

变异株B. S. 796 生产 α -淀粉酶工艺条件的研究

邬显章 顾传娴 全文海 徐维维

赵允麟 徐 岩

(无锡轻工业学院, 无锡)

陈荣兴 王建伟

(常州武进县生物化工厂, 常州)

从枯草杆菌*Bacillus subtilis* 209出发, 选育出B. S. 796变异株。该菌在麦芽糖6%, 豆粕水解液 6—7%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.8%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4%, CaCl_2 0.2%, NH_4Cl 0.15%, pH6.5—7.0的培养基(麦芽糖培养基)中可获得较高的 α -淀粉酶活性, 在 1.5m³ 发酵罐中试验 α -淀粉酶活性平均可达 477u/ml(比原菌提高40.6%)。按上法所得发酵液能快速通过板框压滤机, 过滤回收率高达95%, 提取总收率约为78%。

关键词 麦芽糖培养基; α -淀粉酶

我国微生物酶制剂工业生产是在六十年代中期兴起的^[1-3], 但到目前为止, 仍沿用玉米粉等原料为主的粗粮发酵, 发酵液添加硫酸铵沉淀制取酶制剂。1979年曾研究过以酒精沉淀生产食品级 α -淀粉酶, 但由于当时发酵液的过滤效率甚低, 发酵液残糖高, 发酵单位低等原因, 致使酶制剂成本过高, 未能形成大规模生产能力。

本文报道一株 α -淀粉酶的高产菌株B. S. 796以及改良的麦芽糖培养基所得的发酵液能以板框压滤机快速过滤, 收率高, 从而开发了细菌 α -淀粉酶大规模生产的新途径。

材 料 和 方 法

(一) 菌种诱变技术

1. 供试原菌: 枯草杆菌B. S. 209 出

发菌由无锡酶制剂厂提供。

2. 诱变剂: 硫酸二乙酯、5-氟尿嘧啶、亚硝基胍等。

3. 诱变方法: 取37°C培养72h的马铃薯斜面培养孢子^[3], 加生理盐水制成孢子悬浮液, 孢子浓度约为10⁸个/ml, 经100°C水浴加热3—5min后, 接入麦芽糖培养基中, 于旋转式摇床上培养6h, 加入不同诱变剂处理。诱变中止后将处理液涂布在鉴别淀粉培养基平皿上分离, 按透明圈法挑选试验菌落。初、复筛用摇瓶发酵作比较。

(二) 发酵技术

1. 摇瓶发酵: 500ml三角瓶内装发酵培养基50ml, 其组成为(%): 麦芽糖6、豆粕水解液6、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

本文于1987年1月27日收到。

参加本课题工作的还有夏友坤, 傅健, 谌夏益, 冯露, 杨莺, 朱仁群, 邱建平, 郭鸿飞, 田亚平, 郭利平, 田野, 扬燕红, 薛业敏等。

0.8、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4、 CaCl_2 0.2、 NH_4Cl 0.15, pH6.5—7.0。接种后置旋转式摇床上 (rpm 300、偏心距2.8cm), $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 下培养60h。

2. 1.5m^3 发酵罐发酵: 1.5m^3 夹套发酵罐 (钢制) 罐直径 $\phi 1.1\text{m}$, 高1.6m, rpm 240, 电机1.7KW, 搅拌弯叶二挡, 装液量600~700L。罐培养液的制备与培养条件如下: (1) 麦芽糖液的制备: 取玉米粉或甘薯粉加水2—2.5份, 调 pH6.2, 加 CaCl_2 0.1%, 升温至 80°C , 添加 α -淀粉酶5-10u/g原料, 液化后速在高压1—2kg/cm²下糊化30min, 冷却至55—60 $^\circ\text{C}$, pH 5.0时添加细菌异淀粉酶20—50u/g原料和植物 β -淀粉酶100~200u/g原料, 糖化4—6h后, 加热至90 $^\circ\text{C}$, 趁热过滤即为麦芽糖液。(2) 豆粕水解液的制备: 取豆粕粉加水10份浸泡2h, 然后在 1kg/cm²下蒸煮30min, 冷却至55 $^\circ\text{C}$, 调 pH7.5, 加蛋白酶 50—100u/g 原料, 作用2h, 过滤后浓缩至蛋白质含量为50%, 即得豆粕水解液。(3) 罐培养液的配制: 用上述麦芽糖液配制成含麦芽糖6%, 豆粕水解液6~7%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.8%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4%, CaCl_2 0.2%, NH_4Cl 0.15%, 豆粕1kg, 深井水500L, 调pH6.5~7.0。

