

枯草芽孢杆菌产 β -甘露聚糖酶固体发酵条件的优化*

韦 贇 江正强** 李里特 柴萍萍 日下部功

(中国农业大学食品与科学营养工程学院 北京 100083)

摘要: 芽孢杆菌是产甘露聚糖酶的优良菌株, 首次研究芽孢杆菌固体发酵条件的优化。以天然麸皮作为基本原料, 研究利用枯草芽孢杆菌 WY34 固体发酵生产 β -甘露聚糖酶的发酵条件。最佳固体发酵培养条件为: 麸皮 5 g, 初始水分含量 71%, 初始 pH 7.0, 接种量为 2 mL, 1% Tween-80, 0.4 g 魔芋粉, 培养温度 50℃。在最适条件下培养 5 d, 甘露聚糖酶酶活高达 7, 650 U/g 干基, 是未优化前酶活的 2.78 倍。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 麸皮, 甘露聚糖酶, 魔芋粉

中图分类号: Q932939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0084-06

Optimization of Solid State Fermentation of Endo-mannanase Production by *Bacillus subtilis**

WEI Yun JIANG Zheng-Qiang** LI Li-Te CHAI Ping-Ping KUSAKABE Isao

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract: *Bacillus subtilis* is a good producer of mannanase. This is the first study to investigate mannanase production under solid state fermentation (SSF) by *Bacillus subtilis*. *Bacillus subtilis* WY34 was used for the production of extracellular mannanase in the SSF of wheat bran. The highest mannanase activity was 7, 650 U/g dry matter when the following conditions were used: wheat bran 5g, initial moisture content 71%, Tween-80 1%, konjac powder 0.4 g, initial pH 7.0, incubation temperature 50 °C. Enzyme production was increased 178% after optimization.

Key words: *Bacillus subtilis*, Wheat bran, Mannanase, Konjac powder

甘露聚糖的主链是由吡喃甘露糖残基以 1, 4- β -D 糖苷键连接而成。当主链的某些残基被葡萄糖取代, 或半乳糖通过 1, 6- α -糖苷键与甘露糖残基相连形成分枝, 则称之为异甘露聚糖, 主要有半乳甘露聚糖, 葡萄甘露聚糖和半乳葡萄甘露聚糖。甘露聚糖是半纤维素的第二大组分, 在自然界中分布广泛, 且多以异甘露聚糖的形式存在, 同型甘露聚糖十分少见。 β -甘露聚糖酶以内切方式降解甘露聚糖主链产生不同聚合度的甘露寡糖和少量甘露糖, 是甘露聚糖降解酶中最关键的酶。甘露聚糖酶可广泛应用于食品、造纸、纺织印染等行业。利用 β -甘露聚糖酶可以制取有特殊保健作用的甘露寡糖。在纸浆制造业, 可用于代替碱法进行脱色、漂白^[1]。在纺织印染方面, 利用 β -甘露聚糖酶与其它酶联合作用, 能有效去除产品上粘附的多余染料, 降低能耗和对环境的污染等^[2]。

甘露聚糖酶的工业化生产将在许多行业产生很大的经济和社会效益。因此, 近年来甘露聚糖酶逐渐成为国内外关注和研究的热点之一。但甘露聚糖酶作为一种工业酶

*国家国家高技术研究发展项目 (“863” 项目) (No. 2001AA214171)

**通讯作者 Tel: 010-62737689, E-mail: zhejiang@cau.edu.cn

收稿日期: 2005-04-18, 修回日期: 2005-06-01

制剂在世界范围内尚属空白,主要原因有:首先,国内外研究主要集中于液体发酵产甘露聚糖酶,液体发酵方式生产成本低,限制了其在工业上的应用。如国内的屈野、马建华、崔福绵等^[3-5]及国外的 Mendoza, Khanongnuch 等^[6,7]都是研究液体发酵条件下产甘露聚糖酶,产酶水平最高达 336.3 U/mL^[3]。固体发酵作为一种经济简便的产酶方式,在甘露聚糖酶生产中却少有报道。国内仅有朱 劫报道的黑曲霉产酸性甘露聚糖酶^[8]及邬敏辰报道的宇佐美曲霉产饲用复合酶^[9],尚未见有细菌固体发酵产甘露聚糖酶的报道。其次,筛选出来的菌株所产甘露聚糖酶活低,固体发酵产甘露聚糖酶最高酶活为 1,295 U/g^[8,9],工业化生产成本仍较高。因此,筛选出甘露聚糖酶的高产菌株,并研究其低成本的生产方式将具有重要意义。本研究探讨一株自行筛选 β -甘露聚糖酶的高产枯草芽孢杆菌固体发酵的可能性和条件的优化,以期利用该菌低成本生产甘露聚糖酶及其应用等方面提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和试剂

