

芽孢杆菌 A-30产碱性 β -1,4-聚糖酶固体发酵研究

陈士成 曲音波 高培基

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要: 筛选得到一株高产 β -1,4-聚糖酶的耐碱性芽孢杆菌 A-30, 其固体发酵(Solid state fermentation SSF)时最适培养条件: 起始 pH 为 8.0、培养温度 32℃、10%(v/w)接种量, 含水量为 66.6%(v/w), 以 0.5% 的 NaNO_3 为无机氮源, 发酵 96h, 木聚糖酶活可达 6457IU/g (Dry bacterial bran), 纤维素酶活(CMCase)可以达到 18.66IU/g。氮源组成、温度、pH 及发酵时间等对 A-30 所产木聚糖酶和纤维素酶比例有较大影响。葡萄糖对 A-30 的阻遏效应不如在液体发酵(Submerged Fermentation SMF)中明显, 在 6% 的葡萄糖浓度下, A-30 仍能够产生 35% 以上的 β -1,4-聚糖酶。

关键词: 芽孢杆菌, 固体发酵, 木聚糖酶, 纤维素酶

中图分类号: Q93-936 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2000)03-0188-04

收稿日期: 1999-03-29, 修回日期: 1999-06-10

OPTIMIZATION OF CONDITIONS ON SOLID STATE FERMENTATION OF ALKALION β -1,4-GLYCANASE FROM *BACILLUS* SP. A-30

CHEN Shi-Cheng QU Yin-Bo GAO Pei-Ji

(State Key Laboratory of Microbial. Technology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract: A strain A-30 which produced extracellular alkali-tolerant β -1,4-glycanase was screened and identified as *Bacillus* sp.. Its solid state fermentation (SSF) conditions which were optimized were as follows: 30g fresh medium in flake, initial pH8.0, temperature 32°C, 10% (v/w) inoculum, water concentration 66.6%, and fermentation period 96h. The xylanase activity was as high as 6457IU/gDBB (dry bacterial bran) and CMCase activity amounted to 18.66IU/gDBB. Nitrogen sources, temperature, pH and culture time had great effects on the ratio of xylanase and CMCase. The repressive effect of glucose in SSF was not apparent as in Submerged Fermentation (SMF), when the concentration of glucose was so high as six percent, the amount of β -1,4-glycanase produced from A-30 could exceed 35%.

Key words: *Bacillus*, Solid state fermentation, Xylanase, CMCase

自然界广泛存在的纤维素材料主要成分是纤维素和半纤维素。其主要降解酶为可降解 β -1,4-糖苷键的 β -1,4-聚糖酶,包括纤维素酶和半纤维素酶。在造纸、纺织、饲料及食品等工业,有着广泛的应用前景,是生物技术重点研究的领域之一^[1]。

应用木聚糖酶处理麦草浆,可提高纸浆白度、降低脆性、提高滤水性。如果酶制剂含有适量的纤维素酶,则能显著改善纸浆的裂断长等强度性能,对纸浆改性起重要作用^[2]。这些应用是在碱性或中性条件下进行的。为使酶充分发挥作用,我国陈惠忠^[3]、刘月英^[4]、蔡敬民^[5]等相继开展了对真菌酸性 β -1,4-聚糖酶液体发酵条件的研究,但对 β -1,4-聚糖酶固体发酵的报道较少^[6,7],利用细菌进行 β -1,4-聚糖酶固体发酵还未见报道。固体发酵具有成本低、设备简单、产酶活力高、酶组分齐全、易推广的优点。本文进行了细菌 β -1,4-聚糖酶的固体发酵条件优化以及发酵条件对纤维素酶和木聚糖酶合成影响的研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

芽孢杆菌 A-30 (*Bacillus* sp. A-30)。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基: 葡萄糖 10g, NaCl 5g, 蛋白胨 5g, K_2HPO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, 琼脂粉 15g, 蒸馏水定容至 1L, pH8.5。

1.2.2 基础营养盐液: NaCl 5g, K_2HPO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, 蒸馏水定容至 1L, pH8.5。

1.2.3 固体发酵培养基: 在 300mL 三角瓶中加入 10.0g 麸皮和 20mL 的营养盐液。

1.2.4 种子培养基: 葡萄糖 10g, NaCl 5g, 蛋白胨 5g, K_2HPO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, 蒸馏水定容至 1L, pH8.5。

1.2.5 液体发酵培养基: 麸皮 50g, NaCl 5g, 蛋白胨 5g, K_2HPO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, 蒸馏水定容至 1L, pH8.5。

