

文章编号:1009-038X(2003)02-0034-04

Brevibacterium sp. DGCDC-82 发酵罐中 生产胆固醇氧化酶

王龙刚, 吕陈峰, 杨海麟, 王武

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 用 *Brevibacterium* sp. DGCDC-82 在 7 L 发酵罐中分批培养, 分别对添加剂吐温-80、培养温度、培养基的 pH、通风量和搅拌速度在胆固醇氧化酶的生产中的影响进行了研究。结果显示以上条件均对产酶有影响, 在不同的发酵阶段改变发酵操作条件, 发酵 20 h 最高酶活可达 1 203 U/L, 生产强度可达 60 U/(L·h)。既有效地提高了胆固醇氧化酶的产量, 又防止了发酵过程中的泡沫外溢。

关键词: 胆固醇氧化酶; 短杆菌; 发酵

中图分类号: Q 814.1

文献标识码: A

The Production of Cholesterol Oxidase by *Brevibacterium* sp. DGCDC-82 in Fermentor

WANG Long-gang, LU Chen-feng, YANG Hai-lin, WANG Wu

(Key Laboratory of Industry Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: *Brevibacterium* sp. was grown in a batch fermenter. The effect of Tween-80, cultivation temperature, pH of the culture medium, aeration rate and agitation speed on the production of cholesterol oxidase (COD) by the organism were examined. The results revealed that all of them effected the production of COD. Adjusting the operation variables could increase the production of COD effectively and prevent the occurrence of foam overflow during the fermentation. By adjusting operation condition, a maximum COD activity of 1 203 U/L with a volumetric production rate of 60 U/(L·h) per L could be achieved at 20 h.

Key words: cholesterol oxidase; *Brevibacterium* sp.; fermentation

胆固醇氧化酶(COD)能够催化胆固醇氧化为胆甾-4-烯-3-酮^[1-3]。由于它在胆固醇的检测及化学合成类固醇药物前体中的应用, 胆固醇氧化酶得到了越来越多的关注^[1]。另外, 胆固醇氧化酶可分解食物中的胆固醇, 故而它已经应用在心血管疾病的

治疗^[4]中。

作者研究了响应面分析方法改变培养基配方和添加添加剂 W 后, 培养温度、培养基 pH、通气量及搅拌速度对菌体量和产酶的影响, 提出了分段式控制发酵条件, 提高了产酶水平。

收稿日期: 2002-09-13; 修回日期: 2002-11-08.

作者简介: 王龙刚(1976-), 男, 陕西宝鸡人, 发酵工程硕士研究生。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种 *Brevibacterium sp.* DG CDC-82, 作者所在实验室保藏。

1.1.2 培养基

1) 种子培养基: 牛肉浸膏 0.3 g/dL, 蛋白胨 1 g/dL, NaCl 0.5 g/dL。

2) 发酵培养基: 胆固醇 0.3 g/dL, 葡萄糖 2 g/dL, 酵母膏 0.75 g/dL, NaCl 0.1 g/dL, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0.4 g/dL, K_2HPO_4 0.02 g/dL, MgSO_4 0.005 g/dL, FeSO_4 0.001 g/dL, CaCl_2 0.01 g/dL, 添加剂 W 体积分数 0.3, Tween-80 体积分数 0.3%。以上培养基 pH 调至 7.5 左右, 然后于 0.1 MPa 下灭菌 15 min。

1.2 设 备

发酵罐容积为 7 L, H/D 为 2.0, 二层平叶涡轮搅拌器, 最大搅拌转速 800 r/min, 4 组挡板, 夹套换热。

1.3 方 法

1.3.1 培养条件 斜面活化 48 h, 种子在 30 ℃, 220 r/min 振荡培养 14~16 h。将发酵培养基(按 3.5 L 配料)装入发酵罐, 121 ℃ 灭菌 20 min, 冷却至 28 ℃ 接入液体种子, 接种量为 5%。培养时间为 18 h, 培养温度为 30~38 ℃, 通风比为 1:1~1:1.5, 流加 NaOH 控制 pH, 搅拌速度 200~350 r/min。

1.3.2 胆固醇氧化酶活力的测定 取溶液 A 3 mL, 溶液 B 150 μL 于试管中, 37 ℃ 保温 3 min; 加入 50 μL 发酵上清液, 反应 5 min, 沸水浴 3 min, 冷却后, 用 1 cm 比色皿, 在 500 nm 处测吸光度; 1 U 定义为 1 min 内转化胆固醇生成 1 μmol H_2O_2 的酶量。

