

# 环状芽孢杆菌产 $\beta$ -甘露聚糖酶的产酶条件及粗酶性质研究

杨新建<sup>1,2</sup>, 徐福洲<sup>2</sup>, 王金洛<sup>2</sup>, 周宏专<sup>1,2</sup>

(1. 首都师范大学 生命科学学院, 北京 100037; 2. 北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100089)

**摘要:** 为确定环状芽孢杆菌 WXY-100 的最佳摇瓶培养工艺, 采用了 $L_9(3^4)$  正交试验对培养基成分以及培养条件进行了优化。结果表明, 最佳培养基成分为: 酵母抽提物 20 g/L, 魔芋粉 20 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g/L。最佳培养条件为: 种龄 8~12 h, 接种量为 6%, 装液量为 25 mL, pH 7.5, 培养温度 40℃, 培养时间 25 h。该酶在 pH 4~8 和 60℃ 以下稳定, 作用最适条件是 pH 5.0 和 60℃,  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Co}^{2+}$  对酶有较显著的激活作用, 而  $\text{Hg}^{2+}$  对酶有强烈的抑制作用。

**关键词:**  $\beta$ -甘露聚糖酶; 环状芽孢杆菌; 产酶条件; 性质

中图分类号: S556 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)03-0108-04

## Studies on the Condition and Some Properties of $\beta$ -mannanase Produced by *Bacillus circulans* WXY-100

YANG Xin-jian<sup>1,2</sup>, XU Fu-zhou<sup>2</sup>, WANG Jin-luo<sup>2</sup>, ZHOU Hong-zhuan<sup>1,2</sup>

(1. Capital Normal University, Beijing 100037, China;

2. Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100089, China)

**Abstract:** To study the optimal technical conditions of shaking fermentation for producing  $\beta$ -mannanase by *Bacillus circulans* WXY-100, the culture ingredients and conditions were optimized with the orthonormal table  $L_9(3^4)$  method. Studies showed that the culture components for optimization of the enzyme production were yeast extract 20 g/L, Konjak powder 20 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/L and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g/L; and the optimal culture conditions were seed incubation time 8~12 h, inoculation ratio 6%, medium volume 25 mL, pH 7.5, fermentation temperature 40℃ and fermentation time 25 h. The enzyme was stable between pH 4~8 and below 60℃. The optimal pH and temperature for enzyme activity were 5.0 and 60℃ respectively.  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  had a remarkable influence on increasing the activity of  $\beta$ -mannanase, while  $\text{Hg}^{2+}$  was on the contrary.

**Key words:**  $\beta$ -mannanase; *Bacillus circulans*; Optimal conditions; Properties

研究表明,  $\beta$ -甘露聚糖酶能有效分解存在于魔芋粉、槐豆胶等不同植物中的甘露聚糖以及葡萄糖聚糖、半乳甘露聚糖, 主要产物为甘露低聚糖, 而甘露低聚糖为功能糖类, 有利于肠道双歧杆菌、乳酸菌的生长, 抑制有害菌繁殖, 从而改善肠道功能, 增强免疫力<sup>[1,2]</sup>。本试验以提高  $\beta$ -甘露聚糖酶活力为目的, 对影响酶活力的参数进行了正交设计分析, 得到了最佳产酶培养基以及培养条件, 并对该酶的部

分性质做了研究, 旨在为进一步的研究工作打好基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

环状芽孢杆菌 WXY-100, 由北京市农林科学院畜牧所高技术室保藏。

### 1.2 种子培养基

收稿日期: 2005-12-22

基金项目: 北京市科技新星计划资助(2004B23)

作者简介: 杨新建(1979-), 男, 河南驻马店人, 在读硕士, 主要从事免疫学研究。

一级种子培养基: NaCl 10 g/L, Yeast extract 5 g/L, Tryptone 10 g/L, pH 7.2, 高压灭菌后备用。接种单个环状芽孢杆菌菌落, 37℃ 振摇培养 (200 r/min) 8~12 h, 为一级种子。二级种子培养基: 酵母抽提物 10 g/L, 魔芋粉 7.5 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, pH7.5。按照 5% 的接种量接入一级种子, 37℃ 振摇培养 (200 r/min) 8~12 h, 为二级种子。

