

[文章编号] 1007-7405(2016)03-0184-07

褐藻胶裂解酶发酵工艺优化及其中试放大

陈艳红^{1,2,3,4}, 杨帆¹, 肖安风^{1,2,3,4}, 倪辉^{1,2,3,4}, 朱艳冰^{1,2,3,4}, 蔡慧农^{1,2,3,4}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021; 3. 厦门市食品与生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021; 4. 厦门南方海洋研究中心经济海藻资源化利用与深加工重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 对产微球茎菌(*Microbulbifer* sp.) ALW1 发酵产褐藻胶裂解酶 5 L 罐发酵工艺进行优化, 建立褐藻胶裂解酶的高产发酵工艺。结果表明: 海藻酸钠质量浓度为 1 g/L 时效果最好, 浓度减半或加倍都会使酶活力下降; 25 ℃ 比 20 ℃ 更利于产酶; pH 值控制在 7.5 时比自然条件下发酵产酶高峰提前, 产酶量变化不大; 在此基础上, 对罐上工艺进行中试放大, 20 L 发酵罐酶活力最高为 57.0 U/mL, 200 L 罐酶活力最高为 43.5 U/mL, 500 L 罐酶活力最高为 38.3 U/mL, 分别是小试水平的 39.6%、30.2%、26.5%。

[关键词] 产微球茎菌 ALW1; 褐藻胶裂解酶; 发酵工艺; 优化; 中试放大

[中图分类号] TQ 920.6

Optimization and Scale-up of Alginate Lyase Fermentation Processes

CHEN Yan-hong^{1,2,3,4}, YANG Fan¹, XIAO An-feng^{1,2,3,4}, NI Hui^{1,2,3,4},
ZHU Yan-bing^{1,2,3,4}, CAI Hui-nong^{1,2,3,4}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering of Fujian Province, Xiamen 361021, China; 3. Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, China; 4. Key Laboratory of Systemic Utilization and In-depth Processing of Economic Seaweed, Xiamen Southern Ocean Technology Center of China, Xiamen 361021, China)

Abstract: *Microbulbifer* sp. ALW1 isolate was subjected to fermentation parameters optimization in a attempt to increase the alginate lyase producing ability in a 5 L bioreactor. The results showed that the addition of 1 g/L alginate was better for enzyme production than double or half the concentration, and 25 ℃ was more conducive to enzyme accumulation than 20 ℃. In addition, when pH was controlled at 7.5, the peak of alginate lyase yield occurred earlier than that at natural pH, but the yields showed little change. Based on the optimized conditions, the fermentation processes for alginate lyase production were scaled up and the maximum alginate lyase activities of 57.0 U/mL, 43.5 U/mL, and 38.3 U/mL were achieved in 20 L bioreactor, 200 L bioreactor and 500 L bioreactor respectively, which were 39.6%, 30.2% and 26.5% of the small scale level.

Keywords: *Microbulbifer* sp. ALW1; alginate lyase; fermentation process; optimization; scale-up of fermentation process

[收稿日期] 2015-09-09

[修回日期] 2015-11-24

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31401632); 厦门市科技计划项目(3502Z20120005); 厦门南方海洋研究中心项目(13GZP004NF10)

[作者简介] 陈艳红(1981—), 女, 实验师, 硕士, 从事食品酶工程方向研究。通信作者: 肖安风(1973—), 男, 教授, 博士, 从事食品生物技术方向研究, E-mail: xxaaffeng@jmu.edu.cn。

