

克劳氏芽孢杆菌 S-4 菌株固态发酵产碱性果胶酶*

张保国² 白志辉¹ 李祖明³ 张国政² 张洪勋¹

1(中国科学院生态环境研究中心, 北京, 100085) 2(天津科技大学食品科学与生物工程学院, 天津, 300222)

3(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京, 100083)

摘 要 对克劳氏芽孢杆菌(*Bacillus clausii*) S-4 菌株产碱性果胶酶的固态发酵条件进行了优化, 并对酶的部分性质进行了分析, 结果表明, 以甜菜粕为碳源和酶的诱导物, 酵母膏和麸皮作氮源较适宜。固体培养基的组成: 甜菜粕 5.0 g, 麸皮 2.0 g, KH_2PO_4 0.015 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, Na_2CO_3 0.12 g, 水 20 mL; 培养温度 40℃; 发酵时间 72 h; 产酶率可达 2300 u/g(甜菜粕)。该酶具有果胶水解酶和果胶裂解酶的活性, 在 pH 10.5, 反应温度 60℃ 时酶活力最高, 在 pH 9.5~11.0 范围内, 温度 40℃ 以下较稳定。1.0 mmol/L 的 Ca^{2+} 、Tween 80 和 SDS 对该酶有明显的激活作用, Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对其有强烈的抑制作用。

关键词 克劳氏芽孢杆菌, 碱性聚半乳糖醛酸酶, 发酵, 性质

目前碱性果胶酶在生物工程领域的应用越来越广泛, 其应用领域主要包括: 棉纤维的生物精炼、植物韧皮纤维脱胶、造纸、咖啡和茶发酵、处理含果胶废水、洗涤剂^[1~3]。

文献中报道的产碱性果胶酶的菌种主要有: *Bacillus alcalophilus*^[4], *B. pumilus*^[5], *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *Pseudomonas marginalis*, *P. syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Penicillium italicum* 等^[6]。但目前还未见克劳氏芽孢杆菌(*Bacillus clausii*)产碱性果胶酶的报道。我们从碱性土壤中分离筛选出 1 株嗜碱细菌, 具有很高的产碱性果胶酶能力, 经鉴定为克劳氏芽孢杆菌。前期工作中比较了该菌株进行液态发酵和固态发酵产碱性果胶酶的效果, 结果表明, 固态发酵优势明显。文中对该菌株产碱性果胶酶固态发酵条件进行了优化, 并对粗酶液进行了部分酶学特性的研究。

1 材料与方法

1.1 菌 种

克劳氏芽孢杆菌(*Bacillus clausii*) S-4 菌株: 分离自碱性土壤, 其 16S rDNA 序列可以通过登录号 AY825251 在 GenBank 查看。菌种保藏于 4℃ 冰箱内, 碱性培养基斜面, 半年转接 1 次。

1.2 培养基

菌种保藏培养基: 胰蛋白胨 1.5%, 大豆蛋白胨

0.2%, 酵母浸膏 0.3%, 葡萄糖 0.2%, NaCl 0.2%, K_2HPO_4 0.12%, Na_2CO_3 0.3%, 琼脂 1.5%, 于 115℃ 灭菌 15 min。

液体种子培养基: 果胶 0.5%, 酵母膏 1.0%, MgSO_4 0.05%, KH_2PO_4 0.1%, Na_2CO_3 0.3%, 于 115℃ 灭菌 15 min。

初始产酶固体培养基: 甜菜粕 5.0 g, 蛋白胨 0.5g, KH_2PO_4 0.015 g, Na_2CO_3 0.15 g, 水 15 mL, 搅拌均匀, 于 115℃ 灭菌 15 min。

1.3 碱性果胶酶固态发酵

先将液体种子培养基分装于三角瓶中, 接种克劳氏芽孢杆菌(*Bacillus clausii*) S-4 菌株, 35℃ 振荡培养 24 h, 得到液体种子。取 2 mL 液体种子培养基接种于产酶固体培养基, 静态培养 72 h 后, 加定量 0.05 mol/L 的 Na_2CO_3 / NaHCO_3 缓冲溶液 (pH 10.5) 35 mL, 浸提 30 min, 9 000 r/min 离心 20 min, 测定上清液(粗酶液), 定容到 50 mL, 测定酶活, 计算果胶酶产率。

