

文章编号: 1000-5013(2010)04-0426-04

阿魏酸酯酶产生菌的培养条件优化

范韵敏, 李夏兰, 方柏山

(华侨大学 工业生物技术福建省高校重点实验室, 福建 泉州 362021)

摘要: 通过均匀设计法和二次多项式逐步回归,对产阿魏酸酯酶的培养基配方进行优化,得出优化的培养基配方(质量分数):0.30% KH_2PO_4 , 0.60% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01% NaCl , 0.80% 酵母粉, 1.33% 麦糟。在此基础上,用单因素法考察发酵条件对产酶的影响,确定最佳条件:初始pH值为6.0,培养温度为28℃,摇床转速为210 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,发酵时间为68 h,装液量为75 mL,接种量为5%,麦糟粒径为0.054 mm。采用优化的培养基组分进行最优发酵培养,优化后的阿魏酸酯酶酶活达到119.36 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$,比优化前提高了32倍。

关键词: 阿魏酸酯酶; 麦糟; 优化; 均匀设计

中图分类号: TQ 920.6; Q 814.9

文献标识码: A

阿魏酸酯酶(EC 3.1.1.73, Ferulic Acid Esterases, FAE)是羧酸酯水解酶的一个亚类,属胞外酶,能水解阿魏酸甲酯、低聚糖阿魏酸酯和多糖阿魏酸酯中的酯键^[1-2]。真菌、细菌和酵母都能分泌阿魏酸酯酶^[3]。各种微生物分泌的阿魏酸酯酶,在氨基酸序列、肽链的结构、物化性质和催化特性上有所不同。目前,由黑曲霉(*Aspergillus niger*)得到的2种阿魏酸酯酶 AnFae A 和 AnFae B 受到研究者的普遍关注^[4]。在禾本植物纤维质中,阿魏酸是含量最多的酚酸^[5-7],主要是以酯键与半纤维素连结^[8],阿魏酸及双阿魏酸的含量和连结方式,是决定半纤维素生物降解的最关键因素。因此,通过阿魏酸酯酶断裂阿魏酸与半纤维素连结的酯键,可提高半纤维素降解程度^[7-8]。本文对已筛选到一株能产阿魏酸酯酶,能降解麦糟的放线菌,进行产阿魏酸酯酶发酵条件的优化。

1 材料与方法

1.1 菌种

菌种从土壤中筛选得到,本实验室保藏,初步鉴定为放线菌白色种属。

1.2 培养基及培养条件

(1) 斜面培养基:高氏1号培养基,pH值自然。(2) 液体种子培养基:高氏1号培养基,不加琼脂,pH值自然,于28℃,200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下培养4 d。(3) 基础发酵培养基^[9](质量分数):0.1% KH_2PO_4 , 0.4% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.02% NaCl , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005% CaCl_2 , 0.6% 酵母粉, 6.0% 麦糟。(4) 初始发酵条件:在250 mL 三角瓶中装入100 mL 发酵培养基,按1%接种量接入种子培养液,pH值自然,于28℃,200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下培养80 h。

1.3 阿魏酸酯酶酶活定义及测定

阿魏酸采用高效液相色谱法^[10]测定。取250 μL 离心后的发酵上清液加入到250 μL 阿魏酸甲酯溶液中,50℃保温15 min,加入500 μL 体积分数为10%的冰乙酸。样品于离心机(10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$)离心15 min,于4℃下保存。空白样品为煮沸失活的发酵上清液,处理方法同上。阿魏酸酯酶的酶活定义:在50℃,pH值为6.0的条件下,每分钟酯解阿魏酸甲酯,生成1 μmol 阿魏酸所需的酶量。

1.4 优化设计

(1) 培养基的优化。根据DPS统计软件^[11],设计出7因素7水平均匀设计表 $U_7^*(7^7)$ ^[12-13]。优化因

收稿日期: 2008-11-19

通信作者: 方柏山(1957-),男,教授,主要从事生物信息化的研究。E-mail:fangbs@hqu.edu.cn。

基金项目: 国家重点基础研究发展(973)计划项目(2007CB707804)

素(质量分数): X_1 为酵母粉, X_2 为麦糟, X_3 为 KH_2PO_4 , X_4 为 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, X_5 为 NaCl , X_6 为 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, X_7 为 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. (2) 发酵条件的优化. 采用单因子设计实验, 按照初始发酵条件, 先得到的优化结果用于后续的实验, 分别进行培养基装液量 (V_1)、培养基的起始 pH 值、培养温度 (t)、摇床转速 (v)、接种量 (V_2)、发酵时间 (t)、麦糟粒径 (d) 优化.

