

高产淀粉酶和蛋白酶的黑曲霉菌株的发酵条件优化

谭海刚, 李静, 杨文浩

(青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266109)

摘要: 本文分离筛选到一株高产蛋白酶和淀粉酶黑曲霉菌株 A020, 确定该菌的最佳产酶培养基为: 香蕉皮基础培养基中添加 1% 蛋白胨、1% 麦芽糖和 3×10^{-3} mol/L NaCl; 最佳发酵条件为: 30 °C、pH 6.5、装液量 150 mL/500 mL。在此条件下, 150 r/min 摇瓶培养 4 d, 测得淀粉酶、蛋白酶酶活分别为 1278 U/mL 和 918 U/mL, 淀粉酶和蛋白酶的酶活分别比优化前提高了 68.2%、41.2%。

关键词: 黑曲霉; 蛋白酶; 淀粉酶

文章编号: 1673-9078(2013)4-808-811

Optimization of Fermentation Conditions for the Production of Amylase and Protease by a Strain of *Aspergillus niger*

TAN Hai-gang, LI Jing, YANG Wen-hao

(College of food science and technology, Qingdao agricultural university, Qingdao 266109, China)

Abstract: A strain A020 of *Aspergillus niger* with high productivity of amylase and protease was isolated. The optimum compositions of fermentation medium were as followed: 1% peptone, 1% maltose and 3×10^{-3} mol/L NaCl in banana peel basic medium. And the optimum fermentation conditions were achieved as follows: temperature 30 °C, initial pH 6.5 and medium volume 150 mL in 500 mL flask. Under these conditions, the activities of amylase and protease and cultured for 4 d at 150 r/min were 1278 U/mL and 918 U/mL, respectively. The amylase and protease activities increased by 68.2% and 41.2%, respectively.

Key words: *Aspergillus niger*; protease; amylase

随着农业产业化结构的调整, 香蕉深加工产业迅速发展, 与此同时产生了大量的香蕉皮(占果实重量的 30%左右)^[1]。香蕉皮中含有大量的果胶、低聚糖、纤维素、半纤维素等膳食纤维, 具有很高的开发价值^[2-3]。但长期以来, 香蕉皮一直作为废弃物直接丢弃, 对其还没有很好地利用, 不但浪费资源而且污染环境^[4-5]。因此, 如何提高香蕉皮的利用价值, 有效地利用这一资源是目前亟待解决的问题。

目前关于香蕉皮膳食纤维的提取多为化学法或酶解法^[6-7]。采用发酵法提取香蕉皮膳食纤维的研究尚未见报道, 原因是难以获得一种可以分解香蕉皮中蛋白质、淀粉等物质同时保留膳食纤维的微生物菌种。本文致力于筛选一株高产蛋白酶和淀粉酶的黑曲霉菌株, 并对该菌株的培养基和发酵条件进行优化, 为发酵法提取香蕉皮膳食纤维奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

香蕉: 市售; 黑曲精, 上海迪发酿造生物制品有限公司; SPX 型智能生化培养箱, 宁波东海仪器有限公司; TGL-16C 型台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 组织捣碎机, 龙口市先科仪器公司。

1.2 培养基

1.2.1 淀粉酶平板分离培养基

蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 牛肉膏 5 g, 可溶性淀粉 2 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL, pH=6.5。

1.2.2 香蕉皮基础培养基

将香蕉皮煮沸后, 加等量水, 用组织捣碎机打浆, 搅拌均匀, pH=6.5。

1.3 方法

1.3.1 高产蛋白酶和淀粉酶黑曲霉菌株

1.3.1.1 初筛

将黑曲精在无菌水中活化 30 min, 涂布于淀粉酶平板分离培养基, 28 °C 培养 3 d, 喷洒碘液, 测量透明圈直径和菌落直径, 根据圈径比确定复筛菌株。

收稿日期: 2012-11-26

基金项目: 青岛农业大学第四届大学生创新教育立项 (2010)

作者简介: 谭海刚 (1979-), 男, 讲师, 研究方向为发酵工程; 杨文浩 (1989-), 女, 生物工程 2008 级学生

通讯作者: 李静

1.3.1.2 复筛

将复筛菌株接入香蕉皮基础培养基 (100 mL/500 mL 三角瓶), 于 28 °C 150 r/min 条件下发酵 4 d, 测酶活, 确定一株高产淀粉酶和蛋白酶黑曲霉菌株, 进行进一步优化。

1.3.2 最佳产酶培养基的确定

1.3.2.1 NaCl添加量的确定

分别将香蕉皮基础培养基中 NaCl 浓度调整到 0、 1×10^{-3} 、 2×10^{-3} 、 3×10^{-3} 、 4×10^{-3} mol/L, 28 °C、150 r/min 条件下发酵 4 d, 测酶活, 确定最佳 NaCl 添加量。

