

碱性 β -甘露聚糖酶发酵工艺的研究

马延和 周培瑾 田新玉 王大珍

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 本文报道碱性 β -甘露聚糖酶 16L 罐的发酵工艺。在发酵过程中, 通气量影响菌体生长, 最适通气量为 1:0.75—1:1.0 vvm。搅拌速度影响菌体产酶, 最适搅拌速度为 500r/min。碳源为魔芋粉, 其适宜浓度为 2%。发酵周期为 40 小时。发酵液中 β -甘露聚糖酶的酶活力达 300u/ml, 比摇床上培养提高了 2 倍。

关键词 芽孢杆菌; 碱性 β -甘露聚糖酶; 发酵工艺

近年来, 微生物的 β -甘露聚糖酶已逐渐引起了人们的重视^[1,2], 特别是该酶对一些食用纤维的水解产物可有效地促进肠道内双歧杆菌 (*Bifidobacteria*) 的增殖^[3], 为该酶在食品和医药方面的应用提供了广阔的前景。目前, 国外正在继续分离高产菌株, 积极开发这一工业新酶源^[4,5], 但未见发酵工艺研究的报道, 在国内尚属空白。我们从内蒙碱湖中分离到一株碱性 β -甘露聚糖酶的高产菌株, 并确定了其最佳发酵条件(另作报道)。本文报道该酶 16L 罐发酵工艺的研究结果。

材料和方法

(一) 菌种

嗜碱菌株 N16-5 分离自内蒙碱湖的泥样, 经鉴定为芽孢杆菌 (*Bacillus*) 属的一新种, 根据其产生 β -甘露聚糖酶的特征, 暂定名为产甘露聚糖酶芽孢杆菌 (*B. mannanasogenes* n. sp.) (待发表)。

(二) 培养基

1. 种子培养基 (g/L): 可溶性淀粉 5.0, 酵母膏 6.0, K_2HPO_4 1.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3, NaCl 80.0, Na_2CO_3 10.0 及适量有机氮。

2. 发酵培养基: 以魔芋粉 10.0g/L 代替可溶性淀粉, 其它成份同种子培养基。

(三) 培养条件

1. 种子: 将斜面种子接种于含 200ml 液

体种子培养基的 500ml 三角瓶中, 37℃ 摇床 (220r/min) 培养 24 小时。

2. 发酵条件: 16L 罐中装 10L 培养基, 121℃ 实罐灭菌 30min。发酵温度 35℃, 罐压 0.5kg/cm², 接种量 4%(V/V), 加适量消泡剂。

(四) 仪器与设备

1. SF-116 发酵罐 (New Brunswick Scientific, USA)。

2. 国产 721 分光光度计。

3. 紫外分光光度计 (DU-7 Beckman USA)。

(五) 分析方法

1. 酶活力的测定: 以 0.5% 的槐豆胶 (Locust bean gum) (Sigma) 作底物(用 pH10.0, 0.05 mol/L gly-NaOH 缓冲液配制), 以 Akino 等^[6]的方法进行酶活力测定。一个酶活力单位定为每分钟水解出相当于 1 μ mol 甘露糖的还原糖的量。

2. 菌体生长测定: 以 8% NaCl 水溶液作适当稀释, 用 721 分光光度计在 660nm 下, 测定光密度值。

3. 总糖的测定: 硫酸-酚法^[6]。

4. 还原糖的测定: Somogyi-Nelson 方法^[7,8]。

5. 谷氨酸钠的测定: 铜复合物法测氨基酸^[9]。

6. 溶氧的测定: 用原电池 900 型氧电极 (New Brunswick) 测相对溶氧。

(六) 粗酶的提取

发酵液离心 ($10000 \times g, 10\text{min}$) 除细胞, 上清液中加入一定饱和度的硫酸铵, 4°C 静置过夜, 离心 ($10000 \times g, 20\text{min}$), 将沉淀部分溶于 $\text{pH}10.0, 0.01\text{mol/L}$ 的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲液中并于这一缓冲液中透析 24 小时 (4°C), 即为 β -甘露聚糖酶的粗酶液。

