



引用格式:黄丽,孟继坤,周媛,等.高产右旋糖苷酶微生物的筛选及产酶条件的优化[J].轻工学报,2019,34(1):11-20.

中图分类号:TS241 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2019.01.002

文章编号:2096-1553(2019)01-0011-10

高产右旋糖苷酶微生物的筛选及产酶条件的优化

Screening of high yield dextran microorganisms and optimization of enzyme production conditions

黄丽,孟继坤,周媛,李树波,徐羽

HUANG Li, MENG Jikun, ZHOU Yuan, LI Shubo, XU Yu

广西大学轻工与食品工程学院,广西南宁530000

School of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530000, China

关键词:

右旋糖酐;
右旋糖苷酶;
巨大芽孢杆菌;
发酵优化

Key words:

Polymer dextran;
dextran;
Bacillus megatherium;
fermentation optimization

摘要:使用营养缺陷型培养基、运用透明圈法从甘蔗土壤中筛得高产右旋糖苷酶的微生物SGC-2,根据菌株的形态和16S rDNA基因序列对其进行分析鉴定,并对其发酵产酶条件进行优化.结果表明,SGC-2为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megatherium*),该菌株的适宜产酶条件为:右旋糖酐T2000质量浓度20 g/L,牛肉膏质量浓度10 g/L,NaCl质量浓度4 g/L,MgSO₄质量浓度0.4 g/L,接种时间36 h,接种量3%,发酵时间96 h.该条件下,右旋糖苷酶酶活可高达28.32 U/mL,比优化前提高了151%.该右旋糖苷酶产生菌为首次报道,这为筛选高产右旋糖苷酶微生物的研究提供了一定的理论基础.

收稿日期:2018-10-16

作者简介:黄丽(1997—),女,广西壮族自治区田阳县人,广西大学硕士研究生,主要研究方向为食品微生物工程.

通信作者:李树波(1985—),男,广西壮族自治区桂林市人,广西大学教授,博士,主要研究方向为食品微生物工程.

Abstract: The microorganism SGC-2 with high yield of dextran glycosidase was screened from sugarcane soil using nutrient-deficient medium and transparent circle method. The microorganism SGC-2 was identified according to its morphology and 16S rDNA gene sequence analysis. Moreover, the conditions of fermentation and enzyme production were further optimized. The results showed that the microorganism SGC-2 was *Bacillus megatherium*. The optimum conditions for enzyme production were as follows: dextran T2000 20 g/L, beef extract 10 g/L, NaCl 4 g/L, MgSO₄ 0.4 g/L, inoculation time 36 h, inoculation volume 3%, fermentation time 96 h. Under this condition, the activity of dextran anhydrase reached 28.32 U/mL, which increased by 151% when compared with that before optimization. The dextran anhydrase-producing strain was firstly reported, which provided a theoretical basis for screening high-yield dextran microorganisms.

0 引言

作为一种诱导酶,右旋糖苷酶可专一性水解右旋糖酐分子中的 $\alpha-1,6$ 葡萄糖苷键,降解得到小分子的右旋糖酐、葡萄糖、异麦芽糖以及少量低聚糖等^[1].右旋糖苷酶具有重要的应用价值.如在制糖工业中,右旋糖苷酶可以降解以右旋糖酐为主的多糖聚合物,从而降低产品黏度,减少蔗糖损耗,提高生产效率^[2].在口腔疾病治疗方面,细菌多糖即右旋糖酐是牙菌斑的主要成分,右旋糖苷酶能够降低黏性多糖对牙齿表面的粘附性,从而对龋齿和牙周病的防治具有重要意义^[3].在临床医学领域,右旋糖苷酶可以用于处理大分子右旋糖酐以制作代血浆,治疗失血性休克^[4].

右旋糖苷酶在动物、植物和微生物中都普遍存在,真菌和细菌等微生物是其来源.其中,真菌是商品化右旋糖苷酶的主要来源,如淡紫拟青霉(*Penicillium lilacinu*)、绳状青霉(*Penicillium funiculosum*)、细丽毛壳菌(*Chaetomium gracile*)、淡黄青霉(*Penicillium luteum*)等^[5-8].目前国内外报道可以生产右旋糖苷酶的细菌包括链球菌属(*Streptococcus s*)、黄杆菌(*Flavobacterium sp*)、嗜纤维菌(*Cytophaga SP*)、交替单胞菌(*Altermonasespejiana*)、交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas tetraodon*)和氧化节杆菌(*Arthrobacteroxydans*)等^[9-11].与真菌来源相比,细菌来源的右旋糖苷酶具有发酵时间较短、

次生代谢产物少、分离纯化简便等优势,但其酶活力普遍较低.吴定涛等^[12]从土壤筛选出一株棘孢青霉菌株,其产右旋糖苷酶的酶活力为75.6 U/mL. Mohamed 等^[13]报道的一株青霉-258产右旋糖酐酶的酶活力为41.8 U/mL.焦豫良等^[11]从海泥筛选出的埃氏交替单胞菌 *A. espejiana* YSN412,其右旋糖苷酶的酶活力仅为9 U/mL.李卫娟等^[14]发现的海洋细菌 *Arthrobacter oxydans* KQ11 在优化条件下产右旋糖苷酶的酶活力仅为4.697 U/mL.但以上研究仍存在发酵时间长或酶活性低等问题.鉴于此,本研究旨在筛选出一株细菌来源的高产右旋糖苷酶的菌株,对其进行分子生物学鉴定和产酶条件优化,为筛选高产右旋糖苷酶微生物的研究提供一定的理论基础.

