

β -葡萄糖苷酶产生菌的选育

姚卫蓉 曹霖

(无锡轻工大学食品学院, 无锡 214036)

摘要 对 β -葡萄糖苷酶活力为 $0.497 \mu\text{mol}/(\text{s}^\circ\text{g})$ 的无花果曲霉 101 菌株进行 Co^{60} 及 UV 和 NTG 诱变, 得到一株产酶提高 1.72 倍的 L2 菌株; 再经发酵培养基及培养条件, 包括碳源、氮源、有机酸、表面活性剂、金属离子、产酶诱导剂、培养温度、水分、初始 pH 值、通风量、接种形式及接种量等的优化, 以优化得到的最佳条件固态发酵 6 d, 产酶稳定在 $4.17 \sim 4.67 \mu\text{mol}/(\text{s}^\circ\text{g})$.

关键词 无花果曲霉; β -葡萄糖苷酶; 诱变; 优化

中图分类号 Q93-335

0 前言

β -葡萄糖苷酶是纤维素酶系中的一个组成部分, 它可将内切、外切葡聚糖酶水解下来的纤维二糖再次降解成葡萄糖, 该酶主要作用于 β -(1, 4) 糖苷键, 还能作用于 (1, 1) (1, 2) (1, 3) (1, 6) 键, 它可将水果中以键合态存在的香气组分释放出来, 增加水果的香气, 从而提高果制品的品质。 β -葡萄糖苷酶在植物、微生物及动物体内均有分布^[1]。苦杏仁是该酶的经典来源^[2], 曾有关于该酶在蕃木瓜^[3]、李^[4]等植物组织中存在的研究报导。考虑到该酶的植物来源有限及研究成本, 故选择微生物作为该酶的酶源。根据报导, 许多微生物中发现有该酶, 如康氏木霉^[5]、梭状芽孢杆菌^[6]、链霉^[7]、曲霉^[8]、酵母^[9]等。

1 材料与方法

1.1 菌种

所有菌种均选自上海工业微生物研究所及无锡轻工大学。

1.2 培养基

1.2.1 紫外诱变后暗培养及其条件 葡萄糖 1%, 牛肉膏 1.4%, 蛋白胨 0.4%, 酵母膏 0.7%; pH 7.0, 30°C , 180 r/min 回转式摇瓶 24 h, 装液量 25 ml (250 ml 三角瓶)

1.2.2 分离培养基及条件 甘油 10%, 去氧胆酸钠 0.1%, 土豆 20%, 葡萄糖 2%, 琼脂

该课题为国家“八五”攻关项目

收稿日期: 1997-03-21

第一作者: 姚卫蓉, 女, 1970 年 10 月出生, 工学硕士, 工程师

1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

1. 5% ; 自然 pH(土豆去皮,切成约 1 cm 见方的块,加蒸馏水煮沸 20 min,纱布过滤后,取其滤液), 30℃,培养 2 d.

1. 2. 3 初筛培养基及条件 土豆 20%,葡萄糖 2%,琼脂 1. 5%; 自然 pH,灭菌冷却至 60℃左右加入 0. 1% ρ NPG,用自制特殊培养皿于 30℃培养 5 d.

1. 2. 4 固态发酵培养条件 麸皮 5 g,乳酸 1. 0%,水 7. 5 ml; 自然 pH, 30℃,培养 6 d.

1. 2. 5 对照固态发酵培养基及条件 麸皮 5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1. 5%, MgSO_4 0. 6%, 尿素 0. 3%, 去离子水 7. 5 ml; pH5. 5, 30℃,培养 6 d.

1. 3 酶活测定方法

取 0. 1 ml 适当稀释的酶液,加入 0. 9 ml pH4. 5 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液 (Na_2HPO_4 浓度为 0. 2 mol/L,柠檬酸浓度为 0. 1 mol/L),于 50℃水浴预热 10 min,再加入已预热 10 min 的 1 ml 5 mmol/L ρ NPG 溶液,计时, 10 min 后立即加入 1 ml 1 mol/L Na_2CO_3 溶液终止反应,冷却至室温,于 410 nm 处测消光值 OD. 以经过加热失活的酶液,按照同样方法处理作空白

1. 4 酶液的提取

每克发酵酶曲加 pH4. 5 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液 10 ml 于 30℃下 180 r/min 回转式摇瓶 2 h.

