

# 嗜碱性芽孢杆菌产高碱碱性蛋白酶发酵培养基及发酵条件的研究

苑琳 戚薇 路福平 杜连祥

(天津科技大学食品科学与生物工程学院应用微生物教研室,天津 300222)

**摘要** 对一株高产高碱碱性蛋白酶的嗜碱性芽孢杆菌的发酵培养基及发酵工艺进行了优化。确定了发酵培养基所采用的棉籽饼粉最适粒度为 80 目,麦芽糊精的最佳 *DE* 值为 30%。并确定了该菌株的最适发酵培养基配方为(*g*/100 mL):棉籽饼粉 3,酵母浸粉 1.75,麦芽糊精 10,柠檬酸钠 0.3,  $\text{CaCl}_2$  0.3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,最适摇瓶发酵条件为:种龄 12 h,接种量 2%,装液量 50 mL/250 mL,摇床转速 200 r/min,34℃,发酵 54 h,碱性蛋白酶的发酵单位可达 33 985 u/mL,比优化前提高了 54.48%。此外,还进行了 5 L 罐放大实验,在 5 L 罐所确定的最适工艺条件下,发酵单位可达 36 579 u/mL。

**关键词** 碱性蛋白酶,嗜碱性芽孢杆菌

碱性蛋白酶是指在碱性条件下水解蛋白质肽键的酶类,主要应用于生产加酶洗涤剂<sup>[1]</sup>,另外,在制革、丝绸、医药、食品、饲料和生物化学试剂等领域也有应用。我国在 20 世纪 70 年代初期就成功开发了碱性蛋白酶,并实现了工业化生产<sup>[2]</sup>。目前,我国用于生产的菌种为国内学者自行筛选诱变的菌株——地衣芽孢杆菌 2709,其发酵单位在 10 000 u/mL,与国外先进水平相差甚远。本实验所采用的高产高碱碱性蛋白酶菌株为嗜碱性芽孢杆菌,其实验发酵单位为 22 000 u/mL,与国外大型酶制剂公司所报道的生产水平 30 000 u/mL 相差较大。本实验对该菌株的发酵培养基及发酵工艺进行了优化,从而使其发酵单位达到了 30 000 u/mL 以上,达到国内外领先水平,为其工业化生产奠定了基础,具有很大的开发价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

嗜碱性芽孢杆菌(*Bacillus alcalophilus*)

### 1.2 试剂及仪器

干酪素中国医药(集团)上海化学试剂公司,麦芽糊精山东省菏泽市都庆股份有限公司;棉籽饼粉河北,其余试剂均为国产分析纯及生

化试剂。MP220 型 pH 计,722 分光光度计,恒温水浴锅, GL20A 型高速冷冻离心机, LD5-10 离心机。

### 1.3 培养基

①平板培养基:酪素培养基<sup>[3]</sup>。②种子培养基:肉汤培养基<sup>[3]</sup>。③初始发酵培养基(*g*/100 mL):棉籽饼粉 2,酵母浸粉 1,麦芽糊精(*DE* ≥ 47%)10,柠檬酸钠 0.3,  $\text{CaCl}_2$  0.3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1。

### 1.4 菌种的培养

①将酪素平板上形成透明圈、生长正常的单菌落转接于装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,34℃,200 r/min,摇床振荡培养 12 h。②以 2% 的接种量将种子培养液转接于装有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,34℃,200 r/min,摇床振荡培养 54 h。③将发酵液 8 000 r/min 离心 10 min,上清液即为粗酶液。

### 1.5 酶活力的测定

按 Folin 试剂显色法<sup>[4]</sup>在 pH11、40℃ 下测定酶活力,将该条件下每分钟水解酪素产生 1 μg 酪氨酸所需的酶量定义为一个活力单位。

### 1.6 菌体核酸量的测定

该实验所采用的发酵培养基中含有棉籽饼粉,杂质较多,故采用菌体内核酸量表示其菌体

量。核酸量的测定方法如下 ①取 2 mL 发酵液加 8 mL 蒸馏水,混匀,3 000 r/min 离心 15 min;②弃上清,在沉淀中加冷的 10% 三氯乙酸 2 mL,振荡,冰水浴中放置 2~3 min,30 000 r/min 离心 15 min;③弃上清,沉淀中加冷的 5% 三氯乙酸 2 mL,混匀,沸水浴中加热 30 min,冷却后离心,3 000 r/min × 15 min;④取上清 0.1 mL,加 4.9 mL 蒸馏水,混匀后,在紫外分光光度计上测 260 nm 处吸收值 A。菌体核酸量(g/L)= $A \times 1.72$

