

文章编号:1673-1689(2005)06-0043-06

嗜盐嗜碱菌 *Alkalibacterium* sp. F26 产碱性果胶酶发酵条件的优化

李建洲^{1,2}, 李江华¹, 许正宏¹, 陶文沂^{1,2*}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 对 *Alkalibacterium* sp. F26 发酵产碱性果胶酶的培养基和培养条件进行了优化. 考察了碳源、氮源、无机盐、表面活性剂及起始 pH、发酵时间、温度等发酵条件的影响. 经单因素和响应面分析试验得到适宜的发酵培养基为(组分 g/dL): 葡萄糖 0.95, 蛋白胨 1, NaCl 6.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1, NaCO_3 1, 吐温-80 1; 培养条件为: 250 mL 三角瓶装液量 25 mL, 35 °C, 起始 pH 值 11.25, 培养 24 h. 在此优化条件下培养, 酶活达 1 015 U/mL.

关键词: 碱性果胶酶; 优化; 发酵

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

Optimizing Fermentation of Alkaliphilic and Halophilic *Alkalibacterium* sp. F26 for Producing Alkaline Pectinase

LI Jian-zhou^{1,2}, LI Jiang-hua¹, XU Zheng-hong¹, TAO Wen-yi^{1,2*}

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The medium components and fermentation conditions for the alkaline pectinase by *Alkalibacterium* sp. F26 fermentation were studied. The operating factors, including the carbon and nitrogen sources, inorganic salt, surfactants, initial pH, fermentation temperature and time were investigated. The optimized fermentation medium determined by single factors and response surface analysis experiments was (g/dL): glucose 0.95, tryptone 1, NaCl 6.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1, NaCO_3 1, tween-80 1. The corresponding fermentation conditions were: 25 mL liquid medium in a flask of 250 mL, initial pH 11.25 culture temperature 35 °C, and culture time 24 h. Pectinase activity reached 1015 U/mL under the optimized medium and condition.

Key words: alkaline pectinase; optimization; fermentation

果胶酶是一种能够分解果胶质的酶, 它广泛存在于植物果实和微生物中. 它是一类复合酶, 有果

收稿日期: 2005-02-28; 修回日期: 2005-04-10.

基金项目: 国家“863”计划项目(2001AA214101)资助课题.

作者简介: 李建洲(1980-), 男, 江苏高邮人, 微生物专业硕士研究生. * 责任作者.

胶水解酶、果胶裂解酶和原果胶酶 3 种类型. 通常所说的果胶酶是指分解果胶的多种酶的总称. 在碱性范围内具有较高活性的果胶酶称为碱性果胶酶(本研究对象为碱性果胶水解酶). 近年来, 碱性果胶酶在棉纺织预处理中的应用引起广泛的关注^[1]. 随着人们对健康环保纺织品需求的增加以及各国政府对环境保护力度的加大, 在纺织印染行业中一种基于碱性果胶酶的新型纺织生物助剂正在应用推广. 在传统工艺中, 一般是在高温下用氢氧化钠的强碱溶液对退浆后的棉织物进行处理, 以除去其表面的非纤维素成份. 在此过程中, 棉纤维易形成氧化纤维素而遭到损伤, 棉纤维表面因去除了大量起润滑作用的蜡质而失去应有的手感; 另一方面, 传统工艺对环境造成了污染. 利用碱性果胶酶处理不仅可提高产品品质, 而且能大大降低成本, 减少环境污染. 例如, 可节约大量工艺用水、生产时间、能耗、原料及对废水的处理费用, 减少排放废水中的盐含量及 COD 等等. 此外, 碱性果胶酶还应用于饲料工业、造纸和纸浆工业、浸解植物纤维等方面^[2]. 20 世纪 90 年代, 日本已将用于生物精练的碱性果胶酶推向了市场. 1999 年 Novo Nordisk 公司更是推出用基因工程改造菌种生产的品牌为‘Bio-Prep’碱性果胶酶. 碱性果胶酶可由细菌、放线菌产生, 也可由真菌产生. 能产生碱性果胶酶并具有工业化使用前景的菌种不多, 仅嗜碱性芽胞杆菌、萝卜软腐欧文氏菌、放线菌及螺孢菌等几种^[3,4]. 作者所用菌种为嗜盐嗜碱杆菌. 细菌具有生长速度快, 产酶发酵周期短的优点, 且较高盐碱的培养环境, 使得发酵过程不易染菌, 这种菌种优势有利于工业化推广.

