文章编号：1009－038X(2003)04－0076－03

提高耐高温 α-淀粉酶发酵液酶活力的方法

林 剑
(烟台大学 生物工程系，山东 烟台 264005)

摘　要：提出了提高耐高温 α-淀粉酶发酵水平的方法，并在容积为 30 L 的机械搅拌式生物反应器上进行了较系统的研究. 结果表明 发酵过程中向发酵罐内流加一定量的谷氨酸水溶液，有利于对数生长期菌体的增殖，提高了发酵液中菌体的浓度数，同时也满足了菌体在酶的合成期对 α-氨基氮代谢的需求，进而明显地提高发酵液的酶活力.

关键词：耐高温 α-淀粉酶；流加；α-氨基氮；谷氨酸
中图分类号：Q 55　　**文献标识码**：A

The Method of Improving the Activity of Thermostable α-Amylase Broth

LIN Jian
(Department of Biological Engineering, YanTai University, Yantai 264005, China)

Abstract: In this paper, the method of improving the activity of thermostable α-amylase in the fermentation was proposed and tested in a 30 L fermentator. The results showed that feeding glutamate solution to the fermentor could increase the concentration of cell and meet the metabolic requirement of the α-amino acid. Therefore, the activity of broth was obviously increased.

Key words: thermostable α-Amylase; feed; α-amino acid; glutamic acid

耐高温 α-淀粉酶是目前生物工业生产领域使用较多的一种酶，它是由地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)生产的一种淀粉水解酶类，由于其具有较高的耐热性，而且可以把淀粉的 α-1，4 葡萄糖苷键任意切割成短链糊精[1]，因而得到了广泛地应用. 特别是近几年来，随着双酶法制糖工艺在粮食深加工领域的成功应用，该工艺给发酵工业诸如味精工业、酵母工业、柠檬酸工业、抗菌素工业等带来的巨大的经济效益，使得耐高温 α-淀粉酶有着良好的发展前景. 耐高温 α-淀粉酶是近 10 年来在我国市场上出现的新型酶制剂，尽管目前国内的市场需求很大，但是对于耐高温 α-淀粉酶发酵工艺的研究报道却很少. 由地衣芽孢杆菌生产的耐高温 α-淀粉酶通常有固体发酵和液体深层发酵两种生产方法[2]，我国目前耐高温 α-淀粉酶都是采用液体深层发酵法由地衣芽孢杆菌生产的. 在对耐高温 α-淀粉酶在发酵过程中各种参数的变化规律进行初步研究的基础上[3]，提出了进一步提高耐高温 α-淀粉酶发酵水平的方法，并在总容积为 30 L 的全自动通风搅拌式生物反应器上进行了较全面的研究，为进一步提高耐高温 α-淀粉酶的发酵生产水平提供了理论基础.

收稿日期：2003－02－28； 修回日期：2003－05－13.
作者简介：林剑(1963－)，男，山东烟台人，副教授，工学学士.

万方数据

1　材料与方法

1.1　供试菌种

地衣芽孢杆菌(*Bac. licheniformis*),HY-3 菌株,由山东某酶制剂厂提供.

1.2　培养基及培养条件

1.2.1　发酵培养基(组分 g/dL):淀粉 240,豆粕 25,磷酸氢二钠 14,磷酸二氢钠 6,柠檬酸钠 2,有机氮2.5,硫酸铵 5,氯化钙 0.45. 豆粕浸出液 0.5.

1.2.2　发酵条件　发酵温度 41～42 ℃,搅拌速率 800 r/min,pH 值 6.4～7.5,使用工业氨水调控.通气比 0.5～1.1 L/(L·min),发酵周期 90 h 左右.

1.3　生物反应器及内部条件

MSJ-U3 型生物反应器:B. E. MARUBISHICO. LTD.,JAPAN,总容积 30 L,工作容积 24 L,内径 D 为 0.30 m,配备两个搅拌涡轮 T/D 为 0.5.

1.4　检测分析方法

1.4.1　耐高温 α-淀粉酶酶活力的测定　采用 QB/T2306-97 目视比色法.

1.4.2　菌体形态的检查　营养琼脂平板培养及结晶紫染色观察[4].

1.4.3　pH 值检测及控制　耐高温 pH 值玻璃电极在线检测,并配有 MDIAC-C_1 生物过程控制器,由 0.1 mol/L 的工业硫酸和体积分数为 10% 的工业氨水自动调控.

