

文章编号:1673-1689(2005)03-0057-04

产 β -葡聚糖酶淀粉液化芽孢杆菌的选育

林小杰, 李崎, 顾国贤

(江南大学 教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要:通过对一株淀粉液化芽孢杆菌进行紫外和 ^{60}Co 逐级诱变,使该菌株产 β -葡聚糖酶酶活从80 U/mL提高到105 U/mL;对突变株进行多次单菌落分离及传代,对其传代稳定性的研究表明:该菌株产酶性能稳定;在5 L发酵罐中突变株的产酶水平比摇瓶要高,可达120 U/mL,产酶周期比摇瓶缩短了15 h.

关键词:淀粉液化芽孢杆菌;筛选;发酵

中图分类号:TQ 920

文献标识码:A

Screening of *Bacillus amyloliquefaciens* Mutant 5582 in Production β -glucanase

LIN Xiao-jie, LI Qi, GU Guo-xian

(Key Lab of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: One strain *Bacillus amyloliquefaciens* was treated with UV, ^{60}Co , and the over-producing β -glucanase mutant *Bacillus amyloliquefaciens* 5582 was obtained. The β -glucanase activity was improved from 80 U/mL to 105 U/mL. In 5 L fermentation the activity of the producing β -glucanase mutant reached 120 U/mL, and the production cycle was shortened 15 h than that in the conical flask.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*; screening; fermentation

β -葡聚糖酶广泛应用于食品和发酵工业. 美国、日本、丹麦、德国、澳大利亚、加拿大等国均已采用 β -葡聚糖酶作为啤酒工业的主要酶制剂之一^[1]. β -葡聚糖是自然合成的多糖,是大麦籽粒中半纤维素的主要组分之一,其含量与大麦品种有关,见表1^[2]. β -葡聚糖过多地存在会增加麦汁(或啤酒)的粘度,使其过滤困难,还容易造成啤酒混浊和沉淀. 外加 β -葡聚糖酶对 β -葡聚糖进行降解,不仅可解决上述问题,还可提高麦汁得率,增加可发酵糖的

含量.

表1 不同品种100 g绝干大麦芽中 β -葡聚糖质量

Tab. 1 The content of β -Glucan in different malt

麦芽	β -葡聚糖质量/mg
加拿大大麦芽	350
澳大利亚大麦芽	255
国产沪麦大麦芽	450

中国在该酶的研制方面起步较晚,缺乏高酶活

收稿日期:2004-06-16; 修回日期:2004-09-22.

作者简介:林小杰(1979-),女,山东烟台人,发酵工程硕士研究生.

万方数据

性的优良菌种,而进口酶制剂价格昂贵,以致国内啤酒厂仍采用常规麦芽糖化发酵酿酒。此外,由于 β -葡聚糖酶对饲效的提高也很有帮助,因而也作为畜禽饲料的添加剂之一。

目前国内外主要利用微生物法来生产 β -葡聚糖酶^[3]。虽然多种微生物能产生专一性降解混合键型葡聚糖的内- β -1,3-1,4-葡聚糖酶^[4,5],但绝大多数菌株的酶系对大麦 β -葡聚糖无特异性,能特异分解大麦 β -葡聚糖酶的菌株主要来源于芽孢杆菌属和曲霉属。不同来源的 β -葡聚糖酶有不同的最适温度,其中芽孢杆菌属来源的 β -葡聚糖酶最适温度在60℃以上,而黑曲霉属来源的 β -葡聚糖酶最适温度与内源 β -葡聚糖酶类似,因此不宜用于酿造过程^[6]。作者研究的淀粉液化芽孢杆菌除了产 β -葡聚糖酶还可产蛋白酶和 α -淀粉酶,通过对其进行紫外诱变,选育出产 β -葡聚糖酶酶活较高的菌株。

1 材料与方 法

1.1 菌种

淀粉液化芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* B-19,由江南大学生物工程学院保藏。

1.2 培养基

斜面培养基(g/dL):蛋白胨 1.0,牛肉膏 0.5, NaCl 0.5,琼脂 2.0。pH 7.0,0.1 MPa/cm²灭菌 20 min。

分离培养基与斜面培养基相同。

种子培养基(g/dL):蛋白胨 1.0,牛肉膏 0.5, NaCl 0.5。pH 7.0,0.1 MPa/cm²灭菌 20 min。

鉴定培养基(g/dL):蛋白胨 1.0,牛肉膏 0.5, NaCl 0.5, β -葡聚糖 0.005,刚果红 0.01。pH 7.0, 0.1 MPa/cm²灭菌 20 min。

