

酸性 β -甘露聚糖酶的固态发酵工艺研究^{*}

朱 劭¹, 李剑芳², 邬敏辰¹

(1 江南大学 医学系, 江苏 无锡 214064; 2 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

[摘 要] 在对黑曲霉WM 20-11产酸性 β -甘露聚糖酶的培养基组分和培养条件单因素研究的基础上, 设计了Plackett-Burman试验选取主要影响因素, 并进行响应面分析。结果表明, 黑曲霉WM 20-11产酸性 β -甘露聚糖酶的最适培养基和发酵条件为: 水 11.7 mL, 麸皮 9.0 g, 豆饼粉 1.0 g, 魔芋粉 0.98 g, 玉米浆 0.375 mL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 12.5 g/kg, CaCl_2 1.0 g/kg, MgSO_4 1.0 g/kg, KH_2PO_4 2.5 g/kg(相对于固体料), 自然pH; 28℃ 固体静置培养 96 h, 期间翻曲 2~3次。在此条件下, 菌株产酶活性可达 1337 IU/g干曲。

[关键词] β -甘露聚糖酶; 黑曲霉; 固态发酵; 响应面分析

[中图分类号] TQ 925+.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)08-0139-05

β -甘露聚糖酶(β 1, 4-D-mannan mannohydrolase; EC 3.2.1.78)是一种能降解甘露聚糖、葡萄糖聚糖和半乳甘露聚糖的主链 β 1, 4-D-甘露糖苷键的酶。它能够水解可食性植物胶(如魔芋粉、角豆胶、瓜儿豆胶等)产生促进双歧杆菌生长的寡聚糖^[1]。因此, 人们对高活力产 β -甘露聚糖酶菌株的选育和发酵工艺的研究产生了兴趣^[2]。国内已有马延和等^[3]、田新玉等^[4]、杨文博等^[2]报道了嗜碱芽孢杆菌(*A. l-kaliphilic bacillus* sp.)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)所产碱性 β -甘露聚糖酶的研究; 崔福绵等^[5]报道了枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)所产中性 β -甘露聚糖酶的研究。国外Civas等^[6]、Tamaru等^[7]、Akino等^[8]报道了 β -甘露聚糖酶生产和纯化的研究, 但也主要集中在中性、碱性 β -甘露聚糖酶。为此, 本文研究了黑曲霉(*Aspergillus niger*) WM 20-11菌株合成酸性 β -甘露聚糖酶的工艺条件。

1 材料和方法

1.1 菌种

黑曲霉(*Aspergillus niger*) WM 20-11酸性 β -甘露聚糖酶高产菌株, 由江南大学医学系分子生物学研究室保存。

1.2 培养基和培养方法

1.2.1 斜面培养基 马铃薯 200 g/L, 蔗糖 20

g/L, 琼脂 20 g/L, 自然pH, 用于菌种保存、斜面种子和平板分离等。

1.2.2 麸曲种子培养基 250 mL 三角瓶装麸皮 10 g, 水 12 mL, 121℃ 灭菌 30 min; 接种一菌耳斜面种子, $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 静置培养 96 h, 期间翻曲 2~3次。

1.2.3 固态发酵培养基 250 mL 三角瓶, 装料量分别为水 12 mL, 麸皮 8 g, 豆饼粉 2 g, 魔芋粉 0.4 g, 玉米浆 0.5 mL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g, KH_2PO_4 0.02 g, CaCl_2 0.01 g, MgSO_4 0.01 g, 自然pH。121℃ 灭菌 30 min; 按 3.0 g/kg 接入麸曲种子, $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 静置培养 84 h, 期间翻曲 2~3次。

1.3 Plackett-Burman 试验及响应面分析方法

首先选用 $N = 12$ 的 Plackett-Burman 试验设计, 对影响黑曲霉 WM 20-11 菌株产酸性 β -甘露聚糖酶的 8 个因素(包括培养基组成和培养条件)进行研究, 从而快速、有效地筛选出最为重要的 3 个因素; 然后用响应面分析(Response Surface Analysis, RSA)法对筛选出的产酶重要影响因素进一步优化。