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) WY34 菌株由本实验室从土壤中筛出保存。酵母提取物 (yeast extract) 为英国 Oxoid 公司产品,槐豆胶 (Locust bean gum, LBG) 为美国 Sigma 公司产品。其他试剂为国产分析纯。所用麸皮为古船面粉厂副产品。

1.2 培养基及种子液的制备

斜面培养基: 5 g 槐豆胶, 1 g 酵母提取物, 1 g 牛肉蛋白胨, 1 g KH_2PO_4 , 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 定容至 1 L。1 $\times 10^5$ Pa 灭菌 20 min。

种子液的制备: 将上述培养基培养 48 h 的新鲜菌株接入种子培养基 (10 g 肉蛋白胨, 5 g 酵母提取物, 10 g NaCl, 定容至 1 L), 培养 18 h。制得的种子液于 20% 甘油管 -20℃ 下保存备用。600 nm 下吸光度 (OD 值) 平均值为 0.625。

1.3 固体发酵及粗酶液的提取

固体发酵培养: 100 mL 三角瓶装料量: 基本营养盐溶液 10 mL (0.05g KH_2PO_4 , 0.01g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 麸皮 (60℃ 下烘干备用) 5 g, pH 自然, 1 $\times 10^5$ Pa 灭菌 20 min; 冷却后接入 2 mL 种子液 (OD 值约为 0.625), 50℃ 静置培养 5 d。在发酵结束后的新鲜培养基中加入 10 倍含 1% Tween-80 的蒸馏水, 将麸皮充分捣碎后于 30℃, 150 r/min 转速下振荡 4 h, 8,500 r/min 离心 10 min, 取上清液作为粗酶液。

1.4 发酵产酶条件的优化

在上述培养条件下,改变碳源种类(麸皮、脱脂椰粉和咖啡渣)考察对该菌产酶的影响。最佳碳源确定后,调节不同的初始水分含量(50%~80%),考查其对产酶的影响。在优化碳源及水分的基础上将菌株分别在 30℃~55℃ 下培养 5 d。确定最适培养温度之后,在 pH 4.0~9.0 范围内调节基本营养盐溶液的初始 pH,培养 5 d 以寻求最佳初始 pH 值。另外,还考查了各种添加物对产酶的影响:表面活性剂包括 Tween-80,食用橄榄油, Triton X-100,添加量为 0.05 g;不同糖类包括魔芋粉、槐豆胶、瓜尔豆胶、甘露糖、乳糖和半乳糖,添加量分别为 0.4 g/5 g 干基;不同氮源包括酵母提取物、牛肉蛋白胨、胰蛋白胨、大豆蛋白胨、干酪素、尿素、硫酸铵和磷酸氢二铵,添加量为 0.196 g 氮素/5 g 干基。

1.5 酶活力和蛋白质含量的测定

采用DNS法测定甘露聚糖酶的活力^[10]：以0.5%槐豆胶(Sigma)溶液为底物(0.05 mol/L, pH 6.0 柠檬酸钠缓冲液溶解)。0.9 mL底物溶液加0.1 mL适当稀释的酶液,在60℃反应10 min,用DNS法测定释放的还原糖量,同时以甘露糖为标准。在以上条件下,每分钟产生1 μmol甘露糖所需的酶量为一个酶活单位(U)。酶活力结果均表示为U/g干基(碳源)。纤维素酶(木聚糖酶)活力的测定:方法同上,仅将底物和标准物分别换成低粘度羧甲基纤维素(桦木木聚糖)和葡萄糖(木糖)。蛋白质含量的测定采用Lowry^[11]法,以牛血清蛋白为标准。实验结果均为3次平行实验的平均值。

2 结果与讨论

2.1 碳源对产酶的影响

咖啡渣、椰粉和麸皮都是半纤维素的良好来源,可作为基料进行固体发酵,本实验中以麸皮作为唯一碳源时酶活最高,达2,750.3 U/g干基。以脱脂椰粉及咖啡渣作为碳源,酶活均小于200 U/g干基,不及麸皮的1/10(数据未列出)。分别用脱脂椰粉和咖啡渣与麸皮以不同比例配合做复合碳源进行固体发酵,该菌产酶也远不如单一麸皮效果好。可见麸皮最适于作为芽孢杆菌WY34固体发酵产甘露聚糖酶的碳源。