1.3.3 比生长速率及 COD 合成速率的计算

$$\text{比生长速率 } \mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dx}{dt}$$

COD 合成速率 $\epsilon = \frac{1}{X} \cdot \frac{dE}{dt}$ 。X 指生物量 (g/L), E 指 COD 产量 U/L。

2 结果与讨论

2.1 培养基乳化体系对发酵过程的影响

在摇瓶发酵过程中, 用表面活性剂及添加剂来帮助形成较为稳定的乳浊液从而促进胆固醇在培养基中的分散、增加微生物与胆固醇的界面接触, 从而增加了培养基中有效的胆固醇, 提高了 COD

产量。但是在 7 L 发酵罐中培养短杆菌, 在通风大于 0.5 L/(L·min) 时, 乳化体系就会被破坏, 大量胆固醇发生相聚集并悬浮在培养基表面继而粘在罐壁、挡板及搅拌桨, 不能起到诱导作用, 从而大大影响产量。如果把通风降低到 0.5 L/(L·min) 以下, 通过增加搅拌速度来增加溶氧 (DO) 又会引起大量泡沫, 泡沫溢出罐外, 造成发酵液损失并且增加了染菌机会。

因此作者尝试增加乳化剂吐温-80 的体积分数来增加乳化体系的稳定性。在保持 1 L/(L·min) 通风量和 300 r/min 转速的条件下, 考察不同体积分数乳化剂对培养基 B 乳化体系稳定性(即发酵液中胆固醇质量浓度)的影响, 结果见图 1。

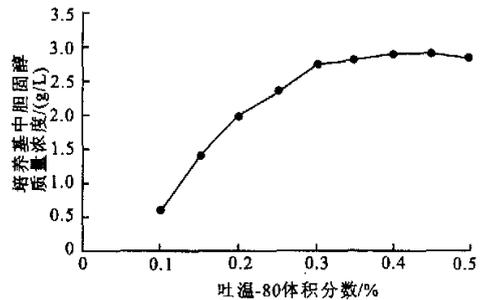


图 1 吐温-80 体积分数对培养基中胆固醇质量浓度的影响

Fig.1 Effect of Tween-80 on cholesterol concentration in culture medium

由图 1 可见, 吐温-80 体积分数在 0.3% 以上都能起到较好的乳化作用, 但是如果吐温-80 体积分数大于 0.3%, 会产生大量泡沫, 影响发酵质量。经摇瓶试验验证, 发现 0.3% 的吐温-80 对菌体生长和 COD 产量影响很小。因此选择吐温-80 在培养基中的初始体积分数为 0.3%。

2.2 pH 对 COD 发酵过程的影响

总的说来, pH 7.5 条件下培养 *Brevibacterium sp.* 较为适宜。pH 7.5 条件下, 培养 28 h 左右 COD 产量达到最大值 812 U/L, 比其他条件下 COD 产量明显要高, 而在达到这一最大值后酶活又会显著下降(见图 2)。从图 3 可以看出, 在发酵前 7 h 内, pH 7.0 组 COD 合成速率最高, 之后 pH 7.5 组的 COD 合成速率最高。在 pH 7.0, 7.5, 8.0 下, 生产强度分别是 27.1, 31.2, 29.5 U/(L·h)。

2.3 温度对 COD 产量的影响

温度是影响微生物代谢的重要环境因素, 它对于细胞生长和酶合成过程具有重要的影响。以前的研究表明^[5], 在摇瓶水平上, 30 ℃ 最适合菌体生长及产酶。作者考察了 30, 33, 36, 39 ℃ 条件下, 7 L 罐

上 COD 发酵的情况,结果见图 4. 在 30 ℃ 和 39 ℃ 条件下合成酶不理想. 而在 36 ℃, COD 达到最大产量 908 U/L 仅需 18 h, 发酵周期大大缩短.

由图 5 可以看出, 在 30, 33, 36, 39 ℃ 下最大 ϵ_{COD} 分别为 12.06, 15, 21.46, 15.9 U/(g·h). 在 36 ℃ 下, COD 合成速率最快, 在 10 h 就达到最大值, 直到 20 h 左右才停止. 温度对生长强度影响非常显著. 在 30, 33, 36, 39 ℃ 下, 生产强度分别是 27.9, 32.9, 50, 40.5 U/(L·h).