罐培养液经消毒灭菌, 冷却后接入3~5%种子培养成熟液, 培养条件为: 温度 $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 罐压0.5kg/cm², 风量: 0—20h为1:0.48, 20h后1:0.67, 培养时间28—36h。

(三) α -淀粉酶提取技术

发酵结束后, 于发酵罐内添加凝聚剂, pH6.3~6.5, 升温至40~45 $^\circ\text{C}$ 后放入絮凝剂, 维持一定时间进行预处理后, 泵入板框压滤机进行过滤, 水洗, 合并洗液 (或经浓缩) 放入沉淀缸内加入一定量

淀粉, 边搅拌边加入酒精, 沉淀, 湿酶经真空干燥, 即为成品酶。

(四) 分析方法

1. α -淀粉酶活性测定: 按部颁法^[4]。
2. pH: 以pH5.5~9.0精密pH试纸测定。
3. 总糖, 还原糖测定: 按斐林试剂滴定法。
4. 麦芽糖测定: 按纸层析定性, 化学法定量^[5]。
5. 总氮测定: 按凯氏定量法。
6. 氨基氮测定: 按甲醛滴定法。
7. 蛋白酶活性测定: 按部颁法^[4]。
8. 吸光度测定: 用721型光电比色计于660nm下测定。

试验结果

(一) B.S.796变异株的筛选

利用抗利福平 (Rif^r) 标记, 抗氨基青霉素 (Amp^r) 标记^[6-8]和鉴别淀粉培养基, 可以提高筛选高产变异株的几率, 如图1所示:

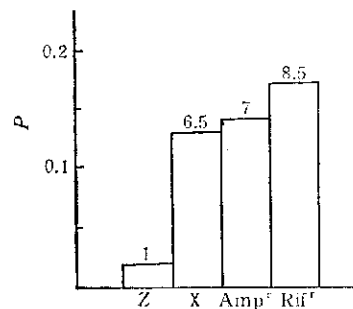


图1 提高30%以上变异株的方法比较
Fig. 1 Comparison of the methods for the positive mutation above 30%

* Z: 直接挑选 Direct selection

X: 用淀粉培养基挑选 Selected with starch medium

Amp^r: 抗氨基青霉素 Ampicillin-resistant

Rif^r: 抗利福平 Rifampin-resistant

P: 提高30%以上的变异株几率 The ratio of positive mutation above 30%

由图可见, 以提高30%酶活性变异株为例, 淀粉培养基分离, Amp^r 标记, Rif^r 标记, 分别是直接挑选几率的6.5、7和8.5倍, 高酶活正突变株被浓缩。本试验结

