

β -葡聚糖酶高产菌株的分离筛选及其新菌种初步鉴定

孙玉英,王瑞明,刘庆军,关凤梅,郭利美

(山东轻工业学院食品工程系,山东 济南 250100)

摘要: 根据刚果红与 β -1,3-1,4-葡聚糖紧密结合而保持红色的特征,采用改进的方法筛选 β -葡聚糖酶高产霉菌。从牛的瘤胃中筛选出产酶活力高的17株霉菌中获得一株高产 β -葡聚糖酶的曲霉,在摇瓶条件下产酶活力达2269 u/ml。经初步鉴定,该菌株为局限曲霉。

关键词: 微生物; 曲霉; 刚果红; β -葡聚糖酶

中图分类号: TS261.1; Q93-33

文献标识码: B

文章编号: 1001-9286(2004)02-0025-03

Separation & Selection of High-yield β -dextranase Strains and the Preliminary Identification of the New Microbial Species

SUN Yu-ying, WANG Rui-ming and LIU Qin-jun et al.

(Food Engineering Department of Shandong Light Industry College, Ji'nan, Shandong 250100, China)

Abstract: Based on the fact that congo red dye closely combined with β -1,3-1,4-dextranase to maintain red color, high-yield β -dextranase mildew was selected by modified methods. 17 mildew strains of high enzyme-producing capability were obtained from bovine rumen. Among all the 17 strains, one high-yield β -dextranase *aspergillus* strain was finally obtained with its enzyme-producing capability as high as 2296 u/ml under the condition of flask shaking. The preliminary identification indicated that the strain belongs to *aspergillus restrictus*. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; *aspergillus*; congo red dye; β -dextranase

β -葡聚糖酶主要包括内 β -1,3葡聚糖酶、内 β -1,4葡聚糖酶和外 β -1,3葡聚糖酶、外 β -1,4葡聚糖酶。它对水解大麦、黑麦和小麦中的 β -葡聚糖有重要的作用。现代酿酒工业中,为防止大麦和小麦 β -葡聚糖造成过滤困难、啤酒非生物混浊等问题,大都通过添加含 β -葡聚糖酶等酶制剂来解决^[1-3]。采用薯类、植物块根类及谷类原料生产酒精及白酒时,由于纤维素、半纤维素、 β -葡聚糖和果胶质的存在,使得原料液化、糖化困难,醪液粘稠,原料利用率低,解决这一难题必须添加含有 β -葡聚糖酶的复合酶制剂。

目前国内外主要利用微生物法来生产 β -葡聚糖酶。绝大多数菌株的酶系对大麦葡聚糖无特异性,而能特异分解大麦 β -葡聚糖的酶主要来源于芽孢杆菌属和曲霉属,国内已有报道的有:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、臭曲霉(*Aspergillus foetidus*)、冻土毛霉(*Mucor hiemalis*)和溶黄质厄氏菌(*Qerskovia xanthineolytica*)等,一些菌株已经实现工业化生产。

采用大麦 β -葡聚糖为底物,首次从牛的瘤胃中选育 β -葡聚糖酶高产菌株,探讨选育 β -葡聚糖酶高产菌株的有效途径,以提高高产 β -葡聚糖酶产生菌株的筛选效率。所筛选到的菌株经初步鉴定为局限曲霉,局限曲霉产 β -葡聚糖酶在国内外尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要原料及试剂

大麦粉:济南趵突泉啤酒厂提供大麦,自己加工得到。

大麦 β -葡聚糖:大麦粉中提取自制品。

标准大麦 β -葡聚糖:美国Sigma公司产品。

刚果红:上海试剂三厂生产。

刚果红溶液:以pH5.5醋酸-醋酸钠配制成浓度1.0%(w/v)。

去氧胆酸钠:上海化学试剂厂。

1.1.2 菌种

由济南市郊区党家庄镇牛的瘤胃中分离出曲霉,经初步鉴定为局限曲霉(*Aspergillus restrictus*)。

1.1.3 培养基

1.1.3.1 斜面培养基:PDA培养基^[4]。

1.1.3.2 富集培养基:把3%蔗糖改成5%大麦粉的察氏培养基,加入终浓度为100 u/ml的青霉素(母液浓度为2000 u/ml)。

1.1.3.3 菌株鉴定平板:大麦 β -葡聚糖2.50 g,刚果红溶液8 ml,琼脂2.00 g,加蒸馏水100 ml,调pH6.7。灭菌条件:121℃,20 min。

