

枯草芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶补料发酵及其特性研究

余红英^{1*} 杨幼慧^{1**} 杨跃生² 吴序栋¹ 雷红涛¹ 杨金易¹

(华南农业大学食品学院 广州 510642)¹ (华南农业大学生命科学学院 广州 510642)²

摘要: 采用正交实验设计对枯草芽孢杆菌产 β -甘露聚糖酶的培养基组成和培养条件进行优化,在此基础上进行摇瓶补料发酵,酶活达 223.47 U/mL,较未补料的酶活提高了 32.90%。酶反应的最适 pH 为 6.5,最适温度为 70℃;该酶在 pH 5.0~10.0 和 70℃ 以下稳定。水解魔芋胶产物主要为二糖以上低聚糖。

关键词: 枯草芽孢杆菌, β -甘露聚糖酶, 摇瓶补料, 特性, 酶解

中图分类号: Q556.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0025-05

STUDIES ON FED-BATCH FERMENTATION AND CHARACTERISTICS OF β -MANNANASE FROM *BACILLUS SUBTILIS*

YU Hong-Ying¹ YANG You-Hui¹ YANG Yue-Sheng² WU Xu-Li¹ LEI Hong-Tao¹ YANG Jin-Yi¹

(¹ Colle. of Food Sci., ² Biotech Colle. South China Agri. Univ., Guangzhou 510642)

Abstract: The optimal fermentation conditions of β -mannanase [EC 3.2.1.78] from *Bacillus subtilis* was achieved by orthogonal experiment. The enzyme activity in fed-batch fermentation was 223.47 U/mL, which was 32.90% higher than

* 现工作单位: 广东工业大学

** 联系人

收稿日期: 2001-05-25, 修回日期: 2001-08-19

that in batch fermentation. The optimal pH and temperature for enzyme action were 6.5 and 70°C respectively. The enzyme was stable between pH 5.0 ~ 10.0 and below 70°C. The products of enzymatic hydrolysis of konjac gum was oligosaccharides.

Key words: β -Mannanase, *Bacillus subtilis*, Fed-batch, Characterization, Enzymatic hydrolysis

β -甘露聚糖酶 (endo-1, 4- β -mannanase, EC 3.2.1.78) 能作用甘露聚糖、葡萄甘露聚糖、半乳甘露聚糖和半乳葡萄甘露聚糖, 形成低聚糖。这些低聚糖具有低热、稳定、安全、无毒等良好特性, 是人体肠道内有益菌群——双歧杆菌的促生长因子, 对调节肠道菌群结构, 增强人体免疫力有特殊功能, 已成为食品生物技术领域研究的新热点之一。魔芋是唯一大量含葡甘聚糖的作物, 其葡甘聚糖是由 1:1.6 的 D-葡萄糖和 D-甘露糖残基以 β -1, 4-糖苷键连接的高分子多糖。以 β -甘露聚糖酶酶法制备功能性魔芋低聚糖, 对于促进魔芋深度开发利用有重要意义。目前 β -甘露聚糖酶的研究主要集中在产酶菌种的筛选以及酶的分离纯化等方面^[1-4], 在工业应用上仍缺少高质量的酶源。作者在酶法制备魔芋低聚糖中发现枯草芽孢杆菌 SA-22 的 β -甘露聚糖酶具有活性高、作用迅速等特点, 故对其发酵产酶条件及其酶学性质进行进一步的研究, 为魔芋低聚糖的开发奠定良好基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) SA-22。

1.2 种子培养基

魔芋胶 20g, 酵母膏 5g, K_2HPO_4 5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, pH 6.5, 加水至 1L。灭菌后接斜面菌种 1 环, 25°C 摇床培养 (170r/min) 28h。

1.3 发酵培养基

培养基组成: 魔芋胶 20g, 酵母膏 5g, $NaNO_3$ 5g, K_2HPO_4 5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, 加水至 1L。培养条件为 pH 6.5, 250 mL 三角瓶装 30mL 培养液, 接种量 0.6mL/30mL, 25°C 摇床培养 (170 r/min) 24h。菌液于 8,000r/min 离心 10min, 上清液即为粗酶液。

1.4 β -甘露聚糖酶活力测定

参照 Akino 等的^[5]方法, 取 0.9mL 0.5% 槐豆胶 (Sigma) (pH 6.5, 0.05mol/L PBS 配制) 于比色管中, 加入适当稀释酶液 0.1mL, 70°C 水浴反应 10min, 采用 DNS 法测定水解产生的还原糖。在上述反应条件下, 每分钟产生 1 μ mol 相当于 D-甘露糖的还原糖所需酶量为一个活力单位。

