

α -淀粉酶中型和生产性试验

何纪春 赫春华 王凤云

(黑龙江省应用微生物研究所,哈尔滨)

王彦荣 李荣春

(黑龙江省肇东酶制剂厂)

前文报道了 α -淀粉酶高产菌株8a5的选育及其发酵条件试验^[1],本文报道中型和生产性试验结果。

材料和方法

(一) 菌种

枯草芽孢杆菌突变株8a5 (*Bacillus Subtilis* 8a5)。

(二) 培养基和培养条件

1. 试管斜面 and 茄瓶培养基(%)：可溶性淀粉1,牛肉膏1,蛋白胨1,NaCl 0.5,琼脂2,pH7.0。高压蒸汽灭菌30分钟。37℃培养24—36小时。

2. 种子罐培养基和培养条件

(1) 种子培养基(%)：玉米粉3,豆饼粉4,Na₂HPO₄ 0.8,(NH₄)₂SO₄ 0.4,NH₄Cl 0.15,pH自然。高压蒸汽120℃灭菌30分钟。

(2) 种子罐：中型试验使用的种子罐,容积130L,定容40L,搅拌转速350r/min。

生产性试验罐,容积1500L,定容600L,搅拌速度202r/min。

(3) 培养条件：培养温度37℃±1℃;罐压0.5kg/cm²;通气量(V/V):0—6小时,1:0.6;6—10小时,1:1.1;10小时以后,1:1.2。

培养时间为12—15小时;pH 6.3—6.6。

3. 发酵培养基和发酵条件

(1) 中型试验罐容积为2200L,定容800L,搅拌转速230r/min。生产性试验罐容积16.64吨,定容5吨。

(2) 补料罐：中试补料罐容积1.2吨,转

速为204r/min。生产性试验补料罐容积7吨,搅拌转速为130r/min。

(3) 发酵培养基(见结果部分)。

(4) 发酵条件：发酵温度,37±1℃,罐压为0.5kg/cm²,通气量见结果部分。

补料时间：一般在发酵8—10小时开始补料,前期少补,中期适当多补,后期多补。补料时间和补料的多少,主要取决于菌体的生长情况,菌体的大小和着色程度,有无空泡,空泡的多少而定。同时参考代谢的综合指标pH,尽量控制pH在6.7—6.8之间。

4. 分析方法

(1) 菌体生长量：使用721型光电比色计波长680nm,测定发酵液光密度值。

(2) α -淀粉酶活性测定：采用“轻工部工业用液化型淀粉酶活性测定法”测定^[2]。

(3) 总糖和还原糖测定：采用斐林法^[4]。

(4) 氨态氮测定：采用甲醛法^[4]。

(5) pH值：用精密pH试纸测定。

试验结果

(一) 中型试验

中型试验主要考查了发酵培养基的配比和通气量对发酵活力的影响。

1. 发酵培养基的不同配比试验结果：发酵培养基分为基础培养基和补料培养基两部分。发酵培养基,基础培养基和补料培养基中各种成分百分浓度比依次称为总配比,基料配比和补料配比,其体积分别称之总体积,基料体积和补料体积。发酵培养基,基料和补料的无机盐

表 1 发酵培养基不同配比试验

试验组	原料	总配比 (%)	总体积 (L)	基料配比 (%)	基料体积 (L)	补料配比 (%)	补料体积 (L)
一	玉米粉:豆饼粉	9:5	1200	7:5	800	13:5	400
二	玉米粉:豆饼粉	9:5	1200	5:5	800	17:5	400
三	玉米粉:豆饼粉	9:5	1200	5:6	800	17:3	400
四	玉米粉:豆饼粉	11:5.5	1200	5:6	800	23:4.5	400
五	玉米粉:豆饼粉	10:5	1200	5:5	800	20:5	400

