

文章编号:1673-1689(2007)04-0088-05

黑曲霉酸性 β -甘露聚糖酶的产酶条件

李剑芳^{1,2}, 邬敏辰³, 夏文水^{1,2}

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡214122; 2. 江南大学食品学院, 江苏无锡214122; 3. 江南大学医药学院, 江苏无锡214064)

摘要:研究了培养基组分和培养条件对黑曲霉菌株 *Aspergillus niger* LW-1 固态发酵产 β -甘露聚糖酶的影响。在单因素试验的基础上, 采用 Plackett-Burman 和 Box-Behnken 实验设计确定的最佳产酶培养基组成和培养条件: 麸皮与豆饼粉质量比为 7.5 : 2.5 (g/g), 其它物质相对于固体物料的质量分数分别为魔芋粉 4%, KH_2PO_4 0.3%, 玉米浆 5%, CaCl_2 0.1%, MgSO_4 0.1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%, 液固质量比为 1.5 : 1, 自然 pH; 32 °C 静置培养 84 h, 期间翻曲 1 次。最高酶活可达 24 879 IU/g。

关键词: β -甘露聚糖酶; 黑曲霉; 发酵条件; 响应面分析

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Study On Fermentation Conditions of Acidic β -Mannanase from *Aspergillus niger* LW-1

LI Jian-fang^{1,2}, WU Min-chen³, XIA Wen-shui^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of medicine, Jiangnan University, Wuxi 214064, China)

Abstract: In this manuscript, the nutritional and environmental conditions on β -mannanase production were investigated and optimized. The optimum conditions was determined by the multivariant statistical approaches. With the optimum conditions, a highest acidic β -mannanase activity was achieved at 24 879 IU/g dry medium at 32 °C for 84 h.

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

β -甘露聚糖酶(β -1,4-D-mannan mannohydrolase, EC 3.2.1.78)是一种能水解甘露聚糖、葡萄糖甘露聚糖、半乳甘露聚糖和半乳葡萄糖甘露聚糖的主链 β -1,4-D-甘露糖苷键的半纤维素酶,广泛存在于动植物和微生物中。近年来,随着对自然界半纤维素资源的开发和甘露寡糖生理功能的发现,以及绿色饲料的兴起, β -甘露聚糖酶的研究和开发进入了

一个新高潮,并已在食品、医药、饲料、造纸、纺织、洗涤、石油开采等领域得到了广泛运用^[1-3]。

国内外对来源于不同菌种的 β -甘露聚糖酶的研究、生产和应用报道多集中在碱性^[4-5]和中性^[6-7]酶方面,而有关酸性 β -甘露聚糖酶的研究和报道则较少,且所见报道固态发酵产酶活力不超过 10 000 IU/g。本课题从实验室现有的一株酸性 β -

收稿日期:2006-10-28.

作者简介:李剑芳(1965-),女,江苏无锡人,食品科学与工程在职博士研究生,副教授,主要从事食品生物技术研究。

Email:lijf@163.com

甘露聚糖酶高产菌株黑曲霉 *Aspergillus niger* LW-1 出发,通过对产酶培养基和发酵条件的优化,最终产酶活力达到24 879 IU/g,是迄今为止所有报道中最高的,为该酶的工业生产和应用奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 黑曲霉 *Aspergillus niger* LW-1 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选育和保藏。

1.1.2 培养基

1) 活化培养基:马铃薯培养基。用于菌种分离、斜面种子及保藏。

2) 麸曲种子培养基:250 mL的锥形瓶装麸皮10.0 g,硫酸铵0.1 g,水12.0 mL;自然pH,121℃灭菌30 min。

3) 基础发酵培养基:250 mL的锥形瓶装麸皮8.0 g,豆饼粉2.0 g,硫酸铵0.1 g,魔芋粉0.1 g,水12.0 mL(基质与水质量比为1:1.2);自然pH,121℃灭菌30 min。

1.2 实验方法

1.2.1 酶活性测定(DNS法) 取0.1 mL适当稀释的酶液,加到2.4 mL用pH 4.8 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液配制的质量浓度为5 g/L的角豆胶溶液中,50℃准确反应15 min;采用DNS法测定水解产生的还原糖。以每分钟水解底物产生1 μmol 还原糖(以甘露糖计)的酶量,定义为一个 β -甘露聚糖酶活力单位(IU)。

