



产气气杆菌产普鲁兰酶发酵培养基的优化

巩培, 戚薇, 杜连祥, 刘伊

(工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 对一株产气气杆菌产普鲁兰酶的发酵培养基进行了优化, 确定了该菌株的最适发酵培养基配方为(g/L): 玉米淀粉 15, 豆饼粉 10, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 8, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KCl 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05. 采用该培养基在 5 L 发酵罐水平发酵 55 h, 普鲁兰酶活力达到 54.64 U/mL. 研究了不同铵盐形式对该菌株产普鲁兰酶的影响, 结果发现: 以 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 为无机氮源, 该菌株产普鲁兰酶活力高, 且该酶绝大部分能分泌至胞外. 而以 NH_4Cl , NH_4NO_3 及 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为无机氮源, 该菌产普鲁兰酶活力较低, 且为胞内酶.

关键词: 普鲁兰酶; 产气气杆菌; 铵盐形式

中图分类号: Q933

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2009)03-0010-03

Optimization of the Fermentation Medium for Producing Pullulanase by *Aerobacter aerogenes*

GONG Pei, QI Wei, DU Lian-xiang, LIU Yi

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The fermentation medium for producing pullulanase by *Aerobacter aerogenes* was studied. The fermentation medium consists of(g/L): 15 corn starch, 10 bean powder, 8 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 0.5 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 KCl, 0.05 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The experiment was also carried out in a 5 L fermentor. The effects of different kinds of ammonium salt on activity of pullulanase were studied. The results show that the pullulanase is secreted into the growth medium and perform the highest activity when $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ is used as nitrogen. However, pullulanase is not secreted into the growth medium and the strain has low-yield production in the presence of NH_4Cl , NH_4NO_3 and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Keywords: pullulanase; *Aerobacter aerogenes*; ammonium salt

普鲁兰酶(pullulanase, EC 3, 2, 1, 41), 又称普鲁兰-6-葡聚糖水解酶或 α -糊精-6-葡聚糖水解酶, 属于淀粉水解酶, 是一种专一性地水解支链淀粉分支点中的 α -1, 6-糖苷键, 剪下整个侧枝而形成直链淀粉的脱支酶. 目前普鲁兰酶主要应用于以淀粉为原料的食品等工业部门, 特别在淀粉糖和酿造行业中应用广泛. 在淀粉水解过程中, 普鲁兰酶与 α -淀粉酶、糖化酶配合使用可将淀粉彻底降解为葡萄糖. 在西方国家医用葡萄糖的生产中几乎都使用普鲁兰酶. 此外, 普鲁兰酶在高麦芽糖浆, 干啤酒生产中均有应用^[1-2].

1998年, 肖敏等人^[3]从白酒发酵现场中分离出一株产普鲁兰酶的 K_{123} 菌株, 最高酶活力为 4.56 U/mL. 1999年, 金狮等人^[4]从土壤中分离出一株产普鲁兰酶的芽孢杆菌, 通过优化发酵培养基及培养条件, 酶活力可达 4.5 U/mL, 在 2 L 的发酵罐中酶活力可稳定在 3.3 U/mL. 2001年, 唐宝英等人^[5]从土壤中筛选出一株产普鲁兰酶的芽孢杆菌, 经过紫外及 EMS 多次诱变, 最高酶活力可达 8.8 U/mL. 综合诸多有关普鲁兰酶的报道, 各项研究中的酶活力均处于较低水平.

收稿日期: 2008-09-25; 修回日期: 2008-12-11

基金项目: 国家科技基础条件平台资助项目(2005DKA21204-10)

作者简介: 巩培(1982—), 男, 内蒙古人, 硕士研究生; 通信作者: 戚薇, 教授, Qiwei@tust.edu.cn.

我国工业上所用的普鲁兰酶均是从丹麦的 NOVO 和美国的杰能科公司进口,世界上也只有这两个公司具备了普鲁兰酶的工业化生产能力. 基于此现状,本文对天津科技大学工业微生物菌种保藏室保藏的一株具有产较高普鲁兰酶活力的产气气杆菌进行研究,优化其发酵培养基,以提高该菌株产酶活力,为尽快在我国实现该酶的工业化生产奠定基础.

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

产气气杆菌(*Aerobacter aerogenes*TCCC11061),由天津科技大学工业微生物菌种保藏室保藏.

摇瓶种子培养基为肉汤培养基,斜面培养基为肉汤培养基中加入 2%的琼脂.

初始发酵培养基(g/L):可溶性淀粉 15,蛋白胨 5,CH₃COONH₄ 8,K₂HPO₄·3H₂O 0.5,MgSO₄·7H₂O 0.5,KCl 0.5,FeSO₄·7H₂O 0.05,pH 7.2~7.4.

