

张志强,李思思,李 辉,等.高产淀粉酶菌株的筛选及其培养条件的优化[J].江苏农业科学,2017,45(10):221-223.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.061

高产淀粉酶菌株的筛选及其培养条件的优化

张志强,李思思,李 辉,梁魁景,刘 言,王婷婷,由明扬
(衡水学院生命科学系,河北衡水 053000)

摘要:为筛选淀粉酶高产菌株,通过比较水解圈与菌落的直径比及 3,5-二硝基水杨酸(DNS)显色法所测酶活性高低,筛选得到高产淀粉酶能力的菌株 WB-4。通过单因素试验,得到该菌株的最优碳源为可溶性淀粉,最优氮源为蛋白胨。利用 Plackett-Burman 进行显著因素筛选,发现可溶性淀粉含量、蛋白胨含量、温度为显著因素。利用响应面法对显著因素进行优化,得到菌株的最优培养条件为可溶性淀粉含量 18.81 g/L,蛋白胨含量 10.02 g/L,温度 31.12 ℃,淀粉酶活性 365.12 U/mL,酶活性提高了 1.33 倍。

关键词:高产淀粉酶菌株;响应面法;Plackett-Burman 因素筛选;发酵条件优化;工业化应用

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)10-0221-03

淀粉酶是能催化淀粉水解转化成葡萄糖、麦芽糖及其他低聚糖的一类酶的总称^[1]。淀粉酶来源极其广泛,不仅动物的唾液、胰脏富含淀粉酶,植物体内也含有丰富的淀粉酶,但是,目前商业化生产的淀粉酶主要由微生物发酵提炼所得^[2]。自从 19 世纪初德国科学家 Kirchhoff 发现淀粉酶以来,有关淀粉酶的研究报道逐年增加,淀粉酶的应用也越来越广泛。特别是在酿造工业、纺织、医药工业、环保、洗涤剂等方面得到了广泛的应用^[3]。近年来,虽然我国淀粉酶的品种、产量不断增加,但是与国外相比,我国的淀粉酶品种相对偏少、产量偏低^[4]。为了适应经济快速发展对淀粉酶的需求,本试验对河北省衡水市周边采集到的样品进行分离筛选,并利用响应面法进一步提高其产量,以期对淀粉酶的工业化应用提供支持。

1 材料与方法

1.1 样品

试验所用样品采集地点为河北省衡水市某面粉厂、某食品加工厂、某学校食堂。

1.2 培养基

筛选培养基:10 g/L 蛋白胨,3 g/L 牛肉膏,5 g/L NaCl,2 g/L 可溶性淀粉,20 g/L 琼脂,加蒸馏水至 1 000 mL,调节 pH 值为 7.0~7.2。

摇瓶发酵培养基:除不加琼脂外,其他成分同筛选培养

基。

1.3 试验方法

1.3.1 产淀粉酶菌株的筛选 初筛:取 1 g 不同地点采集的样品溶解于 9 mL 灭菌蒸馏水中,然后进行梯度稀释,直到 10⁻⁷ 稀释度为止。取 0.1 mL 不同稀释倍数的样液涂布到筛选培养基上,30 ℃ 培养数天,划线纯化,直到获得单菌落为止。将得到的单菌落接种到筛选培养基上,30 ℃ 培养 2~4 d,经碘液染色后根据水解圈的大小,初步筛选出产淀粉酶的菌株。

复筛:将初筛到的菌株接种到摇瓶发酵培养基上,30 ℃、120 r/min 摇床培养 48 h。将发酵液于 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液测定酶活性,选取酶活性较高的菌株作为试验菌种。

1.3.2 发酵条件的优化

1.3.2.1 单因素试验 在摇瓶发酵培养基中,分别加入 0.5% 不同碳源(麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉、葡萄糖、甘油、乳糖)替换其碳源成分,进行碳源优化试验。在最优碳源的基础上,分别以不同氮源(硝酸铵、尿素、硫酸铵、胰蛋白、牛肉膏、蛋白胨)替换培养基中氮源成分,进行氮源优化试验。

