

生淀粉糖化酶产生菌营养条件的初步优化

刘连成, 陆正清

(江苏食品职业技术学院生物工程系, 江苏 淮安 223003)

摘要: 研究发酵培养基组成对菌株产酶的影响, 通过正交试验优化得出菌株产酶的最佳发酵培养基。优化结果表明, 以玉米淀粉为碳源, 蛋白胨和酵母膏为复合氮源, 满足该菌对维生素和主要无机盐的需要时, 生淀粉酶活力可达 194.9 U/mL, 是优化前的 1.1 倍。

关键词: 生淀粉糖化酶; 产生菌; 营养条件; 优化

中图分类号: Q55; TQ920

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2009)06-0043-04

Preliminary Optimization of the Nutritional Conditions of RSGA-producing Strain

LIU Lian-cheng and LU Zheng-qing

(Department of Biology Engineering, Jiangsu Food Science College, Huaian, Jiangsu 223003, China)

Abstract: The nutritional conditions of raw starch-digesting glucoamylase-producing strain (RSGA-producing strain) were investigated and the effects of the compositions of fermentation culture medium on RSGA were studied. The optimum fermentation culture medium was obtained through orthogonal test. The results showed that when corn starch used as carbon source and peptone and yeast extract used as complex nitrogen source and sufficient vitamins and main organic salts provided, the activity of RSGA could reach up to 194.9 U/mL (1.1 times than that before the optimization).

Key words: RSGA -producing strain; nutritional conditions; optimization

生淀粉酶是指对不经过蒸煮糊化的生淀粉颗粒能够表现出强水解活性的酶类。生淀粉糖化酶 (raw starch-digesting glucoamylase, RSGA) 能够直接水解生淀粉为葡萄糖, 可将传统工艺中的淀粉糊化、液化、糖化合并为一步直接进行糖化, 具有良好的节能前景。生淀粉糖化酶已被用于生淀粉质原料的无蒸煮酒精发酵, 可节约总能耗的 30%~40%^[1]。正是由于生淀粉糖化酶具有的经济价值和某些特殊用途, 因此, 一直受到国内外许多研究人员的关注^[2]。本研究旨在对生淀粉糖化酶产生菌^[3~5]的最佳碳源、氮源、矿质元素以及生长因子的种类和数量需要进行系统的基础研究。以弄清该菌的最佳营养要求, 为厂家对该菌的应用生产提供技术支持和科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌种^[6]

由南京农业大学农业环境微生物工程重点开放实验室提供。

1.2 培养基

种子培养基(g/L)^[7]: 蛋白胨 10, 酵母膏 5, 葡萄糖

10, pH 值为 6.5。

基础发酵培养基 (g/L): 玉米淀粉 10, 酵母膏 3, NH_4NO_3 2, K_2HPO_4 2, KH_2PO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KCl 0.5, pH 自然。121 °C 灭菌 30 min。其中玉米淀粉用甲醛蒸汽灭菌 24 h 后再在 105 °C 下干热灭菌 2 h, 然后无菌操作加入。

培养条件: 培养温度 30 °C, 摇床转速为 180 r/min。

1.3 方法

1.3.1 菌量测定

在每批组培养过程中和培养结束时, 定时取样用 10 倍稀释法稀释后, 准确取样培养, 菌落形成后, 用光电自动菌落计数器法计数活菌数^[8]。

1.3.2 粗酶液的制备

菌株 SDE 的接种量 (活化培养 18 h) 为 8% (V/V), 30 °C 摇瓶培养 48 h, 发酵液 4000 r/min, 离心 10 min, 取上清液即为粗酶液。

1.3.3 酶活力的测定^[9]