1.2 主要原料

甘薯淀粉,舒城大海淀粉有限公司;其余淀粉均为市售;溶菌酶,博大泰克生物公司;其余试剂均为国产化学纯及生化试剂.

1.3 菌种的培养及发酵

将新鲜斜面上的菌种转接于装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,30 ℃、200 r/min 摇床振荡培养 12 h,然后以 3%的接种量将种子培养液转接于装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,30 ℃、180 r/min 摇床振荡培养 75 h.

5 L 发酵罐发酵条件:接种量 3%,装料系数 0.7,温度 30 ℃,转速 200~600 r/min,溶氧维持在 10%~15%,连续培养 55 h.

1.4 粗酶液的制备及酶活力的测定

胞外酶:收集发酵液,8 000 r/min 离心 20 min,上清液即为粗酶液.

胞内酶:离心后的细胞,10 mg/mL 溶菌酶 37 ℃处理 1 h,离心上清液即为粗酶液.

采用 DNS 法测定酶活力,按文献[6]所述方法并略作修改:分别吸取 0.5%普鲁兰糖溶液 1 mL、醋酸缓冲液(pH 5.8)1 mL、酶液(适当稀释)1 mL,55 ℃保温 30 min,迅速冷却,取 1 mL 反应液加入 1.5 mL DNS 试剂,沸水浴 5 min 显色,冰水速冷,定容至 10 mL,540 nm 比色,灭活酶液作对照.

酶活力单位定义:在 pH 5.8、温度 55 ℃下,每分钟从普鲁兰底物释放相当于 1 μmol 葡萄糖的还原量

所需的酶量定义为一个活力单位.

1.5 菌体核酸量、总糖、DE 值的测定

菌体量用菌体核酸量来表示^[7].总糖的测定参考文献[8].不同 DE 淀粉的制备与测定参考文献[9].

2 结果与讨论

2.1 培养基组成对产酶的影响

2.1.1 不同种类淀粉对产酶的影响

(1)碳源的种类

在发酵培养基中分别加入 15 g/L 的不同种类的淀粉,测定其发酵液中普鲁兰酶的活力,结果如表 1 所示.玉米淀粉与可溶性淀粉最适合该菌株产酶,为了节约成本,选用玉米淀粉为碳源.

表 1 不同种类淀粉对产酶的影响

Tab.1 Effect of different starch on pullulanase production U/mL

可溶性淀粉	甘薯淀粉	土豆淀粉	玉米淀粉
25.24	5.80	7.62	24.86

(2)玉米淀粉用量对产酶的影响

改变玉米淀粉的用量,测定其对产酶的影响,结果如表 2 所示.结果表明,玉米淀粉用量 10 g/L 时酶活最高,20 g/L 以上酶活力将会降低.

表 2 玉米淀粉浓度对产酶的影响

Tab.2 Effect of corn starch concentration on pullulanase production

质量浓度/(g·L ⁻¹)	5	10	15	20	25
酶活力/(U·mL ⁻¹)	15.42	26.14	24.86	16.86	14.12

(3)不同 DE 的液化玉米淀粉对产酶的影响

采用不同 DE 的液化玉米淀粉测定对产酶的影响,结果如表 3 所示.由表 3 可见,DE 为 6.7%时最适合该菌株产酶.

表 3 不同 DE 的液化玉米淀粉对产酶的影响

Tab.3 Effect of different liquefacient corn starch on pullulanase production

DE /%	2.4	4.5	6.7	8.6	9.8	11.2
酶活力/(U·mL ⁻¹)	26.86	28.42	34.64	32.12	30.54	25.20

2.1.2 不同有机氮源对产酶的影响

(1)氮源的确定

有机碳源为 10 g/L 玉米淀粉(DE 为 6.7%),以 8 g/L 的醋酸铵为无机氮源,采用不同的有机氮源,测定其对产酶的影响,结果见表 4.由此可知,豆饼粉是最适合该菌株产酶的有机氮源.

表 4 不同有机氮源对产酶的影响

Tab.4 Effect of different organic nitrogen source on pullulanase production U/mL

豆饼粉	蛋白胨	玉米浆	酵母粉
38.34	24.86	34.65	25.67

注:豆饼粉添加前须经预处理,方法为:豆饼粉加 10 倍水,于 121 ℃ 煮沸 30 min,冷却后调 pH 7.0,添加中性蛋白酶量 180 ~ 200 U/g,酶解 1 h 备用.豆饼粉添加量以干基计算.