发酵培养基(g/dL):玉米粉 4,豆饼粉 4,大麦粉 2,Na₂HPO₄ 0.8,(NH₄)₂SO₄ 0.4,NH₄Cl 0.075,CaCl₂ 0.1。pH 6.5,0.1 MPa/cm²灭菌 20 min。

1.3 诱变方法

1.3.1 单细胞悬浮液的制备 保藏斜面菌种接种于肉汤摇瓶,37℃培养 12 h 至对数生长期,用 0.9%的无菌生理盐水于 4 000 r/min 离心洗涤 2 次,转移到有玻璃珠的无菌三角瓶中震荡打散,用无菌脱脂棉过滤,然后用生理盐水将单细胞悬浮液稀释到 10⁷个/mL,得单细胞悬浮液备用。

1.3.2 紫外诱变 吸取出发菌株 B-19 的单细胞悬浮液并计数,接入直径 9 cm 的底部平整的培养皿

中,将盛有悬浮液的培养皿置于诱变箱内紫外灯管下的磁力搅拌器上,培养皿距功率 15 W 的紫外灯管的垂直距离为 10 cm(紫外灯预热 30 min 使光波稳定)。调节搅拌子的转速,转速稳定后,打开培养皿盖子照射,并开始计时。14 个平皿,每两个为一组,共分 7 组,分别照射 0,5,10,15,20,25,30 s。从每个平皿中取出 0.1 mL 的菌悬液,稀释 10⁵ 倍,取稀释后的菌悬液 0.3 mL,涂布分离培养基平板,然后置于 37℃恒温培养箱培养(为避免光复活,平皿需用黑纸或牛皮纸包裹)^[6]。整个诱变操作过程均需在红光下进行,2 d 后长成菌落,统计菌落数并计算致死率,致死率计算公式为:

$$\text{致死率} = \frac{\text{照射前每毫升活菌数} - \text{照射后每毫升活菌数}}{\text{照射前每毫升活菌数}}$$

每组以两个平皿菌落的平均值作为该组的菌落数。

1.3.3 ⁶⁰Co 辐射诱变 吸取由菌株 Z-52 制得的单细胞悬浮液,分别注入 6 个直径 1.8 cm、长 18 cm 的无菌试管中,每个试管的装液量为 5 mL。用⁶⁰Co 发出的 γ 射线处理,分别采用 5×10⁴,6×10⁴,7×10⁴,8×10⁴ R 剂量处理。分别从每个试管样品取出 0.1 mL 的菌悬液做适当稀释。吸取稀释后的菌悬液 0.3 mL,涂布分离培养基平板,倒置于 37℃恒温培养箱培养。菌落长好后计数,并计算致死率。

1.4 筛选方法

1.4.1 β -葡聚糖酶突变株的平板初筛 β -葡聚糖分子能与刚果红染料紧密结合,菌体产酶时其周围的葡聚糖被降解后形成透明圈,应用此原理可进行菌种初筛。将诱变后的菌悬液,稀释后涂布于斜面培养基平板上,24 h 后将长出的菌落点种于鉴定培养基平板上。48 h 后根据菌落直径与水解圈直径比值,挑选单菌落传代于斜面培养基上扩大培养。

1.4.2 摇瓶初筛 上述扩大培养后的菌株,分别接入种子培养基,于 37℃,200 r/min 培养 12 h,以体积分数 8%接种至发酵培养基,37℃培养 60 h,10 000 r/min 离心,取上清液稀释相应的倍数测定酶活。

1.4.3 摇瓶复筛 挑选一定量的初筛最佳菌种,接种摇瓶进行复筛,复筛条件及方法同初筛。每株菌做 3 个平行,取其平均值。

1.5 分析方法

1.5.1 β -葡聚糖酶分析方法 0.1 mL 稀释酶液加 0.4 mL 底物,于 40℃反应 10 min,每个样品中加入 3 mL 沉淀液,离心,测定上清液在 590 nm 处的吸收值 A,以 0.1 mL 蒸馏水代替酶液做空白。

酶活计算公式:

酶活(U/mL)=[(A₅₉₀+0.001238)/0.8903]×n
n 为发酵液稀释倍数
 β -葡聚糖酶酶活定义:1 mL 发酵液于 40 ℃、pH 6.5,每分钟分解大麦 β -葡聚糖产生 1 μ mol 还原糖定义为 1 个酶活单位。
1.5.2 蛋白酶分析方法 见文献[8].