1.5 菌体生长测定

发酵液经 0.8% NaCl 溶液稀释后, 于 721 型分光光度计 660 nm 处测吸光值, 以未接种的培养基等量稀释作空白对照。

1.6 摇瓶补料实验

在优化培养基组成和初始优化发酵条件基础上, 运用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计进行补料量、补料时间和发酵时间的优化。

1.7 魔芋胶酶解产物的纸层析

魔芋胶经粗酶液酶解后, 常压浓缩, 产物用新华 1 号滤纸展层, 以正丁醇: 吡啶:

水 = 6: 4: 3 展层 3 次, 苯胺-二苯胺 85℃ 显色 15min。

1.8 魔芋胶酶解产物的 HPLC 分析

采用 Waters 600 高压液相色谱仪, Sugar-Park 柱, 水作流动相, 流速为 0.7 mL/min, 检测器 RI, 柱温 90℃。

2 结果与分析

2.1 培养条件试验

2.1.1 培养基组分的优化: 碳源和氮源筛选试验表明, 以魔芋胶为碳源, 产酶量最高; 单一氮源以酵母膏的产酶量最高; 以有机氮和无机氮复配时, 酵母膏和 NaNO_3 复配产酶量最高, 因而试验中固定酵母膏用量为 5g/L, 以魔芋胶、 NaNO_3 、 K_2HPO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为因素, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 结果见表 1。

通过极差 (R) 分析, 对酶活影响最大的因素为魔芋胶, 然后依次

为 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NaNO_3 和 K_2HPO_4 。魔芋胶在低浓度时增加胶浓度, 产酶量可显著提高, 但高浓度 (40g/L) 的魔芋胶对酶的诱导可能造成阻遏作用, 不利提高菌体的产酶量。

2.1.2 发酵条件的优化: 以发酵培养基优化后的各因素的最优水平为发酵产酶培养基组成, 即魔芋胶 20g/L、 NaNO_3 5g/L、 K_2HPO_4 5g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/L, 进行发酵条件的优化试验。结果见表 2。

结果表明对产酶影响最大的因素是装液量。装液量越大, 产酶量越低。当装液量为 70mL 时, 产酶量最低, 说明一定条件下通气量大有利于产酶。这与该酶为诱导酶, 氧气显著影响诱导效果^[6] 的结论

是一致的。接种量也会影响菌种的生长, 接种量太大, 菌体生长受抑制, 进而影响菌体的产酶量。根据各因素产酶趋势预测, 当种龄为 28h, 接种量为 2%, 装液量为 30mL 时, 产酶量最大。经实际验证, 此条件下酶活可达 168.15U/mL。

2.2 摇瓶补料发酵

由于 β -甘露聚糖酶属诱导酶, 而高浓度底物对产酶不利, 因而设计了在摇瓶条件下补加魔芋胶

表 1 培养基组分优化结果 (g/L)

序号	魔芋胶	NaNO_3	K_2HPO_4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	酶活 (U/mL)
1	5	2	1	0.2	63.49
2	5	5	3	0.4	68.35
3	5	10	5	0.6	67.07
4	20	2	3	0.6	89.88
5	20	5	5	0.2	143.93
6	20	10	1	0.4	120.34
7	40	2	5	0.4	113.15
8	40	5	1	0.6	108.82
9	40	10	3	0.2	121.73
k_1	66.30	88.84	97.55	109.72	
k_2	118.05	107.03	93.32	100.61	
k_3	114.57	103.05	108.05	88.59	
R	51.75	18.19	14.73	21.13	

表 2 发酵条件的优化

序号	种龄 (h)	接种量 (%)	装液量 (mL)	酶活 (U/mL)
1	24	2	30	158.22
2	24	6	50	85.66
3	24	10	70	33.78
4	28	2	70	40.67
5	28	6	30	150.69
6	28	10	50	105.44
7	32	2	50	109.84
8	32	6	70	38.44
9	32	10	30	146
k_1	92.55	102.91	151.64	
k_2	98.93	91.60	100.31	
k_3	98.09	95.07	37.63	
R	6.38	11.31	114.01	

