

文章编号 :1009-038X(2000)03-0213-03

圆弧青霉产碱性脂肪酶的中试发酵*

李江华¹ 鄢敏辰² 鄢显章¹

(1. 无锡轻工大学中央研究所,江苏无锡 214036; 2. 复旦大学生物化学系,上海 200433)

摘 要 :圆弧青霉 PG37 是碱性脂肪酶的高产菌,在摇瓶和 25 L 发酵罐小试的基础上进行 3 M³ 发酵罐中试. 适合的发酵条件为:发酵培养基(%) 豆饼粉 3.0,玉米浆 3.0,磷酸氢二钾 1.0,硫酸镁 0.1,大豆磷脂 0.5,柠檬酸钠 0.05,花生油 0.2;发酵起始 pH 值为 8.0,发酵温度 29±1℃,接种量 8%~10%,通风量 0.8 L/(L·min),搅拌转速 240 r/min,发酵周期 72 h,期间于 30、42、54 h 分别各流加 0.4% 花生油. 在上述条件下,圆弧青霉 PG37 发酵酶活达 2 000 μmol/(min·mL).

关键词 :碱性脂肪酶;圆弧青霉;发酵

中图分类号:TQ925.6 文献标识码:A

The Fermentation Process of Alkaline Lipase by *Penicillium cyclopium* PG37 in Fermentor

LI Jiang-hua¹, WU Min-chen², WU Xian-zhang¹

(1. Central Research Institute, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036; 2. Department of Biochemistry, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract : *Penicillium cyclopium* PG37 could produce high yield alkaline lipase, whose fermentation conditions in 3M³ agitation fermentor were studied on the basis of agitation flask and 25 L fermentor tests. The experimental results showed that the optimal fermentation conditions were as follows, medium consisted of 3.0% soybean meal, 3.0% corn steep liquor, 1.0% K₂HPO₄, 0.1% MgSO₄, 0.5% soybean lecithin, 0.05% sodium citrate, and 0.2% peanut oil. The cultivation was carried out at the conditions of 29±1℃ with pH 8.0 in initial, 8%~10% inoculum size, 240 r/min agitation speed, and air volume 0.8 L/(L·min) for 72 h, during which 0.4% peanut oil was fed at 30, 42, and 54 hour respectively. With these conditions, the alkaline lipase yield by *Penicillium cyclopium* PG37 was about 2 000 μmol/(min·mL)

Key words : alkaline lipase; *Penicillium cyclopium*; fermentation

碱性脂肪酶是酶制剂工业中的重要酶种,主要应用于洗涤剂 and 皮革工业中,具有较大的市场潜力^[1~4]. 作者采用理化诱变相结合的方法,获得了

碱性脂肪酶的高产菌种圆弧青霉 PG37^[5,6],通过小试工艺条件的优化,摇瓶和 25 L 发酵罐的发酵酶活达到 2 000 μmol/(min·mL) 左右^[7]. 在此基础上进

* 收稿日期:1999-05-12;修订日期:2000-03-01.

基金项目:国家“八五”科技攻关项目资助课题(85-08-03-07).

作者简介:李江华(1966年4月生),男,江西九江人,工学硕士,助理研究员.

行 3 m³ 发酵罐中试扩大试验 ,为实现碱性脂肪酶工业化生产打下了一定的基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 圆弧青霉的白色变株 PG37.

1.1.2 培养基 1)麸皮种子培养基 3L 的三角瓶中装 150 g 麦麸和 150 mL 水 ,拌匀后在 0.1 MPa 条件下灭菌 1 h.2)液体种子培养基(%) 豆饼粉 3.0 ,玉米浆 3.0 ,大豆磷脂 0.5 ,磷酸氢二钾 0.5 ,硫酸镁 0.3 ,豆油 1.0 pH 自然 0.1 MPa 灭菌 30 min.3)发酵培养基(%) 豆饼粉 3.0 ,玉米浆 3.0 ,磷酸氢二钾 1.0 ,硫酸镁 0.1 ,大豆磷脂 0.5 ,柠檬酸钠 0.05 ,花生油 0.2 pH 8.0 0.1 MPa 灭菌 30 min.