1.2.2 Plackett-Burman 实验设计 该实验设计^[8]适用于从众多的考察因素中快速有效地筛选出最为重要的几个因素。

1.2.3 Box-Behnken 实验设计 由Box-Behnken提出的中心组合设计^[9]是一种较常用的响应面分析法(Response Surface Analysis, RSA),适用于2至5个因素的优化设计和试验。通过对试验数据的二次回归拟合,可求出各因素的最佳值。

2 结果与讨论

2.1 产酶培养基的优化

菌株产酶水平的高低一方面与菌株本身的遗传特性有关,另一方面与其生长基质和培养环境密切相关。为有效提高菌株LW-1的发酵酶活,试验中分别通过单因素试验、Plackett-Burman实验和响应面分析法等对菌株的发酵培养基进行优化。

2.1.1 麸皮豆饼粉质量比对产酶的影响 在基础发酵培养基配方的基础上,用豆饼粉替换部分麸皮以补充有机氮源,试验了麸皮和豆饼粉不同质量比对菌株产酶的影响。即麸皮+豆饼粉=10.0 g,魔芋粉0.1 g,硫酸铵0.1 g,水12.0 mL,32℃培养84 h。表1表明,当麸皮与豆饼粉质量比为7.5:2.5时,菌株产酶活性最高。

表1 麸皮与豆饼粉质量比例对产酶的影响

Tab.1 Effect of the proportion of wheat bran to soybean flour on mannanase production

麸皮与豆饼粉 质量比/(g/g)	酶活/(IU/g)	相对酶活/%
10:0	5 816	70.5
9.5:0.5	6 104	74.0
9.0:1.0	6 665	80.8
8.5:1.5	7 375	89.4
8.0:2.0	7 606	92.2
7.5:2.5	8 249	100
7.0:3.0	7 853	95.2

2.1.2 加水比例对产酶的影响 适当的含水量可确保菌丝良好的生长和代谢产物的积累。由图1可知,液固质量比1.5:1对菌株产酶最有利。

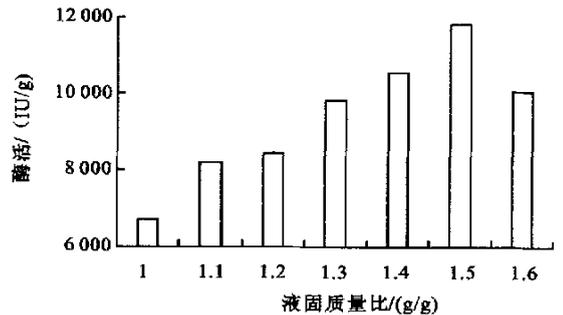


图1 液固质量比对产酶的影响

Fig.1 Effect of the ratio of water and draw medium on mannanase production

2.1.3 附加碳源对产酶的影响 在以麸皮为主要碳源的发酵培养基中,附加占干料质量分数1%的其它碳源取代其中的魔芋粉,对照则不添加附加碳源,结果见表2。从表中可见,除甘露糖、羧甲基纤维素外,大多数试验碳源对酶的产生有一定的促进作用,甘露聚糖类的角豆胶、瓜儿豆胶、魔芋粉诱导效果明显,魔芋粉效果最佳。这与杨文博^[5]、陈一平^[9]等报道的结果接近。另外空白对照有较高的酶活,推测是由于麸皮作为主要碳源本身含有甘露聚糖等半纤维素,对酶的产生有一定的促进作用。

表2 附加不同碳源对产酶的影响

Tab.2 Effect of other carbon sources on mannanase production

附加碳源	酶活/(IU/g)	相对酶活/%	附加碳源	酶活/(IU/g)	相对酶活/%
对照	8 798	72.5	可溶性淀粉	9 126	75.2
葡萄糖	9 162	75.5	果胶	9 696	79.9
甘露糖	8 213	71.8	黄原胶	8 871	73.1
半乳糖	9 308	76.7	角豆胶	10 837	89.3
乳糖	9 417	77.6	瓜儿豆胶	10 193	84.0
魔芋粉	12 135	100	羧甲基纤维素	8 240	67.9

2.1.4 魔芋粉用量对产酶的影响 前面试验表明,魔芋粉为β-甘露聚糖酶的诱导物,对酶的合成与分泌具有明显的促进作用。试验中在发酵基础培养基中分别添加占干料质量分数0~5%的魔芋粉,结果显示当魔芋粉的添加量为4%时,酶活达最高值16 475 IU/g。

