

文章编号 :1009-038X(2003)03-0089-04

耐热芽孢杆菌 XJT9503 高温中性蛋白酶的 中试发酵工艺

活 泼¹, 茆 军², 石玉瑚²

(1. 浙江科技学院 生化系, 浙江 杭州 310012; 2. 新疆农科院微生物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘 要:对耐热芽孢杆菌(*Thermophilic bacillus*)XJT9503 保藏、菌种活化、种子培养基和发酵培养基及 7, 25, 250, 3 000 L 发酵罐的中试发酵工艺参数进行了研究, 确定了耐热芽孢杆菌 XJT9503 高温中性蛋白酶的中试发酵工艺。在 3 000 L 发酵罐上控制罐温为 46 ℃、转速 180 r/min、通气量 4 L/(L·min) 培养 18 h 后发酵酶活最高达 13 240 U/mL。

关键词:耐热芽孢杆菌; 高温中性蛋白酶; 发酵工艺

中图分类号: TQ 920.6

文献标识码: A

Study on the Pilot Fermentation Technology of the XJT9503 Thermostable Neutral Protease

HUO Po¹, MAO Jun², SHI Yu-hu²

(1. Department of bio-chemistry, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310012, China; 2. Xinjiang Agriculture Academy of Science, Wulumuqi 830000, China)

Abstract: In order to industrialize the XJT9503 thermostable neutral protease, the strain preservation and activation methods, seed medium, fermentation medium and fermentation technologies under various scales (7, 25, 250, 3 000 L) were studied. The optimal pilot fermentation conditions were determined. A maximum enzyme productivity of 13 420 U/mL in a 3 000 L fermentor was obtained at 18 h under the fermentation conditions of 46 ℃, 180 r/min, and 4 L/(L·min).

Key words: *Thermophilic bacillus*; thermostable neutral protease; fermentation technology

中性蛋白酶是最早被发现并广泛应用于生产的, 如用于皮革脱毛、软化、畜血蛋白水解、果酒、啤酒和饮料中蛋白质去除以及医药工业等^[1~4]。但由于一般中性蛋白酶不耐热, 稳定性差, 因而限制了它的工业化生产和应用范围。高温中性蛋白酶不仅具有一般中性蛋白酶的特性, 还具有良好的热稳定性, 对温度和 pH 的适应范围较广, 对人体的皮肤和

气管的刺激作用小, 弥补了一般中性蛋白酶的不足, 简化了生产工艺和酶制剂保藏及使用条件。所以在 20 世纪 70~90 年代, 国内外科学家都致力于高温中性蛋白酶的研究与开发, 成为酶制剂新的热点^[5~8]。XJT9503 高温中性蛋白酶, 是从新疆吐鲁番火焰山土壤里分离筛选到的一株耐热芽孢杆菌产生的。其最适反应温度 65 ℃, 最适 pH 值为 7.2。

收稿日期 2003-02-26; 修回日期 2003-03-17。

作者简介: 活泼 (1962-), 女(锡伯族), 新疆伊犁人, 副研究员, 工学博士。

万方数据

在对耐热芽孢杆菌 XJT9503 的特性、产酶条件及酶学特性进行系统研究的基础上,为使 XJT9503 高温中性蛋白酶产业化,对 XJT9503 高温中性蛋白酶进行了中试工艺研究.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 耐热芽孢杆菌 XJT9503,从新疆吐鲁番火焰山土壤里分离筛选而得.

1.1.2 斜面培养基 组分(g/dL):牛肉膏 3,蛋白胨 10,氯化钠 5,琼脂 20.

1.1.3 种子培养基 组分(g/dL):玉米粉 2,豆饼粉 1,磷酸氢二钠 0.4,硫酸镁 0.02,氯化钙 0.02.

1.1.4 发酵培养基 组分(g/dL):玉米粉 2,豆饼粉 1,葡萄糖 0.5,磷酸氢二钠 0.4,碳酸钠 0.085,硫酸镁 0.02,氯化钙 0.02.

1.1.5 仪器设备 气浴恒温振荡器、离心机、SCS-24 摇床、生化培养箱、紫外可见分光光度计,7,25 250 L 全自动发酵罐及 3 000 L 发酵罐.

1.2 实验方法

1.2.1 菌种保藏 采用矿物油和真空冷冻保藏法.