1 材料与amp;方法

1.1 样品

广西某糖厂甘蔗渣;某糖厂污水;甘蔗土样.

1.2 培养基

筛选培养基:右旋糖酐 T2000,质量浓度10.0 g/L;蛋白胨,质量浓度5.0 g/L;氯化钠,质量浓度4.0 g/L;硫酸镁,质量浓度0.4 g/L;琼脂粉,质量浓度20.0 g/L;蒸馏水配制,pH值自然.

种子培养基:右旋糖酐 T2000,质量浓度6.0 g/L;蛋白胨,质量浓度3.0 g/L;NaCl,质量

浓度 2.4 g/L; $MgSO_4$, 质量浓度 0.24 g/L; 蒸馏水配制, pH 值自然.

液体发酵培养基: 右旋糖酐 T2000, 质量浓度 10.0 g/L; 蛋白胨, 质量浓度 5.0 g/L; NaCl, 质量浓度 4.0 g/L; $MgSO_4$, 质量浓度 0.4 g/L; 蒸馏水配制, pH 值自然.

LB 培养基: 蛋白胨, 质量浓度 10 g/L; 酵母膏, 质量浓度 5 g/L; NaCl, 质量浓度 10 g/L; 蒸馏水配制, pH 值自然.

以上培养基^[15]均在 115 °C 下湿热灭菌 30 min.

1.3 方法

1.3.1 菌株的筛选方法 首先, 用无菌水对样品进行梯度稀释, 选取合适的稀释度, 涂布于筛选培养基平板上, 于 37 °C 温度下倒置培养 3 ~ 6 d. 方法 1: 用 Simonson 的快速透明圈法筛选出右旋糖苷酶产生菌株, 即将无水乙醇倒入培养好的平板, 置于冰箱中冷冻 2 h 后取出, 凡在菌落周围出现透明圈的便是右旋糖苷酶产生菌. 方法 2: 在长出菌落的平皿中倒入适量的革兰氏碘液, 可快速观察到透明圈出现情况.

接着, 挑取有透明圈的菌落进行划线纯化, 于 37 °C 下培养 48 h 后, 获得单菌落并对其进行编号、保藏. 将保藏菌株接入种子发酵培养基, 于 37 °C 下, 200 r/min 培养 24 h. 按 3% 的接种量接入液体发酵培养基, 于 37 °C 下, 200 r/min 培养 96 h, 10 000 r/min 离心 10 min 取上清液测定酶活力大小. 每个菌落设置 3 个平行试验, 取平均值. 筛选出酶活力高的菌株进行后续实验^[16, 17].

1.3.2 菌株的遗传稳定性试验方法 用固体筛选培养基对高产右旋糖苷酶菌株进行传代培养, 每隔 24 h 传代 1 次, 于 37 °C 下培养 48 h. 挑取菌株至种子培养基, 于 37 °C 下, 200 r/min 培养 24 h; 随后, 按 3% 的接种量接种至发酵培养基中, 于 37 °C 下, 200 r/min 培养 96 h, 10 000 r/min 离心 10 min 取上清液测定酶活力大小. 菌

株发酵时设置 3 个平行试验, 取平均值. 依次传 10 代, 在传代培养过程中, 将测定 OD_{600} 下菌株在发酵培养基中的生物量, 并观察菌体细胞的形态及其菌落形态.

1.3.3 菌株的鉴定 形态学鉴定: 在平板上划线接种产酶菌株, 置于 37 °C 下培养, 观察并记录菌落形态、颜色等特征, 在光学显微镜下观察菌株的个体形态, 根据《伯杰细菌鉴定手册》^[20] 鉴定菌株的种属.

分子生物学鉴定: 提取细菌基因组 DNA, 使用特异性引物扩增 16S rDNA 序列, 扩增上游引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTAG-3', 下游引物 1429R: 5'-GGTACCTGTGTTACGACTT-3'.

PCR 扩增反应体系: 正向引物与反向引物各 1 μ L, DNA 模板 8 μ L, Prime STAR 聚合酶 10 μ L, 总计 20 μ L.

PCR 扩增反应程序: 98 °C 下变性 10 min, 98 °C 下变性 0.5 min, 55 °C 下退火 0.5 min, 72 °C 下延伸 0.75 min, 30 个循环, 72 °C 下终延伸 10 min, 4 °C 下保存.

使用琼脂糖凝胶电泳分离纯化 DNA, 进行胶回收目的片段, 将 PCR 产物送至上海生物工程公司测序. 将所得 16S rDNA 基因序列于 GenBank 数据库中已有的序列进行 Blast 分析, 从 GenBank 中选择近缘菌株的 16S rDNA 基因序列, 采用 MEGA7.0 软件程序的 NJ 比邻法构建系统发育树, 以确定该菌株的分类学地位^[15, 19].

