

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.10.044

好食脉孢菌固态发酵醋糟产木聚糖酶的工艺优化

Optimization of xylanase production by a *Neurospora sitophila* through solid state fermentation

段睿¹ 邓永平^{1,2} 刘晓兰^{1,2}

DUAN Rui¹ DENG Yong-ping^{1,2} LIU Xiao-lan^{1,2}

郑喜群^{2,3} 姜欢笑¹ 马瑞¹

ZHENG Xi-qun^{2,3} JIANG Huan-xiao¹ MA Rui¹

(1. 齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

2. 黑龙江省玉米深加工理论与技术重点实验室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

3. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江 大庆 163319)

(1. College of Food and Biotechnology, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China; 2. Key

Laboratory of Corn Deep Processing Theory and Technology, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China;

3. College of Food, Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

摘要:以醋糟为主要原料,利用好食脉孢菌固态发酵生产木聚糖酶,以木聚糖酶活力为指标,通过单因素试验和正交试验对培养条件进行优化。结果表明:由 5 g 醋糟和 0.4 g 豆渣组成培养基,初始 pH 5.5,料水比 1 : 3 (g/mL),接种量 10⁶ 个孢子/瓶,28 °C 培养 3 d,该条件下的木聚糖酶活力为 412.34 U/g,较优化前(114.95 U/g)提高了约 3.59 倍。

关键词:好食脉孢菌;固态发酵;醋糟;木聚糖酶

Abstract: Using vinegar as the main raw material to produce xylanase by solid-state fermentation of *Neurospora sitophila*. Using the activities of xylanase as indicators, the medium and culture conditions were optimized by single factor experiment and orthogonal experiment. Results: The medium consisted of 5 g of vinegar and 0.4 g of bean dregs. The initial pH of the medium was 5.5, 10⁶ spores/Bottle of inoculum concentration and the solid-liquid ratio was 1 : 3 (g/mL), and the culture medium was cultured at 28 °C for 3 d. The enzyme activity was 412.34 U/g under the optimized conditions, which was increased about 3.59 times than that before optimization (114.95 U/g).

基金项目:黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(编号:135209268);齐齐哈尔市科学技术计划项目(编号:SFSG-201774);黑龙江省自然科学基金资助项目(编号:C201329)

作者简介:段睿,女,齐齐哈尔大学在读硕士研究生。

通信作者:邓永平(1978—),女,齐齐哈尔大学教授,博士。

E-mail: 913913_monkey@163.com

收稿日期:2019-05-08

Keywords: *Neurospora sitophila*; solid state fermentation; vinegar; xylanase

木聚糖是植物细胞壁中最丰富的半纤维素,是自然界中仅次于纤维素的多糖^[1]。木聚糖酶(EC 3.2.1.8)可将木聚糖水解成不同长度的低聚木糖和 D-木糖^[2],在工业上应用广泛,如用于纸浆改性^[3]、生产生物燃料^[4]、澄清果汁^[5]、提升饲料质量^[6]以及生产木糖醇^[7]等。2019 年 1 月 3 日,澳新食品标准局发布 70-19 号通告,拟批准来自里氏木霉转基因菌株的木聚糖酶作为烘焙产品生产中的加工助剂^[8]。

醋糟为酿造食醋后的废弃物,年产量巨大。由于难降解,纤维含量高,营养价值低,在养殖业中很难达到像酒糟、豆渣等糟渣类原料的高利用率;且由于酸度高,直接排放又易造成环境污染^[9]。好食脉孢菌是一种子囊菌属真菌,生长速率快,为常见工业真菌黑曲霉和产黄青霉的 2~3 倍^[10]。好食脉孢菌是 FDA 组织认证的安全性真菌^[11],已见关于好食脉孢菌降解纤维类底物富集蛋白质及产纤维素酶等产物的报道^[12-14]。课题组前期报道了好食脉孢菌发酵产木聚糖酶的工艺^[15-16],原有工艺分别是采用液态发酵和固态发酵产酶,所使用的培养基配方较复杂,且生产成本有进一步降低的空间。