1.2.2 菌种复壮 取保存菌株,用接种针刮取或挑取少量于固体斜面培养基上,46℃下培养 12 h,连续活化 2~3 次,再进行菌株产酶能力的测定.

1.2.3 摇瓶种子培养 将活化好的菌株挑取一环接种于装有 150 mL 种子培养基的 500 mL 摇瓶中,置于 46℃、200 r/min 摇床上培养 16 h.取样,将种子液稀释 10 倍后在 550 nm 处测得 OD 值大于 0.6 即可.

1.2.4 一级种子培养 按照种子培养基配方,称取物料,加入 25 L 种子培养罐中,115℃灭菌 25 min,用水冷却到 50℃后自然降温,当降至 46℃时,将摇瓶种子以 2%的接种量接入培养.

1.2.5 二级种子培养 按照种子培养基配方,称取物料,加入 250 L 种子培养罐中,115℃灭菌 25 min,用水冷却到 50℃后自然降温,当降至 46℃时,将一级种子以 5%的接种量接入培养.

1.2.6 3 000 L 发酵罐发酵 按照发酵培养基配方,称取物料,加入 3 000 L 发酵罐中,115℃灭菌 30 min,用水冷却到 50℃后自然降温,当降至 46℃时,以 5%的接种量接入种子培养.

1.2.7 放罐标准 发酵酶活达 10 000 U/mL 以上,还原糖含量低于 0.5%,镜检有大量芽孢产生时即可终止发酵.

1.2.8 酶活测定 采用 QB/T1803-93,工业酶制剂通用实验方法,根据 XJT9503 高温中性蛋白酶的特性,温度定为 65℃,pH 值为 7.2.

2 结果与讨论

2.1 菌种的保藏和复壮

2.1.1 菌种保藏 对矿物油和真空冷冻保藏法进行了试验,结果见表 1.

表 1 不同保藏方法对菌株存活率的影响

Tab.1 Effect of different preservation methods on the strain survival rate

保存时间/d	矿物油中存活率/%	真空保藏中存活率/%
7	99	99
30	98	99
180	80	99

由表 1 可看出,矿物油只能用于短期菌种保存,要长期保存菌种必须采用真空冷冻保藏,才能保持菌种的高存活率.

2.1.2 菌种复壮 取保存菌株,用接种环挑取少量,接于固体 LB 培养基上,于 46℃下培养 12 h,连续活化 2~3 次,再进行菌株产酶能力的测定.

2.2 7 L 容积发酵罐的发酵工艺参数确定

在摇瓶发酵最佳培养基的基础上,对发酵培养基进行了进一步筛选与优化,并对菌种活性进行检测.实验发现,XJT9503 菌株可以葡萄糖、麦芽糖、玉米粉、淀粉等作碳源,生长并产酶,其中以葡萄糖为碳源菌体生长最快,但使用玉米粉可使该菌株的酶活最大.XJT503 可利用氨水、蛋白胨、豆饼粉、玉米浆等作为氮源.采用豆饼粉为最佳氮源,不仅资源丰富、价格低廉,且使生产菌株达最大的产酶量.实验还证明, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对产酶具有促进作用, K^{+} 可使菌体生长加快,有益于产酶.已有的摇瓶实验说明,发酵过程酶产量与氧传递有关.同一摇瓶在装料少的情况下,氧气条件相对较好,酶产量也相对较高.

对 7 L 发酵罐发酵工艺的研究进一步验证了摇瓶发酵实验得出的结论.通过对发酵过程中搅拌速度与通气量的调整得到了一套基本控制工艺,并在 7 L 发酵罐上进行了连续 20 余批次的发酵实验,可获得稳定的发酵酶产量,从而确定了发酵温度 45~46℃,通气量 1:0.6 L/(L·min),搅拌速度 350 r/min、发酵罐维持 0.1 MPa、发酵周期 36 h 左右,平均发酵酶活可达 5 500 U/mL 以上,最高发酵酶活

可达 6 000 U/mL. 结果见表 2.

表 2 7 L 的全自动发酵罐连续 5 批次的发酵酶活
Tab.2 Enzyme activity for 5 continuous batches in 7 L fermentor

批 次	酶活/(U/mL)
11	6 009
12	5 632
13	5 664
14	5 484
15	5 760

2.3 25 L 容积发酵罐的发酵工艺参数确定

在 25 L 发酵罐上对 7 L 发酵罐的工艺参数及其发酵控制方法进行了比较验证 ,结果表明在 7 L 罐上得到的工艺完全可以用于 25 L 罐的发酵工艺控制(见表 3 A).