1.3.4 发酵培养条件的优化 将筛选获得的菌株 SGC-2 进行产酶条件(如碳源、氮源、金属离子等)的优化. 先测定菌株的生长曲线和发酵曲线, 再优化其他产酶条件. 碳源为蔗糖, 右旋糖酐 T2000, 右旋糖酐 T70, α -乳糖, 葡萄糖, 可溶性淀粉; 碳源质量浓度分别为 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, 25 g/L, 30 g/L, 35 g/L, 40 g/L, 45 g/L, 50 g/L; 氮源种类分别为牛肉

膏、蛋白胨、酵母粉、硝酸钠、尿素、氯化铵、硫酸铵(10.0 g/L);氮源质量浓度分别为 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, 25 g/L, 30 g/L, 35 g/L; NaCl 质量浓度分别为 0 g/L, 4 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, 25 g/L, 30 g/L;接种量分别为 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%;培养基装液量分别为 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL. 以上均设置 3 个平行试验,取平均值. 通过测定不同条件下酶活的变化情况,获得碳源种类、碳源浓度、氮源种类、氮源浓度、NaCl 浓度、接种时间、接种量、装液量等发酵条件对产酶活力的影响.

1.3.5 酶活力的测定方法 右旋糖苷酶活力测定采用 DNS 比色法. 具体操作如下:发酵液置于 10 000 r/min 离心 10 min 后,取上清液得粗酶液. 取适当稀释后的粗酶液 0.5 mL,加入到含有 1.5 mL 3% 右旋糖酐 T70(缓冲液)的具塞刻度试管中,于 45 °C 下水浴保温 15 min,立即按 DNS 法测定还原糖含量^[18].

参照葡萄糖的标准曲线计算样品中的还原糖含量,最终计算出酶活力. 酶活力单位(U/mL)定义:在上述反应条件下,每 mL 酶液在 1 min 内使底物降解生成 1 μmol 葡萄糖所需的酶量.

2 结果与分析

2.1 产右旋糖苷酶微生物的筛选结果

2.1.1 初筛结果

各采样点样品稀释涂布划

线培养筛选出产酶菌株情况如表 1 所示,产酶菌株初筛平板透明圈结果如图 1 所示.

由表 1 可知,使用酒精透明圈法可以筛选出产右旋糖酐酶产生菌,但将产透明圈菌株划线至筛选培养基时,菌株存活率相对低. 其原因可能是由于酒精存贮时间太久而具有毒害作用和冷冻对菌种的影响,导致菌株划线培养时基本都不生长. 而使用碘液法则可避免这种问题,即将革兰氏碘液倒入长出菌落的平板中,过 30 s 后培养基会染成深棕色,而右旋糖酐酶产生菌的周围便会有透明圈. 这种方法不仅快速、便捷,且划线生长率也比酒精透明圈法高.

2.1.2 复筛结果 用透明圈法对全部菌株进行初筛和纯化培养,共获得存活的产透明圈菌株 50 株. 将其接入液体发酵培养基,经 37 °C 下,200 r/min 培养 6 d 后,10 000 r/min 离心取得上清液,测定酶活力,其中酶活力较高的菌株发酵复筛的结果见表 2. 从表 2 复筛的结果可以看出,菌株 SGC-2 的酶活力最高为 11.26 U/mL.

2.2 菌株的发酵遗传稳定性试验结果

传代培养过程中菌株的生物量及酶活变化如图 2 所示. 由图 2 可知,从第 1 代至第 10 代菌液的生物量变化不大,菌株在平板上的菌落形态相同,在光学显微镜下观察传代过程中菌株细胞形态,其形态特征一致,无明显突变现象. 经传代发酵培养,第 1 代至第 10 代的酶活

表 1 产右旋糖苷酶微生物的筛选结果

Table 1 Isolation results of microorganisms producing dextran

采样点	稀释度	涂布总平板数	产透明圈菌株数	纯化存活菌株	产酶菌株鉴定法
糖厂甘蔗渣 A	$10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$	50	40	7	酒精透明圈法
糖厂甘蔗渣 B	$10^{-5}, 10^{-6}$	50	43	0	酒精透明圈法
糖厂污水 A	$10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$	50	10	0	酒精透明圈法
糖厂污水 B	10^0	10	5	2	碘液透明圈法
甘蔗土样 A	10^{-6}	50	3	3	酒精透明圈法
甘蔗土样 B	$10^{-4}, 10^{-5}$	50	0	0	酒精透明圈法
甘蔗土样 C	$10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$	50	32	18	碘液透明圈法
甘蔗土样 D	$10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$	50	20	20	碘液透明圈法

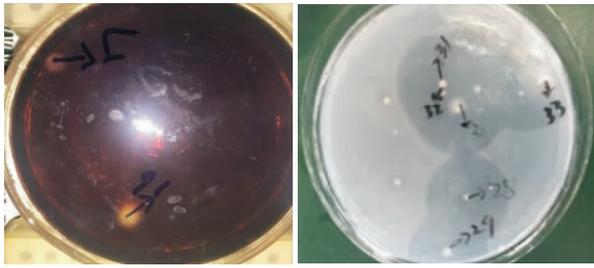


图1 产酶菌株在初筛平板上形成的透明圈
Fig.1 The transparent circle of enzyme-producing strain on screening plan

性,可以选择其作为后续研究的试验菌株.