Regalado等的研究发现咖啡渣和脱脂椰粉都含有丰富的蛋白质及甘露聚糖,其中椰粉中还含有较多的还原糖类(190 g/kg),二者配合在固体发酵中较利于米曲霉(*Aspergillus oryze*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*)产甘露聚糖酶^[12]。但在本研究中发现,相同初始含水量条件下,咖啡渣和椰粉培养基24 h后即变得十分干燥和紧致,水分损失很大,而麸皮培养基在120 h后仍比较湿润,能保持较松散的状态,通气性较好,利于芽孢杆菌WY34的生长和产酶。

2.2 初始水分含量对产酶的影响

初始水分含量对产酶的影响结果见图1。当初始水分含量为71%时,酶活最高为3,264.2 U/g干基。此后,随着含水量增加酶活呈下降趋势。水分含量是影响固体发酵产酶的关键因素之一,据Roussos等报道,一般在真菌固体发酵中,较高的初始水分含量(75%~80%)利于提高酶的产量^[13]。Kalogeris等对固体发酵产木聚糖酶的研究也得到相同的结论^[14]。而对多数细菌的固体发酵研究则表明,细菌所需水分较真菌少,这与本实验结果是一致的。

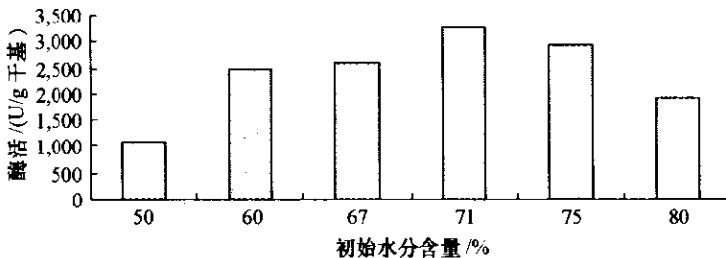


图1 初始含水量对产甘露聚糖酶的影响

2.3 温度对产酶的影响

温度对产酶的影响见图2。当培养温度为30℃~40℃时,酶活均很低,仅在400~500 U/g干基之间。当培养温度为45℃时,酶活明显上升,50℃时酶活达到最高,发酵5 d最终酶活力高达2,976.4 U/g干基。当培养温度升至55℃时酶活开始下降。可见该菌最适培养温度为50℃。而目前国内报道的产甘露聚糖酶菌株的发酵温度普遍在25℃~37℃之间,尚未发现有45℃以上产甘露聚糖酶的报道。这是目前国内报导产甘露聚糖酶菌株中最适产酶温度最高的微生物,说明该菌属于嗜热菌。因此,利用该菌产酶时,在培养和发酵过程中不容易感染杂菌,可以比较方便的控制发酵过程,提高实际生产的适应性。

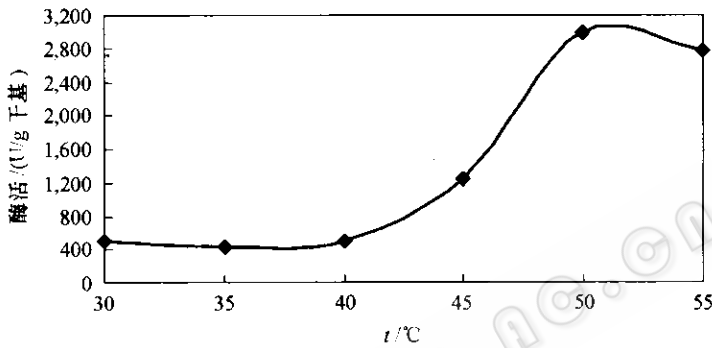


图2 不同培养温度对产甘露聚糖酶的影响

2.4 初始 pH 值对产酶的影响

初始 pH 值对产酶的影响见图3。当初始 pH 为7.0~8.0时,酶活最高,分别为4,689 U/g干基和4,613 U/g干基。这说明该菌产酶的最适初始 pH 为中性偏碱。在固体发酵中,初始 pH 一般影响不大,但在本研究中却对酶活有显著的影响:初始 pH 为中性时酶活要大大高于酸性条件下的酶活,在初始 pH 6.5~8.0条件下能得到高产量的甘露聚糖酶。这符合细菌的生长习惯,即大多数细菌在中性或弱碱性时生长最好,而真菌则更适合偏酸的环境^[15]。

