

细菌 α -淀粉酶发酵技术研究 (II)

淀粉液化芽孢杆菌 α -淀粉酶的发酵条件的研究

邬显章 儿玉彻* 大森俊雄*和蓑田泰治*

摘 要

将在日本收集的 α -淀粉酶有关菌种,作了菌种酶活性的比较,发现淀粉液化芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* KA 63 培养在 10% 可溶性淀粉, 2% 蛋白胨, 1% 牛肉膏, 0.5% 酵母粉, 0.5% NaCl, 0.5% K_2HPO_4 中可获较高的 α -淀粉酶酶活, 2 升发酵罐培养 28-30 小时, α -淀粉酶酶活可达 400 单位/毫升, 该菌种具有一定的生产价值, 将为我国增添一个液化型 α -淀粉酶的新品种。

一、引 言

α -淀粉酶是我国产量大、用途广的一种酶品种,主要用于淀粉液化、淀粉糖、棉布退浆和食品、酿造、造纸等工业^[1]。

日本于 1947 年开始工业生产细菌 α -淀粉酶, 1980 年的产量约为 10,000 吨^[2], 主要是液化型细菌 α -淀粉酶, 菌种采用 *B. amyloliquefaciens*, *B. mesentericus*, *B. subtilis* 等。

本文比较了日本有关大学提供 α -淀粉酶菌株的发酵酶活, 以及叙述 *B. amyloliquefaciens* 产 α -淀粉酶的发酵条件和提高酶活的研究。

二、实验材料和方法

微生物: *Bacillus amyloliquefaciens* KA63 由日本大阪大学工学部提供。

种子培养基: 10 g 可溶性淀粉, 10 g 蛋白胨, 5 g 牛肉膏, 2 g 酵母粉, 2 g NaCl, 5 g K_2HPO_4 加水 1 升, 消毒前 pH 为 6.8。

发酵培养基: 100 g 可溶性淀粉, 20 g 蛋白胨, 10 g 牛肉膏, 5 g 酵母粉, 5 g NaCl, 5 g K_2HPO_4 加水 1 升, 消毒前 pH 为 6.8。

*日本东京大学农艺化学系应用微生物研究室

本文收到日期 1983 年 8 月 14 日

试管振荡培养试验:

于 $\phi 18 \times 180\text{mm}$ 试管中加入 10ml 种子培养基, 接种后在往复振荡 (R.P.M.300), 37°C 下, 培养 16 小时后, 按 10% 接种量移入到另一同容积内含发酵培养基的同样试验管中, 在同一培养条件下培养 3—5 天。

2 升玻璃罐培养试验:

取 500ml 吸滤瓶, 加入 100ml 种子培养基, 消毒后接入斜面菌种, 在旋转振荡 (R.P.M.120) 30°C 下培养 16 小时后, 按 10% 接种量接入内含 1 升发酵培养基的 2 升玻璃罐中, 在 37°C , 搅拌 R.P.M.1000, 通风量 $1\text{v}/\text{v}/\text{m}$ 下培养 24—30 小时。

α -淀粉酶活性测定按 JIS-K-7001 法^[3]。

pH: 用 TDA 型 pH 计测定。

O.D.: 用日立光电比色计 660nm, 10mm 下测定。

三、结 果

(一) 培养基组分的影响

在参观访问日本大阪大学时, 索取到一支菌株, *B. amyloliquefaciens* KA63, 他们报导过该菌有关形成 α -淀粉酶机制的研究结果[4—7]。最近 Shinmyo 等又将 *B. amyloliquefaciens* 链霉素抗性变株 (由 Daiwa Kasei co. Ltd 提供), 制成固定化细胞, 作了发酵生产 α -淀粉酶的研究报告^[8]。