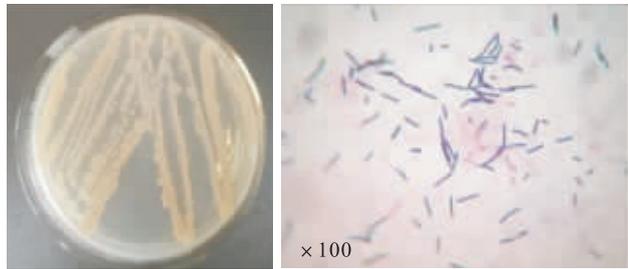
2.3 菌株鉴定结果

2.3.1 形态学鉴定结果 菌株 SGC-2 在筛选培养基上生长 24 h 后形成的菌落形态特征如图 3 所示. 由图 3a) 可知,菌体呈圆形,黄褐色,边缘整齐,表面光滑,湿润. 由图 3b) 可知,在显微镜下,菌体呈杆状,末端圆,大小约 $1.4 \mu\text{m} \times 3.5 \mu\text{m}$,单个或呈短链排列,可运动.

2.3.2 分子学鉴定 利用 16S rDNA 通用引物对菌株 SGC-2 基因组进行 PCR 扩增和电泳检测,凝胶电泳图如图 4 所示. 由图 4 可知,在 1500 bp 处有一明亮的特征条带,琼脂糖凝胶胶回收纯化目标条带后,经上海生工生物有限公司测序,将所得 16S rDNA 基因序列与 GenBank

表2 产右旋糖苷酶微生物的筛选结果
Table 2 Screening results of microorganisms producing dextran

编号	OD ₅₄₀ 值		还原糖质量/mg	酶活/(U·mL ⁻¹)
	对照组	试验组		
MG-1-5	0.007 7	0.013 7	0.098 8	4.17
MG-1-23	0.008 8	0.014 6	0.098 7	4.16
MG-1-24	0.014 6	0.023 7	0.101 2	4.49
MG-1-25	0.014 2	0.023 6	0.101 5	4.53
MG-2-3	-0.001 8	0.004 0	0.098 8	4.17
SGA-1-1	-0.014 5	-0.007 1	0.100 0	4.32
SGA-1-2	-0.023 4	0.002 3	0.103 2	4.76
SGC-2	0.068 5	0.146 2	0.152 0	11.26
SGC-4	0.111 1	0.150 8	0.123 9	7.51
XJ-2	0.200 3	0.215 8	0.106 0	5.13
XJ-5	0.108 7	0.172 4	0.141 6	9.88



a) 菌落形态 b) 细胞形态

图3 菌株 SGC-2 的形态特征

Fig.3 Morphological characteristics of strain SGC-2

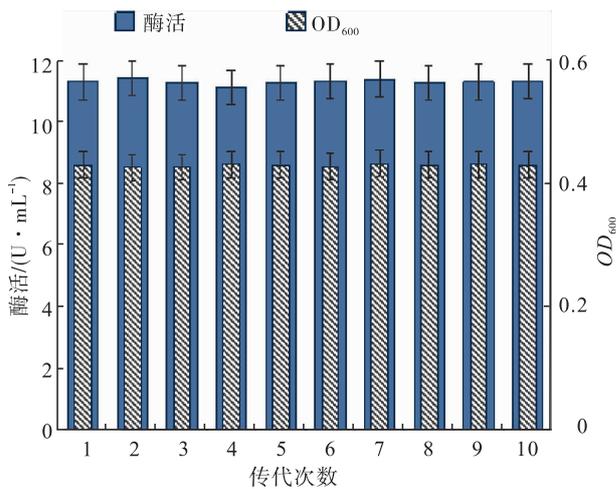


图2 菌株 SGC-2 的遗传稳定性

Fig.2 The genetic stability of strain SGC-2

相对稳定,均在 11.2 U/mL 左右,无明显下降现象. 这说明菌株 SGC-2 具有稳定的遗传特

图4 菌株 SGC-2 的 16S rDNA 凝胶电泳图

Fig.4 Gel electrophoresis diagram of 16S rDNA of strain SGC-2



数据库中已有的序列进行 Blast 分析,从 GenBank 中选择近缘菌株的 16S rDNA 基因序列,经 NCBI 序列比对,菌株 SGC - 2 与 *Bacillus megaterium* strain(NR112636.1) 巨大芽孢杆菌序列匹配度为 100%。利用 MEGA7.0 软件和 Cluster W 软件,运用 NJ 比邻法对包括待鉴定菌株 SGC - 2 在内的 12 株近缘模式菌株进行系统发育树构建,结果如图 5 所示。图 5 显示:菌株 SGC - 2 与巨大芽孢杆菌进化亲缘关系高达 90%,由此可鉴定 SGC - 2 为巨大芽孢杆菌属。