由于固态发酵往往具有比液态发酵更高的产酶活力^[17],试验拟以富含纤维的醋糟废弃物醋糟为发酵底物,经好食脉孢菌固态发酵生产木聚糖酶,对发酵培养基组

成及培养条件进行优化,以期为木聚糖酶提供安全、价廉的新来源,也为醋糟的利用提供新途径,提高酿醋行业经济效益和社会效益。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌种

好食脉孢菌(*Neurospora sitophila*):齐齐哈尔大学食品与生物工程学院生物工程教研室菌种保藏室提供,分离自北方发酵豆制品。

1.1.2 材料与试剂

醋糟:齐齐哈尔市黑龙酿造有限责任公司;

木聚糖:美国 Sigma 公司;

其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器与设备

压力蒸汽灭菌锅:YXQ-SG46-280S 型,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;

高速冷冻离心机:Himac CF15RX 型,日立(中国)有限公司;

隔水式电热恒温培养箱:PYX-DHS·350-BS-II 型,上海跃进医疗器械厂;

分光光度计:TU-1810 型,北京普析通用仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 培养方法

(1) 斜面培养:培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),配制方法参照文献[18]。将 4℃ 保存的好食脉孢菌菌株挑取至 PDA 斜面上,28℃ 培养 3~5 d。

(2) 固态发酵培养:在 250 mL 三角瓶中装入 5 g 干醋糟,其他原料及配比根据试验确定。

1.2.2 氮源种类对木聚糖酶活力的影响 培养基碳源为 5 g 醋糟,氮源分别为 1% 醋糟质量的玉米蛋白粉、豆粕、干豆渣。料水比 1:3 (g/mL),初始 pH 为培养基自然 pH,灭菌后接入好食脉孢菌孢子悬液 1 mL(含孢子量 10^6 个/mL),28℃ 恒温培养 3 d 后测定木聚糖酶活力。

1.2.3 干豆渣浓度对木聚糖酶活力的影响 调节培养基中干豆渣浓度分别为醋糟质量的 0%,1%,2%,3%,4%,6%,8%,10%。将 5 g 干醋糟与上述不同浓度干豆渣加入到 250 mL 三角瓶中,料水比 1:3 (g/mL),灭菌后接入好食脉孢菌孢子悬液 1 mL(含孢子量 10^6 个/mL),28℃ 培养 3 d 后测定木聚糖酶活力。

1.2.4 培养基料水比对木聚糖酶活力的影响 250 mL 三角瓶中加入 5 g 醋糟和 0.4 g 干豆渣,调节培养基的料水比分别为 1:1,1:2,1:3,1:4,1:5 (g/mL),灭菌后接入好食脉孢菌孢子悬液 1 mL(含孢子量 10^6 个/mL),于 28℃ 培养 3 d 后测定木聚糖酶活力。

1.2.5 培养时间对木聚糖酶活力的影响 250 mL 三角瓶中加入 5 g 醋糟和 0.4 g 干豆渣,调节培养基的料水比分别为 1:3 (g/mL),灭菌后接入好食脉孢菌孢子悬液 1 mL(含孢子量 10^6 个/mL),于 28℃ 培养 2,3,4,5 d 后测定木聚糖酶活力。

1.2.6 正交试验优化 利用 $L_9(3^4)$ 正交试验对好食脉孢菌产木聚糖酶的培养基初始 pH、培养温度和接种量进行优化。

1.2.7 粗酶液的制备 培养结束后,向固态发酵培养物中加入 100 mL 生理盐水,180 r/min 浸提酶 2 h。浸提结束后,过滤,在 4℃、10 000 r/min 离心 10 min,得粗酶液。

1.2.8 酶活力的测定 参考 GB/T 23874—2009 方法,对酶促反应的温度和 pH 稍作修改。酶活力定义为在 40℃、pH 6.0 条件下,每分钟水解木聚糖生成 1 μ mol 还原糖所需酶的量为一个酶活力单位,用 U/g 表示。

1.3 数据统计分析

所有试验均重复 3 次,利用 Excel 2003 和 SPSS 软件对数据进行统计分析,字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线的测定

