

芽孢杆菌 M-21 产  $\beta$ -甘露聚糖酶发酵条件研究\*

周 芳,牟海津,江晓路

(中国海洋大学食品工程学院, 山东青岛, 266003)

**摘 要** 从土壤中分离筛选出产  $\beta$ -甘露聚糖酶的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) M-21, 通过单因素实验和正交优化实验, 确定了其最佳发酵产酶条件。菌株的产酶最适培养基组成包括 (g/L) 碳源: 瓜尔豆胶 4, 复合氮源: 豆粉 20、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 其他无机盐组分:  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{NaCl}$  0.5,  $\text{CaCl}_2$  0.1,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001。产酶最适培养条件: 培养基初始 pH 8.0, 接种量 4%, 装液量 50 mL/250 mL 三角瓶, 32 °C 180 r/min 振荡培养 36 h。此条件下酶活力最高可达 1 487 U/mL。

**关键词** 芽孢杆菌,  $\beta$ -甘露聚糖酶, 菌种筛选, 发酵

$\beta$ -1,4-D-甘露聚糖酶是一类能够水解含有  $\beta$ -1,4-D-甘露糖苷键的甘露寡糖、甘露多糖 (包括均一甘露聚糖、半乳甘露聚糖、葡甘露聚糖等) 的内切酶, 可以将半纤维素转化为具有重要商业价值的低聚糖, 具有极大的应用潜力<sup>[1]</sup>。甘露低聚糖属于功能性低聚糖, 能促进人体和动物肠道内以双歧杆菌为代表的有益菌的增殖, 减少肠道病原菌, 调节人和动物的免疫反应, 提高肠粘膜的完整性, 提高人体的健康水平和养殖动物的饲养价值<sup>[2]</sup>。 $\beta$ -甘露聚糖酶还可以用于造纸工业纸浆的漂白、植物胶质的降解和低温油井的破胶等<sup>[3]</sup>。因此, 1990 年代以来,  $\beta$ -甘露聚糖酶及其酶法制取低聚糖的应用性研究引起人们极大关注。

本研究项目组从土壤中分离筛选出 1 株产  $\beta$ -甘露聚糖酶的芽孢杆菌 M-21, 对其产酶条件进行优化, 以期得到最佳产酶培养基组成和培养条件, 获得高活力的  $\beta$ -甘露聚糖酶, 为开发工业用酶提供一定的试验依据。

## 1 材料与方法

## 1.1 主要试剂

魔芋胶、刺槐豆胶、瓜尔豆胶, 均购自烟台协力食品添加剂公司, (主要性能指标见表 1), DNS 试剂, 刚果红染色液, 碘液等。

表 1 各种胶的质量标准

类别	含胶量 / %	粒度 / 目	粘度 / mPa · s (1%水溶液)	pH 值
魔芋胶	≥80	200~300	36000	7.0
刺槐豆胶	≥78	140~200	2600~3000	5.5~7.0
瓜尔豆胶	≥85	200	5000~5500	5.5~6.5

第一作者: 硕士研究生。

\* 国家自然科学基金项目 (No. 40506027), 山东省优秀青年科学家科研奖励基金项目 (No. 2005BS02015)

收稿日期: 2006-10-10, 改回日期: 2006-11-15

## 1.2 培养基 (g/L)

魔芋胶、刺槐豆胶、瓜尔豆胶 3,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{NaCl}$  0.5,  $\text{CaCl}_2$  0.1,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001, pH 7.2。

## 1.3 菌种的平板筛选

将采集的土样富集培养 4 d, 富集液平板划线分离。30 °C 培养 36 h 后, 刚果红或者碘液染色, 检测菌落周围是否产生透明圈, 作为产  $\beta$ -甘露聚糖酶的初步检测<sup>[4]</sup>。