1.3.2.2 外加碳源的确定

分别将 1% 的蔗糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、淀粉、糊精、微晶纤维素添加到香蕉皮基础培养基中, 28 °C、150 r/min 条件下发酵 4 d, 测酶活, 确定最佳外加碳源。

1.3.2.3 外加氮源的确定

分别将 1% 的牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、尿素、硫酸铵添加到香蕉皮基础培养基中, 28 °C、150 r/min 条件下发酵 4 d, 测酶活, 确定最佳外加氮源。

1.3.3 最佳发酵条件的确定

在 1.3.2 所确定的最佳培养基下进行最佳发酵条件的优化。

1.3.3.1 发酵温度的确定

分别在 25 °C、28 °C、33 °C、35 °C、37 °C 条件下 150 r/min 摇瓶发酵 4 d, 测酶活, 确定最佳发酵温度。

1.3.3.2 初始 pH 值的确定

分别调初始 pH 为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5, 最佳温度、150 r/min 条件下发酵 4 d, 测酶活, 确定最佳初始 pH。

1.3.3.3 装液量的确定

分别取 50 mL、100 mL、150 mL、200 mL、250 mL 的香蕉皮基础培养基于 500 mL 三角瓶中最佳温度、最佳 pH、150 r/min 条件下发酵 4 d, 测酶活, 确定最佳装液量。

1.3.3.4 发酵条件优化

在单因素实验的基础上, 以酶活为指标, 利用正交实验进一步考察发酵温度、初始 pH 和装液量 3 个因素对酶活的影响。

1.3.4 酶活力测定

淀粉酶活力测定-DNS 法^[8]: 1 U 是指在特定条件下, 每分钟催化可溶性淀粉产生 1 mg 葡萄糖的酶量。

蛋白酶活力测定-福林-酚法^[8]: 1U 是指在特定条件下, 每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸的酶量。

2 结果与分析

2.1 高产蛋白酶和淀粉酶黑曲霉菌株的筛选

2.1.1 初筛

表 1 黑曲霉菌株初筛结果

Table 1 Primary screening of the strains

菌株编号	A003	A007	A010	A011	A013	A016	A019	A020
圈径比	1.34	1.50	2.81	2.57	2.34	2.15	3.06	3.15

由表 1 可知, 有 9 株黑曲霉的圈径比较大, 其中, A010、A019、A020 的圈径比最大, 在 3 左右, 确定为复筛菌株。

2.1.2 复筛

表 2 黑曲霉菌株摇瓶复筛结果

Table 2 Secondary screening of the strains

菌株	淀粉酶酶活/(U/mL)	蛋白酶酶活/(U/mL)
A010	710	672
A019	710	620
A020	760	650

由表 2 可知, 菌株 A020 的淀粉酶酶活最高, 蛋白酶酶活较高且与最高酶活相差不大, 确定 A020 作为目标菌株进行下一步研究。

2.2 最佳产酶培养基的确定

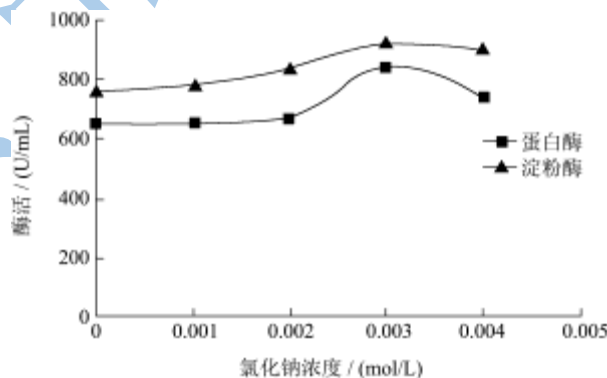


图 1 氯化钠浓度对蛋白酶、淀粉酶酶活的影响

Fig.1 Effect of NaCl concentration on the enzyme activities

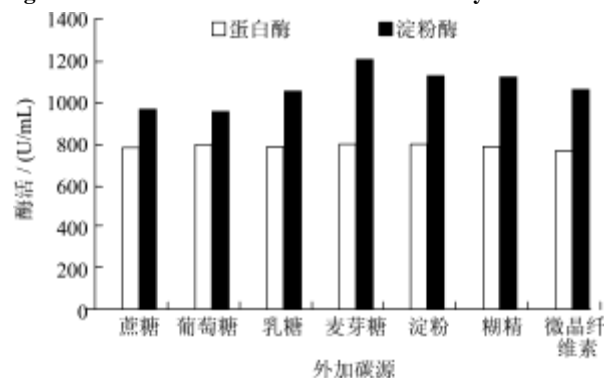


图 2 外加碳源对蛋白酶、淀粉酶酶活的影响

Fig.2 Effect of supplied carbon sources on the enzyme activities

注: 外加碳源的浓度为 1%。

2.2.1 NaCl浓度对蛋白酶、淀粉酶酶活的影响

由图1可知,氯化钠对蛋白酶和淀粉酶的酶活有较大影响,在浓度为 3×10^{-3} mol/L时,淀粉酶和蛋白酶的酶活最高,分别为918 U/mL和836 U/mL。

