

在 5L 自控发酵罐内热稳定 β -淀粉酶的发酵

周蓓芸 郑幼霞

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

β -淀粉酶是一种外切型淀粉水解酶,它从淀粉的非还原性末端依此水解 α -1,4 葡萄糖苷键,产生 β -构型的麦芽糖,在食品、医药工业上有很大用途,但目前工业上使用的 β -淀粉酶大多为植物来源。微生物 β -淀粉酶的研究自 70 年代以来陆续有文献报道^[1-6],但至今未有理想的工业生产菌株推出。我们实验室经过前几年的研究,已得到一株热稳定 β -淀粉酶的产生菌株^[7],但以往的发酵研究都在摇瓶内进行,就生产应用而言,必须进行自控小罐的发酵条件试验,以便逐级放大进行中试,最后达到生产规模。本文报道热稳定 β -淀粉酶产生菌高温放线菌 A61 菌株在 5L 自控发酵罐内的发酵条件优化研究

1 材料和方法

1.1 菌种

高温放线菌 A61 菌株^[8](*Thermoactinomyces* sp. A61)由本实验室保藏

1.2 培养基

SP 斜面培养基,ST 发酵培养基^[8]

1.3 试验装置

使用 5L BioFlo III 发酵罐(New Brunswick Scientific Co., Inc. NBS),能调节温度,搅拌速度,溶氧(DO_2),消泡剂及营养物加入,装备有高级发酵软件(AFS, NBS),通过电脑(IBM ps/value point)进行控制和记录。

1.4 培养条件

菌株接种在 SP 试管(ϕ 3cm)斜面上(55℃, 48h), 4℃ 冰箱保存,一支试管斜面的孢子接种 10 只 250ml 三角烧瓶(内装 50ml ST 发酵培养基),振荡培养(45℃, 300r/min, 17~19h),取 8 瓶作为种子以 10% 接种量接入 5L 自控发酵罐内(内装 3.6L ST 培养基,4 ml 消泡剂,121℃ 高压蒸汽消毒 30min)。发酵恒定条件为:温度 45℃, pH7.1(用 1mol/L NaOH 调节),通气量为每分钟每升培养基 1L。

1.5 测定方法

1.5.1 β -淀粉酶活力测定:参考文献^[7]。酶活力单位定义为在测定条件下每小时每 ml 发酵液产生 1mg 麦芽糖的酶量为一个酶活力单位(u)。

1.5.2 生长测定:在 650nm 处测 OD 值表示。

1.5.3 还原糖测定:用 3,5-二硝基水杨酸法测定^[9]。

2 结果与讨论

2.1 起始搅拌速度的测定

高温放线菌 A61 菌株是丝状菌,且其菌丝比一般放线菌细,为避免菌丝被翼轮搅拌时产生的剪切力打断,首先测定转速对菌丝的生长及菌株产 β -淀粉酶情况。结果如图 1 所示:高温放线菌 A61 菌株在起

始生长时需较温和的条件,起始转速 200r/min 以上则由于剪切力太高而使菌丝不能生长发育,起始转速 150r/min 以下则都能使菌体开始生长。且当菌丝生长达到对数中期后,搅拌速度提高至 500r/min 以上也对生长无任何影响(图 2),这可能是因为当接入种子后,种子的菌丝被搅拌打断,然后重新发育,这时需较温和的环境条件,而当菌丝开始生长发育后,则对搅拌速度就不太敏感了。实验也说明:起始转速不能太低。用 80r/min 及 100r/min 时,菌体生长比 150r/min 时缓慢,停滞期长,生长量小,产酶周期同样变长且酶活力低,用 150r/min 时则最为理想,经 20min 的停滞期后菌丝便迅速生长进入对数期,生长旺盛,发酵 24h 后达到产酶高峰。由此可确定发酵试验的起始转速为 150r/min。图 1 的结果也显示:溶氧水平设定以 50% 为好,虽然起