1.4 酶活性测定

1.4.1 粗酶液制备 向发酵好的新鲜麸曲中加入 10 倍体积的生理盐水, 充分捣碎, 于 4℃ 浸提 3 h, 采用双层滤纸抽滤, 滤液即为粗酶液。

1.4.2 酶活性测定 按文献[8]并略作修改: 取

* [收稿日期] 2004-11-12

[基金项目] 江南大学校级科研项目(210000-52212052)

[作者简介] 朱 劭(1969-), 女, 江苏无锡人, 讲师, 在读硕士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: zhj_sytu@hotmail.com

[通讯作者] 邬敏辰(1962-), 男, 江苏无锡人, 副教授, 博士, 主要从事发酵工程与分子生物学研究。E-mail: bich@163.com

0.5 mL 适当稀释的粗酶液, 加到 2.0 mL 用 0.1 mol/L 和 pH 4.8 醋酸缓冲液配制的 0.5% 角豆胶(Sigma)溶液中, 60℃ 反应 10 min; 3, 5-二硝基水杨酸显色法(DNS 法)测定还原糖。在上述条件下, 将每分钟产生的还原糖量相当于 1 μmol 甘露糖所需酶量定义为 1 个 β-甘露聚糖酶活性单位(U); 比酶活性定义为每 g 绝干曲中含有的活性单位数(U/g)。

2 结果与讨论

2.1 发酵培养基组成及发酵条件的单因素试验

2.1.1 碳氮比的确定 在麸曲种子培养基的基础上添加豆饼粉补充氮源, 研究了麸皮与豆饼粉质量比对菌株产酶的影响(表 1)。由表 1 可见, 在一定范围内, β-甘露聚糖酶活性随麸皮与豆饼粉质量比的降低而提高, 当质量比为 8:2 时菌株产酶最高(482 U/g)。

表 1 麸皮与豆饼粉质量比对菌株产酶的影响

Table 1 Effect of the proportion of wheat bran to soybean flour on fermentation

麸皮 豆饼粉(g/g) Wheat bran soybean flour	比酶活性/(U·g ⁻¹) Specific enzyme activity
10:0	387
9:1	442
8:2	482
7:3	480
6:4	453

2.1.2 魔芋粉、玉米浆的用量 以培养基中麸皮与豆饼粉质量比 8:2 为基础, 研究了魔芋粉、玉米浆不同用量对菌株产酶的影响(表 2)。由表 2 可见, 魔芋粉和玉米浆用量分别为 0.4 g 和 0.5 mL 时产酶最高(1 045 U/g)。

表 2 魔芋粉、玉米浆对菌株产酶的影响

Table 2 Effect of the amount of konjac powder and steep liquor on fermentation

魔芋粉/g Konjac powder	玉米浆/mL Steep liquor	比酶活性/(U·g ⁻¹) Specific enzyme activity
0.2	0	836
	0.5	844
	1.0	679
0.4	0	890
	0.5	1 045
	1.0	770

大多数微生物的 β-甘露聚糖酶是诱导酶, 只有在培养基中含有 β-甘露聚糖时才进行 β-甘露聚糖酶的合成^[2, 3, 5, 6]。玉米浆含有某些生长因子、微量元素等, 对微生物的生长和产酶有促进作用。本研究结果

表明, 适量的玉米浆对 WM 20-11 菌株合成 β-甘露聚糖酶具有显著影响。

2.1.3 加水比例 在已确定培养基中麸皮、豆饼粉、魔芋粉和玉米浆加量的基础上, 研究了不同加水量对菌株产酶的影响(表 3)。表 3 结果表明, 最适的加水比例为 1:2:1。