1 材料与方法

1.1 实验材料

Alkalibacterium sp. F26, 分离自内蒙古海拉尔地区的盐碱湖, 由中科院北京微生物研究所菌种保藏中心提供.

1.2 培养基

斜面培养基(组分 g/dL): 淀粉 1, 酵母膏 0.5, 蛋白胨 0.5, NaCl 5, MgSO₄ · 7H₂O 0.02, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.1, Na₂CO₃ 1(分消).

初始发酵培养基(组分 g/dL): 葡萄糖 1, 酵母膏 0.5, 蛋白胨 0.5, NaCl 5, MgSO₄ · 7H₂O 0.02, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.1, Na₂CO₃ 1(分消). 培养基优化时对其相应组分作替换.

1.3 主要试剂

果胶: 购自 sigma 公司.

1.4 培养方法

种子培养: 接种量 1 环/瓶, 摇床转速 220 r/min, 37 ℃ 培养 18 h.

摇瓶发酵培养: 接种体积分数 1%, 摇床转速 220 r/min, 35 ℃ 培养 22 h.

1.5 菌体量的测定

以 560 nm 下的发酵液的 OD 值表示菌液的相对浓度, 用未接种的培养基作空白.

1.6 碱性果胶水解酶的酶活测定方法

发酵液 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液稀释 10 倍后, 吸 0.5 mL 稀释液与 2.0 mL 含 0.4% 果胶的甘氨酸—氢氧化钠缓冲溶液(pH 10)于 45 ℃ 反应 10 min, 再加入 2.5 mL DNS 溶液沸水浴 5 min, 取经煮沸 10 min 的失活稀释酶液代替原稀释酶液做空白. 然后在 530 nm 下测定吸光值. 通过半乳糖醛酸浓度标准曲线查出释放出的半乳糖醛酸微克数. 在上述测定条件下, 每分钟水解果胶释放出 1 μg 半乳糖醛酸的所需酶量定义为一个酶活单位^[5].

2 结果与分析

2.1 培养基主组分对 F26 产酶的影响

碳源是为菌体生命活动提供能量的最主要的物质. 选择常见的单糖、双糖和多糖作为碳源, 摇瓶培养考察 F26 产酶情况, 结果见表 1. 不同的碳源对产酶的影响很大: 其中葡萄糖效果最佳, 用量为 1 g/dL 时酶活达 832 U/mL, 为添加相同果糖量时酶活的 1.66 倍; 葡萄糖用量不同时产酶水平也相差较大, 1 g/dL 用量情况下产酶比 0.5 g/dL 和 1.5 g/dL 用量情况下高出 32% 和 15%; 双糖和多糖(蔗糖、麦芽糖、淀粉和糊精)作碳源时不产酶. 所以选定 1 g/dL 葡萄糖作碳源.

氮源是菌体合成氨基酸、蛋白质、核酸和细胞质的主要成分, 也是合成各种含氮代谢产物的重要原料. 采用同样的方法考察不同的氮源对 F26 产酶的影响. 表 2 清楚地反映出, 蛋白胨作为氮源时酶活明显比其他氮源高; 豆饼粉、玉米浆、硝酸钠、酵母膏作为氮源时酶活次之; 而以硫酸铵作为氮源时酶活几乎为 0.

考虑到蛋白胨作为氮源时工业生产成本较高, 希望通过蛋白胨和其他物质组合作为氮源也能达到相同的产酶水平. 但在复合氮源实验中, 设计的各种组合并没有较好的结果, 故仍选择 1 g/dL 蛋

白胨作为氮源.

表 1 碳源对产酶的影响

Tab. 1 Effect of different carbon sources on the enzyme production

碳源	质量浓度/ (g/dL)	发酵 酶活/ (U/mL)
葡萄糖	0.5	628
	1.0	832
	1.5	723
蔗糖	0.5	0
	1.0	0
	1.5	0
果糖	0.5	460
	1.0	508
	1.5	418
麦芽糖	0.5	0
	1.0	0
	1.5	0
糊精	0.5	0
	1.0	0
	1.5	0
可溶性淀粉	0.5	0
	1.0	0
	1.5	0

注:发酵培养基其他组分(g/dL):酵母膏 0.5,蛋白胨 0.5,NaCl 5,K₂ HPO₄ · 3H₂O 0.1,MgSO₄ · 7H₂O 0.02,Na₂CO₃ 1(分消).

