

文章编号:1673-1689(2008)05-0124-04

## 突变黑曲霉高产 $\beta$ 葡萄糖苷酶的培养基优化

许晓鹏<sup>1,3</sup>, 袁士芳<sup>2</sup>, 刘立明<sup>\*1,3</sup>

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 对实验室筛选出产  $\beta$  葡萄糖苷酶的黑曲霉进行辐射诱变处理得到高产酶突变菌株, 同时采用单因素和正交实验对黑曲霉产酶培养基进行优化研究。结果表明: 经过 X 射线辐射诱变的黑曲霉产的  $\beta$  葡萄糖苷酶活力提高了 18.86 U/mL。该菌株最适宜产酶的培养基为(质量分数%): 麸皮与玉米粉(1:1)1.5、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.15、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2、吐温 80 0.1, 所得酶活力最大可达到 59.86 U/mL。

**关键词:**  $\beta$  葡萄糖苷酶; 黑曲霉; 辐射诱变; 培养基; 优化

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

## Optimization of Culture Medium for Producing High $\beta$ -Glucosidase by *Aspergillus niger* Mutant

XU Xiao-peng<sup>1,3</sup>, YUAN Shi-fang<sup>2</sup>, LIU Li-Ming<sup>\*1,3</sup>

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science & Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** In this study, *Aspergillus niger* mutant with high  $\beta$ -glucosidase was obtained by radiation. Single factor and orthogonal test were developed to optimize the culture medium for  $\beta$ -glucosidase production. Only 18.86 U/mL  $\beta$ -glucosidase was achieved after X-ray radiation mutation. The optimum composition of medium were listed: bran and maize power (1:1) 1.5%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%, Tween 80 0.1%. the highest  $\beta$ -glucosidase activity were achieved at 59.86 U/mL with the optimum medium.

**Key words:**  $\beta$ -glucosidase; *Aspergillus niger*; mutation breeding by radiation; culture medium; optimization

$\beta$  葡萄糖苷酶( EC. 3. 2. 1. 21) 可催化水解  $\beta$ -D-葡萄糖苷键, 是纤维素酶的主要组分之一, 其酶活高低主要影响纤维素酶的总体酶活高低。由于纤维素分子本身难以分解以及菌种产酶能力有限、纤

维素酶比活力低、酶组分比例不协调等原因, 从而影响纤维素酶工业化生产能力<sup>[1-4]</sup>, 其主要的解决方法在于现代生物技术的应用和酶工程的进一步探索。目前, 国内外对木霉纤维素酶的研究报道很

收稿日期: 2008-07-25.

作者简介: 许晓鹏(1978-), 男, 吉林白山人, 助教, 工学硕士, 主要从事微生物工程方面的研究.

\* 通讯作者: 刘立明(1976-), 男, 安徽宿松人, 副教授, 工学博士, 主要从事微生物细胞生理功能方面的研究.

Email: mingll@jiangnan.edu.cn

多,但由于普遍存在 $\beta$ 葡萄糖苷酶活力低的缺陷,致使纤维二糖积累,影响酶解效率<sup>[2-3]</sup>。但是在木霉纤维素酶中加入 $\beta$ 葡萄糖苷酶可极大地提高纤维素酶的降解能力。另外, $\beta$ 葡萄糖苷酶作为食品风味酶有广阔的应用前景<sup>[4]</sup>。

$\beta$ 葡萄糖苷酶目前主要用黑曲霉发酵来获取,但普遍存在酶活力低、发酵周期长等缺陷,而诱变育种可得到优良菌株并提高生产性能<sup>[5]</sup>。因此,作者拟采用辐射诱变得到高产 $\beta$ 葡萄糖苷酶的黑曲霉,并优化其产酶培养基,为 $\beta$ 葡萄糖苷酶的工业化生产提供一定的理论依据。黑曲霉经过X-射线辐射诱变后酶活达到30.91 U/mL,高于文献[1]报道的17 U/mL。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌种 黑曲霉由作者所在学院微生物研究室保藏。

#### 1.1.2 培养基

PDA培养基:马铃薯(去皮切块)300 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g、蒸馏水1 000 mL,121 ℃灭菌20 min<sup>[1]</sup>。

摇瓶发酵培养基:麸皮0.5 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  40 mg、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mg、 $\text{MgSO}_4$  5 mg、 $\text{CaCl}_2$  0.25 mg、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 mg、尿素5 mg、 $\text{ZnCl}_2$  0.05 mg,加水25 mL于250 mL的三角瓶中,pH值自然,121 ℃灭菌20 min。