2.2.2 外加碳源对蛋白酶、淀粉酶酶活的影响

由图2可知,以麦芽糖为外加碳源的的淀粉酶活最高,为1208 U/mL,同时,蛋白酶活力较高,为792 U/mL,与最高酶活相差不大,确定最佳外加碳源为麦芽糖。

2.2.3 外加氮源对蛋白酶、淀粉酶酶活的影响

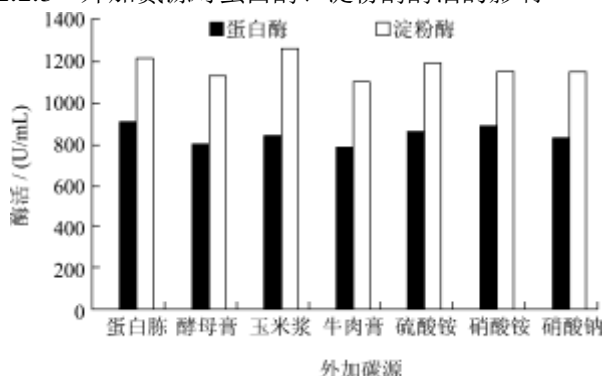


图3 外加氮源对蛋白酶、淀粉酶酶活的影响

Fig.3 Effect of additional nitrogen sources on the enzyme activities

注:外加碳源的浓度为1%。

由图3可知,以玉米浆为外加氮源时,虽然淀粉酶酶活最高,但其蛋白酶酶活较低,故不是最佳氮源。而以蛋白胨为外加氮源时,蛋白酶酶活最高,为903 U/mL。同时,淀粉酶酶活力较高,为1211 U/mL,与最高酶活相差不大,确定最佳外加氮源为蛋白胨。