生淀粉酶酶活测定方法: 取 1% 的生淀粉悬浮液 2.0 mL 加入到 50 mL 三角烧瓶中, 添加 pH6.0 磷酸氢二

收稿日期: 2009-03-24

作者简介: 刘连成 (1973-), 男, 江苏淮安人, 硕士, 讲师, 主要从事发酵微生物应用研究。

钠-柠檬酸缓冲溶液 2 mL, 40 °C 预热 10 min, 加入 1.0 mL 适当稀释的酶液, 在 40 °C 恒温振荡 (180 r/min) 反应 30 min 后, 加入 4 % 的氢氧化钠溶液 0.5 mL 终止反应, 反应液用 3000 r/min 离心 10 min, 上清液用 DNS 法测定葡萄糖量。测定时每个样品平行测定 3 次, 取其平均值。

酶活力定义: 在以上测定条件下, 1min 释放 1 μg 葡萄糖的酶量定义为一个酶活力单位 U。

1.3.4 发酵培养基碳源对菌株产酶的影响

分别将添加量为 2 % 玉米淀粉、大麦淀粉、糊精、蔗糖、葡萄糖、半乳糖作为基础发酵培养基中的碳源, 进行产酶试验, 并在产酶高峰测定各碳源培养基中的粗酶液酶活力。

1.3.5 发酵培养基中不同氮源对菌株产酶的影响

菌株 SDE 在以玉米淀粉为碳源, 分别将有机氮源和无机氮源作为基础培养基中的氮源, 同上法进行产酶试验。

1.3.6 复合氮源对菌株产酶的影响

以不同蛋白胨和酵母膏的添加量作为复合氮源, 进行产酶试验。

1.3.7 发酵培养基中维生素对菌株产酶的影响

在基础发酵培养基中加入 2 mg/L 不同种类的 VB1、VB2、VB3、VB4、VB5、VB6、VB11、VH。同前法配制成液体培养基, 并进行测定各维生素中的菌量及粗酶液酶活, 以确定其对维生素的需求情况。

1.3.8 矿质元素对菌株产酶的影响

以玉米淀粉为基础发酵培养基碳源, 加入不同种类的无机盐, 配成液体培养基, 进行酶活试验, 以了解该菌对矿质元素的需要。

1.3.9 发酵培养基最佳配方的选择

根据单因素试验结果, 在基础培养基基础上选择影响生淀粉酶产酶水平的碳源(g/L)、复合氮源、维生素 VH (mg/L) 及矿质元素 Ca^{2+} (mmol/L) 4 个因素, 根据添加量的不同取 3 个水平进行正交试验, 测定生淀粉酶活力, 确定最佳正交组合和表现正交组合。

1.3.10 发酵培养基最佳配方的验证

为了进一步验证正交试验的结果, 按最佳正交组合对基础培养基进行优化, 和表现正交组合的培养基配方进行验证试验。

2 结果和讨论

2.1 碳源种类对菌体生长和产酶的影响

碳源是菌体合成自身骨架的主要物质来源, 是影响菌体生长和代谢产物合成的重要因素。菌株在不同碳源

的基础发酵培养基中生长, 产酶能力不一(见表 1)。

表1 不同碳源对菌株产酶的影响

碳源	添加量(g/L)	酶活(U/mL)
大麦淀粉	20	152.76
玉米淀粉	20	186.5
糊精	20	158.4
蔗糖	20	107.6
半乳糖	20	75.8
葡萄糖	20	166.5
果糖	20	140.8

表 1 结果表明, 在玉米淀粉为碳源的基础发酵培养基中, 菌体不仅生长良好, 而且产酶能力较强, 对半乳糖和蔗糖的利用能力则相对较弱, 产酶能力不高。

2.2 氮源种类对菌体生长和产酶的影响

菌体合成自身蛋白和遗传物质的主要来源是氮源。菌株 SDE 在以玉米淀粉为碳源, 不同氮源的基础培养基中生长, 产酶能力各异(见表 2)。

表2 不同氮源对菌株产酶的影响

氮源	添加量(g/L)	酶活(U/mL)
蛋白胨	5	175.3
酵母膏	5	178.3
蛋白胨和酵母膏(占总氮源的质量百分比相同)	5	190.5
硫酸铵	5	56.8
氯化铵	5	74.4
硝酸铵	5	86.4
磷酸二氢铵	5	95.2