0 引言

褐藻胶寡糖是褐藻胶经水解得到的低聚糖,目前,褐藻胶寡糖的研究已涉及到药物治疗^[1-2]、疾病防治^[3-5]、植物生长^[6-7]等方面,它表现出的较高生物活性受到人们的关注。褐藻胶裂解酶作为一种用途广泛的工具酶,在制备低分子质量的褐藻胶寡糖时因反应条件温和、专一性强、得率高而逐渐成为生产寡糖的主要方式^[8-9]。此外,褐藻胶裂解酶可以作为工具酶用于治疗囊性纤维化患者的肺部感染^[10]。2012年,Wargacki等^[11]用褐藻胶裂解酶降解褐藻胶来生产生物乙醇,为解决能源危机提供了新的思路。国内外对褐藻胶裂解酶的研究主要集中于菌种分离、基因工程菌的构建、酶学性质的改善以及酶解产物的构效关系等方面^[12],而对褐藻胶裂解酶菌株大规模发酵条件方面的研究报道却很少。近年来,有关褐藻胶裂解酶发酵工艺的研究也逐渐开展起来,但是针对发酵工艺的研究主要集中在摇瓶水平上^[13-16],发酵罐上的工艺研究还不够深入,特别是褐藻胶裂解酶的中试发酵研究更少,发酵生产工艺更需完善。本研究利用海带表面分离的一株产微球茎菌(*Microbulbifer* sp.) ALW1,对其进行5 L罐发酵,并进行发酵条件优化,研究其在发酵罐中的产酶规律,使褐藻胶裂解酶产量能够得到进一步提高,再逐步进行中试放大,最终放大至500 L,为今后的大规模生产提供重要的技术参数依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

产微球茎菌 *Microbulbifer* sp. ALW1 由集美大学食品与生物工程学院发酵工程研究室选育,保藏于中国工业微生物菌种保藏中心,保藏编号 23821。

1.2 培养基

种子培养基 (g/L): 海藻酸钠 5, 蛋白胨 5, 酵母粉 1, 琼脂 1.5, (NH₄)₂SO₄ 5, K₂HPO₄ 2, NaCl 30, MgSO₄ · 7H₂O 1, FeSO₄ · 7H₂O 0.01, pH = 7.5。

初始发酵培养基成分 (g/L): 海藻酸钠 1, NaCl 60, MgSO₄ · 7H₂O 3, K₂HPO₄ 6, FeSO₄ · 7H₂O 0.06, pH = 7.5。

1.3 培养方法

1.3.1 种子的活化

将超低温下甘油菌种解冻后接入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 25 ℃、180 r/min 下培养 36 h。

1.3.2 5 L 发酵罐分批发酵

按 2% 的接种量将活化的菌种转接入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 25 ℃、180 r/min 下培养 12 h, 培养好种子液按 5% 的接种量接入含 4 L 发酵培养基的 5 L 发酵罐, 25 ℃、100 r/min, 通气量 2 L/min 发酵 72 h, 每 6 h 检测生物量及褐藻胶裂解酶活力。

1.3.3 放大试验

20 L 罐培养: 按 2% 的接种量将活化的菌种转接入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 25 ℃、180 r/min 下培养 12 h, 培养好的种子液按 5% 接种量转接入含 10 L 发酵培养基的 20 L 发酵罐中, 25 ℃、150 r/min、通气量 0.26 m³/h 下发酵 72 h, 每隔 6 h 取样测定生物量、褐藻胶裂解酶活力及发酵液 pH 值。

200 L 罐培养: 以 20 L 罐进行种子液的培养, 按 2% 的接种量将活化的菌种接入含 5 L 种子培养基的 20 L 罐中, 25 ℃、150 r/min 下培养 12 h, 然后按 5% 接种量转接入含 100 L 发酵培养基的 200 L 发酵罐中, 25 ℃、通气量 2.4 m³/h 不进行机械搅拌发酵 72 h, 每 6 h 取样检测。

500 L 罐培养: 以 20 L 罐进行种子液的培养, 按 2% 的接种量将活化的菌种接入含 10 L 种子培养基的 20 L 罐中, 25 ℃、150 r/min 下培养 12 h, 然后按 5% 接种量转接入含 200 L 发酵培养基的 500 L

发酵罐中，25 ℃、通气量 3.6 m³/h 不进行机械搅拌发酵 72 h，每 6 h 取样检测。

1.4 生物量测定

取 1.0 mL 发酵液，12 000 r/min 离心 8 min，去上清液后，用蒸馏水稀释适当倍数，在 600 nm 波长下测吸光度值。

1.5 酶活力检测

取稀释一定倍数的发酵上清液 250 μL，添加 500 μL 质量浓度为 5 g/L 海藻酸钠溶液，40 ℃ 水浴 30 min，再沸水浴 5 min 终止反应，加入 0.5 mL DNS 溶液，混匀，沸水显色 5 min，冷却后蒸馏水稀释到 5 mL，在 540 nm 处测定吸光度值，根据标准曲线计算反应液中还原糖的生成量，测定褐藻胶裂解酶活力^[17]。