### 1.2 实验方法

1.2.1 菌株的培养方法 在PDA斜面培养基上,30 ℃活化菌种48 h,然后接入PDA固体培养基的500 mL的三角瓶中(种子培养基),30 ℃恒温培养24 h,用无菌水洗下种子培养基中的孢子,接入发酵培养基(250 mL的三角瓶装25 mL,121 ℃灭菌20 min),接种体积分数10%,30 ℃、150 r/min摇床培养72 h,取发酵液于4 000 r/min离心10 min,收集上清液,测酶活力。

1.2.2 菌种的辐射诱变 采用X-射线与 $\gamma$ -射线对黑曲霉进行辐照处理,辐射时间8 min,通过初筛和复筛,分别得到一株 $\beta$ 葡萄糖苷酶产量提高、遗传稳定的突变株。

1.2.3  $\beta$ 葡萄糖苷酶的酶活测定方法 取0.5 mL一定稀释度的样液,加入0.5 mL 0.5 g/dL的水杨苷(溶于0.1 mol/L pH 4.8 醋酸缓冲溶液中),55 ℃保温20 min后,加入1 mL DNS试剂,充分混合后在沸水中煮5 min,冷却后用蒸馏水稀释至10

mL,在722型分光光度计上于540 nm处测OD值<sup>[3]</sup>,以加热灭活的酶液按照同样的方法处理作为空白。在上述条件下,定义每小时由底物产生1  $\mu\text{mol}$ 还原糖(以葡萄糖计)所需的酶量为一个酶活单位(U)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌种的诱变

由表1可以看出,黑曲霉经过X-射线辐射诱变后酶活最高,达到30.91 U/mL,相比原菌株提高了18.86 U/mL。

表1 不同辐射处理对产酶的影响

Tab. 1 Effect of radiation treatment on  $\beta$ -glucosidase production

黑曲霉	酶活力/(U/mL)
原菌株	12.05
X-射线诱变菌株	30.91
$\gamma$ -射线诱变菌株	25.48

### 2.2 碳源对产酶的影响

表2的可知,黑曲霉在以麸皮与玉米粉为碳源的酶活力最高,麸皮次之,单独使用玉米粉作为碳源时,酶活力不高,说明该菌株对麸皮和玉米粉复合的纤维素利用能力较强,麸皮和玉米粉有协同作用<sup>[4]</sup>。而采用米糠及米糠和麸皮作为黑曲霉培养基的碳源不理想。因此添加2%的麸皮与玉米粉(质量比1:1)为碳源,所得到的酶活最高。

表2 碳源对产酶影响

Tab. 2 Effect of carbon source on  $\beta$ -glucosidase production

碳源	添加质量分数/%	酶活力/(U/mL)
麸皮	2	31.80
玉米粉	2	25.96
米糠	2	21.41
麸皮+玉米粉	1+1	35.16
麸皮+玉米粉	1+2	29.03
麸皮+玉米粉	2+1	30.21
麸皮+米糠	1+1	21.62
麸皮+米糠	2+1	26.57
麸皮+米糠	1+2	22.44

### 2.3 氮源对产酶的影响

表3表明,无机氮优于有机氮, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时, $\beta$ 葡萄糖苷酶酶活力最高(37.65 U/mL),因此作者选择了0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源。

表 3 氮源对产酶影响

Tab. 3 Effect of nitrogen source on  $\beta$ -glucosidase production

氮源	添加质量分数/%	酶活力/(U/mL)
豆饼粉	0.1	35.19
蛋白胨	0.1	31.44
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1	37.65
尿素	0.1	35.81

## 2.4 磷酸盐对产酶的影响

表 4 表明,0.2%的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>对产酶有较好促进作用较好。

表 4 磷酸盐对产酶影响

Tab. 4 Effect of phosphate on  $\beta$ -glucosidase production

添加剂	添加质量分数/%	酶活力/(U/mL)
对照(不加)	0	24.70
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1	27.66
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2	40.63
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	33.16

## 2.5 吐温-80对产酶的影响

表 5 表明,吐温 80 对产酶有促进作用,且质量分数 0.1%吐温 80 对产酶促进作用较好,而质量分数 0.15%的吐温 80 对产酶促进作用开始下降,说明吐温 80 质量分数过高,对产酶有抑制作用。

表 7 正交试验方案及计算分析

Tab. 7 The design and result analysis of the orthogonal experiment

试验序号	因素				酶活力/(U/mL)
	A 麸皮+玉米粉 (1:1)质量分数/%	B (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 质量分数/%	C KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 质量分数/%	D 吐温 80 质量分数/%	
1	1(1.5)	1(0.05)	1(0.15)	1(0.05)	43.34
2	1	2(0.1)	2(0.2)	2(0.1)	55.56
3	1	3(0.15)	3(0.25)	3(0.15)	45.37
4	2(2)	1	2	3	37.13
5	2	2	3	1	38.25
6	2	3	1	2	42.78
7	3(2.5)	1	3	2	30.92
8	3	2	1	3	36.17
9	3	3	2	1	44.90
<i>k</i> <sub>1</sub>	36.07	27.85	30.57	31.63	
<i>k</i> <sub>2</sub>	29.54	32.50	34.40	32.32	
<i>k</i> <sub>3</sub>	28.00	33.26	28.36	29.67	
极差 R	8.07	5.41	6.04	2.65	
优水平	A <sub>1</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	

