

氧载体对 α -淀粉酶发酵过程影响的研究

尹源明 郑晓冬 何国庆 王友永 蒋梅巧
(浙江大学)

摘要: 通过添加氧载体(正十二烷),提高发酵体系的氧传递速率,从而促进枯草杆菌产 α -淀粉酶的能力。实验结果表明,正十二烷的加入量和摇瓶装液量对菌体产 α -淀粉酶的能力有较大影响,在 250 mL 三角瓶中装液量为 50 mL。正十二烷的加入量为 1.5% 时,可使发酵液酶活提高 50%。

关键词: 氧载体; α -淀粉酶; 发酵

α -淀粉酶用途十分广泛,在农产品加工、食品工业、纺织工业及医药行业有着广泛的应用。随着 α -淀粉酶用途日益广泛,对此酶的需求也不断增加^[1~2]。数十年来,为了提高 α -淀粉酶的生产效率,人们在选育生产菌株,研究 α -淀粉酶发酵条件,无机盐对 α -淀粉酶的活性影响,表面活性剂对产酶的促进作用等方面进行了一系列研究工作,其中,对如何增加发酵体系的溶氧水平也是一个重要的研究方面。在气液两相发酵体系中,氧气溶解在发酵液中是一个复杂的过程,影响的因素很多。传统上,是通过提高搅拌转速和加大通气量来提高溶氧水平,但由于高搅拌转速形成的高剪切力,会使菌受损而影响产酶能力,而单纯加大通气量,效果欠佳。为此,有必要探讨新的强化供氧途径。

近年来的研究表明,氧载体(Oxygen vectors)是一种与水不互溶,对微生物无毒,具有较高溶氧能力的有机物^[3]。液态烷烃,正十二烷,全氟化碳等均可作为氧载体。由于发酵体系中加入氧载体,可提高该系统的供氧能力,提高好氧发酵产率。因此越来越受到人们的重视,据报道,添加氧载体可提

高青霉素、泰乐菌素、衣康酸、葡萄糖酸、L-2-天冬酰胺酶、碱性淀粉酶发酵体系的供氧能力,提高菌体的产素能力^[4~7]。但对添加氧载体来提高菌体产 α -淀粉酶能力的研究还未见报道。本文研究了添加氧载体在枯草杆菌发酵生产 α -淀粉酶过程中的影响。结果表明:通过添加氧载体,可提高菌体的产酶能力。

1 材料与方法

1.1 菌株

枯草杆菌(*Bacillus subtilis*),由浙江大学农业工程与食品科学学院发酵研究室提供。

1.2 培养基

斜面培养基、种子培养基、发酵培养基:牛肉膏 1%、蛋白胨 1%、可溶性淀粉 1%、NaCl 0.5%、琼脂 2%、pH 7.0~7.2。

1.3 氧载体的性质

氧载体的性质如表 1 所示。

表 1 氧载体的性质

氧载体	表面张力 $(\text{dyne} \cdot \text{cm}^{-1})$	与水的张力 $(\text{dyne} \cdot \text{cm}^{-1})$	溶氧能力 $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	铺展系数 $(\text{dyne} \cdot \text{cm}^{-1})$	密度 $(\text{g} \cdot \text{cm}^{-3})$
正十二烷	27.6	34.9	54.9	8.7	0.749
全氟化碳	24.5	32.2	118	14.5	1.950
液态烷烃	24.7	51.4	39.5	24.9	0.743
水	71.2		6.3		

3.35, $1.01 \times 10^5 \text{ Pa}$; 其余 25, $1.01 \times 10^5 \text{ Pa}$ 。

1.4 培养方法

由活化斜面接一环种子到 250 mL 三角瓶,在装有 50 mL 的种子培养基中,37, 100 r/min (旋转式摇床)振荡培养 48 h。以 1% 的接种量转接至发酵培养基(250 mL 三角瓶)中,37, 100 r/min 振荡培养 60 h。

1.5 分析方法

α -淀粉酶测定方法:目视比色法^[10](酶活单位 u:是指 1 mL 发酵液在 60、pH 值为 6.0 1 h 液化可溶性淀粉的克数)。

2 结果与讨论

2.1 菌体对氧载体的可利用性

培养皿中倒入无碳源的含菌培养基,以无菌的滤纸片分别浸入已灭菌的 20 g/L 的淀粉溶液和氧载体后,再放入培养皿中,37 培养 48 h,观察菌体是否生长。结果表明,枯草杆菌不能利用表 1 中 3 种氧载体作为碳源。

收稿日期:1999211209 修订日期:2000205221

尹源明,讲师,杭州市凯旋路 268 号 浙江大学农业工程与食品科学学院,310029

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

2.2 氧载体的筛选

氧载体可分为负值铺展系数和正值铺展系数2类。根据有关的研究结果,选择正十二烷、全氟化碳和液态烷烃为氧载体,其性质如表1所示。分别以3%的添加量进行对比实验,结果表明(见表2):3种氧载体的添加均能提高菌体的产酶能力,其中以正十二烷效果最好,可提高产酶能力37%左右,故以下均以正十二烷进行实验。

