

嗜碱芽孢杆菌产环糊精葡萄糖基转移酶 发酵条件的优化

曹新志, 金征宇

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 对一株嗜碱芽孢杆菌产环糊精糖基转移酶的发酵条件进行了研究。利用单因素试验和正交试验获得该菌株产环糊精糖基转移酶的最佳条件为: 接种量 3%; 培养温度 30℃; pH10.5; 发酵培养基的组成为玉米粉 2%, 酵母膏 1.5%, 玉米浆 5%; 250ml 三角瓶装液量为 30ml; 270r/min 振荡培养 3d, 其发酵液酶活可达 5400U/ml 左右。10L 罐发酵时酶活可达 5820U/ml。

关键词: 嗜碱芽孢杆菌; 环糊精糖基转移酶; 发酵条件; 优化

Optimization Study on Cyclodextrin Glycosyltransferase Production by *Bacillus alkalophilus*

CAO Xin-zhi, JIN Zheng-yu

(College of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Conditions of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) production by *Bacillus alkalophilus*12-7 were studied. The optimal fermentation conditions for cyclodextrin glycosyltransferase production were determined by a single-factorial experiment and orthogonal experiment. The results showed that the optimal conditions were as follows: amount of inoculum is 3%; incubation temperature 30℃; pH 10.5. The compositions of fermentation medium were maize powder 2%, yeast extract 1.5% and corn steep liquor 5%. The load of 250ml-flask was 30ml and the shaking incubation took 3d at 270r/min and the enzyme activity could reach to 5400 U/ml. In 10L-fermentor the enzyme activity could reach as high as 5820U/ml.

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

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0122-05

收稿日期: 2004-02-20

作者简介: 曹新志(1965-), 男, 副教授, 博士研究生, 研究方向为食品生物技术。

- 研究进展[J]. 中成药, 1993, 15(6): 6-7.
- [4] 朱自强. 超临界流体技术——原理和应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [5] Hans Berg, Charlotta Turner, Lena Dahlberg, et al. Determination of food constituents based on SFE: applications to vitamins A and E in meat and milk[J]. J Biophys Methods, 2000, 43: 391-401.
- [6] Russell Thiering, Fariba Dehghani, Nei R. Foster. Current issues relating to anti-solvent micronisation techniques and their extension to industrial scales[J]. Journal of supercritical fluid, 2001, 21: 159-177.
- [7] 潘见, 杨克, 张文成. 超临界 CO₂ 萃取天然产物技术及发展[J]. 精细与专用化学品, 2001, 14: 14-16.
- [8] Jaw-Shin Cheng, Muoi Tang, Yan-Ping Chen. Correlation of solid solubility for biological compounds in supercritical carbon dioxide: comparative study using solution model and other approaches[J]. Fluid Phase Equilibria, 2002, 194-197: 483-491.

环糊精葡萄糖基转移酶(cyclodextrin glycosyltransferase, 简称为 CGTase, E.C.2.4.1.19)从淀粉和其它 α -1,4- 葡聚糖合成非还原性的麦芽低聚糖即环糊精(CDs)。CDs 有三种主要的类型, 它们分别是由 6、7 和 8 个 α (1 \rightarrow 4)糖苷键连接的 α -CD, β -CD 和 γ -CD。环糊精是一种具有内疏水外亲水的筒形结构。因此, 它们能与许多疏水客体化合物或功能基团形成包合物^[1]。从而改变其物理或化学性质。环糊精这种独特的性质使其在食品、医药、农业、化妆品、化学、环保等领域有广泛的应用^[2~6]。 β -CD 的生产已工业化, 但是 β -CD 的低溶解性(1.85%, 室温)和空腔较小(346Å)限制其广泛使用, γ -CD 有较高的溶解度(23.3%, 室温)和较大的空腔(510Å), 能包接较大的分子, 其应用情景看好, 然而 γ -CD 还不能工业化生产, 因为其低产率, 高成本导致的高价格限制其使用, 为了增加 γ -CD 的产率, 我们对一株嗜碱芽孢杆菌 1177 菌株经紫外线和 γ 射线诱变处理后, 经该法筛选得到突变株 7-12, 酶活显著提高, 在适当的反应条件下其 γ -CD 的产量显著提高, γ -CD 相对淀粉的转化率为 16% 左右, 达到了国际上公认的 11% 的指标, 目前国内报道的 γ -CD 的转化率最高为 2.9%^[7]。