表 3 25 L 的全自动发酵罐不同搅拌速度对发酵酶活的影响
Tab.3 Effect of different stirred speeds on enzyme activity in 25 L fermentor

搅拌速度/(r/min)	酶 活/(U/mL)
200	4 656
250	6 860
300	7 940
350	8 660

表 4 25 L 的全自动发酵罐连续 7 批次的发酵酶活
Tab.4 Enzyme activity for 7 continuous batches in 25 L fermentor

批 次	酶 活/(U/mL)
1	6 860
2	6 840
3	7 940
4	8 144
5	8 640
6	8 660

2.4 250 L 容积发酵罐的发酵工艺

在 7 L 与 25 L 发酵工艺研究的基础上对 250 L 发酵罐的发酵工艺进行了研究 ,前后共进行了 35 批次实验 ,并对发酵培养基、通气量、搅拌速度、发酵温度等工艺参数进一步优化 ,使之适合于大规模工业发酵生产 .其简要工艺流程为

斜面→摇瓶→25 L 种子罐→250 L 发酵罐
摇瓶种子以 2% 的接种量接入 25 L 种子培养罐中 ,培养 8 h 后以 5% 的接种量接入 250 L 发酵罐中 ,在 46 ℃ ,通气量 1 :0. 45 L/(L·min) ,转速 220

r/min 的条件下培养 16~18 h ,测定发酵酶活大于 8 000 U/mL ,还原糖含量低于 0. 5 % ,菌体大量产生芽孢即下罐 .其发酵过程曲线见图 1.

2.5 3 000 L 的发酵罐中试工艺

以 250 L 发酵罐工艺流程为基础 ,进行了 3 000 L 发酵罐中试工艺研究 .在实验过程中对发酵培养基及工艺参数进一步优化 ,经过 8 个批次的实验 ,平均发酵酶活达 11 000 U/mL ,最高达 13 000 U/mL .实验结果及发酵过程曲线见表 5 和图 2. 3 000 L 发酵罐简要工艺流程如下 :

斜面→摇瓶→25 L 种子罐→300 L 种子罐→3 000 L 发酵罐

3 000 L 发酵罐发酵工艺参数为 :将培养 8 h 的种子罐种子 ,以 5% 接种量移种于 3 000 L 发酵罐 ,46 ℃、180 r/min、4 L/(L·min)通气量下发酵培养 18 h 左右 ,测定发酵酶活达 10 000 U/mL 以上 ,还原糖含量低于 0. 5 % ,镜检有大量芽孢产生时即可终止发酵 ,为保证后处理过程中酶活不会大量损失 ,需迅速降温 .

表 5 3 000 L 的发酵罐连续 8 批次的发酵酶活
Tab.5 Enzyme activity for 7 continuous batches in 3 000 L fermentor

批 次	酶 活/(U/mL)
1	7 360
2	8 016
3	10 000
4	11 000
5	11 256
6	12 680
7	13 149
8	13 240

3 结 论

通过以上实验 ,获得了切实可行的 XJT9503 高温中性蛋白酶的种子培养和发酵工艺流程参数 .中试工艺流程为 :

斜面→摇瓶→25 L 种子罐→300 L 种子罐→3000 L 发酵罐

7 L 发酵罐发酵工艺参数为 :发酵温度 45~46 ℃ ,通气量 1 :0. 6 L/(L·min) ,搅拌速度 350 r/min、发酵罐维持 0. 1 MPa、发酵周期 36 h 左右 ,平均发酵酶活可达 5 500 U/mL 以上 ,最高发酵酶活可达 6 000 U/mL .

