

环糊精葡萄糖基转移酶高产菌株 MS-UD2 的选育及产酶条件的研究

郭利伟, 王卫卫*, 陈兴都, 李端
(西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要: 采用紫外线、硫酸二乙酯和 UV+DES 复合诱变, 对一株产环糊精葡萄糖基转移酶的嗜碱芽孢杆菌 IS 进行诱变育种, 获得了产酶能力是出发菌株 2.96 倍且产酶性能稳定的高产菌株 MS-UD2, 并利用单因素分析和正交试验获得突变株的最佳产酶培养基组成为: 玉米粉 2.0%、玉米浆 6.0%、 K_2HPO_4 0.15%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%; 在温度 28℃、pH10.0、接种量 8%、250ml 三角瓶装液量为 50ml 的发酵条件下, 180r/min 二级摇瓶振荡培养 36h 产酶活力达 5741.6U/ml。5L 发酵罐 36h 产环糊精葡萄糖基转移酶活力为 5920.0U/ml。

关键词: 嗜碱芽孢杆菌; 环糊精葡萄糖基转移酶; 诱变育种; 条件优化

Study on Screening and Fermentation Conditions of High β -Cyclodextrin Glucanotransferase-producing Strain MG-UD2 of *Bacillus alcalophilus*

GUO Li-wei, WANG Wei-wei*, CHEN Xing-du, LI Duan
(College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: The original strain *Bacillus alcalophilus* IS was mutated with ultraviolet (UV), diethyl sulfate(DES) and UV plus DES. A mutant MS-UD2 was obtained, whose β -cyclodextrin glucanotransferase(CGTase) productivity was 2.96 folds as much as that of parent strain. The continuous 10 generations experiments showed that the mutant MS-UD2 is stable in CGTase production. The fermentation conditions for CGTase production were optimized via single-factor test and orthogonal test. The results showed that the optimal conditions are as follows: using fermentation medium consisting of maize powder 2%, corn steep liquor 6%, K_2HPO_4 0.15% and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, incubation temperature 28 °C, amount of inoculum 8%, pH 10.0, filled medium volume in 250-ml flask 50 ml and adopting shaking incubation for 36 h at 180 r/min. The enzyme activity could reach as high as 5741.6 U/ml, under these conditions, and in 5-L fermentor the enzyme activity could reach 5920.0 U/ml.

Key words: *Bacillus alcalophilus*; β -cyclodextrin glycanotransferase; strain breeding; fermentation condition optimization

中图分类号: Q556

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)12-0439-05

环糊精葡萄糖基转移酶(cyclodextrin glucanotransferase, 简称 CGTase, EC2.4.1.19)能将淀粉和其他 α -1,4-葡聚糖合成为非还原性的麦芽低聚糖, 即环糊精(cyclodextrin, CD)^[1], CDs 有三种主要的类型, 它们分别是由 6、7 个和 8 个 α -(1-4)糖苷键连接的 α -CD、 β -CD、 γ -CD。CDs 是一种具有内疏水外亲水的筒形结构, 能与许多疏水客体化合物或功能基团形成包含物, 从而改变其物理或化学性质, 环糊精的这种性质使其在食品、医药、农业、化妆品、环保等领域有广泛的

应用^[2-4]。尤其是 β -CD, 因其水溶性低, 包含物易制备, 稳定性强, 而且目前研究报道表明, 环糊精葡萄糖基转移酶转化淀粉生成的 β -CD 的含量远远高于其他 CDs, 因此, β -CD 更适宜于工业生产及应用^[5]。

我国生产 β -CD 已有 20 多年的历史, 但由于生产菌种酶产量不高及 β -CD 生产成本过高而使其应用受到限制。目前国内外 β -CD 企业生产用 CGTase 酶活力只有 3000U/ml 左右。本实验通过多因子复合诱变, 获得了一种稳定高产菌株 MS-UD2。

收稿日期: 2006-07-24

作者简介: 郭利伟(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物生理生化。E-mail: guoliwei8@163.com