本文对这株诱变处理后的产环糊精糖基转移酶的嗜碱芽孢杆菌的发酵条件进行了研究, 并优化了发酵条件。

1 材料与方法

1.1 菌株

嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus alkalophilus*7-12(由本实验室诱变获得)。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 马铃薯琼脂培养基。

1.2.2 平板培养基 可溶性淀粉 1%、酵母膏 0.2%、K₂HPO₄ 0.1%、Mg₂SO₄·7H₂O 0.02%、Na₂CO₃ 1%、琼脂 2%。

1.2.3 发酵基础培养基 可溶性淀粉 1%、酵母膏 0.2%、K₂HPO₄ 0.1%、Mg₂SO₄·7H₂O 0.02%、Na₂CO₃ 1%。

1.3 酶液的制备

摇瓶发酵 250ml 锥形瓶装入液体培养基 50ml, 接种量 2.5%, 在 29℃, 以 230r/min 摇瓶培养 3d, 发酵完毕后加入 CaCl₂ 至 pH7~8。振荡片刻, 在 300r/min 离心 15min 的上清液即为酶液。

1.4 生物量的测定

吸取 1ml 培养液, 加蒸馏水至 10ml, 于 560nm 波长处测定。

1.5 酶活性的测定

取 10 μ l 适当稀释的酶液, 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℃水浴 10min, 立即加入 0.5ml/L 醋酸 0.5 终止反应, 然后加入 0.005% 碘液显色, 同时以蒸馏水为空白, 不加酶液为对照, 在 700nm 波长下测定吸光度(OD), 一个酶活单位定义为使吸光度下降 10% 的酶量。按以下公式计算:

一个酶活单位(U/ml)= $\frac{a-b}{a} \times 1000 \times$ 酶液稀释倍数

式中: a 为对照组的吸光度, b 为样品的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 菌种发酵条件的研究

2.1.1 不同碳源对菌株产 CGTase 的影响

在基础培养基中改用不同的碳源, 培养 3d 后的生长和产酶情况见表 1。

表 1 不同碳源对菌株产 CGTase 的影响
Table 1 Effect of the different carbon source on the production of CGTase

碳源	酶活力(U/ml)
菊芋粉	4160
甘薯粉	4500
焦藕粉	4650
玉米淀粉	5200
玉米粉	5150
马铃薯淀粉	5070
可溶性淀粉	5350

用 1% 的不同来源的淀粉为碳源进行摇瓶发酵试验, 结果见表 1。可溶性淀粉为碳源时酶活力最高, 其它淀粉为碳源时所产酶活力相对都低, 但由于玉米粉是由玉米直接粉碎所得, 价格便宜, 来源广, 处理方便, 适合工业化生产, 因此我们选择玉米粉为碳源。

2.1.2 不同氮源对菌株产 CGTase 的影响

由表 2 可看出, 菌株能利用无机氮化合物, 但 CGTase 在这些营养素组成的培养基中产量很少。玉米浆是最合适的氮源, 玉米浆中含有大约 4% 的氮, 其中

表2 不同氮源对菌株产CGTase的影响

Table 2 Effect of the different nitrogen source on the production of CGTase

氮源	浓度(%)	酶活力(U/ml)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0	170
NH ₄ NO ₃	1.0	130
NH ₄ Cl	1.0	150
KNO ₃	1.0	173
NaNO ₃	1.0	216
酵母膏	1.0	4890
尿素	1.0	0
玉米浆	6.0	5120
蛋白胨	1.0	4700
脱脂豆饼	1.0	4500