2.3 最适发酵条件的确定

2.3.1 培养温度对蛋白酶、淀粉酶酶活的影响

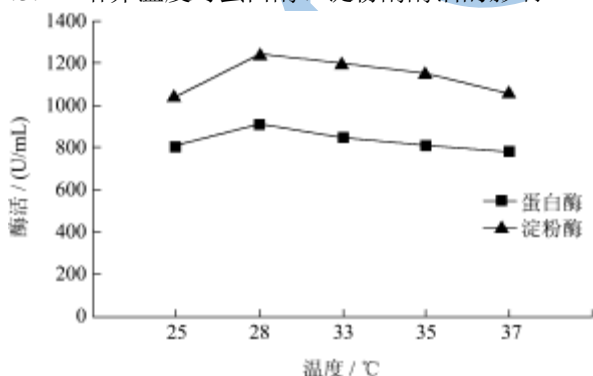


图4 温度对蛋白酶、淀粉酶酶活的影响

Fig.4 Effect of temperature on the enzyme activities

由图4可知,菌株 A020 在 28 °C 发酵时,蛋白酶和淀粉酶的酶活最高,分别为 913 U/mL 和 1246 U/mL,确定最佳发酵温度为 28 °C。

2.3.2 初始pH对蛋白酶、淀粉酶酶活的影响

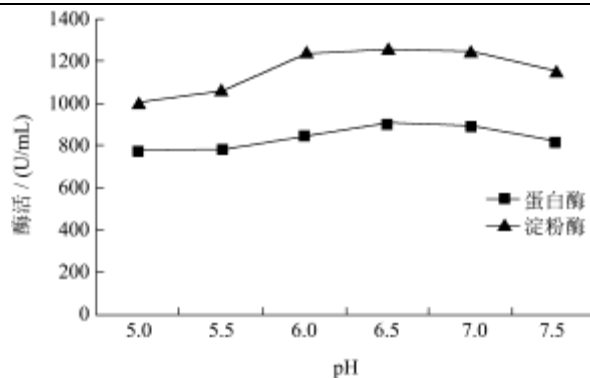


图5 不同 pH 对蛋白酶、淀粉酶酶活的影响

Fig.5 Effect of pH on the enzyme activities

由图5可知,菌株 A020 在 pH=6.5 时,蛋白酶和淀粉酶的酶活最高,分别为 909 U/mL 和 1290 U/mL,确定最佳 pH 为 6.5。

2.3.3 装液量对蛋白酶、淀粉酶酶活的影响

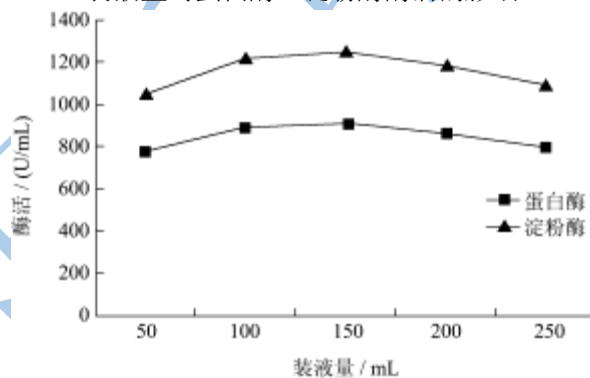


图6 装液量对蛋白酶、淀粉酶酶活的影响

Fig.6 Effect of medium volume on the enzyme activities

由图6可知,500 mL 的三角瓶中装液量为 150 mL 时,蛋白酶和淀粉酶的酶活最高,分别为 912 U/mL 和 1290 U/mL,确定 500 mL 的三角瓶中最佳装液量为 150 mL。

2.3.4 发酵条件的优化

考虑到各因素的交互影响,在单因素实验的基础上,以蛋白酶和淀粉酶酶活为指标设计正交实验进一步优化发酵条件,因素水平设计见表3,试验结果见表4。

表3 因素水平表

Table 3 Factors and levels

水平	A (温度/°C)	B (初始 pH)	C (装液量/mL)
1	26	6	120
2	28	6.5	150
3	30	7	180

2.3.5 最优发酵条件验证实验

150 mL 香蕉皮基础培养基、30 °C、初始 pH=6.5、150 r/min 条件下发酵 4 d,淀粉酶、蛋白酶酶活分别为 1278 U/mL 和 918 U/mL,均高于正交实验的结果。

表 4 正交试验结果

Table 4 Orthogonal test results

因素	A	B	C	蛋白酶	淀粉酶
				酶活/(U/mL)	活/(U/mL)
1	1	1	1	821	1056
2	1	2	2	839	1138
3	1	3	3	818	1037
4	2	1	2	910	1241
5	2	2	3	892	1232
6	2	3	1	893	1223
7	3	1	2	898	1220
8	3	2	1	907	1238
9	3	3	3	905	1245
蛋白酶 k ₁	826	876	874		
蛋白酶 k ₂	898	879	885		
蛋白酶 k ₃	903	872	869		
R	77	7	16		
淀粉酶 k ₁	1077	1172	1178		
淀粉酶 k ₂	1232	1203	1194		
淀粉酶 k ₃	1234	1168	1172		
R	157	35	22		

3 结论

本实验从黑曲精中筛选得到一株高产蛋白酶和淀粉酶黑曲霉菌株 A020, 通过单因子实验获得菌株 A020 的最佳产酶培养基为: 香蕉皮基础培养基中添加

蛋白胨 1%、麦芽糖 1%、NaCl 为 3×10^{-3} mol/L; 最佳发酵条件为: 30 ℃、pH=6.5、装液量 150 mL/500 mL。在上述培养条件下, 150 r/min 摇瓶培养 4 d, 测得淀粉酶、蛋白酶酶活分别为 1278 U/mL 和 918 U/mL, 淀粉酶和蛋白酶的酶活分别提高了 68.2%、41.2%, 为发酵法提取香蕉皮膳食纤维奠定了基础。

参考文献

- [1] 李琴.香蕉皮黄酮提取工艺研究[J].陕西农业科学, 2012, 2: 34-37
- [2] Zhang PY, Zhang Q, Whistler R L. L-arabinose release from a rabinoxylan and arabinogalactan under potential gastric acidities [J]. Cereal Chemistry, 2003, 80(3): 252
- [3] 王辰,马立安.香蕉皮果胶的提取及其对凝固型酸奶稳定性的影响[J].现代食品科技,2008,24(5):459-461,465
- [4] 顾生玖,朱开梅,许有瑞,等.香蕉皮利用现状与药理作用的研究进展[J].安徽农业科学,2008,36(20):8771-8772
- [5] 李哲,李芬芳,袁德保,等.超声波辅助提取低褐变程度香蕉皮中总酚的研究[J].现代食品科技,2012,28(9):1166-1169, 1172
- [6] 付全意,刘冬,李坚斌,等.膳食纤维的提取方法[J].食品科技, 2007,2:225-227
- [7] 陈军,宋维春,徐云升.从香蕉皮提取膳食纤维研究[J].食品科学,2007,28(1):99-101
- [8] 郭承义,王志,陈雄,等.高产蛋白酶和淀粉酶米曲霉菌株的选育[J].中国调味品,2012,37(2): 42-45