

科研与开发

高活力液体碱性蛋白酶制备工艺研究

孙同毅, 李军训, 殷向彬, 陈 坤, 路福平, 杜连祥

(天津科技大学生物工程学院 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457)

摘要: 为了获得高质量浓缩液体蛋白酶, 对提取工艺中不同絮凝剂, 不同大小活性炭以及膜过滤条件进行了优化。结果表明 0.1% 质量分数 NaAlO_2 絮凝剂在 $\text{pH} = 8.0$ 时絮凝速度快、效果好; 1% 中型颗粒活性炭脱色效果明显; 聚丙烯膜超滤温度 10°C 、压力 0.05 MPa 时酶的回收率最高。优化后的工艺使液体酶活力提高到 $3.2 \times 10^5 \mu/\text{mL}$, 使初始发酵液浓缩了 8.3 倍, 酶回收率达到 83.6%。

关键词: 液体蛋白酶; 制备工艺; 絮凝; 超滤浓缩

中图分类号: TQ426.97

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2007)11-0031-03

Study on pilot preparation technology for high activity and alkaline liquid protease

SUN Tong-yi, LI Jun-xun, YIN Xiang-bin, CHEN Kun, LU Fu-ping, DU Lian-xiang

(Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Optimization of flocculent agents, active carbon and conditions of filter membranes are studied in the pilot preparation technology to obtain high quality liquid protease. The results show that 0.1% of NaAlO_2 is the best in $\text{pH} 8.0$ for it, and 1% of carbon medium-sized active carbon the best too. The conditions of treating temperature of 10°C and operating pressure of 0.05 MPa is optimal for ultrafiltration concentration with polypropylene filter membranes. Under these conditions, a $3.2 \times 10^5 \mu/\text{mL}$ of liquid protease can be produced. And the enzyme can be condensed by 8.3 times from broth, with a recovery rate of 83.6%.

Key words: liquid protease; preparation technology; flocculation; ultrafiltration concentration

碱性蛋白酶是重要的工业用酶, 已经广泛应用于洗涤、皮革和食品等工业领域^[1]。随着研究的不断深入和新领域的开发, 碱性蛋白酶需求量急剧增加, 成为国内近年来的研究热点。但对液体碱性蛋白酶浓缩工艺的研究报道非常少。本课题组筛选到 1 株高产碱性蛋白酶的菌株, 中试发酵液酶活力达到 $3.86 \times 10^4 \mu/\text{mL}$, 是目前国内外报道的最高活力之一。但由于发酵液黏度大、塑性强, 在采用传统的浓缩工艺进行研究时发现效果并不理想, 浓缩液酶的回收率只有 50% 左右, 而且色泽呈暗黑色, 因此针对此问题进行工艺优化以提高碱性蛋白酶的回收率和质量。

1 实验部分

1.1 主要实验材料、设备

发酵液中含有嗜碱芽孢杆菌, 镜检正常, 无杂菌, 酶活力达到最高 $3.86 \times 10^4 \mu/\text{mL}$, $\text{pH} = 8.0$ 左

右。冷冻离心机, 日本日立公司; 纸板过滤器, 天津市东丽区通达滤材器厂; 膜浓缩设备, 天津膜天膜高科技工程有限公司。

1.2 工艺流程

浓缩酶制备工艺流程为: 发酵液 → 絮凝 → 离心 → 活性炭脱色 → 纸板过滤 → 超滤浓缩。

(1) 絮凝: 取刚下罐的发酵液 100 mL, 分别加入絮凝剂, 室温搅拌 10 min, 然后倒入 100 mL 量筒中, 观察沉降情况, 并记录清液出现时间为分层时间。每隔 5 min 测定清液高度, 至 120 min 为止。所得数据做沉降曲线, 分析絮凝效果。然后取上清液、沉降物分别测定吸光度 OD_{600} 、除菌率。

(2) 离心: 将发酵液装入离心管中, 在 4°C 条件下 8 000 r/min 离心, 每 4 min 测定上清液吸光度, 吸光度在 0.40 ~ 0.45 时记录离心时间。