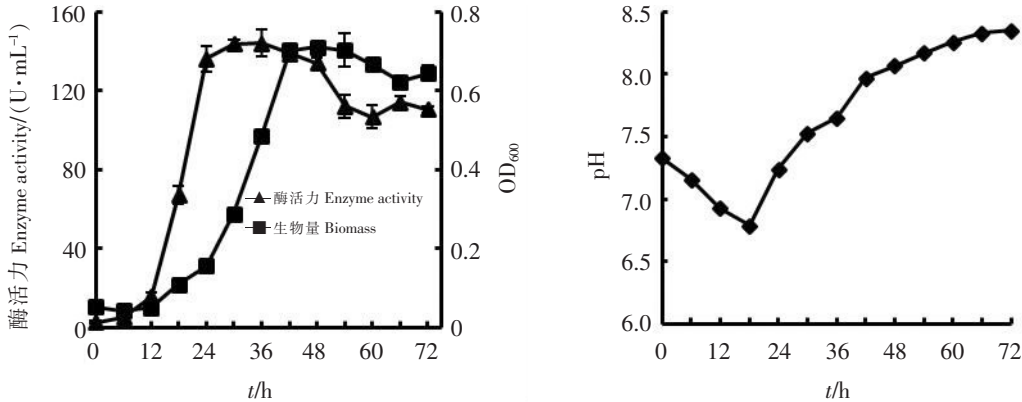
2 结果与分析

2.1 5 L 发酵罐分批发酵工艺

在 5 L 发酵罐中对产微球茎菌 ALW1 发酵工艺进行研究，探索 *Microbulbifer* sp. ALW1 在发酵罐中的发酵规律。

从图 1 可以看出，菌株生长较产酶有所滞后，褐藻胶裂解酶迅速积累时期为菌株生长对数中前期，即在较低菌浓度情况下可以大量产酶，36 h 时酶活力达到最高值 144.2 U/mL。42 h 生物量达到最高值后保持稳定，54 h 菌株生长进入衰亡期。随着发酵时间的延长，菌株进入稳定期时褐藻胶裂解酶活力有下降趋势，可见，在培养环境下发酵时间过长酶可能会失去活力。

在发酵过程中，pH 值的变化总体趋势为先下降后上升，刚开始发酵时，pH 值下降，可能是由于接种过程中种子液的硫酸铵被菌株代谢利用，随着发酵的进行，pH 值开始上升，说明在该阶段微生物大量利用海藻酸，导致发酵液 pH 值升高。



a. ALW1 发酵曲线 Fermentation curve of ALW1 b. 发酵过程中 pH 值的变化 Change of pH during fermentation

图 1 产微球茎菌 ALW1 发酵产褐藻胶裂解酶发酵罐培养发酵曲线
Fig.1 Fermentation curve of *Microbulbifer* sp. ALW1 producing alginate lyase

2.1.1 海藻酸钠质量浓度

采用 5 L 罐对产微球茎菌 ALW1 进行发酵试验，分别将培养基中海藻酸钠质量浓度设为 0.5、1、2 g/L，其余条件与发酵罐初始发酵条件相同，进行 72 h 的分批发酵。考察发酵过程中控制不同浓度海藻酸钠对产微球茎菌 ALW1 发酵产褐藻胶裂解酶的影响，结果如图 2 所示。

从图 2 可以看出，海藻酸钠质量浓度为 1 g/L 时，发酵开始至 18 h 褐藻胶裂解酶活力较低，18 ~ 30 h 酶活力迅速增加，30 ~ 54 h 酶活力增加缓慢之后保持相对稳定，发酵结束时酶活力为 130.9 U/mL。海藻酸钠添加量为 0.5 g/L 和 2 g/L，发酵结束时的酶活力较低。海藻酸钠质量浓度为 2 g/L 时，菌株较快进入对数期，生物量迅速增加，60 h 时开始下降，发酵结束时生物量（OD₆₀₀）为 0.68。海藻酸

