

黑曲霉 FS25 产 β -葡聚糖酶发酵特性的研究*

郑毅 陈接锋 马石金 吴松刚

(福建师范大学生物工程学院 福州 350007)

摘要: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) FS25 产 β -葡聚糖酶最适碳源为大麦粉, 氮源为玉米浆; 最佳摇瓶发酵配方为大麦粉 6g, 玉米浆 2g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, CaCO_3 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03g, 麦麸 0.8g, 发酵初始 pH 为 5.0, 定容 100mL。发酵温度为 32℃, 250mL 三角瓶发酵液的装量为 50mL, 接种量为 1.5mL 孢子悬液 (1.5×10^7 个/mL); 发酵周期为 30h, 酶活达到 80.1u/mL, 比初始的产酶水平提高了 84.1%。

关键词: β -葡聚糖酶, 黑曲霉, 发酵特性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 04-0047-04

STUDIES ON THE FERMENTATION CONDITIONS OF *ASPERGILLUS NIGER* FS25 PRODUCING β -GLUCANASE

ZHENG Yi CHEN Jie-Feng MA Shi-Jin WU Song-Gang

(Bioengineering college of Fujian Teachers University, Fuzhou 350007)

Abstract: The optimum fermentation conditions of *Asp. niger* FS25 producing β -glucanase was as follows, medium composition (g/100mL): barley flour 6, corn liquid 2, bran 0.8 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1, CaCO_3 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03; initial pH 5.0, cultivate temperature 32℃, 50mL medium volume in 250mL triangle flask. The β -glucanase activity of fermentation fluid reached 80.1u/mL, increasing 84.1% contrasted to the initial.

Key words: β -glucanase, *Aspergillus niger*, Fermentation conditions

β -葡聚糖酶指 β -1, 3-1, 4-葡聚糖酶 (EC.3.2.1.73), 其底物为 β -1, 3 和 β -1, 4 混合键连接的 β -D 葡聚糖。它对水解大麦、黑麦中的 β -葡聚糖有重要的作用^[1]。该酶早期主要应用于啤酒工业, 可分解大麦及麦芽中 β -葡聚糖凝胶, 降低麦汁粘度, 提高麦汁的过滤速度及得率^[2,3]。近年来在饲料工业中, 因其能分解 β -葡聚糖这种非淀粉粘性多糖 (大麦饲料的一种重要抗营养因子), β -葡聚糖酶已作为畜禽大麦饲料的重要添加剂

* 福建省科委资助项目 (No K990104)

收稿日期: 2000-03-07, 修回日期: 2000-10-7

之一,能够大大提高饲料的生物转化率同时减少了排泄物对环境的污染^[1]。

目前国内外主要利用微生物生产 β -葡聚糖酶,其中能特异分解大麦 β -葡聚糖的酶主要来源于芽孢菌属和曲霉属^[2],本文就 β -葡聚糖酶产生菌 *A. niger* FS25 的产酶条件进行优化研究。

1 材料与方 法

1.1 主要原料及试剂

大麦粉,福州市场购买;大麦 β -葡聚糖,美国 Sigma 公司产品。

1.2 菌种

A. niger FS25 由本实验室保藏。

1.3 培养基及培养条件

1.3.1 斜面培养基:改良察氏培养基。

1.3.2 初始产酶培养基:大麦粉 5g,黄豆饼粉 2g, NaNO_3 0.3g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001g, CaCO_3 0.5g, 麸皮 0.8g; 定容 100mL, pH 为 6.4; 250mL 三角瓶分装 50mL。

1.3.3 初始产酶条件:将斜面菌种接种于 50mL 产酶培养基(250mL 三角瓶)中, 30℃摇瓶培养(200r/min)发酵 50h。

1.4 方 法

1.4.1 β -葡聚糖酶活力测定:以 β -葡聚糖底物,采用 DNS 显色,光电比色法^[5]。酶活力单位定义:在 pH7.0, 温度 40℃条件下, 1min 使底物产生 1 μ mol 葡萄糖所需的酶量, 定义为一个单位(u)。

1.4.2 残糖测定:用 DNS 显色,光电比色法。

1.4.3 培养基及培养条件的优化:在初始产酶培养基及产酶条件的基础上,进行各项的研究。

2 结果与分析

2.1 产酶培养基的优化

在综合相关文献的基础上,初步设计了 FS25 的初始产酶培养基及初始产酶条件,摇瓶结果为 43.5u/mL。在此基础上进行了产酶培养基及产酶条件的优化研究。

2.1.1 不同碳源对产酶的影响:用 7 种常见碳源(蔗糖、葡萄糖、玉米淀粉、糊精、乳糖、可溶性淀粉、小麦粉)分别代替初始培养基中的大麦粉进行碳源单因素试验,结果表明大麦粉产酶效果最好,其次是小麦粉,这可能与大麦粉及小麦粉中含相对较多的 β -葡聚糖,对酶的产生具有诱导作用的原因,因此发酵碳源选用大麦粉。

2.1.2 不同有机氮源对产酶的影响:用 5 种有机氮源(玉米浆、酵母粉、蛋白胨、干酪素、大豆粉)分别代替初始培养基中的黄豆饼粉进行有机氮源单因素试验。几种氮源在一定程度上都促进酶的合成,相差不是很大,但以玉米浆最好。