1.1.3.4 初始平板分离培养基:葡萄糖0.15 g,大麦 β -葡聚糖10.00 g,NaNO₃ 0.30 g,K₂HPO₄ 0.10 g,FeSO₄·7H₂O 0.0005 g,MgSO₄·7H₂O 0.05 g,去氧胆酸钠0.06 g,琼脂2.00 g,加蒸馏水100 ml,调pH6.7。灭菌条件:121℃,20 min。

1.1.3.5 摇瓶发酵培养基:大麦粉4.00 g,玉米浆2.00 g,FeSO₄·7H₂O 0.01 g,Na₂HPO₄ 0.10 g,CaCO₃ 0.50 g,MgSO₄ 0.03 g,NaNO₃ 0.40 g,加蒸馏水100 ml,调pH6.7。灭菌条件:121℃,20 min。

1.2 方法

1.2.1 大麦 β -葡聚糖的制备^[5]

1.2.2 筛选步骤

收稿日期:2003-06-17

作者简介:孙玉英(1974-),女,山东人,硕士,助理工程师,研究方向为微生物酶技术,发表论文10余篇。

1.2.2.1 菌种富集:按文献[4]方法采集样品,无菌操作取2~3 g样品加入装有50 ml已灭菌的菌种富集培养基的三角瓶中,160 r/min,30 ℃,培养24 h。

1.2.2.2 菌株初筛:牛津杯琼脂块鉴定平板法。

1.2.3 β -葡聚糖酶活力测定

1.2.3.1 比色法^[6]:722光栅分光光度计法。

吸取1.8 ml 1.0 %的 β -葡聚糖(酶作用底物,用0.1 mol/L pH5.0 醋酸钠缓冲液配制),50 ℃预热5 min后,准确加入适当稀释的酶液200 μ l,50 ℃水浴反应10 min后,立即用DNS法测定葡萄糖含量^[7]。

酶活单位定义:在上述反应条件下,1 s中从大麦 β -葡聚糖中产生1 nmol葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

1.2.3.2 凝胶平板扩散法^[8,9]。

1.2.4 菌种复筛

摇瓶培养:500 ml三角瓶,盛80 ml培养基。

接种量:将斜面孢子用生理盐水配成孢子悬液(孢子浓度为 4.5×10^7 个/ml),在培养基中接入0.5 ml孢子悬液。往复摇床,30 ℃培养48 h。

1.3 菌株初步鉴定

将纯化菌株置于PDA平板上,25 ℃培养至肉眼可见菌落,用5.0 mm打孔器无菌移植于PDA平板中央,25 ℃培养。观察菌落生长速度、形态变化,并在显微镜下观察菌丝形态,测量菌丝直径。

2 结果与分析

2.1 产 β -葡聚糖酶菌株初筛方法比较

据文献报道,用于产酶菌株初筛的方法主要有以下3种:快速凝胶扩散测定法^[10]、GCN平板法^[8]和改良琼脂块鉴定平板法^[11]。这3种方法利用的原理都是刚果红与 β -葡聚糖偶联成红色化合物,经由菌落产生 β -葡聚糖酶分解后颜色变浅,平板上呈现透明圈,刚果红褪色的透明圈直径与酶活性的对数值成正比^[10],从而根据透明水解圈的大小及透明度判断菌株产酶水平。后两种方法虽然比第一种方法提高了筛选效率,但是霉菌菌落蔓延很快,即使加上氯胆酸钠,菌丝还是很快覆盖透明圈。

结合以上方法,我们在菌株的初筛方面作了如下改进:平板分离培养基为产酶培养基,将孢子涂布分离在平板上,待到菌落基本形成,将牛津杯和琼脂块一起移到鉴定平板上,在整个菌落的生长过程中,牛津杯能在一定程度上限制菌丝过快蔓延,称此方法为牛津杯琼脂块鉴定平板法。经过初筛,总共筛选出17株透明圈大的霉菌。同时,根据鉴定平板上透明圈的大小(图1,图2),初步筛选出5株透明圈比较大的进一步摇瓶复筛。

