

郭宏文,江成英,王 路,等. 酸性 α -淀粉酶菌种产酶条件的优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(21):308-310.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.086

酸性 α -淀粉酶菌种产酶条件的优化

郭宏文,江成英,王 路,郭建华,景 艳,孙美佳

(齐齐哈尔大学食品与生物工程学院/黑龙江省普通高校齐齐哈尔大学农产品加工重点实验室,黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要:以从实验室白酒酒醅中分离筛选并经诱变育种得到的高产酸性 α -淀粉酶的菌株 F21 为试验对象,利用单因素及正交试验法进行液态产酶条件的优化,结果表明,菌株 F21 的最佳产酶培养基组成为麸皮 2.0%、豆饼粉 1.5%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 K_2HPO_4 0.1%,最佳培养条件:初始 pH 值为 6.0、250 mL 三角瓶中装液量为 30 mL、接种量为 8%、40 °C 200 r/min 摇床培养 48 h,此时酶活性达到 2 305.9 U/mL,比优化前的初始酶活性(987.3 U/mL)提高 1.34 倍。

关键词:酸性 α -淀粉酶;液态发酵;产酶条件;优化;正交试验

中图分类号: S188⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)21-0308-03

酸性 α -淀粉酶是一种重要的工业酶制剂,能够在酸性条件下水解淀粉,保持高活性,被广泛应用于食品、发酵、纺织、制药和饲料等工业领域。近年来,随着我国国民经济的迅速发展,对酸性 α -淀粉酶的需求也日益增加,研究并开发新型的酸性 α -淀粉酶具有较高的社会效益。自 1963 年日本学者发现可以用黑曲霉生产耐酸性 α -淀粉酶^[1]以来,许多国家对其相继开展了相关研究,而我国学者从 20 世纪 90 年代始,在酸性 α -淀粉酶工业菌种选育方面开展了相应的研究工作^[2-5]。齐齐哈尔大学食品与生物工程学院从北大仓酒厂白酒酒醅中分离筛选得到产酸性 α -淀粉酶的菌株^[6],并经诱变育种得到高产酶突变株 F21。本研究以菌株 F21 为试验对象,利用单因素及正交试验法对其最佳产酶培养基组成及液态产酶条件进行优化,以进一步提高菌株的产酶能力。

1 材料与方法

1.1 试验材料

枯草芽孢杆菌 F21,分离自白酒酒醅并经诱变处理得到。斜面保藏培养基:可溶性淀粉 1.2%、蛋白胨 0.8%、酵母粉 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 K_2HPO_4 0.1%、琼脂 1.8%,pH 值为 7.0。产酶种子培养基:可溶性淀粉 1.2%、蛋白胨 0.8%、酵母粉 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 K_2HPO_4 0.1%,pH 值为 7.0。产酶发酵培养基:可溶性淀粉 1.5%、蛋白胨 1.0%、酵母粉 0.5%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 K_2HPO_4 0.1%,pH 值为 7.0。麸皮、玉米粉、豆饼粉为市售,试验用试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

菌种活化,接种到装有 25 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,在摇床中 36 °C 180 r/min 培养 18 h;取 2 mL 接到装有 25 mL 发酵培养基的三角瓶中,在摇床中 36 °C 180 r/min 培养 48 h;4 层纱布过滤,离心,参照 Yoo 等的改良法^[7-8]测定上清液酶活性。采用单因素法及正交试验法^[9]研究确定菌株最佳产酶发酵培养基的组成及发酵条件。

2 结果与分析

2.1 菌株最佳培养基单因素试验

2.1.1 培养基中不同碳源对产酶的影响 培养基分别添加可溶性淀粉、玉米淀粉、玉米粉、蔗糖、葡萄糖、乳糖及麸皮为碳源,发酵后测定酶活性,制作产酶关系曲线。由图 1 可知,以蔗糖、麸皮为碳源,菌株 F21 的产酶能力相对较高,酶活性分别为 1 247.1、1 208.4 U/mL。考虑麸皮相对较为低廉,因此选择麸皮作为菌株 F21 发酵的碳源。

