

海洋真菌液体发酵产淀粉酶的研究

周茂洪, 赵肖为[†], 朱杰, 陈伟明, 王欣

(温州大学生命与环境科学学院, 浙江温州 325035)

摘要: 研究了分离自乐清湾红树林的1株海洋真菌(真菌#34)液体发酵产淀粉酶的条件. 结果表明, 最优培养条件为: 培养时间 95 h、培养温度 30℃、起始 pH 值 5.8、盐度 1 (即天然海水); 最优培养基配方为: 淀粉 3 g、麸皮 14 g、酵母膏 6 g、 KH_2PO_4 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g、海水 1000 mL.

关键词: 淀粉酶; 海洋真菌; 液体发酵

中图分类号: TQ464.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-0375(2007)02-0025-03

淀粉酶是一种用途极广的生物催化剂, 广泛应用于造纸、食品、医药工业. 目前关于淀粉酶的研究主要集中在高温淀粉酶和低温淀粉酶. 低温淀粉酶在纺织、食品、洗涤剂、饲料等工业具有广泛的用途, 在洗涤剂工业中, 低温淀粉酶与碱性蛋白酶、脂肪酶一起添加于洗衣粉中制成多酶洗衣粉. 海洋微生物所产的淀粉酶特别是常年温度不超过 5℃的高纬度深海海底菌所产的淀粉酶具有在低温下保持高活力的特性, 这在纺织、食品、洗涤剂、饲料工业有广泛的用途, 目前已有一些产低温淀粉酶的海洋微生物的筛选和研究报道^[1-3].

红树林真菌是目前研究得最多和最系统的海洋真菌, 已鉴定出数百种, 占已分离海洋真菌的大部分, 它们多为腐生, 子囊菌和半知菌占大多数, 担子菌很少. 在红树植物上, 位于潮间带以上的部分多数为陆生真菌, 以下则为海洋真菌^[4]. 浙江省乐清湾生长有一片 50 年代人工栽培的红树林, 作者研究了该红树林的真菌区系, 从分离到的真菌中筛选到 1 株产淀粉酶活性较高的真菌, 属曲霉属, 其最适生长温度为 25-30℃, 最高生长温度为 35℃, 在 10℃下仍能生长, 为兼性嗜冷微生物. 本文对其产淀粉酶的液体发酵条件进行了研究.

1 材料与方方法

1.1 菌株

从乐清湾红树林中分离获得, 属曲霉属, 种名有待鉴定, 暂命名为真菌#34.

1.2 培养基

1.2.1 PDA 培养基

马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, 琼脂 18g, 海水 1000mL, pH 自然.

1.2.2 液体发酵基本培养基

淀粉 10.5g, 麸皮 0.5g, 酵母膏 10.5g, KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4g, 海水 1000mL.

1.3 实验方法

斜面菌株 → 茄子瓶斜面培养(25℃, 4-5 天) → 加 150mL 无菌海水制成孢子悬液 → 液体发酵培

收稿日期: 2006-02-21

作者简介: 周茂洪(1964-), 男, 浙江瑞安人, 副教授, 学士, 研究方向: 应用微生物的研究. † 通讯作者, sherwood@wzu.edu.cn

养(250ml 三角瓶装培养基 50ml, 接种量 10%, 一定温度下, 150-180rpm 振荡培养)→离心(8000rpm)→滤液(发酵液)→测淀粉酶活性.

1.4 淀粉酶活力测定^[5]

在 25mL 比色管中加 1%淀粉溶液 (0.1mol/L pH5.6 的柠檬酸缓冲液) 1.0mL, 于 40℃水浴中保温 5min, 加入适当稀释的滤液 0.2mL, 在 40℃下水解 5min, 然后加入 3,5-二硝基水杨酸 2mL, 在沸水浴中加热, 变色后加蒸馏水至 25mL, 在 540nm 测定吸光度, 从标准曲线求得麦芽糖的量, 推算出酶活性. 每 mL 滤液 5min 内水解淀粉生成 1mg 麦芽糖定义为 1 个活力单位 (U).

2 结果与分析

2.1 液体发酵的时间进程

按 1.3 实验方法, 培养温度为 25℃, 每隔 24 小时测定滤液中淀粉酶活力, 结果见图 1. 由图 1 可知, #34 菌发酵液中淀粉酶的活力随着培养时间延长而逐渐上升, 95h 时酶活力达到最大, 143.3h 后开始下降.

2.2 培养温度对产酶的影响

按 1.3 的实验方法, 培养 95 小时, 培养温度分别是 15℃、25℃、30℃、35℃、40℃和 50℃, 结果见图 2. 由图 2 可知, 当培养温度为 30℃时, #34 菌发酵液的酶活力最大, 25—35℃为其适宜培养温度.

2.3 培养基初始 pH 对产酶的影响

按 1.3 实验方法, 培养 95h, 培养温度为 25℃, 培养基初始 pH 值分别 3.4、4.0、4.9、5.8、6.9、8.0 和 9.3, 结果见图 3. 从图 3 可以看出, 当培养基的初始 pH 为 5.8 时, #34 菌的发酵液酶活力最高, pH4.9-6.9 为其适宜的 pH 值.

