

文章编号: 1001-7453(1999)02-0033-06

培养基及培养条件对普鲁兰酶的影响

金 羽中, 顾国贤, 陆 健

(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘要: 从土壤中分离出一株产普鲁兰酶的菌株, 初步鉴定为芽孢杆菌。通过优化发酵培养基及发酵培养条件, 在 250 mL 的摇瓶中可达到 $4.5 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 的普鲁兰酶酶活。优化后的发酵培养基成分如下: 玉米支链淀粉 2 g/dL, 蛋白胨 2 g/dL, 牛肉膏 1.5 g/dL, NaCl 0.5 g/dL, $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $2 \mu\text{mol/L}$ 。摇瓶发酵工艺条件: 接种量 1%, 温度 37°C , 摇瓶转速 220 r/min, pH 6.0, 发酵周期 32 h。通过 2 L 容积的发酵罐批式发酵, 酶活可稳定在 $3.3 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 左右。

关键词: 普鲁兰酶; 芽孢杆菌; 优化; 发酵

中图分类号: Q556.2 **文献标识码:** A

普鲁兰酶 (Pullulanase, E.C. 3.2.1.41) 作为淀粉酶类的新品种, 主要应用于以淀粉质为原料的食品工业 (大部分淀粉质原料含有 75% ~ 85% 的支链淀粉), 通过高效切割 α -1, 6 糖苷键, 可以显著提高淀粉原料的利用率, 从而提高生产效率, 目前已较成功的应用于高葡萄糖浆、高麦芽糖浆、低聚寡糖和啤酒生产^[1], 在医药领域亦有应用。有关该酶的报道在国内并不多见, 笔者在已获菌株的基础上, 对培养基成分及培养条件对发酵产酶的影响进行了探索, 在 2 L 容积罐上批式发酵并与摇瓶发酵作对比。

1 材料与方法

1.1 菌种

J-008 作者自筛。

1.2 培养基

1.2.1 试管斜面培养基 支链淀粉 2 g/dL, 蛋白胨 0.4 g/dL, 琼脂 2 g/dL, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $50 \mu\text{mol/L}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/dL, MnCl_2 $0.1 \mu\text{mol/L}$; pH 6.0, 0.1 MPa 下灭菌 20 min。

1.2.2 种子培养基 蛋白胨 1 g/dL, 牛肉膏 0.5 g/dL, NaCl 0.5 g/dL; pH 7.0, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

收稿日期: 1998-09-21; 修订日期: 1998-03-01

作者简介: 金 羽中 (1973年 10月生), 男, 安徽合肥人, 工学硕士。

1.2.3 起始发酵培养基 支链淀粉 2 g /dL,鱼粉蛋白胨 0.8 g /dL,牛肉膏 0.5 g /dL, NaCl 0.5 g /dL; pH 6.5和 0.1 MPa 下灭菌 20 min,接种前加入 0.5% 灭菌后的 CaCO₃.

1.3 菌种鉴定方法

根据菌种个体形态 生理生化特征 ,结合电镜照片 ,依据《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 8 版) ,进行菌种的初步鉴定 .

1.4 酶活测定方法

参照文献 [2],采用 3, 5-二硝基水杨酸法 (DNS法) ,笔者稍加改动 .

- 1)发酵液 1 mL+ pH5.5的 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液 n mL(稀释 n+ 1倍) .
- 2)取两根试管 ,各加入 1 mL稀释后发酵液 ,一根加 0.5% 普鲁兰糖溶液 pH5.5, 1 mL, 另一根加入 1 mL pH 5.5磷酸盐缓冲液 , 55℃水浴锅反应 30 min, 流动水速冷终止反应 ;
- 3)各取 0.5 mL加入 25 mL的比色管中 ,加 1.5 mL蒸馏水+ 1.5 mL DNS试剂 ,沸水浴 5 min,流动水速冷定容 ,测 O. D. 520nm .
- 4)把两个结果代入酶活计算公式中 ,相减得净酶活 .

酶活定义: 在上述条件下 ,每分钟产生相当于 1^μ mol葡萄糖还原力的酶活力为 1个酶活单位 .

1.5 残总糖测定方法

盐酸水解并中和彻底后以 DNS法测 O. D. 520nm .