1. 5 试剂及材料

ρ NPG Sigma 公司产品; NTG Fluka 进口分装; 乳酸 无锡民丰试剂厂产品

1. 6 诱变方法

1. 6. 1 NTG, UV 诱变 见文献 [10]

1. 6. 2 Co^{60} 诱变 制备新鲜孢子悬浮液 5 ml (浓度 $10^7 \sim 10^8$ /ml), 装入试管,置于 Co^{60} 辐射装置内,处理剂量 36. 12 C/kg (离辐射源距离 10. 5 cm,照射时间 30 min).

1. 7 筛选过程

诱变 $\rightarrow$ 分离单菌落 $\rightarrow$ 初筛 $\rightarrow$ 复筛 $\rightarrow$ 再复筛

1. 7. 1 分离单菌落 将诱变后的孢子悬浮液稀释成不同浓度,各取 0. 2 ml 涂布于装分离培养基的平皿内, 2 d 后开始形成单菌落.

1. 7. 2 初筛 将平皿内分离出的单菌落用牙签挑至初筛培养皿的各个小室中, 5 d 后喷洒 1 mol/L Na_2CO_3 显色,挑取黄色较深的菌株直接进行复筛.

1. 7. 3 复筛 采用固态发酵,每个菌株 1 瓶, 6 d 后测酶活

1. 7. 4 再复筛 取复筛得到的高酶活菌株进行再次复筛,每株 2 瓶, 6 d 后测酶活

2 结果与讨论

2. 1 出发菌株

从上海工业微生物研究所和本校生物工程学院菌种保藏室得到 20 多株产纤维素酶、糖化酶、液化酶的霉菌、细菌,对这些菌株筛选,酶活大于 $0. 333 \mu\text{mol}/(\text{s}^\circ \text{g})$ 的有 6 株,其中无花果曲霉 101 产酶相对较高,为 $0. 497 \mu\text{mol}/(\text{s}^\circ \text{g})$. 详细情况见表 1.

2. 2 诱变结果

出发菌株无花果曲霉 101 经一次 Co^{60} , 一次 UV, 两次 NTG 诱变,酶活由初始的 $0. 497 \mu\text{mol}/(\text{s}^\circ \text{g})$ 提高至 $1. 353 \mu\text{mol}/(\text{s}^\circ \text{g})$,提高了 1. 72 倍. 诱变图谱如下:

出发菌株 $\xrightarrow[15\text{ W}, 20\text{ min}]{\text{UV}}$ 5-3 $\xrightarrow[36.12\text{ C/kg}]{\text{C}_6\text{O}_6}$ SH7 $\xrightarrow[1.0\text{ g/L}, 40\text{ min}]{\text{NTG}}$ Q18 $\xrightarrow[0.5\text{ g/L}, 30\text{ min}]{\text{NTG}}$ D19 $\xrightarrow{\text{自然选择}}$ L2

2.3 L2菌株发酵条件的优化

2.3.1 碳源 将各种碳源替代对照培养基中的麸皮,结果发现菌种在所有碳源上不是生长不好,就是产酶太低。如土豆粉、可溶淀粉、微晶纤维素作碳源,经杀菌后成糊状,通风性太差,菌种无法生长。因此,决定采用麸皮与各种碳源在总干物质(5 g)不变的条件下按不同的配比混作碳源,即麸皮:各碳源为 9:1, 8:2, 7:3。由实验可知,有利于产酶的配比碳源依次为麸皮-豆渣(7:3),麸皮-土豆粉(8:2),麸皮-CMC(9:1),麸皮-可溶