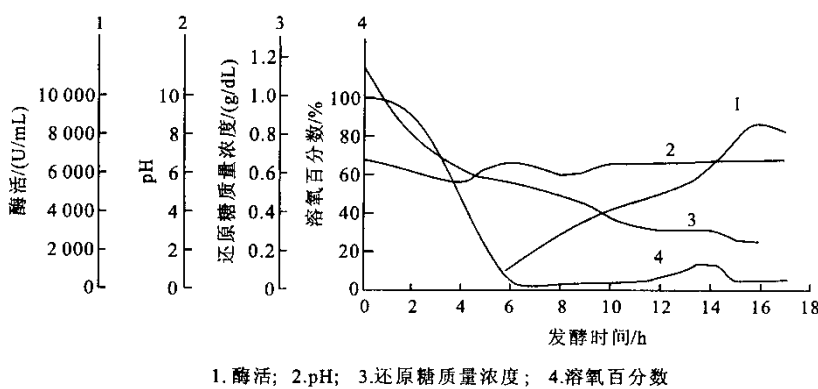


图 1 XJT9503 高温中性蛋白酶 250 L 容积发酵罐的发酵曲线

Fig.1 Fermentation curve of XJT9503 thermostable nutral protease in 250 L fermentor

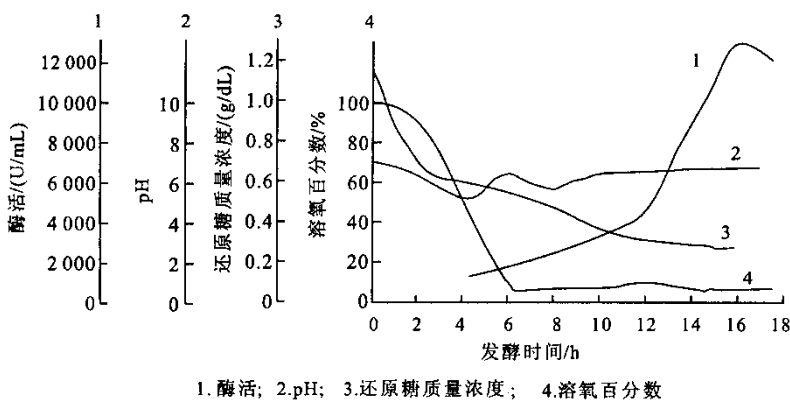


图 2 XJT9503 高温中性蛋白酶 3 000 L 容积发酵罐的发酵曲线

Fig.2 Fermentation curve of XJT9503 thermostable nutral protease in 3 000L fermentor

3 000 L 发酵罐发酵工艺参数为 :将培养 8 h 的
种子罐种子 ,以 5 %接种量移种于 3 000 L 发酵罐 ,
46 ℃、180 r/min、4 L/(L·min)通气量下发酵培养
18 h 左右 ,测定发酵酶活达 10 000 U/mL 以上 ,还

原糖含量低于 0.5 % ,镜检有大量芽孢产生时即可
终止发酵 ,为保证后处理过程中酶活不会大量损
失 ,需迅速降温.

参考文献 :

[1]李泰明 ,徐秀兰. AS1398 中性蛋白酶固定化条件的初步研究 [J]. 药物生物技术 ,1998 ,5(4) 214 - 218.

[2]陈武勇 ,辜海兵 ,秦涛 ,等. 中性蛋白酶水解皮革屑的研究 [J]. 中国皮革 ,2001 ,30(21) 2 - 5.

[3]唐兵 ,周林峰 ,陈向东 ,等. 嗜热脂肪芽孢杆菌高温中性蛋白酶的产生条件及酶学性质 [J]. 微生物学报 ,2000 ,40(2) :188 - 192.

[4]李永泉 ,姚恕. 中性蛋白酶发酵工艺优化研究 [J]. 微生物学通报 ,1995 ,22(3) :155 - 154.

[5]Takii Yukio ,Urata Yoshimi. Thermostable neutral protease resembling thermolysin derived from *bacillus brevis* MIB001[J]. Noriko Biosci Biotechnol Biochem ,1998 ,62(5) :1028 - 1030.

[6]Dolashka Pavlina ,Georgieva Dessislava N. A novel thermostable neutral protease from *Saccharomonospora canescens*[J]. Biochim Biophys Acta ,1998 ,1382(2) 207 - 216.

[7]Odibo F J C ,Obi S K C. Production of excellular thermostable neutral protease of *Thermoactinomyces thalpophilus*[J]. Discov- ery Innovation ,1995 ,7(1) :11 - 14.

[8]Lu S F ,Chang P P. A thermostable neutral protease from pseudomonas aeruginosa CCRC 1554[J]. Lett Appl Microbiol ,1996 ,22(1) 万 方 数 据

(责任编辑 :李春丽)