

## 产耐碱性 $\beta$ -1,4-聚糖酶芽孢杆菌 A-30 液体发酵研究

陈士成 曲音波\* 张 岩 高培基

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**摘 要** 研究了搅拌转速、pH 控制以及结合摇瓶发酵过程中不同时间硫酸铵的补加对  $\beta$ -1,4-聚糖酶形成的影响,优化得到 A-30 的  $\beta$ -1,4-聚糖酶分批发酵操作条件和初步优化了  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  流加发酵条件。研究结果显示麸皮表面有大量 A-30 菌体细胞的吸附,搅拌转速对菌体吸附和  $\beta$ -1,4-聚糖酶的形成有明显影响;发酵过程中 pH 下降有利于  $\beta$ -1,4-聚糖酶形成。采用了初期以 5mL/h 的速率恒速流加,后期测定  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度进行调整的流加方法,使木聚糖酶活达到 616IU/mL,纤维素酶活达到 1.33UI/mL。

**关键词** 短小芽孢杆菌  $\beta$ -1,4-聚糖酶,分批发酵,流加发酵

中图分类号 Q815 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0485-05

$\beta$ -1,4-聚糖酶的研究一直是以纤维素资源的有效利用为目标进行的。近年来, $\beta$ -1,4-聚糖酶类在造纸制浆、纺织和洗涤剂工业上有着广泛的应用前景。这些应用要求往往在中性或碱性条件下进行,因此对碱性和中性微生物及其所产相应  $\beta$ -1,4-聚糖酶的研究也逐渐受到重视。

我们曾经筛选到能产生碱性木聚糖酶的细菌 G6-2<sup>[1]</sup>,用其所产生的酶液处理麦草浆,进行草浆改性,可提高纸浆白度,降低脆性,提高滤水性。但是 G6-2 不产纤维素酶,而我们的研究结果显示,酶制剂中含有适量比例纤维素酶能显著改善纸浆的强度性能(如提高裂断长)<sup>[2]</sup>。短小芽孢杆菌 A-30 是我室选育的一株在生产上具有潜在价值的生产菌株,本文报道 A-30 液体浸没发酵的分批发酵研究以及流加发酵研究的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

短小芽孢杆菌 A-30(*Bacillus pumilus* A-30),芽孢杆菌 Y106(*Bacillus sp.* Y106),黑曲霉 L22(*Aspergillus niger* L22),黑曲霉 An76(*Aspergillus niger* An76),斜卧青霉 A-10(*Penicillium decumbens* A-10)菌株均为本室保存。

### 1.2 培养基

**1.2.1 种子培养基(g):**葡萄糖 10,NaCl 5,蛋白胨 5, $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,定容至 1L,pH 8.5。

**1.2.2 产酶培养基:**摇瓶发酵培养基(g)麸皮 50,蛋白胨 2.5,NaCl 5, $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,定容至 1L,pH 8.5。发酵罐培养基(g):麸皮 50, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.5,NaCl 5, $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,定容至 1L,pH 8.5,消泡剂根据实验需要加入。

### 1.3 发酵方法

**摇瓶发酵:**按 10% 接种量接种至发酵培养基中,培养条件为在 300mL 三角瓶中装样量 50mL,温度 32℃,pH 8.5,旋转摇床转速为 150 r/min。

**发酵罐发酵:**德国 B. Braun 公司生产的 Biostat. B 型 2L 自控式发酵罐,工作体积 1.5L,通风量 1:1.0。转速根据实验需要进行调整。10% 接种量,32℃ 发酵,pH 用 NaOH 和 HCl 调节,用聚醚类消泡剂控制发酵过程中的泡沫。

### 1.4 分析测定方法

**1.4.1 纤维素酶活测定:**用 0.02mol/L pH 7.2 的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液制备 1% 的 CMC-Na 溶液。加入适当稀释的酶液 0.5mL,50℃ 反应 30min,终止反应后用 DNS 法测定 540nm 光吸收,以葡萄糖做标准溶液,以每分钟生成 1 $\mu$ mol 葡萄糖作为一个酶活单位。

**1.4.2 木聚糖酶活测定:**用 0.02 mol/L pH 7.2

的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液制备 1% 的木聚糖溶液。加入适当稀释的酶液 0.5mL, 50°C 反应 30min, 终止反应后用 DNS 法测定 540nm 光吸收, 以木糖做标准溶液, 以每分钟生成  $1\mu\text{mol}$  木糖作为一个酶活单位。