表 1 出发菌株的选择

		$\mu\text{mol}/(\text{s}^\circ\text{g})$	
编号	原编号	名 称	酶活
1		<i>Aspergillus niger</i>	0.398
2		<i>Aspergillus niger</i>	0.450
3		<i>Aspergillus niger</i>	0.363
4		<i>Aspergillus niger</i>	0.347
15		<i>Aspergillus niger</i>	0.432
21	101	<i>Aspergillus ficuum</i>	0.497

淀粉(7:3),麸皮-大麦粉(8:2),麸皮-米糠(9:1),麸皮-稻壳(9:1),抑制产酶的碳源为微晶纤维素、玉米粉。麸皮-豆渣在所试验的范围内均有利于产酶,特别是以 7:3 的比例加入时产酶提高近一倍。有趣的是,促进产酶的几种碳源中除可溶淀粉、CMC较贵外,其余几种都是农副产品,价格便宜,这就为该酶的工业化生产创造了条件。

2.3.2 氮源 作为培养基的氮源可以是有机氮或无机氮,将各种氮源替代对照培养基中的氮源(尿素和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$),氮源的加入量一律按氮元素的 0.3%, 0.5%, 0.7% 加入。结果表明,在试验范围内 NH_4Cl 以 2.0% 的加入量,酶活提高最多,提高约 50%。对产酶有促进作用的氮源依次为 NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 尿素, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 牛肉膏,菜籽粕。总的看来,无机氮比有机氮更适合于该菌株产酶。由 NH_4NO_3 , NaNO_3 的酶活看, NO_3^- 中的氮元素并不促进此菌株产酶,而 NH_4^+ 中的氮元素能很好的被 L2 菌株利用,含 SO_4^{2-} 和 CO_3^{2-} 的氮源抑制产酶, HPO_4^{2-} 有利于产酶,尿素对酶活无多大帮助。

2.3.3 糖类 本实验中以葡萄糖、蔗糖、乳糖、山梨糖、菊糖、果糖、半乳糖、棉子糖、甘露糖、鼠李糖、木糖、苦杏仁苷、纤维二糖等作固体曲的补充碳源及诱导剂,按 0.5%, 1.0%, 2.0% 的加入量添加到对照培养基中。结果表明,各种糖均抑制产酶,说明此无花果曲霉产生的 β -葡萄糖苷酶是组成型酶,而不是诱导酶。各种糖的添加量越大,绝大多数酶活相应地降低得更多,说明高浓度的糖对产酶有抑制作用,影响了酶的合成。

2.3.4 表面活性剂 本实验中将 11 种表面活性剂,各按 0.03%, 0.10%, 0.20% 的加入量添加到对照培养基中。结果表明,促进产酶的依次为 0.20% 十二烷基磺酸钠, 0.2% MES, 0.05% K-12, 0.10% Span-60, 0.1% 十二烷基硫酸钠, 0.1% 十二醇油酸钠。其中添加十二烷基磺酸钠效果最好,酶活提高近 50%。由于表面活性剂改变了细胞膜的透性,或改变了膜的选择性,加快了酶的分泌排出,使细胞内的酶水平达不到临界水平,从而提高产酶。而添加 Tween-80, Tween-40, Tween-20, AES,油酸钠和丝肽均抑制产酶。

2.3.5 有机酸和氨基酸 实验结果表明,促进产酶的有机酸和氨基酸依次为 L-苯丙氨酸、丙酸、柠檬酸、乳酸、丁二酸、L-酪氨酸。其中添加 0.1% L-苯丙氨酸提高酶活 40% 左右。另外 4 种有机酸(苹果酸、乌头酸、异丁酸、异戊酸)抑制产酶。部分有机酸和氨基酸促进产酶有可能是补充了碳源,增加了培养基内碳源的量。

2.3.6 金属离子 本实验中考察了常量元素 (Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Fe^{2+}) 和微量元素 (Mn^{2+}