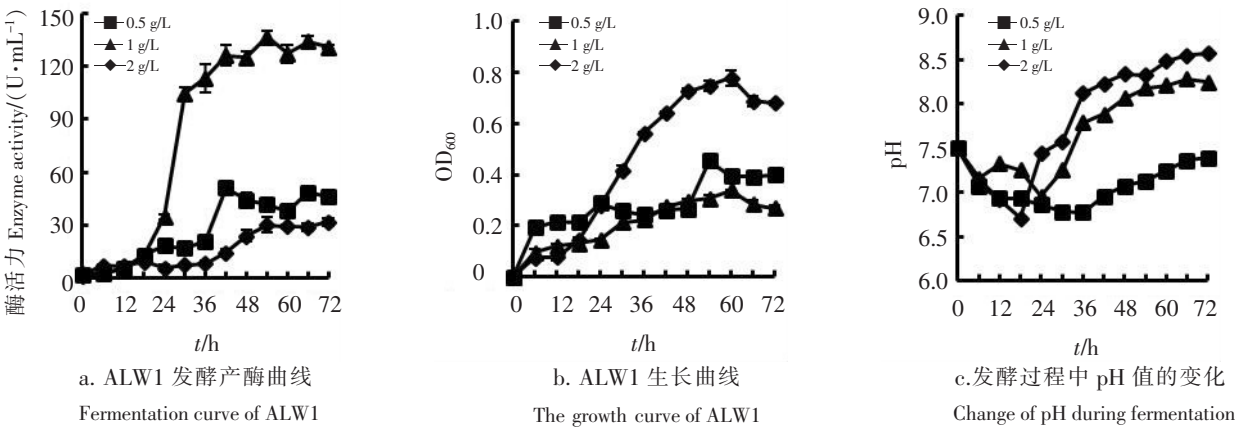


图2 不同浓度海藻酸钠对产微球茎菌 ALW1 罐上发酵产褐藻胶裂解酶活力及生长的影响
Fig.2 Effects of different concentration of alginate on the production of alginate lyase and growth of *Microbulbifer* sp. ALW1 in bioreactor

钠质量浓度为 0.5 g/L 和 1 g/L 时生物量偏低。不同浓度海藻酸钠发酵条件下, pH 值的变化趋势都是先下降后升高, 随着海藻酸钠浓度的增加, pH 值上升的趋势越明显。

海藻酸钠添加量为 0.5 g/L 和 1 g/L 时, 菌株生长曲线相似, 且生物量都偏低。但就产酶而言, 添加量为 1 g/L 时产酶量大大提高, 可以认为菌株产酶并非与生长关联, 且低浓度对于诱导产酶较有利, 添加量为 2 g/L 时, 生物量明显增加, 产酶却受抑制, 生长代谢途径也可能发生变化, 一些代谢产物的积累对产酶也会造成抑制。因此, 海藻酸钠添加量为 1 g/L 时较好。

2. 1. 2 温度

将产微球茎菌 ALW1 发酵温度设为 20 ℃, 对照组温度为 25 ℃, 其余发酵条件与初始发酵条件一致, 进行 5 L 发酵罐 72 h 的分批发酵试验。图 3 显示, 温度对发酵的影响主要为对数中后期, 温度过低, 影响生长。温度为 25 ℃时, 菌株较快进入对数生长期, 发酵 12 h 后酶活力迅速增加, 30 h 时褐藻胶裂解酶活力达到 104.9 U/mL, 此后酶活力增加缓慢, 54 h 时酶活力达到最高, 为 136.9 U/mL。温度 20 ℃时, 菌株生长受温度影响, 生物量偏低, 发酵 24 h 菌株产褐藻胶裂解酶活力达到最大值, 仅为 29.7 U/mL。因此, 一般在合适范围内, 温度高, 菌株生长代谢较旺盛, 产酶量也相应增加。