2.4 发酵条件的优化试验结果

在基础发酵培养基上,对接种时间、培养基碳源和氮源、NaCl 质量浓度、菌株接种量、培养基装液量进行优化,确定最优的发酵培养基配方。

2.4.1 接种时间与产酶发酵周期对产酶的影响

接种时间是影响菌株 SGC - 2 生长的重要因素。将菌株 SGC - 2 接种到发酵培养基中,37 °C 下 200 r/min 振荡培养 134 h,其间定时取发酵液,利用比浊法测定 OD_{600} 值,绘制生长曲线见图 6。图 6 显示,在初始 36 h 内,菌株生长变化不明显,菌体增殖缓慢,生物量缓慢提升;当培养时间达到 48 h 以后,菌株进入对数期,菌体快速增殖,生物量急剧提高;96 h 后进入稳定期,菌体总量达到峰值,继续延长培养时间至 108 h 以后,营养物质的消耗已经不利于

菌体生长代谢物的积累,导致菌体自溶,菌体生物量呈下降趋势。故菌株的最佳接种时间为 36 h。

定时间间隔取发酵液,置于 10 000 r/min,4 °C 条件下离心 10 min,取上清液测定酶活,其结果如图 6 所示。由图 6 可知,初始培养 48 h 内,菌株产右旋糖苷酶酶活较低,表明培养初期菌株主要靠消耗营养物质来维持菌体的增殖,基本不代谢产酶。当发酵时间超过 48 h 后,右旋糖苷酶活大幅度提高,至 96 h 产酶达到峰值,酶活为 10.24 U/mL。这表明当菌株增殖到一定程度时,菌株开始分泌右旋糖苷酶,酶活出现剧增。随发酵过程的继续进行,96 h 后产酶量开始降低,其原因是此时菌株进入衰亡期及营养物质的消耗,导致菌体的产酶能力减弱。所以,菌株的生物量与产酶能力有较密切的关系,为保证发酵过程中充分利用菌体增殖提高产酶能力,产酶发酵周期不宜超过 96 h。

2.4.2 不同碳源对产酶的影响

右旋糖苷酶属于诱导酶,不同碳源对发酵产酶均有影响(见图 7)。分别以质量浓度为 10 g/L 的蔗糖,右旋糖苷 T2000,右旋糖苷 T70, α -乳糖,葡萄糖,可溶性淀粉作为碳源,于 37 °C 下,200 r/min 发酵 134 h,测定酶活力,结果如图 7a) 所示。从图 7a) 可知,在 6 种碳源中,以右旋糖酐 T2000 发作为碳源时右旋糖苷酶活力最高,可达到

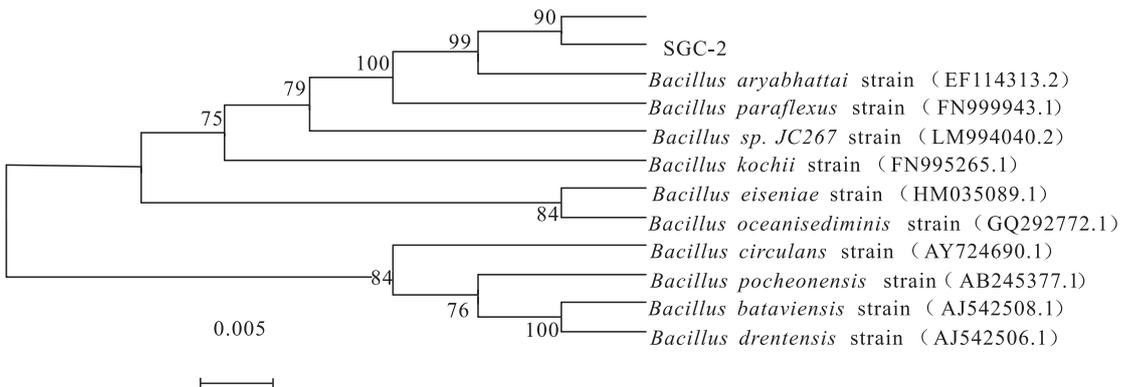


图 5 菌株 SGC - 2 的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of strain SGC-2