1.3 发酵培养基

酵母抽提物 20 g/L, 魔芋粉 20 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g/L, pH 7.5。

1.4 发酵条件

250 mL 三角瓶装 25 mL 发酵培养基, 接入 6% 的二级种子, 40℃ 摇床培养 25 h (200 r/min)。发酵液于 8 000 r/min 条件下离心 20 min, 上清为粗酶液。

1.5 酶活力测定

取 0.5% 槐豆胶 (Sigma 产品, 50 mmol/L Tris-Cl, pH7.5 配制) 溶液 0.5 mL 加入反应管中, 然后加入适当稀释的粗酶液 0.1 mL (6 支平行管, 其中 2 个在沸水浴之前加入酶液, 作为 0 点, 另外 4 支作为 45 min 的反应, 记为 45 点), 40℃ 水浴反应 45 min 后, 加入 1.5 mL 的 DNS 反应试剂, 沸水浴 5 min, 冷至室温后离心, 测定 550 nm 吸光值。在由标准甘露单糖溶液制定的标准曲线上将相应的吸光值 (A<sub>45</sub>, A<sub>0</sub>) 转换成糖浓度 (M<sub>45</sub>, M<sub>0</sub>), 根据每升百万活性单位的发酵液 45 min 反应后, 产生的还原糖相当于 5.4 g/L 的甘露单糖标准, 运用公式酶活性 = (M<sub>45</sub> - M<sub>0</sub>) ÷ 5.4 × 稀释倍数 × 密度 × 10<sup>3</sup> (单位: mL), 计算出粗酶液的活性大小。

1.6 培养条件的优化

1.6.1 碳源对产酶的影响 改变发酵培养基的碳源种类与浓度 (木糖、葡萄糖、果糖、甘露糖、甘油、乳糖、0.5% 魔芋粉、1% 魔芋粉、1.5% 魔芋粉、2% 魔芋粉、3% 魔芋粉、槐豆胶), 进行摇瓶发酵试验, 根据酶活性的高低确定最佳碳源。

1.6.2 氮源对产酶的影响 改变发酵培养基的氮源的种类与浓度 (尿素、牛肉膏、酵母、胰蛋白胍、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NaNO<sub>3</sub>、酵母 + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、胰蛋白胍 + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、牛肉膏 + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 进行摇瓶发酵试验, 根据酶活高低确定最佳氮源。

1.6.3 发酵培养基组分的优化 根据 1.6.1, 1.6.2 的结果, 以及细菌生长所需要的无机离子, 进行 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 正交试验, 优化发酵培养基各组分的最佳含量。

1.6.4 发酵条件的优化 改变种龄、装液量、接种量、发酵培养基初始 pH、培养温度、培养时间等变量, 采用正交试验等方法确定最佳的发酵产酶条件。

1.7 粗酶的性质

改变粗酶作用底物的环境条件, 包括温度、pH、金属离子以及螯合剂, 确定该酶的最佳作用条件及其稳定性。

2 结果与分析

2.1 培养条件的优化

2.1.1 发酵培养基组分的优化 碳源优化试验表明, 魔芋粉为最佳碳源; 氮源以有机氮酵母抽提物 (2%) 和无机氮 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的组合为最优。因此, 固定酵母抽提物为 20 g/L, 以魔芋粉, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 为因素, 进行 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 的正交试验, 结果列于表 1。

表 1 发酵培养基组分对产酶的影响

Tab. 1 Effect of culture components on the enzyme production

试验号 Experiment No.	因子 (g/L) Factors				酶活 (U/mL) Enzyme activity
	魔芋粉 Elephant taro powder	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	
1	5	2	1	0.5	333.0
2	5	4	2	1	320.2
3	5	6	4	2	271.6
4	10	2	2	2	380.5
5	10	4	4	0.5	312.1
6	10	6	1	1	354.7
7	20	2	4	1	443.1
8	20	4	1	2	467.0
9	20	6	2	0.5	422.6
k1	924.8	1156.6	1154.7	1067.7	
k2	1047.3	1099.3	1123.3	1118.0	
k3	1332.7	1048.9	1026.8	1119.1	
R	407.9	107.7	127.9	51.4	