* 通讯作者: 王卫卫(1961-), 男, 教授, 博士, 研究方向为微生物发酵。E-mail: wwwang@nwu.edu.cn

1 材料与与方法

1.1 菌株

嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus alcalophilus* IS), 由本实验室保藏。

1.2 培养基

基础培养基组成(%): 可溶性淀粉 1.0、酵母膏 0.1、 K_2HPO_4 0.1、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02、 Na_2CO_3 1.0(灭菌后加入); 分离及斜面培养基为加入 2.0% 琼脂的固体培养基; 筛选培养基为固体培养基基础上加入 0.03% 酚酞。

1.3 菌种的诱变处理

紫外(UV)诱变: 按参考文献[6]进行; 硫酸二乙酯(DES)诱变: 按参考文献[7]进行; UV+DES 复合诱变: 按参考文献[8]、[9]进行。

将处理过的菌悬液适当稀释后涂布于筛选平板, 以未经诱变处理的菌液稀释涂平板作对照。待菌落长出后, 视菌落周围退色圈大小进行初筛^[10], 挑取退色圈与菌落直径之比较大的接入斜面, 30℃培养 30h 后转接于装有 50ml 种子培养液的 250ml 三角瓶中, 培养 30h, 以 10% 接种量接于发酵培养基中发酵 40h, 发酵液 4000r/min 离心 20min, 取上清液适当稀释, 测定酶活进行复筛。

1.4 产酶条件的确定^[11]

为了确定突变株 MS-UD2 的最佳产酶条件, 在摇瓶培养基基础上选用不同的碳源、氮源、磷酸盐和金属离子, 对菌株的产酶能力进行比较, 并利用正交设计分析试验结果, 确定突变株 MS-UD2 产酶的最佳培养基配方; 在此基础上利用正交设计对发酵条件(温度、pH 值、接种量、装液量)进行进一步优化, 得到其最佳发酵条件。

1.5 生物量测定

1ml 发酵液中加入蒸馏水至 10ml, 在 620nm 波长处测定吸光度。

1.6 酶活测定

取 10 μ l 适当稀释的酶液, 加入 0.2mol/ml 甘氨酸-NaOH-NaCl 缓冲液(pH 8.55)0.2ml, 再加入马铃薯淀粉液 0.2ml, 振荡, 于 40℃水浴 10min, 立即加入 0.5ml 0.5mol/ml 醋酸溶液终止反应, 然后加入 3ml 0.005% 碘液显色, 同时以蒸馏水为空白, 不加酶液为对照, 在 700nm 波长处测定吸光度。使吸光度下降 10% 的酶量定义为一个酶活单位。按以下公式计算:

一个酶活单位(U/ml)=(a-b)/a \times 1000 \times 酶液稀释倍数
式中, a 为对照组的吸光度; b 为样品的吸光度。

2 结果与分析

2.1 菌株选育

2.1.1 UV 诱变结果

经 20、30、40、50 和 60s 不同时间照射的 IS 菌株单菌悬液, 以 50s 剂量最为理想, 平均致死率为 92.1%, 平均正变率为 11.7%。从筛选平板上挑取退色圈与菌落直径之比较大的 28 个单菌落, 从中筛选出一株酶活 2928.1U/ml 的菌株 MS-UV, 较出发菌株产酶活力(1764.7U/ml)提高了 70%(表 1), 连续传代三次, 酶活力保持稳定, 作为进一步诱变的出发菌株。

表 1 IS 菌株诱变谱系($\bar{x} \pm s$, n=5)
Table 1 Mutation effects of original strain IS($\bar{x} \pm s$, n=5)

处理方法	致死率 (%)	正变率 (%)	酶活力 (U/ml)	酶活力提高率 (%)
UV 照射	92.1 \pm 1.2	11.7 \pm 3.5	2928.1	170
DES 处理	90.0 \pm 2.6	9.0 \pm 2.8	3453.8	196
UV + DES 复合诱变	86.2 \pm 2.9	38.0 \pm 1.7	5217.8	296

