

文章编号:1673-1689(2005)06-0071-04

L-氨基酰化酶产生菌的筛选及其固态发酵工艺

房 峻, 李江华

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 从 13 株米曲霉菌株中筛选到一株产氨基酰化酶活力较高的米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) WO607, 以米曲霉 WO607 为生产菌固态发酵生产氨基酰化酶, 较适的培养基组成和培养条件为: 麸皮 7.0 g, 豆饼粉 3.0 g, 蛋白胨 0.3 g, 水 11 mL, pH 值 6.5, 发酵温度 28 ℃, 发酵周期约 48 h. 在此条件下, 米曲霉 WO607 的氨基酰化酶产率为 400 U/g 左右.

关键词: 氨基酰化酶; 米曲霉; 筛选; 固态发酵

中图分类号: TQ 925.6

文献标识码: A

Screening of Aminoacylase-Producing Strain and Its Solid State Fermentation

FANG Jun, LI Jiang-hua

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: A aminoacylase producing strain *Aspergillus oryzae* WO607 was obtained by screening 13 *Aspergillus oryzae*. Solid state fermentation of *Aspergillus oryzae* WO607 for production of aminoacylase was carried out in a system consisting of wheat bran 7.0 g; soybean meal 3.0 g; peptone 0.3 g; water 11 mL, initial pH 6.5 and temperature of 28 ℃. The fermentation cycle was about 48 hr. Under these conditions, the aminoacylase yield by WO607 was about 400 U/g.

Key words: aminoacylase; *Aspergillus oryzae*; screening; solid state fermentation

D-氨基酸是一类非天然氨基酸. 作为医药、农药和食品添加剂的中间体, D-氨基酸具有非常重要的工业价值^[1]. 目前 D-氨基酸的生产方法一般有化学合成和生物合成两大类. D-氨基酸的生物合成可采用完整的微生物细胞或从微生物中提取的酶作为生物催化剂进行生物转化. 生物催化剂的区域选择性强、反应条件温和、操作简便、成本较低、公害少, 且能完成一些化学合成难以进行的反应, 因此该领域的研究引起了广泛的关注^[2~6]. 在 D-氨基酸

的生物合成方法中, 以 L-氨基酰化酶为催化剂进行生物拆分是最常见的方法之一^[7,8]. 该酶具有立体选择性强、底物专一性范围广的优点, 能立体选择性地 将 N-乙酰-L-氨基酸水解, 适合于多数外消旋氨基酸的拆分. L-氨基酰化酶最早是从动物的肾脏中发现的, 但目前该酶主要采用微生物发酵的方法制备. 在产 L-氨基酰化酶的微生物中, 米曲霉是最常用的生产菌^[9,10]. 因此作者从实验室保藏的米曲霉中筛选出一株较适合的 L-氨基酰化酶的产生菌,

收稿日期: 2004-03-13; 修回日期: 2005-04-15.

作者简介: 房峻(1968-), 男, 江苏扬州人, 工程师.

万方数据

并对该菌株的固态发酵产酶条件进行了初步的研究.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) WO 607,作者所在实验室保藏.

1.1.2 培养基

1) 固体培养基(g/L):土豆 200,蔗糖 20,琼脂 20;pH 值自然.此培养基用于菌种保藏和斜面种子培养.

2)筛选培养基:250 mL 三角瓶装 4.5 g 麸皮、5.5 g 豆饼粉,11 mL 水,pH 值自然,121 ℃灭菌 45 min.

3)固态发酵产酶培养基:250 mL 三角瓶中装 7.0 g 麸皮,3.0 g 豆饼粉,0.3 g 蛋白胨,11 mL 水,pH 值 6.5,于 121 ℃灭菌 45 min.

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法 固体发酵培养基灭菌冷却后接种一环斜面孢子,于 37 ℃培养 48 h.

1.2.2 酶活性的测定 1)酶液制备:发酵结束后,称取 1 g 固体曲,加 10 mL 蒸馏水,25 ℃浸提 30 min,然后过滤,取滤液适当稀释测定酶活力.

