

# 地衣芽孢杆菌产生碱性蛋白酶的动力学研究

赵良启 戚 敬\*

(山西大学生命科学系 太原 030006)

郝晋阳

(山西省侯马市平阳制药厂 侯马 043000)

**摘 要** 应用自动控制发酵设备,首先进行分批发酵试验摸索了地衣芽孢杆菌 2709 生长与代谢的基本规律。然后采用补料分批发酵方法限制生长基质浓度,测定了一系列 ( $S_i, \mu_i$ ) ( $\mu_j, q_{pj}$ ) 数据,获得  $K_S, \mu_{max}, \alpha, \beta$  等参数的值,并且推导出了细胞生长与产物合成的动力学公式,从而证明了用 Monod 方程描述地衣芽孢杆菌 2709 生长速率与基质浓度关系的合理性和合成碱性蛋白酶的发酵属于生长部分关联型。

**关键词** 碱性蛋白酶,补料分批发酵,发酵动力学

**学科分类号** Q 817

地衣芽孢杆菌 2709 是我国发酵生产碱性蛋白酶的主要菌株之一,而碱性蛋白酶是加酶洗涤剂和皮革脱毛的重要原材料与作用剂。

目前发酵工程正在进入一个新的发展阶段,朝着目标化、精细化、自动化方向迈进。这就需要进行发酵动力学的研究,获得可靠参数,建立数学模型,进而实现计算机在线控制,以获得最佳的生产效率和经济效益。本文主要对地衣芽孢杆菌 2709 的生长动力学和产酶动力学作了研究<sup>[1-5]</sup>。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

地衣芽孢杆菌 2709 (*Bacillus licheniformis* 2709) 来自山西省生物研究所。

### 1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基:牛肉膏-蛋白胨固体培养基。

1.2.2 摇瓶种子培养基(%):牛肉膏 0.3,蛋白胨 1,葡萄糖 0.5,NaCl 0.5,pH7.0-7.2。250ml 摇瓶装量为 50ml 培养基,121℃ 灭菌 20min。

1.2.3 发酵培养基(%):配方 1:黄豆饼粉 5(水解液,加 0.5% NaOH,121℃ 水解 30min,冷却过滤),葡萄糖 6,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.8,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.16,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.03,Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1,酵母膏 1,pH7.0,110℃ 灭菌 30min。配方 2:黄豆饼粉 1(水解液制备方法同上),(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.8,葡萄糖 2,酵母膏 1,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.16,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.03,Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1,pH7.0,110℃ 灭菌

\* 现在山西省肿瘤医院工作。

收稿日期:1997-11-10,修回日期:1998-04-22。

30min<sup>[4]</sup>。

### 1.3 种子制备

将活化 2 次的斜面菌种制成菌悬液接入摇瓶种子培养基,置于 Hy-x<sub>3</sub> 恒温摇床(偏心距 4cm),30℃,180r/min 培养 18h。

### 1.4 发酵

1.4.1 生长曲线试验:使用美国 VIRTIS 公司生产的 2L-型自动控制发酵罐进行分批发酵。发酵罐容积 2L,两层六平直叶搅拌,双挡板。采用 1 号培养基,装料系数 0.75,接种量 5%,培养温度 36℃,以 6mol/LNaOH 液调节 pH7.0 左右,通气量 1:1(L/L·min),搅拌转速 300~900r/min,控制溶氧在 10%~30%之间。在发酵过程中每隔 4h 取样,测定糖浓度、细胞浓度、酶活<sup>[6]</sup>。

1.4.2 生长动力学试验:所用发酵罐及控制条件(温度、pH、通气量、搅拌、溶氧等)同生长曲线试验。采用 2 号培养基,装料系数 0.6,以 30%葡萄糖液补料控制底物浓度,及时测定糖浓度、细胞浓度<sup>[7]</sup>。