2.1.2 DES 诱变结果

将 MS-UV 菌株制成单菌悬液经 DES 处理后平均致死率和正变率分别 90.0%、9.0%, 从筛选平板上挑取 24 个单菌落, 经过复筛获得了 MS-DES 菌株, 该菌株产酶活力为 3453.8U/ml, 较出发菌株产酶能力(1764.7U/ml)提高了 96%(表 1), 且连续传代三次, 酶活稳定, 作为进一步诱变的出发菌株。

2.1.3 UV + DES 复合诱变

将 MS-DES 菌株的单菌悬液经 UV + DES 复合诱变, 平均致死率为 86.2%, 平均正变率最高, 达 38.0%(表 1)。所得菌株筛选平板分离, 反复比较, 从中筛选出 5 株酶活在 5000U/ml 以上的突变株, 其酶活力见表 2。

表 2 UV + DES 复合诱变突变株
Table 2 CGTase activities produced by mutants with UV and DES

菌株号	MS-UD1	MS-UD2	MS-UD3	MS-UD4	MS-UD5
酶活(U/ml)	5002.2	5217.8	5022.7	5115.1	5678.8

突变株 MS-UD5 酶活最高, 但传代产酶活力不稳定; 突变株 MS-UD2 酶活较高, 且经过 10 次传代实验, 测定其酶活力(表 3), 可以看出该突变株的产酶性能稳定, 作为进一步研究的菌株。

对 IS 菌株的诱变过程, 可以看出 UV + DES 复合诱变处理比 UV、DES 单独处理效果好。

表 3 突变株 MS-UD2 10 次传代的产酶稳定性
Table 3 CGTase activities produced by mutant MS-UD2 within ten generations

传代次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
酶活 (U/ml)	5091.8	5132.1	4999.2	5239.3	5090.4	4908.6	5013.9	5129.3	5021.4	5108.6

高产突变株 MS-UD2 的诱变选育流程如图 1 所示。

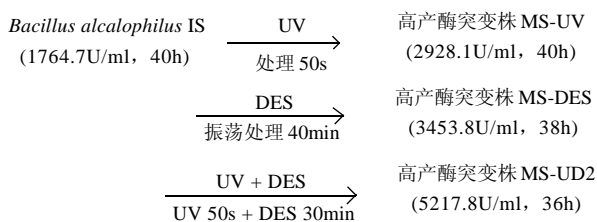


图1 突变株MS-UD2诱变选育流程
Fig.1 Breeding progress of mutant MS-UD2

2.2 突变株MS-UD2产酶条件的研究

2.2.1 不同碳源、氮源对突变株MS-UD2产CGTase的影响

在基础培养基的基础上用等量的碳源替换, 考查不同碳源对突变株MS-UD2产CGTase的影响。该菌株虽能利用葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖等, 但以可溶性淀粉、马铃薯淀粉和玉米粉等作碳源效果最好(表4), 这是因为这些淀粉类物质可能含有CGTase酶生成的诱导因子^[9]; 而不同的淀粉类物质诱导产酶活性的差异可能和其自身的理化性质有关。由此可见, 在实验室进行菌种筛选及菌种生理生化特性的研究, 选用可溶性淀粉最合适; 而在大规模的发酵生产中, 考虑到生产成本等经济因素, 选用价格便宜来源广泛的玉米粉较为适宜。

同样以等量氮源替换基础氮源, 考查不同氮源对菌株产酶能力的影响。如表4所示, 菌株MS-UD2能够利用无机氮源, 但在这些含有无机氮源培养基中CGTase酶活力很低; 相比较所用的几种有机氮源, 以6%玉米浆最佳, 由于玉米浆中含有大约4%的氮, 其中包括许多微生物生长代谢所必须的氨基酸, 如赖氨酸, 蛋氨酸等, 玉米浆一方面满足了菌株对氮源的需要, 同时也满足了对生长因子的要求, 从而有助于菌株合成CGTase^[10]。

表4 不同碳源、氮源对产CGTase的影响
Table 4 Effects of different carbon and nitrogen sources on CGTase production

