

# 高产环糊精葡萄糖基转移酶菌株 发酵工艺条件优化

闵伟红, 丁茵, 方丽

(吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118)

**摘要:** 以筛选、诱变所获得的一株高产环糊精葡萄糖基转移酶 CGTase 的芽孢杆菌为出发菌株, 对其进行发酵工艺条件的优化。结果表明: 该菌株产 CGTase 的最佳条件为碳源 1% 可溶性淀粉、氮源 0.1% 酵母膏、碳酸盐 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、pH10、培养温度 33℃、接种量 3%、摇床转速 180r/min, 此条件下 CGTase 酶活为 2842U/ml。

**关键词:** 环糊精葡萄糖基转移酶; 工艺条件; 优化

## A Preliminary Study of Fermentation Conditions for Producing Cyclodextrin Glycosyltransferase by A High-yield *Bacillus* Strain

MIN Wei-hong, DING Yin, FANG Li

(College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**Abstract:** A high-yield *Bacillus* strain producing cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) has been screened and bred by our lab. In the present study, one-factor-at-a-time method was adopted to investigate the effects of medium components and fermentation conditions on CGTase production by the strain. The results showed that the optimal carbon source, nitrogen source and carbonate for the growth of the strain were 1% soluble starch, 0.1% yeast extract and 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , respectively. And the optimal fermentation parameters were determined as follows: initial pH of fermentation medium 10, fermentation temperature 33 °C, inoculation proportion 3%, rotation speed of shaker 180 r/min. A CGTase activity of 2842 U/ml was achieved under these conditions.

**Key words:** cyclodextrin glycosyltransferase; fermentation conditions; optimization

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)14-0160-03

环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)可以通过催化环化、耦合和歧化反应来降解淀粉, 将淀粉、麦芽低聚糖、糖原通过环化反应生成环糊精。环糊精(cyclodextrin, CD)是一种由多个脱水葡萄糖单元通过 $\alpha(1 \rightarrow 4)$ 糖苷键结合而成的环状低聚糖, 根据含有葡萄糖单元数量的不同可分为 $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD以及 $\gamma$ -CD<sup>[1-2]</sup>, 其分子结构为洞穴状, 具有内疏水、外亲水的独特性质, 可以广泛的包接客体分子, 由于其化学性质稳定, 无毒无味, 在医药、食品、化工等方面有广泛的应用价值。早在1986年, 日本的Kato等就报道了*Bacillus subtilis* No.313, 其 $\gamma$ -CD的产率只有5%<sup>[3]</sup>。2003年韩国的Lee等以嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus firmus* var. *alkalophilus*)为出发菌株, 通过诱变育种得到了高产的突变菌株, 将 $\gamma$ -CD的转化率由28.6%提高到39%<sup>[4]</sup>。我国1985年中科院微生物所从土壤中分离出嗜碱杆菌52-2, 酶活可达1600U/ml, 发酵产物中三种环糊精含量比为 $\alpha:\beta:\gamma=1:$

7.4:1.7<sup>[5]</sup>。2001年陕西微生物所杨国武等从新疆的土壤筛选出一株芽孢杆菌32-3-10,  $\alpha:\beta:\gamma=46:5:49$ , 其中 $\gamma$ -CD的转化率最大为2.9%<sup>[6]</sup>。本实验以筛选、诱变的一株高产CGTase的菌株为出发菌株, 研究其发酵产酶的最佳工艺条件, 为发酵获得环糊精葡萄糖基转移酶奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

发酵菌株: 实验室提供, 产环糊精葡萄糖基转移酶能力为2630U/ml。

化学试剂均采用国产分析纯。

基础发酵培养基: 玉米淀粉1%, 酵母膏0.1%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02%,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1%。

### 1.2 仪器与设备

AUY220型分析天平 Shimadzu Philippines公司;

收稿日期: 2008-06-25

作者简介: 闵伟红(1971—), 女, 副教授, 博士, 主要从事发酵工程与粮油科学与深加工技术研究。

E-mail: minwh2000@163.com

Z36HK 型冷冻离心机 德国 HERMLE 公司; 1700 型紫外分光光度计 日本岛津公司; SHP-250 型生化培养箱 上海精宏实验设备有限公司; HH-8 型数显恒温水浴锅 江苏省金坛市江南仪器厂; CL-32L 型高压蒸汽灭菌器 日本 ALP 公司; HZS-H 型水浴振荡器 哈尔滨东联电子技术开发有限公司; DL-CJ-2N 型超级洁净工作台 北京东联哈尔仪器制造有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 CGTase 酶活性的测定