对产酶影响的试验。以补料量、补料时间和发酵时间为因素，进行 $L_9(3^4)$ 正交实验。结果见表 3。

表 3 补料发酵对产酶的影响

序号	补料量 (魔芋胶%)	补料时间 (h)	发酵时间 (h)	酶活 (U/mL)
1	0.5	8	30	185.80
2	0.5	12	36	203.16
3	0.5	16	42	193.33
4	1.0	8	42	195.95
5	1.0	12	30	181.54
6	1.0	16	36	192.35
7	2.0	8	36	223.47
8	2.0	12	42	212.98
9	2.0	16	30	197.59
k_1	194.10	201.74	188.31	
k_2	189.95	199.23	206.33	
k_3	211.35	194.42	200.75	
R	21.40	7.32	18.02	

36h，结果二者之间未见明显差异。从该菌种产酶进程曲线分析（图 1），在其对数生长期补料较适宜。

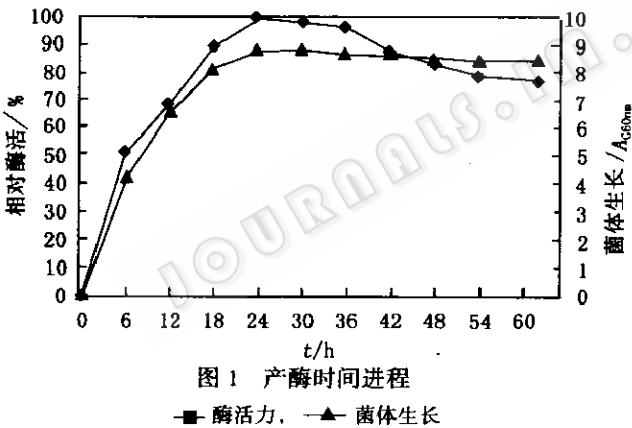


图 1 产酶时间进程

■ 酶活力, ▲ 菌体生长

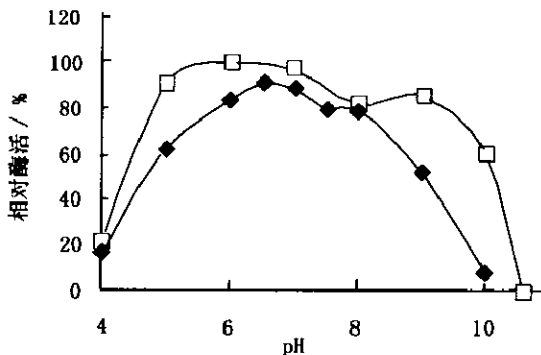


图 2 pH 对酶活力和稳定性的影响

■ 酶活力, □ 酶稳定性

结果表明，摇瓶补料发酵中影响最大的因素是补料量，其次为发酵时间。根据各因素对产酶量影响的趋势预测，当补料量为 2%，补料时间为 8h，发酵 36h 时，产酶量可达 223.47U/mL，比未补料的酶活提高了 32.90%。试验同时还探讨了补料方式对酶活的影响，2% 的魔芋胶分两次补加，分别于接种后 6h 和 10h 加入，同样发酵

2.3 粗酶的特性

2.3.1 pH 对酶活力和酶稳定性的影响：以不同 pH 的缓冲液（pH4.0 ~ 5.0, 0.05mol/L HAc-NaAc；pH6 ~ 8.0, 0.05mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ，pH9 ~ 10.6, 0.05mol/L Gly-NaOH）代替酶活力测定中的 pH，相同条件下进行酶反应，结果（图 2）表明，该酶反应的最适 pH 为 6.5。酶 pH 稳定性测定是将酶液与上述 pH

缓冲液混合，并以同一缓冲液配制底物，30℃保温 2h 后测定残余酶活力，结果表明酶在 pH5.0 ~ 10.0 范围相对稳定。

2.3.2 温度对酶活力和酶稳定性的影响：分别在 30℃ ~ 80℃ 下进行酶活测定，结果（图 3）表明酶反应的最适温度为 70℃。将用 pH6.5、0.05mol/L 的磷酸缓冲液稀释的粗酶液，于不同温度下保温 30min 后测定酶活力，结果表明该酶在 30℃ ~ 70℃ 热稳定性较好。

2.3.3 金属离子对酶活力的影响：在金属离子（1.0mmol/L）存在下测定酶活力，结果（表 4）

表4 金属离子对酶活力的影响

金属离子	相对酶活(%)	金属离子	相对酶活(%)
对照	100		
Fe ²⁺	115.15	Pb ²⁺	84.85
Mg ²⁺	139.39	Cu ²⁺	78.79
Zn ²⁺	124.24	Mn ²⁺	60.61
Ba ²⁺	133.33	Al ³⁺	77.39
Co ²⁺	130.30	Hg ²⁺	0
Ca ²⁺	131.33	Ag ⁺	38.60
Na ⁺	103.49	Fe ³⁺	3.03

