

文章编号:1673-1689(2007)03-0106-04

# *Penicillium* sp. X-1 液态发酵产生淀粉酶的优化

孙海彦<sup>1,2</sup>, 张伟国<sup>1,2</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 通过摇瓶发酵, 研究了培养基成分对 *Penicillium* sp. X-1 液态发酵产生淀粉酶的影响。结果表明: 碳源、氮源及  $MgCl_2$  对产酶有较大的影响, 经响应面优化得到的培养基组成为: 玉米粉 42 g/L, 豆粕粉 30 g/L,  $MgCl_2$  16 mmol/L, 在最优条件下酶活达到 239 U/mL, 与采用基本培养基的相比, 酶活提高了 7.5 倍。

**关键词:** 生淀粉酶; 青霉; 响应面

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

## Optimization of the Production of Raw Starch Digesting Enzyme by *Penicillium* sp. X-1 under Submerged Culture

SUN Hai-yan<sup>1,2</sup>, ZHANG Wei-guo<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Flask liquid-state fermentation experiments were to study the optimal medium for the production of raw starch digesting enzyme by *Penicillium* sp. X-1. The results showed that the carbon source, nitrogen source and  $MgCl_2$  play key role on the production of raw starch digesting enzyme. The optimum medium obtained by response surface analysis as follow: corn meal 42 g/L, soybean meal 30 g/L,  $MgCl_2$  16 mmol/L. Upon the optimum medium, the raw starch digesting enzyme activity reached 239 U/mL, which was 7.5 fold of that obtained from the basal medium.

**Key words:** raw starch digesting enzyme; *Penicillium*; response surface analysis

生淀粉酶是指能水解不经过蒸煮糊化的生淀粉颗粒的酶类, 由于其可将传统的淀粉糊化、液化、糖化合并为一步, 具有优良的节能前景, 因此一直受到国内外许多研究人员的关注<sup>[1]</sup>。目前报道的能产生淀粉酶的菌种主要是黑曲霉<sup>[2]</sup>、根霉<sup>[3]</sup>和细菌<sup>[4]</sup>, 有关青霉的报道较少。作者以菌株 *Penicillium* sp. X-1 为发酵菌种, 研究了培养基成分和培养

条件对产酶的影响, 并用响应面优化试验对产酶条件进行了优化。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌种

作者所在实验室筛选的菌种 *Penicillium* sp. X-1。

收稿日期: 2006-07-03.

作者简介: 孙海彦(1979-), 女, 河南三门峡人, 发酵工程硕士研究生. Email: hysun168@126.com

通讯作者: 张伟国(1963-), 男, 江苏张家港人, 教授, 工学博士, 博导, 主要从事发酵工程的研究. Email: zhangwg168@126.com

## 1.2 材料、试剂与设备

玉米粉、糯米粉、荞麦粉和豆饼粉由市场购买,其它试剂均为分析纯级别;主要设备:回转式恒温摇瓶柜,恒温水浴振荡器和 722 型分光光度计。

## 1.3 产酶基本培养基组成及培养条件

装 50 mL 基本培养基(玉米淀粉 20 g/L,豆饼粉 20 g/L, pH 自然, 0.10 MPa 灭菌 20 min)于 250 mL 的摇瓶中, 30 °C 恒温摇床培养 96 h(转速 140 r/min), 测定酶活。

## 1.4 单因素实验

**1.4.1 不同碳源对产酶的影响** 采用不同的碳源替代基本培养基中的玉米粉,其它成分及培养条件不变,比较酶活。

**1.4.2 不同氮源对产酶的影响** 采用不同的氮源替代基本培养基中的豆饼粉,其它成分及培养条件不变,比较酶活。

**1.4.3 不同金属离子对产酶的影响** 在基本培养基中分别添加 10 mmol/L 的  $MgCl_2$ 、 $ZnSO_4$ 、 $FeSO_4$ 、 $BaCl_2$ 、 $CuSO_4$ 、 $NaCl$ 、 $MnSO_4$  和  $CaCl_2$ ,其它成分及培养条件不变,比较酶活。

