



米曲霉发酵玉米芯生产β-葡萄糖苷酶发酵条件的研究

作者:吴小刚 曾莹 周丽明 李彦 何平 期号: 2005年第14期

★ 湖北省教育厅重点项目

摘要 将经过筛选的产β-葡萄糖苷酶的米曲霉,通过单因子及正交实验对其产酶发酵条件进行了研究,结果显示:当培养基为:玉米芯 3%;豆饼粉 0.2%;KH₂PO₄ 0.4%;CaCl₂ 0.04%;MgSO₄ 0.04%;自然pH;装液量为60ml时为最佳发酵条件。酶活力测定中采用了京尼平试剂法测相对酶活。

关键词 β-葡萄糖苷酶;培养基;酶活力;发酵条件
 中图分类号 S816.6

Study on Fermentation Condition of *Aspergillus.oryzae* Producing β-glucosidase
 Wu Xiaogang, Zeng Ying, Zhou Liming, Li Yan, He Ping

Abstract An *Aspergillus.oryzae* producing β-glucosidase was selected. its medium ingredients and fermentation conditions were optimized by single factor and orthogonal experiments. The results are as follows: corncob 3% beancake powder 0.2% KH₂PO₄ 0.4% CaCl₂ 0.04% MgSO₄ 0.04% natural pH liquid-installed 60ml. In the determination of the enzyme activity, we apply salicin treatment.
Key words β-glucosidase; culture medium; enzyme activity; fermentation condition

近年来,异黄酮的研究成为国际上一大研究热点。据不少研究表明,与异黄酮比较,异黄酮甙元具有广泛的生理活性,如具有抗肿瘤作用,尤其对与激素有关的肿瘤如乳腺癌和前列腺癌的抑制作用更为显著。此外,异黄酮甙元在治疗和预防心脑血管疾病方面也有明显作用。而微生物制备异黄酮甙元用于降压的研究,国内尚属空白[1]。

本文是在对本研究小组筛选的一株产β-葡萄糖苷酶的米曲霉菌种进行发酵条件的研究基础之上得来的,对其培养基的碳氮比、pH值、溶氧、产酶发酵时间进行了摸索。把玉米芯、豆饼粉、麸皮等价格低廉的农产品的下脚料应用于工业发酵上来,能够制备出价值很高的异黄酮甙元降压药,同时也能解决农产品的下脚料的出路问题。如能尽快开发此类产品,不仅能填补国内市场的空白,还能够提高农产品的附加值,于国于民都有利。

1 材料与仪器

1.1 菌种

米曲霉03:从豆豉中筛选而来。

1.2 主要仪器与试剂

梔子蓝甙水:武汉绿孚生物制品有限公司;α-纤维素:美国Sigma公司,分析纯;其它的药品均为分析纯;分光光度计:上海精密科学仪器有限公司,型号:722S。

1.3 培养基

1.3.1 斜面培养基

马铃薯培养基(PDA)[5]。

1.3.2 种子培养基

麸皮2%;α-纤维素1%;(NH₄)₂SO₄ 0.2%;KH₂PO₄ 0.4%;CaCl₂ 0.04%;MgSO₄·7H₂O 0.04%。

2 方法

2.1 菌种的产酶条件研究[2]

2.1.1 产酶条件的单因子实验

分别测定在不同碳源、氮源、装液量、pH、培养时间等培养条件下,菌株的产酶量,优化菌种的产酶条件。

2.1.1.1 碳源 玉米粉、玉米芯、麸皮、麸皮+玉米粉、麸皮+玉米芯+玉米粉、麸皮+α-纤维素。

2.1.1.2 氮源 蛋白胨、豆饼粉、尿素、NH₄Cl、NH₄NO₃、(NH₄)₂SO₄。

2.1.1.3 装液量 20ml、30ml、40ml、50ml、60ml、70ml。

2.1.1.4 pH 自然pH、4.0、7.0。

2.1.1.5 培养时间 24h、36h、48h、60h、72h、84h。

2.1.2 通过正交实验对接种量、C源、N源、含磷量进行研究,研究结果见表1。

表1 因素与水平

项目	因素			
	A 接种量(ml)	B 氮源	C 碳源	D KH ₂ PO ₄ (%)
1	0.2	NH ₄ Cl	玉米芯	0.1
2	0.4	豆饼粉	麸皮	0.2
3	1.0	蛋白胨	麸皮+玉米芯+玉米粉	0.4