为了发掘该菌产 α -淀粉酶的发酵能力, 我们采用摇管法, 查定了木下培养基的各组分对 α -淀粉酶形成的影响, 其结果见表一。

表一 发酵培养基各组分对 α -淀粉酶形成的影响

No.	培养基组分	种 后 pH	发 酵 完 了 pH	α -淀粉酶活性 u/ml
1	无淀粉	7.1	8.6	15.4
2	无 NH_4NO_3	7.0	5.7	72
3	无柠檬酸钠	6.8	8.2	32
4	无 K_2HPO_4	7.1	8.2	27.5
5	无 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6.8	8.1	36.5
6	无 KCl	6.8	8.3	29
7	无 CaCl_2	6.8	8.3	33
8	无蛋白胨	6.8	8.2	24
9	无酵母膏	6.8	6.1	55
10	全有(对照)	6.8	6.4	93

木下培养基(对照): 5%可溶性淀粉, 0.56% NH_4NO_3 , 0.28%柠檬酸钠, 0.13% K_2HPO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01%KCl, 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5% 蛋白胨和 0.2%酵母膏。

表一说明, 为了形成 α -淀粉酶, 发酵培养基中的淀粉、蛋白胨, K_2HPO_4 和 Kcl 等是必不可少的组分, 这个基本成分同丸尾 ABY 产酶培养基很一致^[9]

(二) 培养基 pH 对 α -淀粉酶的影响

为了研究提高 α -淀粉酶的产量, 试验了摇管培养的起始 pH 问题。培养基根据 ABY 培养基同本试验 1 结果结合, 稍作修改如下: 10% 淀粉, 2% 蛋白胨, 0.5% 酵母膏, 1% 牛肉膏, 0.5% NaCl 和 0.5% K_2HPO_4 。上述培养基经消毒灭菌后再用 H_3PO_4 或 NaOH 将 pH 调整在 5.0 到 8.0 之间, 试验结果见表二。

表二 起始 pH 对 α -淀粉酶产量的影响

No.	起 始 pH	发 酵 后 pH	α -淀粉酶活性 u/ml
1	5.0	5.0	7.5
2	5.5	6.0	180.0
3	6.0	6.2	240.0
4	6.5	6.2	288.0
5	7.0	6.3	320.0
6	7.5	6.4	211.0
7	8.0	6.4	192.0

No.1-4, 以 H_3PO_4 溶液调整。

No.5, 未调。

No.6-7, 以 NaOH 溶液调整。

表二表明, 发酵起始 pH 应在 7.0 左右为宜, 起始 pH 高或低时, 虽然发酵终了 pH 也能回降到 6.2—6.4 左右, 但对产酶有很大影响。Bacillus amyloliquefaciens KA63 在本试验培养基(pH7.0)中, 所得发酵单位约可比木下培养基提高 3.4 倍。

(三) 比较不同微生物的 α -淀粉酶活性

将收集的有关产 α -淀粉酶的菌株, 在本文所确定的培养基中作了产酶活性的比较, 方法详见“试验材料和方法”, 结果如下(表三)。

表三 不同菌株的产酶比较

序号	微 生 物 名 称	种子培养后 pH	发 酵 温 度 $^{\circ}C$	α -淀粉酶活性 u/ml
1	B. amyloliquefaciens FUKUMOTO			
	1521	8.5	30 $^{\circ}C$	112
2	1522	8.7	30 $^{\circ}C$	139
3	1523	8.8	30 $^{\circ}C$	228
4	B. amyloliquefaciens 74	8.7	30 $^{\circ}C$	159
5	B. SP. Akabori-strain 85	8.7	30 $^{\circ}C$	94
6	B. SP. Towa-strain 86	8.8	30 $^{\circ}C$	—
7	B. Subtilus. natto IAM 1071	9.0	30 $^{\circ}C$	—
8	B. Sphericus 1787-72H 84	8.5	37 $^{\circ}C$	—
9	B. amyloliquefaciens KA63	8.7	30 $^{\circ}C$	320
10	B. Subtilus var. amylosacchariticus (S.A.C)	8.5	30 $^{\circ}C$	74