果获得一些高产变异株如Fu1811, NTG7等。

从B.S. 209到B.S. 796的选育谱系如图2。

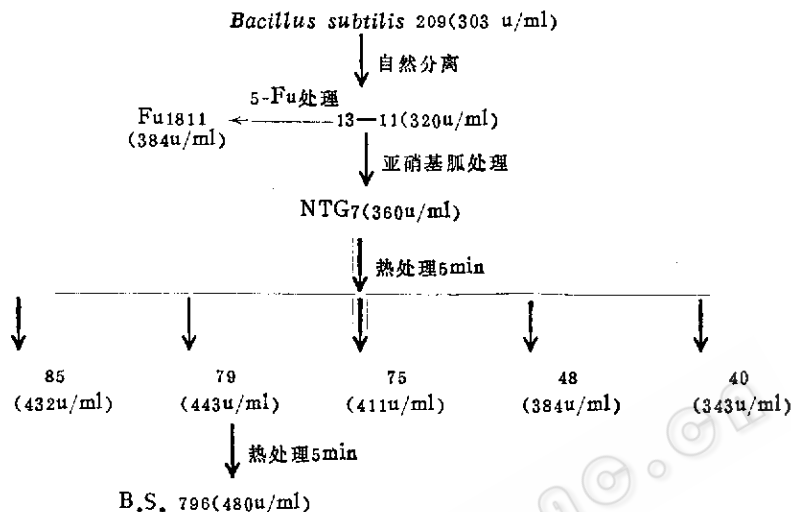


图2 B.S. 796变异株的育谱系
Fig. 2 Genealogy of B.S. 796 mutant

(二) 碳源的诱导及阻遏

细菌 α -淀粉酶可以说是半组成酶, 大多数工业生产菌即使在培养基中不含淀粉或者不含具有 α -1, 4键的多糖或低聚糖, 仍然可以产生 α -淀粉酶^[1]。我们的实验证实了这种观点。结果如表1所示。

为了观察葡萄糖的阻遏效应, 将麦芽糖培养基在总糖浓度不变的条件下, 以葡萄糖置换麦芽糖, 其结果如图3所示。

从图3可知, 葡萄糖比例在10-15%以下对产酶无甚影响。

(三) 氮源的选择

氮是构成细胞及酶结构的主要元素, 因此氮源的选择将会直接影响产酶能力, 比较了几种氮源对酶活性的影响结果, 如表2所示。

从表2看出: 豆粕、豆粕水解液、黄豆粉, 豆饼粉、蛋白胨等均是 α -淀粉酶的良好氮源。考虑到大规模生产原料的来源及减少发酵液中的固形物, 所以可采用豆

粕水解液作为发酵的最佳氮源。

(四) 碳氮比(C/N)对 α -淀粉酶形成的影响

C/N和 α -淀粉酶形成的关系很复杂, 菌的种类不同, 培养条件与方法不同, 最适C/N是不同的。今以B.S.769菌株试验,

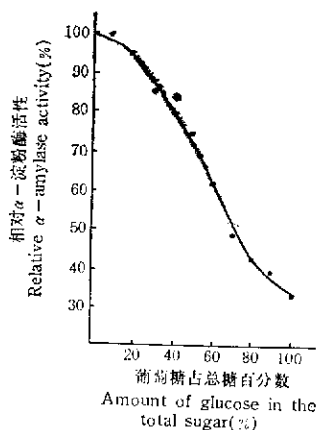


图3 葡萄糖对 α -淀粉酶的阻遏效应
Fig. 3 Repression of glucose on the formation of α -amylase

表1 各种碳源对 α -淀粉酶活性的影响
Table 1 Effect of various carbon sources on the activity of α -amylase

碳源 Carbon sources (%)	α -淀粉酶活性 Activity of α -amylase (u/ml)	碳源 Carbon sources (%)	α -淀粉酶活性 Activity of α -amylase (u/ml)
甜菜糖蜜 Beet molasses 12	0	玉米粉 Corn meal 9	220
甘蔗糖蜜 Cane molasses 12	35	玉米淀粉 Corn starch 6	267
蔗糖 Sucrose 6	108	可溶性淀粉 Soluble starch 6	288
果糖 Fructose 6	96	马铃薯淀粉 Potato starch 6	303
葡萄糖 Glucose 6	102	糊精 Dextrin 6	320
果葡糖浆 Fructose syrup 9	125	乳糖 Lactose 6	384
饴糖 Malt sugar 9	230	半乳糖 Galactose 6	400
麦芽糖 Maltose 6	360	木糖 Xylose 6	9
		n-甲基葡萄糖 n-methylglucose 6	262