表 3 加水比例对菌株产酶的影响

Table 3 Effect of the proportion of water addition on fermentation

水 固料(mL/g) H ₂ O solid medium	比酶活性/(U·g ⁻¹) Specific enzyme activity
0.8:1	699
1.0:1	976
1.2:1	1 106
1.4:1	968

2.1.4 其他氮源 在上述较好培养基组成的基础上, 又分别研究了 (NH₄)₂SO₄、尿素、NH₄Cl、NaNO₃ 等氮源用量对菌株产酶的影响(表 4)。表 4 结果表明, 在已用豆饼粉作为氮源的前提下, 再添加无机铵盐时, 可进一步提高产酶效率, 且以 10 g/kg (NH₄)₂SO₄ 最佳。

表 4 其他氮源对菌株产酶的影响

Table 4 Effect of other nitrogen sources on fermentation

氮源 Nitrogen source	用量/(g·kg ⁻¹) Concentration	比酶活性/(U·g ⁻¹) Specific enzyme activity
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	1 162
	20	1 153
	30	1 074
尿素 Urea	10	791
	20	596
	30	450
NH ₄ Cl	10	1 118
	20	1 027
	30	991
NaNO ₃	10	785
	20	710
	30	702

陈一平等^[9]研究表明, 芽孢杆菌 M₅₀ 在所有被试的氮源中, (NH₄)₂SO₄ 最有利于产 β-甘露聚糖酶。崔福绵等^[5]研究了各种氮源对枯草芽孢杆菌 BM 9602 所产中性 β-甘露聚糖酶的影响, 除尿素外无机氮源和有机氮源均能显著提高菌株合成酶的能力。多数研究结果表明^[2, 3], 在不同氮源中, 有机氮源明显优于无机氮源, 其中以豆饼粉、酵母膏、谷氨酸钠等对产酶的促进作用最大。本研究采用由豆饼粉和 (NH₄)₂SO₄ 组成的复合氮源, 在有机氮源豆饼粉比例进一步提高(表 1)未能有效提高酶活性的前提下, 在培养基中添加 10 g/kg 的无机氮源

(NH₄)₂SO₄, 使酶活性提高了 5 1%。

2 1 5 KH₂PO₄ 无机盐用量 磷和钾是微生物生长的必需元素。在上述较好的培养基组成基础上, 研究了不同 KH₂PO₄ 用量对菌株产酶的影响(表 5)。表 5 结果表明, KH₂PO₄ 为 2 0 g/kg 时菌株产酶最高。

表 5 KH₂PO₄ 对菌株产酶的影响

Table 5 Effect of the amount of KH₂PO₄ on fermentation

KH ₂ PO ₄ /(g · kg ⁻¹)	比酶活性/(U · g ⁻¹) Specific enzyme activity
0	1 162
1 0	1 187
2 0	1 295
3 0	1 248

2 1 6 培养温度 测试了 (28 ± 1) , (30 ± 1) , (32 ± 1) 等不同温度对 WM 20-11 菌株产酶的影响(表 6)。表 6 结果表明, (30 ± 1) 最适合菌株产酶。温度太低, 微生物生长缓慢。温度太高, WM 20-11 菌株产生大量黑色孢子。

表 6 培养温度对菌株产酶的影响

Table 6 Effect of the cultural temperature on fermentation

温度/ Temperature	比酶活性/(U · g ⁻¹) Specific enzyme activity
28 ± 1	884
30 ± 1	1 295
32 ± 1	1 220

2 1 7 培养时间 测试了 WM 20-11 菌株不同发酵时间的酶活性, 如图 1 所示。由图 1 可见, 产酶高

峰在 84 h, 继续培养则酶活性开始下降。与文献报导相比, 枯草芽孢杆菌 BM 9602^[5] 和芽孢杆菌 M₅₀^[9] 产中性 β 甘露聚糖酶最高的培养时间分别为 36 h 和 60 h, 地衣芽孢杆菌 NK-27^[2] 和嗜碱芽孢杆菌 N 16-5^[3] 产碱性 β 甘露聚糖酶最高的培养时间分别为 48 h 和 40 h, 与之相比 WM 20-11 菌株发酵产酸性 β 甘露聚糖酶的培养时间较长。

