

枯草芽孢杆菌产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的响应面优化

唐艳斌¹ 闫巧娟² 江正强^{1*} 杨绍青¹ 杜雪丹²

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院 北京 100083)

(2. 中国农业大学 工学院 北京 100083)

摘要: 【目的】采用响应面法(RSM)优化枯草芽孢杆菌 5 L 发酵罐产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的发酵条件。【方法】利用 Box-Behnken 设计和方差分析。【结果】获得最佳发酵条件为: 转速、通气量和培养基 pH 分别为 500 r/min、1.05 vvm 和 5.08, 发酵时间仅为 22 h 产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶活力达 2 294.4 U/mL。【结论】实验结果表明响应面法优化 5 L 发酵罐发酵产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的条件合理可行。

关键词: 发酵, β -1,3-1,4-葡聚糖酶, 响应面优化, 枯草芽孢杆菌

Optimization of fermentation conditions for β -1,3-1,4-gluconase production by the thermophilic *Bacillus subtilis* D-6 using the response surface methodology

TANG Yan-Bin¹ YAN Qiao-Juan² JIANG Zheng-Qiang^{1*}

YANG Shao-Qing¹ DU Xue-Dan²

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

(2. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] [Methods] The fermentation parameters on the β -1,3-1,4-gluconase production by *Bacillus subtilis* D-6 in a batch fermentor (5 L) were optimized by statistical

analysis using response surface methodology (RSM) based on Box-Behnken design (BBD) analysis of variance (ANOVA). **[Results]** The results showed that under the optimized conditions, with agitation, aeration, and pH at 500 r/min, 1.05 vvm and 5.08, respectively, the highest β -1,3-1,4-glucanase activity of 2 294.4 U/mL was obtained after 22 h of cultivation. **[Conclusion]** This study proved that RSM could efficiently be applied for modeling of β -1,3-1,4-glucanase production in submerged fermentation.

Keywords: Fermentation, β -1,3-1,4-Glucanase, Response surface methodology, *Bacillus subtilis*

β -1,3-1,4-葡聚糖, 主要存在于谷物胚乳的细胞壁中, 是由葡萄糖通过 β -1,3 和 β -1,4 混合糖苷键连接起来^[1-2]。 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(EC3.2.1.73) 是一类重要的水解酶, 它对水解谷物中的 β -葡聚糖具有重要的作用, 在啤酒工业和饲料工业中具有重要的应用价值。在啤酒生产中, 可解决因大麦中 β -葡聚糖引起的麦汁粘度大和啤酒过滤速度慢的问题^[3]。在饲料工业中, 添加该酶可消除因谷物中 β -葡聚糖含量高引起动物消化道内食糜粘度的增加, 从而提高饲料利用率, 促进动物生长^[4]。

β -1,3-1,4-葡聚糖酶主要来源于植物或微生物^[5-9], 其中利用微生物发酵产酶多以芽孢杆菌为出发菌株获得^[3,8-13], 且细菌酶具有酶系单一、特异性强、发酵周期短、芽孢杆菌产酶安全等优点^[10], 可应用于食品工业。国内郝秋娟等^[7]和白晓娟等^[12]以芽孢杆菌为出发菌株, 利用 5 L 发酵罐和摇瓶发酵, β -葡聚糖酶活力可达 185.52 U/mL 和 32.12 U/mL; 国际上研究芽孢杆菌产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶发酵条件优化的报道较少。Tang 等^[9]对枯草芽孢杆菌 ZJF-1A5 的发酵条件进行响应面优化后, 酶活力可达 251 U/mL。因此, 由于目前其产酶水平较低, 生产成本高。

产酶条件的优化是提高微生物源酶活力的重要方式, 响应面法(Response surface methodology, RSM)是一种统计技术的合称^[10], 该方法已经成功应用于生物技术的许多方面。但利用其方法优

化产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶产酶发酵条件的研究报道还比较少^[9-10]。

本实验室前期从自然界筛选得到一株枯草芽孢杆菌 D-6, 首先对该菌摇瓶液体发酵产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶条件进行了研究。在此研究工作的基础上, 进一步采用 5 L 发酵罐, 利用 RSM 中 Box-Behnken 设计, 进行发酵放大优化研究, 为该酶的进一步工业化生产提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