2.2 酶活测定

京尼平试剂法测酶活[3]:取7%京尼平试剂溶液0.2ml,5%的谷氨酸钠溶液0.2ml,再加入0.1ml的酶液(发酵液),0.5ml pH为4.6的醋酸缓冲液,50℃保温24h,于722S分光光度计下测其吸光度。以吸光度大小比较β-葡萄糖苷酶的相对活力。

会员登录

用户名:

密码:

验证码: 9700

相关文章

- RNA干扰的实验方法及应用
- 鸡肝脏组织中防御素基因片段...
- 原生质体融合技术在饲料开发...
- 利用产脲假丝酵母转化无机硒...
- 产纤维素酶芽孢杆菌的分离鉴...
- 白腐真菌和黑曲霉对甘蔗渣降...
- 利用双外流连续培养系统研究...
- 传统技术与现代分子生物学技...
- 硅藻土共固定化淀粉酶和糖化...
- 雨生红球藻规模化培养工艺的...
- 饲用酶制剂中木聚糖酶嗜学性...
- 扩展青霉产碱性脂肪酶发酵条...

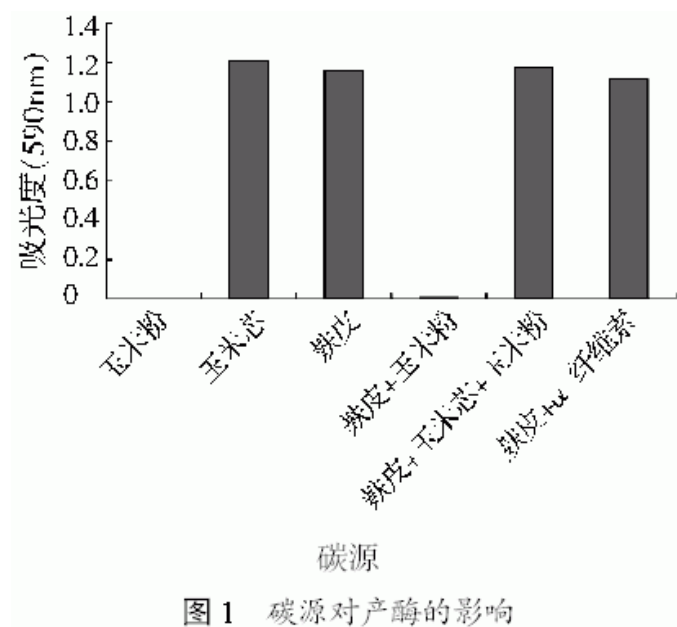
合作伙伴



3 结果与分析

3.1 单因子影响产酶条件的研究

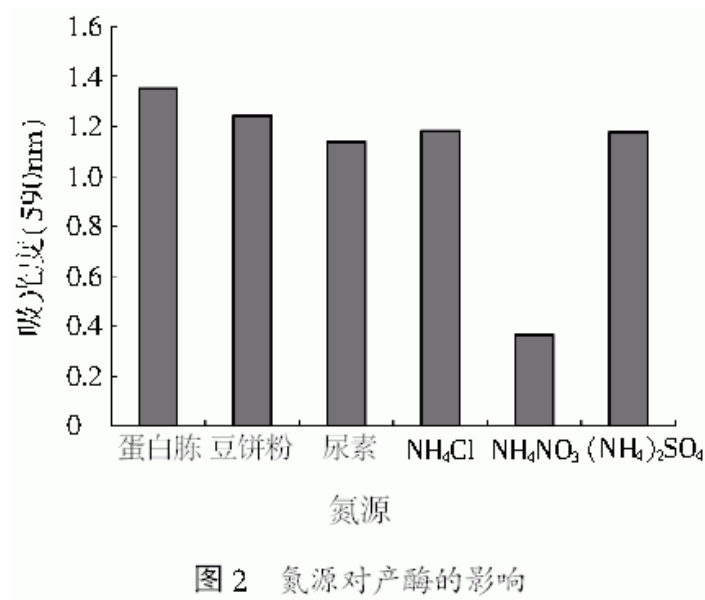
3.1.1 碳源对产酶的影响 (见图1)



实验中所有碳源总量均为3%。由图1可以看出，玉米芯为最佳碳源，而玉米粉则不适合作为该菌种的碳源。

3.1.2 氮源对产酶的影响 (见图2)

以上氮源用量均为0.2%。由图2可见，在实验范围，以蛋白胨作氮源时，产酶最高。对产酶有促进作用的氮源依次是蛋白胨、豆饼粉、 NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、尿素、 NH_4NO_3 ，其中， NH_4Cl 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对产酶的影响是相当的。总的来看，有机氮源比无机氮源较利于该菌种产酶。 NO_3^- 中的氮元素对该菌株产酶的促进作用最小。