Zn^{2+} 等) 对产酶的影响。结果表明,加入 0.2% Ca^{2+} 促进产酶,说明 Ca^{2+} 可能是 β -葡萄糖苷酶的辅助因子。 K^+ 的存在不影响酶活。几乎所有微量元素均抑制产酶

2.3.7 水分 固体发酵中水分的影响,不仅在于水分为微生物生长代谢所必需,而且含水量的多少与通气有着密切关系。作者考察了不同水分 (1.0~ 5.0 ml) 对酶活的影响,结果见图 1,当每克麸皮中加入 1.5 ml 水时产酶最高,而后水分越多,酶活越低。

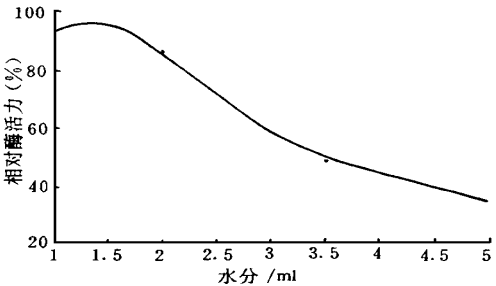


图 1 水分对酶活的影响

2.3.8 温度 不同的微生物生长对温度有不同的要求,本实验考察了三个温度 $30^{\circ}C$, $33^{\circ}C$, $36^{\circ}C$ 。图 2 中显示, $30^{\circ}C$ 时,产酶高峰期在第 6 天; $33^{\circ}C$ 时,高峰期约在第 5 天,酶活降低; $36^{\circ}C$ 时,高峰期又提前在第 4 天,酶活降得更低。说明,此无花果曲霉 L2 菌株的最适发酵温度在 $30^{\circ}C$ 左右。温度太高,生长加快,产酶高峰期提前,但酶活降低。在第 3 天和第 4 天时, $33^{\circ}C$ 发酵优于 $30^{\circ}C$,而 $36^{\circ}C$ 发酵的酶活始终最低,说明对于无花果曲霉 L2 菌株, $36^{\circ}C$ 太高,菌体的生长、繁殖受抑制。

2.3.9 初始 pH 值 培养基的 pH 值影响细胞膜表面基团的解离及其微观结构,进而影响营养物的吸收及代谢物的分泌,导致微生物的生长和代谢发生变化。由于是固体培养,中间 pH 很难控制,因此只考虑起始 pH 对产酶的影响。从图 3 可见,起始 pH 以 5.50 为好。

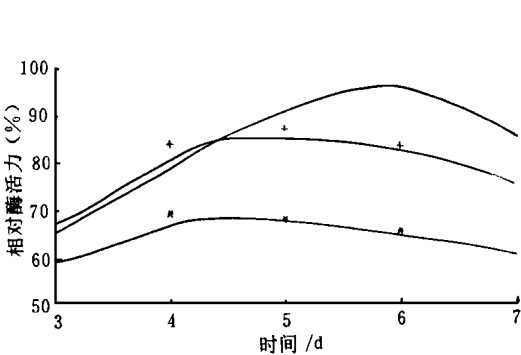


图 2 发酵温度对产酶的影响
1 $30^{\circ}C$ 2 $33^{\circ}C$ 3 $36^{\circ}C$

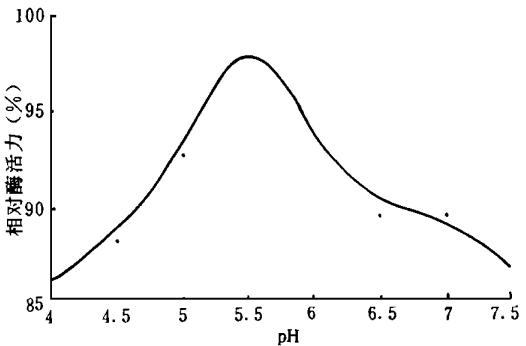


图 3 初始 pH 对酶活的影响

2.3.10 通风量 酶制剂工业上使用的菌株绝大多数是好氧菌,适量的氧气供给有利于菌体的生长、代谢及产酶,供氧不足或供氧过多都会严重地影响微生物的生理代谢和产酶量。研究浅盘培养时不同料层厚度对产酶的影响,结果见表 2。结果显示,当料层厚度为 0.5 cm 时产酶最高,说明此 L2 菌株是好氧菌,其生长、繁殖过程需足够的氧气。