1.6 菌体生长浓度测量方法

取发酵液 1 mL,加 0.1 mol /L稀 HCl溶解未反应的 CaCO₃ ,稀释至 10 mL,以发酵 0 h 的发酵液为空白 ,在波长 620 nm 处测 OD值 .

2 结果与讨论

2.1 J-008的生物学特性

J-008菌株的形态和生理生化特性见表 1.

表 1 菌株形态和生理生化特性

考察项目	特征	考察项目	特征
菌体细胞形态	棒杆状 ,0.4~ 0.7 ^μ m× 1.6~ 2.2 ^μ m,呈紊乱的链状分布	葡萄糖	利用
运动性	无	蔗糖	利用
菌落形态	圆形 ,中凸 ,乳白色	乳糖	利用
鞭毛	无	麦芽糖	利用
芽孢	顶端有	生长 pH	4.5~ 9
革兰氏染色	阳性	生长温度	20~ 60℃
普鲁兰酶	产	牛乳酪化	阳性
水解明胶	阴性	耐渗性	弱 (NaCl质量分数大于 5% 时生长贫瘠)
水解可溶性淀粉	阳性	V - P实验	阴性
过氧化氢酶	阳性	吡啶实验	阴性

根据上面的特性 ,依照《伯杰细菌鉴定手册》(第 8版) ,初步得出 J- 008菌株为芽孢杆 菌属 (*Bacillus. sp*)的结论 .

2.2 发酵培养基优化

2.2.1 碳源 对发酵产酶的影响 见表 2.

表 2 不同碳源对产酶的影响

碳源 (2%)	最终 pH	酶活 /($\mu\text{mol}/(\text{min}^\circ\text{mL})$)
葡萄糖	5.1	0
麦芽糖	5.1	0
可溶性淀粉	5.1	0
玉米支链淀粉	5.8	1.02
马铃薯淀粉	5.8	0.95

注: 其它成分为鱼蛋白胨 0.8 g/dL,牛肉膏 0.5 g/dL, NaCl 0.5 g/dL,接种前加入 0.5% 灭菌后的 CaCO_3 .

高,达 $1.09\mu\text{mol}/(\text{min}^\circ\text{mL})$,碳源浓度过高,酶活反而有下降趋势,这是因为支链淀粉浓度过高会在发酵过程中产生大量还原糖,从而对酶的生成产生阻遏作用,另外还使发酵液粘度增加,影响发酵体系的通风状况.有实验显示,在不加 CaCO_3 的情况下,发酵液最终 pH 为 4,可见有机酸含量大量增加,从而使发酵液 pH 下降,影响了菌体自身的繁殖和产酶能力,酶也迅速失活.而当碳源不足时,则可能因能量缺乏而使菌体生长不足,产酶能力降低.

2.2.2 氮源对发酵产酶的影响 为研究氮源对产酶的影响,分别选取了几种经济的常见有机和无机氮源进行研究.结果见表 3.

表 3 不同氮源对产酶的影响

氮源 (1.5%)	终点 pH	酶活 /($\mu\text{mol}/(\text{min}^\circ\text{mL})$)	氮源 (1.5%)	终点 pH	酶活 /($\mu\text{mol}/(\text{min}^\circ\text{mL})$)
蛋白胨	5.6	0.71	干酪素	5.8	0.18
牛肉膏	5.8	0.47	$\text{NH}_4\text{CH}_2\text{COOH}$	6.4	0
酵母膏	8.0	0.43	NH_4NO_3	6.2	0
豆饼粉	5.9	0.19	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6.5	0
酪蛋白水解物	6.8	0.26	尿素	7.0	0

注: 其它成分为支链淀粉 2 g/dL, NaCl 0.5 g/dL,接种前加入 0.5% 灭菌后的 CaCO_3 .

由表 3 可见,该菌几乎不能利用无机氮源,或在无机氮源上不产酶,有机氮源中蛋白胨、牛肉膏和酵母膏都是较理想的氮源.为了考察混合氮源的影响,将蛋白胨分别与牛肉膏、酵母膏混合在发酵培养基中,结果见表 4.