2.4 盐度对产酶的影响

将配制培养基的海水盐度调为天然海水的 0 (即蒸馏水)、0.25、0.5、1、1.5 和 2.0 倍, 按 1.3 实验方法, 培养 95h, 培养温度为 25℃, 结果见图 4. 从图 4 可以看出, 天然海水配制的培养基产酶最高.

2.5 培养基优化试验^[6]

采用均匀设计法(实验方案为 $U_9(5)$)设计培养基配方, 按 1.3 方法, 在 25℃下培养 95 小时, 结果见表 1.

从表 1 可知, 实验 4 号酶活力最高, 其相应的培养基配方为: 淀粉 3g、麸皮 14g、酵母膏 6g、 KH_2PO_4 0.5g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4g、海水 1000mL. 在本实验中, 碳源为淀粉、氮源为酵母膏, 至于采用天然的碳源或氮源液体发酵产淀粉酶的培养基优化将进一步研究.

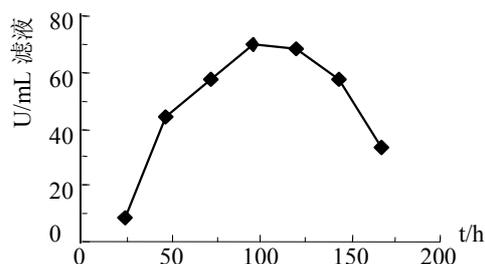


图1 液体发酵的时间进程

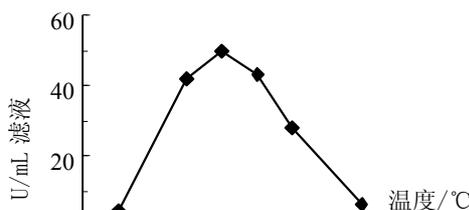


图2 培养温度对产酶量的影响

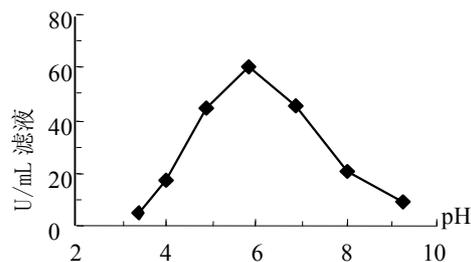


图3 培养基 pH 对产酶量的影响

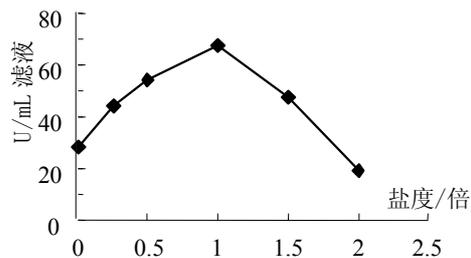


图4 盐度对产酶量的影响

3 结 论

#34 菌液体发酵产淀粉酶最优培养条件为: 培养时间 95h、培养温度 30℃、培养基起始 pH 值 5.8、盐度 1 倍 (即天然海水), 最优培养基配方为: 淀粉 3 g、麸皮 14 g、酵母膏 6 g、 KH_2PO_4 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g、海水 1000 mL.

表 1 均匀设计实验方案与结果

实验号	淀粉/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	麸皮/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	酵母膏/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	KH_2PO_4 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	酶活力单位数
1	0	2	3	2.0	0.70	24.2678
2	1	6	7	0.0	0.60	77.7981
3	2	10	2	2.5	0.50	48.7709
4	3	14	6	0.5	0.40	81.0670
5	4	0	1	3.0	0.30	16.8672
6	5	4	5	1.0	0.20	64.3306
7	6	8	0	3.5	0.10	19.1977
8	7	12	4	1.5	0.00	75.5753
9	8	16	8	4.0	0.80	72.0450

参考文献

- [1] Chess J P. Purification and characterization of the heat-labile α -amylase secreted by the psychrophilic bacterium TAC240B [J]. *Can.J Microbiol*, 1999, 45: 452-457.
- [2] 张刚, 汪天虹, 张臻峰等. 产低温淀粉酶的海洋真菌筛选及研究[J]. *海洋科学*, 2002, 26(2): 3-5.
- [3] 黄世琨, 郑天凌, 郑伟等. 深海沉积物中产淀粉酶细菌的 rep-PCR 基因指纹分析[J]. *厦门大学学报*, 2005, 44 (增刊): 171-174.
- [4] 林永成, 周世宁. *海洋微生物及其代谢产物*[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 23-25.
- [5] 陈毓荃. *生物化学实验方法和技术*[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 83-86.
- [6] 任露泉. *试验优化设计与分析*[M]. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 2003. 191-206.

Submerged Fermentation of Amylase by Marine Fungus

ZHOU Maohong, ZHAO Xiaowei, ZHU Jie, CHEN Weiming, WANG Xin
(School of Biological and Environmental Sciences, Wenzhou University, Wenzhou, China 325035)

Abstract: The paper has studied the conditions of marine fungus #34, which is separated from the mangrove in the Yueqing Bay. The marine fungus #34 produces amylases by submerged fermentation under the conditions. The results shows that the optimum conditions are as followed: fermentation time of 95h, fermentation temperature of 30℃ and initial pH of 5.8 and salinity of 1 of the media. The optimum formula of the media, which are determined to use the uniform design test, are as followed: starch 3 g, bran 14 g, yeast extract 6 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g and sea water 1000 mL.

Key words: Amylase; Marine fungus; Submerged fermentation

(编辑: 王一芳)