### 1.7 总糖的测定

参见文献[5]

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基组成成分对产酶的影响

#### 2.1.1 棉籽饼粉的浓度及其粒度对产酶的影响

实验选用河北产棉籽饼粉(100 目),在培养基中分别添加不同浓度的棉籽饼粉,其结果如图 1。

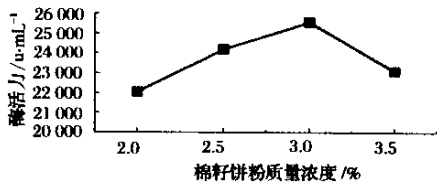


图 1 棉籽饼粉浓度对产酶的影响

可以看到,增加棉籽饼粉的浓度至 3% 时粗酶液中酶活力最高,继续增加其浓度,酶产量没有增加反而降低。此外,实验中还对棉籽饼粉的粒度对产酶的影响进行了研究,结果如图 2。

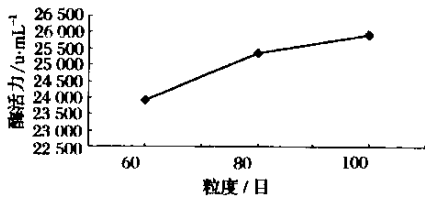


图 2 棉籽饼粉粒度对产酶的影响

可见,棉籽饼粉越细越利于产酶,同时也可以看到,80 目的棉籽饼粉与 100 目的差别不大,因此,从生产成本考虑决定采用 80 目的棉籽饼粉。

### 2.1.2 酵母浸粉浓度对产酶的影响

实验在培养基中添加不同浓度的酵母浸粉,其结果见图 3。

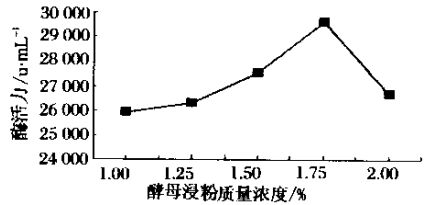


图 3 酵母浸粉浓度对产酶的影响

可见,增加酵母浸粉的浓度可以提高菌株的产酶量。当酵母浸粉浓度为 1.75% 时其粗酶液中酶活力最高,继续增加至 2% 时,酶产量不再增加反而降低。

### 2.1.3 不同 DE 值的麦芽糊精对产酶的影响

本实验以麦芽糊精为发酵培养基的主要碳源,对山东省菏泽市都庆股份有限公司产的 5 种不同 DE 值的麦芽糊精及北京奥博星生物技术责任有限公司生产的糊精分别进行了发酵试验,其加入量均为 10%,产酶情况如图 4 所示。

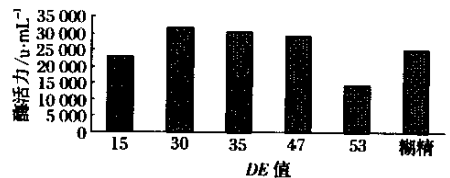


图 4 不同 DE 值麦芽糊精及糊精对产酶的影响

由图 4 看出,以 DE 值为 30% 的麦芽糊精为碳源,发酵后的粗酶液酶活力最高,可达 31 752 u/mL。同时可以看到,麦芽糊精的 DE 值越高越不利于产酶,说明该菌株可能存在分解代谢阻遏现象。

### 2.1.4 最佳发酵培养基的确定

在确定了发酵培养基主要氮源棉籽饼粉的粒度为 80 目、主要碳源麦芽糊精的 DE 值为 30% 的基础上,采用单因素实验法对发酵培养基进行了优化,确定了该菌株的最适发酵培养基组成为(g/100 mL):棉籽饼粉 3,酵母浸粉 1.75,麦芽糊精 10,柠檬酸钠 0.3,  $\text{CaCl}_2$  0.3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1。