1.4.4　溶氧百分数 DO 值的检测　由原电池型溶氧电极放在两个涡轮之间在线检测.

1.4.5　还原糖质量浓度的测定　采用廉·爱农法[5].

1.4.6　α-氨基氮质量浓度的测定　甲醛滴定法[5].

1.4.7　发酵液菌体浓度的测定　血球计数板法[4].

2　结果与讨论

2.1　耐高温 α-淀粉酶发酵过程中各种参数的变化

对发酵培养基进行耐高温 α-淀粉酶的发酵,在通气比为 0.909 L/(L·min)、搅拌转速为 800 r/min 的条件下,其发酵过程中溶氧百分数、酶活力等参数的变化规律见图 1,2.

图 1 表明了耐高温 α-淀粉酶发酵过程中各参数随时间的变化.其中还原糖的质量浓度由 96 g/L 下降到 9.9 g/L,甲醛氮的质量浓度为 1.92～5.87 g/L、菌体浓度为 0～1.53×10^8 个/mL,酶活力为 0～5.28×10^2 U/mL.图 2 表示了耐高温 α-淀粉酶发酵过程中溶氧百分数的变化.

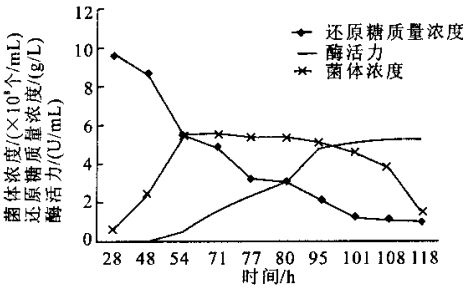


图 1　发酵过程中各种参数的变化

Fig. 1　Parameters' changes in the fermentation

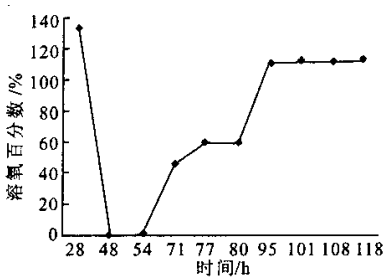


图 2　发酵过程中溶氧百分数的变化

Fig. 2　Changes of dissoloved oxygen in the fermentation

由图 1,2 可以看出:

1)地衣芽孢杆菌 HM-3 菌株是在完成对数生长期进入停止期时,开始合成、积累并分泌耐高温 α-淀粉酶的,此时发酵液的溶氧百分数由原来的 0% 开始回升,显微镜染色观察表明:菌体形态由原来对数生长期的粗、短型变成了产物积累时期的细、长型,此时的 pH 值由于酸性产物的积累仍然呈下降的趋势,需要不断的向发酵液中流加氨水以控制其 pH 值在 6.4 以上.显然,此时菌体完成了由生长型到产物积累型的转变,表现在外观上就是菌体形态的变化,而本质的原因则是由于菌体的代谢途径发生了转变——转向了产物的合成上.上述这些现象是符合耐高温 α-淀粉酶作为微生物的次级代谢产物的代谢规律的[6].此时如果改变某些发酵条件(例如向发酵罐中流加谷氨酸水溶液),则会导致发酵逆转[7],使菌体由原来的产物积累型转回到了生长型,从而停止了酶的合成与积累,菌体形态也发生了变化.

2)菌体在对数生长期是强烈需氧的,此时的发酵液的溶氧百分数成了微生物生长和繁殖的限制性因子.由于氧的供给影响了菌体的正常代谢,其主要表现是还原糖的代谢速率明显下降,进而可能影响到菌体的浓度和最后的发酵液的酶活力.从这个意义上讲,提高菌体对数生长期的溶氧百分数是

万方数据

非常重要的. 但是在发酵中后期,菌体对溶氧百分数的要求并不高,特别是发酵后期,过高的溶氧百分数可能导致发酵液的 pH 值升高速度过快,相对缩短了产酶期,反而不利于提高发酵液耐高温 α-淀粉酶的酶活力.

2.2 发酵过程中流加谷氨酸(GA)溶液对耐高温 α-淀粉酶发酵的影响

在培养基成分相同、发酵工艺条件相同的条件下,当菌体进入对数生长期、发酵液的溶氧百分数下降到 0%时,向发酵罐中流加 2 g/dL 的谷氨酸水溶液,其发酵过程中各参数随时间的变化规律见图 3,4.

