

文章编号 :1009-038X(2000)01-0054-04

固态发酵生产细菌 α -淀粉酶*

吴大治, 张礼星, 徐 柔, 章克昌

(无锡轻工大学生物工程学院,江苏无锡 214036)

摘要 采用国内 α -淀粉酶生产常用菌株 BF7658 变异菌种,直接以麸皮为原料固态发酵法生产 α -淀粉酶,得到较适宜的条件为:培养基初始含水量(质量分数)为 60%,起始 pH 自然,液体接种量为 5 mL/kg,37~39 °C 培养 48~60 h,三角瓶培养产酶水平可达 1 248 U/g,浅盘培养平均产酶可达 1 754 U/g。固态发酵生产细菌 α -淀粉酶产酶水平为液体深层发酵法的 4~5 倍,并且成本低廉,具有较好的经济和环境效益。

关键词: α -淀粉酶;固态发酵;解淀粉芽孢杆菌

中图分类号: TQ925.1 **文献标识码**: A

Production of Bacterial Alpha-Amylase by Solid-State Fermentation

WU Da-zhi, ZHANG Li-xing, XU Rou, ZHANG Ke-chang

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract: In this paper, solid-state fermentation for production of alpha-amylase was studied in a pure wheat bran medium. With the initial water content 60%, initial pH natural, incubation temperature 37~39 °C, the liquid inoculum size 0.5%, cultivation in 250 mL Erlenmeyer flask yielded an enzyme titre of 1 248 U/g dry bacterial bran at 48~60 h. Under these above conditions, cultivation in trays yielded an average enzyme titre of 1 754 U/g, which was 4~5 times higher but cost less than in Submerged fermentation.

Key words: alpha-amylase; solid-state fermentation; *Bacillus amyloliquefaciens*

α -淀粉酶是我国目前用途最广泛、产量最大的工业酶制剂种类之一,在酶制剂生产中占有重要地位,应用领域主要集中在淀粉加工业、纸浆制造、纺织工业、酿造酒精及饲料加工业等。国内主要采用解淀粉芽孢杆菌 BF7658 及其变异菌株,以液体深层发酵法(Submerged fermentation, SmF)生产中温 α -淀粉酶,虽然具有一些优点,但是由于发酵产酶水

平不高,提取困难且环境污染严重等因素,经济效益不太好。这也导致了許多厂家转向高温 α -淀粉酶的生产,但高温 α -淀粉酶毕竟不能完全代替中温 α -淀粉酶,许多场合由于工艺等原因必须采用中温 α -淀粉酶,因此目前市场上中温 α -淀粉酶的价格比高温 α -淀粉酶高。

利用固态发酵法(Solid-state fermentation, SSF)

* 收稿日期:1999-04-08;修订日期:1999-11-10。

作者简介:吴大治(1976年10月生),男,浙江金华人,发酵工程硕士研究生。

生产 α -淀粉酶是一项既传统又面临新挑战的新型发酵技术^[1~3],国内上海工业微生物研究所^[4]20 世纪 80 年代利用 SSF 技术生产中温 α -淀粉酶,浅盘发酵产酶最高达 1 403 U/g(按 QB547-80 方法测定)相当于目前新标准(QB1 803-93)的1 079 U/g,它具有生产效率高、工艺简单、操作粗放、能耗少、废液少、产物分离较容易等优点,因而与 SmF 法相比生产成本较低.随着人们对节省能源和减少环境污染问题的重视 SSF 技术日益受到关注,利用固态发酵技术生产 α -淀粉酶具有较好的经济和环境效益.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* No BF7658 变异菌株,由无锡轻工大学生物工程学院再生资源实验室保藏.

1.1.2 斜面培养基 牛肉膏 1.0 g/dL,蛋白胨 1.0 g/dL,NaCl 0.5 g/dL,可溶性淀粉 1.0 g/dL,琼脂 2.0 g/dL,pH 6.5~7.0,0.1 MPa 蒸汽灭菌 20 min.

1.1.3 种子培养基 牛肉膏 1.0 g/dL,蛋白胨 1.0 g/dL,NaCl 0.5 g/dL,可溶性淀粉 0.5 g/dL,pH 6.5~7.0,0.1 MPa 蒸汽灭菌 20 min.