从表 2 可以看出, 在含蛋白胨和酵母膏的复合氮源培养基中菌体生长较好, 产酶能力也很强, 酶活达到 190.5 U/mL, 比优化前提高了 7.9 % (优化前菌株酶活为 176.5 U/mL)。同时可以看出, 各种无机氮源对于菌株产酶能力较小, 在一定程度上说明了菌株 SDE 对于无机氮源的利用能力较一般。

2.3 发酵培养基中复合氮源对菌株产酶的影响

菌株在不同添加量的酵母膏与不同添加量的蛋白胨组成复合氮源的基础培养基中生长情况见表 3。

表3 复合氮源对菌株产酶的影响

复合氮源	酶活(U/mL)
酵母膏10% + 蛋白胨90%	176.6
酵母膏20% + 蛋白胨80%	178.2
酵母膏30% + 蛋白胨70%	181.2
酵母膏40% + 蛋白胨60%	180.4
酵母膏50% + 蛋白胨50%	185.5
酵母膏60% + 蛋白胨40%	178.2
酵母膏70% + 蛋白胨30%	175.0
酵母膏80% + 蛋白胨20%	176.0
酵母膏90% + 蛋白胨10%	170.1

从表 3 中可以看出, 当蛋白胨与酵母膏添加量分别

为总氮源 50 % 时,酶活力最高,为 185.5 U/mL,酶活提高 5.1 % (优化前菌株酶活为 176.5 U/mL)。因此,选择添加量为总氮源 50 % 的酵母膏与总氮源 50 % 的蛋白胨组成的复合氮源作为发酵培养基中的氮源,有利于菌株生长产酶。

2.4 SDE 菌株生长维生素营养要求的研究

SDE 菌株在以不同维生素作为生长因子的基础发酵培养基中生长,生长及产酶情况见表 4。

表4 不同维生素对菌株产酶的影响

维生素 (2mg/L)	活菌数 ($\times 10^7$ 个/mL)	酶活 (U/mL)
VB1	4.36	166.7
VB2	3.23	132.6
VB3	4.45	164.3
VB4	5.33	154.6
VB5	3.13	136.8
VB6	2.47	112.7
VB11	3.40	124.9
VH	6.54	181.5

表 4 结果表明,2 mg/L 不同维生素对 SDE 菌株生长有一定影响。其中 VB1、VB3、VB4 菌数较高,为 $4.36 \times 10^7 \sim 5.33 \times 10^7$ 个/mL。VB6 菌数最少,为 2.47×10^7 个/mL。而生物素 VH 对生长影响最明显,比其他维生素都好,菌数最高,为 6.54×10^7 个/mL。酶活最高为 181.5 U/mL。因此,优化营养条件时可选择添加生物素 VH 促进 SDE 菌株的生长及产酶。

2.5 SDE 菌株生长对矿质元素要求的研究

SDE 菌株在不同种类矿质元素的基础发酵培养基中的酶活力情况见表 5。

表5 不同矿质元素对菌株产酶的影响

矿质元素 (1.5mmol/L)	酶活 (U/mL)
Mn ²⁺	164.8
Ba ²⁺	132.7
Mg ²⁺	178.7
Cu ²⁺	127.5
Zn ²⁺	175.7
Ca ²⁺	186.9
Fe ³⁺	174.3

从表 5 可以看出,SDE 菌株在 1.5 mmol/L Ba²⁺ 或 Cu²⁺ 存在条件下酶活明显受到抑制,菌株在 1.5 mmol/L Ca²⁺ 存在的条件下酶活最高,达 186.9 U/mL。说明 Ca²⁺ 对生淀粉酶具有一定的激活作用。因此,在培养基中选择添加一定浓度的 Ca²⁺ 有利于 SDE 菌株的生长产酶。

2.6 发酵培养基最佳配方的选择

根据培养基单因素试验结果,选择影响生淀粉酶产酶水平的碳源(g/L)、复合氮源(蛋白胨与酵母膏各占总氮源 50 %)、维生素 VH(mg/L)和矿质元素 Ca²⁺(mmol/