2 结果与讨论

2.1 培养基优化结果

考察培养基成分对阿魏酸酯酶的影响, 结果如表 1 所示. 表 1 中, z 为阿魏酸酯酶的酶活. 以 KH_2PO_4 (X_1), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (X_2), NaCl (X_3), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (X_4), $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (X_5), 酵母粉 (X_6), 麦糟 (X_7) 为自变量, 阿魏酸酯酶的酶活为因变量, 进行二次多项式逐步回归分析. 以调整相关系数 R 最大为原则, 对该模型进行显著性检验, 建立回归方程为

$$Y = 26.762 - 1\,713.678 X_4 - 2\,622.615 X_5 + 41\,831.527 X_4^2 + 47\,299.663 X_3 X_5.$$

表 1 优化培养基组成的均匀设计实验结果

Tab. 1 Results of uniform design for optimization of medium formulations								
因子	X_1 / %	X_2 / %	X_3 / %	X_4 / %	X_5 / %	X_6 / %	X_7 / %	z / $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$
N_1	0.30	0	0.015	0.025	0.004	0.45	10.0	0.433
N_2	0	0.1	0.005	0.010	0.002	0.15	7.0	1.734
N_3	0.25	0.3	0.025	0	0	0.30	4.0	4.434
N_4	0.05	0.2	0.030	0.015	0.005	0.60	1.0	0.733
N_5	0.15	0.6	0.010	0.030	0.003	0	2.5	1.134
N_6	0.20	0.4	0	0.005	0.006	0.75	5.5	0.500
N_7	0.10	0.5	0.020	0.020	0.001	0.90	8.5	1.067

其相关系数 R 为 0.996, F 值为 58.852, 显著水平 p 值为 0.017, 剩余标准差 S 为 1.331, Durbin-Watson 统计量 d 为 1.299. 说明, 该方程能很好地拟合产酶的影响过程. 对该模型的显著性检验, 结果如表 2 所示. 从表 2 可知, 对阿魏酸酯酶产量的影响的大小顺序: $r(y, X_5) > r(y, X_4) > r(y, X_4^2) > r(y, X_3 X_5)$. 即因素之间存在交互作用.

表 2 显著性检验结果

Tab. 2 Significant test results			
因素	偏相关	t 检验值	p
$r(y, X_4)$	-0.985	7.968	0.004
$r(y, X_5)$	-0.989	9.266	0.003
$r(y, X_4^2)$	0.976	6.298	0.008
$r(y, X_3 X_5)$	0.932	3.637	0.036

由此可得, 优化的培养基成分(质量分数): 0.30 %

KH_2PO_4 , 0.60 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 % NaCl , 0.80 % 酵母粉, 1.33 % 麦糟. 根据以上结果进行验证, 测得阿魏酸酯酶酶活为 $4.818 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$, 与 DPS 软件预测值 $4.468 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 的相对误差为 7.84 %. 培养基优化前, 阿魏酸酯酶酶活力为 $3.734 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$, 而优化后的阿魏酸酯酶酶活力比优化前提高了 29 %, 能较好的达到优化的目的. Mg^{2+} , Ca^{2+} 是许多重要酶的激活剂, 对培养基质的氧化和蛋白质的合成均有影响^[10]. 但是, 优化后的培养基中没有另添加 Mg^{2+} , Ca^{2+} , 这可能是因为

在麦糟中已含有 Mg^{2+} , Ca^{2+} , 不需要另外添加.

2.2 发酵条件对产酶量的影响

2.2.1 装液量 按照初始发酵条件(下同), 考察装液量 (V_1) 对产酶量(以阿魏酸酯酶的酶活力 z 表征, 下同)的影响, 如图 1 所示. 由图 1 可知, 培养基装液量对产酶影响较大. 随着装液量的增加, 阿魏酸酯酶产量也增大. 装液量达到 75 mL 时, 产酶量最大, 随后逐渐减小. 这是因为装液量对供氧量有一定影响, 从而影响菌体的生长.

2.2.2 培养基的起始 pH 值 考察培养基起始 pH 值对产酶量的影响, 如图 2 所示. 从图 2 可知, 和胞内酶不同的, pH 值对胞外酶的影响较大. 该菌株在 pH 值为 5.0 ~ 8.0 的条件下均能产酶, 但产酶量变化较大; 在 pH 值为 6.0 处, 菌株产酶达到最大值. 酸性有利于该菌体的发酵产酶, 但偏酸会导致产酶量急剧下降; 而碱性环境对酶的生产是否有抑制作用, 还需进一步研究.