1.3.2.2 筛选显著因素 用 Design Expert 7.0 软件中的 Plackett-Burman 对可溶性淀粉含量、蛋白胨含量、牛肉膏含量、温度、转速、装液量、初始 pH 值等 7 个因素进行设计,每个因素分别按低水平(-1)、高水平(+1)进行设计(表 1),

表 1 Plackett-Burman 设计的各因素水平

水平	A:可溶性淀粉含量 (g/L)	B:牛肉膏含量 (g/L)	C:蛋白胨含量 (g/L)	D:温度 (℃)	E:转速 (r/min)	F:250 mL 装液量 (mL)	G:初始 pH 值
低水平(-1)	2	0	1	20	80	50	6
高水平(+1)	20	5	10	30	150	100	8

共随机设计生成 12 组试验,包括 11 个变量(其中 4 个哑量)。
1.3.2.3 响应面法优化 以“1.3.2.2”节筛选到的显著因素为基础,利用中心组合设计原理,对选取的显著因素从 5 个水平进行考察,确定最优条件,并验证其准确性。

1.3.3 淀粉酶活性测定 淀粉酶活性测定采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法^[5]。酶活性单位定义:1 U(单位酶活)表

收稿日期:2016-02-24

基金项目:衡水学院大学生创新课题(编号:16020732)。

作者简介:张志强(1983—),男,河北衡水人,硕士,从事食品微生物技术与微生物研究。Tel:(0318)6905659;E-mail:435395363@qq.com。

示在试验条件下 1 min 释放出 1 μmol 还原糖需要的酶量。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

样品经涂布及多次纯化后,将得到的单菌落接种到筛选培养基上,进行淀粉酶水解圈试验。经初步筛选共有 32 株菌株产生了透明圈,其中水解圈/菌落直径比(即 D/d 值)大于 2 的菌株共有 8 株,分别命名为 WB-1、WB-2、WB-3、WB-4、WB-5、WB-6、WB-7、WB-8; D/d 值最大的为 WB-3,其次为 WB-4,再次为 WB-2(表 2)。因此,初步筛选这 3 株菌株进行复筛。

表 2 淀粉酶产生菌的初筛

菌株	透明圈直径 D (mm)	菌落直径 d (mm)	D/d 值
WB-1	32.29	14.93	2.16
WB-2	26.79	10.84	2.47
WB-3	24.75	6.34	3.90
WB-4	26.71	10.05	2.66
WB-5	26.63	13.19	2.02
WB-6	27.77	12.69	2.19
WB-7	29.32	14.22	2.06
WB-8	27.54	13.61	2.02

将初筛得到的 3 个菌株 WB-2、WB-3、WB-4 接种到摇瓶发酵培养基上培养一定时间后,进行酶活性测定。结果显示,WB-2、WB-3、WB-4 的酶活性分别为 126.4、137.3、156.5 U/mL。水解圈的大小在一定程度上可以反映酶活性的高低,但是却不能完全代表菌株产酶能力的强弱,其原因可能是不同菌株在生长、产酶速度上存在差异、菌苔的大小及其在平板上的堆积情况存在差异,此外,还有可能是由于固体培养基、液体培养基的培养条件存在差异等^[6]。因此,在选择菌株时不能以水解圈的大小作为唯一标准。虽然 WB-4 的 D/d 值小于 WB-3,本试验综合考虑水解圈大小及产酶能力的高低,最终选择 WB-4 作为目的菌株。

2.2 发酵条件的优化

2.2.1 单因素试验 用 6 种不同碳源替换摇瓶发酵培养基中的碳源,于 30 ℃、120 r/min 培养 48 h,测定上清液淀粉酶活性。从图 1 可以看出,以可溶性淀粉作为碳源时,酶活性最高,乳糖次之,甘油最低,因此选择可溶性淀粉作为碳源。