(3) 脱色: 分别选择大颗粒、中颗粒和粉末状活

收稿日期: 2007-08-08

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2007AA02Z212); 国家科技资源平台项目(2005DKA21204-10); 科技部中小企业创新基金(06C26211200692)

作者简介: 孙同毅(1979-), 男, 博士生; 路福平(1967-), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为发酵工程, 通讯联系人, 022-60602243, lfp@tust.edu.cn。

性炭进行发酵液脱色,然后按 0.5%、1.0%、1.5.0%、2.0%用量(质量分数)进行脱色效果比较。

(4)纸板过滤:过滤纸板由孔径 30~50 μm 的棉花纤维、石棉和硅藻土组成,纸板过滤机的压力为 0.3 MPa,检测过滤液的酶活力并计算收率。

(5)膜浓缩:由于蛋白酶相对分子质量为 28 k,因此选用膜的 MMCO(截留分子质量)为 20 k,操作压力为 0.05 MPa,温度控制在 10℃左右。分别选择聚醚砜、醋酸纤维、聚丙烯膜材料比较浓缩效果和酶的回收率;分别对超滤时间、压力、温度等操作条件进行单因素实验比较,确定最佳膜浓缩工艺。

1.3 分析方法

SDS-PAGE:按常规 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,5.0%浓缩凝胶,12.0%分离凝胶,考马斯亮蓝 R-250 染色 30 min,甲醇-冰醋酸脱色 1~3 h。碱性蛋白酶酶活测定按照轻工业部颁标准 QB/T 1803-93(Folin 试剂显色)。

2 结果与讨论

2.1 絮凝工艺

絮凝工艺是碱性蛋白酶发酵液处理第一步,也是最关键的一步。它直接关系到下游工艺能否顺利进行。嗜碱芽孢杆菌有荚膜,细胞很小,密度和水接近,其发酵液属于非牛顿型液体,直接用过滤的方法很难除去菌体和残渣。如果采用高速离心机进行分离则能耗太高。理想的提纯方法应是首先采用化学方法处理发酵液,将菌体絮凝下来,然后再用离心方法使酶液与菌体分离^[2-4]。高荷电密度对絮凝有利^[5]。通过比较絮凝剂 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 、聚丙烯酰胺和 NaAlO_2 的效果,发现 NaAlO_2 比 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 和聚丙烯酰胺絮凝效果更加明显。 NaAlO_2 的用量以质量分数 0.1%最为适宜,絮凝速度最快,菌体去除率高达 92%,同时酶回收率也最高,此时离心耗时也最短。对于 NaAlO_2 ,最宜 pH 为 8.0。

2.2 活性炭脱色

活性炭用于糖浆等有色液体的脱色已是成熟的工艺,以活性炭吸附柠檬酸发酵液,可脱除 80%以上的色素^[6],但用于碱性蛋白酶发酵液的脱色还未见报道。利用 3 种活性炭(大颗粒、中颗粒、粉末状)对酶液进行脱色,结果为中颗粒活性炭吸附力最强,脱色效果最为明显。同时活性炭用量为 1%时,最为经济。

2.3 纸板过滤

将脱色发酵液通过纸板过滤,可以有效除去小

的固体颗粒,提高超滤的通透量。检测过滤前后液体中酶活力的变化情况,过滤前的酶活力为 $3.72 \times 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$,过滤后的酶活力为 $3.36 \times 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$,纸板过滤回收率可以达到 90.3%。

2.4 超滤浓缩工艺

2.4.1 滤膜材料选择

膜的渗透性和对产物的吸附性能明显影响滤液流速和产物回收率,膜的渗透性的差别,与制膜材料、结构及溶质分子等因素有关^[7]。由于蛋白酶分子质量为 28 000 g/mol,所以选用膜的 MMCO 为 20 k。对 3 种滤膜材料(聚醚砜、醋酸纤维、聚丙烯)进行了筛选实验,结果表明结果在浓缩倍数分别为 3.2、3.9、4.1 时其酶回收率相近,但聚丙烯略高于前二者,达 98.1%。