L)4 个因素,根据添加量的不同取 3 个水平(见表 6)进行正交试验,通过测定生淀粉酶活力确定最佳的发酵培养基配方。发酵培养基正交试验结果分析见表 7。

表6 发酵培养基正交试验因素水平

水 平	A 碳源 (g/L)	B 复合氮源 (%)	C 维生素VH (mg/L)	D 矿质元素Ca ²⁺ (mmol/L)
1	10	0.3	1.5	1.0
2	15	0.5	2.0	1.5
3	20	0.8	2.5	2.0

表7 发酵培养基正交试验结果分析

试验号	A碳源 (g/L)	B复合氮源 (%)	C维生素VH (mg/L)	D矿质元素Ca ²⁺ (mmol/L)	酶活 (U/mL)
1	1	1	1	1	164.2
2	1	2	2	2	185.4
3	1	3	3	3	170.4
4	2	1	2	3	182.5
5	2	2	3	1	175.8
6	2	3	1	2	177.1
7	3	1	3	1	178.4
8	3	2	2	3	184.0
9	3	3	1	2	174.7
K1	519.9	525	525.3	514.8	
K2	535.5	545.1	542.7	540.9	
K3	537	522.3	524.7	537	
K1'	173.3	175.0	175.1	171.6	
K2'	178.5	181.7	180.9	180.3	
K3'	179.0	174.1	174.9	179.0	
R	5.7	7.6	6.0	8.7	
最佳组合	A ₃ B ₂ C ₂ D ₂				

由表 7 可知,发酵培养基的最佳表观组合为 A₃B₂C₂D₂,酶活力最高为 185.4 U/mL。最佳正交组合为 A₃B₂C₂D₂。而从 R 值来看,发酵培养基 Ca²⁺ 对产酶影响最显著,其次是复合氮源的添加量,最后是碳源的添加量。

2.7 发酵培养基最佳配方的验证

为了进一步验证正交试验的结果,按最佳正交组合和表观正交组合对基础培养基进行优化,并进行验证试验,结果见表 8。

表8 验证试验结果

组合	正交分析所得最佳组合	表观最佳组合
	A ₃ B ₂ C ₂ D ₂	A ₁ B ₂ C ₂ D ₂
酶活 (U/mL)	194.9	185.4

由表 8 可知,按照正交分析所得最佳组合 A₃B₂C₂D₂ 进行试验,菌株 SDS 生长产酶的酶活达 194.9 U/mL,比优化前提高了 10.4 %。由此可见最佳的发酵培养基组成为:玉米淀粉 20 g,蛋白胨 2.5 g,酵母膏 2.5 g,VH 2 mg,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,CaCl₂ 1.5 mmol,K₂HPO₄ 2g,KH₂PO₄ 0.5 g,KCl 0.5 g,蒸馏水 1000 mL。

3 结论

3.1 通过发酵培养基组成的单因素试验得出,以 20 g/L 的玉米淀粉作为碳源时的菌株产酶效果最好,2.5 g/L 的酵母膏与 2.5 g/L 的蛋白胨组合作为氮源时的菌株产酶效果最好,生物素(VH)对菌株 SDE 生长有最明显的促进作用,其菌数最高,可视为最佳生长因子,矿质元素 Ca^{2+} (2 mmol/L)对菌株 SDE 产生淀粉酶有最佳激活作用。

3.2 通过正交试验优化得出,该菌株产酶最佳发酵培养基组成为:玉米淀粉 20 g,蛋白胨 2.5 g,酵母膏 2.5 g, VH 2 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, CaCl_2 1.5 mmol, K_2HPO_4 2 g, KH_2PO_4 0.5 g, KCl 0.5 g, 蒸馏水 1000 mL。

3.3 该最佳发酵培养基培养 SDS 菌株产酶活力最高为 194.9 U/mL,比优化前提高了 10.4 %。

参考文献:

- [1] 方善康,朱明田.无蒸煮生淀粉酒精发酵研究[J].食品与发酵工业,1988,(2):13-19.
- [2] 诸葛斌,姚惠源,姚卫蓉.生淀粉糖化酶的结构和作用机理[J].工业微生物,2001,31(1):49-51.