2.1.3 不同无机氮源对产酶的影响:改变初始培养基中的无机氮源种类,包括 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 NaNO_3 4 种。添加量以氮元素摩尔数相等为依据。结果表明: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 是最佳的无机氮源,其次是 NH_4NO_3 。

2.1.4 培养基配方正交实验：在确定了最佳碳源和最佳氮源（包有机氮源和无机氮源）基础上，以大麦粉、玉米浆及 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 进行了3因素3水平（表1）的正交实验以确定最佳培养基配方，实验结果表明：最佳培养基配方为大麦粉 6g，玉米浆 2g， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4g，定容 100mL，如图1所示3个影响因素中玉米浆对产酶影响最大。

表1 培养基配方正交实验结果

序号	大麦粉 (g/100mL)	玉米浆 (g/100mL)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/100mL)	酶活 (u/mL)
1	5	1	0.2	56.7
2	5	2	0.3	63.4
3	5	3	0.4	44.8
4	6	1	0.3	50.5
5	6	2	0.4	63.9
6	6	3	0.2	53.6
7	7	1	0.4	57.2
8	7	2	0.2	47.9
9	7	3	0.3	33.5
K_1	164.9	164.4	158.2	
K_2	168.0	175.2	147.4	
K_3	138.6	131.9	165.9	
k_1	55.0	54.8	53.7	
k_2	56.0	58.4	49.1	
k_3	46.2	44.0	55.3	
R	9.8	14.0	6.2	

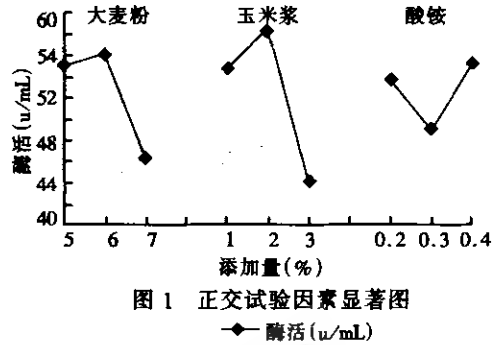


图1 正交试验因素显著图

◆—酶活(u/mL)

2.2 产酶条件的优化

2.2.1 培养基初始 pH 对产酶的影响：设置了 4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5 等 5 个不同初始 pH 的发酵培养基，结果表明在所试的 pH 梯度范围内，产酶培养基最适起始 pH 为 5.0。

2.2.2 发酵温度对产酶的影响：设置了 26℃、28℃、30℃、32℃和 34℃ 5 个温度梯度试验，结果表明在所试的温度范围内，发酵产酶的最适温度为 32℃。

2.2.3 培养基装量对产酶的影响：在 250mL 三角瓶中加入 20mL、30mL、40mL、50mL、60mL 和 70mL 产酶培养基，摇瓶产酶结果表明当每瓶装量为 50mL 时最适合该菌株在本实验条件下产酶。

2.2.4 接种量对产酶的影响：将 FS25 斜面孢子用无菌水配成孢子悬液（孢子浓度为 1.5×10^7 个/mL），在每个三角瓶的产酶培养基中接入不同的种子量（用孢子悬液的 mL 数计），当接种量为 1.5mL 时，产酶水平最高。

2.2.5 培养时间对产酶的影响：将黑曲霉孢子接入最佳发酵培养基后，32℃摇瓶培养，于不同时间取样，测定酶活、pH、生物量（取 15mL 的发酵液离心所获得的菌体体积计）及残糖，结果如图 2。

如图所示，在 30h 其生物量达到最高峰，此时酶活也达到最大值，达到 80.1u/mL，随时间延长，虽然生物量基本维持不变，但残糖逐渐减少，产酶水平也逐渐下降。故最适的发酵周期在 30h 左右即可。通过以上的条件的优化，使产酶

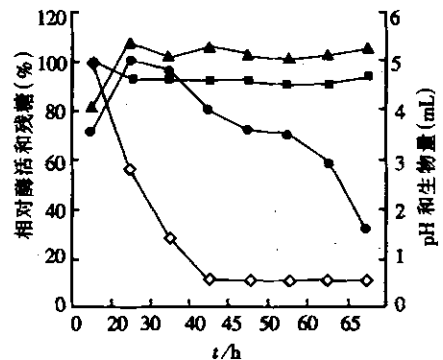


图2 发酵过程年化曲线

▲—生物量(mL), ●—相对残糖(%),
■—相对酶活(%), ◇—pH

水平比较初始发酵水平提高了84.1%，同时发酵周期也由最初的50h缩短到30h。

参 考 文 献

- [1] 李孝辉, 钱玉英, 沙恩泳, 等. 粮食与饲料工业, 1998 (10): 15~17.
- [2] 林宇野. 福建师大学报, 1995, 11 (3): 94~101.
- [3] 王薇青, 刘妙莲, 林宇野. 食品与发酵工业, 1989 (3): 1~7.
- [4] 刘妙莲, 林宇野, 王 洁. 食品与发酵工业, 1989 (4): 1~5.
- [5] 刘永举, 王清吉, 王江青. 中国饲料, 1999, (18): 26.
- [6] 王云川. 微生物学通报, 1998, 25 (2): 74~76.