

细菌产木聚糖酶发酵条件的研究*

白云玲 许正宏 孙 微 陶文沂

(无锡轻工大学生物工程学院 无锡 214036)

摘要: 研究了碳源、氮源以及其他因子对木聚糖酶高产菌 WLUN024 (*Pseudomonas* sp.) 产酶的影响, 结果表明在麸皮 6g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.8g/L, K_2HPO_4 0.4g/L, 接种量 5%~10% 的条件下, 37℃ 培养 36h, 其木聚糖酶活力可达 600IU/mL。同时研究了在较优条件下该菌的摇瓶产酶曲线。

关键词: 假单胞菌, 木聚糖酶, 发酵条件

中图分类号: Q939.97 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)04-0278-03

STUDY ON FERMENTATION CONDITIONS OF A BACTERIAL XYLANASEPRODUCER

BAI Yun-Ling XU Zheng-Hong SUN Wei TAO Wen-Yi

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry Wuxi 214036)

Abstract: Effects of carbon source, nitrogen source and other factors on xylanase production of *Pseudomonas* sp. WLUN024 were studied. The results showed the optimal conditions for enzyme formation were wheat bran 6%,

* 江苏省科委“九·五”攻关项目

收稿日期: 1999-03-22, 修回日期: 1999-06-11

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.8%, K_2HPO_4 0.4%, inoculum size 5%~10%. Its enzyme activity reached 600IU/mL under 37℃ in 36h. Course of its enzyme production was also investigated.

Key words: *Pseudomonas* sp., Xylanase, Fermentation conditions

木聚糖酶(E.C.3.2.1.8)是一类能特异降解木聚糖的酶类。近年来由于在工业中的广泛应用而受到科研工作者的普遍关注。文献表明^[1],木聚糖酶能由很多微生物所产生。国外的研究涉及细菌、霉菌、酵母等多种微生物,并已有用于造纸工业、淀粉加工业等方面的工业用酶。国内木聚糖酶的研究主要集中在霉菌木聚糖酶方面^[2~4],有关细菌木聚糖酶的研究较少。本文报道了一株木聚糖酶产生菌 *Pseudomonas* sp. WLUN024 摇瓶发酵条件的研究结果。

1 材料与方法

1.1 菌株

本研究室保藏的产木聚糖酶菌株 (*Pseudomonas* sp.) WLUN024。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基: 葡萄糖 1g 蛋白胨 0.5g, NaCl 0.5g, 定容于 1L 水中, 0.55×10^5 Pa 灭菌 15min。

1.2.2 基础产酶培养基: 麸皮 4g, 蛋白胨 0.5g, K_2HPO_4 0.5g, 定容于 1L 水中, pH8.5, 1×10^5 Pa 灭菌 20min, 条件实验时变动该培养基的相应组分。

1.3 蔗渣半纤维素的制备

见参考文献 [5]。

1.4 摇瓶培养条件

本文如无特别说明,皆采取 250mL 三角瓶装液 30mL, 旋转式摇瓶柜 220r/min, 37℃ 培养。

1.5 木聚糖酶的测定方法

根据文献 [6] 略做改良。

发酵液经离心得到粗酶液,用 pH7.6, 0.04 mol/L 巴比妥钠缓冲液稀释适当的倍数。取稀释酶液 0.5mL 加入到预热的 1mL 用 pH7.6, 0.04 mol/L 巴比妥钠缓冲液配制的 1% 的 Oat spelt 木聚糖 (Sigma 公司产品) 溶液中, 50℃ 保温反

应 30min 后,用 DNS 法测定还原糖 (以木糖为标准)。酶活单位定义为上述条件下,每分钟释放 1μmol 木糖的酶量。

2 结果与讨论

2.1 WLUN024 菌的生长曲线

采用种子培养基测定 WLUN024 的生长曲线,结果如图 1: WLUN024 培养时间达 12h 时,该菌生长已进入对数生长中后期,种子就采用 12h 左右的培养物。同时可以看出,采用培养液 OD_{600} 来表征该菌的生长情况,与实际活菌计数结果有较好的相关性。

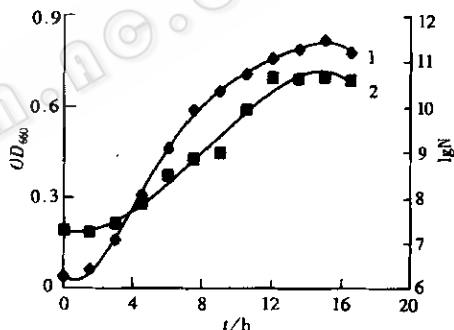


图1 WLUN024生长曲线
1 OD_{600} , 2 lgN

2.2 WLUN024 的产酶条件

2.2.1 碳源的影响: 木聚糖酶的产生多为诱导型,一般诱导物为木糖苷类物质。分别采用自制的蔗渣半纤维素、麸皮作为唯一碳源替代基础产酶培养基中的碳源,观察其不同浓度对产酶的影响。结果表明,该菌在自制蔗渣半纤维素或麸皮为唯一碳源时可分泌大量的木聚糖酶。尤其在以麸皮为唯一碳源时,随着麸皮浓度的增加,该菌的产酶能力增加十几倍。当麸皮浓度达 6%~7% 时,产酶达到相对稳定的水平。这可能是麸皮不仅提供了菌体生长所需的碳源以及酶合成的诱导物,同时还存在有促进产酶的一些成分。