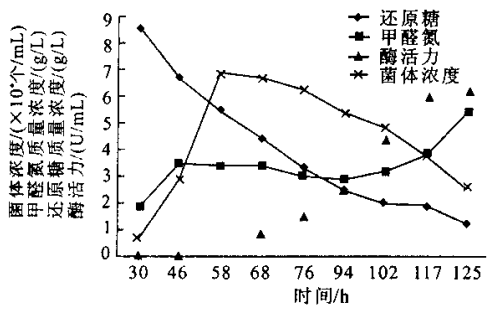


图 3 补加 GA 后发酵过程中各参数的变化

Fig. 3 Parameters' changes after feeding glutamic acid

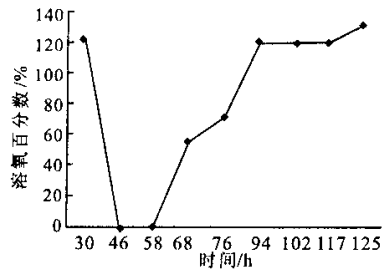


图 4 发酵过程中溶氧百分数的变化

Fig. 4 Changes of dissoloved oxygen in the fermentation

可以看出:

1)在菌体对数生长期加入一定量的谷氨酸(GA),有利于菌体细胞的增殖,最大的菌体浓度可以达到 6.72×10^8 个/mL,明显高于没有流加 GA 的发酵液的菌体浓度(见图 1),其发酵液最后的酶活力可以达到6 200 U/mL,高于不加 GA 的发酵液酶活力近 20%. 这主要是因为谷氨酸作为一种氨基酸,不但可以补充微生物生长的氮源,其脱氨或转氨后生成的 α-酮戊二酸还可以作为碳源直接进入 TCA 循环[8,9]. α-酮戊二酸对微生物生长的这种促进作用在苏云金芽孢杆菌的深层培养中也同样存在[9].

2)对比图 1,3 中的 α-氨基氮质量浓度随时间的变化曲线可以发现,在菌体对数生长期加入 GA 后,其 α-氨基氮质量浓度的下降明显减缓. 实际上发酵过程中 α-氨基氮质量浓度的变化是受到许多因素影响的,一方面是菌体分泌的胞外蛋白酶对培养基中的蛋白质的分解而产生的部分 α-氨基酸,另一方面是菌体的增殖对 α-氨基氮的消耗. 在对数生长期和产酶高峰期,α-氨基氮的消耗速率显然大于蛋白质的分解速率,因此在这一阶段,α-氨基氮质量浓度呈下降趋势;而在发酵后期,由于死亡的菌体细胞而导致的菌体自溶可以产生一定量的 α-氨基氮,加之 α-氨基氮消耗速率的下降,因此在这一阶段,α-氨基氮质量浓度的变化呈上升趋势. 在发酵过程中加入谷氨酸后,减缓了菌体在对数生长期对 α-氨基氮的消耗,从而保证了产酶期菌体对 α-氨基氮的需求,这有利于耐高温 α-淀粉酶的生物合成,最后发酵液酶活力明显地提高可以充分说明这一点.

3)在菌体对数生长期加入一定量的 GA,对耐高温 α-淀粉酶的生成速率也有一定的影响. 前者(不流加 GA)产酶期明显比后者要早,但最后的发酵液的酶活力却少于后者,显然发酵过程中的产酶速率较后者要低. 这一方面是由于前者的菌体浓度低,在相同的条件下,分泌到发酵液中的酶的数量就少. 另一方面,通过比较图 1,3 中的还原糖质量浓度的变化曲线可以发现,加入 GA 后,对糖的代谢有明显的促进作用,这种促进作用进而可能影响到了后期 α-淀粉酶的合成、分泌与积累.

3 结 论

1) 地衣芽孢杆菌 HM-1 菌株在发酵生产耐高温 α-淀粉酶的发酵过程中,菌体明显存在两种状态即:生长型和产物积累型,菌体由生长型顺利转变成产物积累型是耐高温 α-淀粉酶发酵成功的关键;在产物合成期,严格控制各种工艺条件,防止发生发酵逆转[7]是发酵成功的关键.

2) 耐高温 α-淀粉酶在发酵过程中对氧的需求有明显的阶段性,在菌体的对数生长期发酵液中溶氧的浓度成为限制性因子,而在酶的合成期菌体对氧的需求不高,特别是发酵后期,适当地降低氧的浓度可以减缓 pH 值的升高,延长酶合成的时间,有利于耐高温 α-淀粉酶活力的提高.