## 1.4 摇瓶发酵

将初筛菌株接种到含有 50 mL 培养液的 250 mL 三角瓶中, 30 °C 条件下 180 r/min 振荡培养, 定时检测菌体生物量和发酵液酶活力。

## 1.5 菌体生物量的测定

发酵液经 0.85%  $\text{NaCl}$  溶液适当稀释后, 用 722S 分光光度计测 600 nm 处的吸光值。

## 1.6 酶活力测定方法

$\beta$ -甘露聚糖酶活力测定: 在 1 mL 3 g/L 魔芋胶底物 (以 pH 7.0, 1/15 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  缓冲液配制), 加入 0.1 mL 经适当稀释的粗酶液, 以灭活酶液作对照, 50 °C 水浴反应 30 min, 用 DNS 法测定产生的还原糖量<sup>[5]</sup>, 以 D-甘露糖作为标准。酶活力单位定义: 上述反应条件下, 每分钟释放 1  $\mu\text{g}$  相当于 D-甘露糖的还原糖所需的酶量为 1 个酶活力单位 (U)。

## 1.7 菌种鉴定

参照文献[6]和[7]对供试菌株的特征进行鉴定。

## 1.8 发酵条件优化实验

通过单因素试验, 确定菌株 M-21 产酶的最佳碳源和氮源, 再通过正交实验优化产酶培养基的组成和配比。同时对培养基初始 pH 值、接种量、装液量、培

养温度等条件进行研究,确定最佳发酵条件。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产酶菌株的初筛

土壤富集液平板划线分离,挑取染色后有透明圈的菌株平板点种培养,染色后(图1)用直尺分别测量菌落直径( $C$ )和透明圈直径( $H$ ),得到  $H/C > 1$  的菌株共 65 株。

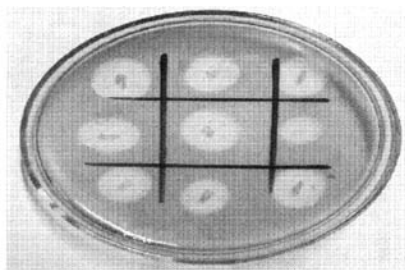


图1 平板透明圈法初筛  $\beta$ -甘露聚糖酶产生菌

### 2.2 产酶菌株的复筛

将初筛得到的产酶菌株接种于 3 种不同甘露聚糖的培养基,进行发酵产酶实验。复筛酶活力测定时,取适量酶液分别作用于魔芋胶、刺槐豆胶和瓜尔豆胶 3 种底物,结果见图 2。

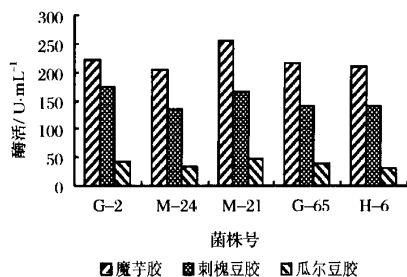


图2 复筛菌株对 3 种底物的酶活力

初筛获得的这些产酶活力较高的菌株,均可降解这 3 种甘露聚糖,但都表现出对魔芋胶的降解活力最高,这可能与不同植物胶中甘露糖主链与葡萄糖或半乳糖支链中糖的分子比例不同有关。魔芋胶中每间隔 60 个甘露糖分布 1 个  $\alpha$ -1,6 糖苷键的葡萄糖支链,刺槐豆胶化学结构与瓜尔豆胶一样,是以甘露糖为主链的半乳甘露聚糖,但连结的半乳糖支链数相对比瓜尔豆胶少,甘露糖与半乳糖的比例为 4:1。瓜尔豆胶中每间隔 1 个甘露糖分布 1 个  $\alpha$ -1,6 糖苷键的半乳糖支链,支链较多不易被降解,以甘露糖计的还原糖含量偏低<sup>[8]</sup>。