2 结果与讨论

2.1 出发菌株的选择

测定 B-1、B-14、和 B-19 淀粉液化芽孢杆菌的 β -葡聚糖酶和蛋白酶两个指标,挑选适宜的菌株作为出发菌株,结果见表 2.

表 2 出发菌株的选择
Tab.2 The selection of primordial strain

菌株	β -葡聚糖酶酶活/(U/mL)	蛋白酶酶活/(U/mL)
B-1	77.65	874.23
B-14	75.62	674.88
B-19	81.43	542.33

从 B-1、B-14、和 B-19 这 3 株菌的测定结果来看,B-19 菌的 β -葡聚糖酶酶活较高而蛋白酶酶活较低,是理想的出发菌株.

2.2 稀释倍数的确定

种子液稀释倍数在 10~10³ 时,平板菌落成密集状,无法记数;在 10⁴ 倍时菌落在千个左右,悬浮液中的细菌尚未形成单细胞状态.为此,确定 10⁵ 倍为悬浮液稀释倍数.10⁶ 倍平板菌落较少,减少了出现高产突变株的概率.单细胞菌悬液平板培养菌落记数见表 3.

表 3 稀释倍数与菌落数的关系

Tab.3 The relationship between diluent multiple and the number of colony

稀释倍数	各稀释度平行菌落数		各稀释度平均菌落数
10 ⁴	980	840	910
10 ⁵	62	87	75
10 ⁶	0	20	10

2.3 紫外线诱变致死率的测定

计算不同照射时间下的紫外杀菌曲线,结果见图 1.从图 1 可以看出,该菌对紫外线较为敏感,随着时间的延长,致死率急剧增加,照射 30 s 的致死率为 100%,照射10 s 的致死率为 80%.故选择 10 s 为紫外诱变菌种的最适时间.

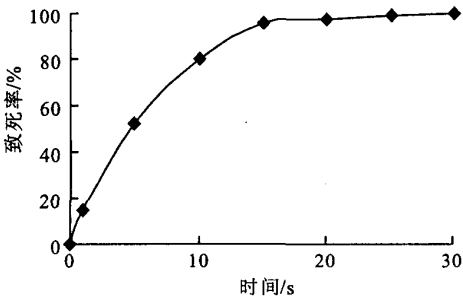


图 1 紫外诱变照射时间与致死率关系曲线
Fig.1 The relationship between UV dosage and lethality

2.4 紫外线诱变结果

分离紫外线诱变得到的突变株 60 株,每株一瓶进行初筛得到 13 株较好的菌株,再将 13 株菌株按每株 3 瓶进行复筛,结果见表 4.

表 4 紫外诱变结果
Tab.4 The production of mutagenesis by UV

菌株编号	β -葡聚糖酶相对酶活/%	蛋白酶相对酶活/%
原菌	100	100
Z-6	91	247
Z-7	92	107
Z-9	101	68
Z-17	97	59
Z-22	109	86
Z-26	96	135
Z-33	96	203
Z-36	99	48
Z-39	99	111
Z-45	98	69
Z-49	102	137
Z-52	113	127

从上述菌株中挑选出酶活最高者 Z-52,其 β -葡聚糖酶酶活是出发菌株的 1.13 倍,将 Z-19 涂布于肉汤平板,进行分离纯化,挑选单菌落,接种于斜面培养基,长出后置冰箱保藏待用.

