

根霉 2 (*Rhizopus* sp. 2) 产酶条件研究*

The Study of the Produced Condition of *Rhizopus* sp. 2

庞宗文 陈桂光 梁静娟
Pang Zongwen Chen Guiguang Liang Jingjuan

(广西大学食品发酵工程研究所 南宁市西乡塘路 10号 530004)
(The Food and Fermentation Engineering Institute of Guangxi
University, 10 Xixiangtanglu, Nanning, Guangxi, 530004)

摘要 对影响根霉 2 (*Rhizopus* sp. 2) 产生生淀粉分解酶的碳源、氮源、无机盐、温度、pH值等进行优化组合试验, 摸索出了一个最佳的产酶条件, 该条件为: 木薯渣 5%、花生麸 0.75%、尿素 0.1%、 K_2HPO_4 0.1%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.075%、pH值 5.0 32℃摇瓶培养 96 h 使用该条件可使得发酵酶液的酶活达到 7.75 U/mL

关键词 生淀粉分解酶 根霉 产酶条件

Abstract The effects of medium components such as carbon, nitrogen, inorganic salt and culture conditions such as pH, temperature on *Rhizopus* sp. 2 were investigated. The optimum formative condition of the raw starch decomposing enzyme was the medium containing 5% cassava residue, 0.75% peanut meal, 0.1% urea, 0.1% K_2HPO_4 , 0.075% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and pH 5.0. The raw starch decomposing enzyme activity of *Rhizopus* sp. 2 cultivated on this condition in 32℃ for 96h reached 7.75 U/mL.

Key words raw starch decomposing enzyme, *Rhizopus* sp., produced condition
中图分类号 Q93

根霉 2 (*Rhizopus* sp. 2) 是从土壤样品中分离筛选到的生淀粉分解酶高产菌。生淀粉分解酶应用于发酵工业, 由于可以直接催化生淀粉转化成葡萄糖, 生淀粉质原料不需蒸煮, 可以节能 30%~40%, 因而显示出了其极大的开发潜力。目前国内外已有不少学者报道筛选到生淀粉分解酶产生菌^[1-5], 并对生淀粉分解酶水解生淀粉的机理作了较深入的研究^[6-8], 但由于酶活不高, 一般每克干曲在 300 U 以下, 严重制约了其工业化进程。我们在多年的科研工作中筛选到了一株生淀粉分解酶酶活较高的根霉, 其酶活已达到每克干曲 500 U 每毫升液体曲 7.75 U 以上, 高于目前其他学者报道的结果

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 菌种: 根霉 2 (*Rhizopus* sp. 2), 由本课题组从土壤样品中分离、保藏

(2) 生木薯粉: 新鲜木薯去皮、切片、晒干粉碎即得

1.2 方法

1.2.1 菌体培养及酶液制备

(1) 斜面种子: 将 *Rhizopus* sp. 2 孢子接种于马铃薯琼脂培养基 (PDA), 28℃培养 4 d, 此时已长满孢子, 置冰箱保存备用。

(2) 酶液制备: 根据试验表将各种培养基成份按比例混和均匀, 接入 *Rhizopus* sp. 2 孢子, 32℃下摇瓶培养 96 h, 过滤即得酶液。

1.2.2 生淀粉分解酶酶活测定

在 50 mL 容量瓶中加入 25 mL 2% 的生木薯粉悬液, 5 mL pH 值 3.6 的 0.2 M Na_2HPO_4 - 0.1 M 柠檬酸缓冲液, 40℃中预热 10 min, 加入 5 mL 适当稀释的酶液, 在 40℃下反应 1 h, 中间不断摇动, 加入 15 mL 0.2 N 的 NaOH 溶液终止反应。用 DNS 法测定反应液中的还原糖量。

酶活力单位定义: 在 pH 值 3.6 40℃的条件下, 1 h 释放出 1 mg 还原糖 (以葡萄糖计) 所需的酶量为一个酶活力单位。

2 结果与讨论

2.1 碳源对 *Rhizopus* sp. 2 产酶的影响

在成分为 (%) 花生麸 0.75 尿素 0.1 $MgSO_4$

1996-12-30 收稿, 1997-07-10 修回

* 广西壮族自治区教委资助项目。

0.075 K₂HPO₄ 0.1 pH值 5.0的培养液中分别加入各种常见碳源, 试验碳源对产酶的影响, 结果见表 1

表 1 各种碳源对 *Rhizopus sp. 2* 产酶的影响
Table 1 Effect of carbon on glucoamylase formation by *Rhizopus sp. 2*

碳源 Carbon (%)	生淀粉酶活力 Glucoamylase activity (U/ml)
木薯渣 (5%) Cassava residue	7.75
木薯粉 Cassava meal	4.80
大米粉 Rice meal	4.18
糯米粉 Glutinous rice flour	4.92
玉米粉 Corn meal	6.40
可溶性淀粉 Soluble starch	3.45
糊精 Dex trin	3.60
蔗糖 Sucrose	0.80
葡萄糖 Glucose	3.98
-	0.30