5JG-9000 发酵罐, 上海保兴生物设备工程有限公司; TU 1800PC 紫外分光光度计, 北京普析通用仪器设备有限公司; LRH 恒温恒湿培养箱, 广东省医疗器械厂; Power Pac Basic TM 型电泳仪, Bio-Rad 公司; GL-20B 高速冷冻离心机, 上海安亭科技仪器厂。

大麦葡聚糖、葡萄糖购于 Sigma 公司; 低分子量标准蛋白样品购于 TaKaRa 公司; 其它试剂均为分析纯。

1.2 菌种、培养基及培养条件

枯草芽孢杆菌 D-6 由中国农业大学食品科学与营养工程学酶工程研究室保存。

种子培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母膏提取物 5.0, NaCl 10.0。1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

发酵培养基(g/L): 燕麦粉 20.0, 大豆蛋白胨 10.0, KH₂PO₄ 5.0, MgSO₄·7H₂O 0.3 和 CaCl₂ 0.3。

1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

种子液的培养: 从平板培养基挑取单菌落接入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 50°C 、200 r/min 振荡培养 16 h, 培养液即为种子液。

发酵罐培养: 在 5 L 发酵罐中加入 3 L 发酵培养基, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 冷却后加入接种量为 1% 种子液(30 mL)发酵 24 h。于 50°C 下, 考察其发酵产酶历程(测定其酶活力和溶氧量)。

1.3 酶活力、SDS-PAGE 以及酶谱分析

酶活力测定: 采用 DNS 法测定 β -1,3-1,4-葡聚糖酶酶活力^[6]。0.1 mL 适当稀释的酶液(空白对照则将其酶液灭活, 即将酶液在沸水中煮沸 10 min, DNS 法检测无颜色变化), 加入到 0.9 mL 0.5% 的大麦葡聚糖底物溶液中(用 50 mmol/L、pH 6.0 的柠檬酸缓冲液配制), 60°C 水浴反应 10 min 后加入 1 mL DNS 试剂, 煮沸终止反应并显色, 测定所释放的葡萄糖量。 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的活力单位定义为: 在上述反应条件下, 每分钟生成 1 μmol 葡萄糖所需要的酶量。

SDS-PAGE 参照 Laemmli 的方法进行^[4]。分离胶为 12.5%, 浓缩胶为 4.5%, 考马斯亮蓝 R250 染色。

酶谱分析方法参照 Tang 等的方法^[6]。 β -1,3-1,4-葡聚糖酶酶谱分析为正常的 SDS-PAGE 后(电泳胶中含有 0.2% 的大麦葡聚糖), 将电泳胶取出用 25% 的异丙醇溶液浸泡 3 次(10 min/次)使蛋白复性, 然后用缓冲液浸泡 3 次(10 min/次)洗去异丙醇溶液, 最后将电泳胶置于 50°C 保温 30 min, 加入 0.5 g/L 的刚果红溶液染色 30 min, 用 1 mol/L 的 NaCl 溶液脱色直至显现透明带。淀粉酶酶谱分析与 β -1,3-1,4-葡聚糖酶相似, 只是将 β -1,3-1,4-葡聚糖底物更换为玉米淀粉, 染色液更换为稀碘液染色 20 min, 去离子水冲洗直至出现亮带。

1.4 发酵罐响应面试验设计

采用 BBD 模型, 以转速(X_1)、通气量(X_2)和 pH (X_3)为自变量, 因子编码及水平见表 1, 以酶活力 Y 为响应值, 由最小二乘法拟合的方程为:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_{ii} + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

其中 β_0 为常数项, β_i 为线性系数, β_{ij} 为交互项系数, ε 为随机误差。根据此二次回归方程, 在一定水平范围内求取最佳值。

表 1 试验因素水平及编码
Table 1 Process variables and their levels for BBD experiments

自变量 Independent variables	因子 Symbol	水平 Coded levels		
		-1	0	1
Speed (r/min)	X_1	300	400	500
Ventilation (vvm)	X_2	0.5	1.0	1.5
pH	X_3	4	5	6

