

芽孢杆菌 WY45 产 α -甘露聚糖酶发酵条件的优化

柴萍萍 韦 云 江正强 李里特 日下部功

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要 为获得最佳产酶配方,同时获得高活力的 α -甘露聚糖酶,经碳源、氮源、碳氮质量比、初始 pH 和培养温度 5 个单因素发酵条件的优化,得到芽孢杆菌 WY45 发酵产 α -甘露聚糖酶的最适发酵培养条件:以 4 g/L 魔芋精粉为碳源,1.33 g/L 大豆蛋白胨为氮源,碳氮质量比为 4/1,初始 pH 5.5,50 °C 培养时间 96 h。此条件下, α -甘露聚糖酶活性最高可达 2 800 U/mL。

关键词 芽孢杆菌; α -甘露聚糖酶; 发酵; 魔芋粉

中图分类号 TQ 464.8; O 629

文章编号 1007-4333(2005)03-0077-04

文献标识码 A

Optimization of α -mannanase production by *Bacillus subtilis* WY45

Chai Pingping, Wei Yun, Jiang Zhengqiang, Li Lite, Kusakabe Isao

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

Abstract *Bacillus subtilis* WY45 for high activity of extracellular α -mannanase was isolated from soil samples. The fermentation conditions, including carbon source, nitrogen source, ratio of the two sources, cultivation temperature and pH value, were optimized in order to improve the activity and amount of the enzyme. The result showed that *Bacillus subtilis* WY45 grew best when cultured at 50 °C with the medium composed of 4% konjac powder as carbon source, 1.33% soya peptone as nitrogen source, and pH value 5.5. After 96 h culturing, the enzyme show the highest activity of 2 800 U/mL that is the highest value obtained up to now.

Key words *Bacillus subtilis*; α -mannanase; fermentation; konjac powder

半纤维素是自然界第二大植物多糖资源,而甘露聚糖作为半纤维素的第二大组分分布广泛,来源丰富^[1],在魔芋粉、槐豆胶、沙蒿胶、瓜儿豆胶等中都有不同种类的甘露聚糖存在。 α -甘露聚糖酶可以水解甘露聚糖、葡萄甘露聚糖、半乳甘露聚糖等中的(1,4)-D-甘露吡喃糖,主要产物为甘露低聚糖^[2]。甘露低聚糖为功能糖类,不能被人体胃肠道消化,但可作为肠道益生菌——双歧杆菌的碳源,促进其增殖且抑制有害菌生长,从而改善人体肠道功能;同时,甘露低聚糖还有防龋齿的作用^[3-5]。

对 α -甘露聚糖酶的研究始于 20 世纪 50 年代末 60 年代初,是研究甘露聚糖及其水解时发现的;70 年代对产甘露聚糖酶的研究着重于产酶菌株的筛选、酶的分离纯化和酶学性质,并将其作为工具酶用

于对天然多糖类物质糖链结构的分析;80 年代 α -甘露聚糖酶被作为微生物酶制剂开发,其研究开始向应用研究和产业化方向发展^[4-9]。对 α -甘露聚糖酶发酵的研究主要集中于黑曲霉菌(*Aspergillus*)和芽孢杆菌(*Bacillus*),而对芽孢杆菌的研究又多集中于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)和嗜碱芽孢杆菌(alkalophilic *Bacillus* sp.)。这 3 种芽孢杆菌中枯草芽孢杆菌的发酵产酶活性最高,但目前所见报道中其活性最大值也仅为 334.6 U/mL^[10]。由于 α -甘露聚糖酶活性水平普遍较低,限制了其在实际生产中的应用,为此,本研究对 1 株产较高活性 α -甘露聚糖酶的芽孢杆菌的发酵条件进行优化,以期得到最佳产酶配方,同时获得高活力的 α -甘露聚糖酶。

收稿日期:2004-12-20

基金项目:国家“十五”科技攻关计划项目(2004BA713C04-02)

作者简介:柴萍萍,硕士研究生;李里特,博士,教授,主要从事食品工程方面的研究,E-mail:llt@cau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

