

# 产 $\beta$ -甘露聚糖酶地衣芽孢杆菌的 分离筛选及发酵条件

杨文博 沈庆 佟树敏

(南开大学微生物学系, 天津 300071)

**摘要** 从土样中分离筛选出产 $\beta$ -甘露聚糖酶的地衣芽孢杆菌, 经紫外线诱变处理后(15W, 30cm 照射 10s) 获得高酶活力 NK-27 菌株, 在以魔芋粉、豆饼粉为碳、氮源添加无机盐的发酵培养基中,  $\beta$ -甘露聚糖酶活力达 110.49u/ml。初始 pH 值、装液量、培养温度和培养时间对产酶有一定影响。

**关键词** 地衣芽孢杆菌,  $\beta$ -甘露聚糖酶, 发酵条件

自 70 年代始, 国内外先后报道了产 $\beta$ -甘露聚糖酶的枯草芽孢杆菌、嗜水气单胞菌、链霉菌和嗜碱芽孢杆菌 N16-5 等的研究工作<sup>[1-4]</sup>。鉴于 $\beta$ -甘露聚糖酶水解可食性植物胶(如魔芋粉、角豆胶、瓜儿豆胶等)能产生促进双歧杆菌生长的寡糖产物<sup>[5]</sup>, 使该酶在酶制剂、食品和医药工业等方面具有很重要的应用价值。由此引发人们对高酶活力菌株分离筛选的兴趣。我们在芽孢杆菌的研究工作中获得了一株产 $\beta$ -甘露聚糖酶的地衣芽孢杆菌, 经诱变处理和产酶发酵条件探索, 摇瓶产酶活力与嗜碱芽孢杆菌 N16-5 水平相近<sup>[6]</sup>。研究结果报告于后。

## 1 材料和方法

### 1.1 培养基

1.1.1 分离培养基(%): 牛肉膏 0.5, 蛋白胨 1, 酵母粉 0.5, NaCl 0.5, 琼脂粉 1.5, pH7.5。

1.1.2 角豆胶平板培养基(%): 角豆胶 1, 蛋白胨 1, 酵母粉 0.2, MgCl<sub>2</sub> 0.02, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, 琼脂粉 1.5, pH7.5。

1.1.3 发酵产酶培养基(%): 魔芋粉 2, 豆饼

粉 4, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.03, MgCl<sub>2</sub> 0.06, CaCl<sub>2</sub> 0.3, 酵母膏 0.6, FeSO<sub>4</sub> 0.001, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.25, pH7。

### 1.2 主要试剂

酵母粉(荷兰进口分装), 角豆胶(Sigma 公司), 琼脂粉(日本进口分装)。魔芋粉(成都魔芋精粉厂), 豆饼粉(天津酶制剂厂), 其它药品均为国产分析纯。

### 1.3 摇瓶产酶发酵

500ml 锥形瓶, 装发酵培养基 50ml, 37℃, 150r/min 往复式摇床振荡培养 48h。

### 1.4 $\beta$ -甘露聚糖酶活力测定

参照 Akino<sup>[7]</sup>方法, 在 0.9ml 0.5% (w/v) 角豆胶底物中 (pH9.0 0.05mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液配制) 加入适当稀释的酶液 0.1ml, 60℃ 水浴反应 10min, 用 DNS 试剂测定产生的还原糖量。酶活力定义为: 在上述反应条件下, 每分钟释放出 1 $\mu$ mol 相当于 D-甘露糖

本文系南开大学科学技术发展基金项目

1994-07-20 收稿

的还原糖所需要的酶量为 1 个酶活力单位。

1.5 菌种鉴定

常规鉴定方法<sup>[8,9]</sup>。

2 结果

2.1 产酶菌株的初筛

从河北、湖北、江苏、陕西及天津大港区采集的 5 份土样，采用常规稀释分离，涂布分离培养基平板，37℃ 培养后挑取细菌菌落，点接角豆胶平板，37℃ 培养 12—16h，测量角豆胶水解圈直径 H 和菌落直径 C，经计算 H/C 比值，选取 H/C>1 的菌株，通过摇瓶产酶初筛，共获得具有 β-甘露聚糖酶活力的自然分离菌 18 株。从表 1 结果可以看出，18 株分离菌均具有水解角豆胶的能力，其中以 3 号菌株摇瓶产酶活力最高为 13.75u/ml，编号为 NK-3，系分离自天津大港区的油田土样。

表 1 产 β-甘露聚糖酶菌株的自然分离

菌株号	H/C 值	β-甘露聚糖酶活力 (u/ml)
1	1.30	8.50
2	1.23	5.40
3	1.50	13.75
4	1.16	7.60
5	1.09	1.37
6	1.22	9.60
7	1.20	7.60
8	1.11	2.65
9	1.25	2.85
10	1.25	6.50
11	1.20	1.90
12	1.14	6.0
13	1.33	2.53
14	1.17	3.26
15	1.33	2.94
16	1.14	3.50
17	1.11	2.80
18	1.14	2.60