取 10  $\mu$ l 发酵液, 加入 0.2mol/L 甘氨酸-NaOH-NaCl 缓冲液(pH8.55)0.2ml, 再加入马铃薯淀粉液 0.2ml, 振荡, 于 40 $^{\circ}$ C 水浴 10min, 立即加入 0.5ml/L 醋酸 0.5ml 终止反应, 然后加入 0.005% 碘液显色, 同时以蒸馏水为空白, 不加发酵液为对照, 在 700nm 波长下测定吸光度, 一个酶活单位定义为使吸光度下降 10% 的酶量<sup>[7-8]</sup>。

#### 1.3.2 发酵培养基的优化研究

##### 1.3.2.1 不同碳源对 CGTase 酶活力的影响

以基础发酵培养基中其他成分不变, 以 1% 玉米淀粉, 1% 马铃薯淀粉, 1% 可溶性淀粉作为培养基的碳源。接种量 3%, 于 180r/min, 37 $^{\circ}$ C 条件下摇瓶培养 2d, 测定 CGTase 酶活性, 确定合适产酶碳源。

##### 1.3.2.2 不同氮源对 CGTase 酶活力的影响

分别以 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% KNO<sub>3</sub>, 0.1% 酵母膏, 0.1% 蛋白胨作为氮源, 以 1% 可溶性淀粉为最佳碳源, 其他发酵条件同 1.3.2.1 节, 测定 CGTase 酶活性, 确定合适产酶氮源。

##### 1.3.2.3 不同碳酸盐对 CGTase 酶活力的影响

分别以 1% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、1% NaHCO<sub>3</sub> 做为碳酸盐, 以 0.1% 酵母膏为最佳氮源, 其他发酵条件同 1.3.2 节, 测定 CGTase 酶活性, 确定合适的产酶氮源。

#### 1.3.3 发酵工艺条件的优化研究

##### 1.3.3.1 初始最适 pH 值的确定

分别选择培养基初始 pH 值为 9.5、10、10.5、11, 以 1.3.2 节所获得的最佳培养基为发酵培养基, 其他发酵条件同 1.3.2 节, 确定合适初始 pH 值。

##### 1.3.3.2 最适发酵温度的确定

分别采用 30、33、36、39 $^{\circ}$ C 作为发酵温度, 初始培养基 pH 值为 10, 其他发酵条件同 1.3.3.1 节, 确定合适发酵温度。

##### 1.3.3.3 最适接种量的确定

分别采用 1%、2%、3%、4%、5% 作为接种量, 最适发酵温度 33 $^{\circ}$ C, 其他发酵条件同 1.3.3.2 节, 确定合适的接种量。

##### 1.3.3.4 最适摇床转速的确定

分别采用 150、180、210、240r/min 作为培养转速, 最适接种量为 3%, 其他发酵条件同 1.3.3.3 节, 确

定合适的发酵摇床转速。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵培养基的优化研究

#### 2.1.1 不同碳源对菌株产 CGTase 的影响

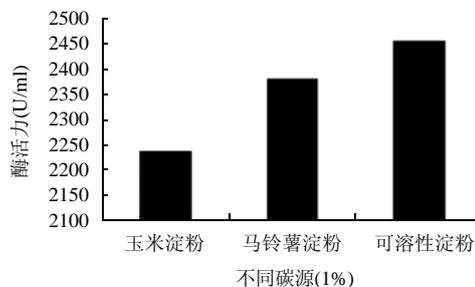
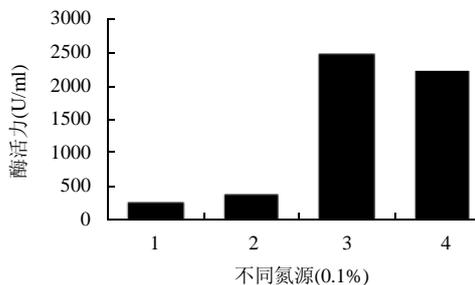