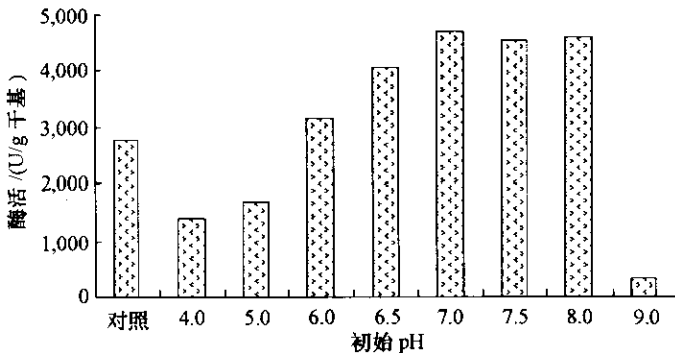


图3 初始 pH 值对产甘露聚糖酶的影响

2.5 各种添加剂对产酶的影响

为了进一步提高固体发酵甘露聚糖酶的产量,考察了3种表面活性剂 Tween-80、橄榄油和 Triton X-100 对产酶的影响,其中以 Tween-80 效果最好,同时也考察了

Tween-80 添加量对产酶的影响, 结果表明以 1% 为佳, 酶活由原来的 2,750.3 U/g 干基提高到 3,523 U/g 干基。橄榄油对提高产酶帮助不大, 添加 Triton X-100 反而使酶活有所降低 (数据未列出)。另外, 添加不同氮源 (196 mg 氮素/5g 干基) 后产酶比对照 (不添加其它氮源) 低 6.9% ~ 35.5%, 而蛋白酶活则比对照提高了 171% ~ 288%。这可能是因为麸皮本身已含有足够的氮源供枯草芽孢杆菌 WY34 生长, 再添加其它氮源反而促使蛋白酶的合成与分泌, 从而引起甘露聚糖酶的降解, 导致酶活降低。

不同糖类对产酶的影响结果见图 4。其中以魔芋粉的效果最好, 酶活大幅度提高至 5,277.3 U/g 干基, 为原来的 192%。槐豆胶次之, 酶活是原来的 113%。添加甘露糖则对产酶有抑制作用。此外还考察了魔芋粉不同添加量对产酶的影响, 结果表明随着添加量的提高酶活也逐步升高, 添加量达到 0.08 g/g 干基时酶活最高, 大于 0.08 g/g 干基酶活开始下降, 可以确定魔芋粉最佳添加量为 0.08 g/g 干基。大多数研究表明, β -甘露聚糖酶一般以胞外诱导酶的形式存在于生物体, 在培养基中添加少量的甘露多糖或甘露寡糖, 如魔芋粉、槐豆胶或其水解物等就能极大提高产酶水平^[3]。邬敏辰等的研究也发现魔芋粉有助于黑曲霉 WM20-11 固体发酵产甘露聚糖酶^[8]。

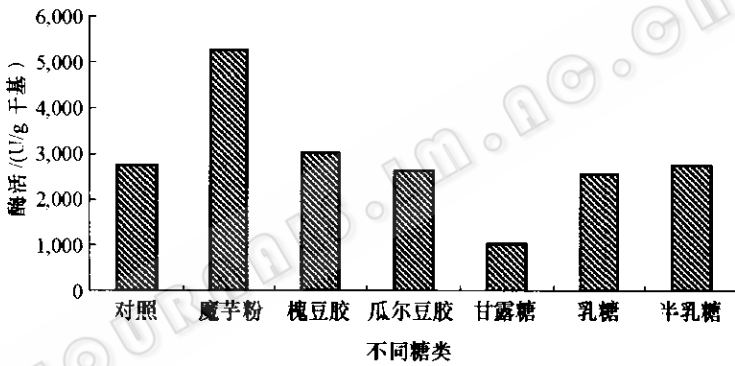


图 4 各种糖类对产酶的影响

2.6 固体发酵的产酶历程

枯草芽孢杆菌 WY34 优化后的固体发酵条件为: 麸皮 5 g, 初始水分含量 71%, 初始 pH 7.0, 接种量 2 mL, 1% Tween-80, 0.4 g 魔芋粉, 培养温度 50℃。在该条件下其产酶历程见图 5。培养 1 d, 酶活即达 1,900.2 U/g 干基, 此后随着培养时间的增长酶活逐步上升, 在 5 d 时酶活达到最高, 为 7650.3 U/g 干基, 继续培养则酶活略微下降。