从表 1 结果分析可知, 天然淀粉质有利于 *Rhizopus sp. 2* 生淀粉分解酶的产生, 其中尤以木薯渣和玉米粉为好, 其机理有待进一步研究。蔗糖对 *Rhizopus sp. 2* 生淀粉分解酶的产生最为不利, 这可能是蔗糖阻遏了生淀粉分解酶的合成^[6]。本试验中葡萄糖对 *Rhizopus sp. 2* 生淀粉分解酶的合成产生的阻遏作用不明显, 这一现象尚需进一步探索。

2.2 有机氮源对 *Rhizopus sp. 2* 产酶的影响

在成分为 (%) 木薯渣 5 尿素 0.1 MgSO₄ 0.075 K₂HPO₄ 0.1 pH值 5.0的培养液中分别加入各种有机氮源, 试验其对产酶的影响, 结果见表 2

表 2 各种有机氮源对 *Rhizopus sp. 2* 产酶的影响
Table 2 Effect of organonitrogen on glucoamylase formation by *Rhizopus sp. 2*

有机氮源 Organonitrogen (0.5%)	酶活力 Glucoamylase activity (U/ml)
花生麸 Peanut meal	4.80
黄豆饼粉 Soybean meal	1.45
麸皮 Wheat bran	2.70
米糠 Rice bran	2.20
胰蛋白胨 Tryptone	2.25
-	0.95

表 2 结果说明有机氮源对生淀粉分解酶的合成是必要的, 其中花生麸的促进效果最好, 它除了提供构成酶分子的氮素外, 对酶的形成有诱导作用^[9]。

2.3 无机氮源对 *Rhizopus sp. 2* 产酶的影响

在成分为 (%) 木薯渣 5 花生麸 0.75 MgSO₄ 0.075 K₂HPO₄ 0.1 pH值 5.0的培养液中分别加入

含氮量相当于 0.1% 尿素的各种无机氮源, 试验无机氮源对产酶的影响, 结果见表 3

表 3 各种无机氮源对 *Rhizopus sp. 2* 产酶的影响

Table 3 Effect of inorganonitrogen on glucoamylase formation by *Rhizopus sp. 2*

无机氮源 Inorganonitrogen	含量 Content (%)	酶活力 Glucoamylase activity (U/ml)
尿素 Urea	0.10	4.80
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.21	1.25
NH ₄ Cl	0.17	2.35
-		0.50

注: 考虑到尿素的实际使用特性, 将它归为无机氮源

从表 3 可知, 无机氮源对生淀粉分解酶的合成是不可少的, 其中尿素的效果最好。

2.4 钾盐对 *Rhizopus sp. 2* 产酶的影响

在成分为 (%) 木薯渣 5 花生麸 0.75 尿素 0.1 MgSO₄ 0.075 pH值 5.0的培养液中分别加入含钾量相当于 0.1% K₂HPO₄ 的各种钾盐, 试验钾盐对产酶的影响, 结果见表 4

表 4 各种钾盐对 *Rhizopus sp. 2* 产酶的影响

Table 4 Effect of sylvite on glucoamylase formation by *Rhizopus sp. 2*

钾盐 Sylvite	含量 Content (%)	酶活力 Glucoamylase activity (U/ml)
K ₂ HPO ₄	0.10	4.80
KH ₂ PO ₄	0.16	2.25
KCl	0.085	1.65
K ₂ SO ₄	0.10	0.85
-		0.50

从表 4 的结果可知, 钾盐对生淀粉分解酶的合成是很必要的, 其中 K₂HPO₄ 效果最好。

2.5 培养基成份配比及其它因素对 *Rhizopus sp. 2* 产酶的影响

采用 L₁₈ (3⁷) 正交表试验碳源、氮源、无机盐等因素对产酶的影响, 结果见表 5

从表 5 的分析结果可以全面了解各因子在试验中的作用。根据 F 检验结果可知影响产酶的试验因子的影响效应, 其排列顺序为: pH值 > 尿素 > 花生麸 > K₂HPO₄ > 木薯渣 > MgSO₄ > 时间。花生麸、尿素、pH值的 F_{检验} 均大于 10.92, 是影响产酶的高度显著因子, 其余因子的 F_{检验} 均小于 5.14, 影响不明显。3 个时间条件下的产酶量基本相等, 考虑到实验的经济性, 在选择时间时, 我们选择了居中的条件。因此最终确定的产酶条件为: 木薯渣 5%、花生麸 0.75%、尿素 0.1%、K₂HPO₄ 0.1%、MgSO₄ 0.075%、pH值 5.0,