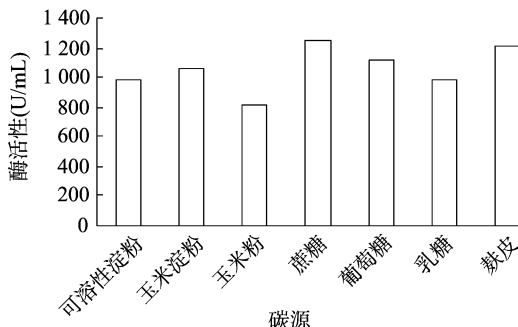


图1 不同碳源对产酶的影响

2.1.2 培养基碳源含量对产酶的影响 由图 2 可知,随麸皮含量的增加,酶活性呈先升高后降低趋势,麸皮含量为 2% 时的酶活性相对最高,为 1 380 U/mL。因此,2% 为最佳碳源含量。

2.1.3 培养基中不同氮源对产酶的影响 以蛋白胨、酵母粉、豆饼粉、硫酸铵、尿素为单一氮源及以不同比例的蛋白胨+酵母粉、豆饼粉+酵母粉为复合氮源进行发酵,测定酶活

收稿日期:2017-05-05

基金项目:黑龙江省教育厅面上项目(编号:135109263);黑龙江省齐齐哈尔市科学技术计划(编号:NYGG-201426)。

作者简介:郭宏文(1973—),男,河北深县人,硕士,副教授,主要从事微生物遗传研究。Tel:(0452)2742731;E-mail:ghw666@126.com。

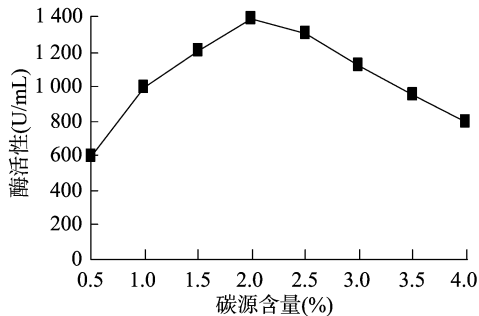


图2 碳源含量对产酶的影响

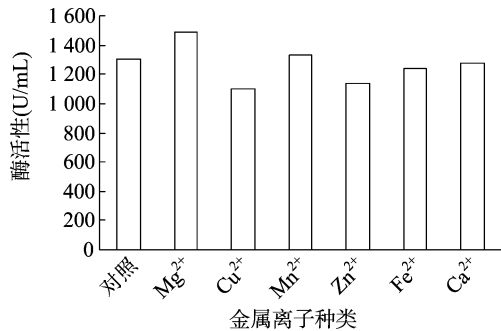


图5 金属离子对产酶的影响

性。由图 3 可知,以 1.5% 豆饼粉为有机氮源时酶活性相对最高,为 1 502.6 U/mL;配比为 1% 豆饼粉 + 0.5% 酵母粉的复合有机氮源酶活性次之,为 1 437.8 U/mL;1.5% 尿素作单一无机氮源时酶活性相对最低。因此,1.5% 豆饼粉为培养基最佳氮源。

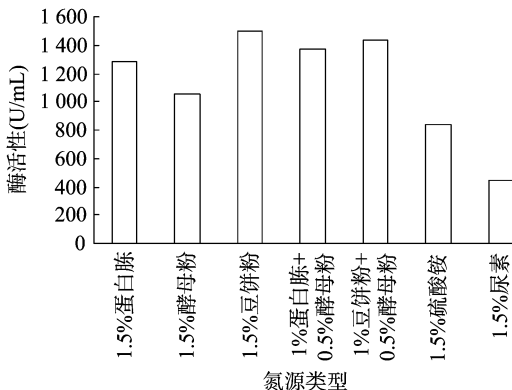


图3 不同氮源对产酶的影响

2.1.4 培养基氮源含量对产酶的影响 由图 4 可知,随豆饼粉含量的增加,酶活性呈先升高后降低趋势,豆饼粉含量为 1.5% 时的酶活性相对最高,为 1 514.6 U/mL;随着豆饼粉含量的继续增加,酶活性开始降低。因此,1.5% 为最佳氮源含量。

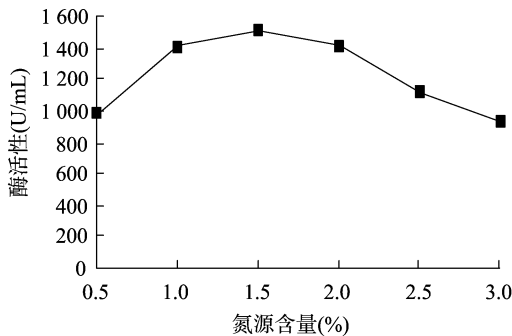


图4 氮源含量对产酶的影响

2.1.5 培养基中添加金属离子对产酶的影响 以没有镁离子的发酵培养基为基础培养基(对照),在基础培养基中加入一定量不同的金属离子,发酵测酶活性。由图 5 可知,添加 Mg^{2+} 对产酶有较强的促进作用,酶活性较对照提高 13.7%;添加 Mn^{2+} 对产酶也有一定的促进作用,但酶活性提高极小;添加 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 对产酶有一定的抑制作用, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的抑制作用相对较强,而 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 对产酶的抑制作用相对较弱。因此,选择在培养基中添加 Mg^{2+} 以提高菌种的产