结 果

(一) 通气量对发酵的影响

在选定的发酵条件下, 将搅拌速度固定在

600r/min 分别以 1:1.0, 1:0.75、1:0.5 和 1:0.25vvm 的通气量进行发酵试验, 结果如图 1, 通气量影响菌体生长, 通气量低时, 菌体生长慢, 延迟期长, 当通气量为 1:1.0vvm 时, 延迟期为 12h, 而在 1:0.25vvm 时为 20h (图 1a)。由图 1b 可见, 菌体产酶受生长的影响, 低通气量时, 产酶量稍低。图 1c 表明, 由于对生长的影响, 通气量与发酵液中的残余总糖成反比。由图 1d 可认为通气量对溶氧水平影响不大。此研究结果表明, 通气量以 1:0.75—1:1.0vvm 为宜, 此时菌体生长好, 产酶量较多, 底物利用也

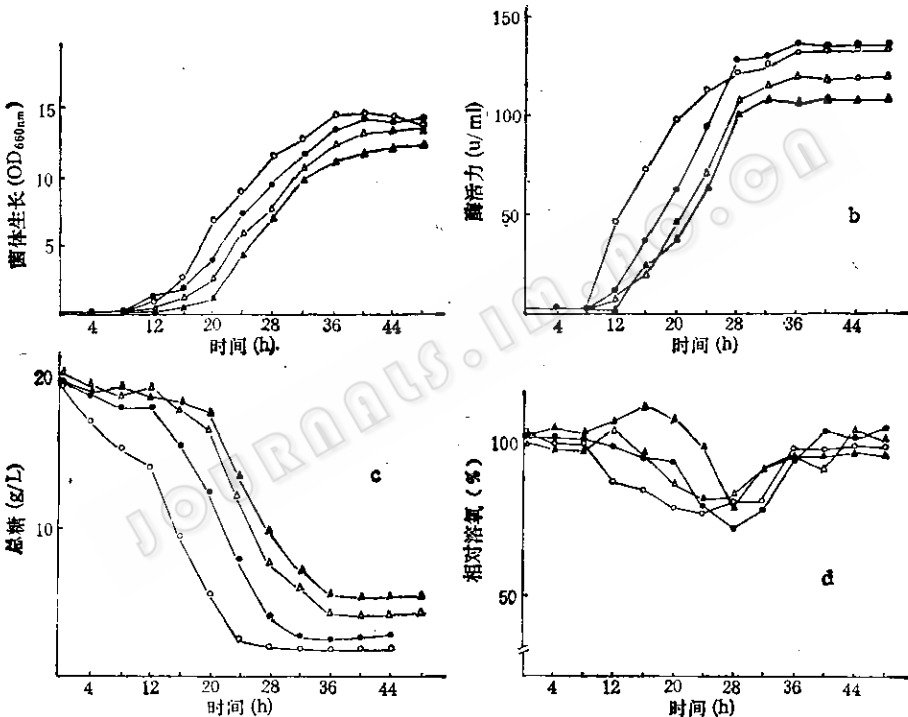


图 1 通气量与发酵的关系

a. 菌体生长 b. 酶活力 c. 总糖 d. 相对溶氧水平

○—○ 1:1.0vvm △—△ 1:0.75vvm ●—● 1:0.5vvm ▲—▲ 1:0.25vvm

较完全。

(二) 搅拌速度对发酵的影响

在通气量为 1:1.0vvm 时, 分别以 400、500、600 和 800r/min 的搅拌速度进行发酵试验, 结果表明, 搅拌速度高时, 菌体生长快, 菌量多, 但产酶并不高。搅拌速度低时, 菌体生长稍弱, 而产酶较高。在所试范围内, 搅拌速度不影响碳源的消耗, 但对溶氧水平影响较大, 如 800 r/min 时, 发酵过程中相对溶氧水平基本不下