根据复筛结果,菌株 M-21 产酶时间短,产酶稳定,酶活性最高,因此将其作为试验研究菌株。菌株 M-21 初步鉴定结果如下,形态为  $(0.8 \sim 1.0) \times (1.8 \sim 2.2) \mu\text{m}$  的杆状,具运动性,革兰氏染色阳性。芽孢中生,椭圆,孢囊膨大。M-21 在肉汤平板培养基上培养 24 h,形成的菌落为圆形,边缘不规则,中间有突起,表面湿润,白色,好氧,发酵产酸。其特征与芽孢杆菌属的典型特征一致,暂命名为 *Bacillus* sp. M-21,菌株的鉴定工作有待进一步深入。

### 2.3 产酶最适培养基的研究

#### 2.3.1 不同碳源对 M-21 产酶的影响

改变产酶基础培养基中碳源的种类和浓度,进行发酵产酶试验,结果见表 2。

表2 不同碳源对 M-21 产酶的影响

碳源	浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	酶活/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
葡萄糖	5	0
半乳糖	5	0
淀粉	5	23
魔芋胶	5	60
槐豆胶	5	43
瓜尔豆胶	3	284
	5	247
	10	190

从表 2 中可看出,以 3 g/L 的瓜尔豆胶为碳源时, $\beta$ -甘露聚糖酶活力最高,魔芋胶、刺槐豆胶次之,而以葡萄糖、半乳糖为碳源时不产生  $\beta$ -甘露聚糖酶,可见该酶为诱导酶,只有在培养基中含有  $\beta$ -甘露聚糖时才进行  $\beta$ -甘露聚糖酶的合成<sup>[9,10]</sup>。最适碳源为瓜尔豆胶,推测原因可能是瓜尔豆胶本身不易被降解,因此刺激菌体产生较多的酶,促进菌体的利用。

进而以瓜尔豆胶为碳源进行浓度实验。结果表明,随着瓜尔豆胶浓度的增加,产酶量并没有增加,可能是由于培养基粘度增大,溶氧量减少,不利于菌株的产酶。

#### 2.3.2 不同氮源对菌株 M-21 产酶的影响

用不同种类的氮源取代产酶基础培养基中的氮源,进行产酶试验,结果见表 3,最佳有机氮源为酵母膏,蛋白胨、豆粉次之;无机氮源  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  最有利于产酶。多数实验结果表明,在不同的氮源中,有机氮源明显优于无机氮源,其中以豆粉、酵母膏、谷氨酸钠等对产酶的促进作用最大<sup>[2,10,11]</sup>。由于豆粉的成本远低于酵母膏等,所以在酶的大量生产中,可采用豆粉作为氮源以降低成本。

表3 不同氮源对菌株 M-21 产酶的影响

氮源	浓度 /g · L <sup>-1</sup>	酶活 /U · mL <sup>-1</sup>	氮源	浓度 /g · L <sup>-1</sup>	酶活 /U · mL <sup>-1</sup>
酵母膏	7	420	NaNO <sub>3</sub>	5	310
蛋白胨	5	399	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	255
豆粉	12	370	(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	5	297
牛肉膏	7	214	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	385
玉米粉	12	0	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	349
尿素	5	183	KNO <sub>3</sub>	5	262
NH <sub>4</sub> Cl	1	310	NH <sub>4</sub> Cl	5	104

2.3.3 主要营养源产酶的正交实验

在上述实验基础上,选择瓜尔豆胶、豆粉、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 为因素(见表4),进行 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) 正交实验,结果见表5。

表4 正交实验的因素与水平

水平	因素		
	瓜尔豆胶 /g · L <sup>-1</sup>	豆粉 /g · L <sup>-1</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /g · L <sup>-1</sup>
1	2	10	1
2	4	20	3
3	6	30	5