## 1.5 响应面方法优化培养基

通过以上实验找出对产酶的影响显著的因素,设计响应面优化试验,优化培养基组成。

## 1.6 生淀粉酶活测定方法

取 1.0 mL 发酵液,经适当稀释后,5 000 r/min 离心 5 min,取上清液测酶活。取 4.0 mL 的 2 g/dL 生玉米淀粉悬浮液(用 0.1 mol/L pH 6.5 柠檬酸缓冲溶液配制),40 °C 预热 10 min,再加入 1 mL 适当稀释的酶液。40 °C 恒温振荡反应 30 min 后,加入 4% 的氢氧化钠溶液 0.5 mL 终止反应,反应液用 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液用 DNS 法<sup>[5]</sup>测葡萄糖量。

酶活力单位定义:在上述条件下,1 h 释放 1  $\mu$ mol 葡萄糖的酶量定义为一个酶活力单位。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素试验

**2.1.1 不同碳源对产酶的影响** 从表 1 可以看出,碳源质量浓度为 20 g/L 和 40 g/L 时,玉米粉都是最好的碳源,玉米粉质量浓度从 20 g/L 提高到 40 g/L,酶活提高了 2.5 倍,达到 80 U/mL。从表 1 还可知,容易利用的碳源不利于产酶,尤其是蔗糖、葡萄糖和果糖在质量浓度为 40 g/L 时,菌体生长良好,但不产酶;从图 1 可知,玉米粉的最佳质量浓度为 40 g/L。

表 1 不同碳源对产酶的影响

Tab. 1 Effect of carbon sources on enzyme production

碳源	酶活/(U/mL)	
	质量浓度 20 g/L	质量浓度 40 g/L
玉米粉	32	80
糯米粉	28	56
荞麦粉	12	26
玉米淀粉	21	53
木薯淀粉	30	47
山芋淀粉	19	36
土豆淀粉	12	28
糊精	26	37
麦芽糖	16	45
蔗糖	11	0
果糖	7	0
葡萄糖	5	0

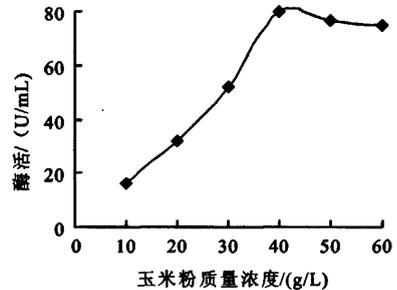


图 1 玉米粉质量浓度对产酶的影响

Fig. 1 Effect of corn meal concentration on enzyme production

**2.1.2 不同氮源对产酶的影响** 从表 2 可知,有机氮源比无机氮源更利于产酶。在所用有机氮源中,蛋白胨是最好的氮源,酶活达到 34 U/mL;其次是豆饼粉,酶活为 32 U/mL。考虑到这两种氮源产酶水平相差不多,蛋白胨却比豆饼粉价格高得多,故用豆饼粉作为氮源。从图 2 可知豆饼粉的最佳质量浓度为 30 g/L。

表 2 不同氮源对产酶的影响

Tab. 2 Effect of nitrogen sources on enzyme production

氮源 (20 g/L)	酶活/(U/mL)
蛋白胨	34
豆饼粉	32
牛肉膏	22
酵母膏	18
尿素	17
$NaNO_3$	18
$NH_4NO_3$	13
$NH_4Cl$	9
$(NH_4)_2SO_4$	6

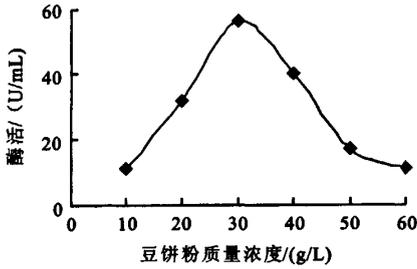


图2 豆饼粉质量浓度对产酶的影响

Fig. 2 Effect of soybean meal concentration on enzyme production

2.1.3 不同金属离子对产酶的影响 由表3可知,  $Mg^{2+}$  和  $Na^+$  对提高产酶量有利, 特别是  $Mg^{2+}$  可以使产酶水平提高 2.5 倍。添加  $Zn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  对产酶几乎没有影响, 添加  $Ba^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  不利于产酶。由图3可知, 在培养基中加入 15 mmol/L  $MgCl_2$  最有利于产酶, 酶活提高 3.1 倍, 达到 100 U/mL。