表 5 吐温 80 对产酶影响

Tab. 5 Effect of Tween 80 on production  $\beta$ -glucosidase

添加剂	添加质量分数/%	酶活力/(U/mL)
对照(不加)	0	27.35
吐温-80	0.05	41.02
吐温-80	0.10	41.62
吐温-80	0.15	31.17

## 2.6 Mg<sup>2+</sup>对产酶的影响

表 6 表明,镁离子质量分数的改变,对产酶的影响不大。

表 6 Mg<sup>2+</sup>对产酶影响Tab. 6 Effect of Mg<sup>2+</sup> ion on production  $\beta$ -glucosidase

添加剂	添加质量分数/%	酶活力/(U/mL)
MgSO <sub>4</sub>	0.01	39.43
MgSO <sub>4</sub>	0.02	39.10
MgSO <sub>4</sub>	0.05	39.32

## 2.7 培养基正交实验优化

通过上述单因素试验,确定了影响酶活的 4 个主要因素,并确定了它们的最佳添加范围。这 4 个因素为:碳源质量分数、氮源质量分数、磷酸盐及吐温 80 质量分数。考虑到这 4 个因素对产品的综合影响,选定每一个因素的最佳添加范围的 3 个水平,设计 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表试验,试验安排见表 7,并通过对发酵产生的酶活力为指标,确定培养基最佳配方,结果见表 7。

由表7的4个因素的极差分析可知:各因素对酶活的影响大小分别为 $A>C>B>D$ ,麸皮和玉米粉(碳源)的协同作用对实验的影响较大,起主导作用, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 与氮源次之,吐温80相对影响较小。高产 $\beta$ 葡萄糖苷酶培养基的最佳配比为 $A_1B_3C_2D_2$ ,即麸皮+玉米粉(质量比1:1)1.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数0.15%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 质量分数0.2%,吐温80质量分数0.1%。在该条件下发酵产生的酶活力单位达到59.86 U/mL。

### 3 结 语

通过对产 $\beta$ 葡萄糖苷酶的黑曲霉菌株进行辐射诱变处理均能提高其产酶活力,其中X射线辐射诱变能使酶活力提高最大,达到18.86 U/mL。该菌株最适宜产酶的培养基为:1.5%麸皮添加量与玉米粉(质量比1:1)、质量分数0.15% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、质量分数0.2% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、质量分数0.1%吐温80,所得酶活力最大可达到59.86 U/mL。

### 参考文献(References):

- [1] 李平,宛晓春,陶文沂,等. 黑曲霉生产 $\beta$ 葡萄糖苷酶发酵条件的研究[J]. 应用生态学报,1999,10(6): 732-734.  
LI Ping, WAN Xiao-chun, TAO Wen-yi, et al. Fermentation conditions of  $\beta$  glucosidase production from *Asp niger*[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1999,10(6): 732-734. (in Chinese)
- [2] Garcia-Kirchner O, Segura-Granados M, Rodriguez-Pascual P. Effect of media composition and growth conditions on production of bate-glucosidase by *Aspergillus niger* C-6[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2005, 121-124: 347-360.
- [3] Ramirez-Coronel M A, Viniestra-Gonzalez G, Darvill A, et al. A novel tannase from *Aspergillus niger* with beta-glucosidase activity[J]. *Microbiology*, 2003, 149(10): 2941-2946.
- [4] 杨胜远. 黑曲霉(*As. n. XD-1*) $\beta$ 葡萄糖苷酶产酶条件研究[J]. 食品科学,2002, 23(11): 59-62.  
YANG Sheng-yuan. Study on  $\beta$ -glucodydase production conditions of *Aspergillus niger* (*As. n. XD-1*)[J]. *Food Science*, 2002,23(11): 59-62. (in Chinese)
- [5] 居乃琥. 酶工程研究和酶工程产业的新进展(II)——国内外酶制剂工业的现状、发展趋势和对策建议[J]. 食品与发酵工业,2000,26(4):40-42.  
JU Nai-hu. New advances in enzyme engineering research and enzyme preparation industry(II)——present status and development prospects of enzyme preparation industry at home and abroad, and countermeasures for speeding up the development of enzyme prep[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2000,26(4):40-42. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)