

文章编号:1673-1689(2008)03-0064-04

## $\beta$ -甘露聚糖酶固态发酵的产业化生产技术

邬敏辰<sup>1</sup>, 徐春梅<sup>2</sup>, 李剑芳<sup>2</sup>

(1. 江南大学 医药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:**在黑曲霉 LW-1-9 菌株三角瓶固态发酵试验的基础上,经曲盘( $\Phi$  20.0 cm  $\times$  5.0 cm)固态发酵试验,放大到 30 m<sup>3</sup> 固态发酵罐( $\Phi$  4.5 m  $\times$  2.0 m)的产业化生产规模。固态发酵基料(其中:麸皮 700~800 kg,豆饼粉或菜籽饼粉 200~300 kg)总量为 1 000 kg/批次,料水质量比 1:1.8~2.0,自然 pH,并添加魔芋粉 3%~5%,玉米浆 3%~5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1%~1.5%, $\text{CaCl}_2$  0.05%~0.1%, $\text{MgSO}_4$  0.05%~0.1%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%~0.5%(质量分数,相对于基料);经灭菌、接种后,于 32~36 °C 间断通风培养 72~84 h,期间分别于第 20~24 小时和第 36~40 小时各翻曲 1 次,并同时补加无菌水 180~200 kg。在上述发酵工艺条件下,LW-1-9 菌株产业化生产  $\beta$ -甘露聚糖酶,活性可达每克干曲 26 725~29 218 IU。

**关键词:**  $\beta$ -甘露聚糖酶;黑曲霉 LW-1-9;固态发酵;产业化生产

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

## Industrial Production Technology of the $\beta$ -Mannanase with Solid-State Fermentation by *Aspergillus niger*

WU Min-chen<sup>1</sup>, XU Chun-mei<sup>2</sup>, LI Jian-fang<sup>2</sup>

(1. School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Based on the tests of solid-state fermentation by *Aspergillus niger* LW-1-9 strain with shake flask and koji tray, the industrial production of  $\beta$ -mannanase was carried out in 30 m<sup>3</sup> solid-state fermentor ( $\Phi$  4.5  $\times$  2.0 m). The amount of base material (wheat bran 700~800 kg, soybean or rapeseed cake flour 200~300 kg) was 1000 kg, the ratio of based material to waster was 1:1.8~2.0, natural pH, complemented with konjac powder 3~5%, corn steep liquor 3~5%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1~1.5%,  $\text{CaCl}_2$  0.05~1%,  $\text{MgSO}_4$  0.05~0.1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3~0.5% (related to based materials). The  $\beta$ -mannanase activity reached 26 725~29 218 IU/g dry koji at 32~36 °C for 72~84 h by adding water and turning koji at 20~24 h and 36~40 h.

**Key words:**  $\beta$ -mannanase; *Aspergillus niger*; solid-state fermentation; industrial production

近年来,随着饲料中甘露聚糖“抗营养因子”的消除<sup>[1]</sup>、功能性甘露低聚糖的酶法制备<sup>[2]</sup>、油井压裂

收稿日期:2007-06-20.

基金项目:国家自然科学基金项目(20776061).

作者简介:邬敏辰(1962-),男,江苏无锡人,副教授,理学博士。主要从事酶工程与基因工程研究。

Email:bioch@163.com

液的酶法破胶<sup>[3]</sup>、纸浆的生物漂白<sup>[4]</sup>,以及β-甘露聚糖酶在其它领域<sup>[5]</sup>的广泛应用,市场上对β-甘露聚糖酶的需求量在不断增大。但β-甘露聚糖酶在各行业中的应用程度与其重要性相比还相差甚远,主要原因在于微生物发酵酶活性过低,无产业化价值,勉强生产将导致酶的生产和应用成本过高。美国 ChemGen 公司开发的β-甘露聚糖酶产品 Hemicell,商品名是“和美酵素”,其售价高达60万元/t。因此,要打破国外公司对国内市场的价格垄断,实现β-甘露聚糖酶的大规模应用及拓展该酶的应用领域,关键在于提高发酵酶活性和降低生产成本。