酶能力。

2.2 最适培养基正交试验

根据单因素试验结果,以麸皮、豆饼粉、 Mg^{2+} 为试验因素,以酶活性为指标,采用 $L_9(3^3)$ 方案^[9] 设计正交试验。由表 1、表 2 可知,麸皮(碳源因素)对酶活性的影响相对最大,豆饼粉(氮源)次之, Mg^{2+} 影响相对最小,碳源因素对产酶的影响显著;最佳的三因素配比为 $A_2B_2C_2$,即培养基中添加 2.0% 麸皮、1.5% 豆饼粉, Mg^{2+} 浓度为 0.05%。

表 1 菌株 F21 最适培养基正交试验结果

编号	A:麸皮 (%)	B:豆饼粉 (%)	C: Mg^{2+} (%)	酶活性 (U/mL)
1	1(1.7)	1(1.2)	1(0.02)	1 261.9
2	1	2(1.5)	2(0.05)	1 399.5
3	1	3(1.8)	3(0.08)	1 323.9
4	2(2.0)	1	2	1 412.0
5	2	2	3	1 528.2
6	2	3	1	1 427.8
7	3(2.3)	1	3	1 337.5
8	3	2	1	1 375.8
9	3	3	2	1 404.1
k_1	1 318.63	1 337.13	1 355.17	
k_2	1 456.00	1 434.50	1 405.20	
k_3	1 372.47	1 385.27	1 396.54	
R	127.57	97.37	50.03	

注:小括号中为各因素含量。

表 2 方差分析结果

方差来源	自由度	平方和	均方	F	显著性
A	2	25 190.007	12 595.003	21.612	0.044
B	2	14 221.007	7 110.503	12.201	0.076
C	2	4 289.647	2 144.823	3.680	0.214
误差	2	1 165.580	582.790		
总计	8	44 866.241			

2.3 产酶条件的优化

2.3.1 培养基初始 pH 值对产酶的影响 由图 6 可知,培养基 pH 值为 6.0 时的酶活性相对最高,为 1 695.8 U/mL。因此,菌株 F21 发酵初始的 pH 为偏酸性为好,最适初始 pH 值为 6.0。

2.3.2 培养温度对产酶的影响 由图 7 可知,随培养温度的增加,酶活性呈先升高后降低趋势;培养温度为 40 ℃ 时酶活性相对最高,为 1 889.0 U/mL。因此,选择 40 ℃ 为培养基最适培养温度。

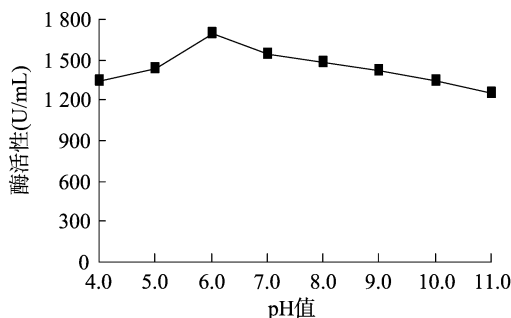


图6 培养基初始pH值对产酶的影响

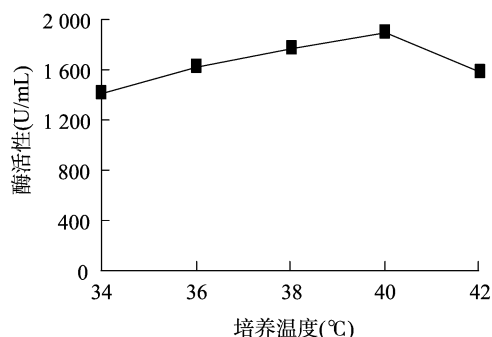


图7 培养温度对产酶的影响

2.3.3 装液量对产酶的影响 在250 mL三角瓶中分别装入15~50 mL的发酵培养基进行发酵,测定酶活性。由图8可知,装液量为30 mL时的酶活性相对最高,为2 083.8 U/mL。因此,三角瓶中的最适装液量为30 mL。