2)酶活力测定:取 0.2 mL 底物(0.2 mol/LN-乙酰-D,L-丙氨酸)和 0.6 mL pH 值 7.0 的磷酸缓冲液于试管中,37 ℃水浴预热 5~10 min,加入适当稀释的酶液 0.2 mL,保温 30 min.采用茚三酮显色法测定水解产生的 L-丙氨酸.在上述条件下,每克干曲每分钟催化底物水解释放出 1 μmol L-丙氨酸所含酶量定义为一个氨基酰化酶单位.

1.2.3 水分的测定湿曲在 105 ℃干燥至恒重测定.

2 结果与讨论

2.1 产酶菌种的筛选

将实验室收集保藏的 13 株米曲霉接种于筛选培养基,28 ℃培养 48 h.结果见表 1.7 号菌株的产酶能力明显高于其它菌株,而且经进一步试验证实该菌株的产酶水平较稳定,因此选定该菌株为后续试验的试验菌种,编号为 WO 607.

2.2 WO 607 的产酶条件

2.2.1 培养时间对产酶的影响 将 WO 607 接种于筛选培养基于 28 ℃静置培养,从 24 h 起每隔 8 h 取样测定其酶活,结果见图 1. WO 607 的最适产酶

周期为 48 h.

表 1 产酶菌种的筛选

Tab. 1 Screening of strains producing aminoacylase			
序号	酶活/(U/g)	序号	酶活/(U/g)
1	48.0	8	171.6
2	136.5	9	0
3	23.5	10	0
4	84.0	11	74.2
5	66.8	12	110.2
6	78.0	13	68.2
7	262.5		

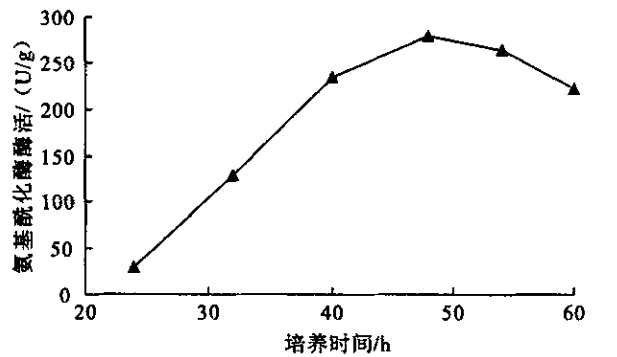


图 1 培养时间对产酶的影响

Fig. 1 Effect of cultivation time on the formation of aminoacylase

2.2.2 碳源对产酶的影响 以麸皮为基础碳源,试验了不同碳源对产酶的影响,结果见表 2.所选用的碳源在试验浓度范围内均对氨基酰化酶的合成有不同程度的抑制作用.因此在后续的试验中仍以麸皮为单一的基础碳源.

表 2 碳源对产酶的影响

Tab. 2 Effects of different carbon sources on the formation of aminoacylase

碳源种类	添加质量/g	氨基酰化酶酶活/(U/g)
玉米粉	0.1	86
可溶性淀粉	0.1	79
葡萄糖	0.1	150
乳糖	0.1	0
蔗糖	0.1	255
麦芽糖	0.1	238
对照		269

2.2.3 氮源对产酶的影响 试验各种氮源对产酶的影响,结果见表 3.豆饼粉为最佳氮源.

表 3 氮源对产酶的影响

Tab. 3 Effects of different nitrogen sources on the formatrion of aminoacylase

碳源种类	添加质量/g	氨基酰化酶酶活/(U/g)
硝酸钠	1	89
尿素	1	76
豆饼粉	2	248
硝酸铵	1	183
蛋白胨	1	193
硫酸铵	1	161
酵母膏	1	169

2.2.4 麸皮和豆饼粉的比例对产酶的影响 试验了麸皮和豆饼粉的比例对产酶的影响,结果见表 4. 麸皮和豆饼粉的最佳配比为 7 : 3.