表3 不同金属离子对产酶的影响

Tab. 3 Effect of metal ions on enzyme production

金属离子	酶活/(U/mL)
对照	32
$Mg^{2+}$	80
$Zn^{2+}$	33
$Fe^{2+}$	32
$Ba^{2+}$	28
$Cu^{2+}$	10
$Na^+$	35
$Mn^{2+}$	33
$Ca^{2+}$	31

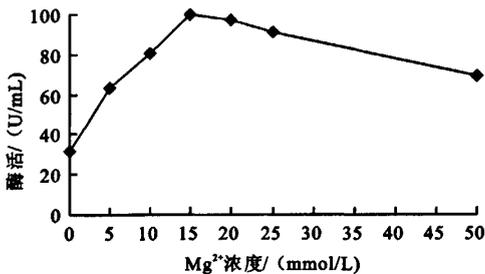


图3  $Mg^{2+}$  浓度对产酶的影响

Fig. 3 Effect of  $Mg^{2+}$  concentration on enzyme production

2.2 响应面方法优化培养基

2.2.1 实验因素及水平 根据以上单因子试验, 玉米粉、豆饼粉质量浓度和  $MgCl_2$  浓度对产酶影响较大, 以这3个因素为自变量, 以生淀粉酶活力为响应值, 设计了三因素三水平的试验, 试验设计及

结果见表4。

表4 响应面试验设计

Tab. 4 Experimental design and results of RSA

试验批次	$X_1$ (玉米粉 质量浓度)	$X_2$ (豆饼粉 质量浓度)	$X_3$ ( $MgCl_2$ 质量浓度)	酶活 Y/ (U/mL)
1	-1 (20 g/L)	0 (30 g/L)	-1 (10 mmol/L)	123
2	-1	-1 (20g/L)	0 (15 mmol/L)	100
3	-1	1 (40 g/L)	0	116
4	-1	0	1(20 mmol/L)	173
5	0 (40 g/L)	-1	-1	143
6	0	1	-1	152
7	0	0	0	234
8	0	0	0	242
9	0	0	0	237
10	0	-1	1	174
11	0	1	1	167
12	1 (60 g/L)	0	-1	152
13	1	-1	0	156
14	1	1	0	131
15	1	0	1	144

2.2.2 二次回归模型拟合 根据表4的试验结果, 以生淀粉酶活力(Y)为响应值, 确定回归方程的系数, 得到二次回归方程:

$$Y = 237.6667 + 8.8750X_1 - 0.8750X_2 + 11.0000X_3 - 61.4583X_1^2 - 50.4583X_2^2 - 28.2083X_3^2 - 10.2500X_1X_2 - 14.5000X_1X_3 - 4.0000X_2X_3$$

对回归方程进行方差分析(见表5), 可以看出:  $F_{\text{回归}} > f_{0.01}(9, 5)$ , 说明回归方程在  $f_{0.01}$  的水平上显著。  $R^2 = 97.47\%$ , 说明模型能解释 97.47% 的酶活变化, 因此回归方程给菌株 *Penicillium* sp. X-1 发酵生产生淀粉酶提供了一个合适的模型。