表5 正交实验结果

试验号	因素			酶活/ U · mL <sup>-1</sup>
	瓜尔豆胶 /g · L <sup>-1</sup>	豆粉 /g · L <sup>-1</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /g · L <sup>-1</sup>	
1	2	10	1	568
2	2	20	3	740
3	2	30	5	626
4	4	10	3	735
5	4	20	5	919
6	4	30	1	581
7	6	10	5	879
8	6	20	1	756
9	6	30	3	564
k <sub>1</sub>	644.667	727.333	635	
k <sub>2</sub>	745	805	679.667	
k <sub>3</sub>	733	590.333	808	
R	100.333	214.667	173	

通过极差分析,对酶活影响最大的因素为豆粉,然后为(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、瓜尔豆胶。根据各因素产酶的最高水平,即瓜尔豆胶、豆粉选取第二水平、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 第三水平,从而组成最优培养基配方为(g/L):瓜尔豆胶 4、豆粉 20、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 1、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5、NaCl 0.5、CaCl<sub>2</sub> 0.1、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.001。在此条件下重复发酵产酶实验,平均酶活力可达 919 U/mL。

2.4 发酵产酶条件的优化

2.4.1 培养温度

在优化培养基组成条件下,分析不同的温度条件

对产酶的影响。由图3可见,菌株 M-21 最适宜的产酶温度为 32℃ 左右。

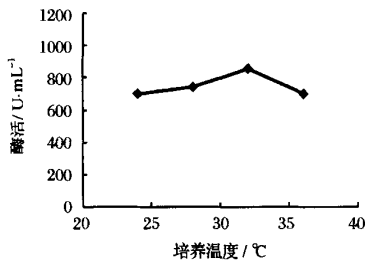


图3 培养温度对产酶的影响

2.4.2 培养基初始 pH

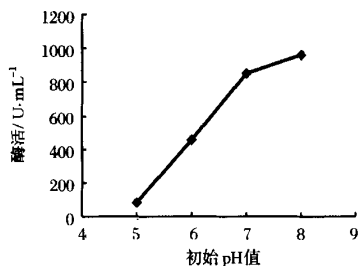


图4 培养基初始 pH 对产酶的影响

培养基初始 pH 值分别调节为 5、6、7、8,由图4可见初始 pH 值 8 最有利于菌株 M-21 产酶,初始 pH 要保证在弱碱性范围内,否则菌体生长将很缓慢甚至不能生长。不同芽孢杆菌菌株的生长和发酵最佳初始 pH 值相差较大,初始 pH 略偏酸性有利于枯草芽孢杆菌的生长,初始 pH 7~8 利于地衣芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌等的生长<sup>[12,13]</sup>。

2.4.3 装液量

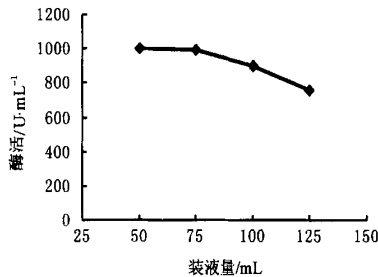


图5 装液量对产酶的影响

250 mL 三角瓶装液量分别为 50、75、100、125 mL,由图5可见装液量越大,产酶量越低。当装液量为 125 mL 时,产酶量最低,这是由于培养基较粘稠,起始阶段需要较高的通气量,一定条件下通气量大有利于产酶。

#### 2.4.4 接种量

接种量分别为4%、6%、8%、10%，由图6可见结果影响不大，接种量越大产酶时间越早，但是对于最终酶活力的提高无帮助，本实验选取4%的接种量。

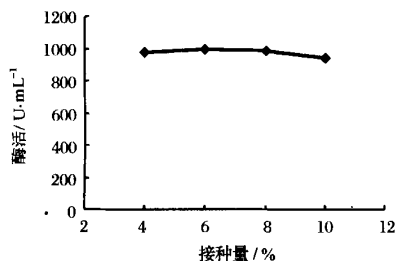


图6 接种量对产酶的影响

#### 2.4.5 产酶时间

在32℃进行发酵培养，每隔4 h取样，测定酶活力和菌体生物量，做出M-21的产酶进程曲线。由图7可见，M-21在培养20 h菌体生物量达到高峰，而产酶高峰出现在36 h，之后，酶活力缓慢下降，但依然维持在较高水平，说明该酶比较稳定，不易失活。