2.1.5 附加氮源对产酶的影响 在前面实验得到的较优发酵培养基中,附加占干料质量分数1%的其它氮源以取代其中的硫酸铵,魔芋粉用量为4%,考察对产酶的影响。从表3可见,大多数附加氮源对产酶有促进作用,其中硫酸铵的效果最好。

表3 附加不同氮源对产酶的影响

Tab.3 Effect of other nitrogen sources on mannanase production

附加氮源	酶活/(IU/g)	相对酶活/%	附加氮源	酶活/(IU/g)	相对酶活/%
对照	14 359	86.6	尿素	13 862	83.6
(NH ₄) ₂ SO ₄	16 581	100	酵母膏	15 006	90.5
NaNO ₃	14 741	88.9	牛肉膏	14 210	85.7
NH ₄ NO ₃	16 365	98.7	蛋白胨	14 260	86.0
NH ₄ Cl	16 100	97.1			

2.1.6 硫酸铵用量对产酶的影响 前面试验表明,硫酸铵为黑曲霉LW-1产β-甘露聚糖酶的最佳氮源,为此试验中考察硫酸铵以0~3%的不同添加量(质量分数)对酶活产生的影响。结果显示,1%添加量最佳,酶活达最高值16 620 IU/g。

2.1.7 Plackett-Burman 实验 根据已有实验结果,选择发酵培养基中的魔芋粉质量分数、硫酸铵质量分数2个因素,及欲确定的6种添加物质量分数为PB实验的8个因素,每个因素取2个水平,高水平“+”为低水平“-”的1.25或1.3倍。以β-甘露聚糖酶活力Y(IU/g)为响应值,试验结果经SAS分析和整理后列入表4。

表4 Plackett-Burman 实验设计各因素、水平及影响效果

Tab.4 Experiment design and result of Plackett-Burman

因素	水平		T-test	Pr> T	可信度	重要性排序
	-	+				
X ₁	CaCl ₂ 质量分数/%	0.1 0.13	-1.228 74	0.306 765		4
X ₂	Tween-80 质量分数/%	0.3 0.4	0.545 113	0.623 589		7
X ₃	MgSO ₄ 质量分数/%	0.1 0.13	-1.208 28	0.313 494		5
X ₄	玉米浆质量分数/%	5 6.5	-4.529 25	0.020 136	>95%	2
X ₅	KH ₂ PO ₄ 质量分数/%	0.2 0.25	4.840 381	0.016 82	>95%	1
X ₆	(NH ₄) ₂ SO ₄ 质量分数/%	1 1.3	0.718 151	0.524 54		6
X ₇	FeSO ₄ 质量分数/%	0.01 0.013	0.006 393	0.995 3		8
X ₈	魔芋粉质量分数/%	3 4	2.506 497	0.087 206	>90%	3

由T-检验可知,魔芋粉、玉米浆和KH₂PO₄3个因素的可信度均大于90%,为重要因素。其中玉米浆低水平好,其它二因素高水平的好。

2.1.8 Box-Behnken 实验 以PB实验可信度大于90%的3个重要因素作为自变量,其它可信度较小的因素因对产酶无太大影响,维持在较低水平的质量分数,即CaCl₂ 0.1%、MgSO₄ 0.1%、(NH₄)₂SO₄ 1%。以Y(IU/g)为响应值,采用三因素三水平的Box-Behnken 响应面分析法进一步对培养基进行优化。其

因素水平选取见表5,方差分析见表6。

表5 响应面三因子水平

Tab.5 The three factors and levels in the Respond Surface Analysis

因素	水平			
	-1	0	1	
X ₁	魔芋粉质量分数/%	3	4	5
X ₂	KH ₂ PO ₄ 质量分数/%	0.2	0.3	0.4
X ₃	玉米浆质量分数/%	4	5	6

表 6 回归方程的方差分析表
Tab. 6 ANOVA of regression equation

方差来源	平方和	自由度	平均平方和	F 值	显著性
一次项	2 866 287.1	3	955 429.03	13.172 1	
二次项	33 866 227	3	11 288 742.33	155.632 7	*
交互项	997 569.55	3	332 523.18	4.584 3	
误差项	1 088 017	5	217 603.4		
总回归	35 106 285	14	2 507 591.79		

注: * 表示显著。

SAS 分析结果表明,回归方程 $R^2 = 96.90\%$,说明回归方程拟合程度良好。由方差分析得知,回归模型的 F -检验高度显著,因子 X_1 的一次项、 X_3 的二次项显著 [$F > f_{0.05}(9, 5)$], X_1 、 X_2 的二次项高度显著 [$F > f_{0.01}(9, 5)$], 而各交互项不显著。方差分