由表 4 可见,选用 1.0% 蛋白胨 + 0.5% 牛肉膏时酶活较大.为考察牛肉膏在发酵培养基中的含量与菌株产酶能力的关系,改变牛肉膏的添加量,结果见图 2.可见牛肉膏的量占 1.5% 时, J-008 菌种普鲁兰酶酶活最高.当

牛肉膏的量大于 1.5% 时,可能由于促进因子过多而影响抑制菌种生长,导致发酵产酶下降.固定牛肉膏占 1.5% 的量,考察蛋白胨量的影响,结果如图 3 所示.蛋白胨量占 2% 时,普鲁兰酶酶活最高.采用 2.0% 支链淀粉, 2.0% 蛋白胨, 1.5% 牛肉膏为碳氮源,可获得比原来高 31% 的酶活力.

由表 2 数据可知,玉米支链淀粉和马铃薯淀粉都是较理想的碳源.这是因为玉米淀粉和马铃薯淀粉含有较多的支链,对普鲁兰酶的产生具有较强的诱导作用.保持发酵培养基中其它成分含量不变,改变玉米支链淀粉的添加量,结果如图 1 所示.在氮源保持不变的情况下,加 2.0% 的支链淀粉时酶活最

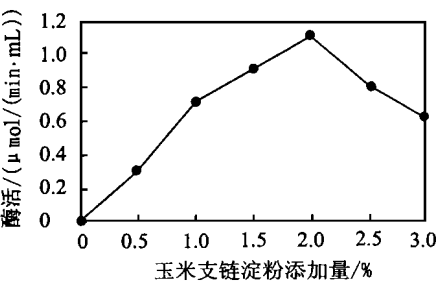


图 1 支链淀粉添加量对产酶的影响

表 4 混合氮源对产酶的影响

混合氮源	终了 pH	酶活 / ($\mu\text{mol}/(\text{min}^\circ\text{mL})$)
0.5% 蛋白胨+ 1.0% 牛肉膏	5.8	0.75
1.0% 蛋白胨+ 0.5% 牛肉膏	6.0	1.16
1.0% 蛋白胨+ 0.5% 酵母膏	6.0	0.47
0.5% 蛋白胨+ 1.0% 酵母膏	7.2	0.62

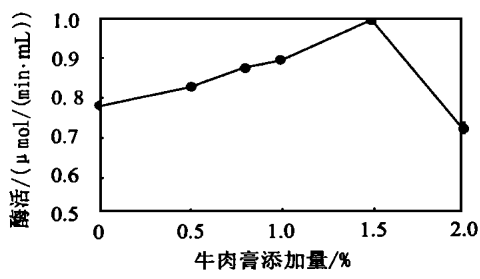


图 2 牛肉膏添加量对产酶的影响

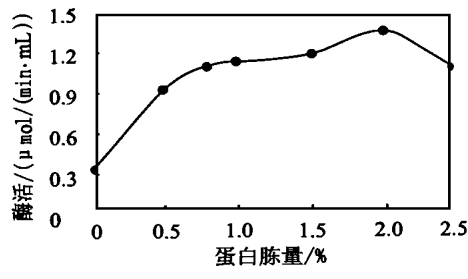


图 3 蛋白胨量对产酶的影响

2.2.3 碳氮源正交实验 为考察 C/N(碳氮比)及不同复合氮源量对产酶的影响,设计了三因素三水平的正交实验.由极差分析可知,最佳配比条件为 2% 支链淀粉,2% 蛋白胨,1.5% 牛肉膏,最高酶活为 $1.3 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$.经多次验证,酶活稳定.

2.2.4 金属离子对发酵产酶的影响 微生物在生长繁殖和生产过程中,需要一些微量元素如 Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , NH_4^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} 等,以作为其生理活性物质的组成或生理活性作用调节物.为了考察它们对 J-008 产普鲁兰酶的作用,在基础培养基里加入 $50 \mu\text{mol/L}$ 的金属离子,发酵后测酶活,结果见图 4 可见, Mn^{2+} 对该菌株产酶具有较大促进作用.这点与文献 [3] 报道一致,可能是由于 Mn^{2+} 改变了细胞膜的通透性,从而提高了酶分泌的结果.另外, Zn^{2+} 对产酶有较明显的抑制作用.金属离子一般在低浓度时对微生物生长、产酶有促进作用,在高浓度时常表现明显的抑制作用.锰离子最适作用浓度一般在 1 mmol/L $\sim 0.1 \mu\text{mol/L}$ 之间,通过对锰离子浓度的优化,结果见表 5.很明显, Mn^{2+} 的浓度为 $2 \mu\text{mol/L}$ 时对发酵产酶提高最大,约为原来的 100%,当 Mn^{2+} 的浓度再增大时,酶活反而有所下降.