表 4 麸皮和豆饼粉的比例对产酶的影响

Tab. 4 Effects of wheat bran/ soybean meal ratio on the formation of aminoacylase

豆饼粉	麸皮	氨基酰化酶酶活/(U/g)
1	9	175
2	8	251
3	7	287
4	6	236
5	5	158
6	4	92
7	3	83
8	2	74
9	1	1. 6

2.2.5 复合氮源对产酶的影响 从表 3 的结果可知,氨基酰化酶合成的最佳氮源为豆饼粉,其次为蛋白胨和硝酸铵. 因此在麸皮豆饼粉的基础培养基中按不同比例加入蛋白胨和硝酸铵作为复合氮源,考察其对产酶的影响. 表 5 表明,在麸皮豆饼粉基础培养基中加入 3 g/dL 蛋白胨对产酶有明显的促进作用,加 1 g/dL 硝酸铵溶液和 1 g/dL 蛋白胨也能少量提高产酶能力.

2.2.6 表面活性剂对产酶的影响 试验了不同质量浓度表面活性剂对产酶的影响,结果见表 6. 所选用的表面活性剂在试验质量浓度范围内均对氨基酰化酶的合成具有抑制作用.

表 5 复合氮源对产酶的影响

Tab. 5 Effects of mixed nitrogen sources on the formatrion of aminoacylase

硝酸铵质量/g	蛋白胨质量/g	氨基酰化酶酶活/(U/g)
0	0	273
0	0. 1	157
0	0. 2	201
0	0. 3	351
0. 1	0	115
0. 2	0	152
0. 3	0	230
0. 1	0. 1	290
0. 1	0. 2	189
0. 1	0. 3	194
0. 2	0. 1	237
0. 3	0. 1	262

表 6 表面活性剂对产酶的影响

Tab. 6 Effects of surfactants on the formatrion of aminoacylase

表面活性剂	添加质量浓度/(g/dL)	氨基酰化酶酶活/(U/g)
吐温 40	0. 5	286
	1. 0	98
	1. 5	64
吐温 60	0. 5	247
	1. 0	159
	1. 5	102
吐温 80	0. 5	325
	1. 0	287
	1. 5	196
对照		362

2.2.7 培养基中水分对产酶的影响 在固态发酵中,水分是影响产量的一个重要因素. 试验培养基中不同水分质分数对氨基酰化酶合成的影响. 从图 2 可以看出,水分质量分数对产酶有较大的影响. 培养基中较适当的水分质量分数大约在 53%左右(即加水质量比为 1 : 1. 1 左右).

2.2.8 培养基起始 pH 值对产酶的影响 将培养基调整至不同的 pH 值(3. 5~7. 5)灭菌、接种和培养. 图 3 的结果表明,培养基的起始 pH 值在 6. 5 左右较佳.

