

耐酸耐热普鲁兰酶菌株的筛选及发酵条件的研究

唐宝英 朱晓慧 刘佳

(江苏省微生物研究所 无锡 214063)

摘要:从土壤中分离出一株产普鲁兰酶的菌株,初步鉴定为芽孢杆菌,通过紫外及 EMS 多次诱变及筛选,酶活从 1.6u/mL 提高到 5.4u/mL。在此基础上对产酶条件进行了优化,酶活有了较大提高,最高产酶水平达 8.8u/mL。初步研究了酶的性质,酶反应的最适温度和 pH 分别为 75°C 和 4.6,在 55°C 反应条件下,酶在 pH4.0~8.0 范围内活性稳定。

关键词:普鲁兰酶,芽孢杆菌,诱变,产酶条件和酶的性质

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)-01-039-06

SELECTION OF THE ACID AND HEAT-RESISTANT PULLULANASE-PRODUCING STRAIN AND ITS FERMENTATION CONDITIONS

TANG Bao-Ying ZHU Xiao-Hui LIU Jia

(Jingsu Institute of Microbiology, Wuxi 214063)

Abstract: A strain producing pullulanase was isolated from soil and mutated by UV and EMS with the increase of pullulanase activity from 1.6 to 5.4 u/mL. The fermentation conditions and medium were studied and optimized. The enzyme activity can reach 8.8 u/mL under the optimal fermentation conditions and medium. The optimal pH and temperature for enzyme are 4.6 and 75°C respectively. It shows a high stability during pH4.0~8.0 at 55°C.

Key words: Pullulanase, *Bacillus*, Mutation, Enzyme formation and properties.

普鲁兰酶(Pullulanase, EC. 3. 2. 1. 41)是一种能够专一性切开支链淀粉分支点中的 α -1.6 糖苷键,从而剪下整个侧枝,形成直链淀粉的脱支酶^[1]。普鲁兰酶可以将最小单位的支链分解,最大限度的利用淀粉原料。因此,它在淀粉加工工业中有着重要的用途。普鲁兰酶与糖化酶并用时,可使 DE 值大到 97%~98%,从而大大提高了葡萄糖收率;当它与 β -淀粉酶并用时,几乎可以将淀粉 100% 地转化成麦芽糖,从而可以生产出 0.8g/mL 以上的超高麦芽糖浆;在啤酒生产中添加普鲁兰酶可提高糖的利用率、缩短糖化时间。目前,我国工业上所用的普鲁兰酶均是从丹麦的 NOVO 公司进口,世界上也只有该公司具备了普鲁兰酶的工业化生产能力。由于该公司生产的普鲁兰酶的最适 pH 为 4.5~5.5,与糖化酶的最适 pH 相近,受到特别的欢迎。因此,价格相当昂贵。我国早在七十年代就筛选到了产普鲁兰酶的菌株,但由于该菌株所产的普鲁兰酶最适 pH 为 5.5~6.0,与糖化酶的最适 pH 不符,且在 pH<5 易失活,所以没有得到广泛应用。为了改变对进口产品的依赖,寻找一条国产化的道路,本研究从土壤筛选着手,在筛选到产酶菌株的基础上,对产酶菌种进行了一系列

的研究,最终得到一株产耐酸(pH4.6)、耐热(75℃)普鲁兰酶的优良菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源:从分离自本所中试车间下水道酸性污泥、所附近菜园土、本所院内土壤样品的200余株细菌中筛选产耐酸耐热普鲁兰酶的菌株。

1.1.2 培养基:液体培养基:糯米淀粉 10.0g,蛋白胨 5.0g,酵母膏 5.0g, KH_2PO_4 0.5g, KH_2PO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g,加水溶解后定容至 100mL,调 pH5.0。

斜面培养基:糯米淀粉 10.0g,蛋白胨 5.0g,酵母膏 5.0g, KH_2PO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g,琼脂 20.0g,加水溶解后定容至 1000mL,调 pH5.0。

鉴别培养基:普鲁兰糖 3.0g,蛋白胨 5.0g, KH_2PO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g,琼脂 20.0g,加水溶解后定容至 1000mL,调 pH5.0。

发酵培养基:糯米淀粉 15.0g,蛋白胨 8.0g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0g, KH_2PO_4 1.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, NaCl 0.5g,加水溶解后定容至 1000mL,调 pH6.5。