2 结果与讨论

2.1 摇瓶发酵产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶

通过对碳源、氮源、初始 pH 值等优化, 在最佳发酵培养条件下培养 72 h, 枯草芽孢杆菌 D-6 发酵产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的最高酶活力可达 2 800 U/mL。产酶历程如图 1 所示。与大多数芽

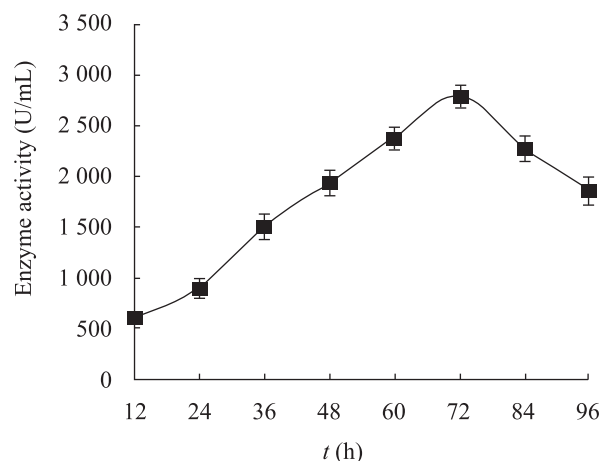


图 1 枯草芽孢杆菌 D-6 摇瓶发酵产酶历程
Fig. 1 Time course of β -1,3-1,4-glucanase production from *Bacillus subtilis* D-6

孢杆菌产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶相比, D-6 具有明显的产酶优势, 比以往报道的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶活力都高^[3,7-8,11-12]。但也存在一个问题, 即 D-6 发酵时间较长, 一般芽孢杆菌产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶在 50 h 左右即可达到产酶高峰^[3,7,12,16]。发酵时间长则不利于工业化生产。

2.2 发酵罐方差分析

D-6 在摇瓶试验中得到了较高的酶活力。由于摇瓶发酵有其局限性, 不能自动控制溶氧和 pH 值, 因此考虑溶氧和控制 pH 以及发酵时间等因素, 进一步考察利用 5 L 发酵罐发酵产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶。试验结果见表 2。利用统计软件 Design-Expert (版本 7.1.6)对表 2 试验数据进

行回归分析。各试验因子对响应值的影响用方程表示: $Y=2\ 202.99+275.66X_1+30.22X_2+55.79X_3+9.41X_1X_2+4.14X_1X_3+3.90X_2X_3-286.91X_1^2-233.90X_2^2-357.11X_3^2$

对该模型进行方差分析和显著性检验见表 3。由表 3 可以看出, 该模型回归显著($P<0.000\ 1$), 方程中 X_1 和 X_3 的影响都显著, 且该模型的 $R^2=0.995\ 9$, 回归方程和分析表较好地描述了各因素和响应值之间的关系, 可利用该模型确定最佳培养条件。同时, 还可以看出转速($F=481.56$)> pH ($F=19.72$)>通气量($F=5.79$), 说明转速对其酶产量影响最大。有研究显示, 转速的改变直接影响发酵罐中溶解氧的增减, 溶解氧的改变可提高代谢产物的形成^[16]。

表 2 试验设计及结果
Table 2 Design and results of Box-Behnken design

试验号 Trial No.	因素及水平 Coded level of variables			酶活 Enzyme activity (U/mL)
	X_1	X_2	X_3	
1	-1	-1	0	1 379.9
2	1	-1	0	1 922.3
3	-1	1	0	1 423.3
4	1	1	0	2 003.2
5	-1	-1	-1	1 240.3
6	1	0	-1	1 773.5
7	-1	0	1	1 300.2
8	1	0	1	1 849.9
9	0	-1	-1	1 491.0
10	0	1	-1	1 542.0
11	0	-1	1	1 638.2
12	0	1	1	1 704.8
13	0	0	0	2 196.4
14	0	0	0	2 301.1
15	0	0	0	2 172.6

Note: X_1 : Agitation; X_2 : Aeration; X_3 : pH.