由图 1 可知,标准曲线 R^2 为 0.998 4,可用于好食脉孢菌固态发酵醋糟产木聚糖酶活力的测定。

2.2 氮源种类对木聚糖酶活力的影响

由图 2 可知,当以豆渣为氮源时,好食脉孢菌产木聚糖酶活力显著高于玉米蛋白粉和豆粕的($P < 0.05$),可

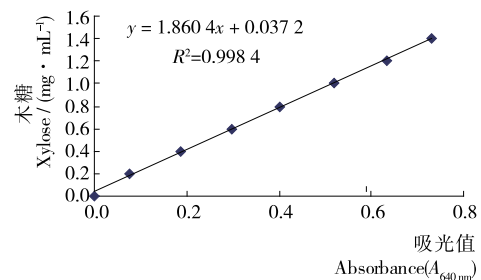


图 1 木糖标准曲线

Figure 1 Standard curve of xylose content

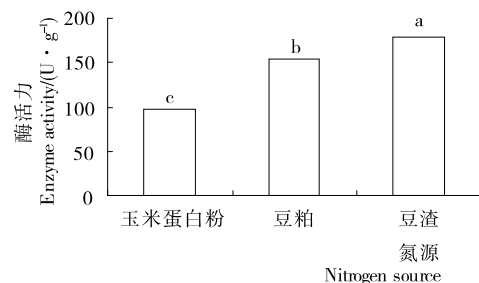


图 2 氮源种类对木聚糖酶活力的影响

Figure 2 Effect of nitrogen sources on xylanase activity

能是豆渣中含有较高含量的膳食纤维(干基中约占 60%)^[19],在发酵中起到了木聚糖酶诱导物的作用。

2.3 豆渣浓度对木聚糖酶活力的影响

由图 3 可知,随着豆渣浓度的提高,酶活力显著提高($P < 0.05$),当培养基中豆渣添加量为醋糟质量的 8% 时,木聚糖酶活力最高;当继续增加豆渣浓度至 10% 时,培养基状态较为黏稠,氧气流通性变差,不利于好氧菌的生长代谢,导致酶活力有所降低,与黑曲霉固态发酵豆渣生产纤维素酶及淀粉酶的研究结果^[20]相似。因此,确定培养基中豆渣浓度为醋糟质量的 8%。

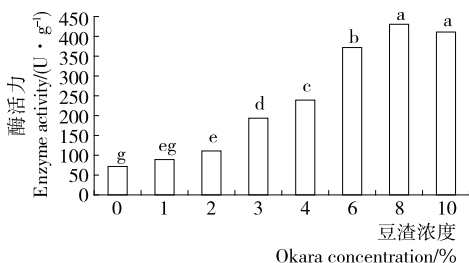


图 3 豆渣浓度对酶活力的影响

Figure 3 Effect of okara concentration on enzyme activity

2.4 培养基料水比对木聚糖酶活力的影响

大多数丝状真菌在固态基质表面或内部的生长状态取决于固态基质的孔隙率^[21]。培养基料水比对于营养物质的溶解状态,以及培养基的孔隙率均会有较大的影响,进而对菌体生长和活性物质的积累产生一定的影响。由图 4 可知,当料水比为 1:3 (g/mL) 时,木聚糖酶活力显著高于其他料水比的($P < 0.05$),达 400.19 U/g;继续加大培养基含水量会导致酶活力显著降低($P < 0.05$),因此,确定料水比为 1:3 (g/mL)。

2.5 培养时间对木聚糖酶活力的影响

由图 5 可知,随培养时间的延长,木聚糖酶活力呈先升高后逐渐降低的趋势,培养至 3 d 时酶活力显著增高($P < 0.05$),之后无显著性变化($P > 0.05$),因此,确定培养时间为 3 d。