1.2 方法

1.2.1 菌种分离初筛方法^[2,3]:将土样 10g 用 30mL 无菌生理盐水浸泡 1h,摇匀,吸 1.0mL 于液体培养基中,30℃振荡培养 18~20h,取培养液稀释涂布分离培养基(同斜面培养基)平板,于 30℃温箱中培养 48h,用 0.1%稀碘液显色,将有兰色圈的菌落挑至斜面上,30℃培养 48h,然后转接到鉴别培养基平板上,在 30℃温箱培养 48h 后,将 10mL 无水乙醇倒入平皿,在室温放置 2~5h,培养基中的普鲁兰糖在乙醇作用下沉淀,形成乳浊色背景,菌落四周的底物被普鲁兰酶降解,形成透明圈,将有透明圈的菌落的菌号记下,供摇瓶筛选用。

1.2.2 紫外诱变方法:将在液体培养基中振荡培养 14h 的培养液用离心沉淀法收集菌体,并用 pH7.0 的磷酸缓冲液洗涤 2 次,将菌泥用 pH7.0 磷酸缓冲液洗入含玻璃珠的无菌三角瓶中,振荡打散后用无菌滤纸漏斗过滤。取菌悬液进行血球计数,调整菌浓度为 10^8 个/mL 左右,取 10mL 菌液于无菌培养皿中,于 30W 紫外灯下距离 30cm 分别照射 1、1.5、2、2.5 和 3min,将处理液分别稀释 $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 涂布平板,30℃温箱避光培养 48h。

1.2.3 甲基磺酸乙酯(EMS)诱变方法:菌液制备方法同紫外诱变。取 10mL 菌悬液于无菌三角瓶中,加入 0.1mL EMS,在 30℃处理 60min,加入 25%的硫代硫酸钠 5mL 终止反应,处理液稀释 $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 涂布平板,倒置于 30℃温箱培养 48h。

1.2.4 菌种特征鉴定:主要依据《一般细菌常用鉴定方法》^[4]和《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)^[5]进行初步鉴定。

1.2.5 酶活测定方法:参照文献[6]并稍加改动。

取 0.5g 普鲁兰糖(Sigma)产品溶于 0.1mol/L 醋酸缓冲溶液(pH=4.6)中,定容至 100mL,得浓度为 5g/L 的普鲁兰糖溶液,吸此溶液 1.0mL 和 1.0mL 稀释酶液于试管中混匀,于 55℃水浴中反应 30min,测定反应混合液的还原力(用 DNS 法),一个酶活力单位定义为:在上述条件下每分钟分解普鲁兰糖所释放的还原碳水化合物,其还原力相当于 $1\mu\text{mol}$ 葡萄糖所需的酶量。

1.2.6 粗酶提取方法:发酵液离心,取上清液用硫酸铵进行盐析(硫酸铵浓度为 70%饱和度),4℃静止过夜,离心收集沉淀物,溶于少量缓冲液(0.05mol/L 醋酸-醋酸钠, pH4.6)中,对同样缓冲液透析,即得到粗酶液。

2 结果与分析

2.1 菌种筛选和诱变

通过土壤分离,选到了200多株产酶菌株,把它们转接到含普鲁兰糖的鉴别培养基上进行确认,选到了48株产普鲁兰酶的菌株。经过摇瓶初筛、复筛,选到了一株产普鲁兰酶较高的菌株134号,酶活为 1.6u/mL ,该菌株筛自本所中试车间下水道酸性污泥。以134号为出发菌株进行紫外诱变,经过筛选,得到一株编号为UV-176的菌株,其酶活达 3.6u/mL ,比出发菌株高出一倍多。再以UV-176为出发菌株,经甲基磺酸乙酯进行处理,通过大量的分离筛选,获得一株产酶最高的菌株,编号EM-24-19,其酶活为 5.4u/mL 。

2.2 EM-24-19的特性

EM-24-19是经土壤分离并进行诱变处理后筛选获得的产普鲁兰酶菌株,经测定,它的生长pH范围为 $4.0\sim 9.0$,细胞杆状,大小为 $0.5\sim 0.8\mu\text{m}\times 2.5\sim 4.5\mu\text{m}$,革兰氏染色阳性,周生鞭毛,运动,芽孢中生,椭圆形($0.2\sim 0.3\mu\text{m}\times 0.3\sim 0.5\mu\text{m}$),明胶液化阴性,接触酶阳性。根据《伯杰细菌鉴定手册》(第八版),初步断定菌株EM-24-19属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

2.3 产酶条件

2.3.1 碳源对发酵产酶的影响:在发酵培养基中加入一定量的不同碳源,保持其它成分不变,在相同接种量、相同培养条件下摇瓶发酵,测定酶活,结果见图1。

从图1可看出,糯米淀粉对产酶最有利,蔗糖不利于产普鲁兰酶。以糯米淀粉为碳源,采用不同的加量,保持其它条件不变进行摇瓶,结果见图2。从图2可以看出,糯米淀粉含量过高过低都不利于菌种产酶,培养基中最适的糯米淀粉含量为2%。