表明Fe²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Ba²⁺、Co²⁺、Ca²⁺对该酶有一定的激活作用; Pb²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺、Al³⁺对该酶有一定抑制作用; Hg²⁺、Ag⁺、Fe³⁺强烈抑制酶的活力。

2.3.4 魔芋胶酶解产物(EK)检测:魔芋胶酶解产物(EK)纸层析图谱(图4)中,葡萄糖、甘露糖两种单糖层析带不明显,低聚糖层析带颜色很深。HPLC进一步分析表明,EK中以二糖以上低聚糖为主,单糖含量仅为0.15%。

3 讨论

与同类枯草芽孢杆菌菌种比较,该菌种产β-甘露聚糖酶,具有产酶周期短,比活力高特点。发酵24h的粗酶液,比活可达到1140.84U/mg。该菌种是目前发现粗酶比活最高菌种。通过该菌种所产粗酶的酶学特性可知,该酶反应的最适温度为70℃,与碱性枯草芽孢杆菌^[7]相似,酶反应的最适pH为6.5,在pH5.0~10.0和70℃以下稳定,较同类菌种BM 9602^[8]的热稳定性好。本文报道的β-甘露聚糖酶作用魔芋葡甘聚糖后经纸层析和HPLC检测,主要产物为二糖以上低聚糖,单糖含量极低,该酶有望应用于甘露低聚糖的制备。

有关β-甘露聚糖酶补料发酵的研究尚未见报道。补料发酵可以使发酵液维持较低的魔芋胶浓度,解除高浓度底物的阻遏效应。而补料发酵需要确定补料时间、补料量、发酵时间等因素,作者在预备实验的基础上确定各因素不同水平,最终以补料量2%,补料时间8h,发酵36h,使酶活达到223.47U/mL,与未加料相比,酶活提高了32.90%。可见,摇瓶补料可有效提高β-甘露聚糖酶的产酶量。有关放大试验有待进一步研究。

参考文献

- [1] Kurakake M, Komaki T. *Curr Microbiol*, 2001, 42 (6): 377~380.
- [2] Banik M, Bourgault R, Benley J D, *et al.* *J Exp Bot*, 2001, 52 (354): 105~111.
- [3] Zakaria M M, Ashiuchi M, Yamamoto S, *et al.* *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 623 (4): 655~660.
- [4] 杨幼慧, A. A. McKay. *华南农业大学学报*, 2001, 22 (2): 86~88.
- [5] Akino T, Nakamura N, Horikoshi K, *et al.* *Agric Biol Chem*, 1988, 52 (3): 773~779.
- [6] 朱雨生, 谭 常. *植物生理学报*, 1978, 4 (1): 1~17.
- [7] 田新玉, 徐 毅, 马延和, 等. *微生物学报*, 1993, 33 (3): 115~121.
- [8] 李文玉, 董志扬, 崔福绵. *微生物学报*, 2000, 40 (4): 420~424.

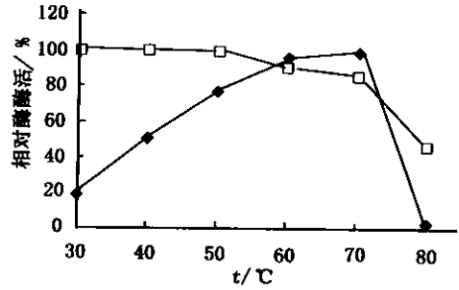


图3 温度对酶活力和稳定性的影响

■-酶活力, □-酶稳定性

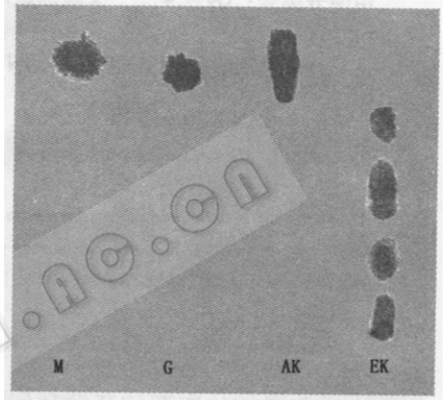


图4 魔芋胶酶解液的纸层析

M 甘露糖, G 葡萄糖, AK 魔芋胶酶解产物, EK 魔芋胶酶解产物