碳源	酶活力(U/ml)	氮源	酶活力(U/ml)
可溶性淀粉	5408.6	(NH ₄) ₂ SO ₄	888.2
马铃薯淀粉	5349.5	NH ₄ NO ₃	903.5
玉米粉	5151.6	NH ₄ Cl	867.4
果糖	432.1	尿素	1775.3
蔗糖	660.4	蛋白胨	2668.2
麦芽糖	547.2	酵母膏	4994.1
无碳源	68.9	玉米浆	5293.9
		无氮源	86.3

2.2.2 金属离子和磷酸盐对菌株产CGTase的影响

在基础培养基的基础上改用不同的硫酸盐和磷酸盐, 菌株产酶情况见表5。Mg²⁺、Na⁺、K⁺有利于产

酶, Zn²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺和Cu²⁺的存在对产酶有抑制作用; 在选用的磷酸盐中, K₂HPO₄对菌株的产酶最有利。

表5 金属离子和磷酸盐对产CGTase的影响
Table 5 Effects of different metal ions and phosphate sources on CGTase production

硫酸盐	酶活力(U/ml)	磷酸盐	酶活力(U/ml)
Na ₂ SO ₄	5135.8	K ₂ HPO ₄	5151.6
K ₂ SO ₄	5142.2	Na ₂ HPO ₄	5090.6
MgSO ₄	5173.9	(NH ₄) ₂ HPO ₄	4998.6
ZnSO ₄	4072.3		
MnSO ₄	4184.8		
FeSO ₄	4717.4		
CuSO ₄	88.8		

2.2.3 发酵培养基的正交试验设计

以上单因素分析结果显示: 玉米粉、玉米浆、K₂HPO₄、MgSO₄·7H₂O为突变株MS-UD2最佳产酶培养基成分。因此, 选用这四个因素, 设计四因素三水平正交试验(表6), 正交结果见表7。

表6 发酵培养基的正交试验L₉(3⁴)因素水平
Table 6 Factors and levels of fermentation medium composition orthogonal test L₉(3⁴)

水平	因素			
	A 玉米粉(%)	B 玉米浆(%)	C K ₂ HPO ₄ (%)	D MgSO ₄ ·7H ₂ O(%)
1	1.0	4.0	0.05	0.01
2	1.5	5.0	0.10	0.02
3	2.0	6.0	0.15	0.03

表7 发酵培养基正交试验结果
Table 7 Results of fermentation medium composition orthogonal test

试验号	玉米粉	玉米浆	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O	酶活(U/ml)
1	1	1	1	1	3513.4
2	1	2	2	2	4015.9
3	1	3	3	3	4334.6
4	2	1	2	3	3675.0
5	2	2	3	1	4603.8
6	2	3	1	2	4913.5
7	3	1	3	2	5128.8
8	3	2	1	3	5075.0
9	3	3	2	1	5196.2
T ₁	11899.9	12317.2	13501.9	13313.4	
T ₂	13192.3	13730.7	12923.1	14094.2	A ₃ B ₃ C ₃ D ₂
T ₃	15400.0	14444.3	14067.2	13084.6	
R	3400.1	2127.1	1144.1	1009.6	R _A >R _B >R _C >R _D

正交结果显示, 突变株MS-UD2最佳产酶发酵培养基配比为: 玉米粉2.0%、玉米浆6.0%、K₂HPO₄0.15%、MgSO₄·7H₂O0.02%。

由表7中极差值分析可知, 所选的四个因素中玉米

粉是 CGTase 酶活力最主要的影响因子, 其次是玉米浆和 K_2HPO_4 , 影响最小的是 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 。

2.2.4 发酵条件的进一步优化

对发酵的条件初始 pH 值、温度、接种量、装液量作进一步优化处理, 在最适培养基的基础上, 根据正交表 $L_{16}(4^4)$, 设计四因素四水平的正交试验(表 8), 正交试验结果见表 9。

表 8 发酵条件的正交试验 $L_{16}(4^4)$ 因素水平
Table 8 Factors and levels of fermentation condition orthogonal test $L_{16}(4^4)$