1.4 果胶酶活力测定方法

聚半乳糖醛酸酶(果胶酶主要组成之一)测定方法: 向具塞试管中加入 1.9 mL 0.28% 聚半乳糖醛酸钠溶液(用 0.05 mol/L 的 Na_2CO_3 / NaHCO_3 缓冲溶液配制, 调节到 pH 10.5), 于 55℃ 水浴下保温 5 min, 然后加入一定稀释倍数的酶液 0.1 mL 反应 10 min, 以沸水浴灭活的酶液为对照, 用 DNS 法测定还原糖。以半乳糖醛酸做还原糖的标准曲线。酶活力定义: 在上述试验条件下, 每分钟由底物产生 1 μmol 半乳糖醛酸所需的酶量为 1 个酶活力单位。文中未做其他特殊说明的结果均为该方法所测定结果。

第一作者: 硕士研究生。

* 国家 863 计划资助项目 (No. 2001AA246074)

收稿时间: 2004-11-17, 改回时间: 2005-01-05

聚半乳糖醛酸裂解酶(果胶酶主要组成之一)测定方法:与上述底物相同,采用测定反应底物 235 nm 波长处的紫外吸收的方法来定量酶的活力^[7]。

2 结果与讨论

2.1 产酶发酵条件的优化

2.1.1 不同氮源对碱性聚半乳糖醛酸酶产率的影响

以甜菜粕为碳源和诱导物,在产酶初始固体培养基中,将 0.5 g 蛋白胨分别用等量的其他氮源替换。调查各种氮源对产酶的影响,见表 1。可以看出,有机氮源比无机氮源更适合提高聚半乳糖醛酸酶的产率,其中酵母膏、麸皮都可明显的提高产酶率,而麸皮作氮源在成本上具有优势。

表 1 不同氮源对产酶的影响

氮源	酶活/ $\text{u}\cdot\text{g}^{-1}$ (生物质)
不加氮源	105
蛋白胨	640
酵母膏	920
大豆蛋白胨	660
KNO_3	120
NaNO_3	115
麸皮	950
鱼粉	760

2.1.2 不同麸皮添加量对碱性聚半乳糖醛酸酶产率的影响

在初始产酶固体培养基中,分别用不同量的麸皮作氮源,代替蛋白胨,配制发酵培养基,结果表明,麸皮添加量为 2.0 g 时,酶活最高。结果见图 1。

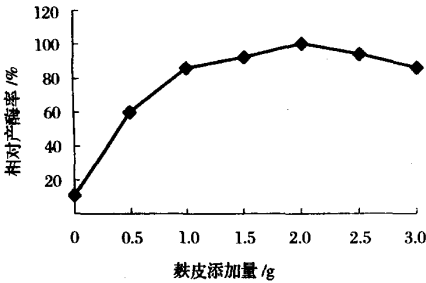


图 1 麸皮添加量对产酶的影响

2.1.3 不同糖类对碱性聚半乳糖醛酸酶产率的影响

向初始产酶培养基中分别添加 0.15 g 果胶、聚半乳糖醛酸钠、葡萄糖、乳糖、半乳糖、麦芽糖、蔗糖等碳源,进行发酵试验,结果表明,添加的几种碳源都不能明显提高酶的产率,并且葡萄糖、麦芽糖、和木糖的加入反而会降低酶的产率。

2.1.4 培养基中的含水量对产酶的影响

固态发酵过程中,培养基中的含水量不但会影响菌体对水分的吸收,而且还会影响菌体对氧的吸收,因此适合的含水量是产酶的重要条件。初始产酶培养基中以 2.0 g 麸皮代替蛋白胨,然后加入不同量的水,考察含水量对产酶的影响。由图 2 可知,当加入 20 mL 水时产酶率最高。

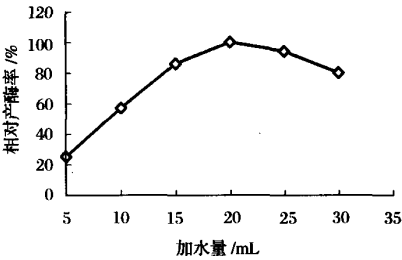


图 2 含水量对产酶的影响

2.1.5 不同盐类对产酶的影响

在初始产酶培养基中以 2.0 g 麸皮代替蛋白胨,然后分别添加不同量的 $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$,进行发酵试验,结果(表 2)表明, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对产酶有明显的促进作用,且添加量为 1 mmol 时最佳, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对产酶影响不明显, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对产酶有一定的抑制作用。

表 2 不同盐对产酶的影响

盐	添加量/mmole	相对酶活 /%
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5	86
	1.0	80
	1.5	72
	1.5	62
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	125
	1.0	136
	1.5	133
	1.5	62
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	95
	1.0	104
	1.5	98
	1.5	62
$\text{CuSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	68
	1.0	65
	1.5	62
	1.5	62
$\text{MnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	38
	1.0	32
	1.5	26
	1.5	26
对照		100