表 2 料层厚度对产酶的影响

料层厚度 (cm)	0.2	0.5	1.0	1.5	2.0
相对值 (%)	45.09	100.00	73.64	59.09	42.73

2.3.11 接种量及接种形式

1) 实验中采用种子培养基培养出的孢子悬浮液接种,以每毫升悬浮液中所含孢子个数来计量接种量。将孢子浓度为 $4. \times 10^7$ /ml 的孢子悬浮液按不同的量接入固态发酵培养基中,结果见表 3,可知,接入 0.5 ml 时产酶最高。当接种量小时,发酵迟缓,产酶也相应延迟。接种量太大,影响发酵培养基的组成,新生菌体少,因此产酶受影响。

表 3 孢子接种量对产酶的影响

接种量 (ml)	0.1	0.3	0.5	1.0	1.5	2.0
相对值 (%)	81.65	90.35	100.0	79.11	80.54	81.65

2) 实验中,从种子培养基培养出的菌丝体按质量分数 6%,10%,20% 接种,并与孢子接种相比较,由图 4 可知,菌丝体接种的酶活均高于孢子接种的酶活,孢子接种的产酶高峰期在第 6 天,菌丝体接种产酶高峰期提前在第 5 天。孢子接种和菌丝体接种相比,孢子接种由于有一个孢子萌发过程,因此生长要比菌丝体迟缓,并且孢子萌发生长菌丝体需要营养,要先利用一部分碳源,而培养基中总碳源并不能随意增加,这关系到培养基

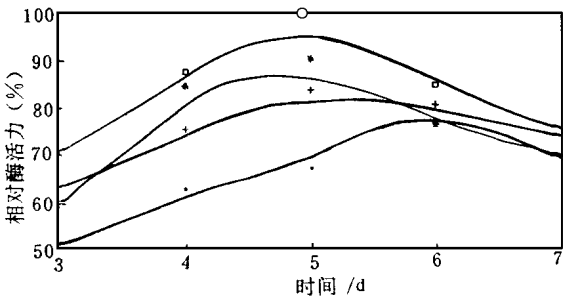


图 4 菌丝体、孢子接种对酶活的影响

1 孢子; 2 6% 菌丝体; 3 10% 菌丝体; 4 20% 菌丝体

配比问题。因此相对来说,产酶时的底物浓度降低了,产酶也就相对减少了。而菌丝体接种的培养物代谢旺盛,对纤维素基质消耗快且菌体衰老慢,因而缩短了产酶延滞期,从而提高产酶水平。用菌丝体接种,在试验范围内,接种量越多,产酶也越多,但并不是说接种菌丝体越多越好,因为,菌丝体中带入的种子培养基的量也多了,这样会影响培养基的组成。根据平时的实践经验及单因子试验,按下表(表 4)配方进行实验,以进一步确定培养基最佳组成。经上述比较,决定采用下述培养基:麸皮 3.5 g,豆渣 1.5 g, NH_4Cl 5.0%, CaCl_2 0.4%, L-苯丙氨酸 0.1%, SDS 0.2%, 去离子水 7.5 ml, pH5.5。

表 4 实验配方

培养基组成	A	B	C	D	E	F	G
豆渣 (g)	2.5	2.5	1.5	2.5	2.5	2.5	2.5
麸皮 (g)	2.5	2.5	3.5	2.5	2.5	2.5	2.5
$\text{NH}_4\text{Cl}(\%)$	3.0	4.0	2.0	5.0	4.0	4.0	5.0
尿素 (%)	1.5	1.0	0.3	—	1.0	—	—
$\text{CaCl}_2(\%)$	0.4	0.4	0.2	0.4	—	0.4	0.4
L-苯丙氨酸 (%)	0.1	0.1	0.1	乳酸 0.1	0.1	0.1	0.1
SDS (%)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
酶活 ($\mu\text{mol}/(\text{s} \cdot \text{g})$)	1.799	2.097	2.737	2.369	1.815	2.092	2.676