根据极差 (R) 分析, 对产酶影响大小的顺序为: 魔芋粉、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O。从表 1 数据可知, 魔芋粉、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 随含量增加酶活逐步提高。其中, 魔芋粉的浓度增加, 产酶量显著提高; 而 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 浓度增加, 产酶量变化不显著, 尤其是后 2 个水平, 几乎相同。因此根据节约成本的原则, 最佳的培养基组合为: 酵母抽提物 20 g/L、魔芋粉 20 g/L、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g/L。

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佳组合为发酵产酶培养基, 进行发酵条件的优化试验。试验设计与结果列于表 2。

表 2 发酵条件对产酶的影响

Tab. 2 Effect of the culture conditions on the enzyme production

序号 No.	因子 Factors			酶活(U/mL) Enzyme activity
	种龄(h) Age of species	接种量(%) Inoculation capacity	装液量(mL) Fluid capacity	
1	8	2	25	705.03
2	8	6	50	364.81
3	8	10	75	153.29
4	12	2	75	172.37
5	12	6	25	728.77
6	12	10	50	323.09
7	16	2	50	186.20
8	16	6	75	133.72
9	16	10	25	694.63
k1	1223.13	1063.60	2128.43	
k2	1224.23	1227.30	874.10	
k3	1014.55	1171.01	459.38	
R	209.68	163.70	1669.05	

试验结果表明,装液量对产酶影响最大,并在一定范围内成正比。这同时表明,通气量越大对该菌的产酶越有利。这与该酶为诱导酶,氧气显著影响诱导效果<sup>[6]</sup>的结论相一致。其次,接种量也在一定程度上影响产酶量,接种量过大,菌体生长过快,致使发酵液粘度增大,不但会抑制菌体的进一步生长,也不利于氧气的溶解,导致产酶量下降。综合各因素,种龄为 8~12 h,接种量为 6%,装液量为 25 mL 时,产酶量最大。

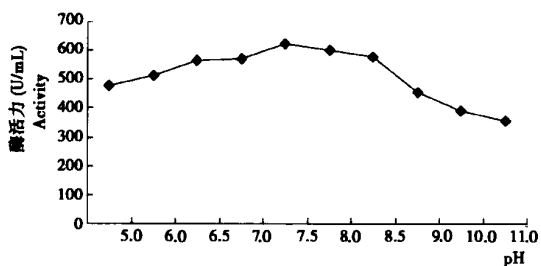


图 1 发酵培养基初始 pH 对产酶的影响

Fig. 1 Effect of initial pH on the enzyme production

2.1.3 发酵培养基初始 pH 对产酶的影响 将发酵培养基初始 pH 分别调为 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 10.0, 11.0 等不同值,按照常规方法进行酶活性测定,结果如图 1。结果显示,产酶适宜初始 pH 为 6.5~8.5,最适 pH 为 7.5。

2.1.4 培养温度对产酶的影响 分别在 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50 °C 等不同温度条件下进行摇瓶培养,按照常规方法测定酶活性,结果如图 2。结果表明,产酶适宜温度为 37~50 °C,最适宜温度为 40 °C。

2.1.5 培养时间对产酶的影响 在上述最佳条件下,在不同的发酵时间进行取样,根据常规方法进行

酶活测定,结果如图 3。结果表明,在发酵 25 h 处,产酶达到最高点,酶活力为 1 002.25 U/mL。

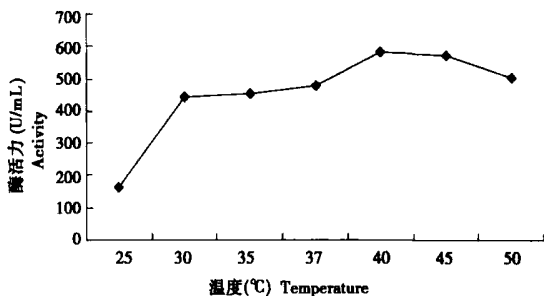


图 2 培养温度对产酶的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the enzyme production