2.1.6 Na_2CO_3 的添加量对培养基初始 pH 和产酶的影响

将初始产酶培养基的蛋白胨换为 2.0 g 麸皮,然后添加不同量的 Na_2CO_3 进行发酵试验,结果见图 3。发酵过程中添加 Na_2CO_3 可以调节培养基的 pH,提高产酶率,通过试验可知,在培养基中加入 0.12 g

Na_2CO_3 可使产酶率达到最大值,此时培养基的 pH 为 8.7。

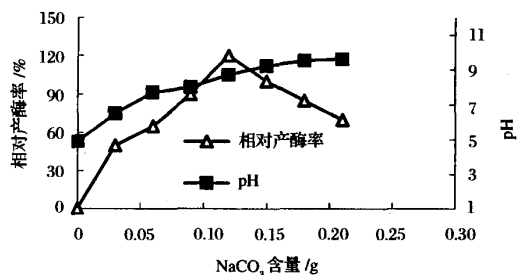


图3 Na_2CO_3 的添加量对培养基初始 pH 和产酶的影响

2.1.8 培养温度对产酶的影响

采用优化后的产酶固态培养基(甜菜粕 5.0 g, 麸皮 2.0 g, KH_2PO_4 0.015 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, Na_2CO_3 0.12 g, 水 20 mL)在不同培养温度下绘制产酶生长曲线。结果见图 4, 表明最适发酵温度为 40℃, 在 72 h 出现产酶高峰。

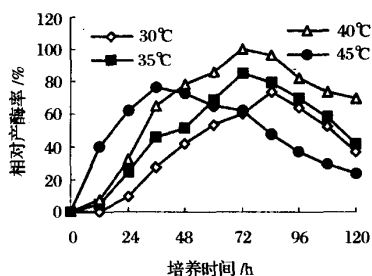


图4 不同培养温度下的产酶生长曲线

通过优化试验,确定培养基组成为:甜菜粕 5.0 g, 麸皮 2.0 g, KH_2PO_4 0.015 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, Na_2CO_3 0.12 g, 水 20 mL; 培养温度 40℃; 发酵时间 72 h; 酶的产率可达 2 300 u/g。与中国专利 CN 1480529A 采用的短小芽孢杆菌液体深层发酵的产率 20 u/mL 相比具有一定优势。若再考虑各个因素的交互作用,继续进行多因素多水平的优化试验,预计能找到更佳的发酵条件。

2.2 酶的特性

2.2.1 反应 pH 值对酶活性的影响

在 40℃ 反应温度下,在不同 pH 值的底物溶液中,测定粗酶液的聚半乳糖醛酸酶活力,如图 5 所示,此酶在 pH 10.5 时活力最高。

2.2.2 反应温度对酶活性的影响

在 pH 10.5 的底物溶液中,采用不同的反应温度测定粗酶液的聚半乳糖醛酸酶活力。结果见图 6,表明该酶在 60℃ 的反应温度下活力最高。

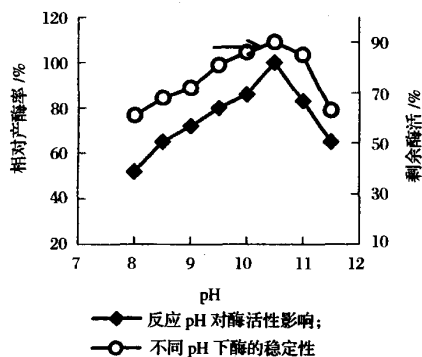


图5 反应 pH 值对酶活性的影响和不同 pH 下酶的稳定性

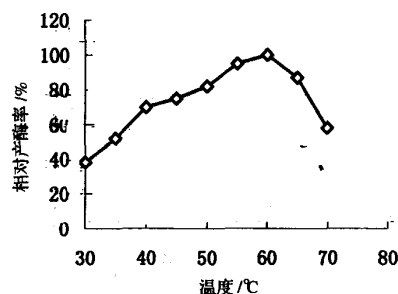


图6 反应温度对酶活性的影响

2.2.3 酶的 pH 稳定性

酶溶液在不同 pH 缓冲液中,55℃ 水浴保温 30 min 后,测定剩余的聚半乳糖醛酸酶活力,以初始酶活力为 100%,结果表明(图 5),该酶在 pH 9.5~11 范围内稳定性较高。

2.2.4 酶的热稳定性

酶液在 pH 10.5 的缓冲溶液中,在不同的温度下保温,每 0.5 h 取样测定剩余的聚半乳糖醛酸酶活力,以 0 h 酶活为 100%,结果表明(图 7),在 40℃ 时,酶可以长时间保持活力;高于 55℃ 时,酶的活力损失很快。