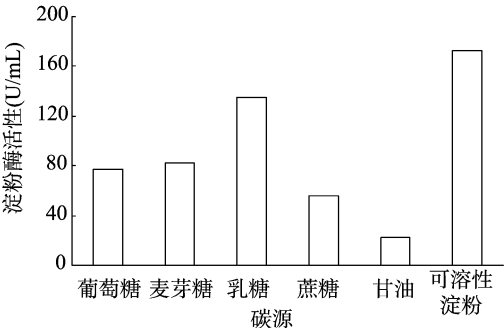


图 1 不同碳源对酶活性的影响

用 6 种不同氮源替换摇瓶发酵培养基中的氮源,于 30 ℃、120 r/min 培养 48 h,测定上清液淀粉酶活性。从图 2

可以看出,以蛋白胨作为氮源时,淀粉酶活性最高,以牛肉膏作为氮源时也能取得较好的效果。而以硫酸铵、硝酸铵、尿素等无机物质作为氮源,产酶效果较差。因此,本试验选择蛋白胨作为氮源。

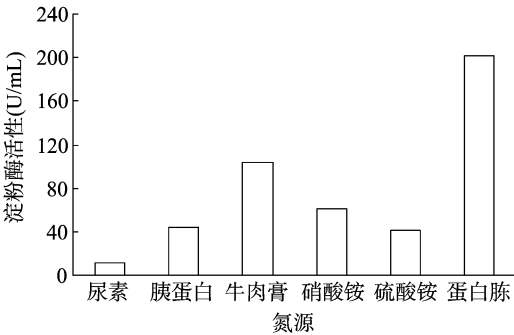


图 2 不同氮源对酶活性的影响

2.2.2 显著因素的筛选 利用 Design Expert 7.0 软件中的 Plackett-Burman 对 7 个因素进行设计,具体方案及结果见表 3、表 4。一般认为 P 值 $> F$ 值小于 0.05,说明该因素为显著因素。由表 4 可以看出,可溶性淀粉含量、蛋白胨含量及温度的 P 值 $> F$ 值的值分别为 0.006 2、0.046 1、0.015 0,说明这 3 个因素为显著因素,因此选择可溶性淀粉含量、蛋白胨含量、温度进行进一步的优化试验。

表 3 Plackett-Burman 试验设计结果

序号	因素							酶活性 (U/mL)
	A	B	C	D	E	F	G	
1	1	1	-1	1	1	1	-1	264.22
2	-1	1	1	-1	1	1	1	118.82
3	1	-1	1	1	-1	1	1	247.17
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	187.07
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	58.14
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	40.43
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	151.74
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	80.90
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	239.94
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	173.47
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	275.02
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	40.98

2.2.3 响应面法优化 根据中心组合设计原理,对“2.2.2”节选取的 3 个显著因素从 5 个水平进行设计,各因素的水平设计见表 5,具体设计方案及对应的结果见表 6。利用 Design Expert 7.0 拟合得到多项式回归模型:

$$Y = 363.42 + 31.51A + 1.86B + 22.97C - 3.07AB - 28.83AC - 3.07BC - 40.24A^2 - 32.09B^2 - 31.53C^2。$$

由表 7 可以看出,模型 R^2 为 0.97,说明预测值和实测值有高度的相关性;模型的 $P < 0.000 1$,说明此模型很显著。如果该模型的信噪比大于 4,则说明模型可信;该模型的信噪比为 19.47,说明该模型高度可信。模型中的变异系数表示试验的精密性,其值越高,说明试验的可靠性越差,本模型的变异系数为 4.83%,数值较低,说明该模型的操作可行。综上可知,该模型的设计及试验结果可行。

表 4 Plackett – Burman 设计的各因素水平对应的效应评价结果

项目	A:可溶性淀粉含量 (g/L)	B:牛肉膏含量 (g/L)	C:蛋白胨含量 (g/L)	D:温度 (℃)	E:转速 (r/min)	F:250 mL 装液量 (mL)	G:初始 pH 值
低水平 (-1)	2	0	1	20	80	50	6
高水平 (+1)	20	5	10	30	150	100	8
<i>F</i> 值	27.729	4.263	8.160	16.709	3.646	4.524	0.578
<i>P</i> 值	0.006 2	0.107 9	0.046 1	0.015 0	0.128 8	0.100 6	0.489 3

表 5 3 个变量的不同水平

水平	A:可溶性淀粉含量 (g/L)	B:蛋白胨含量 (g/L)	C:温度 (℃)
-1.68	0.86	1.59	21.59
-1	7.00	5.00	25.00
0	16.00	10.00	30.00
1	25.00	15.00	35.00
1.68	31.14	18.41	38.41