水平	因素			
	A 温度(°C)	B pH	C 接种量(%)	D 装液量(250ml)
1	28	7.0	6	30
2	30	8.0	8	40
3	32	9.0	10	50
4	34	10.0	12	60

表 9 发酵条件的正交试验结果
Table 9 Results of fermentation condition orthogonal test

试验号	温度(°C)	pH	接种量(%)	装液量(250ml)	酶活(U/ml)
1	1	1	1	1	5086.9
2	1	2	2	2	5437.5
3	1	3	3	3	5452.2
4	1	4	4	4	4760.9
5	2	1	2	3	5282.6
6	2	2	1	4	4473.9
7	2	3	4	1	5243.5
8	2	4	3	2	5657.1
9	3	1	3	4	5047.8
10	3	2	4	3	941.9
11	3	3	1	2	4352.7
12	3	4	2	1	5035.7
13	4	1	4	2	4714.3
14	4	2	3	1	4928.6
15	4	3	2	4	4861.6
16	4	4	1	3	5022.3
T ₁	20737.5	20131.6	18935.8	20294.7	
T ₂	20657.1	19781.9	20617.4	20162.2	
T ₃	19078.1	19910.0	20183.9	20699.0	A ₁ B ₄ C ₂ D ₃
T ₄	19526.8	20476.0	19660.6	19124.2	
R	1659.4	1694.1	1481.6	1574.8	R _B >R _A >R _D >R _C

正交试验结果显示, 突变株 MS-UD2 发酵产生环糊精葡萄糖基转移酶的最适发酵条件为: 培养温度 28 °C, pH10.0, 接种量 8%; 发酵培养基的 250ml 三角瓶装液量为 50ml。

由表 9 中极差值可看出, $R_B > R_A > R_D > R_C$, 所以发酵初始 pH 值是影响 CGTase 酶活力的主要因素, 接种量的影响最小。

2.2.5 突变株 MS-UD2 在基础培养基与优化条件下的产酶进程

MS-UD2 菌株在基础培养基与优化培养基上二级摇瓶发酵产酶结果见图 2。菌株培 24h 进入生长稳定期, 之后酶活力快速增加, 36h 产酶活力最高为 5741.6U/ml, 比在基础培养基上相同时间产酶活力提高了 10%。

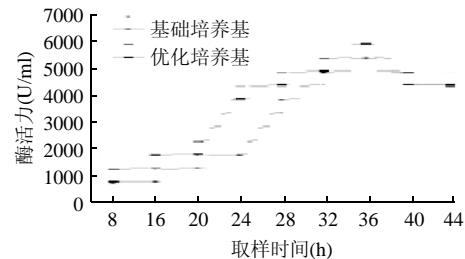


图 2 MS-UD2 在基础培养基与优化条件下产酶进程
Fig.2 Time course of CGTase production in basal and under optimized fermentation conditions

2.3 5L 罐发酵实验

按最佳产酶条件进行 5L 罐发酵, 从发酵 8h 开始起, 每隔 4h 取样, 测定吸光度、pH 值和酶活性。结果表明, 发酵前 20h 左右 pH 值下降至 8.59 之后开始回升, 最后达到 9.40。这是由于发酵前期, 菌体大量生长, 糖类物质被分解产酸导致 pH 值的下降; 随着蛋白质的利用 pH 值有所回升^[12]。发酵初期检测不到酶活性; 当菌体进入对数生长期, 环糊精糖基转移酶大量产生; 在稳定末期, 发酵液中的环糊精糖基转移酶活性达到最高(5920.0U/ml), 结果如图 3 所示。

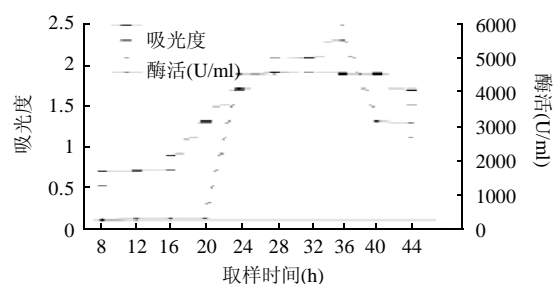


图 3 5L 发酵罐试验中突变株 MS-UD2 的生长和产酶曲线
Fig.3 Time course of growth and CGTase production by strain MS-UD2 in 5-L fermentor