针对目前β-甘露聚糖酶产业化生产过程中存在的问题,以提高发酵酶活性和降低生产成本为目的,在前期对产β-甘露聚糖酶菌株的诱变育种、三角瓶和曲盘固态发酵工艺条件等研究的基础上,采用麸皮、豆饼粉或菜籽饼粉等农副产品为发酵主原料(即固态发酵基料),并添加适量的魔芋粉、玉米浆、无机盐和自来水等,利用黑曲霉 LW-1-9 高产菌株、固态发酵罐(1 000 kg 基料/批次),实施了β-甘露聚糖酶的产业化生产,发酵酶活性达到每克干曲 26 725~29 218 IU,酶产品生产成本仅为 1.5 万元/t。

## 1 材料与方 法

### 1.1 生产菌株

黑曲霉(*Aspergillus niger*)LW-1-9 菌株,由江南大学医药学院分子生物学研究室选育。

### 1.2 原料和试剂

麸皮、豆饼粉、菜籽饼粉、玉米浆等:由无锡市恒盛生物技术有限公司提供;魔芋粉:购自成都百仕隆生物科技有限公司;角豆胶、甘露糖、3,5-二硝基水杨酸:购自 Sigma 公司;其余试剂均为国产分析纯。

### 1.3 斜面种子培养基

马铃薯 200 g/L,蔗糖 20 g/L,琼脂 18 g/L,自然 pH;121 ℃ 灭菌 20 min,放置斜面;冷却后接种黑曲霉 LW-1-9 菌株,于(32±0.5)℃ 培养 96 h。

### 1.4 麸曲种子制备

**1.4.1 一级麸曲种子** 500 mL 的三角瓶中加入麸皮 20 g,自来水 24 mL,自然 pH;121 ℃ 灭菌 40 min;冷却后接种斜面种子,于(32±0.5)℃ 培养 96 h,期间分别于第 24 小时和第 48 小时各翻曲 1 次。

**1.4.2 二级麸曲种子** 称取麸皮 3.0 kg,加自来水 3.6 kg,自然 pH;拌匀后,于 121 ℃ 灭菌 40 min,冷却后接种 1 只三角瓶麸曲种子,混匀,装入曲盘

(100 cm × 50 cm × 8 cm)中,置于(32±0.5)℃ 曲房中培养 96 h,期间分别于第 24 小时和第 44 小时各翻曲 1 次,同时于第 44 小时补加 360 mL 无菌水 1 次。

### 1.5 固态发酵培养基

**1.5.1 曲盘发酵培养基** 称取基料(麸皮质量:豆饼粉质量=7:3)150 g,料水质量比 1:1.8,自然 pH,并添加魔芋粉 4%,玉米浆 5%,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0%,CaCl<sub>2</sub> 0.08%,MgSO<sub>4</sub> 0.08%,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3%(质量分数,相对于基料)。

**1.5.2 产业化生产培养基** 称取基料(其中:麸皮 700~800 kg,豆饼粉或菜籽饼粉 200~300 kg)1 000 kg,自来水 1 800~2 000 kg,自然 pH,并添加魔芋粉 30~50 kg,玉米浆 30~50 kg,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10~15 kg,CaCl<sub>2</sub> 0.5~1.0 kg,MgSO<sub>4</sub> 0.5~1.0 kg,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3~5 kg。

### 1.6 酶活性测定

**1.6.1 粗酶液提取** 取 1~2 g 成熟麸曲,加入 10 倍体积的 0.1 mol/L HAc-NaAc 缓冲液(pH 4.8),充分捣碎,于 40 ℃ 浸提 30 min,采用滤纸过滤或离心,清液即为β-甘露聚糖酶粗酶液。

**1.6.2 酶活性测定** 取 0.1 mL 适当稀释的粗酶液,加到 2.4 mL 用 0.1 mol/L、pH 4.8 的 HAc-NaAc 缓冲液配制的 5.0 g/L 的角豆胶溶液中,50 ℃ 准确反应 10 min;采用 3,5-二硝基水杨酸显色法(DNS 法)<sup>[6]</sup>测定水解产生的还原糖。在上述反应条件下,以每 min 催化底物水解产生 1 μmol 还原糖(以甘露糖计)的酶量定义为 1 个β-甘露聚糖酶活性单位(IU)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 曲盘发酵工艺条件试验