1.1.4 三角瓶固体发酵培养基 250 mL 的三角瓶中,加 15 g 麸皮和 20 mL 水,0.1 MPa 灭菌 30 min.

1.2 实验方法

1.2.1 生长曲线测定 250 mL 的三角瓶中盛放 25 mL 种子培养基,从斜面接入 1 环菌体,置于旋转式摇瓶机上 200 r/min,37℃培养,每隔 2 h 以新鲜培养基作空白,用 721 型分光光度计于 660 nm 下测定光密度.

1.2.2 培养条件 保藏菌种在斜面上活化一代(37℃培养 24 h),然后挑取一环接入种子培养基,37℃下于旋转式摇床 200 r/min 培养 10 h.再按一定的接种量接入三角瓶固体发酵培养基,在 37℃培养 60 h.

1.2.3 酶活测定 按原轻工业部部颁标准 QB/T1803—93 规定的方法^[5]测定 α -淀粉酶活力.

2 实验结果

2.1 种子种龄和接种量的确定

采用液体种子作为种子来源,因为液体种子具有接种量小、易培养、进行过程放大、前期污染容易控

制等优点.为了确定种子的最佳种龄和接种量,选用淀粉肉胨培养基,在 37℃和 200 r/min 培养条件下测定生长曲线(图 1),菌种生长的对数期后期约为 10 h.

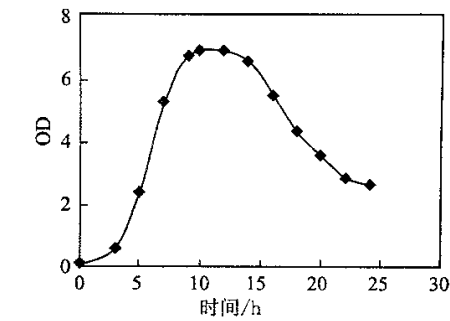


图 1 菌体生物量—时间生长曲线
Fig.1 Biomass concentration with time in flask incubation

从表 1 不同接种量试验的结果可以看出,接种为 5 mL/kg 时,发酵产酶较好,发酵 60 h 后酶活达到 1 072 U/g.

表 1 接种量和种龄对产酶的影响 Tab.1 Effect of inoculum size and age on α -amylase production		
接种量/(mL/kg)	不同种龄时所产酶的酶活/(U/g)	
	10 h	24 h
3.3	743	258
10	903	422
5	1 072	695

注:表中所测均为发酵 60 h 的酶活

2.2 培养基碳氮比的确定

培养基的碳氮比(C/N)对微生物的生长和产酶有一定的影响.通过在主要原料麸皮中添加不同氮源进行发酵产酶实验,结果见表 2,发现未添加氮源的产酶较高,分析原因,可能是添加氮源后菌体大量繁殖消耗了过多的营养,而使合成酶蛋白的营养比例减少,造成产酶下降,这在接种量试验中也有反映,即接种量大对产酶反而不利.

表 2 添加氮源对产酶的影响 Tab.2 Effect of nitrogen source on α -amylase production			
基本培养基	添加氮源	添加比例	60 h 时的酶活/(U/g)
麸皮	—	—	1 054
麸皮	豆饼粉	1:0.50	375
麸皮	尿素	1:0.10	95
麸皮	硫酸	1:0.05	175

2.3 培养基初始含水量的确定

在固态发酵培养中,培养基的含水量(质量分数)对菌体生长和产酶很重要.从图 2 中可知,培养基含水量 60% 左右时产酶较高.培养基含水量过低,麸皮培养基过于干燥,一方面在灭菌中麸皮中的淀粉不易糊化,另一方面菌体接入后不易生长繁殖,对发酵产酶产生不利的影响.培养基含水量过高,甚至有游离水存在,灭菌后麸皮就会粘成一团,通气性差,接种后静置培养时也对产酶不利.