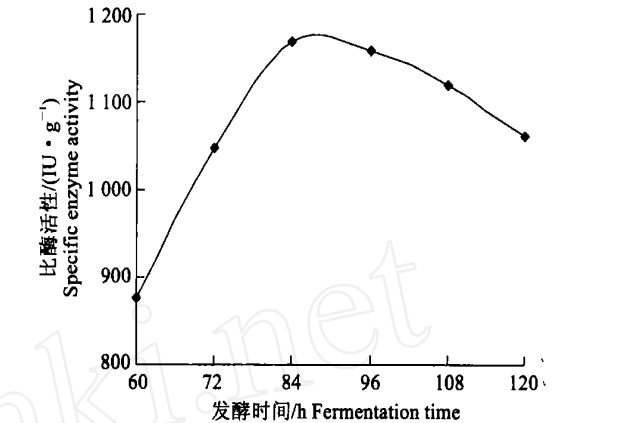


图 1 WM 20-11 菌株产酶进程曲线

Fig 1 Profile of enzyme synthesis in WM 20-11 strain

2 2 Plackett-Buman 试验及响应面分析结果

将黑曲霉 WM 20-11 产酸性 β 甘露聚糖酶的培养基组成及培养条件的 8 个因素作为 Plackett-Burman 试验的 8 个因素, 每个因素取 2 个水平, 高水平为低水平的 1.25 倍。试验结果经 SA S 分析和整理后见表 7。

表 7 Plackett-Buman 试验设计各因素、水平及影响效果

Table 7 Experimental design of PB and effect of various factors levels

因素 Factor		低水平 Low level	高水平 High level	t	P r> t
x ₁	麸皮 豆饼粉(g g) Wheat bran: soybean flour (g g)	8 78 1 22	9 1	0 571 301	0 607 791
x ₂	魔芋粉/g Konjac powder	0 2	0 25	6 107 478	0 008 82 *
x ₃	玉米浆/mL Steep liquor	0 3	0 375	0 040 807	0 970 014
x ₄	水 固料(mL g) H ₂ O solid medium (mL g)	1 1	1 25 1	3 318 986	0 045 088 *
x ₅	(NH ₄) ₂ SO ₄ /(g · kg ⁻¹)	10	12 5	0 598 506	0 591 677
x ₆	KH ₂ PO ₄ /(g · kg ⁻¹)	2 0	2 5	0 299 253	0 784 281
x ₇	培养时间/h Time	76 8	96	4 298 358	0 023 164 *
x ₈	培养温度/ Temperature	28	35	- 1 904 34	0 152 977

注: * 可信度> 95%。
Note: * Reliability> 95%.

由 t-检验结果可知, 魔芋粉、加水比例、培养时间这 3 个因素的可信度分别为 99.1%, 95.5%, 97.7%, 高于 95%, 为重要因素。为进一步优化, 需在相应条件区域进行响应面分析, 寻找这 3 个因素

的最优水平, 其他 5 个因素取 Plackett-Buman 试验的优水平。

根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理, 以魔芋粉、加水比例、培养时间 3 个因素为自变量, 以比

酶活性为响应值设计了三因素三水平共 15 个试验 点的响应面分析试验, 试验方案与结果见表 8。

表 8 RSA 试验方案与结果

Table 8 Experimental design and results of RSA				
试验号 Number	X_1 魔芋粉/g Konjac powder	X_2 水 固料(mL g) H ₂ O solid medium	X_3 培养时间/h Time	Y 比酶活性/(U · g ⁻¹) Specific enzyme activity
1	- 1(0.5)	- 1(1.0)	0(96)	985
2	- 1	1(1.4)	0	850
3	1(1.5)	- 1	0	870
4	1	1	0	874
5	0(1.0)	- 1	- 1(72)	1 080
6	0	- 1	1(120)	1 036
7	0	1	- 1	995
8	0	1	1	976
9	- 1	0(1.2)	- 1	890
10	1	0	- 1	880
11	- 1	0	1	865
12	1	0	1	825
13	0	0	0	1 350
14	0	0	0	1 336
15	0	0	0	1 328