1.4.3 发酵液蛋白质浓度的测定方法: 采用 Folin-酚比色测定方法<sup>[3]</sup>, 以牛血清蛋白为对照。

1.4.4 发酵液中铵离子的测定方法: 用氨氮快速分析试剂盒以及 Berthelot 反应法<sup>[4]</sup>检测。

1.4.5 残糖测定方法: 用 3,5-硝基水杨酸法。

1.4.6 扫描电镜观察: 定时取样, 将样品放于蒸馏水中漂洗, 再置于无水乙醇中 5min, 取出充分干燥, 喷金。

## 1.5 主要化学试剂及仪器

木聚糖(Oat spelts)为 Sigma 公司产品, 氨氮快速分析试剂盒为北京大学化学系研制。其他试剂若非特别说明均为分析纯。722 分光光度计为上海第

三分析仪器厂出品, 2L 发酵罐及水浴摇床为德国 B. Braun 公司生产, 摇瓶机为山东大学实验仪器厂生产。扫描电镜为日本 Hitachi S-520 型。

## 2 结果和讨论

### 2.1 产 $\beta$ -1,4-聚糖酶 5 株优良菌株摇瓶发酵性能的比较

造纸制浆工艺往往要求在碱性或中性条件下进行。为了优选出能够应用在造纸制浆工业的生产菌种, 从我室选育的大量的产  $\beta$ -1,4-聚糖酶菌株的基础上, 选出性状较为优良的 5 株菌株, 在同一发酵条件下进行摇瓶发酵, 结果见表 1。可见短小芽孢杆菌 A-30 能够产生的碱性的纤维素酶和木聚糖酶, 并且木聚糖酶的容积产率可以达到  $5210\text{ IU}/(\text{L}\cdot\text{h})$  的发酵水平, 并具有适量的纤维素酶活, 其发酵性能较其他的 4 株菌有明显优势, 符合造纸制浆工艺的要求, 因此将其选为进一步研究的菌株。

表 1 5 株优良产  $\beta$ -1,4-聚糖酶菌株摇瓶发酵性能的比较

Table 1 The comparison of the fermentation character of five excellent  $\beta$ -1,4-glycanases producer in flask

Organism	CMCase			Xylanase		
	Optimum pH	Enzyme activity $(\text{IU}/\text{mL})$	Productivity $(\text{IU}/\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	Optimum pH	Enzyme activity $(\text{IU}/\text{mL})$	Productivity $(\text{IU}/\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$
<i>Bacillus pumilus</i> A-30	8.0	0.8	13.3	8.5	312.6	5210
<i>Bacillus sp.</i> Y106	7.0	4.5	75	6.5	15.3	255
<i>Penicillium decumbens</i> A-10	4.5	18.6	310	4.5	156	2600
<i>Aspergillus niger</i> L22	4.5	2.06	34	4.5	47.8	797
<i>Aspergillus niger</i> An 76	5.0	2.1	35	5.0	353.6	5893

### 2.2 搅拌转速对 A-30 分批发酵过程的影响

在纤维素酶和木聚糖酶的生产过程中, 溶解氧和基质一样, 是影响菌体生长代谢的重要因素。在通气量不变的情况下, 提高搅拌转速可以提高发酵罐的传氧速率, 从而保证细胞生长和代谢所需溶氧的供给。在其他条件相同的情况下, 测定在不同转速下 A-30 的生长产酶过程变化曲线, 结果如图 1。实验表明, 过高或过低的搅拌转速对 A-30 的  $\beta$ -1,4-聚糖酶的生成有重大影响。转速为  $300\text{ r}/\text{min}$  时, 在  $0\sim 34\text{ h}$  溶氧接近于 0, 不能满足 A-30 的生长代谢需要, 说明 A-30 对氧的需求很高。当搅拌转速为  $500\text{ r}/\text{min}$  时, 两酶产量达到最高, 木聚糖酶活可以达到  $435\text{ IU}/\text{mL}$ , 纤维素酶活可以达到  $0.79\text{ IU}/\text{mL}$ , 并且纤维素酶在发酵到 20h 就达到产酶高峰。

转速提高到  $700\text{ r}/\text{min}$  时, 溶氧状态得到改善(溶氧饱和度大于 40%), 木聚糖酶的产酶高峰较其他两种情况提前, 但木聚糖酶活与  $500\text{ r}/\text{min}$  时相比下降了 15%, 纤维素酶下降了 30%, 其产酶高峰也有所滞后。文献报道纤维素降解菌在发酵过程中往往与纤维素材料紧密接触<sup>[5]</sup>, 甚至有文献报道<sup>[6]</sup>菌体是进入植物纤维的细胞腔内进行纤维素降解的, 和纤维素的直接接触是细胞生长和纤维素酶的诱导所必需的。我们对发酵过程中的样品取样进行扫描电镜观察, 发现麸皮上有大量菌体细胞吸附, 转速的提高可能影响到了细胞与麸皮的接触, 从而影响到  $\beta$ -1,4-聚糖酶的诱导生成。更为具体的原因还需进一步的深入探讨。