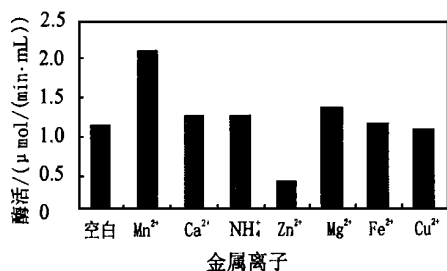


图 4 金属离子对产酶的影响

表 5 Mn^{2+} 量对发酵产酶的影响

$\text{Mn}^{2+}/(\text{mol/L})$	终了 pH	酶活/($\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$)
0	6.2	1.3
$\times 10^{-7}$	6.5	2.2
2×10^{-6}	6.5	2.9
5×10^{-5}	6.3	2.2
$\times 10^{-4}$	6.4	1.8
$\times 10^{-3}$	6.5	1.4

2.3 培养条件的影响

2.3.1 接种量对产酶的影响 接种量的大小是决定菌体在发酵培养基中生长繁殖速度的一个重要因素,选择适当的接种量是必要的.以培养 16 h 的不同量的种子液接入发酵培养基中,发酵结果见图 5.

接种量对 J-008 菌株产酶的影响,集中表现在菌体生长繁殖与发酵产酶的矛盾中.由图 5 可见,接种量为 5 mL,即 17% 时,菌体发酵产酶最高.当接种量过小时,发酵前期菌体生长缓慢,发酵周期延长,发酵产酶高峰期滞后;当接种量过大时,发酵初期菌体生长繁殖

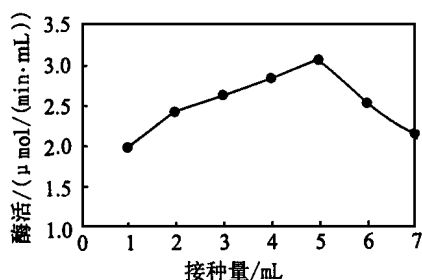


图 5 接种量对产酶的影响

迅速,营养物质多被用于菌体细胞合成,使发酵效果不明显,酶合成下降.

2.3.2 通气量对产酶的影响 普鲁兰酶的发酵是一个好氧过程.在此过程中,无论是基质的氧化,菌体的生长或是酶的产生,均需要大量的氧.因而发酵液中的溶氧浓度是发酵过程中的一个需要调节的重要参数.用改变摇瓶装液量来进行调节控制,在 250 mL 的摇瓶中装不同量的培养基,按 17% 接种量,37℃ 摇床培养 48 h,测胞外酶活力,结果见图 6 可见,装液量为 20 mL 时酶活最高.

2.3.3 发酵温度对发酵产酶的影响 将发酵液置于不同温度下发酵 48 h,测定结果见图 7.

由图 7 可知,在 37℃ 下,J-008 菌株普鲁兰酶活力最大.温度较低时,由于菌株生长缓慢,发酵周期延长,产酶较慢.温度过高时,酶系失活较快,同时菌体过早的衰老,产酶时间缩短,导致酶活较低.

2.3.4 初始 pH 对发酵产酶的影响 由于添加了 CaCO₃ 以控制发酵液 pH,故初始 pH 只要在菌株生长 pH 范围内,发酵结果差别不大. pH6.5 是该菌的最适生长 pH.

2.4 J-008 菌株摇瓶发酵过程与 2 L 容积罐发酵过程的比较

由图 8 及图 9 可以看出,发酵过程基本相似,产酶过程与菌体生长过程基本偶联,当菌体达指数生长期时,酶活最高;发酵液中还原糖量呈现“M”形;但由于搅拌罐的传质较好,故发酵周期显著缩短.