2.4.2 超滤时间、压力和温度与滤出液酶活力的关系

控制温度为 10℃、操作压力在 0.05 MPa 下进行浓缩试验。在不断地往储槽中注入酶的活力为 $3.36 \times 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的蛋白酶溶液,连续工作。结果显示起初透过膜的蛋白酶量较多,为 $0.152 \times 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$,之后逐渐减少直到稳定在 $0.12 \times 10^4 \sim 0.13 \times 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。因为刚开始时在膜的表面未形成浓差极化,酶的透过能力相对较大,随着酶不断在膜表层的积累,酶的透过最终趋向平衡。在这种动态稳定条件下,储槽中原液的浓度越来越大,黏度也越来越大,此时可向储槽中添加蒸馏水稀释酶液,进一步降低酶液中盐类和小分子杂质的浓度。

高压除可使酶结构破坏外,还使超滤膜的内表面的孔隙变大,酶的通过量上升,影响了浓缩收率^[8]。对于 MMCO 为 20 k 的膜而言,当压力控制在 0.05 MPa 以下时,透过液中酶活力小于 $0.13 \times 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$;当控制压力超过 0.05 MPa 时,酶透过量迅速上升,导致酶回收率下降。故压力应控制在 0.05 MPa 左右。

当温度超过 30℃时,酶活力损失率迅速上升,同时滤膜表层孔在高温下也表现得极不稳定,使得大量酶进入滤液中,影响了回收率^[9]。温度宜控制在 10℃为宜。

2.5 新工艺与传统浓缩工艺比较

常规的浓缩工艺包括以下几个步骤:发酵液→絮凝→压滤除渣→超滤浓缩^[1]。王跃军等^[10]用上述工艺对低温浓缩液体碱性蛋白酶进行了研究,回收率为 79%。朱孔生等^[11]对 2709 液体碱性蛋白酶的浓缩工艺进行了研究,采用的工艺为:发酵液→絮

凝→压滤除渣→刮板薄膜蒸发器浓缩,其回收率为65%。

笔者实验发现 NaAlO_2 的絮凝效果优于其他絮凝剂,而且更有利于下游工艺的顺利进行。采用传统压滤工艺时,由于发酵液性状黏稠,使压滤阶段成为提取工艺的瓶颈,所以改用离心方法取得理想效果,经活性炭脱色后用聚丙烯膜超滤,可以有效提高蛋白酶液澄清度,提高液体酶商品性状。每个浓缩工艺阶段酶的回收率都维持在较高的水平,絮凝离心、脱色过滤和超滤浓缩工艺酶的回收率分别达到96.4%、90.3%和96.1%,最终整个工艺流程的总回收率为83.6%(表1),明显高于采用传统工艺流程时碱性蛋白酶的回收率,而且浓缩酶液澄清透明、色泽金黄。

表1 提取流程中酶活力检测 $10^4 \mu\text{mL}$

絮凝离心			脱色过滤			超滤			总回收率/%
处理前	处理后	回收率/%	处理前	处理后	回收率/%	处理前	处理后	回收率/%	
3.86	3.72	96.4	3.72	3.36	90.3	3.36	32.1	96.1	83.6

发酵液经过絮凝离心、脱色过滤和超滤浓缩处理后所得酶液进行 SDS-PAGE 分析,结果显示酶液经过上述工艺处理后得到了浓缩,而且杂蛋白减少,碱性蛋白酶得到了纯化。

3 结语

在碱性蛋白酶发酵液絮凝过程中采用新型絮凝剂 NaAlO_2 ,絮凝速度快,絮凝菌体多,菌体离心速度快,酶回收率高, NaAlO_2 最佳使用量为0.1%,在 $\text{pH} = 8.0$ 时效果最好。发酵液脱色处理时采用中型颗粒活性炭效果优于大颗粒和粉末状活性炭,最佳脱色