表 6 响应面试验设计结果

序号	A	B	C	实测酶活性 (U/mL)
1	-1	-1	-1	152.68
2	1	-1	-1	291.19
3	-1	1	-1	173.53
4	1	1	-1	289.32
5	-1	-1	1	285.58
6	1	-1	1	298.35
7	-1	1	1	283.72
8	1	1	1	294.61
9	-1.68	0	0	208.08
10	1.68	0	0	298.66
11	0	-1.68	0	272.82
12	0	1.68	0	279.98
13	0	0	-1.68	260.68
14	0	0	1.68	295.29
15	0	0	0	370.87
16	0	0	0	369.12
17	0	0	0	362.77
18	0	0	0	358.11
19	0	0	0	360.40
20	0	0	0	364.33

2.2.4 验证模型的可靠性 通过该模型拟合得出生产淀粉酶的最佳培养条件:可溶性淀粉含量 18.81 g/L,蛋白胨含量 10.02 g/L,温度 31.12 ℃,预测最高淀粉酶活性为 371.89 U/mL。在最佳培养条件下得到的淀粉酶活性为 365.12 U/mL,与预测的最佳淀粉酶活性相差很小,说明该模型可用于淀粉酶发酵条件的优化。

3 结论

笔者所在课题组对河北省衡水市周边采集到的样品进行筛选。在综合考虑初筛及复筛的结果后,决定将 WB-4 作为

表 7 试验结果方差分析

名称	方差	自由度	均方差	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
模型	71 601.63	9	7 955.74	39.60	<0.000 1
<i>A</i>	13 556.14	1	13 556.14	67.47	<0.000 1
<i>B</i>	47.33	1	47.33	0.24	0.637 9
<i>C</i>	7 207.39	1	7 207.39	35.87	0.000 1
<i>AB</i>	75.58	1	75.58	0.38	0.553 4
<i>AC</i>	6 649.13	1	6 649.13	33.10	0.000 2
<i>BC</i>	75.58	1	75.58	0.38	0.553 4
<i>A</i> ²	23 329.94	1	23 329.94	116.12	<0.000 1
<i>B</i> ²	14 842.06	1	14 842.06	73.87	<0.000 1
<i>C</i> ²	14 328.31	1	14 328.31	71.32	<0.000 1
残差	2 009.08	10	200.91		

注: $R^2=0.97$,校正的 $R^2=0.95$,预测的 $R^2=0.80$,信噪比 = 19.47,变异系数 = 4.83%。

目的菌株进行发酵条件的优化。对菌株进行单因素优化,发现最优碳源为可溶性淀粉,最优氮源为蛋白胨。在单因素优化的基础上,利用 Plackett – Burman 确定了可溶性淀粉含量、蛋白胨含量、温度为显著因素。利用响应面法对 3 个显著因素进行优化,通过分析显著因素与酶活性之间的关系,建立了两者之间的数学模型,通过响应面法的分析得到最优培养条件为可溶性淀粉含量 18.81 g/L,蛋白胨含量 10.02 g/L,培养温度 31.12 ℃,预测最高酶活性为 371.89 U/mL,实测值为 365.12 U/mL,相差较小,说明优化结果可信。通过优化使得淀粉酶活性由最初的 156.5 U/mL 提高到 365.12 U/mL,提高了 1.33 倍,效果明显,为该菌株的工业化应用提供了有力的支持。

参考文献:

[1] 王晓红. 产低温淀粉酶菌株的筛选及其酶学性质的研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2006.

[2] 易征璇,赵 彤,师 旋,等. 高温淀粉酶高产菌株筛选及产酶条件优化[J]. 现代农业科技,2014(7):240 – 243.

[3] 雷晓燕. 土壤中淀粉酶产生菌的筛选及产酶条件优化[J]. 沈阳化工学院学报,2010,24(3):203 – 208.

[4] 刘杰雄,陈 号,陆 雯,等. 淀粉酶高产菌株的筛选及其酶活的测定[J]. 食品工程,2010(1):45 – 47.

[5] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,1994:10 – 11.

[6] 楼 超,刘铁师,贾博深,等. 高产淀粉酶菌株的筛选及产酶条件优化的探究[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(11):2817 – 2820.