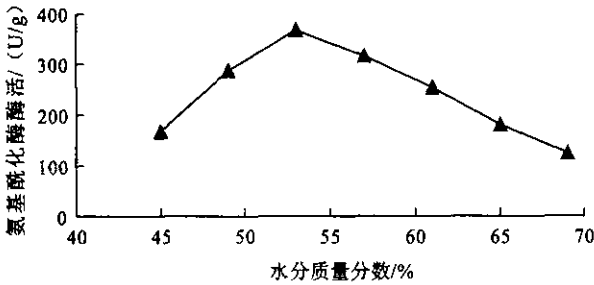


图 2 培养基中水分对产酶的影响

Fig. 2 Effect of water content in culture medium on formation of aminoacylase

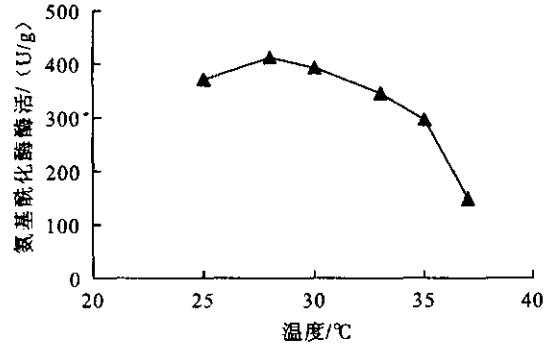


图 4 培养温度对产酶的影响

Fig. 4 Effects of cultivation temperature on formation of aminoacylase

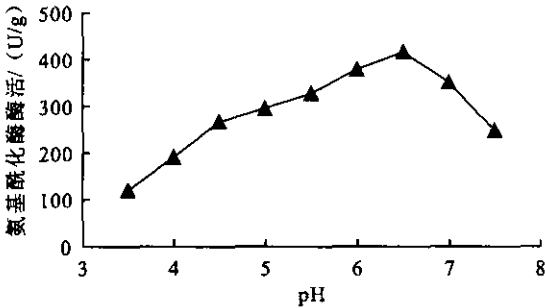


图 3 起始 pH 对产酶的影响

Fig. 3 Effects of initial pH on formation of aminoacylase

2.2.9 培养温度对产酶的影响 将 WO607 接种于固态发酵培养基,分别于 25,28,30,35,37 °C 培养 48 h,测定其酶活.图 4 的结果表明较适的产酶培养温度为 28 °C.

3 结 论

从实验室保藏的米曲霉中筛选出一株氨基酰化酶的产生菌 WO607.对该菌株的固态发酵条件进行了初步研究,该菌株的较适碳源为麸皮,较适氮源为豆饼粉和蛋白胨.培养基的水分和培养温度对产酶影响较大.经过产酶条件的优化,该菌株产酶适宜的固体培养基组成为:250 mL 三角瓶装麸皮 7.0 g、豆饼粉 3.0 g、蛋白胨 0.3 g、水 11 mL.产酶适宜的培养条件为:培养基起始 pH 6.5,培养温度 28 °C. WO607 在此条件下培养 48 hr,氨基酰化酶的活力达到 400 U/g 干曲左右.

参考文献:

[1] Makoto Y, Akio O. Industrial biotransformations for the production of D-amino acids[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1998,4:1—11.

[2] Takahashi E, Furui M, Shibatanil T. D-Amino acid production from racemic amino acids by a microbial asymmetric degradation[J]. *Biotechnology Techniques*, 1997, 11(12):913—916.

[3] Tritaphi C, Bihari V, Tyagi R. Microbial production of D-amino acids[J]. *Process Biochemistry*, 2000, 35:1247—1251.

[4] Mamoru W, Kazuaki Y, Yoshihiko H, *et al.* Production of d-amino acids by N-acyl-d-amino acid amidohydrolase and its structure and function[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, 23:71—85.

[5] Hidenobu K, Naoyoshi I, Yasuhisa A. Enhancement of the thermostability and catalytic activity of d-stereospecific amino-acid amidase from *Ochrobactrum anthropi* SV3 by directed evolution[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, 21:283—290.

[6] Baek D, Song J, Lee S, *et al.* New thermostable d-methionine amidase from *Brevibacillus borstelensis* BCS-1 and its application for d-phenylalanine production[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32:131—139.

[7] 何仕国,俞一军,许文松. DL-苯丙氨酸的酶法拆分研究[J]. *化学反应工程与工艺*, 2004,20(1):64—69.

[8] 王燕,张凤宝,宋正孝,等. 米曲霉菌体光学拆分 N-乙酰-DL-苯甘氨酸的动力学研究[J]. *化学工程*, 2004,32(2):33—37.

[9] 曹军卫,高春东. 产氨基酰化酶米曲霉高产菌株的选育[J]. *氨基酸和生物资源*,1999,21(3):20—22.

[10] 周菊岩,王道宾. 氨基酰化酶产生菌 GR1—11 菌株的选育和产酶条件的研究[J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 1992, (4):39—43.

(责任编辑:李春丽,杨 萌)