2.2 不同添加物对 F26 产酶的影响

无机盐的重要功能是构成细胞组成部分并维持酶的活性,调节细胞渗透压、氢离子浓度、氧化还原电位等^[6].

几种无机盐对产酶的影响见表 3. 据文献[7]报道,一些果胶裂解酶的活性需要 Ca²⁺ 参加,而一些果胶水解酶的活性受 Ca²⁺ 的抑制. 由表 3 看出,当培养基中添加 CaSO₄ 时,酶活明显比不加时低,显然是 Ca²⁺ 起了抑制作用. 作为中度嗜盐嗜碱菌,F26 不仅生长时依赖较高的盐浓度,而且产酶也需要较高的盐浓度. 实验确定在培养基中添加 NaCl 5.0 g/dL,MgSO₄ · 7H₂O 0.02 g/dL,K₂ HPO₄ · 3H₂O 0.1 g/dL.

表面活性剂由于能改变细胞膜的透性和改善氧在气液界面的传递速度,因而能提高酶的发酵产率. 试验了吐温-40 等 6 种表面活性剂对产酶的影响(见表 4). 当培养基中添加 0.5 g/dL 或 1 g/dL 吐温-80 时产酶水平有明显的提高. 确定培养基中

添加 1 g/dL 吐温-80.

表 2 氮源对产酶的影响

Tab. 2 Effect of different nitrogen sources on the enzyme production

氮源	质量浓度/ (g/dL)	发酵酶活/ (U/mL)
豆饼粉	1.0	607
	2.0	625
	4.0	481
	6.0	0
玉米浆	1.6	535
	3.2	596
	6.3	447
	9.5	0
酵母膏	0.6	473
	1.2	449
	2.4	480
	3.6	425
蛋白胨	0.5	829
	1.0	878
	2.0	758
	3.0	764
硫酸铵	0.29	0
	0.58	0
	0.95	0
	1.4	0
硝酸钠	0.31	341
	0.61	429
	1.22	458
	1.82	420

注:1. 各种氮源的用量均以折算成相同的含氮量添加.
2. 发酵培养基其他组分(g/dL):葡萄糖 1,NaCl 5,K₂ HPO₄ · 3H₂O 0.1,MgSO₄ · 7H₂O 0.02,Na₂CO₃ 1(分消).

表 3 无机盐对产酶的影响

Tab. 3 Effect of different inorganic salt on the enzyme production

氯化钠 质量浓度/ (g/dL)	硫酸钙 质量浓度/ (g/dL)	硫酸镁 质量浓度/ (g/dL)	磷酸氢二钾 质量浓度/ (g/dL)	酶活/ (U/mL)
3	0.15	0.02	0.1	410
5	0	0.02	0.1	875
3	0	0.04	0.1	609
5	0.1	0.02	0.1	712
5	0.1	0.04	0.1	514
5	0	0.04	0.2	765
8	0.1	0.04	0.2	640

注:发酵培养基其他组分(g/dL):葡萄糖 1,蛋白胨 1,Na₂CO₃ 1(分消).

表 4 表面活性剂对产酶的影响

Tab. 4 Effect of different surfactants on the enzyme production

表面活性剂	质量浓度/ (g/dL)	酶活/ (U/mL)
吐温-40	0.5	640
	1.0	759
	1.5	720
吐温-60	0.5	800
	1.0	852
	1.5	832
吐温-80	0.5	936
	1.0	972
	1.5	674
聚醚	0.5	760
	1.0	772
	1.5	792
十二烷基磺酸钠	0.5	724
	1.0	700
	1.5	764
司班 80	0.5	548
	1.0	792
	1.5	808
对照	0	810

注:发酵培养基其他组分(g/dL):葡萄糖 1,蛋白胨 1, NaCl 5, K₂ HPO₄ · 3H₂ O 0.1, MgSO₄ · 7H₂ O 0.02, Na₂ CO₃ 1(分消).