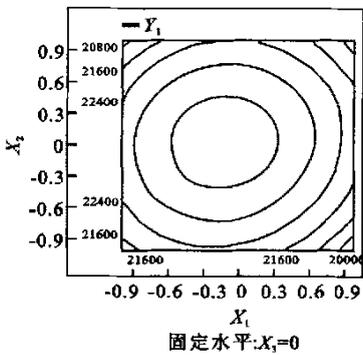


图 2 响应面分析图

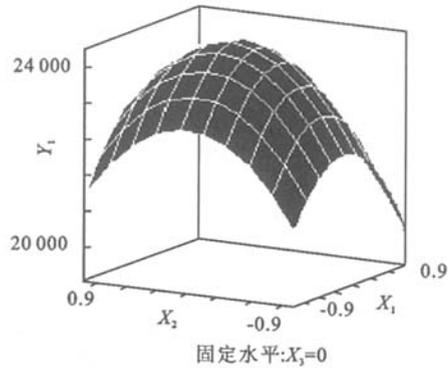
Fig. 2 Response surface plot

析还显示,魔芋粉的质量分数变化对产酶影响最显著。其响应面图见图 2。

运用 SAS 分析得如下回归方程:

$$Y = 24\ 386.67 - 477.875X_1 + 179.625X_2 - 312.5X_3 - 2\ 012.583X_1^2 + 355.5X_1X_2 + 334.25X_1X_3 - 2\ 104.083X_2^2 - 106.25X_2X_3 - 833.3333X_3^2$$

对二次回归方程求导,当 Y 取最大值时,得 $X_1 = -0.134$, $X_2 = 0.037$, $X_3 = -0.218$ 。即各物质的质量分数分别为魔芋粉 3.866%, KH_2PO_4 0.304%, 玉米浆 4.782%。此时理论最大产酶活性为 24 456 IU/g。为配制培养基方便,选择魔芋粉、 KH_2PO_4 、玉米浆的添加量(质量分数)分别为 4%、0.3%、5%。



2.2 发酵条件的优化

2.2.1 培养基起始 pH 对产酶的影响 将最优发酵培养基起始 pH 分别调为 4.0~8.0(自然 pH 为 6.0), 32 °C 发酵培养 84 h。结果显示,起始 pH 5.5~6.5 时酶活均占最高酶活的 95% 以上,且自然 pH 发酵效果最好。

2.2.2 培养温度对产酶的影响 将菌株分别于 26、29、32、35 °C 下培养,48 h 后每隔 12 h 取样测定酶活。图 3 表明,温度过低,菌体生长缓慢,发酵周期长,酶活力不高;培养温度达 35 °C 时,虽然开始时产酶速度较快,但菌丝体过早衰老,最终酶活力仍不高;因此最适培养温度为 32 °C。

2.2.3 发酵周期对产酶的影响 将菌株用最优培养基在 32 °C 培养,研究固体发酵的产酶进程曲线,结果见图 4。由图可知,在接种培养 12 h 时,培养基内仅出现少量白色菌丝,还原糖量达到最大值, pH 开始下降,酶活力很低;至 36 h,培养基内出现

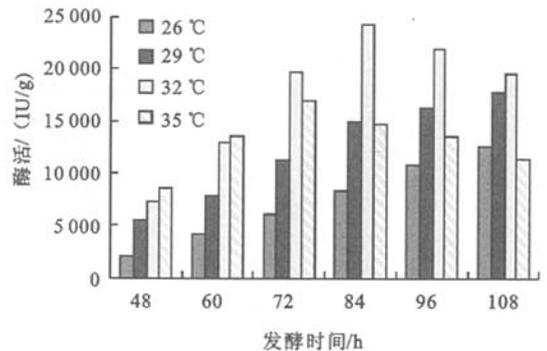


图 3 温度对产酶的影响

Fig. 3 Effect of temperature on mannanase production

大量菌丝及少量黑色孢子, pH 值降至最低点 (pH 3.52), 还原糖快速降低, 酶活出现增长趋势; 以后 pH 逐步回升, 还原糖维持在较低水平, 酶活快速增长, 至 84 h, 酶活力达到最大值 24 879 IU/g, 培养时间进一步延长, 酶活力逐渐下降。以酶活为指标, 培养时间 84 h 最佳。