2.5 ⁶⁰Co 诱变结果

由于紫外诱变所得的菌株产酶量不是很高,因此有必要采用新的诱变方法,以得到高产菌株.作者采用⁶⁰Co 发出的 γ 射线处理 10⁷ 个/mL 的 Z-52 单细胞悬浮液,剂量为 5×10⁴,6×10⁴,7×10⁴,8×10⁴ R,照射剂量与致死率曲线见图 2.选择致死率为 95%的 7×10⁴ R 为⁶⁰Co 的照射剂量.

从鉴定平板上利用透明圈大小筛选出 50 株突变株,然后用发酵培养基摇瓶发酵进行初筛、复筛.从 7×10^4 R 照射的菌株中选出 9 株产 β 葡聚糖酶水平高于出发菌株 Z-52 的突变株,其中 C-8 和 C-15 产 β 葡聚糖酶的水平最高,其产 β 葡聚糖酶酶活分别为出发菌株的 1.25 倍及 1.19 倍,故选这两株菌作为目标菌株进行实验.

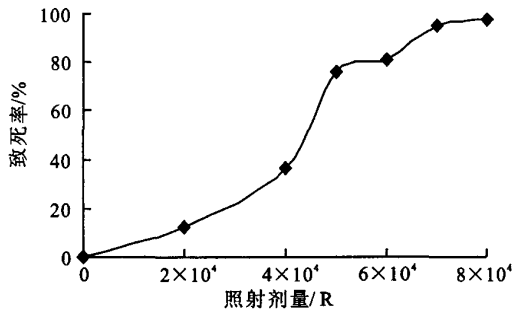


图 2 ^{60}Co 诱变致死率曲线

Fig. 2 The death rates under the mutagenesis by ^{60}Co

2.6 突变株的纯化及传代

对 C-8 和 C-15 两株菌进一步分离纯化,平板划线分离,挑选出单菌落,由单菌落接种至斜面培养基,不断重复,选出一株编号为 5582 的突变株,传代稳定性较好,结果见表 5.

表 5 菌株 5582 的传代稳定性

Tab. 5 Genetic stability of strain 5582

传代次数	β 葡聚糖酶 相对酶活/%	蛋白酶 相对酶活/%
1	107	118
2	115	101
3	116	114
4	108	112
5	113	103

2.7 小型发酵实验

在摇瓶培养的基础上,采用 5 L 发酵罐完成小型发酵实验. 5 L 发酵罐的装液量为 3 L,通风量为 3 L/min,搅拌转速为 600 r/min. 将培养 12 h 的种子培养基按体积分数 8% 的接种量接种至发酵培养基中,发酵曲线见图 3,4.

由图 3,4 可以看出,5 L 发酵罐的发酵过程中蛋白酶的产酶高峰在 25 h,而 β 葡聚糖酶的产酶高峰为 35 h,整个发酵周期比摇瓶缩短了 15 h. 发酵前期,溶氧下降很快,可能是由于此时的细胞处于生长阶段,对氧气的需求较大,低溶氧水平维持时

间较长. 20 h 后溶氧逐渐回升,由于此发酵为好氧发酵,因此如果能够进一步提高发酵前期的溶氧水平,可能会更有利于 β 葡聚糖酶酶活的提高.