2.3 培养条件对 F26 产酶的影响

培养条件的优化从培养基的起始 pH 值入手. 一般来说,生物体中酶的活性范围总是与该生物体的生长条件相近或完全吻合的^[8]. F26 为嗜盐嗜碱菌,其较适的生长 pH 在碱性范围,因此其合成酶的 pH 值范围也可能在碱性范围. 在实验中培养基的起始 pH 值是由碳酸钠的浓度来控制. 培养基 pH 值对酶合成的影响见图 1.

培养基的起始 pH 值为 9 以下时,F26 根本不产酶,在 9~11.5 时酶产量随 pH 值升高而提高,11.5 时出现产酶峰值,这体现出 F26 菌株嗜碱的特性,如此高的 pH 值生产环境使得发酵过程不易染菌,这是有利于工业化推广的优势. 实验确定培养基的最佳起始 pH 值为 11.5.

在影响微生物生长繁殖及发酵的各种物理因素中,温度起重要的作用. 培养基接种后于不同温

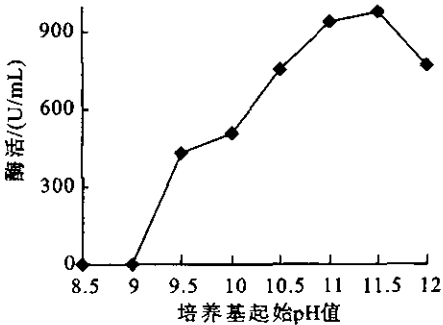


图 1 培养基起始 pH 值对产酶的影响

Fig. 1 Effect of initial pH on the enzyme production
度下进行培养,结果见图 2. 培养温度在 29~35 ℃ 时,产酶逐步提高,35 ℃ 时达到最高,产酶量比 33 ℃ 时高出近 20%;但温度继续升高后,产酶水平则逐步下降,37 ℃ 时产酶量约为 35 ℃ 时的 90%. 故确定 35 ℃ 为最佳发酵温度.

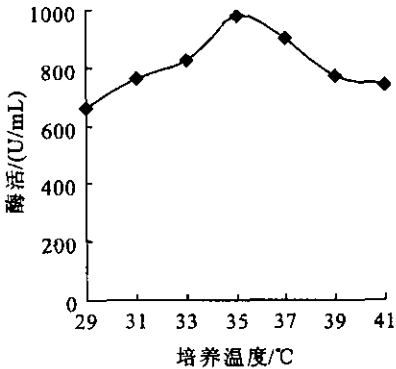


图 2 培养温度对产酶的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the enzyme production

好氧微生物在发酵过程中必须提供大量的氧以满足微生物生长繁殖和产酶的需要. 实验室条件下可以通过改变摇瓶装液量实现改变供氧.

固定摇床条件(旋转式,220 r/min,偏心距 2 cm),培养基中不加表面活性剂时,改变摇瓶(250 mL 三角瓶)的装液量,结果见图 3. 曲线的峰值出现在 25 mL 装液量. 增大装液量造成溶氧浓度下降而使得酶产量下降;减小装液量为 15 mL 和 20 mL 时,发酵水平也下降. 可以看出 F26 合成碱性果胶酶对溶氧的需求并不高,过高的溶氧浓度反而抑制了酶的合成,这可能与酶的稳定性或微生物代谢途径的改变有关. 实验确定 250 mL 摇瓶最适合的装液量为 25 mL.

2.4 组合优化实验及结果

响应面分析方法已被广泛应用于发酵过程实验的设计,根据 BOX-Benhknen 的中心组合设计原理,设计了三因素三水平的响应面分析实验.

从上述的实验可以看出,培养基起始 pH 值、氯

化钠和葡萄糖的质量浓度对产酶的影响很大,且考虑 F26 为嗜盐嗜碱菌,所以选定葡萄糖(x_1),氯化钠(x_2),pH 值(x_3)3 个因素为自变量,以酶活(y)为响应值,实验因素与水平的选取见表 5.