- [3] Jeang CL, Chen LS, Shiau RJ. Cloning of a gene encoding raw-starch digesting amylase from *Cytophaga* sp. and its expression in *E. coli*[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 3651-3654.
- [4] Kim TU, Gu BG, Jeong JY, Byun SM, Shin YC. Purification and characterization of a maltotetraose-forming alkaline α -amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain, GM8901[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 3105-112.
- [5] Nidhi Goyal, J.K. Gupta, S.K. Soni. A novel raw starch digesting thermostable-amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 37: 723-734.
- [6] 李凤玲,张璐,刘连成,等.生淀粉糖化酶产生菌 *Cellulosimicrobium* SP. SDE 的分离鉴定及酶学性质研究[J].工业微生物, 2008,38(5):45-49.
- [7] 范秀容.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1989.
- [8] Michael J. Pelczar, J. r. Laboratory exercises in Microbiology[M]. New York, 1977.
- [9] 诸葛斌,姚惠源,诸葛健.生淀粉糖化酶高产菌的选育[J].微生物学通报,2001,28(6):60-64.

(上接第 42 页)

的吸附具有促进作用^[7]。实验中发现添加 Fe^{3+} ,纤维素酶水解的水解率提高约 3 %,且水解率在反应 14 h 后达到峰值,较之未添加 Fe^{3+} 的出现时间提前。

3 结论

3.1 通过实验发现: Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 对酶活力都有不同程度的促进作用,其中以 Fe^{3+} 最高; Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Mn^{2+} 对酶活力有抑制作用,以 Cu^{2+} 最强;而 Ca^{2+} 则对酶活力影响不大。

3.2 纤维素酶对纤维素的吸附在 14 h 后接近平衡,加入 Fe^{3+} 对纤维素酶的吸附具有促进作用,吸附速度提高,吸附量增加,因此可推测金属离子对酶活力不同程度的促进作用是由于使底物更有利于同酶的活性部位相结合而加速反应进行,提高水解效率,金属离子在其中起了某种搭桥作用。 Fe^{3+} 的存在还可提高纤维素酶对乙醇的耐受能力,这个结果在一定程度上可以改善同步糖化发酵过程中产物乙醇对纤维素酶活力的抑制问题。纤维素酶活力的发挥与其酶系协同作用密切相关^[8], Fe^{3+} 对于绿色木霉系 β -葡萄糖苷酶活力激活作用显著,对于更有效地应用纤维素酶值得进一步研究。

参考文献:

- [1] Henning Jorgensen, Jan Bach Kristensen. Claus Enzymatic conversion of Felbylignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities [J]. Biofuels, Bioproducts and Biorefining. 2007, (1):119-134.
- [2] 董义伟.绿色木霉固态发酵降解纤维素的研究[D].成都:四川大学,2006.
- [3] 周津,阮宏,孙连魁.绿色木霉 A10 纤维素酶的分离纯化及理化性质研究[J].西北大学学报,1994, 24(5):465-466.
- [4] 董晓燕.生物化学实验[M].北京:化学工业出版社,2003.
- [5] 赵晶.玉米芯酶法糖化生产乙醇的研究[D].杭州:浙江大学,2007.
- [6] M. Ballesteros, J.M. Oliva, M.J. Negro, etc. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875[J]. Process Biochemistry, 2004, (39):1843-1848.
- [7] 曾晶,叶媛,龚大春,等.表面活性剂对纤维素酶水解过程的影响[J].酿酒科技,2008, (12):38-43.
- [8] Alex Berlin, Vera Maximenko, Neil Gilkes, etc. Optimization of Enzyme Complexes for Lignocellulose Hydrolysis[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, (97):287-296.

欢 迎 订 阅 《 酿 酒 科 技 》