**2.1.1 曲盘发酵条件** 将曲盘发酵培养基(见 1.5.1)分装于 3 只 500 mL 的三角瓶中,121 ℃ 灭菌 40 min,冷却后每瓶接入一级麸曲种子 1.0 g 左右,混匀,装入一个曲盘(Φ 20 cm × 5 cm)内;(32±0.5)℃ 培养 84 h,期间分别于第 24 小时和第 44 小时各翻曲 1 次,同时于第 44 小时补加 27 mL 无菌水 1 次。

**2.1.2 曲盘产酶进程曲线** 黑曲霉 LW-1-9 菌株(32±0.5)℃ 培养 24 h 后,每隔 12 h 取样,测定β-甘露聚糖酶活性和曲料水分(见图 1)。由图 1 可见:曲盘发酵 72 h 达到产酶高峰,酶活性达每克干曲 45 519 IU,随后缓慢下降;曲料水分在 24 h 以后下降较快,说明黑曲霉生长产热量高,水分蒸发快,

故需在曲盘发酵过程中(第44小时)补充一定的水分。

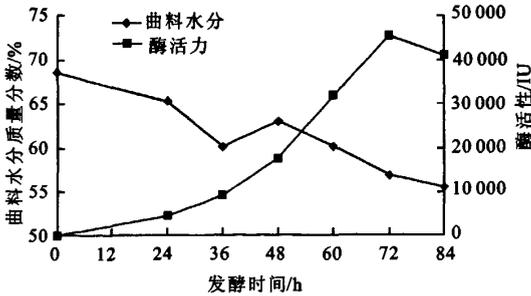


图1 LW-1-9菌株曲盘发酵产 $\beta$ -甘露聚糖酶的进程曲线

Fig. 1 Time course of  $\beta$ -mannanase fermentation by LW-1-9 strain with koji tray

## 2.2 产业化生产实例

本课题组设计的产业化生产 $30\text{ m}^3$ 固态发酵装备<sup>[7]</sup>,罐体直径4.5 m、高度2.0 m,实装1 000 kg基料/批次,发酵培养基堆积厚度30~35 cm;带有自动控温鼓风装置,机械进料、摊平、翻曲和出料装置,补水装置等。该设备具有生产效率高、产量大、发酵过程易控制和杂菌污染少等特点。以下是以麸皮、豆饼粉或菜籽饼粉等农副产品为发酵基料,并添加适量的魔芋粉、玉米浆、无机盐和自来水等,利用黑曲霉LW-1-9菌株、 $30\text{ m}^3$ 固态发酵罐(基料1 000 kg/批次),固态发酵产业化生产 $\beta$ -甘露聚糖酶的实例。

### 2.2.1 例1—— $32\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养

1) 固态发酵培养基:基料(麸皮质量:豆饼粉质量=8:2)1 000 kg,自来水1 800 kg,自然pH,添加魔芋粉40 kg、玉米浆50 kg、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  15 kg、 $\text{CaCl}_2$  1.0 kg、 $\text{MgSO}_4$  0.5 kg、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 kg。

2) 固态发酵条件:将上述发酵培养基加入 $6\text{ m}^3$ 高压蒸煮锅中,用直接蒸汽加热至 $121\text{ }^\circ\text{C}$ ,保温40 min,冷却至 $38\sim 40\text{ }^\circ\text{C}$ 后,接种1只曲盘的二级麸曲种子(用水制成菌悬液),混匀,转移至 $30\text{ m}^3$ 固态发酵罐内培养;采用自动间断通风将温度控制在 $(32\pm 0.5)\text{ }^\circ\text{C}$ ,恒温培养84 h。由于黑曲霉菌株在发酵过程中菌丝体相互缠绕、曲料板结,使通风散热受阻或短路,同时通风散热带走了大量的水分,影响了菌株的生长和产酶<sup>[7]</sup>。因此本产业化生产工艺,分别于第24小时和第40小时各机械翻曲1次,在翻曲的同时分别补加无菌水200 kg。