芽孢杆菌菌株 WY45 为本实验室从全国采集的 200 多份土壤样品中筛选得到的。发酵产酶培养基成分(质量浓度, g/L): 槐豆胶 15, 牛肉蛋白胨 8, 酵母提取物 4, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25。

1.2 主要试剂

槐豆胶(Sigma)、酵母提取物(Oxid)、牛肉蛋白胨(北京奥星公司)、魔芋精粉(四川魔芋粉厂)、魔芋普通粉(四川魔芋粉厂)、琼脂粉(北京奥星公司), 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 α -甘露聚糖酶活性与蛋白质含量的测定

α -甘露聚糖酶活性的测定参照 DNS 法^[11], 在 0.9 mL 质量浓度为 5 g/L 的槐豆胶底物(pH 6.5, 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液配制)中加入适当稀释的酶液 0.1 mL, 60 °C 水浴中反应 10 min, 用 DNS 试剂测定产生的还原糖量, 以 D-甘露糖作为标准。上述反应条件下, 每 min 产生相当于 1 μmol D-甘露糖的还原糖所需要的酶物质的量为 1 个酶活性单位, U。蛋白质含量的测定采用 Lowry 法^[12], 以牛血清蛋白为标准。

1.4 发酵产酶条件的优化

在 250 mL 三角瓶中装入 40 mL 发酵产酶培养基, 在 50 °C 恒温空气浴往复摇床上以 200 r/min 振荡培养。在此基础上进行以下不同试验。

1) 碳源的影响。a. 改变碳源(质量浓度 15 g/L)种类, 考察其对产酶的影响。碳源包括单糖和多糖(槐豆胶、魔芋精粉、魔芋普通粉、花芋粉、瓜儿豆胶、脱脂椰粉、沙蒿粉、可溶性淀粉、马铃薯淀粉、葡萄糖和甘露单糖)共 11 种。b. 最佳碳源确定后, 将其作为唯一碳源并改变其质量浓度(10 ~ 50 g/L, 5 g/L 为 1 个梯度, 共 9 个梯度), 考察碳源不同质量浓度对产酶的影响。

2) 氮源和碳氮质量比对产酶的影响。最佳碳源及其质量浓度确定后, 用不同有机或无机氮源作为唯一氮源, 质量浓度 10 g/L, 考察氮源对产酶的影响。选用干酪素、大豆蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉蛋白胨、酵母提取物、麦芽提取物、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 、 NH_4Cl 和尿素等 12 种氮源, 并调节所有培养基初始 pH 使之与对照发酵产酶培养基相同。

最佳氮源确定后, 改变氮源相对于碳源的添加

量, 考察碳氮质量比对产酶的影响。碳氮质量比分别为 1/1、2/1、3/1、4/1、5/1 和 6/1。

3) 培养基初始 pH 的影响。在优化碳、氮源的基础上, 以 0.1 mol/L 的柠檬酸或 NaOH 溶液将培养基初始 pH 分别调至 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0。

4) 培养温度的影响。在 1) ~ 3) 的基础上, 采用不同温度(30 ~ 55 °C)发酵培养菌株, 考察温度对产酶的影响。

2 试验结果

2.1 不同碳源对酶活性的影响

不同碳源对 WY45 所产 α -甘露聚糖酶活性的影响见表 1。可以看出, 魔芋精粉对其诱导产酶能力最强。以魔芋精粉为碳源的 WY45 所产 α -甘露聚糖酶活性达 1 156 U/mL, 比以槐豆胶为碳源的高 5 倍以上; 普通魔芋粉和花芋粉对 WY45 的诱导产酶效果也高于槐豆胶, 但其诱导该菌所产 α -甘露聚糖酶的最高酶活性与魔芋精粉诱导的相比要低 300 ~ 500 U/mL。槐豆胶和脱脂椰粉也可诱导该菌产酶, 但酶活性低于 500 U/mL。其他碳源基本没有诱导产酶作用, 甘露单糖对菌株的发酵产酶甚至起到了抑制作用。