表2 氧载体对产酶的影响

氧载体的种类	正十二烷	全氟化碳	液态烷烃	对照
相对酶活/‰	137.0	130.8	125.2	100.0

2.3 装液量对发酵体系的影响

在相同的培养条件下,不同的装液量对枯草杆菌产 α -淀粉酶影响很大(见图1)。装液量减少一半,酶活可增加200%。这主要是由于随着

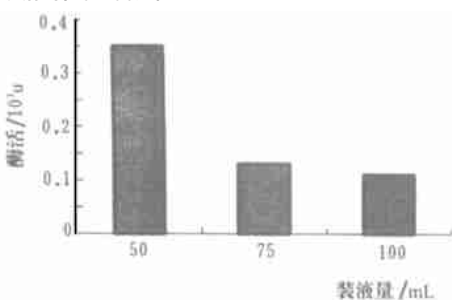


图1 装液量对发酵体系的影响

装液量的增加,发酵体系中气液两相接触面积减少,培养液中溶解氧减少,从而影响代谢产物 α -淀粉酶的生成。这也表明溶氧水平对枯草杆菌产 α -淀粉酶有较大的影响。

2.4 正十二烷浓度对发酵体系的影响

在培养基中分别添加不同浓度的正十二烷进行实验,结果如图2所示。在250mL三角瓶中装50mL培养液时,随着正十二烷的添加量的增加(0%~1.5%),培养基中 α -淀粉酶活增加。贾士儒等^[9]研究发现,具有正铺展系数的氧载体(如正十二烷)含量的增加会使得氧传递系数 K_{La} 值不断增大,因而从氧传递的角度来讲,氧载体浓度的增加是有利的。但随着正十二烷添加量的增加, α -淀粉酶酶活增加幅度反而逐渐有所下降,可能是在低装液量高氧载体浓度时,培养基失水较多,从而影响了 α -淀粉酶的产率。

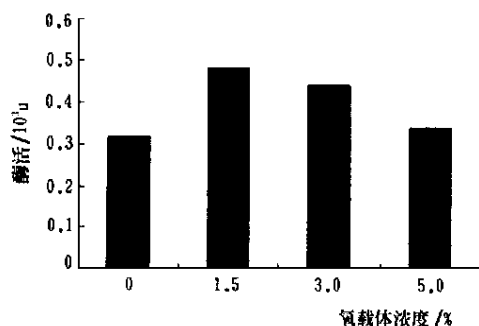


图2 正十二烷浓度对产酶的影响(60h)

2.5 不同装液量体系中氧载体的作用

改变250mL三角瓶中培养基的装液量,进行不同浓度

的氧载体添加实验,结果见图3。从图3可以看出装液量越多,添加氧载体提高酶活性的幅度越大,反之较小。当装液量为100mL时,随着正十二烷的添加量的增加(0%~5%),酶活也同步增加,当添加量为5%时,酶活提高了两倍多。这主要是由于液量过多时,通气条件较差,溶氧供应不足,易导致酶的合成受到影响,添加氧载体后,改善了溶氧水平,因而更能较大幅度提高产酶水平。

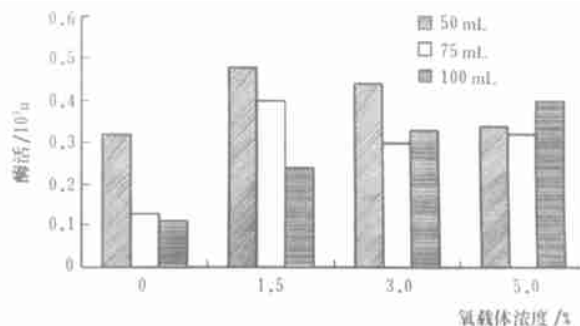


图3 不同装液量体系中氧载体对产酶的影响

3 结论

综上所述,添加氧载体能有效改善氧的供应,有利于产酶,从而提高发酵体系的产酶能力。产酶能力提高的幅度,不仅与所加入的氧载体的种类和浓度有关,也与摇瓶装液量有关。在250mL装液量为50mL的三角瓶中(发酵至20h)加入1.5%的正十二烷,可以提高枯草杆菌产 α -淀粉酶50%。

[参考文献]

- [1] 谷军 α -淀粉酶的生产与运用 生物技术, 1994, 4(3): 1~5
- [2] 穆小民, 吴显龙 酶的开发利用与酶工程 生物技术, 1995, 5(4): 5~8
- [3] Rols J L, et al Mechanism of Enhanced Oxygen Transfer in Fermentation. Biotech Bioeng, 1990, 35(4): 427~435
- [4] 贾士儒, 王明霞, 毛希琴等 气升式生化反应器提高衣康酸的产酸率的研究 食品与发酵工业, 1997, 23(6): 36~38
- [5] 贾士儒, 赵树欣 双液相发酵的进展, 食品与发酵工业, 1996, (5): 58~62
- [6] 贾士儒, 毛希琴, 王明霞 氧载体发酵体系的氧传递及提高衣康酸能力的研究 工业微生物, 1997, 27(4): 9~13
- [7] 刘红, 魏东芝 氧载体对L-2天冬酰氨酶发酵过程的影响 生物工程学报, 1998, 14(3): 298~302
- [8] 高雯, 姜培荣, 张之佳 食品酶学原理与分析方法 哈尔滨: 黑龙江科技出版社, 1991. 287~289
- [9] 贾士儒, 冈部满康 添加氧载体提高泰乐菌素发酵的得率 微生物学通报, 1996, 23(6): 336~338