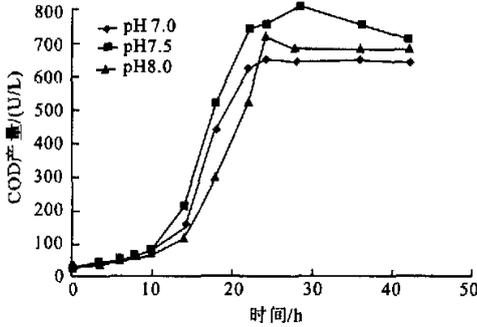


图 2 pH 对 COD 发酵的影响

Fig. 2 Effect of pH on COD production

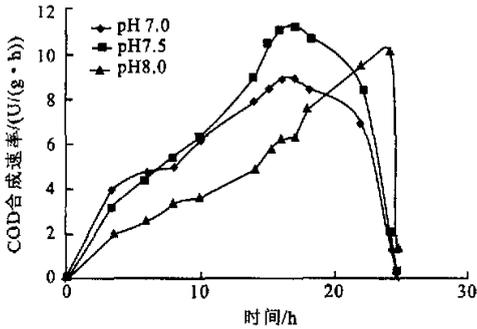


图 3 pH 对 COD 合成速率的影响

Fig. 3 Effect of pH on COD production rate

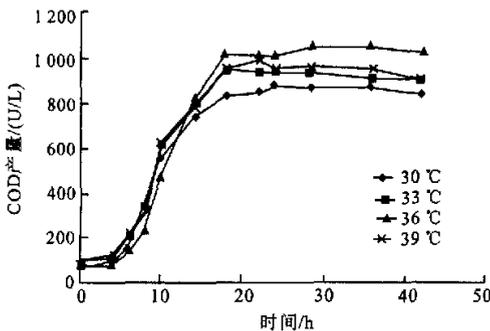


图 4 温度对 COD 产量的影响

Fig. 4 Effect of temperature on COD production

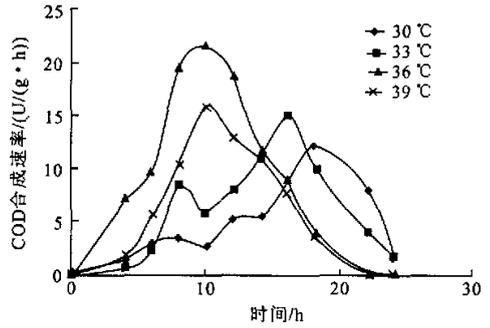


图 5 温度对 COD 合成速率的影响

Fig. 5 Effect of temperature on COD production rate

2.4 溶氧对产酶的影响

作者考察了不同通风量(5, 6, 7 L/min)下 *Brevibacterium sp.* DG CDC-82 的生长及产酶的情况, 结果见图 6. 由图 6 可见, 前 10 h 各条件下产酶差别不大. 在通气量为 6 L/min 或 7 L/min 下, 最大 COD 产量分别达到 1 030 U/L 和 1 049 U/L. 发酵 40 h 时, 酶活分别达到 793, 702, 845 U/L. 但是在 7 L/min 的通气量下泡沫也较多, 发酵终点时发酵液损失达 30%~40%, 并且在发酵中后期酶活下降剧烈, 这可能与 COD 活性中心有 cys 残基有关^[6], 其中的巯基容易被氧化而使酶失活. 在 6 L/min 的通气量下泡沫层只有 2 cm 左右, 发酵中后期酶活损失也没有那么大, 便于发酵控制, 因此选择 6 L/min 作为通气量, 在该条件下, 生产强度达到 52.8 U/(L·h).

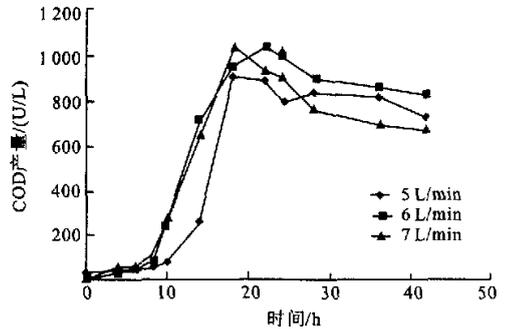


图 6 通气量对 COD 产量的影响

Fig. 6 Effect of aeration on COD production

为了考察搅拌转速对产酶的影响, 试验中控制搅拌转速在 200~600 r/min, 发酵过程见图 7. 由图 7 可见, 在 300 r/min 和 400 r/min 下, 在 18 h 时 COD 产量分别达到 1 032 U/L 和 920 U/L, 在发酵 40 h 时, 酶活分别达到 709, 830, 912 U/L. 但是搅拌转速达到 400 r/min 会引起大量的泡沫, 发酵终点时发酵液损失达 30%~40%. 因此, 300 r/min 为较适合的搅拌转速, 在此条件下生产强度为 51.1