重复3批次的上述产业化生产试验,结果表明: $(32\pm 0.5)\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养84 h达到产酶高峰,成熟发酵曲料经 $45\sim 50\text{ }^\circ\text{C}$ 热风烘干(干曲含水量8%

左右), $\beta$ -甘露聚糖酶平均酶活性达到每克干曲26 725 IU。

### 2.2.2 例2—— $36\sim 32\text{ }^\circ\text{C}$ 变温培养

对于 $\beta$ -甘露聚糖酶固态发酵产业化生产,由于不可避免有杂菌污染,所以本例采用固态发酵温度前高后逐渐降低的变温控制模式,以达到缩短发酵周期和控制杂菌污染的目的。固态发酵培养基同例1。发酵培养基经灭菌、冷却、接种后,置于 $30\text{ m}^3$ 固态发酵罐内,温度控制情况如下:

1) 发酵前期(0~20小时):0~8小时将进风口和出风口全部关闭,温控仪设置在 $(36\pm 0.5)\text{ }^\circ\text{C}$ ;8~12小时开启进风口,将回风口开启2/3,出风口开启1/3;第12小时以后逐渐开大出风口至全部开启,相应地关小回风口至全部关闭,温度仍控制在 $(36\pm 0.5)\text{ }^\circ\text{C}$ 。

2) 发酵中期(20~56小时):发酵至第20小时,一边翻曲一边喷洒无菌水180 kg,同时将设定温度调低至 $(35\pm 0.5)\text{ }^\circ\text{C}$ ;第36小时再翻曲1次并补加无菌水200 kg,同时将设定温度调低至 $(34\pm 0.5)\text{ }^\circ\text{C}$ ;第36~56小时逐渐将发酵温度调低至 $(32\pm 0.5)\text{ }^\circ\text{C}$ 。

3) 发酵后期(56~72小时):将 $(32\pm 0.5)\text{ }^\circ\text{C}$ 一直保持到第72小时发酵结束。

重复3批次的上述产业化生产试验,结果表明:采用前高后低的变温控制模式,黑曲霉LW-1-9菌株培养72 h达到产酶高峰,成熟发酵曲料经 $45\sim 50\text{ }^\circ\text{C}$ 热风烘干(干曲含水量8%左右), $\beta$ -甘露聚糖酶平均酶活性达到每克干曲27 561 IU,比实例1缩短了发酵周期、提高了酶活性。

### 2.2.3 例3——改变麸皮与豆饼粉的质量比例

1) 固态发酵培养基:改变发酵基料中麸皮与豆饼粉质量比例及 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量,其余组分同例1。具体配方为:基料(麸皮质量:豆饼粉质量=7:3)1 000 kg,自来水1 800 kg,自然pH,并添加魔芋粉40 kg、玉米浆50 kg、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10 kg、 $\text{CaCl}_2$  1.0 kg、 $\text{MgSO}_4$  0.5 kg、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 kg。

2) 固态发酵条件:发酵培养基经灭菌、冷却、接种后,转移至 $30\text{ m}^3$ 固态发酵罐内,发酵条件同例2。

重复3批次的上述产业化生产试验,结果表明:采用改变了麸皮与豆饼粉质量比例及 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量的发酵培养基,黑曲霉LW-1-9菌株同样在第72小时达到产酶高峰, $\beta$ -甘露聚糖酶平均酶活性达到每克干曲29 218 IU,平均酶活性比实例2提高了6.01%。

### 2.2.4 例4——用菜籽饼粉替代豆饼粉

1) 固态发酵培养基:用菜籽饼粉替代豆饼粉,其余组分同例3。具体配方为:基料(麸皮质量:菜籽饼粉质量=7:3)1 000 kg,自来水1 800 kg,自然pH,添加魔芋粉40 kg、玉米浆50 kg、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10 kg、 $\text{CaCl}_2$  1.0 kg、 $\text{MgSO}_4$  0.5 kg、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 kg。