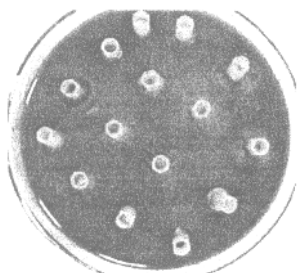


图1 菌株初筛培养皿正面照片

2.2 菌株复筛

500 ml三角瓶中装80 ml发酵培养基,160 r/min,30 ℃培养48 h,离心(4000 r/min, 15 min)测发酵液的酶活力,见表1。

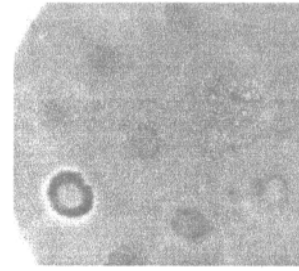


图2 菌株初筛培养皿反面照片

表1 菌株酶活力测定

菌种名称	发酵液酶活(u/ml 发酵培养基)	相对酶活(%)
QY003	2269.25	100
QY005	1005.23	44.3
QY012	2001.29	88.2
QY018	686.33	30.2
QY019	430.83	19.0

综合以上复筛结果,发现QY003产酶活力最高,因此选择QY003作为本次实验筛选的最佳菌株。

2.3 菌种的鉴定^[4]

2.3.1 肉眼及低倍镜下的形态特征

该菌生长慢,28 ℃条件下培养48 h后菌落直径达10 mm,5~6 d后菌落直径达35~40 mm(如图3)。菌落呈同心圆环状向四周拓展,13~14 d后菌落长满整个平皿,菌落直径大约为80 mm(如图4)。菌落暗绿色至暗褐绿色,边缘呈白色绒毛状突起。培养基颜色无明显变化,没有明显渗出物,无明显气味。

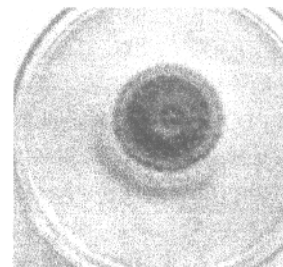


图3 生长5 d后菌株照片



图4 生长13~14 d后的菌株形态

2.3.2 显微镜下孢子及子实体的形态(如图5)

菌丝形态:菌丝分为气生菌丝(如图6)和基内菌丝(如图7)两种。基内菌丝发达。气生菌丝和基内菌丝的直径均为2~3 μ m。基内菌丝和气生菌丝均具横隔。

孢子及子实体的形态:分生孢子柄光滑,柄的顶端膨大为顶囊,顶囊呈球形,瓶梗直接生于顶囊上。呈串的子囊孢子大小均一,为明显的直柱形。

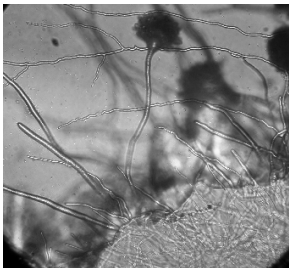


图5 孢子囊及菌丝形态(×400)

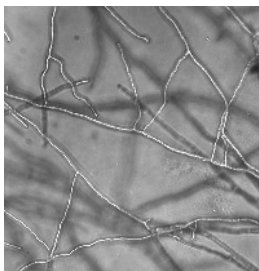


图6 气生菌丝(×400)

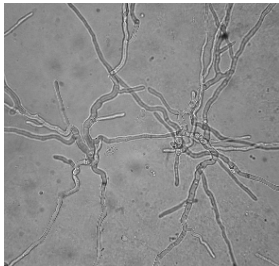


图7 基内菌丝(×400)

根据上述结果，该菌株基本符合有关文献关于局限曲霉特征

的描述^[4]。

3 讨论

本实验在综合前人工作的基础上，提出了牛津杯琼脂块鉴定平板法，能有效地控制菌丝蔓延，提高菌株的筛选效率。

本实验首次从牛的瘤胃中筛选高产β-葡聚糖酶的菌株，所筛选的菌株产酶活力高，经初步鉴定为局限曲霉。

参考文献：

[1] Huang, Hung Chang(Lethbridge, CA),Cheng, et al. US Patent[P], 2001,6,268,202.