C/N和 α -淀粉酶形成关系如表3所示。

从表3看出：C/N在11.5—14.5之间对发酵酶活的影响不大，若氮源过低，即C/N大，致使发酵液pH降到5.5以下，则发酵酶活有所下降。

(五) B.S.796 菌株的发酵过程

按材料和方法中所述的发酵技术，在1.5m³罐中观察B.S.796菌株的发酵过程，其结果如图4所示。

发酵第6h起， α -淀粉酶酶活稳步上升，如pH维持在6.2—6.5之间，产酶速度按每小时约15—25u/ml稳步增长。本菌株对通风量要求不高，故加油次数不多，一

表2 各种有机氮源对 α -淀粉酶活性的影响
Table 2 Effect of various organic nitrogen sources on the activity of α -amylase

氮源 Nitrogen sources (%)	α -淀粉酶活性 Activity of α -amylase (u/ml)
全脂淡奶粉 Whole milk powder 6	0
全脂甜奶粉 Whole sweet milk powder 6	0
脱脂奶粉 Skim milk powder 6	0
棉籽蛋白 Cotton-seed protein 6	96
猪血蛋白 Pig blood protein 6	20
酵母膏 Yeast extract 6	0
玉米浆 Corn steep liquor 6	0
黄豆粉 Soybean meat 6	20
豆饼粉 Soybean cake meal 6	20
蛋白胨 Peptone 6	303
牛肉膏 Beef extract 6	180
豆粕粉 Defatted soybean dregs 6	392
豆粕水解液 Soybean protein hydrolysate 6	390

一般在12—20h之间作2—3次少量加油即可。发酵成熟pH在7.0—7.5以上，温度不再上升，菌体均为空胞，单批发酵时间仅28—36h。

(六) 各种处理条件对 α -淀粉酶发酵液的过滤速度和产品收率的影响

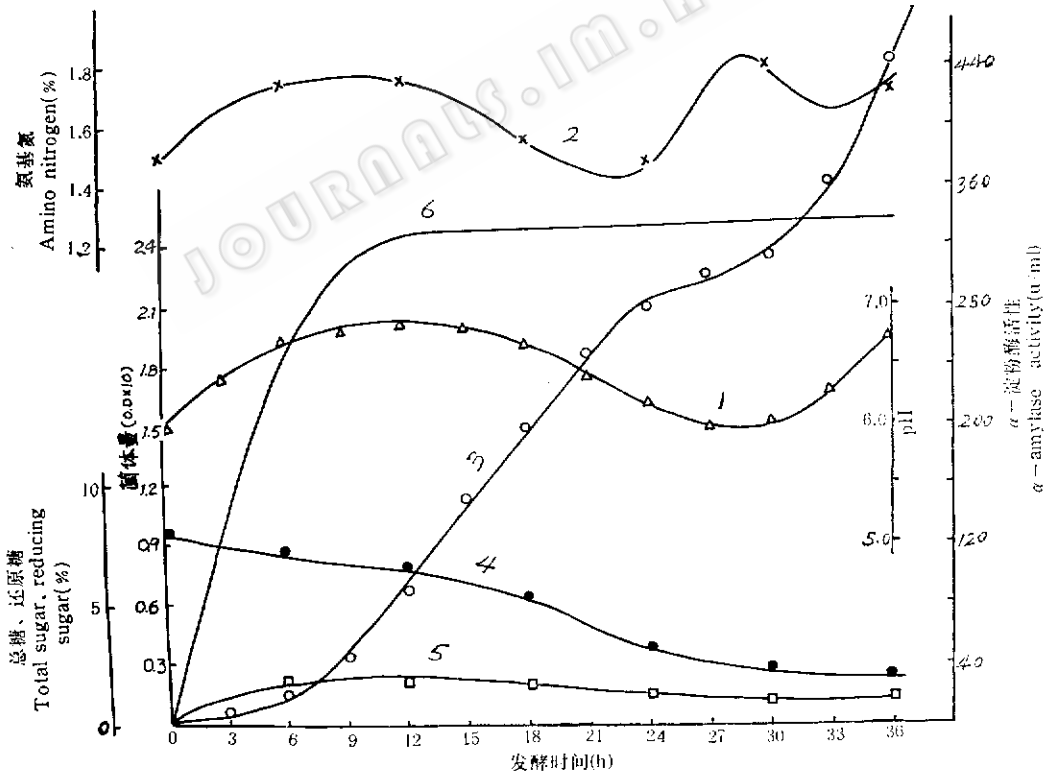
将发酵液经各种条件处理，所得综合结果如图5所示。按本文所述的提取技术操作，其结果如表4所示。