表 3 回归方程方法分析表

Table 3 ANOVA for response surface quadratic model analysis of β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* D-6

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 DF	均方差 Mean square	F 值 F-value	$P_{F>F}$	
模型 Model	1.537E+006	9	1.708E+005	11.15	<0.000 1	显著性
X_1	6.079E+005	1	6.079E+005	481.56	<0.000 1	
X_2	7 305.38	1	7 305.38	5.79	0.061 2	
X_3	24 896.85	1	24 896.85	19.72	0.006 8	
X_1X_2	354.00	1	354.00	0.28	0.619 1	
X_1X_3	68.48	1	68.48	0.054	0.825 1	
X_2X_3	61.00	1	61.00	0.048	0.834 7	
X_1^2	3.039E+005	1	3.039E+005	240.77	<0.000 1	
X_2^2	2.020E+005	1	2.020E+005	160.02	<0.000 1	
X_3^2	5.195E+005	1	5.195E+005	411.54	<0.000 1	
残差 Residual	6 311.94	5	1 262.39			
失拟项 Lack of fit	3 969.51	3	1 323.17	1.13	0.524 4	不显著
误差 Pure error	2 342.43	2	1 171.22			
总离差 Cor. total	1.544E+006	14				
R^2	0.995 9					
Adj R^2	0.988 6					
Pred R^2	0.955 4					

2.3 响应 3D 曲面分析

由图 2 可以看出, 当 X_1 、 X_2 和 X_3 其中一个变量一定时, 随着其它两个变量的增加, β -1,3-1,4-葡聚糖酶活力呈先上升后下降的趋势。利用 Design-Expert 软件, 通过岭脊分析得出, 当转速 500 r/min、通气量 1.05 vvm 和培养基 pH 值控制为 5.08, 在此条件下计算酶活力可达 2 195.8 U/mL。为了验证优化结果的可靠性, 按照响应面优化的发酵条件进行验证实验, 可达 2 294.4 U/mL, 与计算得出的酶活力接近, 认为该模型与实验值拟合较好。

2.4 5 L 发酵罐产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的历程

D-6 以 5 L 发酵罐产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的历程如图 3 所示。发酵前 12 h 内, 菌株几乎不分泌产酶, 从 12 h 后分泌的酶量急剧增加, 到 15 h 时, 酶活力达到最高产酶量的 50% 以上, 第 22 h 达到最高值, 之后酶活力开始下降。与之前该菌株摇瓶发酵相比, 虽酶活力有少许下降, 但发酵罐发酵达到最高产酶时间仅为 22 h, 只需不及摇瓶发酵时间的 1/3, 大大缩短了发酵时间, 能较好地节省生产成本, 利于大规模生产。此外, 图 4 表明 D-6 所产的胞外蛋白有 2 条 β -1,3-1,4-葡聚糖酶带, 分子量主要分布在 27–35 kD 之间。