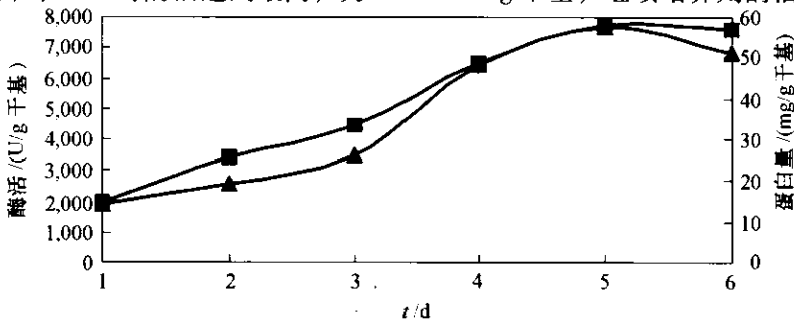


图 5 固体发酵枯草芽孢杆菌产甘露聚糖酶的历程

◆—酶活, ■—蛋白量

培养基 pH 值也由 7.0 增加到 7.9。该菌固体发酵产甘露聚糖酶水平是目前国内最高的。由图 5 还可以看出, 酶活最高时, 蛋白量也达到最高 58.1 mg/g 干基。本实验中枯草芽孢杆菌 WY34 到达产酶高峰所需时间较长, 这很可能是因为该菌甘露聚糖酶的产生滞后于菌体的生长所致。分析图 5 可知, 其甘露聚糖酶活力由第 3 d 的 3,487.7 U/g 干基迅速升高至第 5 d 的 7,650.3 U/g 干基, 最大酶量 54% 的合成与分泌在 2 d 内完成。另外, 粗酶液的纤维素酶和木聚糖酶活力都很低, 分别为 36.5 U/g 干基和 16.4 U/g 干基, 这也有利于所产甘露聚糖酶的纯化和应用。

3 结论

与同类枯草芽孢杆菌菌种相比, 新筛选出的枯草芽孢杆菌 WY34 具有嗜热性, 能在 50℃ 下生长良好。有关枯草芽孢杆菌固体发酵产甘露聚糖酶的研究尚未见报道, 而该菌能以麸皮为基本原料, 通过固体发酵高水平生产甘露聚糖酶。经过优化固体发酵条件, 该菌产酶高达 7,650.34 U/g, 为未优化前酶活的 2.78 倍。而且该菌仅产生微弱的纤维素酶和木聚糖酶。因此, 该菌具有很大的潜在工业应用价值和前景。

参考文献

- [1] 杨文博, 佟树敏, 沈庆, 等. 微生物学通报, 1995, 22 (4): 204~207.
- [2] 吴襟, 何秉旺. 微生物学通报, 1999, 26 (2): 134~136.
- [3] 屈野, 杨文博, 冯耀宇, 等. 武警医学院学报, 2002, 9 (2): 80~86.
- [4] 马建华, 高扬, 牛秀田, 等. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15 (1): 79~82.
- [5] 崔福绵, 石家骥, 鲁茁壮. 微生物学报, 1999, 39 (1): 60~63.
- [6] Mendoza N, Arai M, Kawaguchi T, *et al.* World J Microbiol Biotechnol, 1994, 10 (5): 551~555.
- [7] Khanongnuch C, Asada K, Tsuruga H, *et al.* J Ferment Bioeng, 1998, 86 (5): 461~466.
- [8] 朱劭, 邬敏辰. 生物技术, 2003, 13 (2): 30~32.
- [9] 邬敏辰, 邬显彰. 饲料工业, 2003, 24 (1): 5~8.
- [10] Bailey M J, Biely P, Poutanen K. J Biotechnol, 1992, 23: 257~270.
- [11] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* J Biol Chem, 1951, 193: 265~275.
- [12] Regalado-Gonzalez C, Garcia-Almendarez B E, Venegas-Barrera L M, *et al.* J Sci Food Agric, 2000, 80: 1343~1350.
- [13] Roussos S, Raimbault M, Saucedo-Castaneda G, *et al.* Micol Neotrop Appl, 1991, 4: 19~40.
- [14] Kalogeris E, Christakopoulos P, Kekos D, *et al.* J Biotechnol, 1998, 60: 155~163.
- [15] 王文仲. 应用微生物学. 北京: 中国医药科技出版社, 1996. 4.