2.2 NK-3 菌株的细菌学鉴定

通过 NK-3 菌株形态(个体形态和菌落)的观察、生理生化反应和生长特性测定的结果，根据 Bergey's 细菌学鉴定手册第 8 版<sup>[9]</sup>，NK-3 菌株鉴定为地衣芽孢杆菌。

2.3 NK-3 菌株的诱变和高酶活力菌株的检出

以 NK-3 为出发菌株，采用常规紫外线不同照射时间所获得的 430 个菌落逐一用无菌牙签点接角豆胶平板，37℃ 培养 16h 后，计算 H/C 值数据表明，NK-3 菌株经 UV 照射后的突变株，水解角豆胶的能力均有所提高。对 H/C 值大于 1.7 的 27 株突变株进行摇瓶产酶复筛，酶活力高于出发株的有 25 株。其中 NK-27 诱变株的 H/C 值为 3.75，酶活力最高达 81.37u/ml。我们认为，虽然 H/C 值的大小与摇瓶发酵的酶活力并非呈严格的正相关关系，但至少 H/C 值大，酶活力高的菌株占多数，因此在高酶活力菌株检出时，挑选 H/C 值大的菌落，获得高酶活力菌株的机率要大。

2.4 最佳产酶配方的选择

为了确定突变株 NK-27 产酶培养基的最佳配方，以无机盐溶液为基础配方(%)：Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.03，MgCl<sub>2</sub> 0.06，CaCl<sub>2</sub> 0.3，FeSO<sub>4</sub> 0.001，Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.25，进行了不同碳源、氮源对酶活力影响的对比试验。

2.4.1 不同碳源对酶活力的影响：表 2 的结果表明，NK-27 菌株发酵产生 β-甘露聚糖酶以魔

表 2 不同碳源对酶活力的影响

碳源	(%)	酶活力 (u/ml)
葡萄糖	1	17.83
甘露糖	1	15.50
半乳糖	1	22.47
魔芋粉	0.5	63.76
魔芋粉	1	81.68
魔芋粉	1.5	89.45
可溶性淀粉	1	23.58
玉米粉	1	19.43
果胶	1	14.78
黄原胶	1	12.61
角豆胶	1	81.68
瓜儿豆胶	1	18.58
田菁胶	1	20.65
羧甲基纤维素	1	25.10

\* 在无机盐基础配方中添加 6% 豆饼粉为氮源

芋粉、角豆胶为最佳碳源，1% 的魔芋粉和角豆胶产酶水平相同均为 81.68u/ml。而葡萄糖、甘

露糖和半乳糖均对产酶不利，这表明β-甘露聚糖酶为底物诱导酶。单糖是底物的降解产物，降解物阻遏诱导酶的产生是产酶微生物的普遍现象<sup>[10]</sup>。

2.4.2 不同氮源对酶活力的影响：表3的结果表明，在不同的氮源中，有机氮源普遍优于无机氮源，其中以豆饼粉对产酶的影响最大，好于其它所有氮源。同时，酵母膏对产酶有促进效果，当以6%豆饼粉为氮源并添加0.6%酵母膏时，酶活力最高可达81.49u/ml。

表3 不同氮源对酶活力的影响\*

氮源 (%)	酶活力 (u/ml)
酪素 1	38.94
牛肉膏 1	40.28
酵母膏 1	34.93
聚脲 1	23.13
蛋白脲 1	26.68
玉米浆 1	28.48
谷氨酸 1	23.71
尿素 1	9.30
硫酸铵 1	18.02
氯化铵 1	15.75
硝酸钠 1	17.86
豆饼粉 6	56.47
豆饼粉+酵母膏 6+0.6	81.49

\* 在无机盐配方中添加1%魔芋粉为碳源

2.4.3 碳氮源配比：以上试验表明，培养基中的碳氮源对NK-27菌株的产酶有明显的影 响，为此，对魔芋粉和豆饼粉的添加量进行了考查。

表4 碳、氮源不同配比对酶活力的影响\*

配方	魔芋粉 (%)	豆饼粉 (%)	酶活力 (u/ml)	平均酶活力 (u/ml)
1	1.5	2.0	55.67	79.56
	1.5	4.0	93.42	
	1.5	6.0	89.60	
2	2.0	2.0	62.16	91.12
	2.0	4.0	110.49	
	2.0	6.0	100.72	
3	2.5	2.0	59.11	89.25
	2.5	4.0	108.90	
	2.5	6.0	99.75	