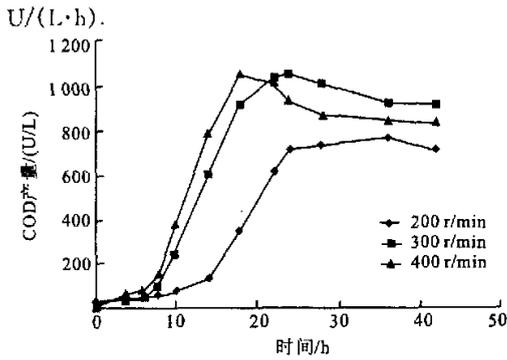


图 7 转速对产酶的影响
Fig.7 Effect of agitation speed on COD production

COD 发酵过程见图 8. 在控制不同溶氧参数的发酵过程中, 溶氧的消耗规律基本相似, 但在发酵的不同阶段对氧的需求并不相同, 在产酶期耗氧最快. 在发酵前 18 h, 细胞摄氧速率明显高于供氧速率, 所以溶氧迅速下降; 在发酵 18 h 以后, 细胞摄氧速率与供氧速率基本持平, 表现为溶氧下降缓慢或保持不变, 超过 24 h 溶氧甚至会回升; 最适溶氧饱和度为 30%~45%, 低于 20% 时产酶受影响, 溶氧高于 55% 产酶也会受影响, 而且会有大量泡沫产生.

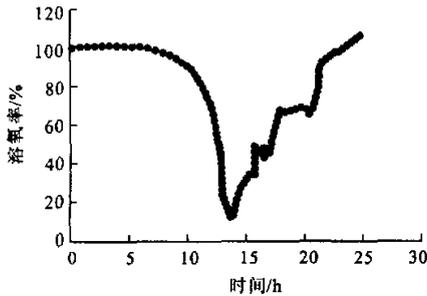


图 8 溶氧饱和度变化曲线
Fig.8 Time course of DO

2.5 改进过程控制条件后的发酵过程曲线

以上的实验结果表明, 最适发酵过程控制条件为: 在 36 ℃, 发酵前 8 小时培养基的 pH、搅拌转速和通气量分别控制在 7.0, 200 r/min 和 5 L/min; 发酵 8~14 h 培养基的 pH、搅拌转速和通气量分别控制在 pH 7.5, 400 r/min 和 7 L/min; 发酵 14 h 以后, pH 不变, 将转速和通气量调低, 控制溶氧在

40% 左右. 采用以上工艺条件发酵 20 h 后, COD 产量可以达到最大值 1 203 U/L, 之后在 22 h 回落到 1 097 U/L. 生物量在 22 h 达到 10.63 g/L. 从图 9、10 可以看出, 细胞生长与产酶是部分偶联的, 酶的合成滞后细胞生长约 2~5 h.

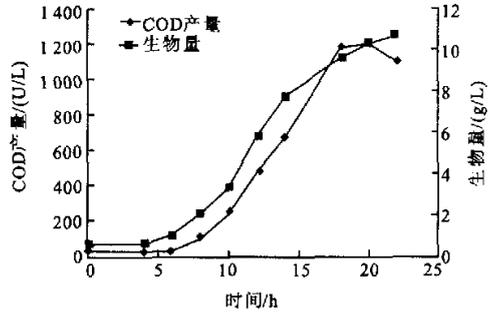


图 9 7 L 罐的发酵过程曲线

Fig.9 Time course of batch culture in 7 L fermentation

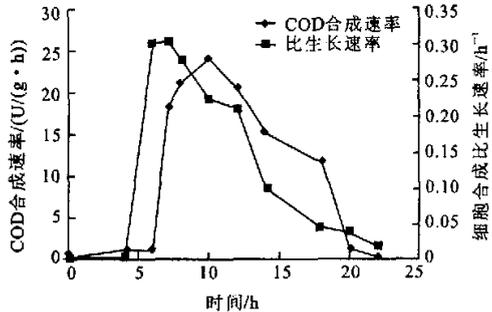


图 10 比生长速率曲线

Fig.10 Time course of μ and ϵ

3 结 论

培养基在灭菌及发酵初期大量产生泡沫的原因是培养基乳化体系不稳定所致, 通过增加乳化剂体积分数能显著改善这一情况, 保证了发酵的正常进行. 7 L 罐分批发酵实验表明: 温度、pH、溶氧均对发酵产酶水平影响较大, 在不同的发酵阶段改变发酵操作条件既能防止发酵过程中的泡沫外溢, 又能有效地提高胆固醇氧化酶的产量. *Brevibacterium sp.* DG CDC-82 菌株在 7 L 发酵罐中发酵 20 h 最高酶活可达 1 203 U/L, 生产强度 60 U/(L·h).