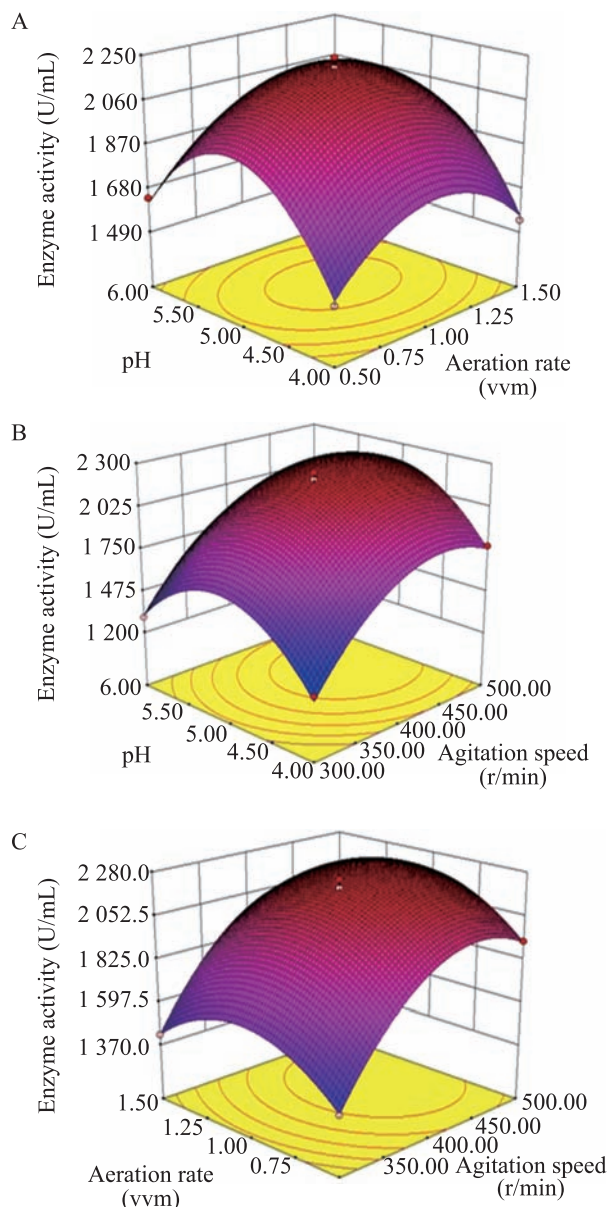


图2 转速、通气量和 pH 对酶活力的响应面分析
Fig. 2 Three-dimensional response surface plots for the effect of fermentation parameters on β -1,3-1,4-glucanase production by *Bacillus subtilis* D-6

Note: A: Effect of pH and aeration; B: Effect of pH and agitation; C: Effect of aeration and agitation.

在细菌 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的研究中, 大多分子量在 10–30 kD 之间^[10], 而本研究中 D-6 所产的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶其中一条酶谱带高于 30 kD 以上, 说明其具有一定的新颖性。此外, 在图 4 中发现分子量 40 kD 左右有一条主带, 通过酶谱分

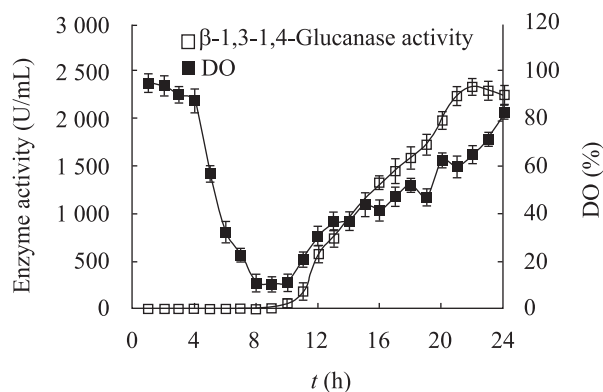


图3 枯草芽孢杆菌 D-6 以 5 L 发酵罐发酵产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶历程

Fig. 3 Time course profile of β -1,3-1,4-glucanase production by *Bacillus subtilis* D-6 using submerged fermentation in a 5 L fermentor

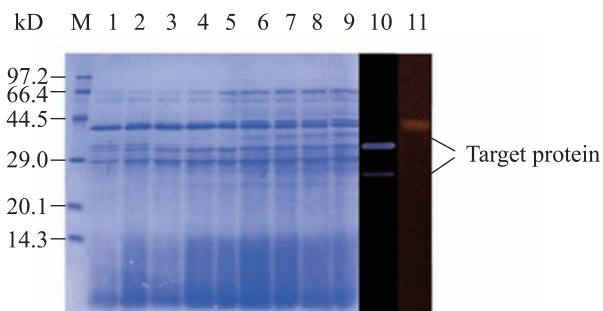


图4 5 L 发酵罐发酵产酶粗酶液的 SDS-PAGE 和酶谱分析

Fig. 4 SDS-PAGE and zymogram analysis of β -1,3-1,4-glucanase production by *Bacillus subtilis* D-6 in a 5 L fermentor

注: M: 低分子量标准蛋白; 1–9: 15–23 h 的粗酶液; 10: β -1,3-1,4-葡聚糖酶谱分析; 11: 淀粉酶谱分析。

Note: M: Low molecular weight calibration kit; 1–9: 15–23 h, respectively; 10: β -1,3-1,4-Glucanase zymogram of the crude culture supernatant; 11: Amylase zymogram of the crude culture supernatant.