表 2 发酵培养基的配比试验结果

实验组	配比			发酵结果					
	总配比	基料	补料	放罐体积 (L)	放罐酶活 (u/ml)	标准体积 (L)	折算酶活 (u/ml)	平均酶活 (u/ml)	平均周期 (小时)
一	9:5	7:5	13:5	1200	502	1200	502	502	38
二	9:5	5:5	17:5	1250	549	1200	571	556	45
				1200	542	1200	542		
三	9:5	5:6	17:3	1080	573	1200	515	522	40.5
				1120	567	1200	529		
四	11:5	5:6	23:4.5	1200	572	1200	572	540	41
				1200	508	1200	508		
五	10:5	5:5	20:5	1200	603	1200	603	601	50
				1200	600	1200	600		

浓度均为 (%) : Na_2HPO_4 0.8、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4、 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.4、 HN_4Cl 0.15, 其玉米粉和豆饼粉百分浓度见表 1。

通气量 (V/V): 0—10 小时, 1:0.5; 0—18 小时, 1:1.0; 18 小时到补料结束, 1:1:3; 补料结束以后, 1:1.1。

考查了三个总配比 (9:5、10:5 和 11:5.5) 和三个基料配比 (7:5、5:5 和 5:6), 其试验结果列于表 2。

表 2 结果说明: (1) 发酵培养基总配比 9:5, 基料配比 7:5, 5:5 和 5:6 的试验中, 基料配比 5:5 的发酵活力最高, 发酵周期最长, 而基料配比 7:5 的发酵活力最低, 周期最短。(2) 发酵培养基总配比 10:5 较 9:5 的发酵活力高, 但发酵周期较后者长。总配比 11:5 虽然比总配比 10:5 的浓度增加了, 但未见发酵活力提高。

2. 通气量试验: 根据发酵培养基配比试验, 选用了总配比 10:5, 基料配比 5:5, 补料配比 20:5, 进行了通气量试验, 其结果列于表 3。

通气量试验结果说明:

(1) 提高前期通气量, 虽然发酵活力有所下降, 但是大大地缩短了发酵周期, 从 50 小时

表 3 通气量试验*

实验组	通气量 (V/V)				酶活 (u/ml)	周期 (小时)
	0—10 小时	10—18 小时	18小时—补料结束至放罐			
一	1:0.5	1:1.0	1:1.3	1:1.1	601	50
二	1:0.7	1:1.0	1:1.3	1:1.1	536	40
三	1:0.7	1:1.1	1:1.3	1:1.1	467	33
四	1:0.6	1:1.1	1:1.3	1:1.1	533	36.5

* 除实验三为一次试验结果外, 均是两次试验结果平均值。

缩短到 40 小时。

(2) 提高前期风量和中期风量, 更进一步缩短了发酵周期, 但是发酵活力则明显的下降。

(3) 将前期风量又加以调整后, 即保证了较高的发酵活力水平, 又缩短了发酵周期。

3. 中型试验初步工艺及其结果

根据上述试验, 采用了发酵培养基总配比 10:5, 基料配比 5:5, 补料配比 20:5。通气量 (V/V): 0—12 小时, 1:0.6; 12—22 小时, 1:1.1; 22 小时到补料结束 1:1.3; 补料结束后 1:1.1。6 罐发酵试验结果列于表 4。

六罐平均酶活 529u/ml, 平均发酵周期 40.2

表 4 初步发酵工艺结果

批号	放罐 pH	酶活 (u/ml)	发酵周期 (h)
24	7.2	516	35
27	7.1	565	39
28	7.1	433	41
29	6.5	536	38
31	6.9	572	46
34	7.0	504	42