## 2.2 发酵工艺的优化

### 2.2.1 种子生长曲线

在 34℃ 200 r/min 条件下,摇床振荡培养,定时取样并测定其在 600 nm 下的吸光值,并绘制种子生长曲线(图 5)。

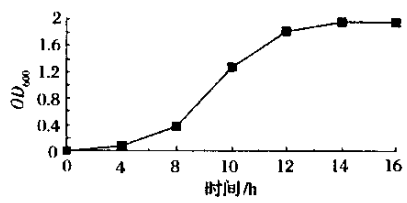


图 5 种子生长曲线

### 2.2.2 种龄对产酶的影响

在绘制种子生长曲线的基础上,选取对数中、晚期的种子培养液进行种龄实验。实验分别将种龄为 10、12、14 h 的种子培养液 1 mL 转接于 30 mL 发酵培养基,34℃ 200 r/min 摇床振荡培养 54 h,测定粗酶液酶活力,结果如图 6 所示。可见种龄为 12 h 最适合该菌株产酶。

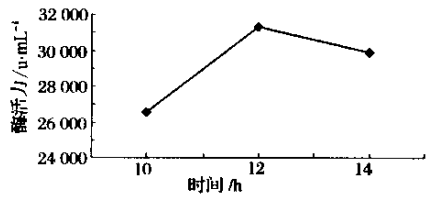


图 6 种龄对产酶的影响

### 2.2.3 接种量对产酶的影响

分别以 1%、2%、3%、5% 的接种量将培养 12 h 的种子培养液转接于 30 mL 发酵培养基,34℃ 200 r/min 摇床振荡培养 54 h,测定粗酶液酶活力,结果见图 7。由图可见,接种量为 2% 时,菌株酶产量最高。

### 2.2.4 装液量对产酶的影响

在 250 mL 三角瓶中分别装入 30 mL、40 mL、50 mL、60 mL、70 mL 的发酵培养基,34℃,200 r/min 摇床振荡培养 54 h 后,测定发酵液的酶活力,结果如图 8 所示。可见,装液量为

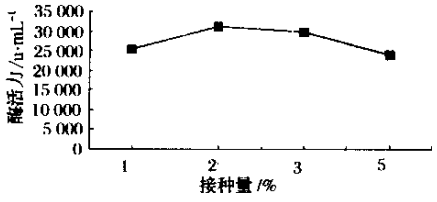


图 7 接种量对产酶的影响

50 mL 时最适合菌株产酶。

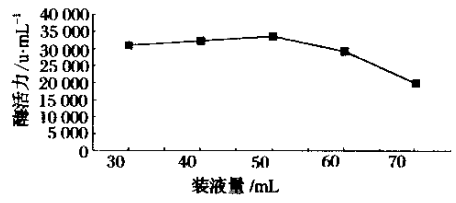


图 8 装液量对产酶的影响

## 2.3 优化条件下的摇瓶发酵及发酵过程曲线

采用最适发酵培养基(g/100 mL):棉籽饼粉(80 目)3,酵母浸粉 1.75,麦芽糊精(DE≥30%)10,柠檬酸钠 0.3,CaCl<sub>2</sub> 0.3,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1;并采用最适发酵条件:种龄 12 h,接种量 2%,装液量 50 mL/250 mL,摇床转速 200 r/min,34℃,发酵 54 h,碱性蛋白酶的发酵单位可达 33985 u/mL,比优化前的发酵单位 22000 u/mL 提高了 54.48%。另外,实验中还对发酵过程中的菌体核酸量及粗酶液酶活力进行了测定,并绘制了发酵过程曲线(图 9)。

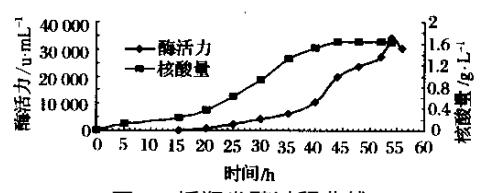


图 9 摇瓶发酵过程曲线

由图 9 可知,菌体在进入对数期后开始产酶,在对数期的中后期开始进入产酶高峰期,在稳定期达到产酶高峰,高峰持续时间很短即消失,酶活开始下降。因此,在生产过程中控制发酵终点十分重要。该菌株在确定的优化条件下进行发酵,粗酶液中酶活力最高可达 33985 u/mL。

## 2.4 5L 罐发酵过程曲线

在摇瓶实验基础上,进行了 5 L 罐中的放大实验。装料系数:0.7,接种量:2%,温度:34℃,转速 200~500 r/min。对发酵过程中的菌体核酸量、粗酶液中酶活力及发酵液中总糖进行了测定,所绘发酵曲线如图 10 所示。5 L 罐发酵单位最高可达 36579 u/mL。