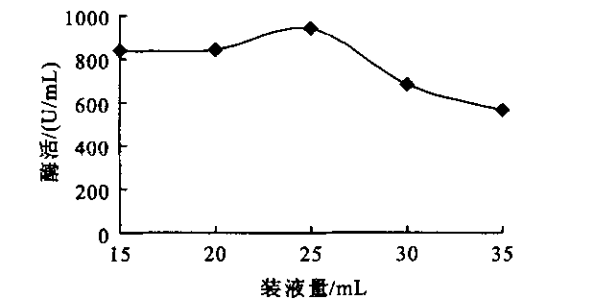


图 3 摇瓶装液量对产酶的影响

Fig. 3 Effect of medium volume on the enzyme production

表 5 响应面分析因素及水平

Tab. 5 The factors and level of response surface analysis			
水平	葡萄糖 质量浓度 x_1 /(g/dL)	氯化钠 质量浓度 x_2 /(g/dL)	pH 值 x_3
—1	0.5	3	10.5
0	1.0	6	11.5
1	1.5	9	12.5

其它培养基成分见摇瓶发酵培养基,实验结果见表 6.

表 6 响应面分析实验结果

Tab. 6 The results of response surface analysis experiment				
试验号	葡萄糖 x_1	氯化钠 x_2	pH 值 x_3	酶活 y / (U/mL)
1	0	-1	-1	624
2	0	-1	1	458
3	0	1	-1	842
4	0	1	1	533
5	-1	0	-1	764
6	-1	0	1	520
7	1	0	-1	720
8	1	0	1	591
9	-1	-1	0	440
10	-1	1	0	560
11	1	1	0	478
12	1	-1	0	640
13	0	0	0	952
14	0	0	0	972
15	0	0	0	940

万方数据

表 6 数据用 SAS 程序计算出回归方程中各系数,得方程如下:

$$y = 954.667 + 18.125x_1 + 31.375x_2 - 106.000x_3 - 195.333x_1^2 - 70.500x_1x_2 - 229.833x_2^2 + 28.750x_1x_3 - 35.750x_2x_3 - 110.583x_3^2$$

对方程求偏导,并令其等于零,可得到曲面的最大点时自变量的值,即 $x_1 = -0.009\ 842$, $x_2 = 0.108\ 504$, $x_3 = -0.498\ 095$ 时, y 取最大值为 982.7. 根据回归模型,作出响应面分析的响应面图以确认葡萄糖、氯化钠、pH 值分别对摇瓶发酵中酶活的影响情况. 在作响应面图时分别将葡萄糖、氯化钠、pH 值中一点固定,以便突出另二个主要的因素对酶活产量的影响(见图 4).

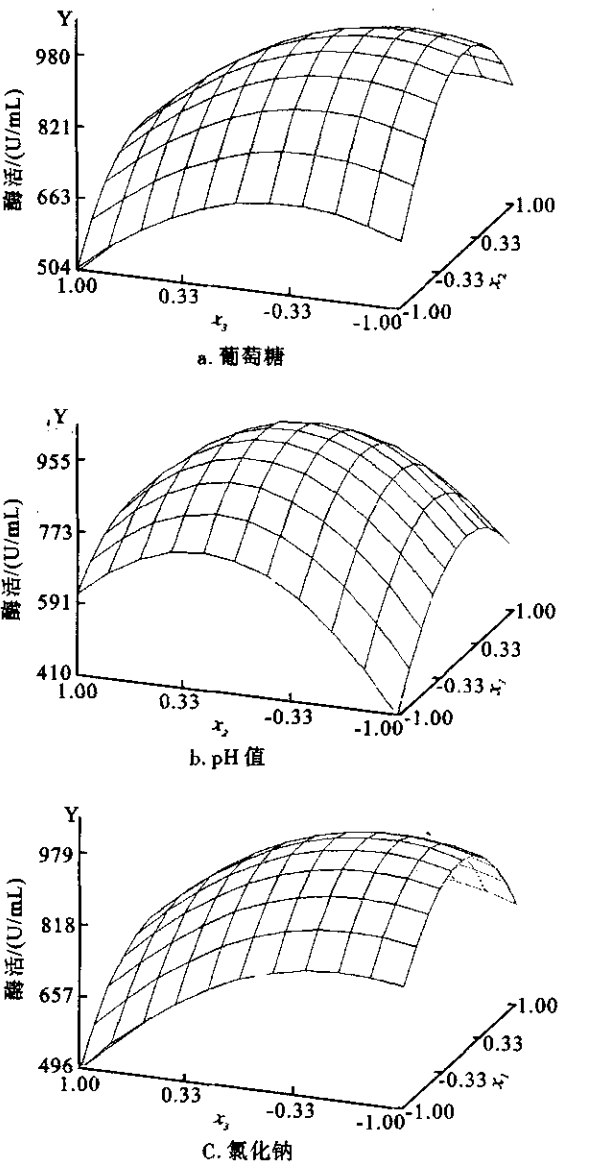


图 4 响应面图

Fig. 4 The response surface plots

根据对回归方程的求解和响应面分析图可知,最优的发酵培养条件为:葡萄糖 0.95 g/dL,氯化钠

6.3 g/dL, pH 11.25, 酶活预测值为 982.7 .