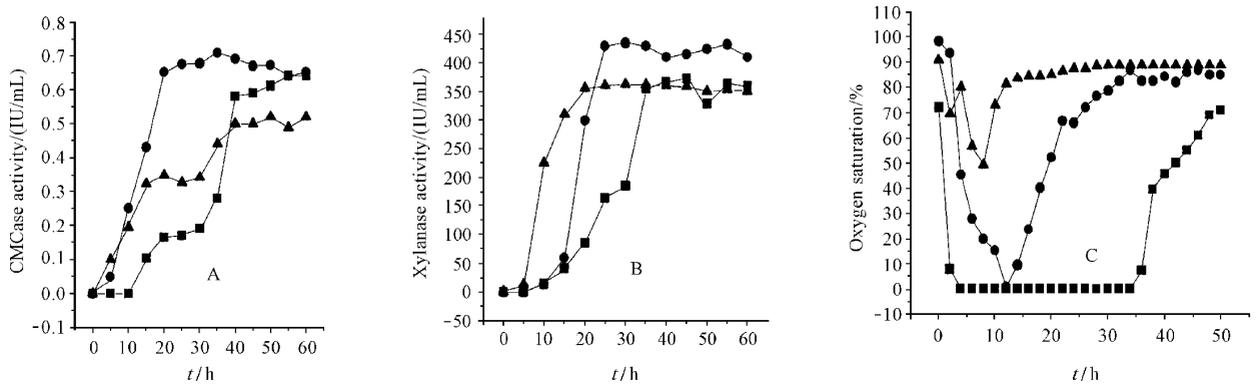


图1 不同转速对A-30分批发酵过程的影响

Fig.1 Effects of different stirring rate on enzyme production of A-30

A. Time-course of cellulase production ; B. Time-course of xylanase production ; C. Time-course of dissolved oxygen

The value of stirring speed (r/min) was ■ 300 ● 500 ▲ 700

### 2.3 pH控制对A-30的 $\beta$ -1,4-聚糖酶形成的影响

A-30是耐碱性细菌,最适产酶的起始pH为8.0,但分批发酵过程中,发酵液pH在0~10h发酵过程中可下降到6.4(见图2D),因此作者在其他条件不变的情况下(转速控制在500r/min),把整个发酵过程pH均控制在8.0,研究发现进行pH控制反而不利于A-30的 $\beta$ -1,4-聚糖酶的形成(图2A,B),文献[7]报道在真菌 $\beta$ -1,4-聚糖酶发酵过程也观察到这一现象,他们认为在发酵过程中pH的下降是诱导 $\beta$ -1,4-聚糖酶所必需的,但没有解释具体原因。固体的纤维性材料是无法直接进入细胞内部来诱导 $\beta$ -1,4-聚糖酶的合成,推测可能细胞首先组成型表达适量的 $\beta$ -1,4-聚糖酶,降解大分子的纤维性材料为可进入细胞内部起诱导作用的小分子物质,从而实现 $\beta$ -1,4-聚糖酶的诱导。据此我们认为A-30发

酵过程中出现不控制pH有利于 $\beta$ -1,4-聚糖酶产量提高的现象,可能与其产生的碱性 $\beta$ -1,4-聚糖酶底物最适作用pH(8.0~9.0)较高有关。发酵至5h,pH下降到6.4左右,此时A-30碱性的 $\beta$ -1,4-聚糖酶在低pH下可以从不溶性底物缓慢地释放可溶性糖,图2C可以看出从发酵液中不断有还原糖释放,不控制的还原糖浓度基本上一直低于控制的。因此可溶性小分子诱导物能够维持在较低水平来诱导 $\beta$ -1,4-聚糖酶形成而不产生阻遏,使得 $\beta$ -1,4-聚糖酶产量提高。

### 2.4 A-30的 $\beta$ -1,4-聚糖酶流加发酵研究

首先进行了摇瓶发酵研究,不同时间添加1%硫酸铵来考察对A-30的 $\beta$ -1,4-聚糖酶产生的影响(表2)。结果表明,适时补加可以大幅度的提高两类酶的酶活,在12h补加与不补加外源氮源的对照