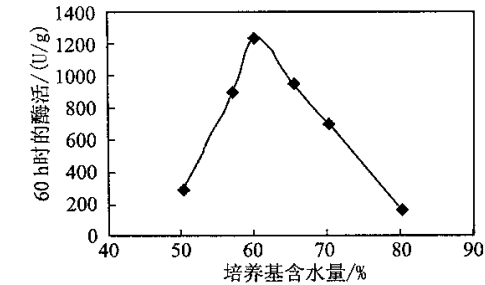


图 2 培养基含水量对产酶的影响

Fig.2 Effect of medium moisture on α -amylase production

2.4 麸皮粗细对产酶的影响

麸皮的粗细主要表征了培养基的通气性好坏和淀粉含量的高低,从而影响菌种的生长和产酶.较粗的麸皮可能通气性好些,灭菌后培养基不容易粘成一团,而且氮源含量可能也较高;较细的麸皮经灭菌后极易粘成一团,影响培养基的通气性,但它的淀粉含量却较高,而作为产酶主要培养基的麸皮,其含氮量和淀粉含量必须有一定的比例.试验后发现,未过筛的麸皮比过筛后不同粗细的麸皮作为培养基时产酶较高,见图 3

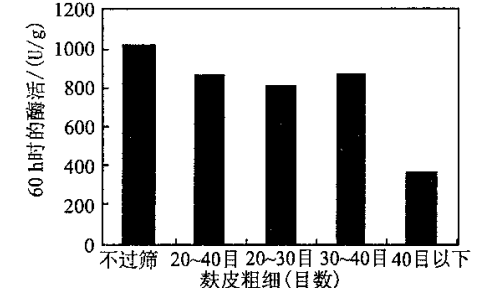


图 3 麸皮粗细对产酶的影响

Fig.3 Effect of wheat bran size on α -amylase production

2.5 培养基起始 pH 对产酶的影响

为了比较培养基不同起始 pH 对产酶的影响,用不同 pH 值的缓冲液配料,接种培养后发现起始 pH 7 或自然的培养基上的产酶水平较高,见图 4.故可选择自然 pH 作为培养基的起始 pH.既操作简便,产酶水平又高.

2.6 培养温度对产酶的影响

培养温度对菌种产酶会产生较大的影响,在不同温度下进行发酵产酶试验,结果见表 3,发现培养温度控制在 37~39℃ 时对菌种产酶较为适宜.

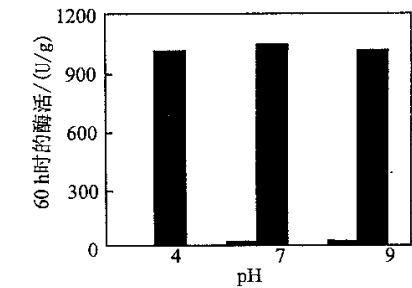


图 4 培养基起始 pH 对产酶的影响

Fig.4 Effect of medium initial pH on α -amylase production

表 3 培养温度对产酶的影响

Tab.3 Effect of incubation temperature on α -amylase production	
培养温度/℃	60 h 时的酶活/(U/g)
31	314
37~39	1 210
43	232

2.7 发酵产酶曲线的确定

综上所述,采用 BF7658 菌种进行三角瓶固态发酵生产 α -淀粉酶的较佳工艺条件为:直接以麸皮为原料,培养基初始含水量 60% 左右,培养温度在 37~39℃,液体种子接种量为 0.5 mL/kg.为了确定发酵产酶的周期,在上述最佳条件下测作了发酵产酶曲线,如图 5 所示,发现产酶高峰在 48~60 h 之间,因此可以在此时期结束发酵.

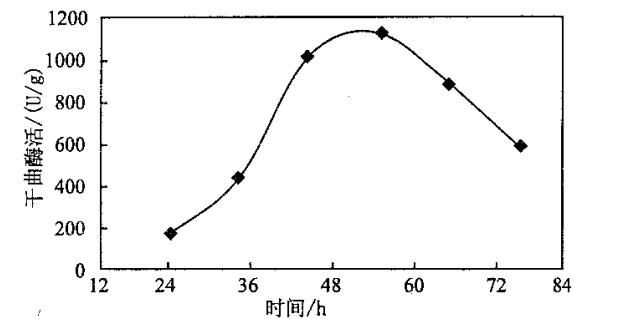


图 5 三角瓶固态发酵产酶曲线

Fig.5 Time course of enzyme production in flask SSF

2.8 浅盘培养试验

根据上述三角瓶固态发酵法摸索出的条件,进行浅盘培养试验,料层厚度为 4~6 cm,3 批发酵的结果见表 4,平均产酶水平为 1 754 U/g.