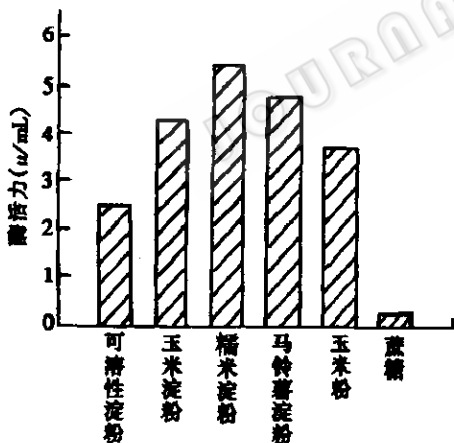


图1 不同碳源对产酶的影响

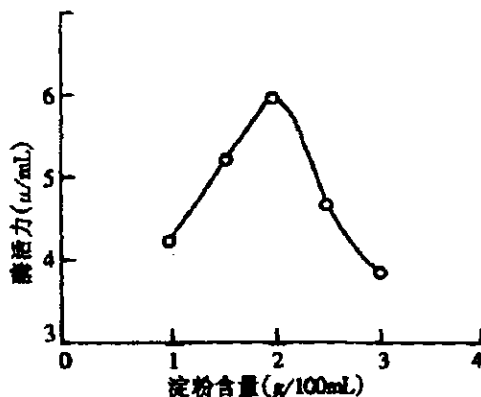


图2 糯米淀粉添加量对产酶的影响

2.3.2 氮源对发酵产酶的影响:为了研究氮源对产酶的影响,分别选取了几种常用无机和有机氮源进行研究,结果见图3。

从图3可看出,有机氮比无机氮源产酶高得多,说明有机氮源有利于该菌产酶,另外可看出,有机复合氮源产酶效果优于单一有机氮源,其中以1.0%蛋白胨和0.5%牛肉膏组合产酶最高。为了考察牛肉膏加量对产酶的影响,将1.0%蛋白胨分别与不同含量的牛肉膏组合进行摇瓶发酵试验,结果见图4。从图4可看出,牛肉膏加量1.0%~1.5%,酶活均较高,考虑到经济问题,以1.0%蛋

白蛋白+1.0%牛肉膏组合为最佳。

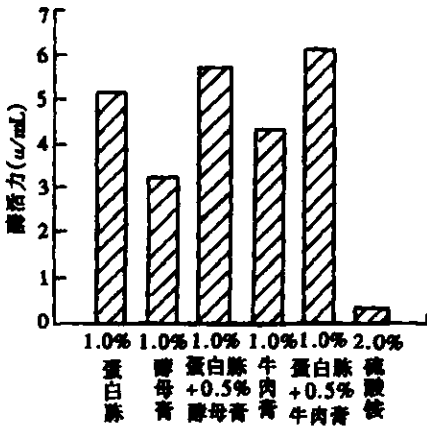


图3 不同氮源对产酶的影响

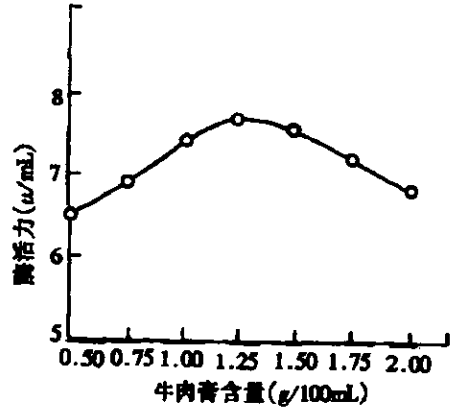


图4 牛肉膏添加量对产酶的影响

2.3.3 pH对发酵产酶的影响:为了考察pH对EM-24-19产酶的影响,我们采用相同的发酵培养基在不同的初始pH下接种等量的种子液,在相同的培养条件下摇瓶培养72h,测定发酵液的酶活,结果见图5。从图5可以看出,在酸性条件下(pH<6),菌种产酶不高,在微酸性条件下菌种产酶量相对较多,说明发酵培养基维持在微酸性条件下有利于产酶,最佳产酶pH为6.5左右。

2.3.4 通气量对产酶的影响:普鲁兰酶的发酵是一个好氧过程,为了考察通风量对产酶的影响,我们用250mL三角瓶分别装15、20、25、30、35、40mL的培养基,灭菌后接入8%的种子液,于30±1℃振荡培养72h,检测酶活。结果表明,装液量为20mL时产酶最高。

2.3.5 发酵时间对产酶的影响:通过培养基优化试验得最佳产酶培养基为:糯米淀粉20.0g,蛋白胨10.0g,牛肉膏10.0g,KH₂PO₄1.0g,MgSO₄·7H₂O0.5g,FeSO₄·7H₂O0.01g,pH6.5。以此为发酵培养基,接入8%的种子液,分别培养不同的时间,检测酶活,结果见图6。从图6可看出,发酵72h产酶最高。