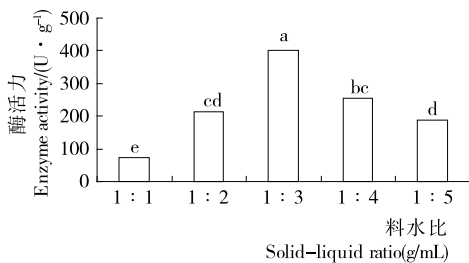


图 4 培养基料水比对酶活力的影响

Figure 4 Effect of the solid-liquid ratio of culture media on enzyme activity

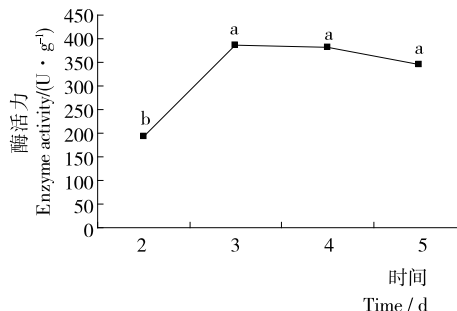


图 5 培养时间对酶活力的影响

Figure 5 Effect of the culture time on enzyme activity

2.6 正交试验优化

温度、培养基 pH 和接种量是影响固态发酵效率的 3 个主要因子^[22]。其中,温度的影响尤为显著,低温培养减缓菌丝代谢速率,延长生产周期,高温培养易导致菌丝快速老化,抑制产物生成,适宜丝状真菌产木聚糖酶的培养温度大多在 23~35 °C^[23];培养基 pH 影响物质的膜间运输,固态发酵过程主要研究培养基的初始 pH 值对产物的影响^[24],丝状真菌的最佳生长和产酶的初始 pH 范围大多在 3.8~6.0^[22];接种量对于维持固态发酵中菌丝生长和产物合成的平衡具有重要影响,接种量过小会导致生物量过低,而接种量过大会导致不必要的真菌生长和养分消耗,两种情况均导致酶的产量低下^[25],固态发酵中采用的孢子接种量通常为 10⁵~10⁷ 个孢子/g 干基^[22]。在前期预试验的基础上对好食脉孢菌发酵醋糟豆渣产木聚糖酶的培养基初始 pH、培养温度和接种量进行正交试验分析,试验因素水平设计见表 1,试验结果及方差分析分别见表 2、3。

由表 2 可知,好食脉孢菌固态发酵醋糟获取木聚糖酶的最优培养条件组合为:培养基初始 pH 5.5、培养温度 28 °C,接种量 10⁶ 个孢子/瓶,影响木聚糖酶活力的主次因素依次为培养温度>初始 pH 值>接种量。

由表 3 可知,培养温度对木聚糖酶活力有显著影响($P < 0.05$),初始 pH、接种量对木聚糖酶活力无显著影响。

最终确定好食脉孢菌发酵醋糟制备木聚糖酶的条件为:5 g 醋糟与 0.4 g 干豆渣组合,料水比 1:3 (g/mL),培养基初始 pH 5.5,接种量 10⁶ 个孢子/瓶,28 °C 发酵 3 d。

表 1 正交试验设计

Table 1 The design of orthogonal experiment

水平	A 初始 pH 值	B 培养温度/°C	C 接种量/Bottle ⁻¹
1	4.5	23	10 ⁵
2	5.5	28	10 ⁶
3	6.5	33	10 ⁷

表 2 $L_9(3^4)$ 试验结果Table 2 The result of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

处理	A	B	C	木聚糖酶活力/($U \cdot g^{-1}$)
1	1	1	1	197.77
2	1	2	2	402.65
3	1	3	3	235.87
4	2	1	2	232.67
5	2	2	3	382.75
6	2	3	1	245.98
7	3	1	3	195.87
8	3	2	1	272.87
9	3	3	2	193.77

k_1	278.76	208.77	238.87	
k_2	287.13	352.76	276.36	
k_3	220.84	225.21	271.50	
R	66.30	143.99	37.49	

表 3 木聚糖酶方差分析结果[†]

Table 3 The variance analysis of xylanase

因素	平方和	自由度	F 值	F 临界值	显著性
A	7 820.804	2	4.230	19.000	
B	37 271.327	2	20.161	19.000	*
C	2 493.466	2	1.349	19.000	
误差	1 848.680	2			

