

文章编号:1673-1689(2005)02-0065-04

黑曲霉产 α -转移葡萄糖苷酶固态发酵条件优化

毕金峰¹, 魏宝东², 李长彪²

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100094; 2. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 对产 α -转移葡萄糖苷酶的黑曲霉 U 菌株固态发酵条件进行了优化. 结果表明: 麸皮和水的质量比为 1:1 较好, 35℃ 培养 48 h 时产酶量及酶活较高; U 菌株生长的最适 pH 值为 6.0; 麸皮中的碳源和氮源可以满足该菌株产酶的需要, 可以不外加碳源和氮源.

关键词: α -转移葡萄糖苷酶; 黑曲霉; 固态发酵

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Studies on Solid-State Fermentation Conditions for Producing α -Transglucosidase from *Asp. niger*

BI Jin-feng¹, WEI Bao-dong², LI Chang-biao²

(1. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 2. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Alpha-transglucosidase is a critical enzyme for producing isomaltooligosaccharide. The solid-state fermentation conditions for producing α -transglucosidase from *Asp. niger* U were studied. The optimum conditions for fermentation in solid-state were: bran:water(m/m) = 1:1, culture temperature and duration were 35℃ and 48 h respectively, the optimum pH value was 6.0. Addition of carbon and nitrogen sources into the culture medium of bran was not required, as the carbon and nitrogen sources in bran could satisfy the needs for the enzyme production.

Key words: α -transglucosidase; *Asp. niger*; solid-state fermentation

α -转移葡萄糖苷酶(α -transglucosidase E. C. 2.4.1.24)又称 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase E. C. 3.2.1.20),它可以从低聚糖类底物的非还原性末端切开 α -1,4糖苷键,释放出葡萄糖,或将游离出的葡萄糖残基以 α -1,6糖苷键转移到另一个糖类底物上,从而得到非发酵性的低聚异麦芽糖(以下简称 IMO,主要包括异麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖等)、糖脂或糖肽等.该酶既具有水解能力,又具有转移能力,故对其命名说法不一^[1~3]. α -转移葡萄糖苷酶在自然界中分布广泛,种类繁多,性质各异,几乎存在

于所有生物体内,在人类的糖原降解及动物、植物和微生物的糖类代谢方面具有重要的生理功能.它作为工业化生产 IMO 的关键酶制剂倍受国内外食品工业界的重视^[4,5].与国外相比,我国的研究工作还处于起步阶段,主要集中在 α -转移葡萄糖苷酶生产菌株的筛选方面,对于其性质、化学结构、催化机制等方面的报道较少.目前,国外生产的 α -转移葡萄糖苷酶大部分为纯酶,国内研究主要以粗酶液为主.作者在选育出高产 α -转移葡萄糖苷酶的黑曲霉菌株基础上,对黑曲霉固态发酵条件进行了优化研

收稿日期:2004-04-20; 修回日期:2004-09-03.

作者简介:毕金峰(1970-),男,吉林辉南人,副教授,农学博士,博士后.

万方数据

究,确定了最佳产酶条件,为该酶的分离提纯、酶学性质研究及国产化提供理论依据^[6~9].

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 作者所在实验室经诱变选育的高产 α -转移葡萄糖苷酶的黑曲霉菌株 U.

1.1.2 培养基

1)斜面培养基(PDA):马铃薯去皮、切碎,称取 200 g,切成条或块,加水 1 000 mL,煮沸 30 min,双层纱布过滤,取滤液,用水补足至 1 000 mL,加葡萄糖 50 g,琼脂 20 g,pH 值自然.

2)固体麸皮培养基:麸皮(沈阳市东大面粉厂生产),水,营养物.

1.2 主要仪器

HZQ-F160 全温振荡培养箱:哈尔滨市东联电子技术开发有限公司制造;101-2A 数显电热鼓风干燥箱:上海沪南科学仪器联营厂制造;SW-CJ-1F 超净工作台:苏州安泰空气技术有限公司制造;DW400/50L 立式电热蒸汽两用消毒器:上海光华机械厂制造;全自动显微照相设备:日本奥林巴斯光学工业株式会社制造;高速冷冻离心机:日本 himac CR21G;高效液相色谱仪:美国 Waters 600E.

1.3 试验方法

1.3.1 相对酶活测定方法 国际酶学委员会规定:在一定条件下(pH 值、温度、离子强度等),1 min 内将 1 μ g 分子的底物转化为产物的酶量定为一个国际单位(I. U.).用直接滴定法测定 α -转移葡萄糖苷酶作用于一定浓度的底物(麦芽糖)生成产物还原糖的量,用消耗反应液体积来间接反映 α -转移葡萄糖苷酶的酶活,即相对酶活.通过试验证明用直接滴定法测还原糖所消耗的酶反应液体积(以下简称耗糖体积)来反映酶活与定量测定结果趋势一致.说明耗糖体积越多,反应液中还原糖含量越低,则在单位时间内 α -转移葡萄糖苷酶水解底物(麦芽糖)的能力越差,即相对酶活越低;反之相对酶活越高.