表3 不同碳酸盐对菌株产CGTase的影响

Table 3 Effect of the different carbonate on the production of CGTase

种类	浓度(%)	pH 值	酶活力(U/ml)
NaOH	—	10.3	3240
(NH ₄) ₂ CO ₃	1	9.1	3190
K ₂ CO ₃	1	10.0	3600
NaHCO ₃	1	9.5	5048
NaCO ₃	1	10.4	5200

包括许多微生物生长代谢所必需的氨基酸,如赖氨酸、蛋氨酸等。玉米一方面满足了菌株对氮源的需要,同时也满足了对生长因子的要求,从而有助于菌株合成CGTase酶。

2.1.3 不同碳酸盐对菌株产CGTase的影响

用不同的碳酸盐作产酶试验,从表可看出菌株在碱性条件下能形成酶,但加NaCO₃和NaHCO₃的效果更好。

2.2 发酵工艺条件对产酶的影响

2.2.1 培养基初始pH对菌株产CGTase的影响

将菌种接入基础培养基后,用无菌NaOH或H₂SO₄调节到需要的pH值,先用pH试纸处测,最后用pH计测精确pH值。摇瓶发酵后测定酶活力,见图1,菌株是嗜碱菌,在pH7.0以下不生长,在pH9.5~11之间不仅生长速度快,而且产酶量也高。

2.2.2 培养温度对产酶的影响

不同温度下发酵3d测酶活。结果见图2,发现培养温度为30℃对产酶更有利。这与酶的最适反应温度(60℃)并不一致。

2.2.3 接种量对菌株产酶的影响

将新鲜培养的种子液以不同的接种量接种于发酵培

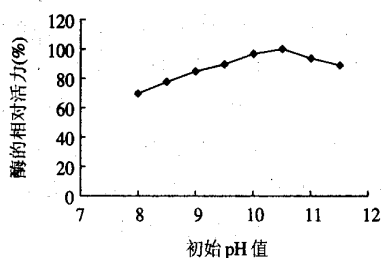


图1 初始pH对菌株产CGTase的影响

Fig.1 Effect of pH on the production of CGTase

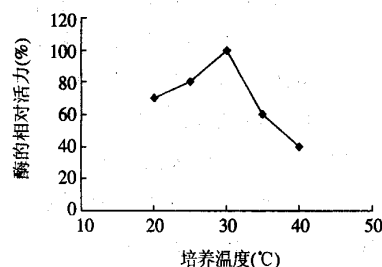


图2 培养温度对产CGTase的影响

Fig.2 Effect of temperature on production of CGTase

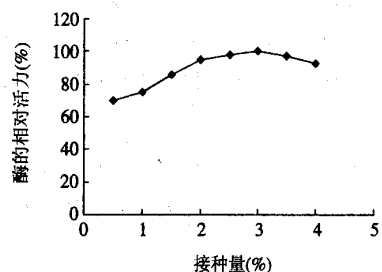


图3 接种量对菌株产CGTase的影响

Fig.3 Effect of amount of inoculum on the production of CGTase

养基中,培养3d后测定酶活力。由图3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,但当酶活力达到一定值后,继续增加接种量,酶活不再提高。酶活最高时的接种量3%。