(七) 蛋白酶的酶活在提取过程中的变化

蛋白酶存在对 α -淀粉酶的生产 and 保藏过程中的失活有很大影响。为此，测定了酶活性比率（中性蛋白酶/ α -淀粉酶）在提取过程中的变化，结果如表5所示。酶活

表3 C/N和 α -淀粉酶形成的关系Table 3 Correlation of the ratio of C/N on the formation of α -amylase

C/N		11.00	12.00	13.16	14.29	15.38	16.50	
每毫升培养基相当量 (The amount correspond to ml culture medium)	氮量 Total N (mg)	豆饼中的N from soybean	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3
	(NH ₄) ₂ SO ₄ 中的N From (NH ₄) ₂ SO ₄	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
	NH ₄ Cl中的N From NH ₄ Cl	0.525	0.525	0.525	0.525	0.525	0.525	0.525
	计 Calculate	6.675	6.675	6.675	6.675	6.675	6.675	6.675
全糖 Total sugar (glucose) (mg)	豆饼中的还原糖 From soybean	14.00	14.00	14.00	14.00	14.00	14.00	
	碳源折算的还原糖 From carbon-sources	59.20	66.40	73.90	81.40	88.70	96.10	
	计 calculate	73.20	80.40	87.90	95.40	102.70	110.10	
pH		7.4	7.5	7.0	6.4	6.0	5.5	
α -淀粉酶活性(u/ml) Activity of α -amylase		352.2	384.3	432.1	394.3	358	280	

图4 B.S. 796变异株在1.5m³发酵罐中的发酵变化过程Fig. 4 Fermentation diagram of B.S. 796 mutant in a 1.5m³ fermentor

1. pH 2. 氨基氮 Amino nitrogen 3. α -淀粉酶活性 Activity of α -amylase
4. 总糖 Total sugar 5. 还原糖 Reducing sugar 6. 菌量 Cell concentration