[2] 李永仙,顾国贤,俞中.耐高温β-葡聚糖酶在啤酒糖化中的应用研究[J].酿酒,2002, 29(2):81-83.

[3] 尹象胜,李永仙,顾国贤,等.啤酒酿造用复合酶的研制[J].无锡轻工业学院学报,1994, 13(4):300-309.

[4] 杜连祥,王昌禄,鲁梅芳,等.工业微生物学实验技术[M].天津:天津科学技术出版社,1992.

[5] Buckee G.K. Estimation of β-glucanase[J]. J. Inst. Brew., 1985,91: 264-266.

[6] 汪傲,雷祖玉,冯学琴,等.饲用复合酶制剂中β-葡聚糖酶活测定方法的研究[J].饲料研究, 2000,(5):5-7.

[7] Miller G.L. Use of dinitrosolicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Anal.Chem.,1959,31:426-437.

[8] 林宇野.丝状真菌产生β-葡聚糖酶的研究[J].福建师范大学学报(自然科学版),1995, 11(3):94-101.

[9] Bruce D. et al. A new assay for quantifying endo-β-D-mannanase activity using congo red dye[J].Phytochemistry,1993,36(4):829-835.

[10] 王薇青,刘妙莲,林宇野,等.β-葡聚糖酶[EC.3.2.1.73]的研究 I 产酶菌种的筛选和培养[J].食品与发酵工业,1989,(3):1-7.

[11] 郑毅,段慧明,施巧琴,等.快速筛选产β-葡聚糖酶曲霉及抗阻遏育种[J].生物技术,2001,(11):22-24.

中国轻工业出版社图书邮购目录

书 名	定 价 (元/册)	邮 费 (元/册)	书 名	定 价 (元/册)	邮 费 (元/册)
酒精工业手册	30.00	5.00	葡萄酒工业手册	48.00	8.00
酒精与蒸馏酒工艺学	55.00	10.00	*白兰地工艺学	20.00	4.00
酒精工艺学(中专教材)	18.00	3.00	*新版配制酒配方	20.00	4.00
酒精蒸馏技术(第二版)	56.00	10.00	果酒工艺学(中专教材)	20.00	4.00
*生料酿酒技术	36.00	6.00	特种啤酒酿造技术	24.00	4.00
*玉米酒精生产新技术	50.00	10.00	啤酒工业手册	98.00	12.00
白酒生产技术全书	120.00	18.00	啤酒生产问答(修订版)	32.00	6.00
固态法白酒生产技术	12.00	2.00	啤酒生产工艺(技工教材)	48.00	10.00
白酒生产指南	32.00	5.00	啤酒工艺学(中专教材)	36.00	7.00
白酒工人培训教程	55.00	10.00	黄酒工艺学(中专教材)	18.00	3.00
低度白酒生产技术	30.00	6.00	黄酒生产工艺(第二版)	36.00	7.00
白酒勾兑技术问答	16.00	3.00	*药酒生产实用技术	28.00	5.00
小曲白酒生产指南	22.00	4.00	药酒配方 800 例	15.00	3.00
白酒工艺学(中专教材)	15.00	3.00	酶制剂应用手册	28.00	5.00
白酒生产问答	40.00	6.00	酶制剂应用技术	20.00	4.00
酿造酒工艺学(第二版)	50.00	10.00	新编调酒师手册	36.00	7.00
*英汉意法葡萄酒词典	45.00	7.00	调酒师教程	40.00	6.00
*葡萄酒酿造学—原理及应用(引进版)	88.00	14.00	工业微生物实验技术手册	30.00	6.00
*国际葡萄酒药典——葡萄酒辅料标准	28.00	5.00	英汉发酵工业词汇	30.00	6.00
*葡萄酒品尝法	20.00	4.00	*发酵食品微生物学(引进版)	85.00	12.00
葡萄酒酿造与欣赏	16.00	3.00	生物工程设备	50.00	8.00

(1) 邮购办法：收款地址：北京东长安街 6 号 中国轻工业出版社·发行部 收款人：读者服务部
邮政编码：100740 联系电话：010-65241695 传真：010-65129020

(2) 字迹务必清楚，以免误投。在汇款单的“附言”栏内注明所购书名和册数 (3) 有*号为近期出版的新书。