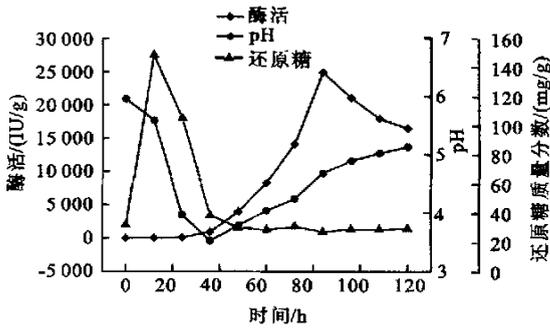


图4 产酶进程曲线

Fig. 4 Time course of mannanase production

3 结 语

影响微生物产酶主要有3个方面的因素:即微

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。为最有效地发挥黑曲霉 *Aspergillus niger* LW-1 菌株合成 β -甘露聚糖酶的潜力,在进行培养基优化时分别通过单因素试验、Plackett-Burman 实验和响应面分析法,获得了最佳的产酶培养基组成。

黑曲霉 *Aspergillus niger* LW-1 菌株的最佳产酶培养基组成和培养条件为:麸皮与豆饼粉质量比为 7.5 : 2.5 (g/g), 其它物质相对于固体物料的质量分数分别为魔芋粉 4%, KH_2PO_4 0.3%, 玉米浆 5%, CaCl_2 0.1%, MgSO_4 0.1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%, 液固质量比为 1.5 : 1, 自然 pH; 32 °C 静置培养 84 h。在该条件下,最高酶活可达 24 879 IU/g, 迄今为止是所有报道中酶活水平最高的。

参考文献 (References):

- [1] 陈建红,周海燕,曾分有,等. 魔芋葡甘低聚糖对小鼠抗氧化酶活性的影响[J]. 氨基酸和生物资源,2006,28(1):40-41.
CHEN Jian-hong, ZHOU Hai-yan, ZENG Fen-you, et al. Effects of konjac oligosaccharides on antioxidative enzymes in mice[J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2006,28(1):40-41. (in Chinese)
- [2] 齐军茹,廖劲松,彭志英. β -甘露聚糖酶的制备及其应用研究进展[J]. 中国食品添加剂,2002(6):12-15.
QI Jun-ru, LIAO Jin-song, PENG Zhi-ying. Preparation and application of β -mannanase[J]. *China Food Additives*, 2002(6):12-15. (in Chinese)
- [3] Pia A, Arthur V, Jo zsef M, et al. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: Purification and properties of a β -mannanase[J]. *Journal of Biotechnology*, 1998,63 (3):199-210.
- [4] 杨清香,曹军卫. 嗜碱细菌 NTT33 碱性 β -甘露聚糖酶的纯化与性质研究[J]. 武汉大学学报,1998,44(6):461-464.
YANG Qing-xiang, CAO Jun-wei. The purification and properties of alkaline-mannanase produced by alkalophilic *Bacillus* sp. NTT33[J]. *Journal of Wuhan University*, 1998,44(6):461-464. (in Chinese)
- [5] 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.
YANG Wen-bo, SHEN Qing, TONG Shu-min. The study on selection and fermentation condition of producing β -mannanase from *Bacillus licheni* formis[J]. *Microbiology*, 1995, 22 (3): 154-157. (in Chinese)
- [6] 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):60-67.
CUI Fu-mian, SHI Jia-ji, LU Zhuo-zhuang. Production of neutral beta-mannanase by *Bacillus subtilis* and its properties [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1999, 39(1): 60-67. (in Chinese)
- [7] Tamaru Y, Araki T, Amagai 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] 欧宏宇,贾士儒. SAS 软件在微生物培养条件优化中的应用[J]. 天津轻工业学院学报,2001,36(1):14-18.
OU Hong-yu, JIA Shi-ru. The application of SAS system in optimization of microbial culture conditions[J]. *Journal of Tianjin University of Light Industry*, 2001, 36(1): 14-18. (in Chinese)
- [9] 陈一平,龙健儿,廖连华,等. 芽孢杆菌 M50 产生 β -甘露聚糖酶的条件研究[J]. 微生物学报,2000,40(1):62-68.
CHEN Yi-ping, LONG Jian-er, LIAO Lian-hua, et al. Study on the production of β -mannanase by *Bacillus* M50[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000,40(1):62-68. (in Chinese)

(责任编辑:秦和平,李春丽)