1.3.2 还原糖测定方法 直接滴定法^[10].

2 结果与分析

2.1 U 菌株形态观察

U 菌株菌丝较短,白色,成熟时孢子呈棕褐色,较小,在显微镜下观察结果见图 1.

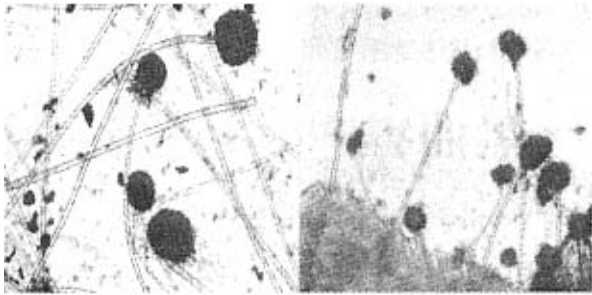


图 1 U 菌株形态(右)(40×16)

Fig. 1 Morphology of strain U(right) (40×60)

2.2 麸皮加水量对产酶的影响

在 10 g 干麸皮中分别加入 5,10,15,20,25 mL 蒸馏水,用玻璃棒搅匀,密封后于 60 $^{\circ}$ C 水浴锅中保温 1 h,并于 121 $^{\circ}$ C 灭菌 60 min,冷却.接种 U 菌株孢子悬浮液 0.5 mL 于 5 个不同处理中,用玻璃棒搅匀后置于 35 $^{\circ}$ C 下培养 48 h.准确称取培养好的麸曲 3 g,加入 30 mL 蒸馏水,室温浸泡 6 h,4 $^{\circ}$ C 于 5 000 r/min 离心 20 min,取上清液作为粗酶液.取 5 mL 具塞刻度试管若干,分别加入 1 mL 20 g/dL 麦芽糖、1 mL pH 5.4 的缓冲液,在 55 $^{\circ}$ C 水浴锅中保温 5 min 后,加入上述不同处理的酶液 1 mL,反应 1 h 后灭酶(沸水浴中 5 min),测定不同处理的相对酶活,结果见图 2.可知该菌在加入 10,15 mL 水时,固态培养菌所产酶的酶活较高,观察发现菌丝生长状态良好,确定最佳麸皮和水的质量比为 1 : 1.

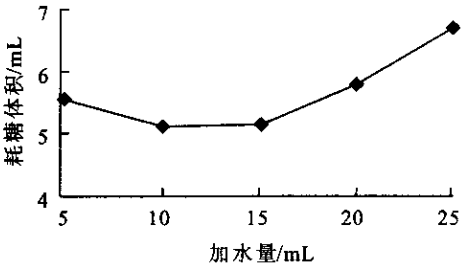


图 2 加水量对相对酶活的影响

Fig. 2 Effect of water quantity on relative enzyme activity

2.3 麸皮 pH 值对产酶的影响

配制不同 pH 值的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,称取麸皮 10 g,加入不同 pH 值的缓冲液 10 mL,其他操作同 2.2,测定不同处理的相对酶活,结果见图 3.可知 U 菌在 pH 值 6.0 时产酶酶活较高.定期观察菌株生长状况时发现,在此 pH 值条件下生长状况良好.

2.4 培养温度对菌株生长及产酶的影响

称取麸皮 10 g,按质量比为 1 : 1 的比例加入水,其他操作同 2.2.于不同温度下进行固态发酵试验,酶反应结果见图 4.可知 35 $^{\circ}$ C 是该菌的最佳产

酶温度. 定期观察菌株生长状况时发现,30 ℃和 35 ℃处理时菌体生长状况良好.