表 1 不同碳源对 WY45 产 α -甘露聚糖酶活性的影响

Table 1 Effect of carbon sources on α -mannanase production

碳源	酶活性/ (U/mL)	碳源	酶活性/ (U/mL)
槐豆胶	204	瓜儿豆胶	48
魔芋精粉	1 156	沙蒿粉	32
魔芋普通粉	916	马铃薯淀粉	34
花芋粉	651	葡萄糖	33
脱脂椰粉	357	甘露单糖	34

注: 培养温度 50 °C, 培养时间 96 h; 下同。

培养基中魔芋精粉的添加量对 α -甘露聚糖酶活性有很大影响(图 1), 魔芋精粉质量浓度 40 g/L 时酶活性最高, 为 1 530 U/mL。

2.2 不同氮源和碳氮质量比对酶活性的影响

不同氮源对 WY45 产 α -甘露聚糖酶活性的影响很大(表 2), 有机氮源培养的菌株所产酶的活性均较高且稳定, 效果明显优于无机氮源; 其中大豆蛋白胨和牛肉蛋白胨又明显优于其他有机氮源, 且以大豆蛋白胨为氮源的菌株所产酶的活性较以牛肉蛋白胨为氮源的高约 150 U/mL。

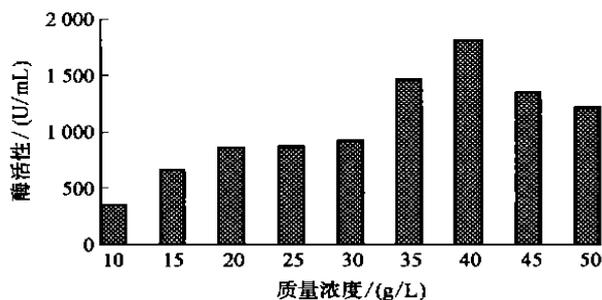


图 1 魔芋精粉质量浓度对 WY45 产 α -甘露聚糖酶活性的影响

Fig. 1 Effect of konjac powder concentration on α -mannanase production

表 2 不同氮源对 WY45 产 α -甘露聚糖酶活性的影响

Table 2 Effect of nitrogen sources on α -mannanase production

氮源	酶活性/(U/mL)	氮源	酶活性/(U/mL)
干酪素	1 211	(NH ₄) ₂ HPO ₄	76
大豆蛋白胨	2 345	NH ₄ H ₂ PO ₄	7
胰蛋白胨	1 034	(NH ₄) ₂ SO ₄	83
牛肉蛋白胨	2 188	KNO ₃	47
酵母提取物	1 511	NH ₄ Cl	257
麦芽提取物	16	尿素	78

碳氮质量比是影响发酵过程的重要因素。氮源添加量过高,会使菌体生长过于旺盛,不利于代谢产物的积累;而氮源不足,菌体繁殖量小,影响酶的产量。碳氮质量比优化结果见图 2,其 4/1 时最适于产酶。较大的碳氮质量比有利与菌株的快速生长和产酶,可使产酶时间提前 24 h 以上;但氮的质量浓度过高会抑制酶蛋白的产生。

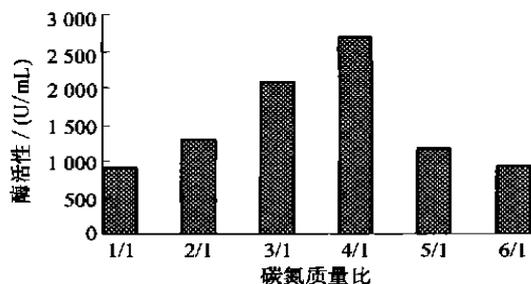


图 2 碳氮质量比对 WY45 产 α -甘露聚糖酶活性的影响

Fig. 2 Effect of the ratio of carbon source to nitrogen source on α -mannanase production