降, 而 400r/min 时, 相对溶氧可降到最低点, 在发酵后期也不能回升。以上结果表明, 对产酶而言, 搅拌速度以 400—500r/min 为宜 (图 2)。

(三) 发酵过程

在上述发酵条件下, 通气量 1:1.0vvm、搅拌速度为 500r/min 时进行罐上发酵。发酵过程如图 3, 可见发酵期间菌体随着生长而产酶, 在生长的稳定期, 发酵液的酶活力最高。在生

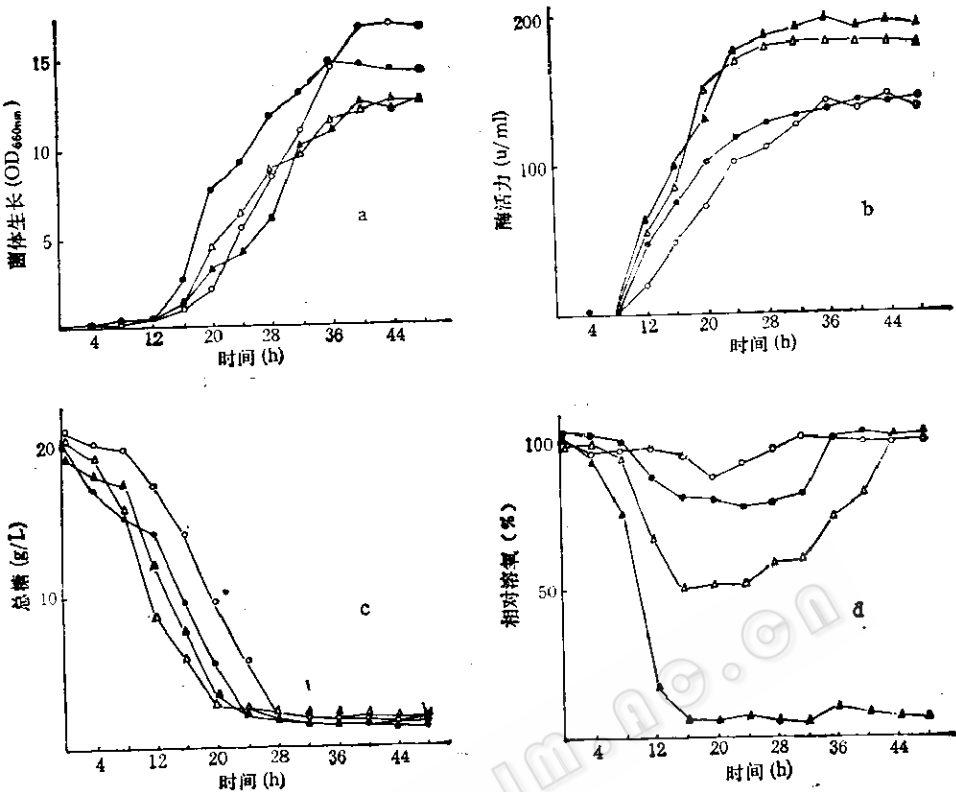


图 2 搅拌速度与发酵的关系

a. 菌体生长 b. 酶活力 c. 总糖 d. 相对溶氧水平
○—○ 800 r/min ●—● 600r/min
△—△ 500 r/min ▲—▲ 400 r/min

长的延迟期初期,还原糖降低,然后又升高,进入对数生长期后,还原糖与总糖及氮源(以谷氨酸钠计)都迅速下降。生长初期,pH 下降,在对数生长期达到最低(9.0 左右),然后又逐渐回升。以1%的魔芋粉为碳源时,在对数生长期,菌体的产酶即进入一平台期,发酵液中的总糖也降到了最低点,发酵终了,酶活力为 180u/ml (图 3a)。当提高底物浓度至 2% 时,菌体的生长与产酶都相应地提高,碳源及氮源的消耗也较完全,发酵终了,酶活力达 300u/ml (图