参考文献:

[1] W Richmond. Preparation and properties of a bacterial cholesterol oxidase from *Nocardia sp.* and its application to enzyme assay of total cholesterol in serum[J]. *Clin Chem*, 1973, (19): 1350-1356.

(下转第 43 页)

- [4] Volker F Wendisch, Albert A DE Graaf, Hermann Sahn, *et al.* Quantitative determination of metabolic fluxes during coutilization of two carbon sources: comparative analysis with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and glucose [J]. **Journal of Biotechnology**, 2000, 3088 - 3096.
- [5] Calder, Philip C. More good news about glutamine[J]. **Nutrition**, 2000, 16 (1): 71 - 73.
- [6] 陈奎发, 杨艳, 焦鹏, 等. 在线氮饥饿处理对谷氨酰胺合成的促进作用[J]. **食品与发酵工业**, 2002, 28(7):20 - 23.
- [7] 陈奎发, 蒋楠, 杨艳, 等. 酸解-酶膜联用法检测谷氨酰胺[J]. **食品与发酵工业**, 2002, 28(9): 26 - 28.
- [8] Serpil Takac, Giizide Calik. Metabolic flux distribution for the optimized production of L-glutamate[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1998, 23: 286 - 300.
- [9] Gregory N Stephanopoulos, Aristos A Aristidou, Jens Nielsen. *Metabolic engineering: principles and methodologies*[M]. San Diego: Academic Press, 1998.
- [10] 张克旭, 陈宁, 张蓓, 等. 代谢控制发酵[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998. 277 - 287.
- [11] Davin Uy, Stephane Delaunay, Jean-Marc Engasser, *et al.* A method for the determination of pyruvate carboxylase activity during the glutamic acid fermentation with *Corynebacterium glutamicum* [J]. **Journal of Microbiological Methods**, 1999, 39: 91 - 96.
- [12] Joseph John Vallino. Identification of branch-point restrictions in microbial metabolism through metabolic flux analysis and local network perturbations[D]. Cambridge MA: MIT, 1991. 63 - 65.
- [13] S M Park, A J Sinskey, Gregory Stephanopoulos. Metabolic and physiological studies of *Corynebacterium glutamicum* mutants [J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1997, 55(6): 864 - 879.
- [14] John L Ingraham, Ole Maaloe, Frederick C Neidhardt. *Growth of the bacterial cell*[M]. Sunderland Mass: Sinauer Associates, 1983.
- [15] Anton A Schulz, Helen J Collett, Sharon J Reid. Nitrogen and carbon regulation of glutamine synthetase and glutamate in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2001, 205:361 - 367.
- [16] Sang Yup Lee, Eleftherios T Papoutsakis. *Metabolic engineering*[M]. New York: Marcel Dekker, 1999. 13 - 55.
- [17] 张永志. 谷氨酰胺生产菌的育种思路[J]. **天津微生物**, 1990, 4:17 - 20.

(责任编辑:杨萌)

(上接第 37 页)

- [2] Lee M T, Chen W C, Chou C C. Nutritional factors that affect the production of cholesterol oxidase by *Rhodococcus equi* no. 23 [J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 1997, 26: 159 - 162.
- [3] Bloch K. The biological synthesis of cholesterol[J]. **Science**, 1965, 150:19 - 25.
- [4] J P Slotte, L Gronberg. Oxidation of cholesterol oxidase in low and high density lipoproteins by cholesterol oxidase[J]. **J Lipid Res**, 1990, (31):2235 - 2242.
- [5] 韩振芳. 胆固醇氧化酶的发酵研究[J]. **无锡轻工大学学报**, 1998, 18(2):18 - 22.
- [6] J Maclachlan, A T L Wotherspoon. Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications[J]. **Sterile Biochemistry and Molecular Biology**, 2000, (72):169 - 195.

(责任编辑:李春雨)