2.2.3 摇床转速 考察摇床转速 (v) 对产酶量的影响, 如图 3 所示. 从图 3 可知, 转速影响溶解氧的含

量,随着溶解氧的增大,酶的表达量相应提高.在 $210 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,阿魏酸酯酶的产量最高.

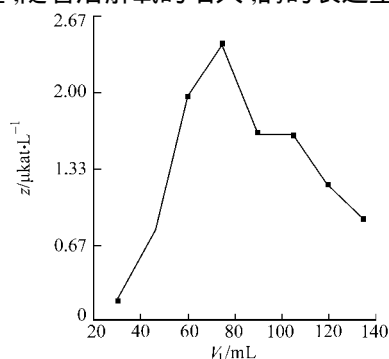


图1 装液量对产酶的影响

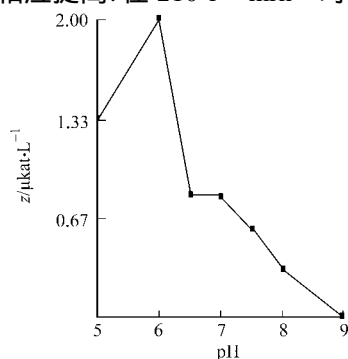


图2 培养基的起始 pH 对产酶的影响

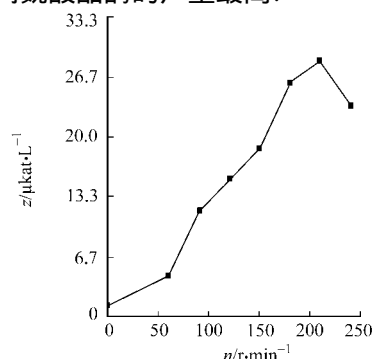


图3 摇床转速对产酶的影响

Fig.1 Effects of volumes on FAE

Fig.2 Effects of pH on FAE

Fig.3 Effects of shaker speed on FAE

2.2.4 摇床温度 考察摇床温度(t)对产酶量的影响,如图4所示.摇床温度在 $28 \sim 32$ 之间,酶的表达量较高.这是由于 $28 \sim 32$ 是菌种的最适宜生长温度,可能在此条件下,菌种的活力较高,产酶能提也较高.

2.2.5 接种量 考察接种量(V_2)对产酶量的影响,如图5所示.从图5可知,随着菌体浓度的增多,阿魏酸酯酶产量随之增加.当接种量为 4 mL 时,阿魏酸酯酶产量最大.

2.2.6 发酵时间 不同培养时间(t)对产酶量的影响,如图6所示.从图6可知,发酵 68 h 左右,酶的表达量最高;随后开始呈下降趋势.这可能与阿魏酸诱导作用有关.适当浓度的阿魏酸能诱导生成大量的阿魏酸酯酶,而过高浓度的阿魏酸对细胞产生毒害作用,反而使阿魏酸酯酶的产量有所下降.

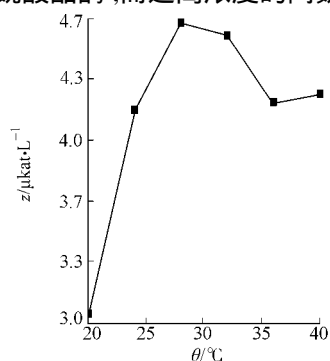


图4 培养温度对产酶的影响

Fig.4 Effects of temperature on FAE

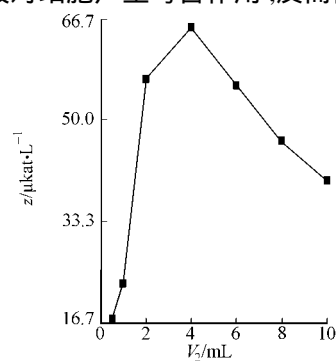


图5 接种量对产酶的影响

Fig.5 Effects of bacteria concentration on FAE

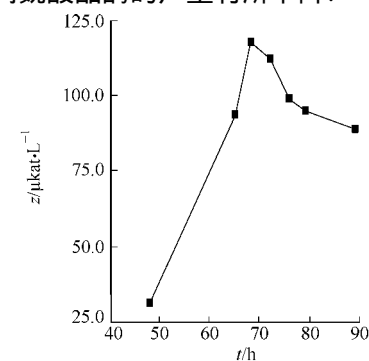


图6 发酵时间对产酶的影响

Fig.6 Effects of culture time on FAE

2.2.7 麦糟粒径 考察麦糟粒径(d)对产酶量的影响,如图7所示.从图7可知,麦糟粒径对产酶影响较大.麦糟粒径越小,相对表面积越大,菌种产酶量越高.