运用 SAS RSREG 程序对 RSA 试验结果分析 得如下回归方程及方差分析表(表 9)。

$Y = 1\,338 - 18.625X_1 - 34.5X_2 - 18.875X_3 -$

$299X_1^2 + 34.75X_1X_2 - 5.5X_1X_3 - 144.25X_2^2 + 6.25X_2X_3 - 172X_3^2$

表 9 RSA 试验回归方程的方差分析

Table 9 Regression equation of ANOVA					
方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 DF	平均平方和 Mean square	F 值 F value	显著性 Significance
一次项 Simple term	15 147.25	3	5 049.08	155.59579	**
二次项 Quadratic term	516 158.97	3	172 052.99	5 302.0958	**
交互项 Interaction term	584 616.5	3	194 872.17	52.465331	*
误差项 Error term	486.75	5	97.35		
总回归 Total	478 485	9	53 165	546.1222	**

注: **. 高度显著, *. 显著, $F_{0.05}(3, 2) = 19.16$, $F_{0.01}(3, 2) = 99.17$.
Note: **. High significance, *. Significance, $F_{0.05}(3, 2) = 19.16$, $F_{0.01}(3, 2) = 99.17$.

回归方程 F 值为 546 122.2; $F > F_{0.01}(9, 5) = 10.16$; $R^2 = 99.90\%$ 。说明上述回归方程描述各因子与响应值之间的关系时, 其因变量与全体自变量

之间的线性关系是显著的, 这种分析方法可靠。响应面分析图见图 2。

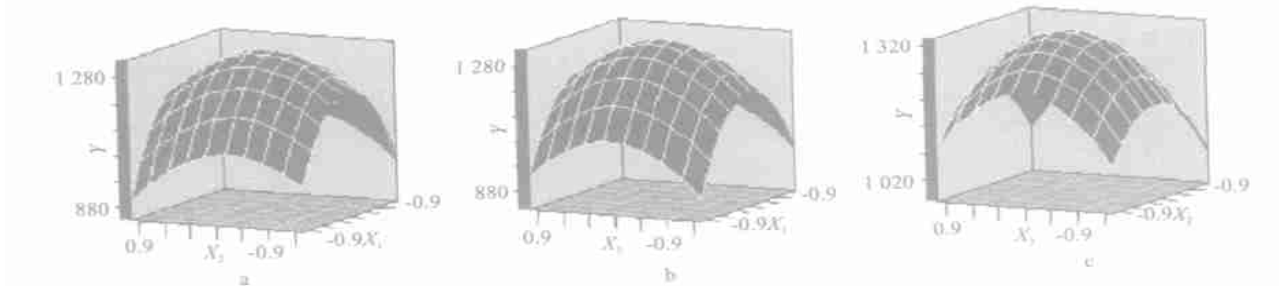


图 2 响应面分析图

Fig 2 Response surface plot

为确定各因素的最佳取值, 对二次回归方程求导。当 Y 取最大值时, 得 $X_1 = -0.037\,91$, $X_2 = -0.125\,4$, $X_3 = -0.056\,40$, 即魔芋粉 0.98 g, 加水比例为 1.17 : 1, 培养时间为 96 h 时, 理论最大产酶

活性为 1 341 U/g 干曲。再以该法筛选出的最佳培养基组成和最适培养条件进行发酵试验, 得实际最大产酶活性为 1 337 U/g 干曲。实际值与理论值相差 0.3%, 证明了用 RSA 法来寻求黑曲霉 WM 20-11 产酸性 β 甘露聚糖酶的最佳发酵工艺条件是可行的。