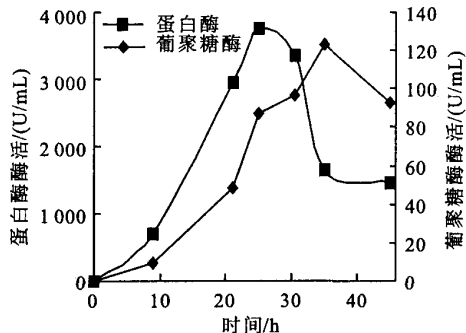


图 3 5 L 发酵罐产酶曲线

Fig. 3 Fermentation curve of strain 5582 in 5 L fermentor

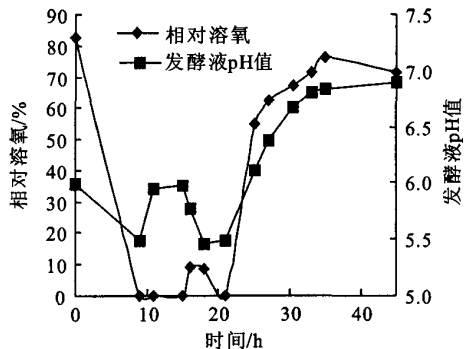


图 4 5 L 发酵罐相对溶氧与发酵液 pH 值随时间变化关系

Fig. 4 DO and pH curves of strain 5582 in 5 L fermentor

3 结 论

在 β 葡萄糖酶产生菌的分离过程中,首先以种子培养基对产生菌进行增殖,再采用刚果红琼脂平板培养基对产生菌进行分离,由于 β 葡聚糖分子能与刚果红染料紧密结合,菌体产酶时其周围的葡聚糖被降解后形成透明圈,极大地提高了分离工作效率.透明圈的颜色深浅基本可显示酶活的高低,但由于在倒平板的操作中较难达到均一,因此仍需要用产酶培养基进一步验证菌株的产酶情况.经紫外、 ^{60}Co 诱变筛选,突变株的 β 葡聚糖酶的活力提高到了 105 U/mL 左右,蛋白酶酶活提高不是很大,在 5 L 发酵罐中 β 葡聚糖酶的产量为 120 U/mL,主要考虑到蛋白酶酶活太高,会对发酵液中其它酶有分解作用.

(下转第 65 页)

参考文献:

- [1] 肖阔. 杨梅的生产和保鲜[EB/OL]. <http://www.cctv.com/program/kjy/20040723/101919.shtml>. 2004-07-23.
- [2] 李共国, 马子骏. 杨梅冰温贮藏保鲜研究[J]. 食品工业科技, 2004, (3): 130-131.
- [3] Mazza G, Brouillard R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products[J]. *Food Chem*, 1987, 25: 207-225.
- [4] 双长明, 陈学平. 杨梅果汁花色苷及其色泽稳定性的研究[J]. 食品与发酵工业, 1991, (3): 1-7.
- [5] 励建荣, 岑沛霖, 蒋志刚. 单宁对杨梅汁花色苷稳定性的影响[J]. 科技通报, 2001, (6): 1-6.
- [6] 励建荣, 岑沛霖, Joyce D C. 杨梅汁花色苷热降解动力学研究[J]. 科技通报, 2002, (1): 1-5.
- [7] Tajchakavit S, Boye J I, Bélanger D. Kinetics of haze formation and factors influencing the development of haze in clarified apple juice[J]. *Food Res Int*, 2001, 34: 431-440.
- [8] Davies A J, Mazza G. Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds[J]. *J Agric Food Chem*, 1993, 41: 716-720.
- [9] Brouillard R, Dangles O. Anthocyanin molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during aging? [J]. *Food Chem*, 1994, 51: 365-371.
- [10] Delgado-Vargas F, Paredes-Lopez O. Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses[M]. Boca Raton: CRC Press, 2002. 167-289.
- [11] Timberlake C F. Anthocyanins - occurrence, extraction and chemistry[J]. *Food Chem*, 1980, (5): 69-80.

(责任编辑: 朱明)

(上接第60页)

参考文献:

- [1] 彭莹. β -葡聚糖酶高产菌 *Bacillus subtilis* 9126-6 的发酵性能研究[J]. 南京农业大学学报, 1994, (17): 59-64.
- [2] 顾国贤. 大麦的 β -葡聚糖和 β -葡聚糖酶[J]. 酿酒, 1993, (3): 9-10.
- [3] Canwell B A, McConnell D J. Molecular cloning and expression of *Bacillus subtilis* β -glucanase gene in *Escherichia coli* [J]. *Gene*, 1983, 23: 211-219.
- [4] Lloberas J, Perz-pons J A, Querol E. Molecular cloning, expression and nucleotide sequence of the endo- β -1,3-1,4-D-glucanase gene from *Bacillus licheniformis* [J]. *Eur J Biochem*, 1991, 197: 337-343.
- [5] Hofemeister J, Kurtz A, Borris R, et al. The β -glucanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* shows extensive homology with that of *Bacillus subtilis* [J]. *Gene*, 1986, 49: 177-187.
- [6] 林宇野. 微生物来源的 β -葡聚糖酶研究[J]. 福建轻纺信息, 1995, (9): 1-3.
- [7] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 9.
- [8] 天津轻工学院, 大连轻工学院, 无锡轻工业学院. 工业发酵分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1980. 85-87.

(责任编辑: 李春丽)