3.1.3 装液量对产酶的影响

通过改变装液量，来考察试验菌对溶氧的需求。实验结果见图3。



图3 装液量对产酶的影响

图3中，均是在300ml的三角瓶中进行发酵。由图可知，当装液量为60ml时，酶活最高。当装液量增加或减少时，产酶均会有不同程度的降低。

3. 1. 4 pH对产酶的影响（见图4）

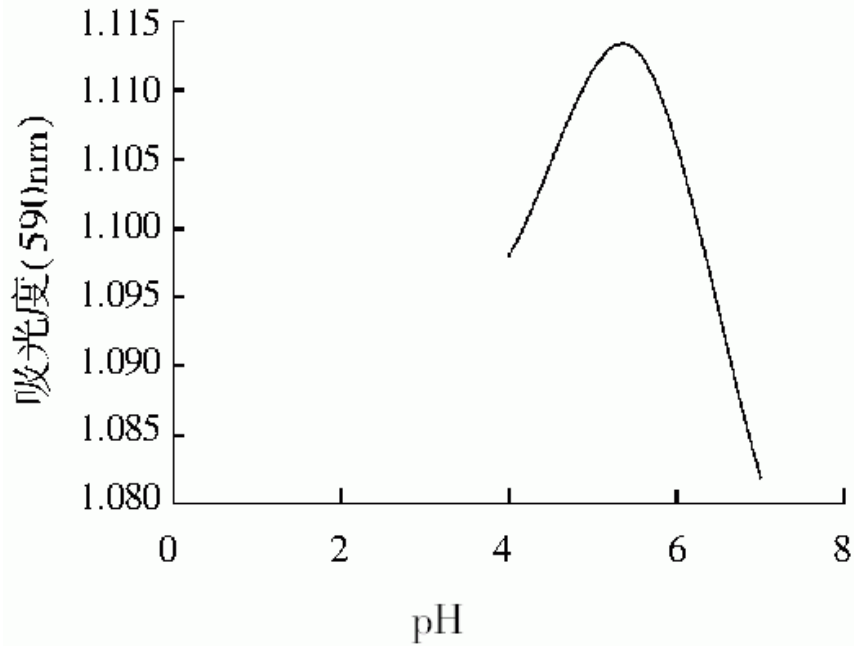


图4 pH对产酶的影响

培养基的pH影响细胞表面带电基团的解离及其微观结构，进而影响营养物的吸收及代谢物的分泌，导致微生物的生长和代谢发生变化。本实验用HCl溶液和NaOH溶液把发酵培养基的起始pH调为4.0和7.0以及自然pH进行发酵培养。

由图4可见，自然pH下，即pH为5.5时，产酶量最高，过酸或过碱会抑制产酶。

3. 1. 5 产酶曲线

取不同发酵时间的发酵液测酶活，结果见图5。

由图5可见，当发酵到60h，产酶基本达到最高值，60h后，产酶增长很缓慢，综合各方面因素，选择60h为最佳产酶时间。

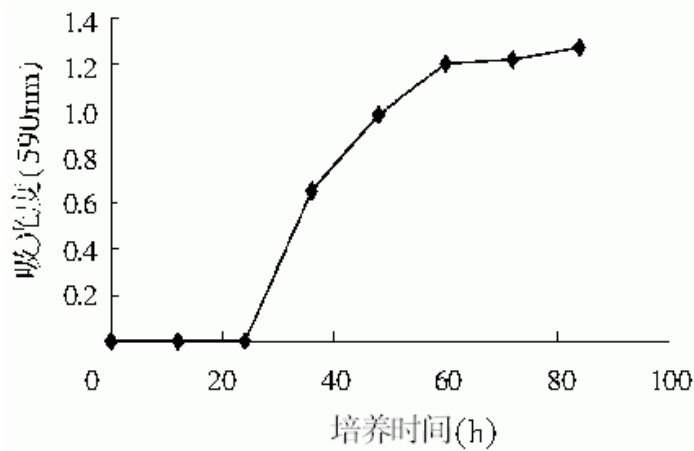


图5 产酶曲线

3. 2 正交实验

在以上单因子实验的基础上，确定了正交实验方案，实验结果见表2。

1	0.2	NH ₄ Cl	麸皮+玉米芯+玉米粉	0.2	0.061
2	0.2	豆饼粉	玉米芯	0.1	1.178
3	0.2	蛋白脲	麸皮	0.4	1.255
4	0.4	NH ₄ Cl	麸皮	0.1	0.867
5	0.4	豆饼粉	麸皮+玉米芯+玉米粉	0.4	1.308
6	0.4	蛋白脲	玉米芯	0.2	1.071
7	1.0	NH ₄ Cl	玉米芯	0.4	1.128
8	1.0	豆饼粉	麸皮	0.2	1.231
9	1.0	蛋白脲	麸皮+玉米芯+玉米粉	0.1	1.074
Y ₁	0.831	0.685	1.126	1.040	
Y ₂	1.082	1.239	1.118	0.788	
Y ₃	1.144	1.133	0.814	1.230	
R _j	0.313	0.554	0.312	0.442	