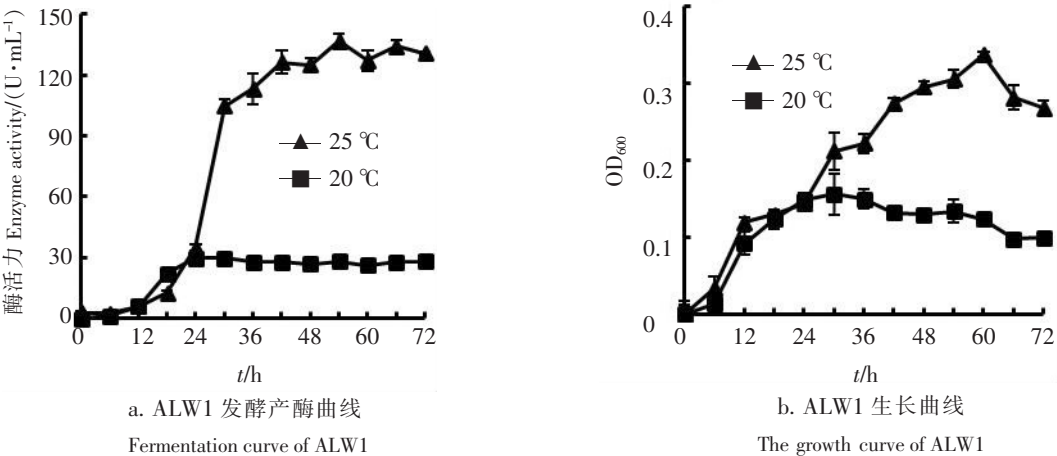


图3 不同温度对产微球茎菌 ALW1 罐上发酵产褐藻胶裂解酶活力及生长的影响
Fig.3 Effects of different temperature on the production of alginate lyase and growth of *Microbulbifer* sp. ALW1 in bioreactor

2. 1. 3 pH 值

从图 1 可知, 发酵过程中 pH 值的变化总体呈先下降后上升趋势。已有报道几种不同的海洋细菌

产褐藻胶裂解酶在偏碱的条件下表现出最佳的活性以及稳定性^{[16][18][18]}。在 5 L 发酵罐发酵试验中将整个发酵过程中 pH 值设为 7.5，对照组将起始 pH 值设为 7.5，整个发酵过程不控 pH 值，其他发酵条件与初始条件一致，进行 72 h 分批发酵试验。

从图 4 可以看出，发酵过程中控制 pH 值与否，发酵曲线及生长曲线趋势基本一致。发酵过程控制 pH 值为 7.5，发酵 12~30 h，褐藻胶裂解酶大量积累，30~42 h，褐藻胶裂解酶活力缓慢增加，42 h 时酶活力达到最高值 132.0 U/mL，此后，酶活力开始下降。控制 pH 值时生物量略高于不控 pH 值。发酵过程中控制 pH 值与不控 pH 值产酶量变化不大，不控 pH 值产酶略微滞后，达到峰值的时间要晚一些，滞后的原因可能是由发酵初期 pH 值的波动引起，整体上控 pH 值条件下维持酶活力稳定的时间比不控 pH 值要稍微长一些。

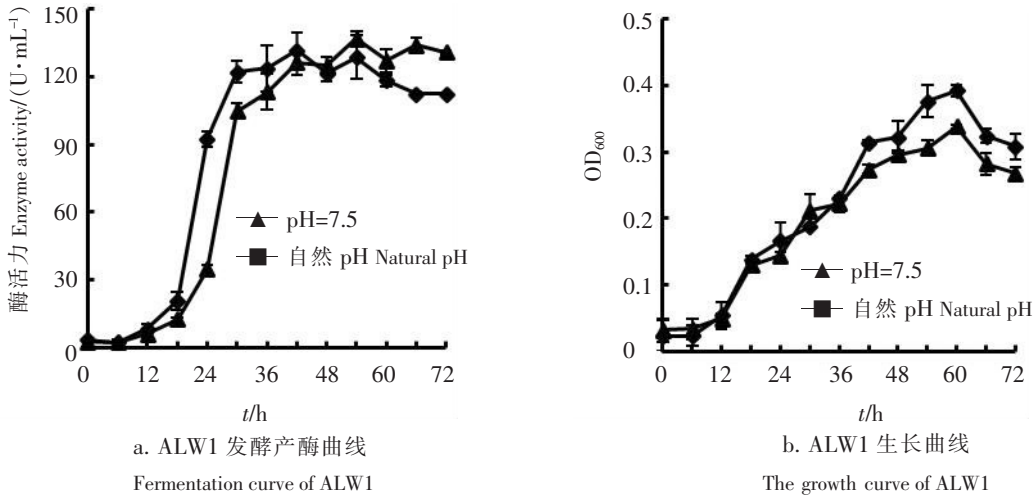


图 4 pH 值对产微球茎菌 ALW1 罐上发酵产褐藻胶裂解酶活力及生长的影响

Fig.4 Effects of pH on the production of alginate lyase and growth of *Microbulbifer* sp. ALW1 in bioreactor