图 1 不同碳源对菌株产 CGTase 的影响

Fig.1 Effects of different carbon sources on production of CGTase

由图 1 可知: 不同碳源对酶活力的影响不同, 其中以 1% 可溶性淀粉为碳源, CGTase 酶活力最高为 2456U/ml; 其次为 1% 马铃薯淀粉, 酶活力为 2381U/ml; 而以 1% 玉米淀粉为碳源时, 酶活力仅为 2237U/ml。在下面的实验中, 采用 1% 的可溶性淀粉作为碳源。

#### 2.1.2 不同氮源对菌株产 CGTase 的影响



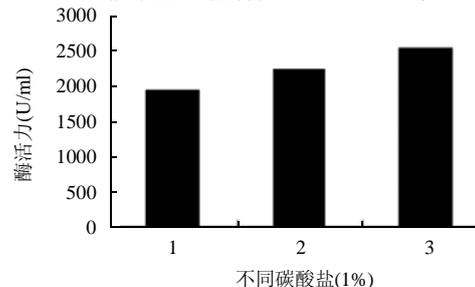
1.(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2.KNO<sub>3</sub>; 3.酵母膏; 4.蛋白胨。

图 2 不同氮源对菌株产 CGTase 的影响

Fig.2 Effects of different nitrogen sources on production of CGTase

由图 2 可知: 氮源为 0.1% 酵母膏时, CGTase 酶活力最高为 2473U/ml; 其次为 0.1% 蛋白胨, 酶活力为 2256U/ml; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 KNO<sub>3</sub> 的酶活力较低, 分别为 256、367U/ml。在下面的实验中采用 0.1% 酵母膏为氮源。

#### 2.1.3 不同碳酸盐对菌株产 CGTase 的影响



1.K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 2.Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 3.NaHCO<sub>3</sub>。

图 3 不同碳酸盐对菌株产 CGTase 的影响

Fig.3 Effects of different carbonates on production of CGTase

由图3可知:最佳碳酸盐为1%的 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 时,酶活力最高为2538U/ml;其次为1%的 $\text{NaHCO}_3$ ,酶活力为2248U/ml;1%的 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 的酶活力最低为1935U/ml。在下面的实验中采用1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 为碳酸盐。

## 2.2 不同发酵工艺条件对菌株产CGTase的影响

### 2.2.1 培养基不同初始pH值对菌株产CGTase的影响

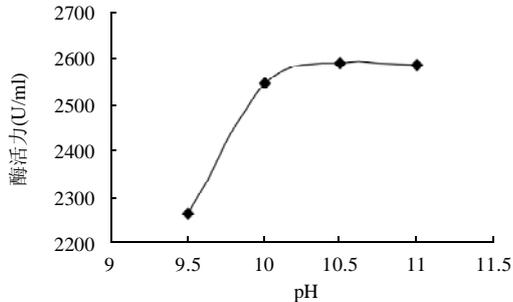


图4 初始pH值对菌株产CGTase的影响

Fig.4 Effects of initial pH value of fermentation medium on production of CGTase

培养基中含有的 $\text{H}^+$ 和 $\text{OH}^-$ 通过解离细胞外的弱酸或弱碱,形成游离态,易透过细胞膜进入细胞内,可间接的影响微生物的生长和代谢。图4为培养基不同初始pH值对菌株产CGTase影响的研究,结果表明,当pH值在9.5~10.5之间时,酶活力升高幅度较大,最高酶活力可达2590U/ml,在以后的发酵过程中,选取培养基最适初始pH值为10。

### 2.2.2 不同培养温度对菌株产CGTase的影响

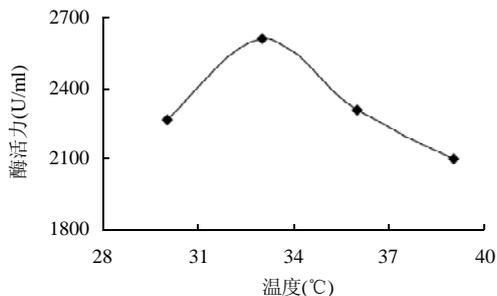


图5 培养温度对产CGTase的影响

Fig.5 Effects of fermentation temperature on production of CGTase

由图5可知:随着培养温度的提高,开始时CGTase酶活力提高,当培养温度为33°C时,酶活力达到最大2614U/ml,继续提高培养温度,酶活力快速下降,因此确定33°C为最适培养温度。