2.2.2 氮源对产酶的影响: 分别考察不同的氮

源对 WLUN024 产酶的影响,结果发现该菌在以硫酸铵作为唯一氮源时酶合成最好。添加不同浓度的硫酸铵,考察其对产酶的影响,结果如图 2:

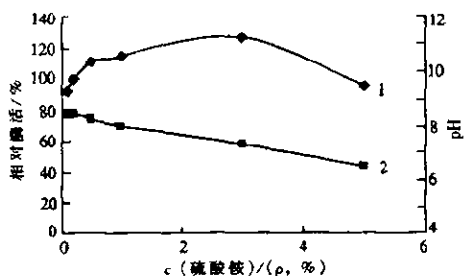


图2 不同硫酸铵浓度对产酶的影响

1. 相对酶活, 2. pH

由图 2 可以看出,硫酸铵浓度在 0.8% 以下时,该菌产酶能力随其浓度增加而迅速增加。当硫酸铵浓度在 0.8%~3% 时,这种上升趋势趋于平缓。当硫酸铵浓度超过 3% 时,浓度的增加反而抑制酶的合成。实验同时发现随着硫酸铵浓度的增加,发酵液的终了 pH 值呈持续下降趋势,这可能是过高浓度硫酸铵抑制酶合成的原因之一。

2.2.3 磷源浓度对产酶的影响:分别添加不同浓度的磷酸氢二钾,观察其对产酶的影响,结果表明磷源浓度对产酶的影响并不显著,实验取其浓度为 0.4%。

2.2.4 金属离子对产酶的影响:分别按 5mmol/L 的浓度添加不同的金属离子于基础产酶培养基中,结果发现 Ca^{++} 、 Mg^{++} 、 Ba^{++} 等离子对该菌的产酶无任何影响, Zn^{++} 、 Co^{++} 、 Cu^{++} 、 Fe^{+++} 等离子对产酶有很大的抑制作用。

2.2.5 摇瓶装液量及接种量对产酶的影响:考察不同的装液量对该菌产酶的影响,结果表明 250mL 三角瓶装 20mL 发酵培养基对其产酶最好。不同接种量实验结果表明 5%~10% 的接种量对产酶有利。

2.2.6 WLUN024 的较优化摇瓶发酵条件实验结果:根据上述实验结果,综合考虑生产成本等实际情况,得到如下较优化的摇瓶产酶条件:麸皮 6g/L,硫酸铵 0.8g/L,磷酸氢二钾 0.4g/L,装液量 20mL/250mL 三角瓶,接种量 5%~10%。采用上述条件,摇瓶考察 WLUN024 的产酶情况,WLUN024 在上述优化发酵条件下,36h 左右产酶达 600IU/mL,比优化前提高了约 70%。分析产酶过程曲线同时可以看出该菌产酶与菌体生长基本同步,是典型的 I 型发酵。这同时从另一个侧面验证了该菌产木聚糖酶属于诱导型。这是因为麸皮中的木聚糖不能直接进入细菌胞内,而是通过降解的片段结合细胞表面进入胞内,启动转录加强酶的合成^[7]。种子培养物刚接入发酵培养基中时,能组成型的分泌少量的木聚糖酶,从而降解培养基中的木聚糖,降解片段一方面提供启动菌体增殖所需的营养物质,另一方面又诱导菌体合成更多的木聚糖酶,从而降解生成更多的木聚糖降解片段,而这又提供了更多菌体增殖所需的营养物质和木聚糖酶合成的诱导物。因而在整个发酵过程中,还原糖的积累量在初期(12h 左右)短暂升高后很快下降并趋于平衡。

参 考 文 献

- [1] Bastawde K B. World J Microbiol Biotechnol, 1992, 8:353~368.
- [2] 陈惠忠,高培基,王祖农. 微生物学报,1990,30(5): 351~357.
- [3] 蔡敏民,吴克,张洁等. 工业微生物,1996,26(2): 17~20.
- [4] 曾宇成等. 微生物学报,1987,27(4): 343~349.
- [5] J. D. Breccia, G. R. Castro, M. D. Baigori et al. J. Appl. Bacteriol. 1995, 78:469~472.
- [6] Bailey M J, Biely P, Poutanen K. J of Biotechnol., 1992, 23:257~270.
- [7] 刘瑞田,曲音波. 工业微生物,1998,28(3): 38~42.