12.29 U/mL;其次为右旋糖酐 T70,以蔗糖、乳糖和可溶性淀粉为碳源时的产酶能力相对较弱,在 5 U/mL 左右;以葡萄糖为底物时几乎不产右旋糖苷酶. 因此选择右旋糖酐T2000为发

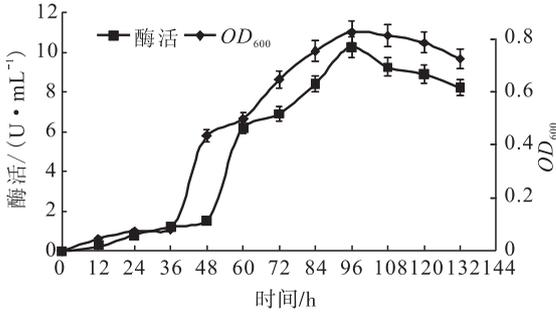
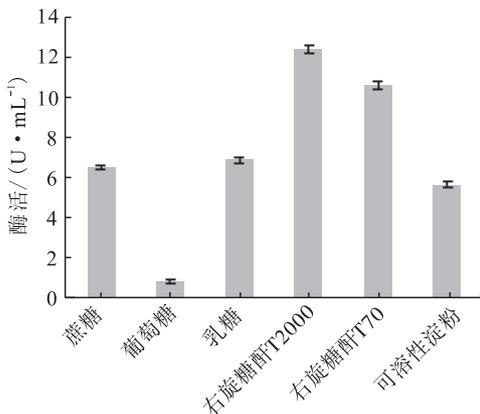
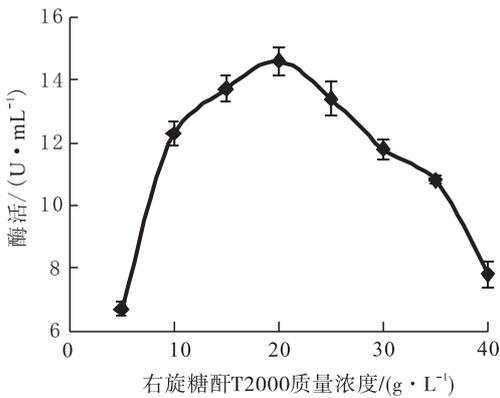


图 6 菌株 SGC-2 的生长、产酶曲线
Fig. 6 Growth and enzyme production curve of strain SGC-2



a) 不同碳源对右旋糖苷酶活的影响



b) 不同右旋糖酐T2000质量浓度对右旋糖苷酶活的影响

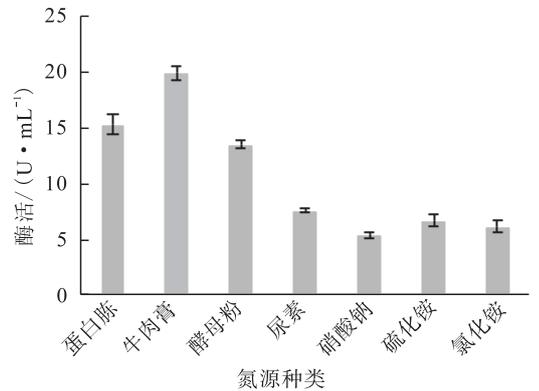
图 7 碳源对产酶的影响

Fig. 7 Effect of carbon source on dextranase production

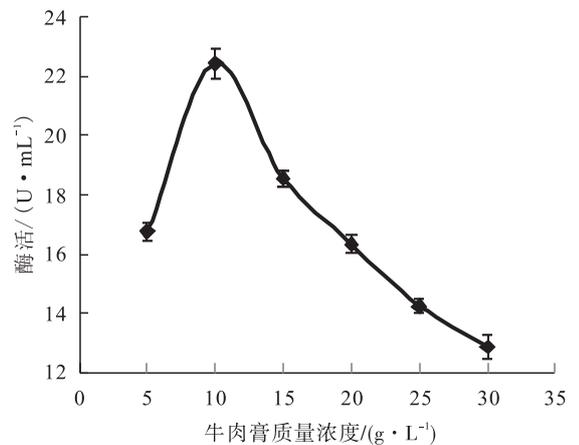
酵培养基的基础碳源.

在确定最适碳源后,考察碳源质量浓度对右旋糖苷酶酶活的影响,结果如图 7b) 所示. 由图 7b) 可知,随着右旋糖苷 T2000 添加量的增加,右旋糖苷酶活呈先上升后逐渐下降的趋势,当右旋糖苷 T2000 质量浓度为 20 g/L 时,酶活达到 14.6 U/mL,当其质量浓度超过 20 g/L 后,右旋糖苷酶活力逐渐降低. 故 20 g/L 为右旋糖酐 T2000 最适质量浓度.

2.4.3 不同氮源对产酶的影响 不同氮源种类和质量浓度对发酵产酶有重要影响(见图 8). 在产酶基础培养基中,以质量浓度为20 g/L 的右旋糖酐T2000为培养基的碳源,分别添



a) 不同氮源对右旋糖苷酶活的影响



b) 不同牛肉膏质量浓度对右旋糖苷酶活的影响

图 8 氮源对产酶的影响

Fig. 8 Effect of nitrogen source on dextranase production

加质量浓度为 20 g/L 的牛肉膏、蛋白胨、酵母粉、硝酸钠、尿素、氯化铵、硫酸铵进行产酶发酵,试验结果如图 8a) 所示. 由图 8a) 可知, 菌株 SGC-2 在以牛肉膏、蛋白胨等有机氮源作为氮源时右旋糖苷酶活力较高, 其中以牛肉膏为氮源时酶活最高, 达到 19.86 U/mL. 无机氮源的产酶能力相对低, 其原因可能为蛋白胨和牛肉膏成分复杂, 营养丰富, 不仅可以作为氮源, 还可以提供生长因子, 促进微生物生长, 从而提高产酶能力. 因此, 选择牛肉膏作为最佳氮源.

以牛肉膏为氮源, 考察氮源质量浓度 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, 25 g/L 和 30 g/L 对右旋糖苷酶酶活的影响, 其结果如图 8b) 所示. 随牛肉膏质量浓度的不断增加, 右旋糖苷酶活力呈先提高后下降的趋势, 当其质量浓度为 10 g/L 时, 右旋糖苷酶活最高, 达到 22.45 U/mL. 因此, 确定牛肉膏的最适质量浓度为 10 g/L.