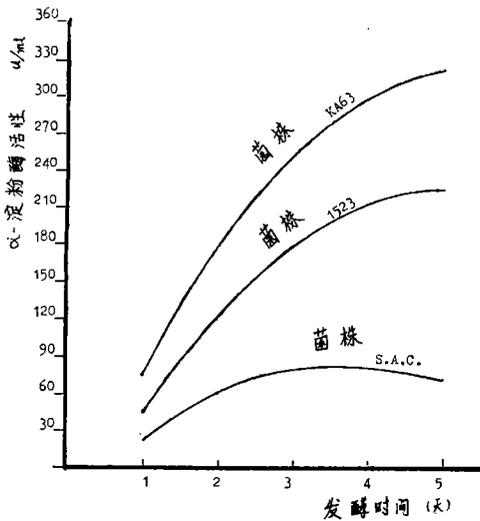


图1 几支 α -淀粉酶菌株的发酵曲线

菌种序号1—3,是从东京大学应用微生物研究所获得。

菌种序号4—8是从东京大学农艺化学系应用微生物研究室获得。

菌种序号9是从大阪大学发酵工学科获得。

菌种序号10是从日本大学农艺化学系有用菌研究室获得。

几支高产菌株的发酵时间曲线见图1。

反复试验看出, *B. amyloliquefaciens* KA63是属最稳定,且是高产 α -淀粉酶的菌

(四) 2升玻璃罐培养试验

利用本实验室现有条件,进行2升玻璃罐培养试验。有关溶解氧的参数如表四。

表四 2升玻璃罐搅拌转速与Kd的关系

RPM	Kd mol O ₂ /ml, min, atm.
300	1.6×10^{-6}
400	3.0×10^{-6}
500	4.0×10^{-5}
600	5.5×10^{-6}
800	9.0×10^{-6}
1000	14.0×10^{-6}
1200	20.0×10^{-6}
1350	27.0×10^{-6}

培养液体积: 2升玻璃罐中实容1升通风量1.0 V/V/M (LABO, Fermentor LF-20Sunaka Rika Kogyo Co Ltd.)

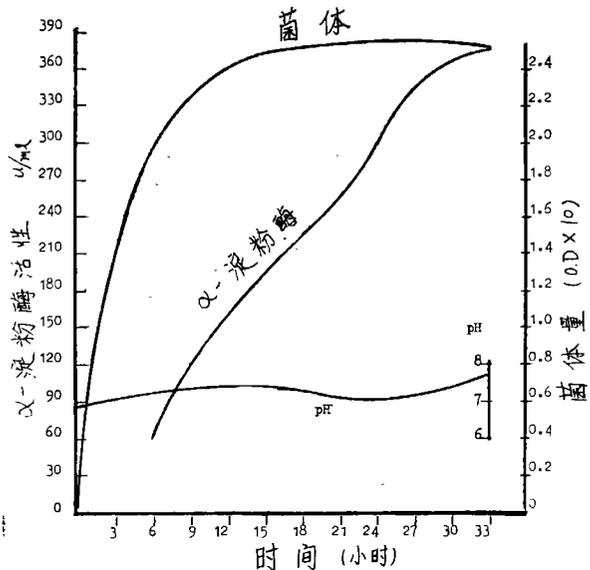


图2 *B. amyloliquefaciens* KA63在2升玻璃罐中 α -淀粉酶发酵时间曲线(温度37℃, 搅拌1000R. P. M., 通风量1V/V/M)。