2.3 初始 pH 对酶活性的影响

培养基初始 pH 对 WY45 产 α -甘露聚糖酶活性的影响见图 3。可以看出,初始 pH 6.5 ~ 8.0 时抑

制了 WY45 所产 α -甘露聚糖酶的活性,而略偏酸性的初始 pH 较利于 WY45 产酶,其中 pH 5.5 时最佳;但发酵 48 h 后,发酵液的 pH 均自然趋向 5.0。

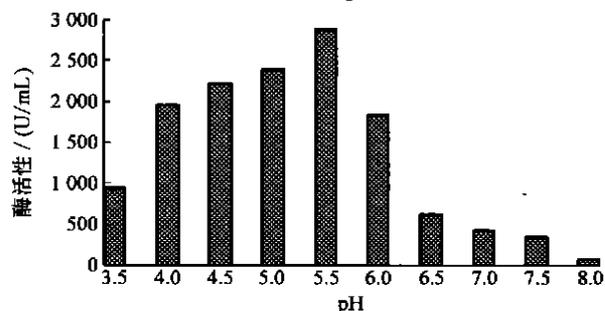


图 3 培养基初始 pH 对 WY45 产 α -甘露聚糖酶活性的影响

Fig. 3 Effect of primary pH on α -mannanase production

2.4 培养温度对酶活性的影响

培养温度对 WY45 产 α -甘露聚糖酶活性的影响见图 4。实验所选 6 种不同温度下该菌株均可产 α -甘露聚糖酶,但以 50 °C 时酶活性最高。可能是由于在从土壤稀释液中筛选该菌时的温度为 50 °C,所以靠近此温度时菌株产酶活性较高。

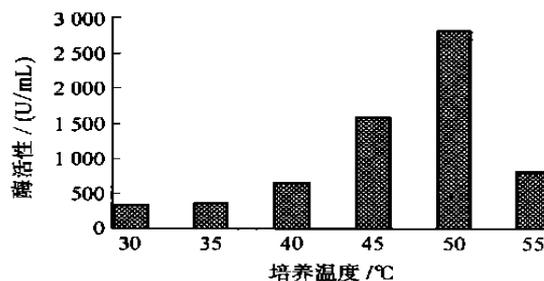


图 4 培养温度对 α -甘露聚糖酶活性的影响 (96 h)

Fig. 4 Effect of temperature on α -mannanase production (96 h)

2.5 产酶历程

以优化后得到的最佳发酵培养基培养 WY45,结果表明,96 h 内粗酶液蛋白质质量浓度和酶活性持续升高,并均在 96 h 时达到最大值 0.68 mg/mL 和 2 800 U/mL,保持平稳约 48 h 后逐渐下降(图 5)。

3 讨论

α -甘露聚糖酶属于诱导酶,在对有关嗜碱芽孢杆菌^[5,13]、地衣芽孢杆菌^[2]、黑曲霉菌^[7]等菌株发酵优化的研究报道中,都有魔芋粉为最优诱导产酶底物的结论,本实验结果与上述结论一致,可见魔芋

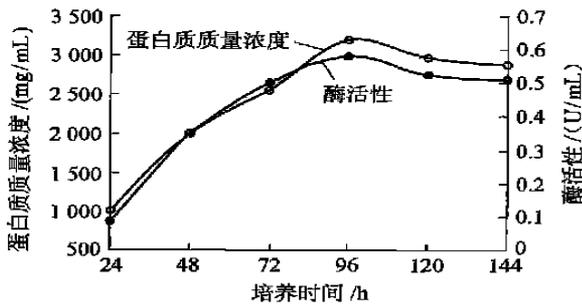


图5 产酶历程(50)

Fig. 5 Time course of α -mannanase production from WY45 (50)

精粉和魔芋普通粉是产 α -甘露聚糖酶菌株液体发酵中普遍最佳的碳源。本实验在取发酵液测酶活性的同时在显微镜下观察菌株生长情况,发现以魔芋精粉为碳源的发酵液中菌体密度最大,这说明其不仅是 α -甘露聚糖酶的极好的诱导物,同时也是菌株赖以生长的优良碳源。较高的碳源含量有利于菌株的生长,也使产酶稳定性增加;但含量过高时,培养基过于黏稠甚至成凝胶状,会导致供氧不足而抑制菌株的生长及产酶。