2.2 产微球茎菌 ALW1 的中试放大试验

根据小试结果进行中试放大试验，研究产微球茎菌 ALW1 在 20 L、200 L 以及 500 L 发酵罐中的发酵规律。

2.2.1 20 L 罐发酵曲线

图 5a、图 5b 分别为 20 L 发酵罐第 1 批发酵及第 2 批发酵曲线，可以看出，接种后，产微球茎菌 ALW1 延滞期比较短，24 h 进入对数生长期，54 h 时生物量为 1.512，进入稳定期。第 2 批发酵与第 1 批生物量整体趋势一致，18~24 h 生物量迅速增加，24 h 后生物量继续增加，但是较缓慢。

第 1 批发酵与第 2 批酶活力变化基本一致。接种后菌株产酶量迅速增加，18 h 时酶活力达到最高值，分别为 30.7 U/mL 和 28.4 U/mL。此后酶活力持续下降，至发酵 56~60 h 酶活力略有上升，发酵结束后，第 1 批和第 2 批发酵液的酶活力分别降至 20.9 U/mL 和 21.8 U/mL。两批发酵过程都出现了酶活力大幅下降并且产酶量都远低于小试水平，因此，需要对其发酵条件进行适当调整。

机械搅拌产生的剪切力会影响菌体生长形态，也会对发酵产物造成影响，因此，在前 2 批发酵基础上将搅拌转速设为 0，其余条件相同，进行第 3 批发酵，结果见图 5c。可以看出，在刚开始发酵的 6 h 内，褐藻胶裂解酶活力没有明显上升，基本保持不变，6~18 h，酶活力迅速升高，18~24 h 内褐藻胶裂解酶活力处于缓慢升高阶段，24 h 后酶活力维持相对稳定状态，为 57.0 U/mL，较前 2 批酶活力显著提高。原因可能是机械搅拌虽然促进发酵液中溶氧增加，促进菌体的生长，但可引起菌种生长环境发生改变，导致其产酶代谢途径发生改变，并且可能在其生长过程中产生有害物质，进一步影响产酶。但是与小试相比，酶活力仍然下降很多，应该是因为放大至 20 L，发酵过程的传质和传热效果变差，从而影响了微生物的生长和产酶。

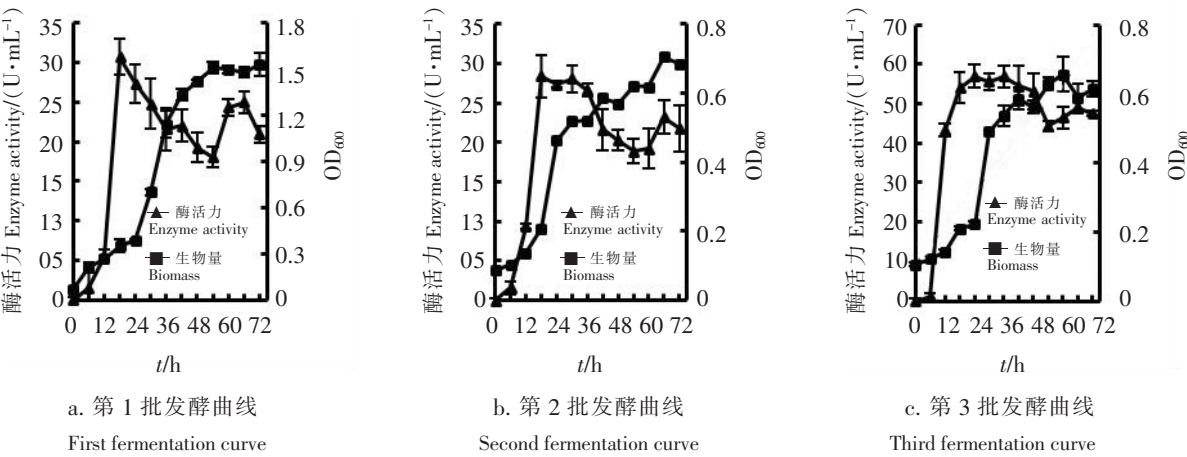


图5 20 L发酵罐产微球茎菌ALW1发酵产褐藻胶裂解酶发酵曲线

Fig.5 Fermentation curve of *Microbulbifer* sp. ALW1 producing alginate lyase in 20 L bioreactor

