

# 产 $\beta$ -葡聚糖酶菌种 T199 的选育及发酵条件

石家骥 崔福绵

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词: 康宁木霉,  $\beta$ -葡聚糖酶, 纤维素酶, 昆布多糖酶, 地衣多糖酶

中图分类号: TQ920.1 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2001) 06-0750-03

大麦为啤酒酿造原料, 含有由葡萄糖残基通过  $\beta$ -1,3-和 1,4-糖甙键连接而成的  $\beta$ -葡聚糖。在麦芽汁制备过程中, 热不稳定的大麦葡聚糖酶不能充分降解  $\beta$ -葡聚糖, 残留的  $\beta$ -葡聚糖不仅影响麦芽汁分离和啤酒过滤, 而且将成为成品啤酒出现混浊和沉淀的因素之一。微生物  $\beta$ -葡聚糖酶能改善啤酒加工工艺和提高产品质量<sup>[1,2]</sup>。谷类饲料含有不同于纤维素的  $\beta$ -葡聚糖<sup>[2]</sup>, 作为抗营养因子,  $\beta$ -葡聚糖使饲料具有粘性, 不能很好的消化利用。 $\beta$ -葡聚糖酶作为饲料添加剂加入到饲料中, 可以将  $\beta$ -葡聚糖降解, 从而提高饲料利用率, 改善营养吸收。相关的  $\beta$ -葡聚糖酶包括纤维素酶(Cellulase)、地衣多糖酶(lichenase)和昆布多糖酶(laminarinase)。纤维素酶和地衣多糖酶仅能催化谷类  $\beta$ -葡聚糖分子中 1,4- $\beta$ -D-糖甙键水解, 而对 1,3- $\beta$ -D-糖甙键不起作用。显然, 使这类  $\beta$ -葡聚糖充分水解, 所用  $\beta$ -葡聚糖酶制剂中不能缺少既能催化 1,4- $\beta$ -D-糖甙键又能催化 1,3- $\beta$ -D-糖甙键水解的昆布多糖酶。

多年来, 国内所需  $\beta$ -葡聚糖酶多以纤维素酶制剂代用, 纤维素酶作用的局限性使应用效果不甚理想。作者利用康宁木霉突变株 T199 制备的  $\beta$ -葡聚糖酶对纤维素、地衣多糖、昆布多糖和大麦  $\beta$ -葡聚糖均有较高的活性, 并且酶最适作用 pH 为 5.0, 与研究较多的枯草芽孢杆菌  $\beta$ -葡聚糖酶 pH6.0 相比, 更适于应用(麦芽汁和啤酒的 pH 为 4.5~5.0)。本文报道康宁木霉 T199 的选育及产酶条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

康宁木霉 (*Trichoderma koningii*) T3, 系本研究组从生霉材料所分离。在麦芽汁琼脂培养基斜面上 28℃ 培养 4d 后使用或于冰箱中保存。

### 1.2 诱变处理方法

1.2.1 分生孢子悬液的制备: 取 T3 菌株试管斜面一支, 加 pH6.0、0.05mol/L 磷酸氢二钠-0.025mol/L 柠檬酸缓冲液 10mL, 刮下孢子, 倒入装有玻璃珠的三角瓶中, 充分振荡, 分散孢子。

1.2.2 紫外光处理: 孢子悬液稀释至  $3 \times 10^3$  个孢子/mL, 取 0.1mL 于含 0.1% 去氧胆酸钠的麦芽汁琼脂平板( $\Phi 9$ cm)上, 用刮刀涂布均匀, 在暗箱中用功率 30W、波长 253.7nm 的紫外灯照射(距离 15cm)。

1.2.3 亚硝基胍处理: 取孢子悬液稀释至  $5 \times 10^3$  个孢子/mL, 取 2mL 于含有 0.8mg 亚硝基胍(用少许甲酰胺溶解)的离心管中, 室温下振荡处理 2h, 离心, 沉淀用 5mL 上述缓冲液洗涤二次后, 用同样的缓冲液 2mL 制成悬浮液。处理后的孢子涂布麦芽汁平板, 以分离单菌落供初筛用。