3 结论

以嗜碱芽孢杆菌 IS 为出发菌株, 采用紫外线、硫酸二乙酯和 UV + DES 复合诱变, 得到的突变株 MS-UD2 发酵产生环糊精葡萄糖基转移酶活力达 5217.8U/ml, 是出发菌株的 2.96 倍, 且具有良好的传代稳定性。

在原有培养基基础上选用不同的碳源、氮源、磷

酸盐和金属离子,对突变株 MS-UD2 的产酶能力进行分析比较,并结合实际生产的需要,考虑到生产成本,企业效益等经济因素,按照价格便宜、来源广、处理方便、适合工业化的选择原则,确定玉米粉、玉米浆、 K_2HPO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 上为其产酶最佳的培养基成分,并通过正交设计得到最佳发酵培养基配方为:玉米粉 2.0%、玉米浆 6.0%、 K_2HPO_4 0.15%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%。在此最适培养基的基础上,利用正交设计对其发酵条件进行进一步优化,突变株 MS-UD2 发酵产生环糊精葡萄糖基转移酶的最适温度为 28℃, pH10.0, 接种量 8%, 发酵培养基 250ml 三角瓶装液量为 50ml, 在得到的最佳产酶条件下 180r/min 二级摇瓶发酵 36h 产酶活力 5741.6U/ml。使突变株 MS-UD2 的产酶活力在诱变选育的基础上进一步提高。在优化产酶条件下 5L 罐发酵实验表明: 36h 发酵罐发酵酶活力可达 5920.0U/ml, 达到目前国内文献报道的较高水平, 这为利用该菌株进行大规模的工业生产 β -环糊精的后续研究奠定了良好基础。

参考文献:

- [1] ALEXANDRA T. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22: 678-686.
- [2] BENDER H. Production, characterization and application of cyclodextrins [J]. Adv Biotechnol Process, 1986(6): 31-71.
- [3] LEE J, CHOI J, LEE Y, et al. Enzymatic production of cyclodextrin with the cyclomalto-dextrin glucanotransferase of *Klebsiella oxytoca* 19-1 [J]. Enzyme Microb Technol, 1992, 14: 1017-1020.
- [4] HEDGES A R. Cyclodextrin: production, properties, and application. [M]//Schenk F W, HEBEBA R E. Starch hydrolysis product. New York: Worldwide Technology, 1992: 319-330.
- [5] THATAI A, KUMAR M, MUKHERJEE K J. A single step purification process for cyclodextrin glucanotransferase from a *Bacillus* sp. isolated from soil[J]. Prep Biochem Biotechnol, 1999, 29: 35-47.
- [6] 施巧琴, 吴刚. 工业微生物育种学[M]. 福州: 福建科技出版社, 1991: 45-59.
- [7] 汪世华, 白文钊, 吴思芳. L-谷氨酰胺高产菌株的诱变育种[J]. 食品科学, 2002, 23(3): 64-67.
- [8] 王弋博, 刘向阳, 李三香, 等. 用紫外诱变及紫外+硫酸二乙酯复合诱变方法选育高产异淀粉酶菌株[J]. 青海大学学报, 2003, 21(4): 7-10.
- [9] 章名春. 工业微生物诱变育种[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [10] 曹新志, 金征宇. 环糊精葡萄糖基转移酶高产菌株的快速筛选[J]. 中国粮油学报, 2003, 18(6): 53-55.
- [11] IBRAHIMA H M, YUSOFF W M W, HAMIO A A, et al. Optimization of medium for the production of β -cyclodextrin glucanotransferase using central composite design (CCD)[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(2): 753-758.
- [12] 曹新志, 金征宇. 嗜碱芽孢杆菌产环糊精葡萄糖基转移酶发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2005, 26(2): 122-126.