2.2.5 金属离子和表面活性剂对酶活的影响

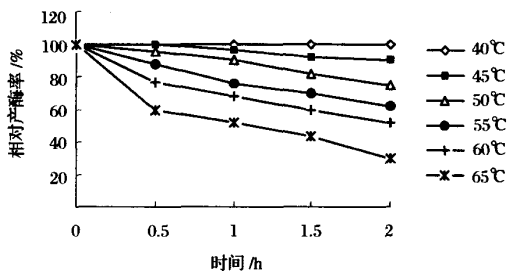


图7 不同温度下酶的热稳定性

分别在反应底物溶液中加入 1.0 mmol/L 金属离子,测定酶活力,结果如表 3 所示。结果表明 1.0 mmol/L 的 Ca^{2+} 、Tween 80 和 SDS 对酶有明显的激活作用,而 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 有强烈的抑制作用。

表 3 金属离子和表面活性剂对酶活的影响

金属离子(1.0 mmol/L)	相对酶活
表面活性剂(0.1%)	/%
Ca^{2+} ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	127
Mg^{2+} ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	113
Mn^{2+} ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0
Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	43
Fe^{2+} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	80
Zn^{2+} (ZnCl_2)	62
Tween80	146
EDTA	105
SDS	125

3 结 论

以上对粗酶液的聚半乳糖醛酸酶的部分性质的测定结果表明,在 pH 8.0 时酶活力只有最适反应 pH 10.5 时的 50%,因此该酶是典型的碱性酶。酶的活力随反应温度的升高而增强,但稳定性变差,金属离子 Ca^{2+} 对酶有激活作用而 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对酶有抑制作用,表面活性剂 Tween80 和 SDS 对酶有明显的激活作用。另外,我们定性地测定了粗酶液中裂解酶的活性,结果表明粗酶液中的裂解酶活性也很明显,但比水解酶活性低,产率高时达到 20 u/g(甜菜

粕)。我们还比较了粗酶液对聚半乳糖醛酸钠和果胶的降解速度,结果表明,水解酶和裂解酶对聚半乳糖醛酸钠的降解速度都明显大于对果胶的降解速度,更详细的性质有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Kashyap D R, Vohra P K, Chopra S, et al. Application of pectinase in the commercial sector: a review [J]. Biore-source Technology, 2001, 77: 215 ~ 227
- 2 Herbots I M A J, Baeck A C. Detergent compositions comprising alkaline polygalacturonase[P]. International Patent, WO 98/06809. 1998-02-19
- 3 Herbots I M A J, Baeck A C. Detergent compositions comprising alkaline pectin lyase[P]. International Patent, WO 98/06807. 1998-02-19
- 4 曹军卫,陈 激,郑连爽. 新的嗜碱芽孢杆菌菌株及其在苧麻脱胶中的应用[P]. 中国专利,公开日: 1998.3.25,公开号: CN 1177003A
- 5 陈 坚,堵国成,董云舟等. 一种碱性果胶酶高产菌及其筛选方法和用该菌株发酵法生产碱性果胶酶[P]. 1480529A. 2004-03-10
- 6 Hoondal G S, Tiwari R P, Tewari R, et al. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59: 409 ~ 418
- 7 Bai Z H, Zhang H X, Qi H Y, et al. Pectinase production by *Aspergillus niger* using wastewater in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance [J]. Bioresource Technology, 2004, 95 (1): 49 ~ 52

Alkaline Pectinase Production by *Bacillus clausii* S-4 with Solid State Fermentaion

Zhang Baoguo² Bai Zhihui¹ Li Zuming³
Zhang Guozheng² Zhang Hongxun¹

1(the Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085, China)

2(College of Food Science & Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, 300222, China)

3(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing, 100083, China)

ABSTRACT Fermentation conditions of the *Bacillus clausii* S-4 for production of alkaline pectinase and the properties of the enzyme were investigated. Sugar beet pulp was used as inducer and carbon source, and yeast extract and wheat bran were used as nitrogen sources. The optimal fermentation medium contained: sugar beet pulp 5.0 g, wheat bran 2.0 g, KH_2PO_4 0.015 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, Na_2CO_3 0.12 g, water 20 mL. After inoculation, the medium were cultivated at 40℃ for 72 h, and the yield of alkaline pectinase was 2 300 u/g sugar beet pulp. The enzyme extract from the cultivated medium has pectin hydrolase and lyase activity. The highest activity of the enzyme is at pH 10.5 and 60℃. It is seen that Ca^{2+} , Tween 80 and SDS enhance the activity of the enzyme, and Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} inhibit its activity.

Key words *Bacillus clausii*, alkaline pectinase, fermentation, characterization