3b)。

(四) 粗酶的提取

发酵液离心去细胞后,分别加入不同饱和度的硫酸铵,所得粗酶稀释至原体积,测定酶活,计算其收率。结果表明,该酶需较高饱和度的硫酸铵才能沉淀完全(表 1)。此外,当通气量低时,发酵液中加硫酸形成的絮状沉淀不易收集,即使 15000×g 离心 30min,仍不能使之沉积,而通气量较大时,10000×g 离心 20min 即可得到粗酶沉淀。

表 1 不同饱和度硫酸中粗酶的收率

硫酸饱和度(%)	60	70	80	85	对照(原发酵液)
酶活力 (u/ml)	61	117	243	263	280
收率 (%)	22	42	87	94	100

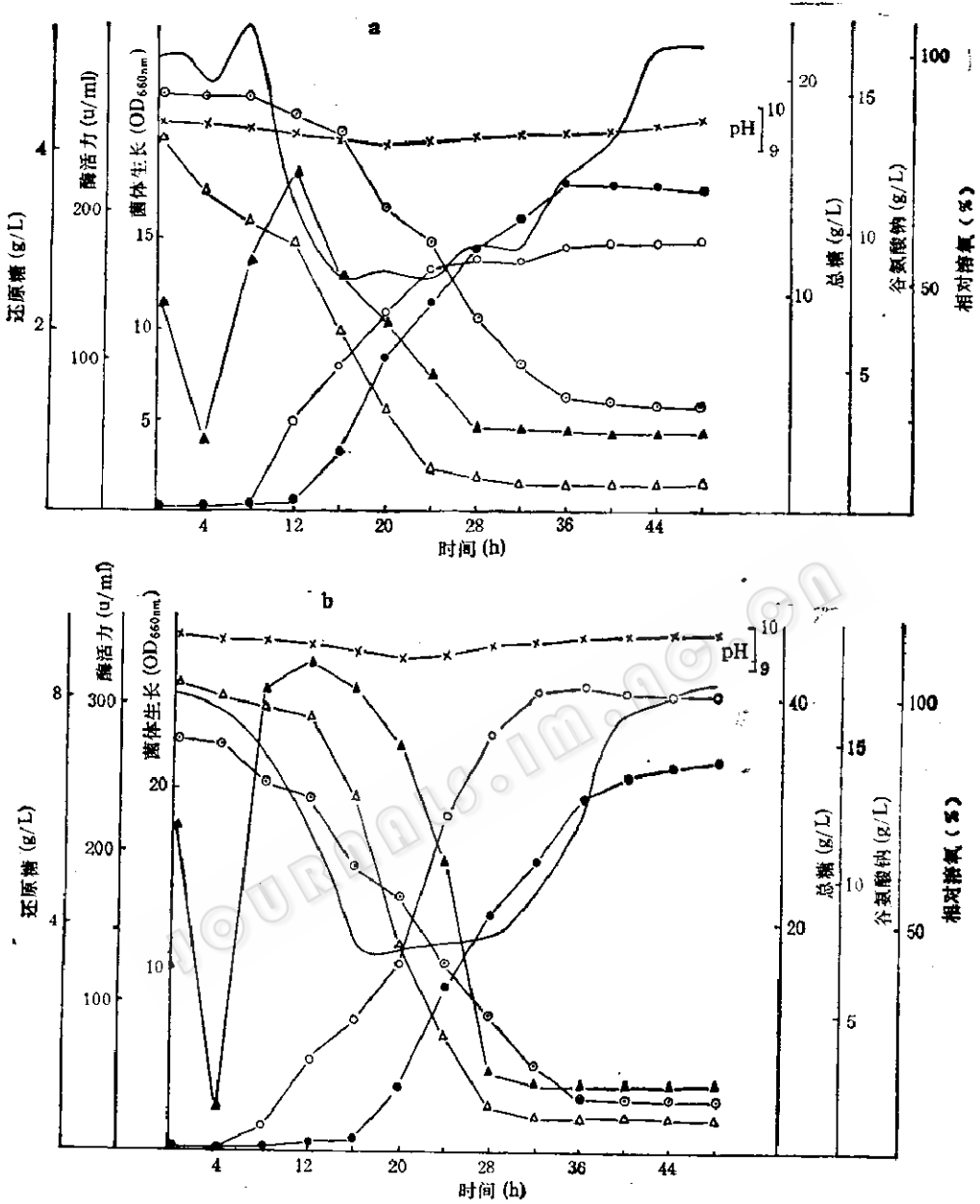


图3 酶的发酵过程

a. 1% 的魔芋粉, b. 2% 的魔芋粉

○—○ 酶活力, ●—● 菌体生长, △—△ 总糖, ▲—▲ 还原糖
○—○ 氮源, ×—× pH, - 相对溶氧

讨 论

在嗜碱菌株 N16-5 产生 β -甘露聚糖酶的过程中,通气量影响菌体的生长,对产酶的影响也是通过影响生长而表现出来。研究中发现,通气量对溶氧水平影响不大,而搅拌速度与溶氧水平关系密切,这与文献报道^[10]一致。溶氧

水平可能直接影响菌体产酶,高溶氧时,菌体生长好,但不利于产酶;低溶氧时,菌体生长差而利于产酶。另外,搅拌速度还直接影响底物的混和效果,从而影响发酵,特别是以魔芋粉作碳源,培养基较粘稠,底物的混和程度尤为重要。以 1% 的魔芋粉为底物时,在发酵后期表现为底物不足,2% 的浓度较适宜。另外,低通气量

时, 菌体生长不好, 底物剩余量大, 这可能是加硫酸铵所形成的粗酶沉淀不易收集的主要原因。

在适宜条件下, 16L 罐上发酵 40h, 酶活力达 300u/ml, 为摇瓶中的 3 倍, 也高于目前国外报道的最高酶活力水平^[4], 而发酵周期仅为国外的 1/3。另外, 菌株 N16-5 为专性嗜碱、兼性嗜盐菌, 发酵过程中不易被污染, 在所试条件下, 罐上发酵成功率为 100%, 这对今后的工业化生产非常有利。

参 考 文 献

1. Ward O P et al.: *Cris. Rev. Biotechnol.*, 8: 237—275,

1989.

2. Ratto M et al.: *Biotechnol. Letters*, 10: 661—664, 1988.