\* 基础配方为无机盐溶液+0.6酵母膏

结果表明（表4），当魔芋粉含量从1.5%增至2%时，酶活力明显增加，平均酶活力可提

高11.56u/ml；而增至2.5%时，平均酶活力则下降了1.87u/ml。说明2%的魔芋粉是NK-27菌株适宜的碳源需要量。不同添加量的豆饼粉对产酶也有显著影响，在3个配方中，2%的豆饼粉产酶活力均低，而4%或6%的豆饼粉酶活力相差不大。以配方2中2%魔芋粉、4%豆饼粉产酶最佳，酶活力达110.49u/ml，说明4%豆饼粉是适宜的氮源量。

2.5 环境因素对产酶的影响

2.5.1 pH对产酶的影响：用不同量的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>将发酵培养基配成4种不同pH（6、7、8、9）值，37℃振荡培养48h，结果表明初始pH以7—8产酶效果最好。pH6或pH9均影响产酶。

2.5.2 装液量对产酶的影响：在500ml锥形瓶中分别加入40、50、70、80ml发酵培养基，37℃振荡培养48h，结果表明以装液量40—50ml产酶最好，通气量大对NK-27菌株产酶有利。

2.5.3 培养温度对产酶的影响：测试了28、32、37、40℃不同温度对NK-27菌株产酶的影响，结果表明，以37℃产酶最好，低于或高于37℃对产酶均有明显影响。

2.5.4 培养时间对产酶的影响：测试了NK-27菌不同发酵时间的酶活力。

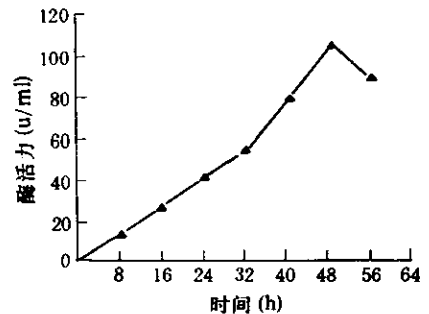


图1 发酵时间对酶活力的影响

图1结果表明，随着培养时间的延长，产酶呈上升趋势，48小时产酶达到高峰，继续培养则酶活力开始下降。

### 3 讨论

从天津大港区油田土样中分离获得的 NK-3 菌株具有水解角豆胶(半乳甘露聚糖)和魔芋粉(葡萄糖甘露聚糖)的能力,是目前国内外首例报道由地衣芽孢杆菌产生 $\beta$ -甘露聚糖酶的菌株。经紫外线诱变后的 NK-27 突变株摇瓶产酶活力可达 110.49u/ml,与国内报道的嗜碱芽孢杆菌 N16-5 的产酶水平相近<sup>[6]</sup>。NK-27 菌株的扩大发酵产酶试验正在研究中。

限于本文篇幅, NK-27 菌株 $\beta$ -甘露聚糖酶对角豆胶、瓜儿豆胶、田菁胶、魔芋粉等可食性植物胶的水解作用,水解产物——寡糖对双歧杆菌的促生长作用以及 NK-27 菌株 $\beta$ -甘露聚糖酶的酶学性质将另文报告。

### 参 考 文 献

[1] Emi S, Fukumoto J, Yamamoto T. Agric. Biol. Chem.

1972, 36: 991—1001.

- [2] Araki T, Kitamikado M, J. Biochem. 1982, 91 (4): 1181—1186.
- [3] Takahashi R, Kusakabe I, Kobayashi H. et al. Agric. Biol. Chem. 1984, 48 (9): 2189—2195.
- [4] 田新玉, 徐毅, 马延和等. 微生物学报, 1993, 33 (2): 115—121.
- [5] 马延和, 周培谨. 食品与发酵工业, 1992, 1: 80—82.
- [6] 马延和, 周培谨, 田新玉等. 微生物学通报, 1992, 19 (1): 13—17.
- [7] Akino T, Nakamura N, Horikoshi K. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1987, 26: 323—327.
- [8] 中科院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978.
- [9] Buchanan R E and Gibbons N E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th. the williams & wilkins Company Baltimore. 1974, 533—535.
- [10] 张树政主编. 酶制剂工业(下册). 北京: 科学出版社. 1989, 400—401.

## THE STUDY ON SELECTION AND FERMENTATION CONDITION OF PRODUCING $\beta$ -MANNANASE FROM BACILLUS LICHENIFORMIS

Yang Wenbo Shen Qing Tong Shumin

(Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071)

**Abstract** A *Bacillus licheniformis* of producing  $\beta$ -mannanase were isolated from soil. After treatment with U V (15W, 30cm, time 40s) a mutant NK-27 producing 110.49u/ml of  $\beta$ -mannanase activity was obtained from 430 strains. The medium for fermentation consisted of Konjak powder, soybean, yeast extract and salt. The primary pH Values, culture temperature and culture time were effective to production of  $\beta$ -mannanase.

**Key words** *Bacillus licheniformis*.  $\beta$ -mannanase fermentation