2.4.4 NaCl 质量浓度对产酶的影响 为了研究氯化钠浓度对菌株产酶的影响, 在发酵培养基中添加氯化钠至不同质量浓度, 结果如图 9 所示. 菌株的最适产酶 NaCl 质量浓度为 4 g/L, 当 NaCl 质量浓度高于 15 g/L 后, 菌株的产酶能力明显下降. 当 NaCl 质量浓度达到 25 g/L 时, 右旋糖苷酶产量不足最大产酶量的 50%. 由此可见, 菌株产酶对 NaCl 质量浓度较为敏感.

2.4.5 接种量对产酶的影响 不同接种量对右旋糖苷酶酶活的影响如图 10 所示. 由图 10 可知, 接种量过低会造成发酵培养基营养过剩, 微生物生长量不能产生足量的右旋糖苷酶, 导致酶活偏低; 接种量过高, 菌体繁殖太多, 发酵培养基营养不足以维持产酶, 会导致酶活下降, 故考察接种量对右旋糖苷酶酶活力的影响. 在装液 50 mL 的发酵瓶中, 当接种量由 1% 升至 3% 时, 菌株产右旋糖苷酶酶活明显提高; 当接种量为 3% 时, 达最高酶活, 为 23.32 U/mL; 当接种量超过 3% 时, 酶活逐渐下降. 故选择 3%

为最佳接种量.

2.4.6 装液量对产酶的影响 发酵液中溶氧量和氧气的传递效率与摇瓶装液量直接相关, 会影响发酵液中菌体对营养物质的利用速率, 从而影响右旋糖苷酶的生产效率. 巨大芽孢杆菌为需氧微生物, 所以装液量的大小直接影响着它的生长和右旋糖苷酶的产生. 不同装液量对右旋糖苷酶酶活的影响如图 11 所示. 由图 11 可知, 在 250 mL 锥形瓶中加入 30 ~ 80 mL 的液体发酵培养基, 菌株产右旋糖苷酶的酶活随着装液量的增加先提高后降低: 当装液量达到 50 mL 时, 酶活达到最高, 为 24.48 U/mL; 之后随装液量的逐步提高, 产酶活逐渐降低. 装瓶量过少, 水分容易挥发, 不能给菌株提供正常生产的足量营养, 导致酶活偏低. 而装液量过高

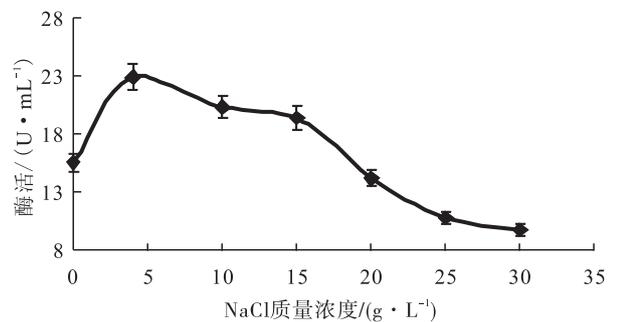


图 9 NaCl 质量浓度对产酶的影响
Fig. 9 Effect of NaCl concentration on dextranase production

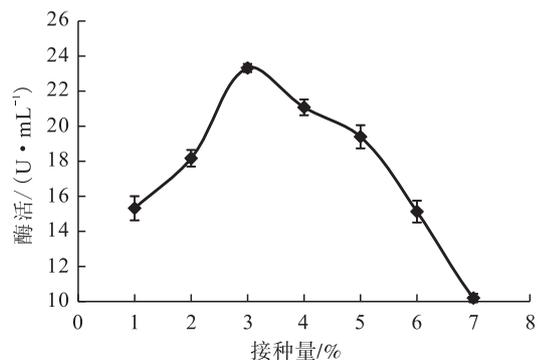


图10 不同接种量对右旋糖苷酶酶活的影响
Fig. 10 Effect of different inoculation amount on dextranase production

时,氧气不足会影响菌株正常的新陈代谢.因此,确定右旋糖苷酶发酵培养基的最适装液量为 50 mL.

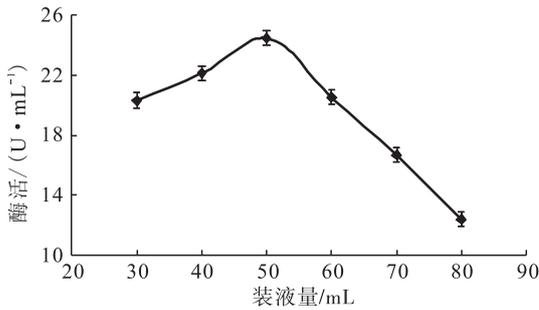


图 11 不同装液量对右旋糖苷酶酶活的影响

Fig. 11 Effect of different liquid volume on dextranase production

2.4.7 综合试验优化结果 在上述优化的培养基及培养条件下,分别发酵培养菌株 84 h, 96 h, 108 h, 进一步确定产酶条件优化的可靠性.其结果如表 3 所示,在 84 h, 96 h, 108 h 这三个时间点,右旋糖苷酶酶活先升高后降低,其变化趋势同菌株的生长、发酵曲线一致.当发酵时间达 96 h 时,酶活达到最高,为 28.32 U/mL,比优化前的 11.26 U/mL 提高了 151%.