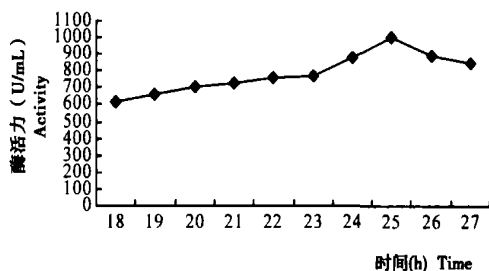


图 3 培养时间对产酶的影响

Fig. 3 Effect of time on the enzyme production

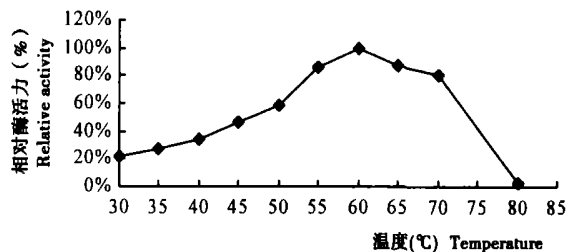


图 4 温度对酶活力的影响

Fig. 4 Effect of temperature on enzyme activity

## 2.2 粗酶的性质

2.2.1 温度对酶活力的影响 在不同温度下,按照常规方法进行酶活力测定,得到温度—酶活力曲线,如图 4。结果显示,酶作用适宜温度为 55~70 °C,最适温度为 60 °C。

2.2.2 pH 对酶活力的影响 于不同 pH 条件下进行酶反应,结果如图 5。结果表明,酶作用的适宜 pH 为 4.5~5.5,最适 pH 为 5。

2.2.3 温度对酶稳定性的影响 将稀释一定浓度的酶液于不同温度下保温 20 min,然后按照常规方法进行酶活力测定结果如图 6。结果表明,该酶稳定性一般,在 60 °C 以下保持稳定,高于 70 °C 酶活力几乎完全消失。

2.2.4 pH 对酶稳定性的影响 将目的酶液与不同 pH 的缓冲液混合,40 °C 水浴保温 2 h,然后按照常规

方法进行残余酶活力测定, 结果如图 7。结果表明, 酶在 pH 4~ 8 相对稳定。

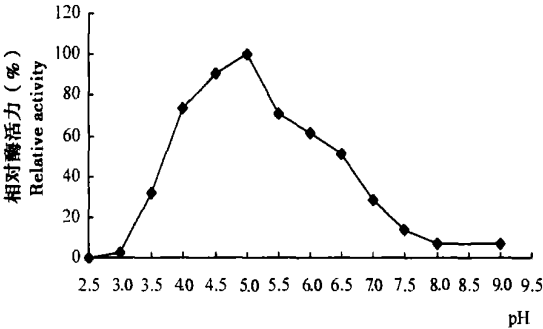


图 5 pH 对酶活力的影响

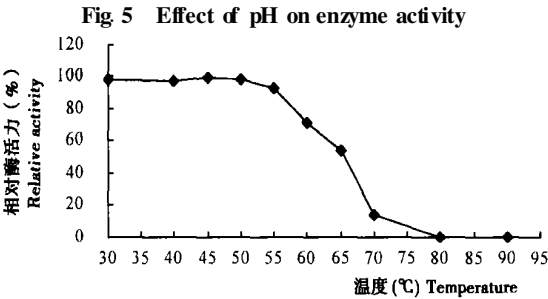


图 6 温度对酶稳定性的影响

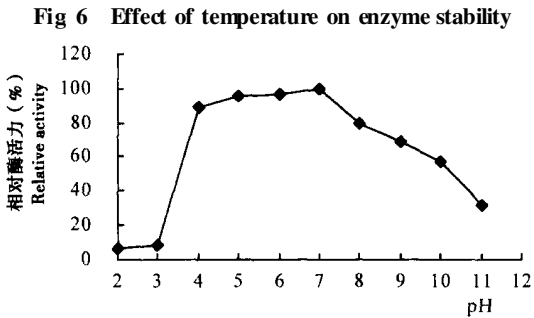


图 7 pH 对酶稳定性的影响

Fig 7 Effect of pH on enzyme stability

2.2.5 金属离子以及 EDTA 对酶活力的影响 将含有下列金属离子的溶液(1 mmol/L)与酶液混合, 40℃水浴 30 min, 然后按照常规方法进行酶活力测定, 以未加入金属离子和 EDTA 的酶活力为 100%。结果见下表 3。