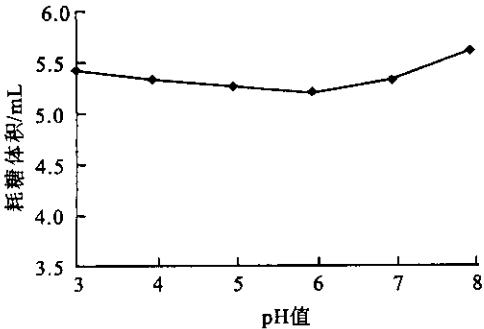


图 3 pH 值对相对酶活的影响

Fig. 3 Effect of pH value on relative enzyme activity

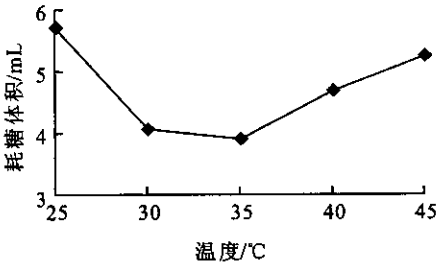


图 4 温度对相对酶活的影响

Fig. 4 Effect of temperature on relative enzyme activity

2.5 接种量对产酶的影响

在 10 g 麸皮中分别加入 9.75、9.5、9.0、8.0、6.0 mL 蒸馏水,水浴、灭菌,对应接种孢子菌悬液 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 mL,35 ℃培养 48 h,在同一条件下制取酶液,进行酶反应,结果见图 5. U 菌株接种量超过 1 mL 时,酶活差别不显著,确定 1.0 mL 为最佳接种量.

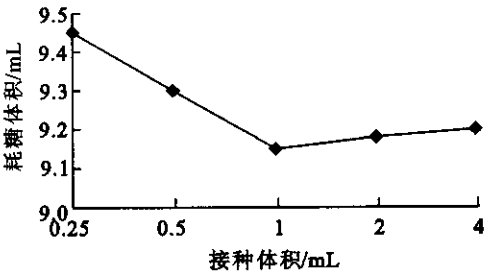


图 5 接种量对相对酶活的影响

Fig. 5 Effect of inoculation volume on relative enzyme activity

2.6 最佳培养时间试验

当麸皮和水的质量比为 1 : 1,接种量为 1 mL 时,定期观察菌株生长状况,并定期取样制取酶液,进行酶反应,结果见图 6. 培养 48 h 时,U 菌已长出孢子,菌丝体量达到最大值. 酶活测定结果表明,培养 48 h 时,酶活已经较高,确定最佳培养时间为 48 h.

2.7 浸提时间对产酶的影响

麸皮和水的质量比为 1 : 1,接种量为 1 mL,35 ℃培养 48 h,按 1 g 菌体加入 10 mL 无菌水室温浸

泡,在不同时间离心取酶液,并测定酶活,结果见图 7. 可知室温浸提 6 h 时即获得较高酶活,浸提时间延长到 24 h 时,酶活未见明显提高,浸提时间过长,可能引起霉菌的二次生长,导致酶活降低. 因此,选择室温浸提 6 h 即可.

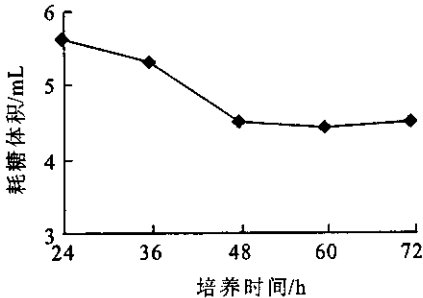


图 6 培养时间对相对酶活的影响

Fig. 6 Effect of culture time on relative enzyme activity

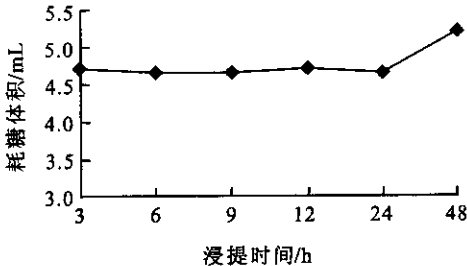


图 7 浸提时间对相对酶活的影响

Fig. 7 Effect of extracting time on relative enzyme activity

2.8 外加碳源对产酶的影响

配制 5 g/dL 的不同碳源. 称取 10 g 麸皮,分别加入上述配好的溶液 10 mL. 每种碳源两瓶,一瓶接种 U 菌株,一瓶对照(CK1). 在相同条件下培养菌株,制取酶液,进行酶反应,结果见表 1. 同时做不外加碳源的接种(CK2)对照,其耗糖体积为 7.85 mL. 可知外加碳源但未接种的对照间差别不显著,只有葡萄糖的还原能力略高些. 不同外加碳源对产酶的影响较小,外加葡萄糖碳源的相对酶活略高些,但因葡萄糖本身还原能力也较强,因此最终结果无太大差异. 外加碳源与未外加碳源的处理差别不显著. 从生产成本上考虑,以麸皮作培养基,可不外加其他碳源,但当大规模生产时可适量加入.