2.2.2 产微球茎菌ALW1产褐藻胶裂解酶200 L和500 L罐发酵曲线

在20 L发酵罐试验基础上, 将第3批的试验条件放大至200 L和500 L发酵罐上进行褐藻胶裂解酶的发酵。从图6a可以看出, 不进行机械搅拌, 200 L发酵罐产酶曲线与20 L罐趋势基本一致, 在刚开始发酵的6 h内, 褐藻胶裂解酶活力上升较慢, 6 h开始酶活力迅速升高, 18~36 h酶活力基本趋于稳定, 36 h时酶活力为43.5 U/mL, 此后酶活力开始下降。生物量从6 h开始进入对数生长期, 42 h进入稳定期, 生物量基本不变。与20 L发酵相比, 酶活力达到的最高值是20 L罐水平的76.4%左右。

500 L发酵曲线结果如图6b, 6 h开始酶活力迅速增加, 12 h开始褐藻胶裂解酶活力基本维持在稳定的范围内, 60 h酶活力为38.3 U/mL, 60 h后酶活力开始下降, 发酵结束时酶活力为29.0 U/mL。开始发酵时, 产微球茎菌ALW1迅速进入对数生长期, 42 h进入生长稳定期, 生物量基本维持不变, 48 h后生物量开始下降, 发酵结束时生物量比200 L发酵罐低。与200 L发酵罐相比, 产酶趋势基本一致, 500 L发酵罐大量产酶时间为6~12 h, 200 L为6~18 h, 缩短了6 h, 酶活力达到最高值, 是200 L水平的87.9%左右。

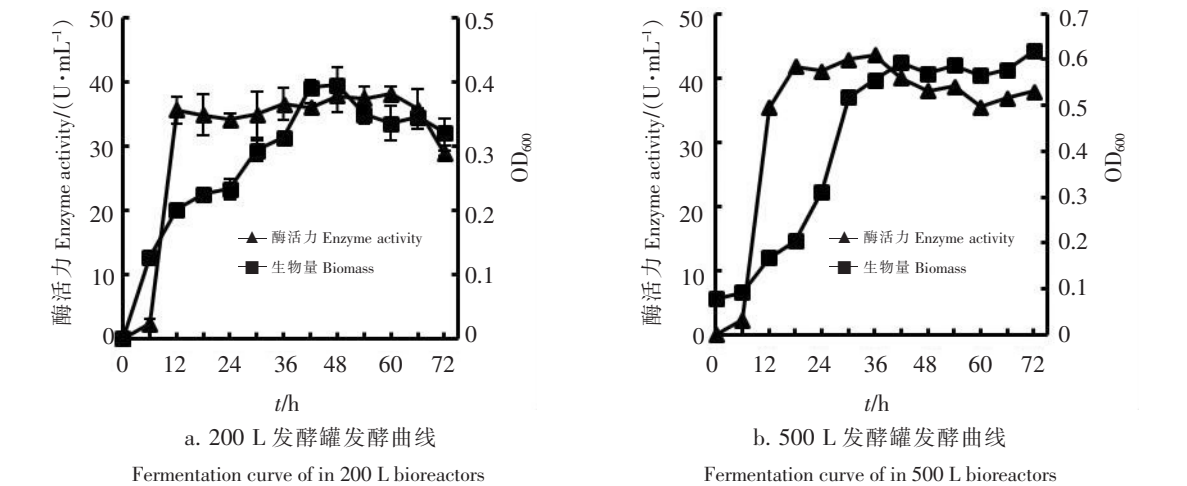


图6 200 L和500 L发酵罐产微球茎菌ALW1发酵产褐藻胶裂解酶发酵曲线

Fig.6 Fermentation curve of *Microbulbifer* sp. ALW1 producing alginate lyase in 200 L and 500 L