表5 L₁₈ (3⁷) 正交表头设计^[10]及试验结果

Table 5 L₁₈ (3⁷) orthogonal test and its result

瓶号 Number	木薯渣 Cassava residue (%)	花生麸 Peanut meal (%)	尿素 Urea (%)	MgSO ₄ (%)	K ₂ HPO ₄ (%)	初始 pH值 pH initial value	时间 Time (h)	酶活力 Glucosylase activity (U/mL)
1	2.5	0.25	0.1	0	0	5	72	2.85
2	2.5	0.50	0.2	0.075	0.1	6	96	1.05
3	2.5	0.75	0.3	0.15	0.2	7	120	0
4	5.0	0.25	0.1	0.075	0.1	7	120	4.20
5	5.0	0.50	0.2	0.15	0.2	5	72	4.65
6	5.0	0.75	0.3	0	0	6	96	3.94
7	7.5	0.25	0.2	0	0.2	6	120	1.28
8	7.5	0.50	0.3	0.075	0	7	72	2.70
9	7.5	0.75	0.1	0.15	0.1	5	96	6.08
10	2.5	0.25	0.3	0.15	0.1	6	72	1.80
11	2.5	0.50	0.1	0	0.2	7	96	3.72
12	2.5	0.75	0.2	0.075	0	5	120	5.70
13	5.0	0.25	0.2	0.15	0	7	96	0
14	5.0	0.50	0.3	0	0.1	5	120	3.00
15	5.0	0.75	0.1	0.075	0.2	6	72	2.33
16	7.5	0.25	0.3	0.075	0.2	5	96	1.24
17	7.5	0.50	0.1	0.15	0	6	120	2.25
18	7.5	0.75	0.2	0	0.1	7	72	2.03

表6 L₁₈ (3⁷) 正交表的试验结果分析

Table 6 Analysis of L₁₈ (3⁷) orthogonal test

列号 Number	试验因子 Tested factor	∑ K ₁	∑ K ₂	∑ K ₃	最佳选择 Choice	平方和 SS Square sum	自由度 DF Diversity factor	F _{检验}
1	木薯渣 Cassava residue	15.12	18.12	15.58	5%	0.8699	2	1.7925
2	花生麸 Peanut meal	11.37	17.37	20.08	0.75%	6.6227	2	13.6466
3	尿素 Urea	21.43	14.71	12.68	0.1%	6.9912	2	14.4059
4	MgSO ₄	16.82	17.22	14.78	0.075%	0.5708	2	1.1762
5	K ₂ HPO ₄	17.44	18.16	13.22	0.1%	2.3739	2	4.8916
6	初始 pH值	23.52	12.65	12.65	pH5.0	13.1285	2	27.0523
7	时间 Time	16.36	16.03	16.43	120h	0.015	2	0.0313

∑ K_j: 对应水平的酶活力之和; n: 因子的水平数; DF = n - 1; 总酶活力 ∑ y_i = 48.82; 矫正数 C = $\frac{(\sum y_i)^2}{18} = 132.411$; 各列 SS = $\frac{\sum (\sum K_j)^2}{n} - C$; F_{检验} = $\frac{SS/DF}{\text{误差 } SS/\text{误差 } DF}$; 1-4 三列的 SS 值较小, 可以将此三项的 SS 值合并作为误差 SS 计算, 误差 DF 为该三项 DF 之和; 查 F 分布表可知 F_{0.05}(2, 6) = 5.14, F_{0.01}(2, 6) = 10.92

摇瓶培养 96 h 其它条件为培养温度 32°C, 培养基装量 100 mL/500 mL 三角瓶, 往复式摇床 120 次/min 使用该条件可使得酶液的酶活达到 7.75 U/mL。

参考文献

- 1 谢舜珍等. 生淀粉酶产生菌的分离和筛选. 微生物学通报, 1992, 19 (5): 267-270
- 2 张德意等. 生淀粉糖化菌的选育诱变的研究. 中国调味品, 1992, 2 8-12.
- 3 李俊刚等. 激光复合诱变黑曲霉 S-1 原生质体选育生淀粉糖化菌的研究. 中国酿造, 1993, 2 32-34.
- 4 Saha B C, Ueda S. Raw starch absorption, elution and digestion behavior of glucoamylase of *Rhizopus niveus*. J Ferment Technol, 1983, 64 (1): 67-72.
- 5 Soccol C R et al. Comparative production of alpha- amylase, glucoamylase and protein enrichment of raw and cooked cassava by *Rhizopus* strains in submerged and solid

- state fermentations. J Food Sci Technol, 1994, 31(4): 320 ~ 323.
- 6 方善康等. 黑曲霉 S1 生淀粉糖化酶生物合成的调节研究. 工业微生物, 1996, 26 (1): 1-6
- 7 Semnara Tsuyoshi et al. Functional analysis of the threonine- and serine- rich Gp- I domain of glucoamylase I from *Aspergillus awamori* var. *kawachi*. Appl Environ Microbiol, 1995, 61 (8): 2885-2890.
- 8 Goto Masatoshi et al. Role of carbohydrate moiety of aglucoamylase from *Aspergillus awamori* var. *kawachi* in the digestion of raw starch. Biosci Biotechnol Biochem, 1995, 59 (1): 16-20.
- 9 郭杰炎等. 微生物酶. 北京: 科学出版社, 1986 80-81.
- 10 中国科学院数学研究所概率统计室编. 常用数理统计表. 北京: 科学出版社, 1974 52.

(责任编辑: 邓大玉)