1.4.3 产酶动力学试验:采用 1 号培养基,发酵设备与培养条件同上。当细胞进入减速生长期时以 30%葡萄糖补料控制底物浓度,及时测定糖浓度、细胞浓度和酶活。

### 1.5 发酵过程中参数的测定

1.5.1 糖浓度的测定:葡萄糖氧化酶法<sup>[8]</sup>。

1.5.2 细胞浓度的测定:取发酵液 20ml,取 10ml 发酵液在 3000×g 下离心 15min,蒸馏水洗涤、离心 2 次,移菌体至恒重的称量瓶中,105℃烘干至恒重,称重,即可算得细胞浓度(干细胞重量/g·L<sup>-1</sup>)。将另外 10ml 发酵液用蒸馏水稀释,用 752 型紫外可见分光光度计测定 OD<sub>580</sub>值(光程 10mm),以 OD<sub>580</sub>值为横坐标,相应稀释倍数的细胞浓度为纵坐标作吸光度与细胞浓度的相关图。在发酵过程中通过测定 OD<sub>580</sub>值查相关图获得细胞浓度<sup>[3]</sup>。

1.5.3 酶活测定:采用福林法在 40℃、pH10.5 的条件下测定碱性蛋白酶活力<sup>[1]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 生长曲线及代谢规律分析

摸清试验菌株的细胞生长及代谢规律方能有效地控制发酵过程。为此我们设计并进行了分批发酵试验。在试验过程中为排除培养液中固形物对细胞浓度测定的干扰,采用葡萄糖为碳源、豆饼粉水解滤液为氮源。分批发酵的试验结果见图 1。由图 1 可以看出地衣芽孢杆菌的细胞生长曲线比较典型,各个期段比较分明。从生长曲线与耗糖曲线在细胞生长期基本呈影镜关系的现象可以推测碳源葡萄糖是其细胞生长的限制性基质,而从生长曲线与酶活曲线的关系可以看出碱性蛋白酶的产生开始于细胞生长减速期,而且有着随比生长速率的下降而加速的趋势,因此预计地衣芽孢杆菌生产碱性蛋白酶的发酵类型有可能是属于生长部分关联型<sup>[6]</sup>。

### 2.2 细胞生长动力学

在维持培养液体积基本不变的情况下,在生长期细胞的增长速率可以用下式表达。

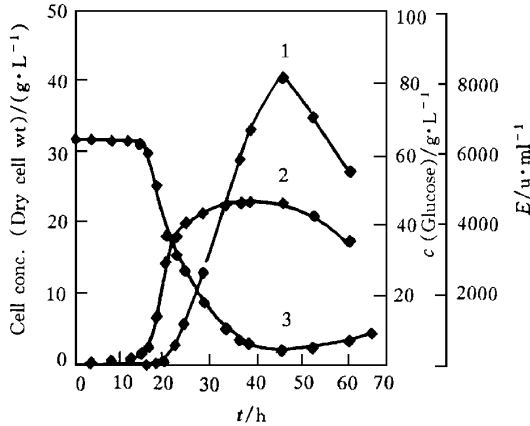


图 1 地衣芽孢杆菌 2709 的分批发酵

Fig.1 Batch fermentation of *B. licheniformis* 2709

1. The enzyme activity ( $\text{u} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) 2. The cell concentration (Dry cell Wt  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 3. Glucose conc.  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

式中  $x$  细胞浓度(干重)  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $t$  时间  $\text{h}$ ;  $\mu$  比生长速率  $\text{h}^{-1}$ 。初始条件,当  $t = t_0$  时,  $X = X_0$ , 将 (1) 式定积分得

$$\ln(t_x/x_0) = \mu t \quad \text{或} \quad \mu = \ln \frac{X_t}{X_0} / t \quad (2)$$

在培养条件(温度、pH、溶氧)确定之后和非生长限制营养成分过量的情况下,细胞的比生长速率主要与生长限制性基质浓度有关。我们选择具有普遍意义的 Monod 方程表达它们之间关系,即:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \quad (3)$$

式中  $\mu_{\max}$  最大比生长速率  $\text{h}^{-1}$ ;  $S$ : 葡萄糖浓度  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $K_S$ : 饱和常数  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由 (1) 和 (3) 式可推出细胞生长速率与底物浓度之间的表达式:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} X \quad (4)$$