3 结论

在 5 L 发酵罐中培养产微球茎菌, 分别对不同碳源浓度、温度、pH 值条件下的产褐藻胶酶活力变化进行研究, 结果表明, 海藻酸钠质量浓度为 1 g/L 时效果最好, 25 ℃ 为最适温度。pH 值控制在 7.5 时比自然发酵产酶高峰提前, 但产酶量变化不大。在 5 L 罐基础上, 将发酵规模分别放大至 20、200、500 L 进行中试, 由于放大效应的影响, 酶活力相应降低。20 L 罐褐藻胶裂解酶活力最高为 57.0 U/mL, 200 L 罐酶活力最高为 43.5 U/mL, 500 L 罐酶活力最高为 38.3 U/mL, 分别是小试水平的 39.6%、30.2%、26.5%。

[参考文献]

- [1] FUJIAHARA M, NAGUMO T. The effect of the content of D-mannuronic acid and L-guluronic acid blocks in alginates on antitumor activity. *Carbohydr res*, 1992, 224(3): 343-347.
- [2] FUJIAHARA M, NAGUMO T. An influence of the structure of alginate on the chemotactic activity of macrophages and the antitumor activity. *Carbohydr res*, 1993, 243(1): 211-216.
- [3] 周绪霞, 徐望, 丁玉庭. 酶解制备褐藻胶寡糖及其产物的抗氧化活性分析. *食品发酵与工业*, 2014, 40(2): 116-120.
- [4] 郝翠. 系列海洋寡糖衍生物的制备及其抗 2 型糖尿病作用机理研究. 青岛: 中国海洋大学, 2011: 6-8.
- [5] 祝玲, 程璐, 蔡俊鹏. 褐藻胶寡糖潜在药用价值的研究进展. *中药材*, 2006, 29(9): 993-996.
- [6] IWASAKI K, MATSUBARA Y. Purification of alginate oligosaccharides with root growth promoting activity toward lettuce. *Biosci biotech and biochem*, 2000, 64(5): 1067-1071. DOI:10.1271/bbb.64.1067.
- [7] 刘瑞志. 褐藻寡糖促进植物生长与抗逆效应机理研究. 青岛: 中国海洋大学, 2009: 53-96.
- [8] 邵宏博, 唐丽薇, 陈带娣, 等. 褐藻寡糖制备的研究进展. *生命科学研究*, 2015, 19(1): 75-79.
- [9] 张真庆. 褐藻胶酶解寡糖的制备、分离和结构鉴定. 青岛: 中国海洋大学, 2003: 5-7.
- [10] LIN X, FENG H, ZHAO Y, et al. A novel alginate lyase with high activity on acetylated alginate of *Pseudomonas aeruginosa* FRD1 from *Pseudomonas* sp. QD03. *World journal of microbiology and biotechnology*, 2006, 22(1): 81-88. DOI:10.1007/s11274-005-7713-4.
- [11] WARGACKI A J, LEONARD E, WIN M N, et al. An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. *Science*, 2012, 335(6066): 308-313. DOI:10.1126/science.1214547.
- [12] 蔡俊鹏, 程璐. 褐藻胶裂解酶及其裂解产物研究进展. *食品研究与开发*, 2006, 27(11): 219-221.
- [13] 傅晓妍, 李京宝, 韩峰, 等. 褐藻胶裂解酶产生菌 *Vibrio* sp. QY102 的发酵条件优化. *中国海洋大学学报 (自然科学版)*, 2007, 37(3): 432-436.
- [14] 刘玉佩, 汪丽萍, 赵勇, 等. 解淀粉芽孢杆菌产褐藻胶裂解酶的发酵条件优化. *湖南农业科学*, 2010(5): 17-20, 23.
- [15] 李恒, 朱思婷, 刘旭梅, 等. 褐藻胶裂解酶产生菌的分离鉴定及产酶发酵优化. *中国生物工程杂志*, 2014, 34(9): 94-101.
- [16] 周久顺. 海洋弧菌 *Vibrio* sp. QY102 产褐藻胶裂解酶的发酵工艺优化. 上海: 华东理工大学, 2012.
- [17] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导. 北京: 人民教育出版社, 1979: 22-24.
- [18] 项翔. 产褐藻酸酶菌株的筛选、发酵条件优化和酶学性质的研究. 青岛: 中国海洋大学, 2006: 35.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)