3. Kobayashi Y et al.: "Intestinal Flora and Dietary Factors", Proceedings of the 4th RIKEN Symposium on Intestinal Flora, Tokyo, 1983, ed. by T mitsuoka, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp. 69—90, 1984.
4. Araujo A et al.: *J. Appl. Bacteriol.*, 68: 253—261, 1990.
5. Akino T et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26: 323—327, 1987.
6. Dubois M et al.: *Anal. Chem.*, 28: 350—356, 1959.
7. Somogyi M: *J. Biol. Chem.*, 160: 61—68, 1945.
8. Nelson N: *J. Biol. Chem.*, 153: 375—380, 1944.
9. Spies JR: *J. Biol. Chem.*, 195: 62—64, 1952.
10. Wang DIC et al.: *Fermentation and Enzyme Technology*, ch. 9, John Wiley and sons, New york, 1979.
11. Kusakaba I et al.: *Methods in Enzymology*, 160: 611—614, 1988.

STUDY ON THE TECHNOLOGY OF ALKALINE β -MANNANASE FERMENTATION

Ma Yanhe Zhou Peijin Tian Xinyu Wang Dazhen
(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

The fermentation of β -mannanase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. has been studied in 16L tank. The optimum ventilation quantity and agitation speed were 1:1 vvm and 500r/min respectively. The fermentation cycle was 40 h and the highest β -mannanase activity was 300 u/ml.

Key words: *Bacillus* sp.; β -Mannanase; Fermentation