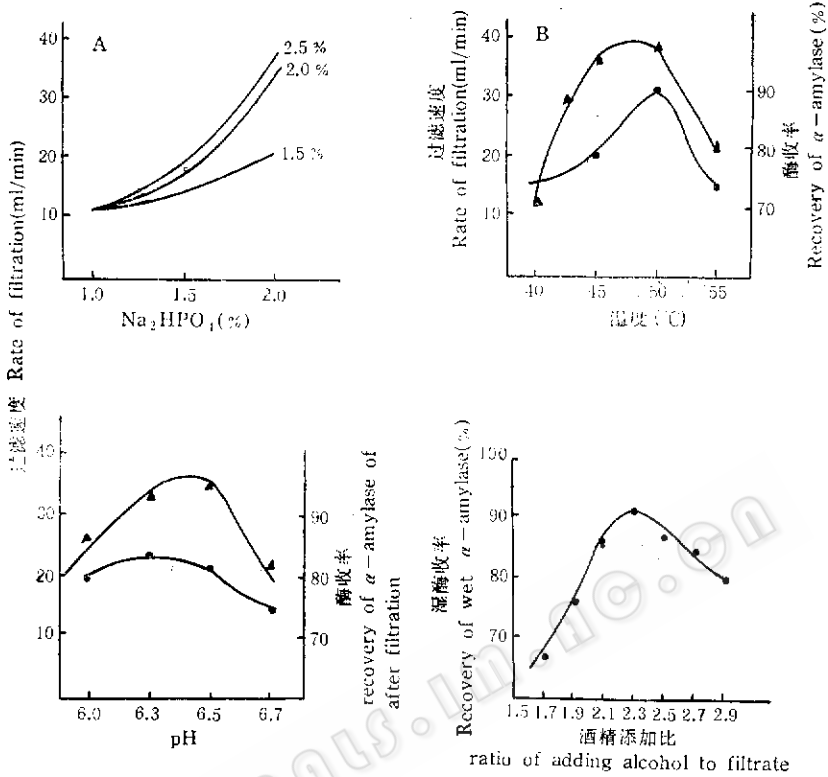


图5 各种处理条件对 α -淀粉酶的过滤速度和产品收率的影响

Fig. 5 Effect of various treatment conditions on rate of filtration and recovery of α -amylase
 ·, α -淀粉酶收率; Recovery of α -amylase(%) ▲: 滤液的过滤速度 Rate of filtration (ml/min)
 图A中曲线上的浓度为 CaCl_2 浓度

表4 α -淀粉酶提取过程的收率

Table 4 Recovery of α -amylase after process of extract

	发酵液 Culture broth	预处理 After preparation	压滤 After filtration	湿酶 Enzyme production (wet)	干酶 Enzyme production (dry)	总收率 Total recovery (%)
总单位 Total units(u)	231×10^5	$216,68 \times 10^6$	$205,15 \times 10^6$	$192,8 \times 10^5$	181×10^6	
收率 Recovery(%)		93.8	94.7	94	94	78.5

表5 酶活比率(蛋白酶/ α -淀粉酶)在提取过程中的变化

Table 5 Variations of the ratio(protase/ α -amylase) of enzyme activity in the extract and production

类别 Classification)	发酵液 Culture broth (u/ml/u/ml)	预处理后 After preparation (u/ml/u/ml)	成品干酶 Enzyme production (dry) (u/g/u/g)
酶活比率(蛋白酶/ α -淀粉酶) The ratio of enzyme activity (protase/ α -amylase)	1.85	0.78	0.145

性相对比率在提取过程中趋向减小, 蛋白酶酶活在提取过程中的损失率达 92% 左右。

讨 论

α -淀粉酶产生菌 *B. subtilis* 已经国内不少研究单位多年考察, 认为经各种常规诱变处理, 该菌的酶活性提高幅度不大, 且有回复现象。国外用遗传工程办法只是在低产菌株, 且局限于糖化型淀粉酶菌株间进行选育为多^[10, 11]。本研究所获得的变异株 B.S. 796 是采用常规诱变结合热处理选出的。为避免夹带噬菌体和稳定大生产, 应定期进行菌种的复壮与纯化。

将淀粉用酶法转化成麦芽糖液作为 α -淀粉酶发酵的碳源, 还未见国内外大生产的报道。从实验知道: 麦芽糖不仅提高了细菌 α -淀粉酶的生产水平 (约 40.6%), 且改善了许多工艺操作条件, 如发酵液总固形物浓度减少 50%, 有利于消毒灭菌、

通风搅拌以及提高发酵液中的溶解氧等, 最大的有利点是解决了 α -淀粉酶发酵液“过滤难”的问题, 开发了我国 α -淀粉酶大规模生产的新途径。

本研究对 α -淀粉酶的提取研究着重于解决发酵液的过滤问题。按本文所提供的发酵液, 用普通板框压滤机或真空抽滤均能快速过滤, 滤液的酶活回收率高达 95%。

鉴于欧美^[12]和日本提取 α -淀粉酶的大规模生产工艺, 均为有机溶剂 (如酒精) 沉淀法, 一般在使用菌种是安全产酶菌种的前提下, 产品完全可符合食品级的各项规定, 而且过程短, 收率高, 成本低。未见用喷雾干燥或硫酸铵盐析的大规模生产工艺。

我们在提取工序中酶总收率为 78% 左右, 同 G. Reed 等提供的流程 (1975), *Bacillus subtilis* α -淀粉酶的总收率为 63% 相比, 是略有提高的。