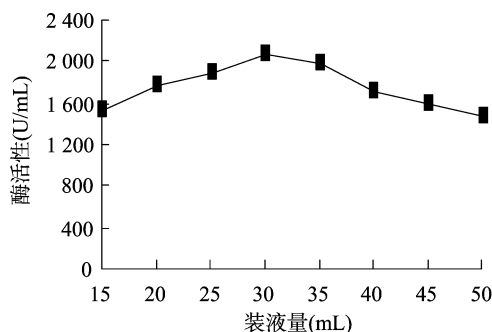


图8 装液量对产酶的影响

2.3.4 接种量对产酶的影响 由图9可知,接种量为8%时的酶活性相对最高,为2 195.5 U/mL,接种量超过8%酶活性下降。因此,选择8%为最佳接种量。

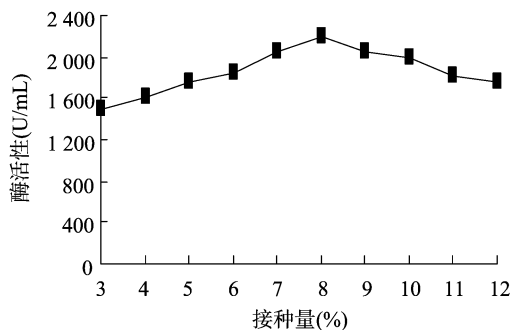


图9 接种量对产酶的影响

2.3.5 转速对产酶的影响 由图10可知,转速为200 r/min时的酶活性相对最高,为2 305.9 U/mL。因此,选择摇床转速为200 r/min进行发酵。

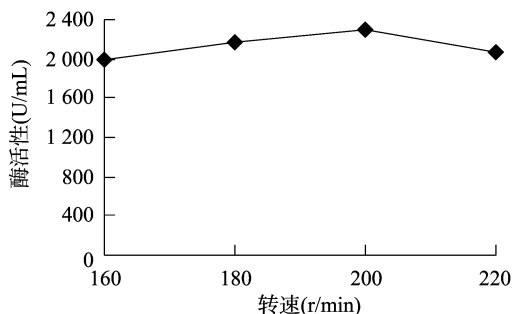


图10 转速对产酶的影响

3 结论

对产酸性 α -淀粉酶菌株F21进行液态发酵条件的优化,研究碳源、氮源、金属离子等培养基成分及培养基初始pH值、培养温度、装液量、接种量、转速等条件对产酶的影响,以确定菌株产酶的最佳培养基组成及培养条件。结果表明,使用价格比较低廉的2.0%麸皮为碳源、1.5%豆饼粉为氮源,同时添加0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1% K_2HPO_4 作为培养基,在培养条件为250 mL三角瓶中装液量为30 mL、接种量为8%、培养基pH值为6.0、培养温度为40℃、摇床转速为200 r/min的情况下培养48 h,菌株F21产酸性 α -淀粉酶的活性相对最高,此时酶活性为2 305.9 U/mL,比优化前初始酶活性(987.3 U/mL)提高1.34倍。

参考文献:

- [1] Minoda Y, Arai M, Torigoe Y. Acid-stable α -amylase of black aspergilli: part II. Some general properties [J]. Agr Biol Chem, 1968, 32(1): 104-109.
- [2] 钱萍. 酸性淀粉酶菌株的诱变选育及酶学性质研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(11): 183-186.
- [3] 刘洋, 王一琰, 白黎婧, 等. 一株酸性淀粉酶产生菌的分离鉴定及其酶学性质研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(4): 174-178.
- [4] 王建玲, 陈志鑫, 刘逸寒, 等. 产耐酸性 α -淀粉酶菌株的分离、鉴定、酶学特性研究及发酵培养基的优化[J]. 生物技术通报, 2014(4): 159-163.
- [5] 张大为, 张洁, 王能强, 等. 一株产酸性 α -淀粉酶产生菌的分离鉴定及所产酶学特性的初步研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(2): 93-99.
- [6] 郭宏文, 郭建华, 邹东恢. 酸性 α -淀粉酶产生菌的筛选[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12): 360-361, 362.
- [7] Yoo Y J, Hong J, Hatch R T. Comparison of alpha-amylase activities from different assay methods [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1987, 30(1): 147-151.
- [8] 史永昶, 姜涌明, 樊飏, 等. 蛋白酶对解粉芽孢杆菌 α -淀粉酶活力的影响[J]. 微生物学通报, 1995(1): 23-25.
- [9] 李春喜, 姜丽娜, 邵云, 等. 生物统计学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 330-332.