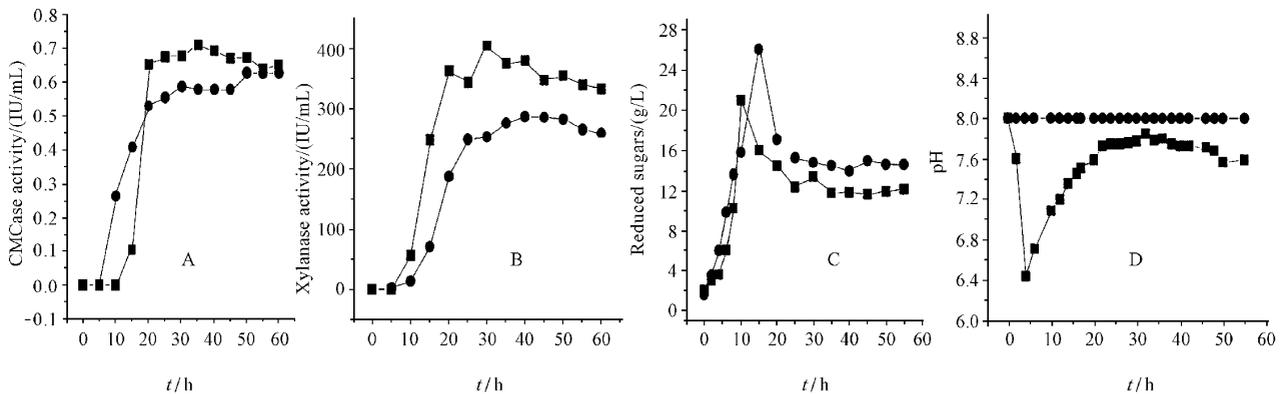


图2 pH控制与否对A-30分批发酵过程的影响

Fig.2 Comparison of effects between controlled pH and uncontrolled pH on batch culture of A-30

A. Time-course of cellulase production ; B. Time-course of xylanase production ; C. Time-course of released reducing sugar ; D. Time-course of pH

● Controlled pH ; ■ Uncontrolled pH

相比,木聚糖酶活提高了 74%,纤维素酶活提高了 33%,而且比发酵初始就加入也有较大幅度的提高。为了进一步弄清楚 A-30 对硫酸铵的利用情况,放大到 2L 罐上(控制转速为 500r/min)分析其整个发酵过程变化,结果如图 3。从实验结果可以看出,A-30 在发酵前期(0~10h)对硫酸铵的利用很快,20h 后发酵液硫酸铵浓度接近于 0,溶解氧逐渐回升,此时胞外蛋白浓度和两酶酶活达到产酶高峰期并趋于稳定。镜检发现此时 A-30 的芽孢开始大量形成,推测可能是氮源缺乏导致的。结合摇瓶发酵结果,作者进行了流加硫酸铵的初步研究,结果如图 4。整个发酵过程如下:初始硫酸铵浓度改为 2.5g/L,流加液硫酸铵浓度为 100g/L,发酵至 20h 后开始流加,流加速率控制在 5mL/h 左右。发酵过程中间隔 2h 取样,及时测定硫酸铵浓度,以便调整流加速率,尽量使发酵液中的硫酸铵浓度控制在 1.0~2.0g/L 的水平,50h 停止流加。与分批发酵相比,由于初始

硫酸铵浓度的降低,从溶氧曲线可以看出,发酵前期细胞代谢率明显加快,溶解氧在 8h 就降低为 0,持续到 14h 开始回升,20h 后流加硫酸铵,但溶解氧仍持续上升,30h 后及时调整流加速率,溶解氧下降,说明此时细胞代谢又开始加速。尽管对硫酸铵的流加是以取样离线测定、及时调整的方法进行控制,还显粗糙,但该控制方法基本满足了 A-30 对硫酸铵的需要,延长了菌体生长和  $\beta$ -1,4-聚糖酶的合成时间,使发酵达到了较高水平,纤维素酶活和木聚糖酶酶活分别达到 1.33IU/mL 和 616 IU/mL。

表 2 不同时间硫酸铵的补加对产酶影响

Table 2 Effects of feed time of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  on xylanase and CMCase production

t/h	0	12	24	36	48	60	Control
Xylanase activity/(IU/mL)	278	312	255	232	249	188	180
CMCase activity/(IU/mL)	0.62	0.80	0.74	0.51	0.61	0.51	0.60