1.3 接种和培养条件

从斜面接一环菌苔至种子培养基, 32°C, 150r/min 培养 12h, 然后在每瓶固体培养基接种 10% (v/w) 种子培养液, 32°C 培养 72h, 间时拍打, 使其均匀生长。

1.4 粗酶液的制备

固体发酵培养基中加入 10 倍体积的

0.02mol/L, pH7.2 磷酸盐缓冲液, 摇匀, 室温抽提 1h, 5000r/min 离心, 上清液即为粗酶液。

1.5 分析测试方法

1.5.1 纤维素酶活测定方法: 用 0.02mol/L pH7.2 的磷酸盐缓冲液制备 1% 的 CMC-Na 溶液。加入适当稀释的酶液, 50℃ 反应 30min, 用 DNS 法测定 540nm 光吸收, 以葡萄糖做标准溶液, 以每分钟生成 1μmol 葡萄糖的酶量作为一个酶活单位。

1.5.2 木聚糖酶活测定方法: 用 0.02mol/L pH7.2 的磷酸盐缓冲液制备 1% 的木聚糖 (Oat spelts, Sigma Co.) 溶液。加入适当稀释的酶液, 50℃ 反应 30min, 用 DNS 法测定 540nm 光吸收, 以木糖做标准溶液, 以每分钟生成 1μmol

木糖的酶量作为一个酶活力单位。

1.5.3 粗酶液蛋白质浓度测定方法: 采用 Folin-酚比色测定方法, 以牛血清白蛋白为对照。

2 结果与讨论

2.1 培养基中氮源对产酶的影响

在固体发酵培养基中通过添加氮源的研究表明 (表 1), 尿素对产酶的影响不大, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NaNO_3 是良好的无机氮源, 0.5% 的 NaNO_3 对 A-30 的产酶能力有明显的促进, 纤维素酶活力提高了 24%, 木聚糖酶活力提高了 46%。有机氮源促进产酶的效果不如无机氮源, 酵母膏对产酶具有抑制作用。

表1 氮源对产酶的影响

氮源	浓度 (w/v)	木聚糖酶活力 (IU/g)	纤维素酶活力 (IU/g)
对照	0	3918	7.57
蛋白胨	0.5	3644	8.34
酵母膏	0.5	3800	7.23
脲	0.5	4462	8.20
硫酸铵	0.5	5166	9.11
硝酸钠	0.5	5740	9.39
脲-硝酸钠	0.25/0.25	5068	8.48
脲-硫酸铵	0.25/0.25	4832	8.89
脲-蛋白胨	0.25/0.25	4200	8.25

2.2 含水量对产酶的影响

表 2 结果表明, 最适的含水量为 65%。固体发酵涉及微生物在没有或几乎没有游离水的固体物上生长, 含水量影响到微生物生长所要求的渗透压, 培养基的含水量往往在整个发酵过程中起关键作用^[8]。另外, 在固体发酵中, 含水量对微生物生长和产酶的影响还由于引起了固体颗粒的物理性质^[9]。过高的含水量影响到了麸皮颗粒之间的松散性, 使麸皮成团, 影响到氧的传递和发酵热的散失, 导致酶活力下降, 而含水量过低会影响到营养基质的溶解和传递以及颗粒的润胀等条件, 影响到了对营养基质的利用。

2.3 接种量对产酶的影响

表 3 的结果表明采取 10% 的接种量较为合适, 接种量过低会使生长缓慢、发酵周期延长;

而过高的接种量会使生长速度, 曲温升高, 影响产酶。

表2 含水量对产酶的影响

酶活力 (IU/g)	含水量 (%)				
	50	60	65	70	75
木聚糖酶活力	2090	3760	4591	4570	3732
纤维素酶活力	5.59	7.06	7.30	4.32	4.65

表3 接种量对A-30菌株产酶的影响

接种量 (%)	5	10	20	30	40
木聚糖酶活力 (IU/g)	4335	4583	4378	4463	4310
产酶高峰期 (h)	108	96	96	96	96

2.4 温度对产酶的影响

实验表明, 32℃ 时培养有利于木聚糖酶的合成, 37℃ 有利于纤维素酶的合成。由于固态发酵单位体积的高基质浓度和高菌体浓度, 使单位体积微生物产热要比液体高的多。另外,