1.2 设备

1.2.1 种子罐 容积760 L ,H/D=2.6 ,二层平叶涡轮搅拌器 ,最大搅拌转速 400 r/min 3 组挡板 ,夹套换热.

1.2.2 发酵罐 容积3 m³ ,H/D=2.0 ,二层平叶涡轮搅拌器 ,转速 240 r/min 4 组挡板 ,夹套换热.

1.3 方法

1.3.1 三角瓶麸皮孢子的制备 灭菌后的麸皮中接入一环孢子 ,摇匀 28~30 ℃ 培养 3~5 d ,待麸皮上布满白色的孢子即为成熟.

1.3.2 种子罐种子制备 760 L 种子罐中装入种子培养基 ,121 ℃ 灭菌 30 min ,冷至 28 ℃ 接入一瓶麸皮孢子 ,于 29±1 ℃ 培养 20~24 h ,搅拌转速 300 r/min ,通风量为 0.6 L/(L·min) .

1.3.3 3 m³ 罐的发酵工艺条件 将发酵培养基 (按 1.5 m³ 配料)装入发酵罐 ,121 ℃ 灭菌 30 min ,冷至 28 ℃ 接种液体种子 ,培养时间 72 h ,培养温度 29±1 ℃ ,搅拌转速 240 r/min ,通风量 0.8 L/(L·min) ,发酵过程中补加 1.2% 的花生油.

1.3.4 碱性脂肪酶活力的测定 见文献 [6] .

2 结 果

2.1 接种量及产酶的影响

用培养 20 h 的液体种子接种 ,结果以 8%~10% 的接种量为好 ,见图 1.

2.2 通风量对产酶的影响

不同的通风量对产酶的影响见图 2 ,较合适的通气量为 0.8 L/(L·min) .

2.3 发酵培养基 pH 值对产酶的影响

发酵培养基起始 pH 值的控制对产酶也很重

要 ,结果见表 1.较适合的起始 pH 值为 8.0 ,比小试的 pH 值高^[7] ,这可能与培养基的灭菌方式不同有关.

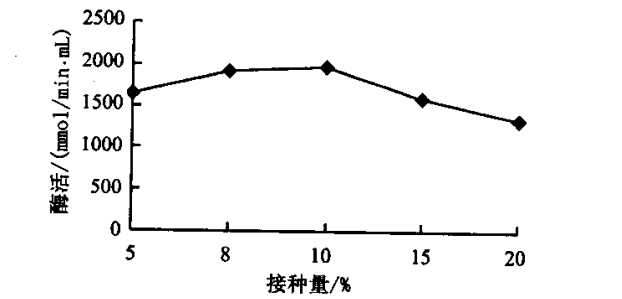


图 1 接种量对产酶的影响

Fig.1 Effect of inoculum volume on lipase production

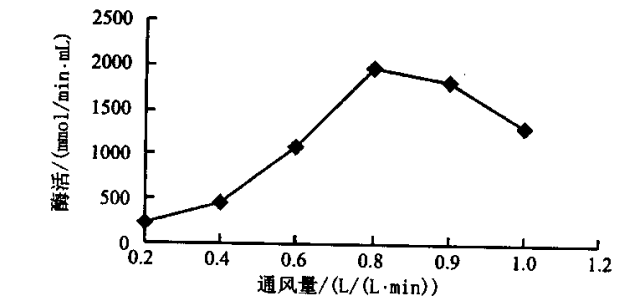


图 2 通风量对产酶的影响

Fig.2 Effect of air volume on lipase production

表 1 发酵培养基 pH 值对产酶的影响

Tab.1 Effect of medium pH on lipase production

培养基灭菌前 pH 值	发酵周期/h	放罐 pH 值	发酵酶活/(μ mol/min·mL)
6.5	72	6.5	320
7.0	72	6.8	730
7.5	72	7.2	1 460
8.0	72	7.5	1 920
8.5	72	8.2	1 210

2.4 流加油对产酶的影响

摇瓶小试中发现 ,在发酵过程中补加一定量的花生油可以提高圆弧青霉 PG37 的产酶水平(见表 2) .