3) 发酵过程中,在菌体的对数生长期向反应器内中流加一定量的谷氨酸水溶液,对于耐高温 α-淀粉酶产生菌的生长以及酶的合成与分泌有明显地促进作用,酶的生成速率也有一定的提高;在发酵

万方数据

周期相同的条件下,发酵液的酶活力可以提高 20% 左右.

参考文献:

[1] Marchal L M, Jonkers J, Franke G TH. The effect of process conditions on α-amylolytic hydrolysis of amylopectin potato starch :an experimental design approach[J]. **Biotechnology and Engineering**, 1999, 63(3) :348 - 357.

[2] Ramesh M V, Lonsane B K. Characteristic and novel feature of thermostable α-amylase produced by *Bacillus licheniformis* M27 under solid-state fermentation[J]. **Starch**, 1990, 42 :233 - 238.

[3] 林剑,郑舒文. 溶氧等参数对耐高温 α-淀粉酶发酵的影响[J]. 食品科学,2002,(4) :54 - 57.

[4] 钱存柔. 微生物实验[M]. 北京 :北京大学出版社, 1984. 32 - 109.

[5] 天津轻工业学院,无锡轻工业学院,大连轻工业学院. 工业发酵分析[M]. 北京 :中国轻工业出版社,1983. 5 - 62.

[6] 布林顿·麦·米勒. 工业微生物学[M]. 居乃琥,朱庆裴译. 北京 :中国轻工业出版社,1986. 106 - 199.

[7] 刘如林. 微生物工程概论[M]. 天津 :南开大学出版社,1995. 225 - 228.

[8] 大连轻工业学院. 生物化学[M]. 北京 :中国轻工业出版社,1987. 89 - 115.

[9] 郭尽力,任万忠,林剑,等. 谷氨酸对苏云金芽孢杆菌生长及伴胞晶体的影响[J]. 微生物学杂志,2001,(3) :45 - 49.

(责任编辑 :李春丽)

(上接第 71 页)

3 结 论

DA201-C 大孔吸附树脂对 CNPP 组分的吸附性强,CNPP 组分的回收率均在 95% 左右,而对无机盐离子基本不吸附,对 CNPP 组分的脱盐率均在 97% 以上. 此外,DA201-C 大孔吸附树脂对 CNPP 组分可以进行分级. 被分离出的各组分中活性肽的氨基酸组成与疏水性的关系有待于进一步验证.

参考文献:

[1] 张虹,柳正良,王洪泉. 大孔吸附树脂在药学领域的应用[J]. 中国医药工业杂志,2001,32(1) :41 - 44.

[2] 宓晓黎,杨焱,成恒嵩,等. 大孔吸附树脂技术应用于复方中成药制备工艺的研究[J]. 离子交换与吸附,1997,13(6) :594 - 598.

[3] 郭本恒. 乳品化学[M]. 北京 :中国轻工业出版社, 2001. 138 - 142.

[4] Chang K J, Killian A, Hazum E, *et al*. Morphiceptin (NH4-Tyr-Pro-Phe-Pro-CONH2) : A potent and specific agonist for morphine (μ) receptors[J]. **Science**, 1981,212 : 75 - 77.

[5] Ondetti M A, Rubin B, Cushman D W. Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme : a new class of orally active antihypertensive agents[J]. **Science**, 1977, 196 : 441 - 444.

[6] 赵利,王璋,许时婴. 大孔吸附树脂对酪蛋白非磷肽吸附性的研究[J]. 食品工业科技,2002,12 :28 - 31.

[7] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导[M]. 北京 :人民教育出版社,1980. 71 - 72.

[8] 华中师范学院,东北师范大学,陕西师范大学. 分析化学实验[M]. 北京 :人民教育出版社,1981. 114 - 116.

[9] 张虹,柳正良,王洪泉. 大孔吸附树脂在药学领域的应用[J]. 中国医药工业杂志,2001,32(1) :41 - 44.

[10] 李伯庭,王湘,李小进. 大孔吸附树脂在天然产物分离中的应用[J]. 中草药,1990,21(8) :42 - 44.

[11] 何炳林,黄文强. 离子交换与吸附树脂[M]. 上海 :科技教育出版社,1995.

(责任编辑 :杨 萌)

万方数据