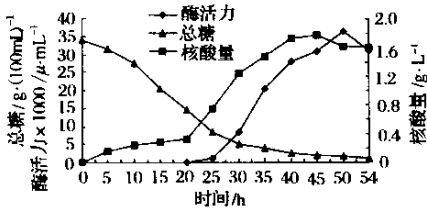


图 10 5L 罐发酵过程曲线

3 讨 论

本实验对一株高碱性蛋白酶高产菌株的发酵条件进行了优化 ,并在摇瓶优化的基础上

进行了 5 L 罐的放大实验 ,最终使其发酵单位达到 36 579 u/mL。该生产水平已达到国际大型酶制剂公司所报道的水平 ,为其工业化生产奠定了基础。

参 考 文 献

1 华章熙 徐 清 . 洗涤剂酶应用手册 [ M ]. 北京 :中国轻工业出版社 ,1999 .39  
2 薛林贵 . 我国碱性蛋白酶的应用及研究进展 [ J ]. 微生物学通报 ,1997 24( 6 ) 370~371  
3 杜连祥 . 工业微生物学实验技术 [ M ]. 天津 :天津科学技术出版社 ,1992 274  
4 王福荣 . 工业发酵分析 [ M ]. 北京 :中国轻工业出版社 ,1997 90~92  
5 蔡定域 . 酿酒工业分析手册 [ M ]. 北京 :轻工业出版社 ,1988 293

The Study on the Medium and Conditions of *Bacillus alcalophilus*  
Producing the High Alkaline Protease

Yuan Lin Qi Wei Lu Fuping Du Lianxiang Cai Xingwang

( Department of Biotechnology ,Tianjin University of Science and Technology ,Tianjin , 300222 )

**ABSTRACT** The fermentation medium and conditions of *Bacillus alcalophilus* , which produces high - yield alkaline protease ,were studied in this paper. The optimum granularity of cotton seed meal was 80mu and the optimum DE of maltrin was 30% . The highest enzyme activity was obtained using 50mL of culture medium in 250 mL shake flasks at 34℃ and 200 r/min for 54h. The fermentation medium consisted of ( per 100 mL ):3g cotton seed meal ,1.75g yeast extract ,10g maltrin ,0.3g NaCitrates ,0.3g CaCl<sub>2</sub> ,1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> . The optimal inoculum volume was 2%( v/v ). Under optimal conditions ,the yield of alkaline protease is 33 985u/mL , which is 54.48% higher than that of before. The experiment was also carried out in a 5 L fermentor. Under the optimal conditions ,the alkaline protease activity reached 36 579 u/mL in the 5 L fermentor.

**Key words** alkaline protease , *Bacillus alcalophilus*

日本啤酒包装的变化

日本啤酒消费量近年来每年都在 70 亿升以上 ,2000 年为 71.3 亿 L ,2001 年为 71.8 亿 L ,略增了 0.3% ,其中啤酒 49 亿 L ,发泡酒 22.3 亿 L。从包装看 ,日本啤酒主要分为玻璃瓶、金属罐和大桶等 3 大类包装物。玻璃瓶曾长期在日本啤酒包装市场上占有统治地位 ,直到 1993 年玻璃瓶装啤酒仍然占一半以上 ,但此后则逐年明显下降 ,由 1993 年的 50% 分别下降为 1995 年的 43%、1997 年的 37% 和 1999 年的 35% ,2000 年降为 32% ,2001 年为 31.9%。而金属听装啤酒的比例在同期内则由 1993 年的 41% 分别上升为 1995 年的 45.3%、1996 年的 47.5%、1997 年的 48.7% 和 1999 年的 47.1% ,2000 年为 47.9% ,2001 年下降为 45.1%。大木桶等桶装啤酒比例也有所上升 ,1993 年为 8.7% ,1995 年、1997 年和 1999 年分别上升为 11.8%、14.4% 和 17.9% ,2000 年为 19.7% ,占日本啤酒总消费量的 20% ,2001 年上升为 23%。在日本啤酒的各种包装物中 ,金属罐所占比例变化不大 ,而且近年来还略有上升 ( 但 2001 年有所下降 )。玻璃瓶则明显下降 ,而大桶包装又重新大幅上升 ,后者增加的部分刚好是前者减少的部分 ,这说明大木桶装啤酒在日本市场上的销量不断增长。

信息窗