这样通过测定 ( $S_i, \mu_i$ ) 得出  $K_S$  和  $\mu_{\max}$ , 便可完成上述表达式。

在实验过程中,参照分批发酵得到的有关数据和反复补料分批发酵的实验结果,依照补糖速率等于耗糖速率的原则,即公式  $F \cdot c = 1/Y_{x/s} \cdot dx/dt$  来确定糖液流加速度,相对恒定  $S^{[7]}$ , 测定  $\mu_0$ 。式中  $Y_{x/s}$  葡萄糖对菌体的转化率  $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 实测值约为 0.28;  $c$ : 补糖液的葡萄糖浓度 30%;  $F$ : 单位体积发酵液单位时间内流加糖液的毫升数 ( $\text{ml} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )。具体做法是在培养液中加入 2% 的葡萄糖作为初糖,待细胞生长期因糖浓度降低而进入减速生长期时,通过变速流加 30% 葡萄糖液控制  $S$  值恒定一段时间 ( $t$ ), 测定  $X_0$  和  $X_{t_0}$ 。由于补糖液浓度很大,增加的体积可忽略不计,因此可通过公式 (2) 计算  $\mu_0$ 。然后逐步降低并恒定  $S$ , 重复上述操作,于是就得到一系列 ( $S_i, \mu_i$ ) 值,测试的一组 ( $S_i, \mu_i$ ) 值及有关实验数据见表 1。

表 1 测试的  $(S_i, \mu_i)$  对应值  
Table 1 Relevant value of determined  $(S_i \text{ and } \mu_i)$

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$F/m[(L \cdot h)^{-1}]$	40.00	47.00	53.00	53.00	60.00	60.00	72.00	72.00	78.00	65.00
$S/g \cdot L^{-1}$	1.20	0.90	0.70	0.50	0.40	0.30	0.25	0.20	0.15	0.10
$X_0/g \cdot L^{-1}$	5.12	6.61	8.12	9.71	11.34	13.21	14.85	17.12	19.54	21.85
$t/h$	0.40	0.35	0.35	0.35	0.35	0.33	0.35	0.4	0.33	0.35
$X_t/g \cdot L^{-1}$	6.46	7.99	9.64	11.26	13.14	14.88	16.96	19.54	21.72	23.68
$\mu/h^{-1}$	0.58	0.54	0.49	0.45	0.42	0.36	0.38	0.33	0.32	0.23
$1/\mu$	1.72	1.85	2.04	2.20	2.38	2.78	2.58	3.00	3.13	4.35
$1/S$	0.83	1.11	1.43	2.00	2.50	3.33	4.00	5.00	6.67	10.00

将 Monod 方程变形为  $\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{\max}}$ , 通过  $1/\mu$  对  $1/S$  作图得图 2。由图 2 可知  $1/\mu$  和  $1/S$  基本符合直线关系。我们可以用线性回归处理数据 得回归方程:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{\max}} = 0.266 \cdot \frac{1}{S} + 1.62 \quad (5)$$

它的“相关系数”  $|r| = 0.97$ , 取信度  $0.05$ ,  $r_{0.05} = 0.632$ ,  $|r| > r_{0.05}$ , 取信度  $0.01$ ,  $r_{0.01} = 0.765$ ,  $|r| > r_{0.01}$ 。因此方程(5)显性相关。于是得到试验条件下,  $\mu_{\max} = 0.62$ ,  $K_S = 0.165$ , 从而细胞生长速率与底物浓度的的关系式可表达为

$$\frac{dX}{dt} = 0.62 \cdot \frac{S}{0.165 + S} \cdot X$$

鉴于(5)式显性相关, 表明了用 Monod 方程描述地衣芽孢杆菌细胞生长与限制性基质葡萄糖浓度之间关系的合理性。

### 2.3 产酶动力学

地衣芽孢杆菌产生的碱性蛋白酶是胞外酶, 以酶活性高低衡量酶的产量。从分批发酵的结果, 我们可以得知酶的合成开始于细胞生长的对数期之后,  $\mu$  值从 0.62 降至 0.001, 酶活从 12u/ml 升至 8196u/ml。因此我们设定其发酵类型为生长部分关联型。拟采用下式描述酶生成速率与细胞生长速率的关系。

$$\frac{dP}{dt} = a \cdot \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (6)$$