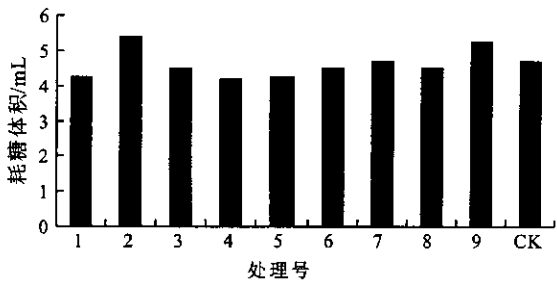
表 1 外加碳源对相对酶活的影响

Tab. 1 Effect of carbon sources on relative enzyme activity

碳源	耗糖体积/mL	
	CK1	接种
蔗糖	15.10	7.85
麦芽糖	15.10	7.80
葡萄糖	14.65	7.75
淀粉	15.50	7.90
可溶性淀粉	15.75	7.80

2.9 外加氮源对产酶的影响

配制 3 g/dL 的不同氮源,取不同氮源溶液 10 mL,加入到 10 g 麸皮中,灭菌接种,定期观察结果,并进行产酶分析,结果见图 8.



1. 牛肉膏; 2. 尿素; 3. L-谷氨酸; 4. 蛋白胨; 5. 酵母膏;
6. 氯化铵; 7. 硝酸铵; 8. 硫酸铵; 9. 磷酸氢二铵; CK. 未加氮源处理.

图 8 外加氮源对 U 菌株相对酶活的影响

Fig. 8 Effect of nitrogen sources on relative enzyme activity of strain U

由图 8 看出,U 菌株在 1,4,5 号外加氮源上生长较好,产酶酶活较高. 因此选择牛肉膏、蛋白胨、酵母膏 3 种氮源,用 1,3,5 g/dL 3 个质量浓度进一步做氮源试验,结果见表 2. CK 为加水试验,其耗糖体积为 9.10 mL. 可知不同质量浓度的外加氮源对菌株的影响不同. U 菌株在牛肉膏中生长良好,酶

活较高,几个质量浓度的处理均好于不外加氮源的对照. 但牛肉膏价格昂贵,不利于降低生产成本. 因测试结果与对照差异不显著,固体麸皮培养基中可不外加氮源,大规模生产时可寻找廉价氮源.

表 2 外加氮源对相对酶活的影响

Tab. 2 Effect of nitrogen sources on relative enzyme activity

氮 源	耗糖体积/mL		
	U(1 g/dL)	U(3 g/dL)	U(5 g/dL)
牛肉膏	8.83	8.80	8.80
酵母膏	9.00	8.90	9.15
蛋白胨	9.05	8.90	8.87

3 结 论

1) 诱变选育出一株产 α -转移葡萄糖苷酶酶活较高的黑曲霉—U 菌株,其固体培养方式产酶酶活明显高于液体培养方式,所产酶属于细胞外酶.

2) 固态发酵产酶条件优化结果表明,麸皮和水的质量比为 1:1 较好,35 ℃ 培养 48 h 时产酶量及酶活较高,U 菌株生长的最适 pH 值为 6.0,麸皮中的碳源和氮源可以满足该菌株产酶的需要,可以不外加碳源和氮源.

参考文献:

[1] 陈必成,扈芝香. 转移葡萄糖苷酶(transglucosidase E. C. 2. 4. 1. 24)生产异麦芽寡糖的研究[J]. 食品与发酵工业,1999,25(4):1—4.

[2] 金其荣,王晓晴. α -葡萄糖苷酶的初步研究及其在异麦芽低聚糖浆生产中的应用[J]. 食品科学,1995,16(4):20—24.

[3] 曹劲松. 微生物酶法合成低聚糖的问题与策略[J]. 食品与发酵工业,1999,25(4):41—47.

[4] Kuriki T, Yanase M, Takata H, *et al.* A new way of producing isomalto-oligosaccharides syrup by using the transglycosylation reaction of neopullulanase[J]. *Application of Environment Microbiology*, 1993,59: 953—959.

[5] Tanriseven A, Dogan S. Production of isomalto-oligosaccharides using dextranase immobilized in alginate fibers[J]. *Process Biochemistry*, 2002, 37:1111—1154.

[6] 李江华. 黑曲霉固态发酵生产酸性 β -甘露聚糖酶[J]. 生物技术,2002,12(1):26—28.

[7] 孙建义. 木霉 GXC 产 β -葡聚糖酶条件和酶学性质[J]. 微生物学报,2001,41(4):457—462.

[8] 王静,金征宇. 黑曲霉产菊粉酶的发酵条件优化及诱变育种[J]. 生物技术,2002,12(3):8—9.

[9] 董明盛. 胞外纤溶酶产生菌的筛选及其产酶条件研究[J]. 食品与发酵工业,2001,27(1):23—26.

[10] 大连轻工业学院,华南理工学院. 食品分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994. 154—189.

(责任编辑:李春丽)