### 2.2.3 不同接种量对菌株产CGTase的影响

由图6可知:随着接种量的增加,有利于菌体生长,产酶活力也随之提高,当接种量为3%时,酶活力达到最高为2672U/ml,继续增加接种量,酶活不再提高而呈下降趋势,说明当菌体浓度过大时,对菌株产酶有一定的抑制作用。

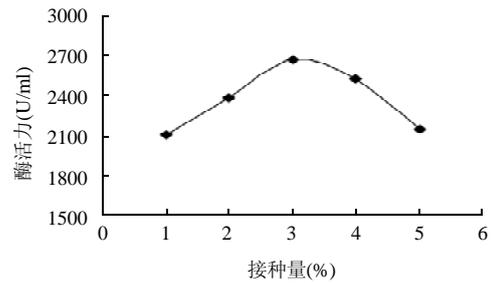


图6 接种量对菌株产CGTase的影响

Fig.6 Effects of inoculation proportion on production of CGTase

### 2.2.4 转速对菌株产CGTase的影响

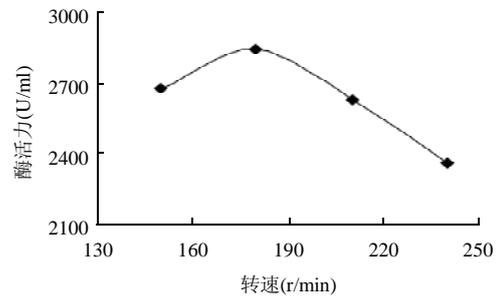


图7 转速对菌株产CGTase的影响

Fig.7 Effects of rotation speed of shaker on production of CGTase

图7为转速对菌株产CGTase影响的研究,由图7可知,转速为180r/min时,酶活最高为2842U/ml。随着转速的升高,酶活力逐渐下降。

## 3 结论

本实验通过对高产环糊精葡萄糖基转移酶产生菌进行营养条件和培养条件的优化,确定该菌最佳发酵工艺条件为:碳源1%可溶性淀粉,氮源0.1%酵母膏,碳酸盐1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH10, 培养温度33°C, 接种量3%, 摇床转速180r/min。此条件下CGTase酶活力为2842U/ml,比优化前酶活力提高了212U/ml。

## 参考文献:

- [1] FRENCH D, RUNDLE R E. The molecular weights of the schardinger alpha and beta dextrins[J]. J Am Chem Soc, 1942, 64: 1651-1653.
- [2] FREUDENBERG K, CRAMER F. Die Konstitution der schardinger dextrin alpha, beta dextrin, and gamma[J]. Z Naturforsch B, 1948, 3: 464-468.
- [3] KATO T, HORIKOSHI K. Cloning and expression of the *Bacillus subtilis* No. 313  $\gamma$ -cyclodextrin forming CGTase gene in *Escherichia coli*[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1986, 50(8): 2161-2162.
- [4] LEE K W, SHIN H D, LEE Y H. Catalytic function and affinity purification of site-directed mutant  $\beta$ -cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus firmus* var. alkalophilus[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003, 26(1): 157-165.
- [5] YANG S J, GE S G, ZENG Y C, et al. Inactivation of ( $\beta$ -Glucosidase by the active site directed inhibitor,conduritol  $\beta$ epoxide[J]. Biochem Biophys Acta, 1985, 828: 236-240.
- [6] 杨国武,李皎,谢薇梅,等.  $\gamma$ -环状糊精生产用菌的筛选及初步鉴定[J]. 西北大学学报:自然科学版, 2002, 32(2): 214-216.
- [7] NAKAMURA T, NAGATOMO Y, HAMADA S, et al. Occurrence of two forms of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* mutant 817 [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1994,78(2): 134-139.
- [8] 王俊英,钞亚鹏,关东明,等. 一种 $\alpha$ 环糊精葡萄糖基转移酶的纯化及性质研究[J].中国生物工程杂志, 2008, 28(7): 67-70.