表 4 浅盘培养产酶结果

Tab.4 α -amylase production in tray cultivation			
培养时间/h	产酶量/(U/g)		
	第一批	第二批	第三批
48	1 340	1 233	1 177
60	1 771	1 699	1 792

3 讨 论

根据以上固态发酵试验 ,采用国内厂家生产淀粉酶的常用菌种 BF7658 系列 ,直接以麸皮为原料 ,培养基初始含水量 60 % 左右 ,培养温度在 37 ~ 39 ℃ ,液体种子接种量为 0.5 % ,发酵时间为 48 ~ 60 h ,产酶可达 1 248 U/g ;浅盘培养平均产酶可达 1 754 U/g ;同样使用该菌株进行液体深层培养 ,发酵液酶活平均为 350 U/mL 左右 .SSF 生产所得酶活为普通液体深层发酵法的 4 ~ 5 倍 ,而且生产成本比较低 ,具有可观的经济效益 .

对于产酶高的原因 ,作者认为主要是 SSF 生产中培养基(麸皮)的碳源浓度比 SmF 生产中的碳源浓度高得多 ,并且 SSF 中营养基质从固体颗粒到细胞的传递吸收阻力较大 ,不如在 SmF 中从液体基质到细胞内那样相对容易 ,从而消除了 SmF 生产中酶合成的分解代谢阻遏 ,促成了 α -淀粉酶的大量合成 ,类似的看法国外学者也曾经提出^[6~8] .

在固体发酵麸曲的应用中 ,一方面可以将麸曲中 α -淀粉酶提取出来 ,纯化精制后使用 .因为麸物质松粒大 ,菌体又和麸曲有一定的附着力 ,提取要比 SmF 的发酵液容易 ,而且产生的污染少 .另一方面许多生产应用中只需粗酶制剂 ,例如在酒精生产的原料液化中 ,直接用热风干燥并磨碎的曲粉代替 α -淀粉酶制剂 ,不用改变后继工艺 .因此 ,利用固态发酵方法生产淀粉酶具有一定的前景 ,特别是在应用 SSF 厚层通风培养技术之后 ,不仅可以提高机械化水平 ,而且有利于扩大生产规模 ,从而降低劳动强度和生产成本 ,与 SmF 生产 α -淀粉酶比较 ,具有明显的竞争力 ,值得推广 .

参考文献

[1] 张树政 . 酶制剂工业 [M] . 北京 : 科学出版社 ,1989 .
[2] BECKORD L D , LEWIS K H . Bacterial amylases production on wheat brar [J] . **Ind Eng Chem** ,1945 ,37 :692 ~ 696
[3] RAMESH M V , LONSANE B K . Solid state fermentation for production of alpha-amylase by Bacillus megaterium 16M [J] . **Biotechnol Lett** , 1987 , 9 (5) :323 ~ 328
[4] 钱建琪 . 固体发酵法生产 α -淀粉酶的研究 [J] . 工业微生物 ,1992 ,22 (5) :15 ~ 19
[5] 中国食品工业标准汇编 [S] . 北京 : 中国标准出版社 ,1996 (饮料酒卷) .
[6] RAMESH M V , LONSANE B K . Ability of a SSF technique to significantly minimize catabolic repression of alpha-amylase production by Bacillus licheniformis M27 [J] . **App Microbiol Biotechnol** , 1991 ,35 (5) :591 ~ 593
[7] RAMESH M V , LONSANE B K . Regulation of alpha-amylase production in Bacillus licheniformis M27 by enzyme end-products in submerged fermentation and its overcoming in SSH [J] . **Biotechnol Lett** , 1991 ,13 (5) :355 ~ 360
[8] NARIMASA SAITO , KATSUJI YAMAMOTO . Regulatory factors affecting alpha-amylase production in Bacillus licheniformis [J] . **J Bacteriol** , 1975 ,121 (3) :848 ~ 856

(责任编辑 :秦和平)