若将方程两边除以  $X$ , 则(6)式可转换为(7)式:

$$q_p = \alpha \mu + \beta \quad (7)$$

式(6)(7)中  $P$  酶活,  $u \cdot ml^{-1}$ ;  $\mu = (\frac{dX}{dt}/X)$ , 比生长速率,  $h^{-1}$ ;  $q_p = \frac{dP}{dt}/X$ , 比产酶速率,  $u \cdot (mg \cdot h^{-1})$ ;  $\alpha, \beta$  为常数。在实验过程中我们同样采取以 30% 葡萄糖液控速补料的方式, 控制基质浓度  $S$  进而控制  $\mu$  值的下降速率, 即时测定酶活, 经计算获得  $q_{pj}$ , 于是得到了一系列  $(\mu_j, q_{pj})$  一组  $(\mu_j, q_{pj})$  值及有关实验数据见表 2。以  $q_{pj}$  对  $\mu_j$  作图见图 3, 从图 3 可知  $q_p$  与  $\mu$  有直线关系。经线性回归处理获得回归直线方程如下:

$$(q_p) = \beta + \alpha\mu = 18.3 - 30.6\mu \quad (8)$$

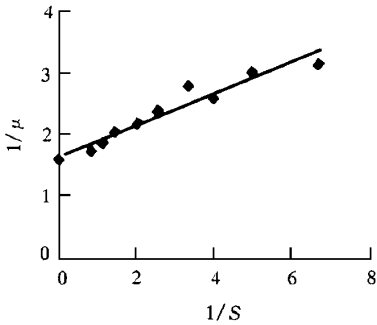
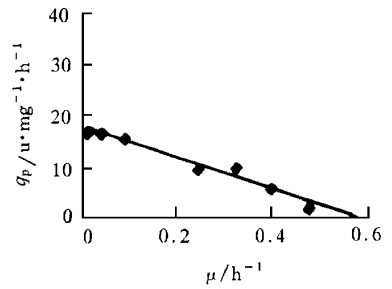


图2 1/S 和 1/μ 的关系

Fig.2 The relationship of 1/S and 1/μ

图3  $q_{pj}$  和  $\mu_j$  的关系Fig.3 The relationship of  $q_{pj}$  and  $\mu_j$ 表2 测试的( $\mu_j, q_{pj}$ )相应值Table 2 Relevant value of determined ( $\mu_j, q_{pj}$ )

No.	1	2	3	4	5	6	7	8
$F/\text{ml} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$	—	45.0	47.00	47.00	43.0	20.00	11.00	6.00
$S/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	3.40	0.70	0.40	0.30	0.20	0.10	0.07	—
$X_0/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	3.64	7.32	9.21	11.16	13.04	14.56	15.12	15.40
$t/\text{h}$	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36
$X_t/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	4.53	8.70	10.64	12.57	14.27	15.09	15.39	15.51
$E_0/\text{u} \cdot \text{ml}^{-1}$	9.40	24.00	99.10	291.00	634.00	1080.00	1671.00	2282.00
$E_t/\text{u} \cdot \text{ml}^{-1}$	9.47	29.50	119.00	332.00	680.00	1164.00	1763.00	2376.00
$\mu/\text{h}^{-1}$	0.61	0.48	0.40	0.33	0.25	0.10	0.05	0.02
$q_0/\text{u} \cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}$	0.05	2.10	6.00	10.20	9.80	16.00	16.80	17.00