2.2.4 装液量和转速对菌株产酶的影响

在250ml三角瓶装入不等量的发酵培养基,其它条件相同的情况下进行产酶试验,发现装液量对酶产量的影响较大,结果见图4。

在250ml三角瓶装入30ml的发酵培养基,其它条件相同的情况下以不同转速进行产酶试验,结果见图5。

从图4、5可看出,但当装液量增大或转速减慢时,菌种产酶活力降低,装液量越少或转速增大时,酶活力越高。这主要是因为嗜碱芽孢杆菌是好氧菌,当装

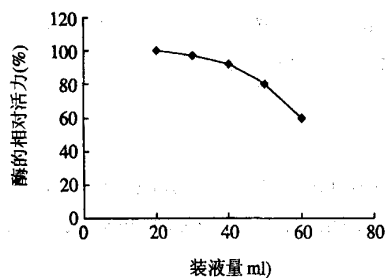


图4 装液量对产CGTase的影响
Fig.4 Effect of load on the production of CGTase

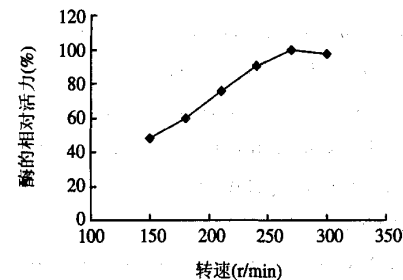


图5 转速对菌株产CGTase的影响
Fig.5 Effect of the rotate speed on the production of CGTase

液量较少或转速较快时，体系中供氧充足，溶解氧的增加更有利于菌体生长，从而也提高了菌株的产酶活力。

2.3 正交试验优化培养基

将培养基的主要成分玉米粉、酵母膏和玉米浆三个因素作三水平的正交试验。见表4、表5。

表4 正交试验 L ₉ (3 ³)因素水平			
Table 4 Factors and levels of orthogonal experiments			
水平	因素		
	A 玉米粉(%)	B 酵母膏(%)	C 玉米浆(%)
1	1.5	0.5	4
2	2.0	1.0	5
3	2.5	1.5	6

表6 正交试验的方差分析					
Table 6 Results of analysis of variance					
方差来源	自由度	平方和	均方和	F值	显著性
A	2	0.079	0.039	2.34	
B	2	0.847	0.473	28.06	*
C	2	0.226	0.113	6.70	
误差	2	0.033	0.017		
总 T	8	1.285			

表5 正交试验结果				
Table 5 Results of orthogonal experiments				
	A	B	C	酶活力(10 ³ × U/ml)
1	1.5	0.5	4	4.30
2	1.5	1.0	5	5.31
3	1.5	1.5	6	5.39
4	2.0	0.5	5	4.72
5	2.0	1.0	6	5.07
6	2.0	1.5	4	5.24
7	2.5	0.5	6	4.52
8	2.5	1.0	4	4.63
9	2.5	1.5	5	5.27
K ₁	15.00	13.54	14.17	
K ₂	15.03	15.01	15.30	
K ₃	14.42	15.90	14.98	
\bar{k}_1	5.00	4.51	4.72	
\bar{k}_2	5.01	5.00	5.10	
\bar{k}_3	4.81	5.30	4.99	
R	0.20	0.79	0.38	

方差分析结果如表6所示。

极差值的大小可以反应各因素对指标影响的程度，根据表5的极差分析，可排列出试验因子的主次顺序如下：B(酵母膏)> C(玉米浆)> A(玉米粉)。

从表5和图6的正交试验结果和极差分析可知，因素A以第2水平为最好，因素B以第3水平为最好，因素C以第2水平为最好，因此最优水平搭配为A₂B₃C₂。酵母膏是影响酶活的最主要因素。

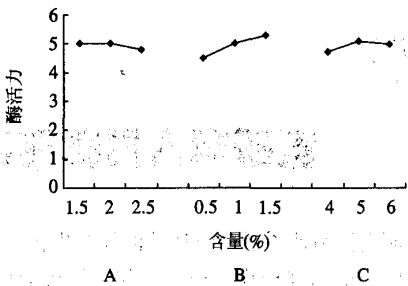


图6 各因素水平对产酶的影响
Fig.6 Effect of factors and levels on the production of CGTase

2.4 嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus alkalophilus*12-7 发酵参数的测定

按最佳发酵条件进行10L罐发酵，每隔一定时间取样，测定560nm处光密度、pH值和酶活性。结果表明，发酵前24h左右pH值下降至9.36之后开始回升，最后达到9.83。这是由于发酵前期，菌体大量生长，糖

类物质被分解产酸导致 pH 值的下降;随着蛋白质的利用 pH 值有所回升。发酵初期检测不到酶活性;当菌体进入对数生长期,环糊精糖基转移酶大量产生;在稳定末期,发酵液中的环糊精糖基转移酶活性达到最高(5820U/ml),结果如图 7 所示。