表 3 优化发酵条件下的产酶情况

Table 3 Enzyme production with optimal fermentation conditions

发酵时间/h	试验次数			酶活均值/(U·mL ⁻¹)
	1	2	3	
84	20.30	22.62	21.53	21.48
96	28.45	27.96	28.55	28.32
108	24.72	24.08	24.10	24.30

3 结论

本文用透明圈法从甘蔗土壤中筛选出了一株新的产高活性右旋糖苷酶菌株,经鉴定为巨大芽孢杆菌,对该菌株的产酶条件进行优化,得到该菌株产右旋糖苷酶发酵最优产酶条件为:右旋糖酐 T2000 质量浓度 20 g/L,牛肉膏质量

浓度 10 g/L, NaCl 质量浓度 4 g/L, MgSO₄ 质量浓度 0.4 g/L, 接种时间 36 h, 接种量 3%, 发酵时间 96 h. 该条件下酶活达到 28.32 U/mL, 与优化前的酶活 11.26 U/mL 相比, 提高了 151%. 该右旋糖酐酶产生菌目前未见相关报道, 而且其产酶量较高, 比其他产右旋糖酐酶产生细菌具有更大优势. 本研究发现了新来源的右旋糖酐酶产生菌, 为筛选高产右旋糖苷酶微生物的研究提供了一定的理论基础.

参考文献:

- [1] 张洪斌, 吴定涛, 黄丽君, 等. 一株产右旋糖酐酶青霉的分离及酶的纯化和性质[J]. 微生物学报, 2011, 51: 495.
- [2] EGGLESTON G, MONGE A. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases [J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 1881.
- [3] 蒋丹, 仇元新, 胡涛, 等. 口腔链球菌右旋糖酐酶分子结构和功能的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2008, 35: 249.
- [4] KIM Y M, SEO M Y, KANG H K, et al. Construction of a fusion enzyme of dextranase and dextranase; Application for one-step synthesis of isomaltoligosaccharides [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2009, 44: 159.
- [5] ASLAN Y, TANRISEVEN A. Immobilization of *Penicillium lilacinum* dextranase to produce isomaltoligosaccharides from dextran [J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 34: 8.
- [6] 朱慧霞, 王雅洁, 邓胜松, 等. 绳状青霉菌发酵产右旋糖酐酶的条件研究[J]. 食品科学, 2010, 31: 288.
- [7] SUGIURA M, ITO A, OGISO T, et al. Studies on dextranase; Purification of dextranase from *Penicillium funiculosum* and its enzymatic properties [J]. BBA-Enzymology, 1973, 309: 357.

- [8] PLESZCZYNSKA M, ROGALSKI J, SZCZODRAK J, et al. Purification and some properties of an extracellular dextranase from *Penicillium notatum* [J]. *Mycological Research*, 1996, 100: 681.
- [9] BARRETT J F, BARRETT T A. Purification and partial characterization of the multicomponent dextranase complex of streptococcus sobrinus and cloning of the dextranase gene [J]. *Infection & Immunity*, 1987, 55: 792.
- [10] KOBAYASHI M, TAKAGI S, SHIOTA M, et al. An isomaltotriose-producing dextranase from *Flavobacterium* sp M-73: purification and properties [J]. *Agricultural & Biological Chemistry*, 1983, 47: 2585.
- [11] 焦豫良, 王淑军, 吕明生, 等. 产右旋糖酐酶埃氏交替单胞菌的筛选、鉴定及酶活分析 [J]. *食品工业科技*, 2013, 34: 171.
- [12] 吴定涛. 高产右旋糖酐酶菌株的筛选及酶学性质和酶的应用研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2012.
- [13] ABDEL-NABY M A, ISMAIL A M S, ABDEL-FATTAH A M, et al. Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculo-*
sum 258 dextranase [J]. *Process Biochemistry*, 1999, 34(4): 391.
- [14] 李卫娟. 可降解牙菌斑生物膜氧化节杆菌右旋糖苷酶的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [15] 吕明生, 王淑军, 房耀维, 等. 一株产低温右旋糖苷酶海洋细菌的筛选和鉴定 [J]. *海洋科学*, 2011, 35: 32.
- [16] 孙晋武. 右旋糖酐酶及其应用 [J]. *中国生物工程杂志*, 1986(4): 35.
- [17] ZOHRA R R, AMAN A, ZOHRA R R, et al. Dextranase: hyper production of dextran degrading enzyme from newly isolated strain of *Bacillus licheniformis* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92: 2149.
- [18] 王德龙. 海洋微生物右旋糖苷酶的发酵和纯化研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [19] KUWAHARA T, NORIMATSU I, NAKAYAMA H, et al. Genetic variation in 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions and the possible use of this genetic variation for molecular diagnosis of *Bacteroides species* [J]. *Microbiology & Immunology*, 2013, 45: 191.
- [20] 布坎南, 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984.