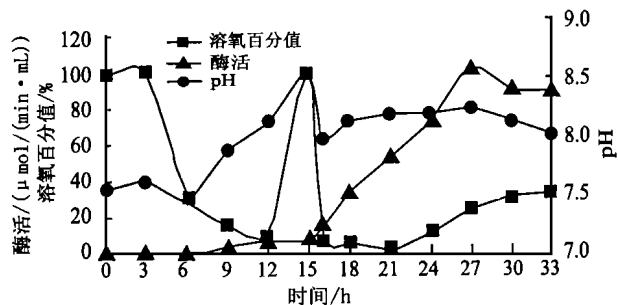


图3 25 L 罐连续补加菜油对发酵的影响

长期, 耗氧大, 发酵液 pH 在 7.47 ~ 8.13 之间波动, 不产生脂肪酶. 第 12~15 小时, pH 值在 8.13 ~ 8.53 之间, 菌体耗氧低, 微弱产生脂肪酶. 在第 15 小时以后开始流加菜油, 并控制发

酵液 pH 在 8.12~8.22 之间波动, 菌体处于旺盛生长期, 耗氧高, 此时大量产生脂肪酶. 第 30 小时以后, 发酵液 pH 在 7.91~8.13 间波动, 菌体开始衰亡, 耗氧低, 脂肪酶酶活下降. 以上分析结果表明, 发酵液 pH 在 8.12~8.22 时, 菌体进入旺盛生长状态, 大量产生脂肪酶, 最高脂肪酶酶活为 $102.55 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$, 表观生产率为 6.0. 此外溶氧百分值反映了菌体生长状态, 并与菌体产酶有一定的相关性.

2.3.2 25 L 容积标准发酵罐连续补加吐温-80 对发酵的影响 作为假单胞菌 JW12 的碳源, 吐温-80 与菜油相比是较难利用的, 因为其诱导产酶的能力强^[6]. 在 25 L 容积标准发酵罐中, 以吐温-80 作为补加的碳源, 第 17 小时后开始连续补加吐温-80, 补加速率依据发酵液的 pH 而改变, 吐温-80 的总补加量为 1.45%. 观察连续补加吐温-80 对发酵产酶的影响, 结果见图 4. 可知, 在发酵第 7~17 小时, 菌体处于旺盛生长期, 耗氧量大, 发酵液 pH 值从 7.52 升至 8.15, 菌体开始产生脂肪酶. 第 17~31 小时, 菌体耗氧量低, 发酵液 pH 值在 8.15~8.47 之间波动, 菌体大量产生脂肪酶. 第 31 小时后, 发酵液酶活开始下降. 以上分析表明, 连续补加吐温-80, 使发酵液的 pH 值在 8.15~8.47 之间, 菌体处于弱生长状态, 可诱导菌体大量产酶, 最高脂肪酶酶活为 $129.2 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$, 表观生产率为 15.9.

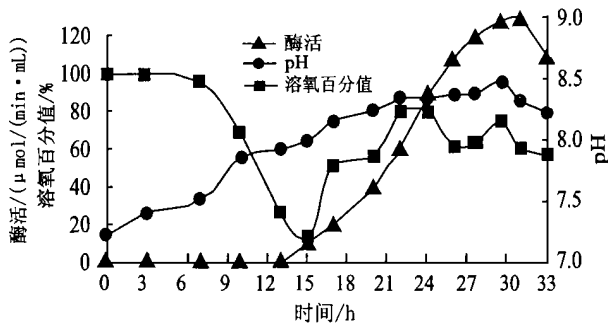


图 4 25 L 罐连续补加吐温-80 对发酵的影响

3 讨论

通过碳源补料分批培养工艺的研究可知, 依据发酵液 pH 值的变化控制补加碳源速率, 控制产酶期发酵液 pH 值在 8.2 左右, 能大幅度诱导脂肪酶的产生. 推测其控制机理: 在该发酵条件下, 由于易分解利用的底物分解产物——脂肪酸的含量低, 使菌体呈半饥饿状态, 从而达到了解除分解代谢阻遏的作用. 阻遏脂肪酶产生的脂肪酸浓度还有待进一步分析测试. 通过对吐温-80 不同补加方式的比较, 表明了连续流加方式优于间歇补加方式. 此外发酵液的溶氧百分值反映了菌体生长状态, 并与菌体产酶有一定的相关性. 控制发酵液 pH 在 8.2 左右, 对不同的原料连续补加, 使发酵液相应呈现不同的溶氧. 对于吐温-80, 菌体呈现弱生长状态; 而对于菜油, 则由于菌体的易利用等特性, 而呈现相对强生长状态. 因而作者认为也可以根据发酵液溶氧百分值的变化规律, 达到控制碳源补加速率的目的.

参考文献:

[1] 俞俊棠, 唐孝宣主编. 生物工艺学[M]. 上海: 华东化工学院出版社, 1991.
[2] SMITH CATHERINE J. Production of a lipase from a Pseudomonas species[D]. United Kindom: Cranfield Institute of Technology, 1991.
[3] GILBERT J E, DROZD J W, JONES C W. Physiological regulation and optimization of lipase activity in Pseudomonas aeruginosa EF2[J]. J Gen Microbiol. 1991, 137: 2215~2221.
[4] TAKAHIRO SUZUKI, YOSHINAO MUSHIGA, TAMANE, et al. Mass production of lipase by fed-

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://

- batch culture of *Pseudomonas fluorescens*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**. 1998, 27: 417 ~ 422.
- [5] KAZU TO ISHIHARA, TAKZHIRO SUZUKI, TSUNEO YAMANE, ed al. Effective production of *Pseudomonas fluorescens* lipase by semi-batch culture with turbidity-dependent automatic feeding of both olive oil and iron ion[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**. 1989, 31: 45 ~ 48.
- [6] 陈守文, 李晓辉, 徐柔等. 碳源对假单胞菌 JW12 脂肪酶生产的影响[C], 第二届全国发酵工程学术论文集. 第二届全国发酵工程学术研讨会, 无锡, 1998.
- [7] 陈守文. 细菌脂肪酶的研究[D]. 无锡: 无锡轻工大学, 1998.
- [8] 张树政主编. 酶制剂工业(下册)[M], 北京: 科学出版社, 1984.

Production of *Pseudomonas SP.* JW12 Lipase by Fed-batch Culture

CHEN Shou-wen, XU Rou, ZHANG Ke-chang

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract: Production of *Pseudomonas sp.* JW12 lipase by fed-batch culture was studied in 2 L and 25 L fermentors. When we controlled supernate pH value at 8.2 or so by adjusting carbon source feeding velocity, lipase activity and productivity_{app} were increased effectively. Lipase of 129.2 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$, productivity_{app} of 15.91 were obtained by feeding Tween 80 culture in a 25 L fermentor.

Key words: *Pseudomonas*; lipase; fed-batch culture