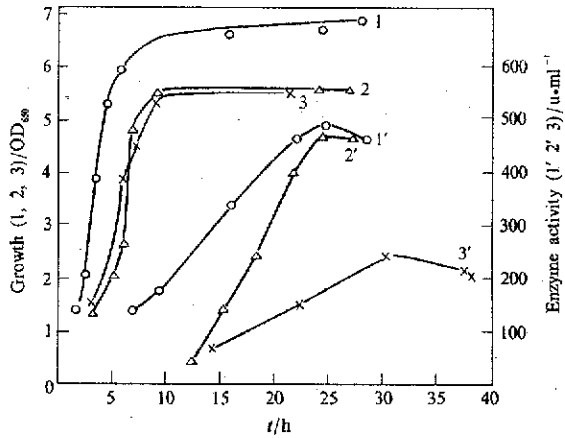


图 1 不同起始转速对生长与产酶的影响
Fig. 1 Effect of different initial agitation speed on growth and enzyme activity.

Agitation speed/r. min ⁻¹	1, 150	DO ₂ /%	50
	2, 80		50
	3, 100		30

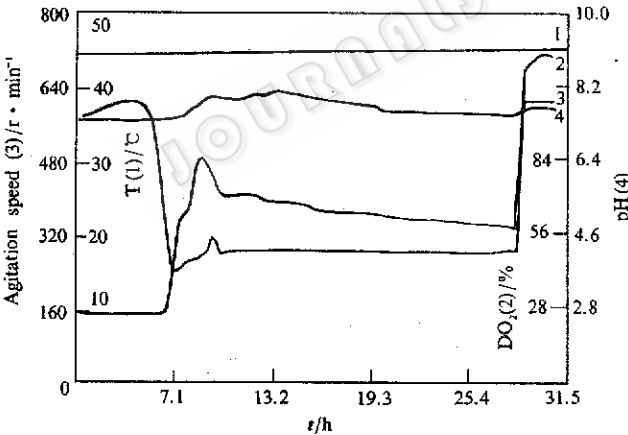


图 2 发酵过程中搅拌,溶氧,温度和 pH 变化
Fig. 2 Typical profile of agitation, DO₂, temperature and pH during computer-controlled culture

始转速为 80r/min,但菌体生长比在 30%溶氧,100r/min 起始转速条件下要快,24h 达到产酶高峰,后者产酶速度慢得多,30h 才达到产酶高峰,且酶活力很低。由此可见,溶氧对产酶的影响比对生长的影响更大,在溶氧设定时,以 50% 较为理想。BioFloIII 的先进功能之一是在培养过程中,由于细菌大量生长使培养基内的溶氧量低于设定的 50% 或培养后期由于细菌大量老化使溶氧量多于设定的 50% 时,可自动提高或降低转速使溶氧水平维持在设定水平。

2.2 放罐时间的确定

从以上试验已经可知用发酵罐生产热稳定 β-淀粉酶的周期大至

在 24h 左右,比摇瓶的 48h 缩短了近一半时间。显微镜观察在这一阶段菌丝已呈老化断裂,无明显的网状菌丝形态,对氧的利用自生长达稳定期后逐渐下降,因此为维持 50% 溶氧水平,搅拌速度从生长高峰的 500r/min 左右逐渐下降到 300r/min 左右(图 2)。在此状态下,将搅拌速度提高到 600r/min 并维持 3h,酶活力测定结果显示:600r/min 保持 1~2h 后酶活力迅速提高,幅度在 20% 以上,3h 后又有所下降,说明在将转速提高至 600r/min,并于 2h 后放罐较好。