氮源是构成细胞原生质和酶蛋白的主要原料。在微生物生长过程中,含有有机氮源的培养基常表现菌株生长旺盛的特点,而无机氮源利用较快,可作为速效性氮源^[2]。菌体生产过程中,有机氮源的利用使培养基的pH有所升高,但并没有影响酶的合成和分泌;而无机氮源中的铵盐被分解利用后,培养基的pH下降,酶的合成分泌量明显下降。芽孢杆菌的发酵优化中,有机氮源几乎都优于无机氮源,但多数以牛肉蛋白胨和酵母膏为最优,尚未发现以大豆蛋白胨为最佳氮源的报道。本实验中大豆蛋白胨的培养产酶效果略高于牛肉蛋白胨,可能因为大豆蛋白胨中含有某些来自大豆的功能性成分促进了菌株的生长和产酶。

李剑芳^[7]等在黑曲霉合成 α -甘露聚糖酶的研究中提出7/1的碳氮质量比是最有利的,明显高于本实验的结论。本实验中WY45在碳氮质量比为6/1时酶活性已经大幅度下降,可见WY45需要更高的氮源添加比例才能维持较高的酶蛋白产量和酶活性水平。

环境的酸碱度对发酵的影响不仅在于改变基质代谢速率,有时甚至可以改变代谢途径及细胞机构^[8]。不同菌株的发酵最佳其初始pH相差较大,初始pH 7~8最利于地衣芽孢杆菌生长,而枯草芽

孢杆菌多在略偏酸性的初始pH下生长更为旺盛^[2,4,5,7,9]。

参 考 文 献

- [1] Akino T, Nakamura N, Horikoshi K. Production of α -mannosidase and α -mannanase by an alkalophilic *Bacillus* sp. [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1987, 26(4):323-327
- [2] 龙健儿,陈一平. α -甘露聚糖酶的研究现状[J]. *微生物学杂志*, 1998, 18:44-57
- [3] 杨文博,董树敏,沈庆,等. α -甘露聚糖酶酶解植物胶极其产物对双歧杆菌促生长作用[J]. *微生物学通报*, 1995, 22(4):204-207
- [4] Charrier M, Rouland C. Mannan-degrading enzymes purified from the brown garden snail *Helix aspersa* Muller [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2001, 290:125-135
- [5] 杨清香,曹军卫. 嗜碱细菌 NTT33 碱性 α -甘露聚糖酶的纯化与性质研究[J]. *武汉大学学报*, 1998, 44(6):761-764
- [6] Takahashi R, Mizumoto K, Takano T, et al. Production of oligosaccharides from hemicellulose of woody biomass by enzymatic hydrolysis I a simple method for isolating α -D-mannanase-producing microorganisms [J]. *Mokuzai Gakkaishi*, 1992, 38(12):1126-1135
- [7] 李剑芳,王斌林,郭敏辰. 黑曲霉酸性 α -甘露聚糖酶的发酵工艺[J]. *食品与发酵工业*, 2002, 28(9):19-22
- [8] Takahashi R, Kusakabe I, Maekawa A. Studies on mannanase of *Actinomyces* [J]. *Tropic Agricultural*, 1983, 27(3):140-148
- [9] Kurakake M, Komaki T. Production of α -mannanase and α -mannosidase from *Aspergillus awamori* K4 and their properties[J]. *Current Microbiology*, 2001, 2:377-380
- [10] Waite M, Ingvorsen K. Production of halostable α -mannanase and α -mannosidase by strain NN, a new extremely halotolerant bacterium[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1999, 52:675-680
- [11] Bailey M J, Beily P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylannase activity[J]. *Journal of Biotechnology*, 1992, 23:257-270
- [12] Gray L, Peterson. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall[J]. *Analytical Biochemistry*, 1979, 100:201-220
- [13] 熊邻,干信. 甘露聚糖酶产生菌 R10 发酵条件研究[J]. *湖北工学院学报*, 2004, 19(1):17-20