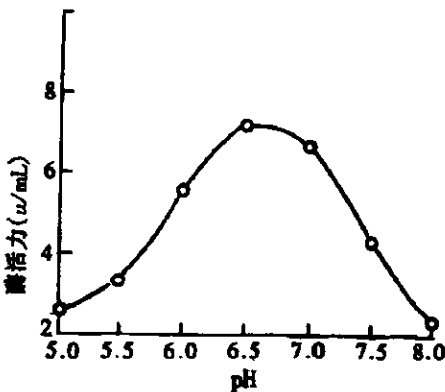


图5 pH对产酶的影响

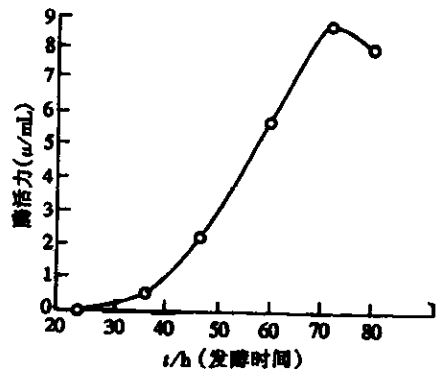


图6 菌体产酶过程曲线

2.4 酶性质的初步研究

2.4.1 酶反应的最适 pH: 将酶液与底物在不同缓冲液中进行反应(0.1mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH4.0~5.8; 0.05mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液, pH6.0~8.0; 0.05mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液, pH9.0~12.0), 按普鲁兰酶测定法测定酶活力, 结果表明, 该酶最适反应 pH 为 4.6~5.0, 在 55℃ 反应条件下, 该酶在 pH4.0~8.0 范围内酶活力保持最高酶活的 60% 以上。

2.4.2 酶反应的最适温度: 将酶液与底物在 pH4.6、0.1mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液中, 分别于不同温度(30℃~90℃)的水浴中保温 30min, 按普鲁兰酶测定法测定酶活力, 结果表明, 该酶最适反应温度为 75℃, 55℃ 时酶活力为最高酶活的 60% 以上, 90℃ 时酶完全失活。

3 讨论

通过土壤分离, 成功地分离到了产普鲁兰酶菌株 134 号, 其产酶水平为 1.6u/mL。以此为出发菌株, 经过紫外及甲基磺酸乙酯多次诱变, 选到了一株产酶较高的菌株 EM-24-19, 其产酶最高水平达 8.8u/mL。通过对培养基及培养条件的优化, 得到了最佳发酵培养基, 其配方为: 糯米淀粉 20g, 蛋白胨 10g, 牛肉膏 10g, KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, 定容水 1000mL pH6.5, 摇瓶发酵工艺条件为: 接种量 8%, 温度 $30\text{C} \pm 1\text{C}$, 摇瓶转速 220r/min, 发酵周期为 72h。

通过对发酵液盐析、透析处理后, 检测其在不同 pH 缓冲液中及不同反应温度下的酶活, 得出 EM-24-19 所产普鲁兰酶的最适反应 pH 为 4.6, 最适反应温度为 75℃, 是较理想的耐酸耐热普鲁兰酶。

对于普鲁兰酶的研究, 国内近期也有报道^[7,8], 但其所产普鲁兰酶的最适 pH5.5~6.5, 最适温度 40℃~55℃, 与糖化酶的最适 pH 不符。而本研究筛选到的产普鲁兰酶菌株, 其所产普鲁兰酶最适 pH(4.6)、最适温度(75℃)与目前国内使用的 NOVO 公司的普鲁兰酶相近, 且该酶具有一个宽的 pH 及温度稳定范围。以 EM-24-19 为出发菌株开展进一步的研究, 不断提高其产酶水平, 这对将来改变我国普鲁兰酶依赖进口的局面将具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 陈驹声, 胡学智. 酶制剂生产技术. 北京: 化学工业出版社, 1994.
- [2] Harada T. Appl Microbiol, 1968, 16: 1439~1444.
- [3] Morgan F J, Adams K R, Priest F G. J Appl Bacteriol. 1979, 46: 291~294.
- [4] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978.
- [5] Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Eighth Edition, 1984.
- [6] Madi E, Antranikian G, Ohmiya K, et al. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(7): 1661~1667.
- [7] 吴燕萍, 金其荣, 李 迅. 生物技术, 1998, 8(6): 14~17.
- [8] 金羽中, 顾国贤, 陆 健. 无锡轻工大学学报, 1999, 18(2): 33~38.