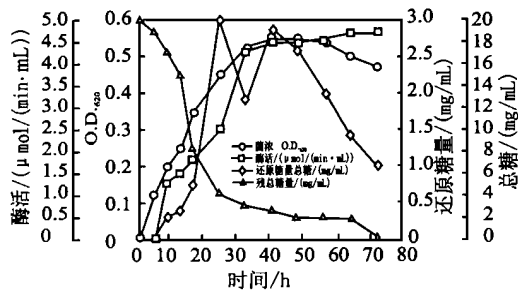


图 8 摇瓶发酵过程曲线

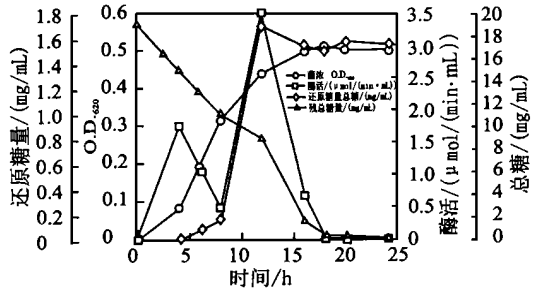


图 9 2 L 容积发酵罐批式发酵过程曲线

3 结 论

通过对培养基及培养条件的优化,酶活比初始发酵培养基提高近 6 倍.碳源、氮源及金属离子 Mn²⁺ 对发酵产酶均有较大的影响.优化后的摇瓶发酵培养基为:玉米支链淀粉 2 g/dL、蛋白胨 2 g/dL、牛肉膏 1.5 g/dL、NaCl 0.5 g/dL、MnSO₄ 2 μmol/L.摇瓶发酵工艺条件为:接种量 17%、温度 37℃、摇瓶转速 220 r/min、pH 6.0 发酵周期 32 h.

比较摇瓶发酵过程和 2L 发酵罐批式发酵过程都发现发酵液中残还原糖呈现“M”形,发酵产酶过程和菌体生长基本偶联,它们明显的不同之处在于后者由于良好通风传质而导

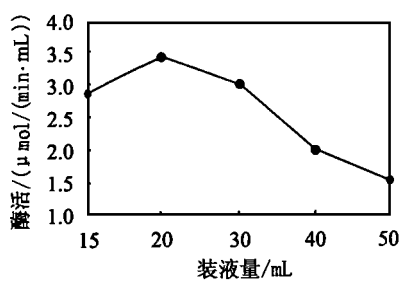


图 6 装液量对产酶的影响

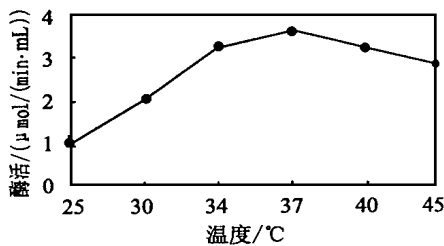


图 7 发酵温度对产酶的影响

致的发酵周期的缩短.

参考文献:

[1] 胡学智.淀粉糖的生产与研究概况 [J].工业微生物 ,1993,23(1): 27~ 31

[2] MADI E, ANTRANIKIAN G, OHMIYA K, et al. Thermostable amylolytic enzymes from a new clostridium isolate[J]. **Applied and Enviromental Microbiology**, 1987, 53(7): 1661~ 1667

[3] YOSHIIYUKI TAKASAKI. Productions an utilizations of β -amylase and pullulanase from bacillus cereus var mycoides [J]. **Agr Biol Chem**, 1976, 40(8): 1515~ 1522

[4] 张树政.酶制剂工业 [M].北京: 科学出版社 ,1989.

Pullulanase from a New Isolated Strain

JIN Chong, GU Guo-xian, LU Jian

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Jangsu Wuxi 214036)

Abstract A bacteria producing pullulanase was isolated from soil with a special method and identified to be Bacillus sp. on the basis of its morphological and physiological characteristics, referring to "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(8th ed.)". The fermentation medium and culture conditions of the strain were investigated and optimized, enzyme activity of $4.5\mu\text{mol}/(\text{min}^{\circ}\text{mL})$ can be achieved after 32hrs when the strain was cultivated in the amylopectin-pepton-salt medium (20 ml) containing 2% corn amylopectin, 2% polypepton, 1.5% beef extracts, 0.5% NaCl and $2\mu\text{mol/L}$ MnSO_4 in a 250 mL Erlenmeyer flask at 37°C , pH6.5; the pullulanase activity maintained at about $3.3\mu\text{mol}/(\text{min}^{\circ}\text{mL})$ when the strain was cultivated in a 2 L fermentor.

Key words pullulanase; bacillus; optimize; fermentation