3 结 论

影响微生物产酶的因素主要有微生物菌株的自身优劣、微生物的培养基组成和微生物的培养条件 3 个方面。为了最有效地发挥 WM 20-11 菌株合成 β

甘露聚糖酶潜力, 本研究不仅对培养基组成和培养条件进行了单因素试验, 还设计了 Plackett-Burman 试验选取了 3 个重要因素, 并进行了三因素三水平的响应面分析, 获得了较好的发酵工艺参数。即: 最适发酵培养基组成为麸皮 9.0 g, 豆饼粉 1.0 g, 魔芋粉 0.98 g, 玉米浆 0.375 mL, 水 11.7 mL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 12.5 g/kg, CaCl_2 1.0 g/kg, MgSO_4 1.0 g/kg, KH_2PO_4 2.5 g/kg, 自然 pH; 最适培养条件为 28℃ 固体静置培养 96 h, 期间翻曲 2~3 次。在该条件下, 菌株产酶活性可达 1 337 U/g 干曲。

[参考文献]

- [1] 杨文博, 佟树敏, 沈 庆, 等. β 甘露聚糖酶酶解植物胶及其产物对双歧杆菌的促生长作用[J]. 微生物学通报, 1995, 22(4): 204-207.
- [2] 杨文博, 沈 庆, 佟树敏. 产 β 甘露聚糖酶地衣芽孢杆菌的分离筛选及发酵条件[J]. 微生物学通报, 1995, 22(3): 154-157.
- [3] 马延和, 田新玉, 周培瑾. 碱性 β 甘露聚糖酶的产生条件及一般特性[J]. 微生物学报, 1991, 31(6): 443-448.
- [4] 田新玉, 徐 毅, 马延和, 等. 嗜碱芽孢杆菌 N 16-5 β 甘露聚糖酶的纯化与性质[J]. 微生物学报, 1993, 33(2): 115-121.
- [5] 崔福绵, 石家骥, 鲁茁壮. 枯草芽孢杆菌中性 β 甘露聚糖酶的产生及性质[J]. 微生物学报, 1999, 39(1): 60-63.
- [6] Civas A, Eberhard R, Le Dizet P, et al. Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii*-Secreted β D-galactosidase and β D-mannanase[J]. Biochem J, 1984, 219: 857-863.
- [7] Tamaru Y, Arai T, Amagoi H, et al. Purification and characterization of an extracellular β 1, 4-mannanase from a marine *Bacterium*, *Vibrio* sp. strain MA-138[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(12): 4454-4458.
- [8] Akino T, Nakamura N, Horikoshi K. Characterization of three β mannanase of an *Alkalophilic bacillus* sp. [J]. Agric Biol Chem, 1988, 52(3): 773-779.
- [9] 陈一平, 龙健儿, 廖连华, 等. 芽孢杆菌 M 50 产生 β 甘露聚糖酶的条件研究[J]. 微生物学报, 2000, 40(1): 62-68.

Study on the solid-state fermentation of acidic β mannanase

ZHU Jie¹, LI Jian-fang², WU Min-chen¹

(1 Department of Medicine, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214064, China;

2 School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036, China)

Abstract: The effects of the nutrition ingredients and cultural conditions on the production of acidic β mannanase by *Aspergillus niger* WM 20-11 were studied in this paper. The optimal fermentation medium contained 9.0 g of wheat bran, 1.0 g of soybean flour, 0.98 g of konjac powder, 0.375 mL of steep liquor, 12.5 g/kg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0 g/kg CaCl_2 , 1.0 g/kg MgSO_4 , 2.5 g/kg KH_2PO_4 , and 11.7 mL of H_2O . The highest β mannanase activity was 1 337 U/g dry matter by solid-state fermentation at 28℃ for 96 hours.

Key words: β mannanase; *Aspergillus niger*; solid-state fermentation; response surface analysis