2) 固态发酵条件:同例2。

重复3批次的上述产业化生产试验,结果表明:采用菜籽饼粉替代豆饼粉的发酵培养基,黑曲霉LW-1-9菌株产β-甘露聚糖酶平均酶活性达到每克干曲28 832 IU,与例3接近。例3和例4试验结果表明,LW-1-9菌株固态发酵以豆饼粉或菜籽饼粉作为有机氮源,均能达到较好的产酶效果。

### 3 结 语

1) 曲盘固态发酵小结:基料150 g,料水质量比1:1.8;各组分质量分数:魔芋粉4%,玉米浆5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0%, $\text{CaCl}_2$  0.08%, $\text{MgSO}_4$  0.08%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%;自然pH;(32±0.5)℃培养72 h达到产酶高峰,β-甘露聚糖酶活性达每克干曲

45 519 IU。

2) 产业化生产小结:在上述产业化生产实例中,以例3产β-甘露聚糖酶活性最高,例4与例3的较接近。固态发酵培养基:基料(麸皮700 kg,豆饼粉或菜籽饼粉300 kg)1 000 kg,自来水1 800 kg,魔芋粉40 kg,玉米浆50 kg, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10 kg, $\text{CaCl}_2$  1.0 kg, $\text{MgSO}_4$  0.5 kg, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 kg,自然pH。固态发酵工艺:(1) 发酵前期(0—20小时):0—8小时将进风口和出风口全部关闭,温控仪设置在(36±0.5)℃;第8—12小时开启进风口,将回风口开启2/3,出风口开启1/3;第12小时后逐渐开大出风口至全部开启,相应地关小回风口至全部关闭,温度仍控制在(36±0.5)℃。(2) 发酵中期(20—56小时):第20小时翻曲1次并同时补加无菌水180 kg,将设定温度调低至(35±0.5)℃;第36小时再翻曲1次并同时补加无菌水200 kg,将温度调低至(34±0.5)℃;第36小时后逐渐将温度调低至(32±0.5)℃。(3) 发酵后期(56—72小时):将(32±0.5)℃一直保持到第72小时发酵结束。

### 参考文献(References):

- [1] Pettey L A, Carter S D, Senne B W, et al. Effect of beta-mannanase addition to corn-soybean meal diets on growth performance, carcass traits, and nutrient digestibility of weanling growing-finishing pigs[J]. *J Ani Sci*, 2002, 80(4): 1012—1019.
- [2] Jackson M E, Geronian K, Knox A, et al. A dose-response study with the feed enzyme beta-mannanase in broilers provided with corn-soybean meal based diets in the absence of antibiotic[J]. *Poultry Sci*, 2004, 83(12): 1992—1996.
- [3] 李希明, 陈勇, 谭云贤, 等. 生物破胶酶研究及应用[J]. *石油钻采工艺*, 2006, 28(2): 52—54.  
LI Xi-ming, CHENG Yong, TAN Yun-xian, et al. Study on biodegelationase and its application [J]. *Oil Drilling & Production Technology*, 2006, 28(2): 52—54. (in Chinese)
- [4] Clarke J H, Davidson K, Rixon J E, et al. A comparison of enzyme-aided of softwood paperpulp using combinations of xy-lanase, mannanase and Alpha-galactosidase[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 53(6): 661—667.
- [5] Hashimoto Y, Fukumoto J. Purification of mannanase from *Rhizopus niveus* and its action on coffee mannan[J]. *Nippon Nogekigaku Kaishi*, 1996, 43: 317—322.
- [6] 李剑芳, 邹敏辰, 夏文水. β-甘露聚糖酶高产菌株选育及产酶条件的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2005, 31(9): 9—13.  
LI Jian-fang, WU Min-chen, XIA Wen-shui. Study on breeding of β-mannanase high producing strains and enzyme fermentation conditions[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2005, 31(9): 9—13. (in Chinese)
- [7] 邹敏辰, 邹显章. 伺用复合酶固体发酵工业化生产[J]. *饲料工业*, 2003, 24(1): 5—8.  
WU Min-chen, WU Xian-zhang. Industrialized production of feed multienzyme by solid fermentation [J]. *Feed Industries*, 2003, 24(1): 5—8. (in Chinese)

(责任编辑:秦和平,李春丽)