通过上述发酵条件的考察,可以确定产酶的最优条件:培养温度为 28 ,摇床转速为 $210 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,发酵时间为 68 h ,装液量为 75 mL ,接种量为 5% ,初始 pH 值为 6.0 ,麦糟粒径为 0.054 mm .采用优化的培养基组分进行最优发酵培养,阿魏酸酯酶的酶活为 $119.36 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$,比优化前酶活 $3.734 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 提高了 32 倍.其中,发酵时间对阿魏酸酯酶的影响最大.

3 结论

通过实验分析不同培养条件对阿魏酸酯酶生产菌产酶的影响.采用均匀设计,二次多项式逐步回归分析所得的发酵培养基组成,并通过单因素实验得到发酵

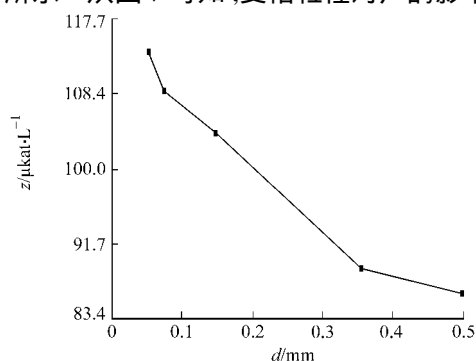


图7 麦糟粒径对产酶的影响

Fig.7 Effects of grain diameter on FAE

培养的最优条件.结果表明,优化后的酶活比优化前提高了近32倍,起到了优化的效果,有助于木质纤维降解工艺的研究.在此基础上,下一步工作是研究此菌种分泌的阿魏酸酯酶的分离和纯化条件,为木质纤维的生物炼制提供前期的研究基础.

参考文献:

- [1] MARK L J, SUN R, BANKS W B. Fractional characterization of alkali-labile lignin and alkali-insoluble lignin from wheat straw[J]. *Industrial Crops and Products*, 1996, 5(4): 291-300.
- [2] RALET M C, FAULDS C B, WILLIAMSON G, et al. Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugarbeet pulp and wheat bran by ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*[J]. *Carbohydr Res*, 1994, 263(2): 257-269.
- [3] CARVALHEIRO F, ESTEVES M P, PARAJO J C. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewer's spent grain[J]. *Bioresource Tech*, 2004, 91(1): 93-100.
- [4] SINDHU M, ABRAHAM T. Ferulic acid: An antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2004, 24(2/3): 59-83.
- [5] BREZILLON C, KROON P A, FAULDS C B, et al. Novel ferulic acid esterases are induced by growth of *Aspergillus niger* on sugar-beet pulp[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 45(3): 371-376.
- [6] MICARD V, THIBAUT J F. Oxidative gelation of sugar-beet pectins: Use of laccases and hydration properties of the cross-linked pectins[J]. *Carbohydr Polym*, 1999, 39(1): 265-273.
- [7] BARTOLOME B, SANTOS M, JIMENEZ J J, et al. Pentoses and hydroxycinnamic acids in brewer's spent grain[J]. *Cereal Sci*, 2002, 36(1): 51-58.
- [8] FAULDS C B, WILLIAMSON G. Effect of hydroxycinnamates and benzoates on the production of feruloyl esterases by *Aspergillus niger*[J]. *Sci Food agric*, 1999, 79(3): 450-452.
- [9] CRAWFORD D L. Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1978, 35(6): 104-105.
- [10] 俞俊棠, 唐孝宣, 邹行彦, 等. 新编生物工艺学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 104-106.
- [11] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其DPS数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 311-313.
- [12] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 75.
- [13] 李夏兰, 魏国栋, 王昭晶, 等. 均匀设计法优化芥菜多糖提取工艺的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2005, 31(8): 104-106.

Optimization of Fermentation Conditions of Ferulic Acid Esterase Producers

FAN Yun-min, LI Xia-lan, FANG Bai-shan

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Fujian Province, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: The optimal parameters of fermentation conditions of ferulic acid esterase from brewer's spent grain were obtained through uniform design and quadratic polynomial regression techniques. The optimal culture medium were as follows (%): KH_2PO_4 0.30, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.60, NaCl 0.01, yeast powder 0.80, brewer's spent grain 1.33. Based on the results above, the influence of fermentation conditions on enzymes were also studied by single factor method and the optimal conditions were confirmed as follows: the optimization initial pH 6.0, cultural temperature 28 °C, the strain was cultivated with 75 mL medium in a 250 mL flask for 68 h on 210 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ shaker, inoculum concentration 5% and grain diameter 0.054 mm. Ferulic acid esterase reached 119.36 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ under optimal conditions, increased 32 times than that before optimization.

Keywords: ferulic acid esterase; brewer's spent grain; optimization; uniform-design

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)