(2) 豆饼粉用量对产酶的影响

有机碳源选用 10 g/L 的玉米淀粉(DE 为 6.7%),改变豆饼粉的用量,测定结果见表 5,豆饼粉用量为 10 g/L 时最适合该菌株产酶.

表 5 豆饼粉初始浓度对产酶的影响

Tab.5 Effect of beanpowder concentration on pullulanase production

质量浓度/(g·L ⁻¹)	2.5	5.0	7.5	10.0	15.0
酶活力/(U·mL ⁻¹)	20.36	28.42	32.64	40.04	28.73

2.1.3 铵盐形式对产酶的影响

(1) 铵盐的确定

培养基中分别添加 8 g/L 醋酸铵、硫酸铵、硝酸铵及氯化铵,以不加铵盐作为对照,测定其对产酶的影响,结果见表 6.培养基中加入醋酸铵时,该菌所产的普鲁兰酶活力最高,而且该酶大部分能分泌至发酵液中,而使用硫酸铵、硝酸铵和氯化铵时,该菌普鲁兰酶活力较低,且该酶累积于胞内.

表 6 不同铵盐对产酶的影响

Tab.6 Effect of different ammonium salt on pullulanase production

铵盐形式	酶活力/(U·mL ⁻¹)		
	胞内	胞外	总酶
醋酸铵	15.00	41.20	56.20
硫酸铵	30.22	0	30.22
硝酸铵	15.46	0	15.46
氯化铵	10.34	0	10.34
对照	0	0	0

(2) 醋酸铵用量对产酶的影响

有机碳源为 10 g/L 的玉米淀粉(DE 为 6.7%),有机氮源为 10 g/L 的豆饼粉,改变醋酸铵的用量,测定其对产酶的影响,结果如表 7 所示,醋酸铵用量为 8 g/L 时最适合该菌株产酶.

表 7 醋酸铵初始浓度对产酶的影响

Tab.7 Effect of acetate ammonium concentration on pullulanase production

质量浓度/(g·L ⁻¹)	4	6	8	10	12
酶活力/(U·mL ⁻¹)	24.16	32.14	41.28	40.12	28.42

2.2 最佳发酵培养基的确定

在单因素实验基础上可知,玉米淀粉、豆饼粉和醋酸铵用量对产酶有较大影响.为考察各因素之间的相互作用,采用 L₉(3⁴) 进行正交实验设计,正交实验结果见表 8.由表 8 可知,玉米淀粉和醋酸铵的影响较显著.三个因素的影响程度依次为:醋酸铵>玉米淀粉>豆饼粉.利用均值可以确定各水平的最适用量,即玉米淀粉 15 g/L,豆饼粉 10 g/L,醋酸铵 8 g/L.其产酶活力最高,达 41.68 U/mL.

表 8 培养基正交实验结果

Tab.8 Results of L₉(3⁴) orthogonal experiments

序号	玉米淀粉/(g·L ⁻¹)	豆饼粉/(g·L ⁻¹)	醋酸铵/(g·L ⁻¹)	酶活力/(U·mL ⁻¹)
1	10	6	4	20.32
2	10	10	8	35.64
3	10	14	12	23.46
4	15	6	8	38.22
5	15	10	12	32.72
6	15	14	4	22.28
7	20	6	12	29.68
8	20	10	4	22.54
9	20	14	8	34.82
均值 1	26.473	29.407	21.713	
均值 2	31.073	30.300	36.227	
均值 3	29.013	26.853	28.620	
极差 R	4.600	3.447	14.514	
偏差平方和	31.855	19.197	316.200	
自由度	2	2	2	
F 比	11.588	6.983	115.024	

注:F 临界值 F_{0.10}(2,2)=9.000.

2.3 摇瓶发酵过程曲线

从图 1 可以看出,采用优化后的发酵培养基,30 ℃、180 r/min 培养 75 h,最高普鲁兰酶活力可达 42.82 U/mL.菌体从对数期末开始产酶,在稳定期达到产酶高峰,在稳定期后期酶活力开始下降,所以控制发酵终点很重要.

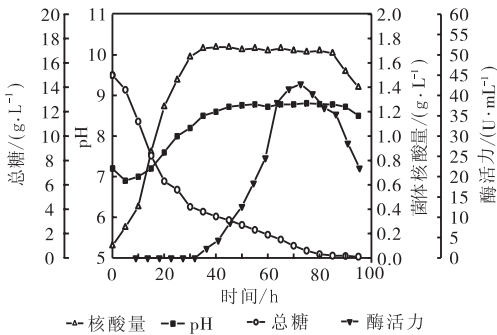


图 1 摇瓶发酵过程曲线

Fig.1 Time courses of fermentation process in shake flask

(下转第 42 页)