析该主带为淀粉酶, 这与其它枯草芽孢杆菌发酵产淀粉酶的报道相一致^[17]。

3 结论

采用 Box-Behnken 实验设计和 Design-Expert 数据处理软件进行数据分析, 得到当转速、通气

量和培养基 pH 分别为 500 r/min、1.05 vvm 和 5.08 时, 于 50 °C 发酵 22 h 后, β -1,3-1,4-葡聚糖酶活力最高达到 2 294.4 U/mL。发酵时间短, 产酶量高, 说明该菌株具有很大的工业化应用前景。同时, 酶谱图中高于 30 kD 的蛋白带具有一定新颖性, 可以通过纯化后进一步考察其相关酶学性质等。

参 考 文 献

- [1] Han YJ, Chen HZ. Biochemical characterization of a maize stover β -exoglucanase and its use in lignocellulose conversion[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(15): 6111–6117.
- [2] Furtado GP, Ribeiro LF, Santos CR, et al. Biochemical and structural characterization of a β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(5): 1202–1206.
- [3] 郑元平, 袁康培, 冯光明. 啤酒用 β -葡聚糖酶高产菌株的选育及发酵条件优化[J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12(3): 316–321.
- [4] Beckmann L, Simon O, Vahjen W. Isolation and identification of mixed linked β -glucan degrading bacteria in the intestine of broiler chickens and partial characterization of respective 1,3-1,4- β -glucanase activities[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2006, 46(3): 175–185.
- [5] Planas A. Bacterial β -1,3-1,4-glucanase: structure, function and protein engineering[J]. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2000, 1543: 361–382.
- [6] Tang YB, Yang SQ, Yan QJ, et al. Purification and characterization of a novel β -1,3-1,4-glucanase (lichenase) from thermophilic *Rhizomucor miehei* with high specific activity and its gene sequence[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2012, 60(9): 2354–2361.
- [7] 郝秋娟, 李永仙, 李琦, 等. 淀粉液化芽孢杆菌 5582 产 β -葡聚糖酶的发酵条件和酶学性质研究[J]. *食品工业科技*, 2006, 27(8): 149–153.
- [8] Teng D, Wang JH, Fan Y, et al. Cloning of β -1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus licheniformis* EGW039 (CGMCC 0635) and its expression in *Escherichia coli* BL21(DE3)[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2006, 72(4): 705–712.
- [9] Tang XJ, He GQ, Chen QH, et al. Medium optimization for the production of thermal stable β -glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology[J]. *Bioresource Technology*, 2003, 93(2): 175–181.
- [10] 李永仙, 郑云飞, 李琦, 等. RSM 法优化产 β -葡聚糖酶的发酵培养基[J]. *食品工业科技*, 2009, 30(8): 137–139.
- [11] 韩晶, 李宝坤, 李开雄. 嗜热 β -葡聚糖酶产生菌的筛选及其培养基优化研究[J]. *中国酿造*, 2008(21): 33–36.
- [12] 白晓娟, 王闻晓. 响应面法优化 *Bacillus subtilis* AS35 产 β -葡聚糖酶发酵培养基的研究[J]. *农产品加工*, 2011(8): 76–80.
- [13] Louw ME, Reid SJ, Watson TG. Characterization, cloning and sequencing of a thermostable endo-(1,3-1,4)- β -glucanase-encoding gene from an alkalophilic *Bacillus brevis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993, 38(4): 507–513.
- [14] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680–685.
- [15] 刘泽慧, 李永仙, 李琦. 溶氧对淀粉液化芽孢杆菌 BS5582 产 β -葡聚糖酶的影响[J]. *食品工业科技*, 2012, 2(14): 1–6.
- [16] Silva DP, Pessoa AJr, Roberto IC, et al. Effect of agitation and aeration on production of hexokinase by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 91/93(1): 605–613.
- [17] Orlando AR, Ade P, di Maggio D, et al. The purification of a novel amylase from *Bacillus subtilis* and its inhibition by wheat proteins[J]. *Biochemical Journal*, 1983, 209(2): 561–564.