本工艺的技术经济效益分析如表 6。

表 6 α -淀粉酶新工艺的技术经济效益分析

Table 6 Analysis of technical economy of this new α -amylase technology

水平 Standard	类别 Classification	发酵水平 Enzyme activity of broth (u/ml)	发酵时间 Ferment time (h)	1.5m ³ 单罐实产 Total unit of 1.5m ³ fermentor (kg)	平均产酶 Average value (kg/h)	粮耗 Expend grain (kg/T prod.)	电耗 Exp- end electricity (kW·h/T prod.)	提取收率 Recovery of extract (%)	成本 Cost Yuan/T prod.)	毛利润 Gross profit (Yuan/T prod.)
对比 Contrast										
1985年某工厂生产水平 Production standard of a certain factory on 1985 (粗酶) (Crude enzyme product)		325	48	153.6	3.2	705	1450	78.0	1900	600
本工艺水平 Production standard of this technology (食品酶) (Food precessing enzyme)		477	36	229	6.36	700	1032	78.0	2600	1900
提高或下降 Increase or decrease (%)		+40.6	-33.3	+40.6	+98.75	±0	-40.6	±0	+36.8	+217

通过技术经济效果分析看到:

(1) α -淀粉酶产品的级别已由硫酸

铵盐析的粗酶改造成食品级酶, 质量与剂型可符合国际市场标准, 为出口争汇开发

了道路。

(2) 利用本工艺的综合效益,即发酵单位提高40.6%,发酵时间缩短33.3%,平均罐产提高98.75%等因素,不会使产品成本上升过多。由于酒精、原材料、水、

电、煤等提价,本工艺食品级酶每吨成本要比粗酶升高36.8%,但产品价格可从2500元/吨(粗酶)提高到4500元/吨(食品级酶),故毛利润提高幅度为217%,经济效益显著。

参 考 文 献

- [1] 上海轻工业研究所:细菌淀粉酶的生产与应用,上海科技出版社,1960。
- [2] 无锡酶制剂厂等:遗传学报,2(3):202,1975。
- [3] 无锡酶制剂厂等:遗传学报,3(3):216,1976。
- [4] 中华人民共和国轻工业部颁标准,QB747-80,1981。
- [5] Bernfeld, P.: *Advanced in Enzymology*, 12:385, 1951。
- [6] Sonenshein, A.L. et al.: *Nature*, 227:906, 1970。
- [7] Shinke, R. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 57:53, 1979。
- [8] Shinke, R. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 55(2):103, 1977。
- [9] 张树政等:酶制剂工业(下册),科学出版社, p.468, 1984。
- [10] Maruo, B. et al.: *Proceed Japan Acad.*, 54(ser B):435, 1980。
- [11] Maruo, B. et al.: *J. Bacteriol.*, 124:48, 1975。
- [12] Daniel, I.C. Wang:发酵与酶工艺学,华侨大学化学化工系生物工程教研室译,福建科学出版社, p. 343, 1983。

STUDIES ON THE TECHNOLOGY OF PRODUCTION OF α -AMYLASE BY A MUTANT B.S.796

Wu Xianzhang Gu Chuanxian Quan Wenhai

Xu Weiwei Zhao Yunlin Xu Yan

(Wuxi Institute of Light Industry, Wuxi)

Chen Rongxing Wang Jianwei

(Wu-Jin Work of Biochemical Technology, Chang Zhou)

The α -amylase-overproducing strain B.S. 796 was derived from *Bacillus subtilis* 209. The mutant obtained overproducing α -amylase activity in a culture medium containing maltose 6%, soybean protein hydrolysate 6%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.8%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4%, CaCl_2 0.2%, NH_4Cl 0.15%, pH 6.5—7.0.

The α -amylase activity can accumulate about 477 unit/ml(average) by 1.5m^3 fermentor under suitable conditions, it was 40.6% higher than old strain. The bacterial broth were obtained by article method can be fast filtered by plate filter, recovery of filtration was about 95%. The total recovery of purification of enzyme was about 78%.

Key words

Maltose medium; α -amylase