2.5 摇瓶发酵过程曲线

F26 摇瓶培养产碱性果胶酶的过程曲线见图 5. 经 10 h 左右的停滞期, 细胞很快进入对数生长期, 但细胞并没有开始合成碱性果胶酶. 直到 16 h 才开始大量合成酶, 在 16~22 h 产酶速度最快, 呈直线攀升势态, 24 h 酶活力达到最高值, 为 1 015 U/mL. 但 22 h 后产酶速度开始下降.

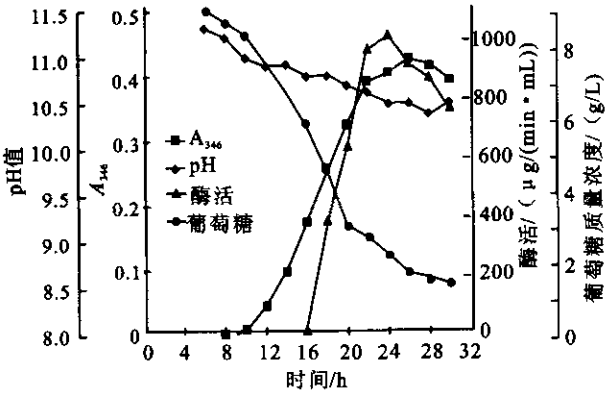


图 5 摇瓶发酵过程曲线

Fig. 5 Change course in shaking flask culture

26 h 后细胞生长开始衰减, 酶合成也随之停止, 酶活力略有下降. 可见该菌产酶与菌体的生长部分耦联. 基质葡萄糖浓度的消耗过程跟细胞生长和酶合成呈对应关系. 细胞快速生长、产物大量合成阶段基质快速消耗, 当发酵终了时培养基中残余少量的葡萄糖.

3 结 论

1) 经单因素和响应面分析试验, 得到最优的 F26 摇瓶培养产碱性果胶酶的发酵培养基为 (组分 g/dL): 葡萄糖 0.95, 蛋白胨 1, NaCl 6.3, MgSO₄ · 7H₂O 0.02, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.1, Na₂CO₃ 1, 吐温-80 1.

2) 摇瓶培养最优的培养条件为: 250 mL 三角瓶装液量 25 mL, 35 ℃, 起始 pH 值 11.25, 培养 24 h.

3) 在此优化条件下培养, 酶活达 1 015 U/mL.

参考文献:

[1] Kashyap D R, Vohra P, Chopra S. Biotechnological applications of microbial pectinases[J]. *Bioresource Technology*, 2001, 77: 215-227.

[2] Alkorta I, Garbisu C, Llama M J, *et al.* Industrial applications of pectic enzymes; a review[J]. *Process Biochemistry*, 1998, 33: 21-28.

[3] 吴琼. 放线菌果胶酶的分离纯化及酶学性质的研究[J]. *山东轻工业学院学报*, 1996, 10(4): 53-58.

[4] 钟卫鸿, 王启军, 岑沛霖. 螺孢菌 ZG9901 的筛选及其产碱性果胶酶发酵条件研究[J]. *应用与环境生物学报*, 2000, 6(5): 468-472.

[5] 丁凤平, 张秀芝. 碱性果胶酶 PATE 及其测定方法[J]. *中国生化药物杂志*, 1993, 64(2): 42-43.

[6] 姚汝华. 微生物工艺工程原理[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1996. 20.

[7] 高必达. 真菌果胶酶的分子生物学研究进展[J]. *生物工程进展*, 2000, 20(6): 14-18.

[8] Hough D W, Danson M J. Extremozymes [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1999, 3: 39-46.

(责任编辑: 李春丽)