2.3.12 固态发酵曲线 根据前面摸索的固态发酵条件,确定了固态发酵培养基配方,用孢

子接种发酵 6 d, 测定固态发酵过程中酶活 发酵浸出液(蒸馏水提取) pH 变化 见图 5。

从发酵过程曲线的结论分析:

1) 从发酵曲线的 pH 变化来看, 固态发酵时的 pH 呈先降后升的趋势, pH 的下降可能与 NH_4Cl 中的 NH_4^+ 被菌体吸收利用有关, 而开始大量产酶时 pH 又回升, 则可能是菌体生长代谢产物分泌所引起。

2) 无花果曲霉生长旺盛, 在发酵的第 3 天以后, 基本不再染菌, 3 d 以后即使敞口培养, 对酶产量也无影响。但在 3 d 之前一定要注意无菌培养。采用上述最佳培养基及条件, 发酵无花果曲霉 L2 菌株的酶产量稳定在 $4.17 \sim 4.67 \mu\text{mol}/(\text{s}^\circ \text{g})$ 。

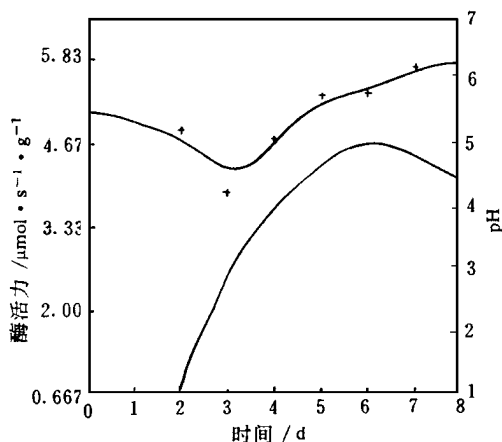


图 5 固态发酵过程曲线

1 酶活

2 pH

参 考 文 献

- 1 吴东儒. 糖类的生物化学. 北京: 高等教育出版社, 1987
- 2 Ashok K, Grover et al. Biochimica Acta. 1977, 482 98
- 3 Jenny Hartmann-Schreier et al. Food Chemistry. 1987, 26 201
- 4 Heuser C W. Phytochemistry. 1972, 11 2455
- 5 汪大受等. 生物化学与生物物理学报, 1980, 12(3): 293
- 6 AL T N, et al. Biochem and Biophys Research Commu., 1979, 90(2): 537
- 7 Satoru Kusama, et al. Agric Biol Chem, 1985, 49(7): 2055
- 8 Gokhale D V, et al. Biotechnology Letters, 1984, 6(11): 719
- 9 Jacob D, Duerksed, et al J Biol Chem., 1958, 233(5): 1113
- 10 诸葛健等. 工业微生物实验技术手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1994

Breeding of β -glucosidase hyperproducer

Yao Weirong Ding Xiaolin

(School of Food Science & Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract The initial strain *Aspergillus ficum*, its activity of β -glucosidase being $0.497 \mu\text{mol}/(\text{s}^\circ \text{g})$, was subjected to alternating treatment of NTG, Co^{60} and UV irradiation, the enzyme yield of the new strain L2 increased for 1.72-fold. The fermentation conditions in solidified medium for the mutant were optimized, including carbon source, nitrogen source, mineral salts, organic acid, surfactant, additive, initial pH of the medium, moisture, cultivation temperature and aeration, etc. Under the optimal conditions, the activity of β -glucosidase was at the level of $4.17 \sim 4.67 \mu\text{mol}/(\text{s}^\circ \text{g})$.

Key-words *aspergillus ficum*; β -glucosidase; mutant; optimize

(责任编辑: 秦和平)