表 2 流加油对产酶的影响

Tab.2 Effect of feeding oils on lipase production

加油方式	发酵周期/h	放罐 pH 值	发酵酶活/(μ mol/min·mL)
24、36、48h 各加 0.4%	72	8.0	1 060
24、42、60h 各加 0.4%	72	7.8	1 250
30、42、54h 各加 0.4%	72	7.5	1 920
36、48、60h 各加 0.4%	72	7.8	1 520

在 3 m³ 罐中试仍采用流加油工艺 ,流加油的次数和量与小试相同 .由于 3 m³ 罐的发酵周期比摇瓶短 ,因此加油的起始时间和间隔时间也相应的有所不同 .从表 2 可以看出 ,在发酵 30、42 和 54 h 各补加 0.4% 的油 ,PG37 的产酶水平较高 .

2.5 发酵过程曲线

采用上述工艺条件 ,PG37 菌株在 3 m³ 发酵罐中过程曲线见图 3 .

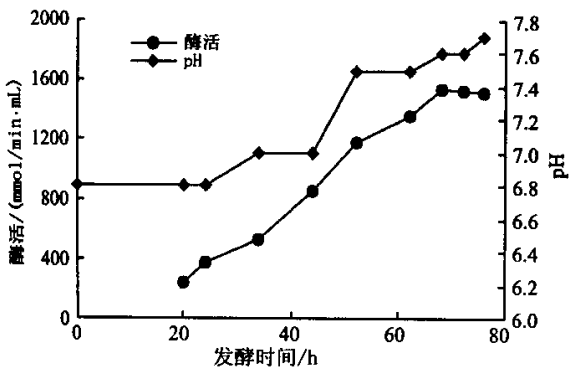


图 3 3 m³ 罐的发酵过程曲线

Fig.3 Time course of batch culture in 3 m³ fermentor

2.6 连续发酵结果

以上述工艺条件进行连续 4 批试验 ,结果见表 3 . PG37 的平均发酵酶活在 2 000 μmol/(min · mL)

左右 ,发酵结束的 pH 值在 7.4~7.6 之间 .

表 3 3 m³ 罐稳产试验结果

Tab.3 Result of parallel experiment in 3 m ³ fermentor			
罐批号	发酵周期/ h	放罐 pH 值	发酵酶活/ (μmol/(min · mL))
950102	72	7.5	1 915
950103	72	7.4	2 040
950201	72	7.4	2 040
950202	72	7.4	1 926
平均	72	7.5	1 981

3 结 论

综合中试过程 ,作者得出以下结论 :

- 1) 通风量和发酵培养基的 pH 值对 PG37 的发酵产酶水平影响较大 .
- 2) 采用合适的流加油发酵工艺 ,能明显提高 PG37 的发酵产酶水平 .
- 3) 采用合适的工艺条件 ,PG37 在 3 m³ 发酵罐中发酵 72 h ,发酵酶活稳定在 2 000 μmol/(min · mL)左右 .

参考文献

[1] WATANABE N , OTA Y , MINODA Y. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms , cultural conditions and some properties of crude enzymes[J]. *Agric Biol Chem* , 1977 , 41(8) :1353~1358

[2] YOSHITAKA K , HARUO M , SHINJIRO I. Studies on alkaline lipase ; Isolation and identification of lipase producing microorganism[J]. *Agric Biol Chem* , 1982 , 46(5) :1159~1164

[3] BOEL E , HUGE - JENSEN B , WOLDIKE H F , et al. Cloning and expression of industrially important fungal lipases[J]. *GBF monogr .(lipases)* , 1991 , 16 :207~219

[4] SAAD R. Production of lipase from *Aspergillus tamarii* and its compatability with commercial detergents - culture medium and formation conditions optimization for enzyme production for use in Surfactant composition[J]. *Folia Microbiol* , 1995(2) , 40 : 263~266

[5] 李江华 . 碱性脂肪酶菌种改良及其发酵工艺的研究 [D]. 无锡 :无锡轻工业学院 , 1992 .

[6] 李江华 , 鄢敏辰 , 鄢显章 . 用筛选抗性突变株法选育碱性脂肪酶的高产菌 [J]. 无锡轻工大学学报 , 1999 , 18(3) :7~11

[7] 李江华 , 鄢显章 , 鄢敏辰 . 圆弧青霉 PG37 碱性脂肪酶发酵工艺条件的研究 [J]. 无锡轻工大学学报 , 2000 , 19(2) :102~107

(责任编辑 朱 明)