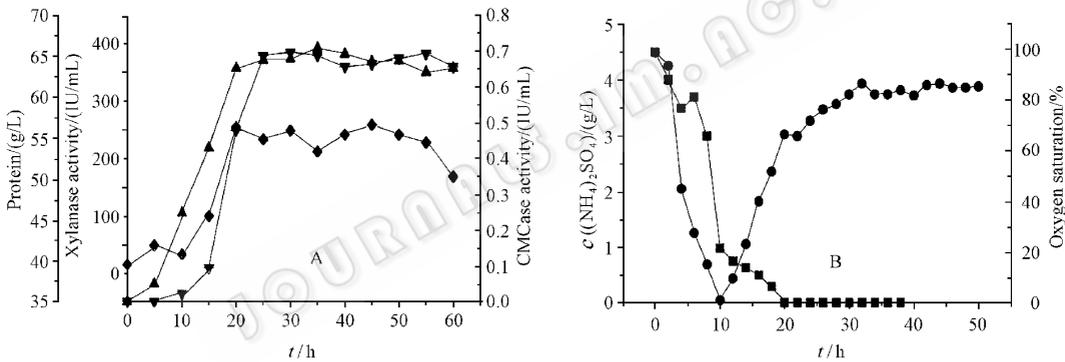


图 3 A-30 分批发酵过程变化曲线

Fig. 3 Time course of A-30 batch culture

▼ Cellulase ▲ Xylanase ◆ Protein ■  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ● Dissolve oxygen

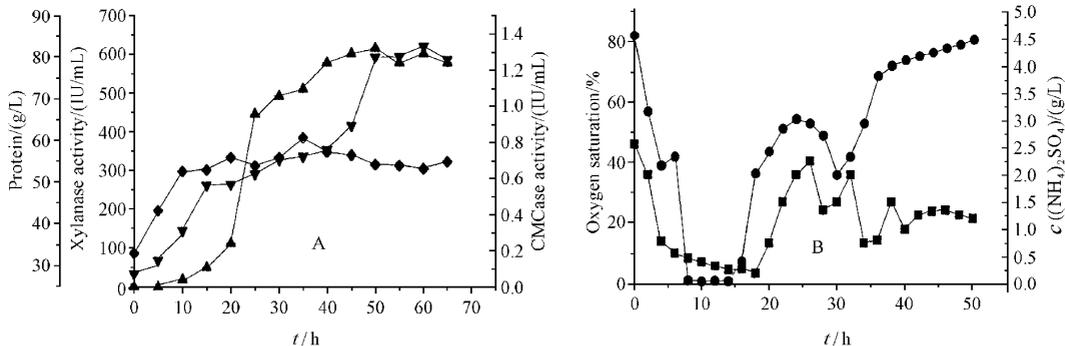


图 4 A-30 流加发酵过程变化曲线

Fig. 4 Time course of A-30 fed-culture

▼ Cellulase ▲ Xylanase ◆ Protein ■  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ● Dissolve oxygen

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 杨建云,曲音波,刘瑞田等.第七届全国生物化工学术会议论文集,北京:化工出版社,1996,pp.715~719
- [ 2 ] CHEN J, YANG J, QU Y *et al.* *ACS Symp Ser*, 1996, **655**: 208~217
- [ 3 ] Lowery O H, Rosebrough N J, Farr A L. *J Biol Chem.* 1951, **193**: 265~275
- [ 4 ] Steinbuchel A, Hans G *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, **31**: 168~175
- [ 5 ] Stefan A, Susanne M, and Detlef S *et al.* *Journal of Biotechnology*, 1996, **46**: 221~234
- [ 6 ] 高培基,曲音波,钱新民等.微生物生长与发酵工程,济南:山东大学出版社,1990,pp.328~330
- [ 7 ] Purkarthofer H, Sinner M, Sterner W *et al.* *Biotechnology letters*, 1993, **15**: 405~410

## Studies on Submerged Fermentation of Alkaline $\beta$ -1,4-glycanases by *Bacillus pumilus* A-30

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

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

**Abstract** The effects of stirring rate, pH control and feed time of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  on  $\beta$ -1,4-glycanases were investigated. The operating conditions of batch fermentation and fed-batch culture were optimized. The results showed there were a large amount of bacterial cells adsorbing on the surface of wheat bran, and stirring rate had a pronounced influence on the adsorption and the production of  $\beta$ -1,4-glycanases. The uncontrolled pH could promote the induction of  $\beta$ -1,4-glycanases. When  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was fed at a constant rate in the earlier age, and regulated later by determining the content of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , xylanase and CMCase activity could reach 616IU/mL and 1.33IU/mL respectively.

**Key words** *Bacillus pumilus*, xylanase, cellulase, fed-batch culture © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>