[†] * 表示差异显著($P < 0.05$)。

该条件下产酶活力为 412.34 U/g,较优化前(114.95 U/g)提高了约 3.59 倍。

3 结论

以酿造食醋下脚料醋糟为主要原料,利用好食脉孢菌固态发酵生产木聚糖酶,得到固态发酵培养基组成和培养条件:5 g 醋糟与 0.4 g 干豆渣组合,料水比 1:3 (g/mL),培养基初始 pH 5.5,接种量 10^6 个孢子/瓶,28 °C 发酵 3 d。此条件下产木聚糖酶活力为 412.34 U/g,较优化前(114.95 U/g)提高了约 3.59 倍。

将醋糟废物再利用,作为原料用于木聚糖酶的生产,有助于降低酶的生产成本,且醋糟中的半纤维素经微生物降解可为木聚糖酶提供诱导物,有助于进一步提高酶活力;同时,采用 FDA 认证的安全菌种好食脉孢菌作为生产菌种,提高了木聚糖酶的安全性,可进一步将其开发为食品或饲料用酶制剂。木聚糖酶是一种诱导酶,在培养基中添加适量的生物或非生物诱导子对酶活力的提高具有一定的促进作用,后续可进一步研究诱导子对酶活力的影响,以期能更大幅度地提高木聚糖酶活力。

参考文献

[1] COLLINS T, GERDAY C, FELLER G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases[J]. FEMS Microbiol Rev, 2005, 29(1): 3-23.

- [2] MAITY C, GHOSH K, HALDER S K, et al. Xylanase isozymes from the newly isolated *Bacillus* sp. CKBx1D and optimization of its deinking potentiality [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 167(5): 1 208-1 219.
- [3] VINOD K N, RANI M E, GUNASEELI R, et al. Paper pulp modification and deinking efficiency of cellulase-xylanase complex from *Escherichia coli* SD5 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 111(9): 289-295.
- [4] YANG Ming, ZHANG Jun-hua, KUITTINEN S, et al. Enhanced sugar production from pretreated barley straw by additive xylanase and surfactants in enzymatic hydrolysis for acetone-butanol-ethanol fermentation[J]. Bioresource Technology, 2015, 189(8): 131-137.
- [5] ADIGUZEL G, FAIZ O, SISECIOGLU M, et al. A novel endo- β -1,4-xylanase from *Pediococcus acidilactici* GC25: Purification, characterization and application in clarification of fruit juices[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 129(10): 571-578.
- [6] ZHAI Heng-xiao, LUO Yan-hong, REN Wen, et al. Digestible energy of a corn-soybean meal-based diet supplemented with xylanase for nursery pigs in metabolism crates and floor pens[J]. Livestock Science, 2018, 218(12): 65-69.
- [7] SENA L M, MORAIS C G, LOPES M R, et al. D-Xylose fermentation, xylitol production and xylanase activities by seven new species of *Sugiyamaella*[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2017, 110(1): 1-15.
- [8] 澳新食品标准局. 澳新拟批准来自里氏木霉转基因菌株的木聚糖酶作为加工助剂[EB/OL]. (2019-01-03) [2019-05-28]. <http://news.foodmate.net/2019/01/501066.html>.
- [9] 田波, 赵顺华, 张俊红, 等. 醋糟资源化利用研究进展[J]. 中国酿造, 2017, 36(3): 1-4.
- [10] SOLOMONS G L. Submerged culture production of mycelial biomass[M]. London: Edward Arnold, 1975: 249-264.
- [11] DAVID D P, ROWLAND H D. Evidence for safety of *Neurospora* Species for academic and commercial uses[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66 (12): 5 107-5 109.
- [12] OGUNTININ G, VLACH D, MOOYOUNG M. Production of cellulolytic enzymes by *Neurospora sitophila* grown on cellulosic materials[J]. Bioresource Technology, 1992, 39(3): 277-283.
- [13] SHOJAOSADATI S A, FARAIDOUNI R, MADADI-NOUEI A, et al. Protein enrichment of lignocellulosic substrates by solid state fermentation using *Neurospora sitophila* [J]. Resources Conservation and Recycling, 1999, 27(1/2): 73-87.
- [14] HANSEN G, FRISVAD J, ANDERSEN B, et al. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(9): 1 327-1 341.