由于固体发酵含水量低,传热和传质比较困难,温度过高培养基失水比较严重,因而选定 32℃ 为合适的培养温度。

2.5 pH 对产酶的影响

在较低的 pH 环境有利于纤维素酶的合成,较高的 pH 有利于木聚糖酶的合成,这与 Baliley 报道 *Trichoderma reesei* 产酶的情况是一致的^[9]。当固体发酵 pH 为 7.0 时,纤维素酶的酶活力最高,可以达到 11.1IU/g,初始 pH 为 9.0 时木聚糖酶活可以达到 5221IU/g,这与 A-30 液体发酵 pH 对产酶的影响有所不同(液体发酵两酶合成的最适 pH 都为 8.0),这也提示我们,调节固体发酵的初始 pH 可以控制 A-30 发酵液两酶的比例。

2.6 葡萄糖在 A-30 固体发酵和液体发酵中对两酶合成的影响

一般说来,β-1,4-聚糖酶的合成是受诱导和阻遏两种机制调控的。在液体和固体两种发酵培养基中分别添加了 1%~6% 的葡萄糖,来检测对两酶合成的影响。图 1,2 表明,在液体发酵中,葡萄糖对 A-30 纤维素酶合成的阻遏效应较为明显,在 4% 的葡萄糖浓度下完全检测不到纤维素酶活,并在 6% 葡萄糖浓度下木聚糖酶也不合成。而在固体发酵,6% 的葡萄糖浓度下,仍有 50% 以上纤维素酶的酶活,35% 以上木聚糖酶的酶活。这说明在固体发酵方式中,A-30 对葡萄糖具有较强的抗阻遏能力。

2.7 A-30 固体发酵过程

在固体发酵培养基中添加了 0.5% 的 NaNO₃,研究了 A-30 在上述优化培养条件下的发酵过程。接种 12h 后,可以检测到两酶活力,残糖在 36h 达到高峰后迅速被利用,含量逐步降低,蛋白质含量随两酶的不断合成继续增加。纤维素酶在 84h 达到产酶高峰,木聚糖酶在 96h 达到高峰。与液体发酵相比^[11],两酶的产酶高峰滞后了 24h,这可能由于固体发酵中传质、传热比较困难以及积累的有害产物浓度过高等因素引起的。

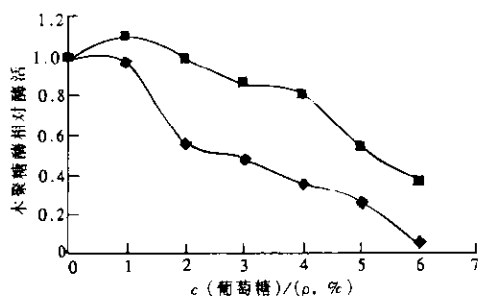


图1 葡萄糖对木聚糖酶合成的影响

—◆— 液体发酵, —■— 固体发酵

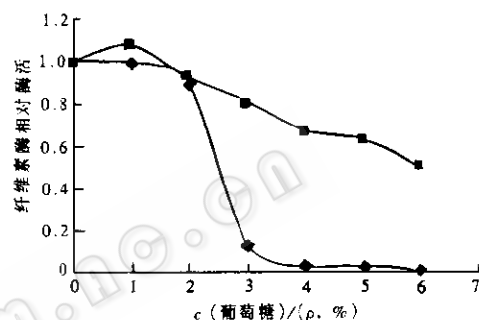


图2 葡萄糖对纤维素酶合成的影响

—◆— 液体发酵, —■— 固体发酵

参 考 文 献

- [1] Christov L P, Prior B A. ACS Symp. Ser., 1996, **655**:208~217.
- [2] Chen J, Jian Y, Qu Y *et al.* ACS Symp. Ser., 1996, **655**:308~316.
- [3] 陈惠忠,高培基,王祖农. 微生物学报,1990,30(5): 351~357.
- [4] 刘月英,郑忠辉,付欲晓等. 微生物学通报,1993,20(6):331~335.
- [5] 蔡敬民,张洁,于雷等. 生物学杂志,1996,2:14~16.
- [6] Deschamps F, Huet C. Appl Microbiol Biotechnol, 1985, **22**:177~180.
- [7] Mandels M, Weter J. Adv chem seres, 1969, **95**: 391~414
- [8] Bailey M J, Biely P, Poutanen K. J. Biotechnol, 1992, **23**:257~270.
- [9] Jiang Y, Qu Y, Chen S *et al.* 7th International conference on biotechnology in the pulp and paper industry. 1998, C:177~120. Canada.