线性相关系数  $|r| = 0.985$  取信度 0.05,  $r_{0.05} = 0.632$ ,  $|r| > r_{0.05}$ ; 取信度 0.01,  $r_{0.01} = 0.765$ ,  $|r| > r_{0.01}$ , 为显性相关。因而表达了用(6)(7)式描述地衣芽孢杆菌 2709 生长与产酶关系的合理性。将  $\alpha, \beta$  值代入(6)式得(9)式:

$$\frac{dp}{dt} = \beta X + \alpha \frac{dX}{dt} = 18.3X - 30.6 \cdot \frac{dX}{dt} \quad (9)$$

将(4)式代入(9)式得(10)式:

$$\frac{dp}{dt} = \beta X + \alpha \cdot \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \cdot X = (18.3 - 19 \cdot \frac{S}{0.165 + S}) X \quad (10)$$

分析上述动力学公式, 可以获得如下启迪 (1) 在地衣芽孢杆菌 2709 的发酵过程中, 动力学公式(4)(6)式只适用于生长期和稳定期, 而不适用于延滞期与自溶期。(2) 该菌合成碱性蛋白酶的速率与细胞总量有关, 因此增加发酵液的细胞浓度( $X$ ) 就为提高发酵液的酶活单位打下基础。(3) 碱性蛋白酶的合成起始于细胞生长指数期之后, 并且随比生长速率( $\mu$ ) 的减小而酶合成比速率( ) 逐步增大。当  $\mu$  趋近于极小值时, 达到最大

此时发酵液的酶活性达到最大值,之后发酵进入衰亡期。(4)细胞生长速率与酶合成速率都与基质浓度有关,当  $S > 1.65 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时发酵过程以细胞生长为主,当  $S < 1.65 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时发酵过程以合成碱性蛋白酶为主。倘若采用补料分批发酵或连续发酵的方式,分阶段合理控制基质浓度,前期促进细胞生长,后期促进酶量增加,应该说是一种提高生产效率和效益的有效措施。

**致 谢** 在本论文的完成过程中得到了本系褚西宁教授和山西省生物研究所周鸿宾研究员的大力支持,在此表示衷心的感谢。

### 参 考 文 献

- 1 张树政. 酶制剂工业,北京:科学出版社,1981,431~449
- 2 Rose A H. In: Economic Microbiology, London: Academic Press, 1980, 5: 51~72
- 3 Lillo B A, Valera F R. Appl Environ Microbiol, 1990, **56**: 2517~2521
- 4 那淑敏,余茂效. 微生物学报, 1988, **28**(3): 249~256
- 5 邱秀宝,袁影,戴宏等. 微生物学报, 1990, **30**(2): 129~133
- 6 俞俊棠,唐孝宣,李友荣主编. 生物工艺学(上册),上海:华东化工学院出版社,1992, pp. 82~99
- 7 龚建华, Strandberg L, Enfor S O. 生物工程学报, 1990, **4**(3): 246~251
- 8 彭彩霞,罗凤林. 中华医学检验杂志, 1979, **4**: 209~211

## A Kinetic Study on the Production of Alkaline Proteinase by *Bacillus licheniformis* 2709

Zhao Liangqi Qi Jing\*

(Department of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 03006)

Gao Jinyang

(Pinyang Pharmaceutical factory, Houma 043000)

**Abstract** With autocontrol fermentation equipment, the basic law of growth and metabolism of *Bacillus licheniformis* 2709 was studied with the batch culture. Then the exact and enough points of  $(S, \mu)$  and  $(\mu, A_p)$  were obtained by controlling the concentration of the growth-limiting substrate with the fed-batch-culture. The parameter values of  $K_S$ ,  $\mu_{\text{max}}$ ,  $\alpha$  and  $\beta$  were acquired and the kinetic formula on cell growth rate and product synthesis rate were inferred. Thereby, the Monod formula was proved to be rational to describe the relationship between the cell growth rate of *B. licheniformis* 2709 and the concentration of the growth limiting substrate in the broth; And the data showed the fermentation type is one partially related to growth.

**Key words** Alkaline proteinase, fed-batch-fermentation, fermentation kinetic