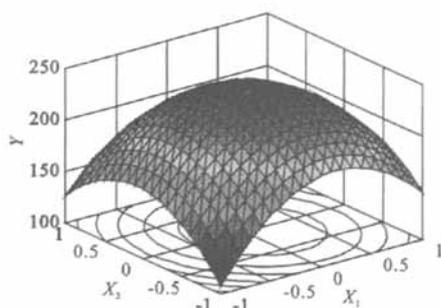
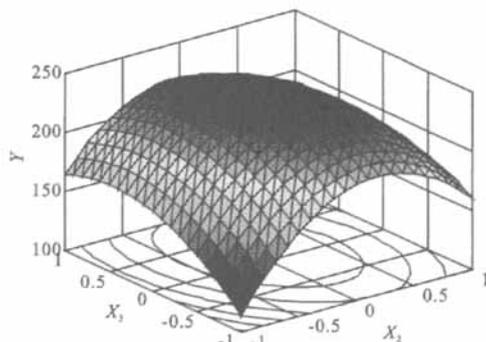
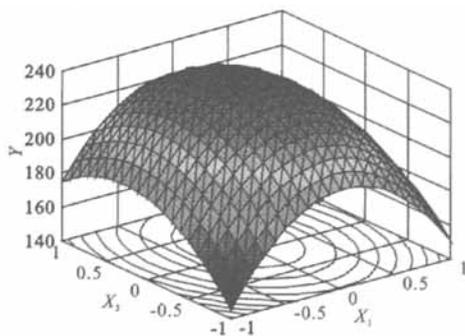
表5 回归方程的方差分析

Tab. 5 Variance analysis of regression equation

方差来源	自由度 DF	平方和 SS	均方 MS	F 值	相关系数 $R^2$
模型	9	26 169.02	2 907.669	21.382 54	97.47%
误差	5	679.9167	135.9833		
总计	14	26 848.93			

注:  $f_{0.01}(9, 5) = 10.15$   $f_{0.05}(9, 5) = 4.78$

2.2.3 响应面分析 应用 Matlab7.0 软件进行分析得到响应面分析图(见图4~6)。

图4  $X_1, X_2$ 对Y值预测曲面图Fig. 4 Response surface plot for  $X_1$  and  $X_2$ 图6  $X_2, X_3$ 对Y值预测曲面图Fig. 6 Response surface plot for  $X_2$  and  $X_3$ 图5  $X_1, X_3$ 对Y值预测曲面图Fig. 5 Response surface plot for  $X_1$  and  $X_3$ 

2.2.4 确定最佳试验条件 由图4~6可以看出, 回归模型存在稳定点, 稳定点即最大值, 利用回归

方程分别对  $X_1, X_2, X_3$  进行求导, 令导数等于0, 可以求得: 当培养基中玉米粉、豆饼粉和  $MgCl_2$  分别为 42 g/L, 29 g/L 和 15 mmol/L 时, 可得到最高酶活 239 U/mL。

### 3 结论

实验表明: 碳源、氮源及  $MgCl_2$  对产酶有较大的影响, 经响应面优化得到的培养基组成为: 玉米粉 42 g/L; 豆饼粉 30 g/L;  $MgCl_2$  16 mmol/L。在该条件下, 酶活提高了 7.5 倍, 达到 239 U/mL, 远远高于 2006 年最新报道的用黑曲霉发酵所得酶活 118 U/mL(折算成与本文相同的酶活单位)<sup>[5]</sup>。

### 参考文献(References):

- [1] 肖长清, 戚天胜, 赵海. 生淀粉糖化酶产生菌 *Aspergillus niger* (6#) 的分离筛选及其产酶条件[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(1): 76-79.  
XIAO Chang-qing, QI Tian-sheng, ZHAO Hai. Isolation of RSGA-producing strain *Aspergillus niger* (6#) and its enzyme producing conditions[J]. *Chinese J Appl Environ Biol*, 2006, 12(1): 76-79. (in Chinese)
- [2] Rajoka M I, Yasmeeen A. Induction, and production studies of a novel glucoamylase of *Aspergillus Niger*[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2005, 21: 179-187.
- [3] Morita H, Fujio Y. Effect of organic nitrogen sources on raw starch-digesting glucoamylase production of *Rhizopus sp.* MKU 40[J]. *Starch*, 2000, 52: 18-21.
- [4] Goyal N, Gupta J K, Soni S K. A novel raw starch digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus sp.* I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch[J]. *Enzym Microb Technol*, 2005, 37: 723-734.
- [5] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Anal Chem*, 1959, 31: 426-427.

(责任编辑: 李春丽)