小时,最高酶活达到 572u/ml。8a5 菌中试发酵代谢变化过程见图 1(据发酵批号 34)。

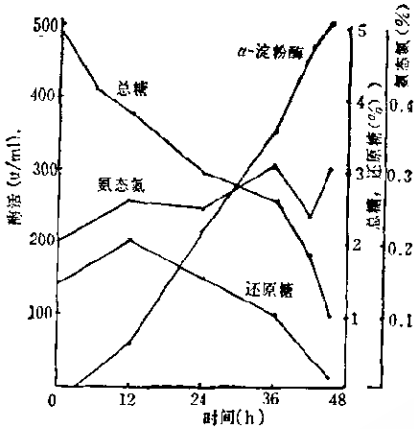


图 1 2200L 罐 8a5 菌株发酵代谢过程

(二) 生产性试验

在中型试验基础上,采用下列发酵培养基配比(%):玉米粉 5,豆饼粉 6, NaHPO₄ 0.8, (NH₄)₂SO₄ 0.4, CaCl₂·6H₂O 0.4, NH₄Cl 0.15。补料配比(%):玉米粉 23.5,豆饼粉 4.5,其他无机盐成份同上。

通气量 (V/V):0—10 小时,1:0.4; 10—18 小时,1:0.8; 18 小时到补料结束,1:0.93; 补料结束后 1:0.8。三批 16 吨罐生产性试验平均发酵单位 505 u/ml (表 5),达到了全国酶制剂 1985 年的 500 u/ml 规划指标,比全国 1983 年平均发酵单位 298.64u/ml 提高 69.1%。经济效益较显著。

讨 论

目前,国内细菌 α-淀粉酶的生产均采用低浓度发酵,高浓度补料的工艺^[2]。基础料配比不仅影响微生物的生长繁殖速度,而且对发酵 pH 的消长有一定的影响,一般说来氮源丰富,菌体生长快,pH 上升也快。如果培养基中的玉米粉和豆饼粉之比太大,发酵过程中 pH 过低,则无法补料,即不能保证菌体的持续生长,又不

表 5 三批 16 吨罐生产性试验结果

批号	种 子				发 酵			放罐酶活 (u/ml)	周期 (h)
	初 pH	种龄 (h)	种液 pH	种子酶活 (u/ml)	初 pH	终 pH	最高酶活 (u/ml)		
84-5	6.2	14	6.5	41	6.1	7.4	508	502	36
84-6	6.3	12	6.8	7	6.1	7.3	541	522	38.5
84-7	6.3	12	6.7	8	6.0	7.3	492	492	32

能达到诱导 α-淀粉酶形成的目的,反之,玉米粉和豆饼粉比太小则菌体生长和 pH 上升太快。为了维持生长和适宜的 pH 值,则不能在发酵前期大量补料,而达不到延长平衡期,提高发酵活力的目的。总之,只有适当的基料配比,才能进行合理的补料达到适当延长平衡期,提高 α-淀粉酶发酵活力水平的目的。但必须指出,通气量的改变对发酵培养基的配比也有一定的影响。进行生产性试验时,由于空气供应

不足而不得不改变发酵培养基的配比。通过预试验而选用基料配比 5:6 和补料配比 23.5:4.5 的配方进行了生产性试验。

补料是适当延长平衡期,增加 α-淀粉酶活力水平的一项重要措施。在发酵过程中补加适当比例的玉米粉和豆饼粉以及无机盐,一方面可以补充营养物质,维持菌体的持续生长繁殖,延长平衡期,另一方面,还能诱导 α-淀粉酶的形成和调节发酵的 pH 值。目前国内 α-淀粉

酶生产发酵培养基中的基料体积与补料体积一般为 3:1。据观察,诱变菌株 8a5 在发酵过程中一个明显的特性是,只要不断的补充营养物质,就能继续生长,不断的产生 α -淀粉酶。因此,将基础料与补料的体积比加大到 2:1,以延长平衡期,达到高产目的。是否可以进一步加大比例,尚待进一步试验研究。

参 考 文 献

- [1] 何纪春等:微生物学通报,13(2): 61—64,1986。
- [2] 无锡酶制剂厂等:遗传学报,3(3): 216,1976。
- [3] 中华人民共和国轻工业部部颁标准: QB746-747-80, 1981。
- [4] 天津轻工业学院等:工业发酵分析,轻工业出版社,北京, p.15—17,31—33。