用量为1%。聚丙烯超滤膜适合碱性蛋白酶发酵液浓缩,适宜操作温度为 10°C ,操作压力为 0.05 MPa 。

酶提取工艺流程为:发酵液→0.1% NaAlO_2 絮凝→离心→中颗粒活性炭脱色→纸板过滤→聚丙烯膜超滤浓缩。采用该工艺进行浓缩,液体酶活力由 $3.86 \times 10^4 \mu\text{mL}$ 提高到 $3.2 \times 10^5 \mu\text{mL}$,浓缩了8.3倍,碱性蛋白酶的回收率达到83.6%,浓缩酶液澄清透明、色泽金黄,而且杂蛋白减少,产品质量提高。

参考文献

- [1] 张树政主编. 酶制剂工业[M]. 上册. 北京: 科学出版社, 1984: 198-216.
- [2] 周艳芬, 潘延云, 张贺迎, 等. 絮凝剂在青霉素酰化酶提取中的应用[J]. 河北农业大学学报, 2002(25): 69-71.
- [3] Ashlock P D. An investigation of the taxonomic value of the phallus in the Lygaeidae (Hemiptera-Heteroptera)[J]. Ann Entomol Soc Amer, 1957, 50: 407-426.
- [4] 刘仲敏, 刘安邦, 张新武, 等. 精制液体 BBA 中温 α -淀粉酶工艺研究[J]. 食品工业科技, 2002(23): 39-41.
- [5] 牟占军, 葛庆仁. 谷氨酸菌体的絮凝及分离[J]. 化学工程, 1996, 24(3): 53-59.
- [6] 焦莉莉, 周建中, 黄顺德. 柠檬酸发酵液的活性炭吸附处理法[J]. 华东理工大学学报, 1995, 18(1): 1-5.
- [7] 高以恒, 叶凌碧. 膜分离技术基础[M]. 北京: 科学出版社, 1989: 1-5.
- [8] 丁凤平, Hidetaka N, Kunio N. 超滤技术在碱性果胶酶浓缩工艺中的应用[J]. 膜科学与技术, 2001, 21(6): 53-58.
- [9] Srijaroonrat P, Julien E, Aurelle Y. Unstable secondary oil/water emulsion treatment using ultrafiltration: Fouling control by backflushing[J]. J Mem Sci, 1999, 159: 11-20.
- [10] 王跃军, 孙溢, 洪义国, 等. 黄海黄杆菌 YS-9412-130 低温碱性蛋白酶的制备工艺研究[J]. 海洋水产研究, 2001, 22(2): 11-20.
- [11] 朱孔生, 苏勉鸿. 液体 2709 蛋白酶的研制[J]. 食品与发酵工业, 1980(5): 1-5. ■

您想了解本专业最新的技术进展吗?
您想及时掌握国内外竞争对手的技术动向吗?
您想获取最新的国外科技文献资源吗?
您想解决在研发过程中遇到的技术难题吗?
您想在进行技术改造时得到有效的技术支撑吗?

中国化工信息中心拥有的全国最权威的化工科技文献资源是您的坚强后盾!
中国石油和化工文献资源网是您最高效便捷的途径!
中国化工信息中心文献服务部的专业服务人员是您最好的帮手!

我们的资源

- 国家财政专项文献采购经费 1 200 万元人民币/年
- 原版外文期刊 1 000 余种
- 国外会议录、科技报告等 270 余种
- 电子版数据库 30 余种
- 定价在 1 万元以上的国外原版期刊 130 余种

· 中文期刊、会议录、科技报告、图书等文献 3 000 余种
· 高度专业化的化学化工及相关学科的专题报告, 提供化工产品、原材料方面的技术经济信息、产品的生产工艺和设计数据

· 1977 年以后的全部美国化学文摘(CA)光盘

我们的服务

技术快讯 文献检索 原文提供 定题跟踪
科技查新 情报调研 咨询服务 文献协作

我们的网站

中国石油和化工文献资源网 WWW.CHEMDOC.COM.CN

我们的目标

使国家投入巨资收藏的国内外科技文献资源多层次、多方位、多角度、多途径、最大程度地为企业所用, 使企业从中获得最大的效益

中国化工信息中心 文献服务部

电话: 010-64444070 64437121 传真: 010-64437115

E-mail: lihj@mail.cncic.gov.cn