### 1.3 产酶培养基和培养方法

250mL 三角瓶装 30mL 含玉米轴粉 5%, 麸皮 3% 和氮源 10 号 [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10%, 蛋白胨 20%, 酵母膏 15%] 1.4% 的液体培养基, 起始 pH5.0。灭菌后接种斜面孢子一环, 30℃, 280r/min 振荡培养 5d。培养物

作者简介: 石家骥(1964-), 男(回族), 山东省济宁市人, 中国科学院微生物研究所助理研究员, 主要从事酶学与微生物药学的研究。

收稿日期: 2000-12-15, 修回日期: 2001-03-23

离心,上清即为  $\beta$ -葡聚糖酶溶液。

#### 1.4 酶活力测定方法

反应在 pH5.0、0.05mol/L 磷酸氢二钠-0.025mol/L 柠檬酸缓冲液中进行。吸取 1% 大麦  $\beta$ -葡聚糖(Sigma 公司产品)溶液 0.9mL,60℃ 预热 3min,加入适当稀释的酶液 0.1mL,60℃ 保温 10min。用比色法测定还原糖<sup>[1]</sup>。每分钟由底物生成相当于 1 $\mu$ mol 葡萄糖所需酶量定义为一个国际酶活力单位(IU)。

## 2 结果和讨论

### 2.1 菌株 T199 的选育

2.1.1 紫外光第一次处理:分别照射 3、5、8、10、12、15min。从照射 10min 的平板上分离出一株突变株 T3-10,产酶能力较出发菌株提高约 0.5 倍。

2.1.2 亚硝基胍处理:对 T3-10 菌分别振荡处理 20、30、40min。从处理 30min 的孢子悬液中分离出一株突变株 T3-101,产酶能力较 T3-10 提高 1.2 倍。

2.1.3 紫外光第二次处理:对 T3-101 菌分别进行 8、9、10、12、15min 照射处理。从照射 15min 的平板上分离出一株突变株 T3-102,产酶能力较 T3-101 提高 0.6 倍。

2.1.4 亚硝基胍和紫外线光复合处理:对 T3-102 先用亚硝基胍分别处理 15、20、25、30min 并涂布于平板上,再经紫外光分别照射 4、6、8、10min。从亚硝基胍处理 25min、紫外光处理 6min 的平板上分离出一株突变株 T199,产酶能力较 T3-102(1100IU/mL)提高约 0.5 倍,约为出发菌株 T3(212IU/mL)的 8 倍,达到 1600IU/mL。

### 2.2 突变株 T199 产酶条件

2.2.1 碳源对产酶的影响:以麸皮(3%)为基础碳源,试验不同碳源对产酶的影响。表 1 结果表明,玉米穗轴粉为最佳碳源,酶活力 1200IU/mL。

表 1 碳源对产酶的影响

碳源	c/%	酶活/(IU/mL)	碳源	c/%	酶活/(IU/mL)
玉米粘粉	5.0	100	CMC-Na	0.5	35
玉米茎粉	5.0	320	地衣多糖	0.5	46
玉米轴粉	5.0	1600	昆布多糖	0.5	49
大麦粉	2.0	75			
大麦 $\beta$ -葡聚糖	0.2	48	对照		20

2.2.2 氮源对产酶的影响:试验各种氮源对产酶的影响,表 2 结果表明,氮源 10 号为最佳氮源。

表 2 氮源对产酶的影响

氮源	c/%	酶活/(IU/mL)	碳源	c/%	酶活/(IU/mL)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.4	505	牛肉蛋白胨	1.0	1390
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4	540	玉米浆	0.5	1390
NH <sub>4</sub> Cl	0.4	500	酵母膏	0.5	1410
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.3	350	氮源 10 号	1.4	1600
NaNO <sub>3</sub>	0.4	680	对照		440
尿素	0.2	68			