通过反复的试验发现,在发酵进行到 16h 时将转速提高到 600r/min 然后在 18h 放罐较为理想(图 3)。

此时,细胞内 β -淀粉酶的合成已达到高峰并在胞内有结果,菌丝也已老化,当转速提高到 600r/min 后菌丝发生断裂,细胞破碎, β -淀粉酶完全释放出来。放罐时间的确定还可以通过另一个指标来显示,由于 β -淀粉酶水解淀粉产生还原糖,随着发酵时间的延长, β -淀粉酶的含量升高导致发酵液内还原糖的含量越来越高。从图 2 可知当还原糖含量达到最高并稳定 5h 后,将转速提高到 600r/min,2h 后再放罐是最佳放罐时间选择,一个容易掌握的确定发酵时间的指标。

综合上述发酵条件试验,已得到高温放线菌 A61 菌株在 5L 自控发酵罐内产生热稳定 β -淀粉酶的较优条件。几罐发酵液热稳定 β -淀粉酶活力最高达 1608, 1288, 1311u/mL;与对照 48h 的摇瓶发酵单位 1396, 1028, 838u/mL 相比,酶活力提高及发酵周期缩短均是显著的。典型的溶氧水平,搅拌,温度记录如图 2 所示。可以看到将搅拌速度提高到 600r/min 时, pH 升高,这是由于细胞破裂,细胞质外溢的缘故。

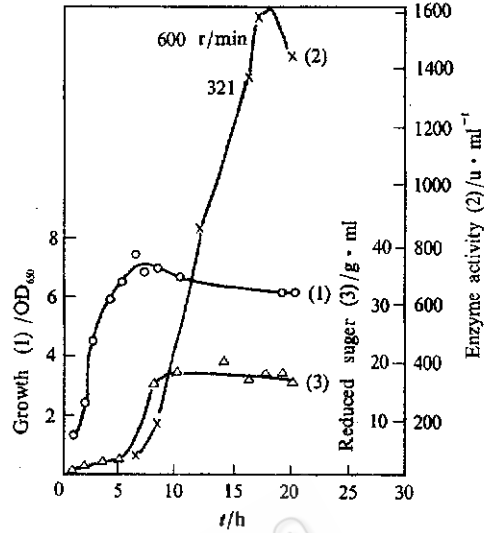


图 3 发酵周期的确定

Fig. 3 Selection of fermentation period

参 考 文 献

[1] Obi S K C *et al.* Appl Environ Microbiol, 1984, 47(3):571~575.
 [2] Nipkow A, Chen G J, Zeikus J G. Appl Environ Microbiol, 1989, 55(3):689~694.
 [3] Castro G R, Ferrero M A, Abate C M *et al.* Biotechnol. Lett., 1992, 14(1):49~52.
 [4] Chatterjee B, Ghosh A, Das A. J Appl Bacteriol, 1992, 72(3):208~213.
 [5] Wang M J, Yu R C. J Ferment Bioeng, 1994, 77(3):243~247.
 [6] Kwan H S, So K H, Chan K Y *et al.* World J Microbiol Biotechnol 1994, 10(5):597~598.
 [7] 周蓓芸, 郑幼霞. 生物工程学报, 1991, 7(2):148~153.
 [8] 周蓓芸, 郑幼霞. 生物工程学报, 1994, 10(3):258~262.
 [9] 蔡武城, 袁厚积. 生物物质常用化学法分析, 北京: 科学出版社, 1982, pp. 8~9.

Fermentation Test of Thermostable β -amylase in 5L Computer-controlled Bioreactor

Zhou Beiyun Zheng Youxia

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)

Abstract The optimal fermentation condition of thermostable β -amylase from *Thermoactinomyces* sp. A61 is: temperature 45°C, pH7.1, air lL/lL medium per min, inoculum of 17~19h culture 10%, initial agitation speed 150 r/min, dissolved oxygen set 50%; Turn up the agitation speed to 600 r/min and last 2h when the enzyme reached the highest or the content of reduced sugar in the fermentation broth was the highest and maintained 5h, the enzyme accumulated within the cells released out and so the enzyme increased up to 20%. The overall fermentation period is 18h, 30h shorter than that in the flask.

Key words Thermostable β -amylase, fermentation, computer-controlled-bioreactor