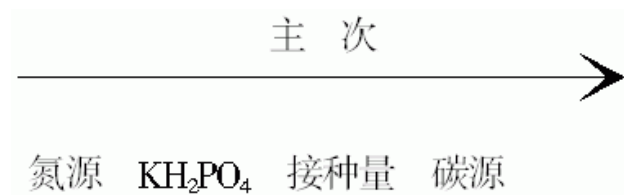
3.3 数据处理

3.3.1 水平组合, 提出预测优处理

由正交分析, 从而提出预测的优处理组合是: A3B2C1D3。

3.3.2 极差分析

极差R的大小是说明此因子的不同水平产生差异的大小的量度, 极差大说明该因子的不同水平产生的差异较大, 是重要的因子。按照极差R大小排列出各因子的主次要次序及预测的优处理。



3.3.3 趋势图直观分析

根据各因子3个水平的平均数(如A1=0.831, A2=1.082, A3=1.144), 可画出此实验4个因子的趋势图, 见图6。

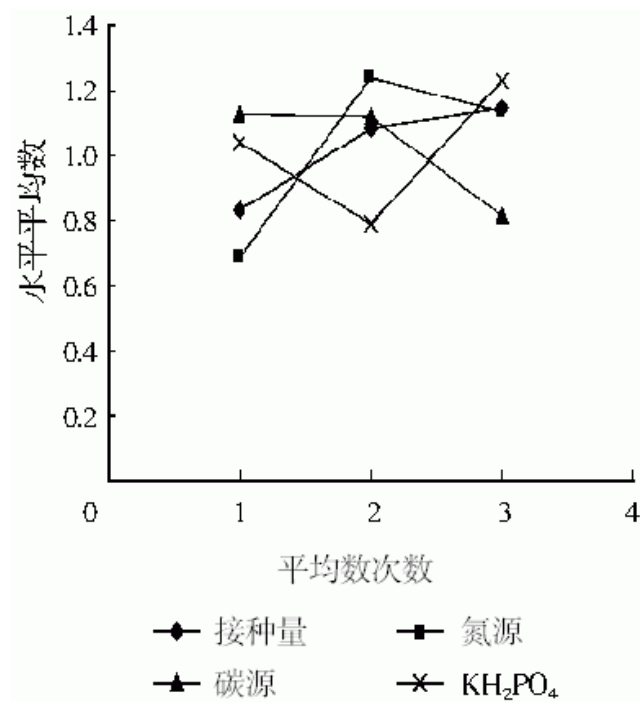


图6 正交分析

通过正交实验的结果分析可见, 氮源是主要影响因素, 最佳组合是: A3B2C1D3。

4 结论与讨论

①结果显示当培养基为: 玉米芯3%; 豆饼粉0.2%; KH₂PO₄ 0.4%; CaCl₂ 0.04%; MgSO₄ 0.04%; 自然pH; 装液量为60ml时为最佳发酵条件; ②在做产酶条件(碳源)研究时, 玉米粉不利于菌株产酶, 而玉米芯则正好相反, 这可能是因为03产生的β-葡萄糖苷酶是诱导酶。另外, 促进产酶的几种碳源中, 麸皮和玉米芯都是农副产品, 价格便宜, 这就为该酶的工业化生产创造了条件; ③京尼平试法与传统的用水杨苷的方法相比, 具有操作简便, 显色稳定等优点, 但不足之处就是只能测其相对酶活、耗时较长。目前这种方法尚未有文献报道。

参考文献

- 1 余春槐. 浅析大豆异黄酮的市场现状. 中国食品报, 2004, (115)
- 2 李平, 宛晓春等. 微生物发酵生产β-葡萄糖苷酶. 安徽农业大学学报, 2000, 27(2): 196~198
- 3 孙力军, 熊晓辉等. 用二步法生产天然食用栀子蓝色素. 南京农业大学学报, 1994, 17(4): 98~101
- 4 李平等. 黑曲霉β-葡萄糖苷酶的活力测定和酶学性质[J]. 安徽农业大学学报, 1998, 25(3): 304~309
- 5 沈萍, 范秀容等. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1996

...评论...

发表
评论

*40字以内

提交

重置