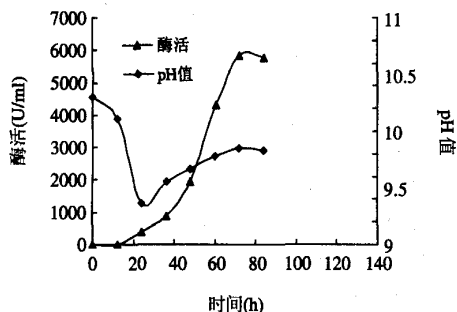


图 7 嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus alkalophilus*12-7 的生长和产酶曲线

Fig.7 Time course of growth and CGTase production of *Bacillus alkalophilus*12-7

3 结论

本试验的结果表明酵母膏是培养基主要组成成分中影响酶产量的最主要因素。通过单因素试验和正交试验获得该菌株产环糊精糖基转移酶的最佳条件为:接种量 3%;培养温度 30℃;pH10.5;发酵培养基的组成为玉米粉 2%,酵母膏 1.5%,玉米浆 5%;250ml 三角瓶装液量为 30ml;270r/min 振荡培养 3d,其发酵液酶活可

达 5400U/ml。10 升罐发酵也表明:酶活有显著提高,可达 5820U/ml。这比文献^[1]报道的酶活高。

参考文献:

- [1] Bender H. Production, characterization and application of cyclodextrin[J]. Adv Biotechnol Processes, 1986, (6): 31-37.
- [2] Hedge AR. Cyclodextrin: Production, properties and application, Starch hydrolysis products[M]. New York: VCH Publishers, 1992. 319-333.
- [3] Szejtli J. Industrial application of cyclodextrin[J]. Inclusion compounds, 1984, (3): 331-390.
- [4] Pramila Rao, C Suresh, D Narasimha Rao, et al. Digestion of residual β -cyclodextrin in treated egg using glucoamylase from a mutant strain of *Aspergillus niger*[J]. Food Chemistry, 1999, 65: 297-301.
- [5] Wang Xiaojing, Brussau M L. Solubilization of some low-polarity organic compounds by hydroxypropyl β -cyclodextrin[J]. Environ sci technol, 1993, 27: 281.
- [6] 双少敏,郭远,等.相溶解法测定 β -环糊精-芦丁包合物的形成常数[J].分析化学,1998,26(5): 564-567.
- [7] 杨国武,李皎,谢薇梅,等. γ -环状糊精糖基转移酶产生菌 32-3-10 产酶条件及酶促反应条件的研究[J].工业微生物,2001,31(2): 30-32.
- [8] 张心平,张善稿,田竹.环状糊精糖基转移酶产生菌的初步鉴定及其产酶条件[J].南开大学学报,1993, (2): 63-68.

信息

意研究人员称西红柿皮可加工成环保塑料袋

意大利全国科研委员会下属的波佐利生物分子化学研究所研究员芭芭拉·尼古拉斯 3 日宣布,她领导的科研小组发现,废弃的西红柿皮可用来制作无污染的可降解塑料袋。

尼古拉斯当天向意大利新闻界介绍研究成果时说,人们知道西红柿可加工成西红柿酱等罐头包装的食品,但人们可能不知道的是,在加工处理过程中,西红柿皮和西红柿籽等约 40% 的原料却作为垃圾废料白白流失了。研究人员从这些被抛弃的西红柿垃圾废料中,尤其是从西红柿皮中提取出复合糖化物,经过提炼和净化过程,这些物质可转化成一类可降解环保塑料制品,包括人们购物经常使用的塑料袋以及在农田使用的塑料薄膜等。

尼古拉斯强调,该项目实现了经济和环境的可持续发展,既保证垃圾废物回收再利用,又能保护环境和节约资源,同时降低了垃圾回收和处理成本,可以创造更多就业机会,可谓是一举多得。

这一项目得到了意大利政府的资金支持,目前正在意南部城市那不勒斯的一些企业中试用,已取得令人满意的成果。尼古拉斯说,西红柿垃圾废料再利用将是一个潜力巨大的“经济资源”。意大利作为欧洲重要农业国之一,是欧洲西红柿生产大国,拥有众多与西红柿有关的食物加工企业。

另据报道,西红柿工业垃圾废料迄今已被成功地用于制造树脂、人造血浆产品及一些医疗用品等。