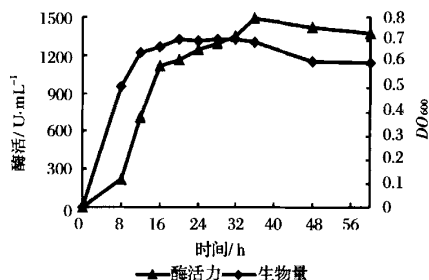


图7 产酶进程曲线

#### 2.4.6 菌株M-21的产酶性状的稳定性

该菌株在最佳的产酶条件下进行传代产酶稳定性实验，结果表明，连续传代12代，其产β-甘露聚糖酶活力具有较好的遗传稳定性，见图8。

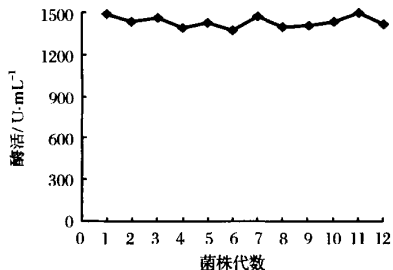


图8 菌株M-21的遗传稳定性

### 3 结论

从实验室采集的土壤样品中，定向筛选出1株产β-甘露聚糖酶活力较高的芽孢杆菌M-21；通过优化试验确定了M-21的最适培养基组成为碳源4 g/L瓜尔豆胶，复合氮源20 g/L豆粉和5 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，无机盐(g/L)：NH<sub>4</sub>Cl 1，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 1，MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5，NaCl 0.5，CaCl<sub>2</sub> 0.1，FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.001。最适培养条件为初始pH 8.0，接种量4%，装液量50 mL/250 mL三角瓶，温度为32℃。此条件下培养36 h，M-21发酵液的酶活力从初始的256 U/mL增加到1487 U/mL。该菌株在液体培养条件下产酶迅速，培养周期短，产酶的遗传性质稳定；并且所产酶可降解魔芋胶、刺槐豆胶、瓜尔豆胶等甘露聚糖型植物胶，制取相应的甘露寡糖，具有很大的应用潜力。

#### 参考文献

- 1 Akino T, Nakamura N, Horikoshi K. Production of β-mannosidase and β-mannanase by an *Alkalophilic bacillus* sp. [J]. Appl Microbio Biotechnol, 1987, 26(4): 323~327
- 2 李剑芳, 邬敏辰, 夏文水. 微生物β-甘露聚糖酶的研究进展[J]. 江苏食品与发酵, 2004(3): 4~9
- 3 陈小兵, 丁宏标, 乔宇. β-甘露聚糖酶的酶学性质工农业应用及基因工程研究[J]. 中国生物工程杂志, 2005(增刊): 156~159
- 4 Downie B, Hilhorst H W M, Bewley D. A new assay for quantifying endo-β-D-mannanase activity using congo red dye [J]. Phytochemistry, 1994, 36(4): 829~835
- 5 Akino T, Nakamura N, Horikoshi K. Characterization of three β-mannanase of an *Alkalophilic bacillus* sp. [J]. Agric Biol Chem, 1988, 52(3): 773~779
- 6 东秀珠, 蔡少英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- 7 Buchanan R E, Gibbons N E. Bergery's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1974
- 8 杨文博, 佟树敏, 沈庆, 等. 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
- 9 杨幼慧, Alan M McKAY. β-甘露聚糖酶的产酶菌种、条件及部分性质研究[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(2): 86~88
- 10 崔福绵, 石家骥, 鲁茁壮. 枯草芽孢杆菌中性β-甘露聚