表 3 不同金属离子和 EDTA 对酶活力的影响

Tab 3 Effect of metal ions and EDTA on enzyme activity			
金属离子 Metal ions	相对酶活(%) Enzyme activity	金属离子 Metal ions	相对酶活(%) Enzyme activity
对照	100	Na <sup>+</sup>	80.23
Cu <sup>2+</sup>	137.45	Mn <sup>2+</sup>	75.21
Co <sup>2+</sup>	132.50	Al <sup>3+</sup>	66.63
Ba <sup>2+</sup>	100.20	Fe <sup>2+</sup>	56.78
Mg <sup>2+</sup>	95.88	Zn <sup>2+</sup>	55.59
Ca <sup>2+</sup>	95.25	Ag <sup>+</sup>	53.84
K <sup>+</sup>	87.95	Fe <sup>3+</sup>	52.11
EDTA	86.33	Hg <sup>2+</sup>	32.20

结果表明, Cu<sup>2+</sup> 和 Co<sup>2+</sup> 对酶有比较显著的激活作用, Ba<sup>2+</sup> 只有微弱的激活作用, Hg<sup>2+</sup> 对酶有强烈的抑制作用, Al<sup>3+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Fe<sup>3+</sup> 对酶有一定的抑制作用, EDTA、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 对酶活性影响不大。

3 讨论

通过最佳产酶培养基及最佳培养条件优化试验, 得到了适合环状芽孢杆菌的产酶培养基和培养条件: yeast extract 20 g/L, 魔芋粉 20 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g/L, 种龄为 8~ 12 h, 接种量为 6%, 装液量为 25 mL, pH 7.5, 培养温度 40℃, 培养时间 25 h。根据上述最佳条件, 该菌体产生的 β-甘露聚糖酶的比活性最高可达到 1 002.25 U/mL, 与同类菌体<sup>[3~ 7]</sup>相比, 产酶周期短、比活性较高。

同时, 本研究也得出了该菌体产生的 β-甘露聚糖酶的一些性质, 在 pH 4~ 8 和 60℃以下稳定, 作用最适条件是 pH 5.0 和 60℃, 这些性质表明, 该菌体产生的 β-甘露聚糖酶比其他菌种产生的同类酶<sup>[6, 7]</sup>更适合于在动物体内发挥作用以及具有更好的稳定性。

本研究中魔芋粉不但作为碳源, 也作为促使菌体产生目的物的诱导剂存在, 这与该酶是诱导酶的结论是一致的。本研究认为 2% 魔芋粉为最佳, 笔者在初始阶段也认为魔芋粉的含量有提升的空间, 现也有报道<sup>[8]</sup>, 但试验发现, 魔芋粉的含量高于 2% 之后, 培养基的黏稠度非常高, 高压灭菌后甚至成为一团, 不利于通气, 同时过高含量的魔芋粉会对酶的诱导造成阻碍作用。当然, 这 and 不同的菌种、不同的培养条件以及一些未知的条件可能存在一定的关系。

参考文献:

[1] 杨文博, 陈锦红. β-甘露聚糖酶降解植物胶及其产物对双歧杆菌的促生长作用[J]. 微生物学通报, 1995, 22(4): 204-207.  
[2] 沈庆, 孙文凤. β-甘露聚糖酶对植物胶的酶解及其产物对双歧杆菌的促生长作用[J]. 天津微生物, 1996, (2): 1-5.  
[3] 余红英, 杨幼慧, 杨跃生, 等. 枯草芽孢杆菌 β-甘露聚糖酶补料发酵以及特性研究[J]. 微生物学通报, 2002, 29(5): 25-29.  
[4] 崔福绵, 石家骥, 鲁茁壮. 枯草芽孢杆菌中性 β-甘露聚糖酶的产生与性质[J]. 微生物学报, 1999, 39(1): 60-63.  
[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]. 微生物通报, 1995, 22(3): 154-157.  
[6] 罗强, 孙启玲, 张兴宇, 等. β-甘露聚糖酶菌株的复合诱变选育及发酵条件的优化[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2003, 40(1): 131-134.  
[7] 熊, 干信. β-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): 17-19.  
[8] 柴萍萍, 韦, 汪正强, 等. 芽孢杆菌 WY-45 产 β-甘露聚糖酶发酵条件的研究[J]. 中国农业大学学报, 2005, 10(3): 77-80.