B. amyloliquefaciens KA63在2升罐中 α -淀粉酶发酵时间曲线见图2。

从结果看出,整个发酵过程比摇管培养要缩短得多,最高 α -淀粉酶活性在发酵28—32小时左右。

pH曲线系自动记录画成的,pH值随着菌体增殖缓慢上升,12小时左右约7.3—7.4,之后逐步下降到7.0,发酵后期由于菌体自溶,pH趋向上升。

微生物菌体也在10—12小时迅速达到顶峰,在后的发酵过程中变化不大。

α -淀粉酶活性随着菌体增殖也迅速增长,发酵24小时后酶活性增长减弱,发酵終了

α -淀粉酶活性约在 380—400u/ml 左右。

试验还发现, 无论增加 Kd 值或者提高发酵温度, 微生物菌体量达到最大值时间还可进一步缩短, 缩短发酵时间对工业生产是有很大意义的, 但 α -淀粉酶产量未见提高, 有待进一步研究。

四、结 论

1. 将在日本收集到的产 α -淀粉酶菌株 10 种, 经筛选, 结果以 *B. amyloliquefaciens* KA63 为较高产酶菌株。

2. 试验确定有利产 α -淀粉酶的培养基组成为: 10% 可溶性淀粉, 2% 蛋白胨, 1% 牛肉膏, 0.5% 酵母膏, 0.5% NaCl 和 0.5% K_2HPO_4 , 发酵接种前 pH 应控制在 7.0 左右。

3. 2 升罐发酵结果, α -淀粉酶活性可达 400u/ml, 发酵过程中产酶 pH 约在 6.8—7.4 之间, 发酵温度 37℃, 时间 28—30 小时(搅拌 1000 RPM, 通风量 1.0 V/V/M)。

作者对日本有关大学提供 α -淀粉酶菌株表示谢意。

主 要 参 考 文 献

- [1] 无锡酶制剂厂等, 〈江苏发酵〉No.2, 1—28(1975)
- [2] Kinoshita, S., Annual Reports of I.C.C.R.(Osaka, Japan), 3,413-431 (1980).
- [3] 郭显章等, 〈无锡轻工业学院学报〉第三期, 35—40(1983)
- [4] Terui, G., Okazaki, M. & Kinoshita, S., J. Ferment. Technol., 45,497 (1967).
- [5] Kinoshita, S., Okada, H. & Terui, G., J. Ferment. Technol., 45,504 (1967).
- [6] Kadowaki, K., Yamaguchi, K. & Maruo, B., Annual Meeting of Agr. Chem. Soc. Japan(April, 1967).
- [7] Fukumoto, J., Yamamoto, T. & Ichikawa, K., Proc. Japan Acad., 27,352-358(1951).
- [8] Shinmyo, A., Kimura, H. & Okada, H., European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 14,7-12(1982).
- [9] Maruo, B., Yamane, K., Yoneda, Y. & Hitotsuyanagi, K., Proceed. Japan Acad. vol, 54, ser, B, 435(1980).

Studies on the Production of Bacterial α -amylase by Submerged Culture (II)

Studies on Cultural Conditions of the Production of α -amylase by
Submerged Culture of *Bacillus amyloliquefaciens* KA63.

*Wu Xian-zhang, Tohru Kodama,
Toshio Omori and Yasuji Minoda*

Abstract

The cultural conditions for the production of α -amylase by submerged culture of *Bacillus amyloliquefaciens* KA63, it was most stable in producibility among selected ten strains, were determined. The results were summarized as follows,

(1) Composition of the medium was determined containing the following constituents(%); soluble starch 10.0; peptone 2.0; yeast extract 0.5; meat extract 1.0; K_2HPO_4 0.5; NaCl 0.5.

(2) The initial pH of the culture for the production of α -amylase was about 7.0 after sterilization of the medium.

(3) Submerged cultures were carried out by employing 2-liter-jar-fermentor with one liter of medium for 28-30 hour at 37°C (agitation; 1000 RPM, aeration; 1.0 V/V/M). The optimal pH of cultural course for production of α -amylase activity was in the range of 6.8-7.4.

The α -amylase activity in the culture broth was approximately 400 units/ml.