- 糖酶的产生及性质[J]. 微生物学报, 1999, 39(1): 60~63
- 11 陈一平, 龙健儿, 廖连华, 等. 芽孢杆菌 M50 产生  $\beta$ -甘露聚糖酶的条件研究[J]. 微生物学报, 2000, 40(1): 62~68
- 12 柴萍萍, 韦 赟, 江正强, 等. 芽孢杆菌 WY45 产  $\beta$ -甘露聚糖酶发酵条件的优化[J]. 中国农业大学学报, 2005, 10(3): 77~80
- 13 罗 强, 孙启玲, 张兴宇, 等.  $\beta$ -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, 2003, 40(1): 131~134

## Study on the Production of $\beta$ -mannanase by *Bacillus* M-21

Zhou Fang, Mou Haijin, Jiang Xiaolu

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**ABSTRACT** *Bacillus* sp. M-21 with high activity of  $\beta$ -mannanase was isolated from soil samples. The fermentation conditions were optimized in order to improve the production of the enzyme. The optimal liquid medium consisted of 4 g/L guar gum was used as carbon source, 20 g/L soybean powder and 5 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  as nitrogen source and other inorganic salts(g/L):  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{NaCl}$  0.5,  $\text{CaCl}_2$  0.1,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001. The optimal culture conditions were: initial pH 8.0, inoculation volume 4%, medium volume 50 mL in 250 mL flask, agitation speed 180 r/min. After incubation at 32°C for 36h, the enzyme reached its highest activity of 1 487 U/mL.

**Key words** *Bacillus* sp.,  $\beta$ -mannanase, strain screening, fermentation

### 欧盟规定食品中添加维生素及矿物质受监管

2006年12月30日,欧盟《官方公报》刊登欧洲议会及理事会第1925/2006号条例,内容与向食品中添加维生素及矿物质等有关。

条例中协调了欧盟成员国的食品中添加维生素及矿物质规定,目的是确保上市食品的安全及附有清晰恰当的标签,让消费者拥有明确的选择权。此外,协调了各国法例,以有助于产品在欧盟各国的自由流通。

条例文本列出可以加进食品的维生素和矿物质,以及添加的形式和情况。附件1开列可以加进食品的维生素和矿物质,附件2列明这些维生素和矿物质的来源,附件3列出禁止、限制或在监管下才可在食品中添加的物质。

条例附件中提供了一套清晰的守则,让食品进口商遵循。欧洲食品安全局负责评估建议纳入附件的维生素及矿物质,考虑有关物质的安全性。

部分欧盟国家有自身的规例,强制在普通食物中添加维生素及矿物质。第1925/2006号条例设立通报程序,让成员国向欧洲委员会通报该类规例。此举可集中资讯来源,澄清关于添加维生素及矿物质的规定,有助食品企业拓展欧盟市场。

附件的清单将由欧委会设立的登记处提供和更新,并定期征询公众意见。条例明确列出关于标签、陈述及广告宣传的规定,强调业者不能在食品营养价值方面欺骗或误导消费者。在条例监管范围内的产品,必须附有营养资料标签,显示所添加的维生素和矿物质。

除维生素和矿物质外,条例中亦涉及对其他食品添加物质的监管和限制。这些在食品中添加或在生产过程中使用的物质,会在均衡饮食中被消化,又或会对消费者构成潜在风险,因此须被监管或限制使用。

成员国须于2014年1月19日前采纳附件1及2。该日之后,只有附件1所列的维生素和矿物质才可以附件2所列的形式加进食品之内。

条例并不适用于受其他欧盟法例监管的食品补充剂,亦不影响关于特别营养用途食品、新奇食品及食品成分、食品添加剂、调味料和制酒过程的个别规定。

条例将于2007年7月1日起实施。不过,在该日之前已上市或已加上标签的食品,将可继续销售,直至到期日为止,但不能迟于2009年12月31日。