2.2.3 培养基起始 pH 对产酶的影响:将培养基调至不同 pH(3.0~7.0),灭菌,接种和培养,菌产酶最适起始 pH 为 5.0。

2.2.4 培养温度对产酶的影响:在 25℃~38℃ 温度范围内进行产酶试验,最适产酶温度为 30℃。

2.2.5 培养时间对产酶的影响:结果表明,培养 5d 产酶达到高峰,酶活力 1600IU/mL。

2.2.6 培养物中各种相关的 $\beta$ -葡聚糖酶的活力:突变株 T199 在最适发酵条件下培养 5d, 分别以羧甲基纤维素钠、地衣多糖、昆布多糖和大麦 $\beta$ -葡聚糖为作用底物测定培养物离心上清的酶活力。由表 3 可以看出, 突变株 T199 所产粗酶含有较齐全的相关的 $\beta$ -葡聚糖酶, 这对应用有利。

表 3 发酵液中各种相关 $\beta$ -葡聚糖酶活力

底物	CMC-Na	地衣多糖	昆布多糖	大麦 $\beta$ -葡聚糖
酶活/(IU/mL)	300	1100	12	1600

### 2.3 酶的性质

2.3.1 pH 对酶作用的影响: 在 60℃ 温度条件下, 测定 pH 值对酶活力的影响。结果表明, 酶作用 pH4.0 ~ 6.0, 最适 5.0。与研究较多的枯草芽孢杆菌所产 $\beta$ -葡聚糖酶(最适 pH6.0)<sup>[1]</sup>相比, 该菌所产酶适于啤酒加工(pH4.5 ~ 5.0)。

2.3.2 温度对酶作用的影响: 在 pH5.0 的条件下, 测定温度对酶活力的影响。结果表明, 酶最适作用温度 70℃(相对酶活力为 60℃ 的 123%)。

2.3.3 pH 对酶稳定性的影响: 置酶于不同 pH 值的缓冲液中, 40℃ 保温 5h 后测定酶活力。结果表明, 酶在 pH4.5 ~ 6.5 范围内稳定。

2.3.4 温度对酶稳定性影响: 酶溶液于不同温度保温 30min 后测定酶活力。结果表明, 酶在 50℃ 以下稳定; 60℃ 保温 30min, 酶活力保留 70%。

### 参 考 文 献

- [1] Chereisinoff P N, Ferrante L M. *Biotechnology Current Progress*, Lancaster: Technomic publishing Co. Inc. 1991. 183 ~ 185.
- [2] Webb E C. *Enzyme Nomenclature*, Orlando, Florida: Academic Press, Inc. 1992. 346 ~ 365.
- [3] Gupta J K, Das N B, Gupta Y P. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1972, 36(1): 1961 ~ 1967.

## SELECTION OF $\beta$ -GLUCANASE-PRODUCING *TRICHODERMA KÖNINGII* T199 AND ITS FERMENTATION CONDITIONS

Shi Jiayi Cui Fumian

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract:** A mutant strain T199 producing about 8 times as much  $\beta$ -glucanase as its parent strain *trichoderma kōningii* T3 was obtained by treatment with ultraviolet light and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. Fermentation was conducted in 250mL flask, each containing 30mL of medium consisted of 5% corn cob powder, 3% wheat bran and 1.4% nitrogen source No. 10 ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%, Peptone 20%, Yeast extract 15%). The optima culture conditions were as below: initial pH5.0, 30℃, shaking speed 280r/min, and cultivation time 5d. Enzyme activity toward CMC-Na, lichenin, laminarin and barley  $\beta$ -glucan at pH 5.0 and 60℃ for 10min were 300, 1100, 12 and 1600 IU/mL, respectively. The optima pH and temperature for enzyme action toward barley  $\beta$ -glucan were pH 5.0 and 70℃, respectively. The enzyme was stable under below 50℃ and at pH 4.5 ~ 6.5.

**Key words:** *Trichoderma kōningii*,  $\beta$ -glucanase, Cellulase, Laminarinase, Lichenase