

# 耐热 $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶源真菌筛选、鉴定及产酶条件优化

华承伟<sup>1</sup>, 于江傲<sup>1</sup>, 谢凤珍<sup>2</sup>, 陈晓静<sup>2</sup>, 孙婷婷<sup>1</sup>

(1.河南科技学院生科院, 河南新乡 453003;

2.河南科技学院新科学院, 河南新乡 453003)

**摘要:**利用葡聚糖作为唯一碳源的基础盐培养,在50℃培养条件下,从新乡周围土样及腐殖质中筛选到一株产 $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶耐热真菌菌株(*Paecilomyces* sp. FLH30)。该菌株在40~60℃能较好生长,最适生长温度45℃。产酶培养优化条件表明:在培养温度为45℃,初始培养基pH6.5,以大麦麸皮为碳源,以蛋白胨、酵母粉和玉米浆为有机氮源,发酵4d,葡聚糖酶活达132.4U/mL,葡聚糖酶最适pH和温度分别为7.0和70℃。

**关键词:**耐热 $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶,真菌,筛选,优化

## Screening and identification of thermostable $\beta$ -1,3(4)-glucanase-producing fungi and optimizing conditions for enzyme production

HUA Cheng-wei<sup>1</sup>, YU Jiang-ao<sup>1</sup>, XIE Feng-zhen<sup>2</sup>, CHEN Xiao-jing<sup>2</sup>, SUN Ting-ting<sup>1</sup>

(1.School of Life Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, 453003, China;

2.College of Xinke, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, 453003, China)

**Abstract:** A thermophilic fungi *Paecilomyces* sp. FLH30 possessing  $\beta$ -1,3(4)-glucanase was isolated from soil and humus samples from Xinxiang, and cultured at 50℃ by using basal medium supplemented with glucan as a sole carbon source. Strain FLH30 was capable of growing well on 40~60℃ and the optimum growth temperature was 45℃. According to optimization condition of enzyme production, the initial pH was 6.5, with addition of barley bran and peptone, yeast extraction and corn steep liquor as carbon and nitrogen sources, respectively. The maximum enzyme activity reached 132.4U/mL after incubation 4d in 45℃. The optimal pH and temperature of the glucanase for the reaction was 7.0 and 70℃, respectively.

**Key words:** thermostable  $\beta$ -1,3(4)-glucanase; fungi; screening; optimizing

中图分类号: Q939.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)13-0131-04

$\beta$ -1,3-葡聚糖作为结构和多糖贮存成分,广泛分布于各种植物、真菌和细菌中,是一种生物活性强、毒副作用低的高效生物应答物<sup>[1]</sup>。 $\beta$ -1,3-葡聚糖不仅包括只有 $\beta$ -1,3-糖苷键组成的线型昆布多糖(Laminarin)<sup>[2]</sup>,而且还包括在主链或支链由其它形式糖苷键连接形成的葡聚糖。如存在于大麦、黑麦、小麦和稻米等禾本科谷物及地衣中的由 $\beta$ -1,3和 $\beta$ -1,4混合糖苷键组成的 $\beta$ -1,3-1,4葡聚糖和来源于含褐海藻(*Laminaria digitata*)带有 $\beta$ -1,6支链的 $\beta$ -1,3/1,6-葡聚糖。 $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶(EC 3.2.1.6)可水解 $\beta$ -1,3-葡聚糖、 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖和 $\beta$ -1,3/1,6-葡聚糖,在啤酒工业和饲料工业中有重要的应用价值。啤酒工业中,可提高麦汁分离速度、麦汁浸出量和啤酒过滤速度,减少啤酒浑浊度和胶状沉淀物,从而改

善啤酒质量;饲料中添加 $\beta$ -葡聚糖酶可改善谷物营养价值,提高饲料转化率和畜禽生长速度<sup>[3]</sup>。迄今,产 $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶的微生物主要来源于真菌<sup>[4-8]</sup>,但真菌来源的 $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶大都热稳定性差,酶作用的最适温度为40~45℃,55℃下迅速失活,是糖化和啤酒酿造的瓶颈步骤,严重限制了糖化工艺的发展,也限制在饲料加工中的使用。耐热微生物所产酶一般具有良好的热稳定性,因此,筛选产耐热 $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶源菌株,对于酶制剂开发和应用具有重要的意义。本文对在50℃下筛选到的一株产葡聚糖酶耐热真菌的类型、产酶条件进行和酶学性质进行了初步鉴定和探究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

样品采集 河南新乡周边土壤及太行山南麓丛林土壤及腐殖质;筛选培养基(g/L)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1,  $\text{CaCl}_2$  0.4,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1, 葡聚糖 1.0, 琼脂粉 15, HCl调pH至5.5;分离培养

收稿日期: 2011-12-06

作者简介: 华承伟(1972-),男,博士,副教授,研究方向:食品生物技术、酶工程。

基 PDA培养基<sup>[9]</sup>; 发酵基础盐培养基(g/L)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3,  $\text{CaCl}_2$  0.4,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1; 酵母提取物、胰蛋白胨 Oxoid公司; 大麦葡聚糖、地衣多糖、昆布多糖、微晶纤维素(Avicel)、CMC-Na、桦木木聚糖、葡萄糖 Sigma公司; 蛋白低分子量标准 Takara公司; 其它试剂 均为分析纯。

## 1.2 实验方法

1.2.1 耐热真菌分离 分别取土样及腐殖质1g左右, 加入装有灭菌的10mL 0.9%的NaCl溶液的小三角瓶中, 室温振荡30min, 取0.1mL涂布筛选平板, 倒置, 于50℃培养3~5d。用灭菌牙签挑取单菌落菌丝, 转接于PDA分离培养基进行单菌落分离。

1.2.2 产酶菌株复筛 用接种铲取面积约1cm<sup>2</sup>左右的菌块, 接种于含有蛋白胨10g/L、酵母粉10g/L和大麦粉20g/L的发酵培养基, 180r/min, 45℃培养3d。取发酵液1mL, 10000r/min离心5min, 取上清, 按1.2.3方法测定酶活。

1.2.3 酶活测定 取1.0mL底物溶液与经适当稀释的酶液0.1mL混合, 反应10min后, 沸水煮沸5min中止反应, 以葡萄糖作标准, 酶活力通过DNS测定还原糖法进行<sup>[10]</sup>。酶活力的单位定义为: 50℃, pH7.0的MES缓冲液及底物浓度为1% (w/v), 每分钟生成1μmol葡萄糖所需要的酶量。

1.2.4 菌种初步鉴定 肉眼观察菌落形态和颜色等, 石炭酸-棉兰染色显微镜观察菌丝、分生孢子梗及孢子形态<sup>[9, 11]</sup>。

1.2.5 葡聚糖酶酶谱 SDS-PAGE电泳<sup>[12]</sup>中加入0.1%葡聚糖, 电泳完毕, 20%异丙醇复性三次, 50mmol/L pH7.0的磷酸缓冲液浸泡三次, 每次10min, 直到紫外下显示透明条带。

1.2.6 产酶条件 45℃生长4d的菌落制成孢子悬液( $10^8$ 个/mL), 接种到添加各种氮源和碳源基础盐的培养基, 装量25mL/500mL三角瓶, 考察不同条件对产酶的影响, 实验结果为3次平行实验的平均值。

1.2.7 真菌生物量的检测 将中性滤纸干燥后称重, 每次检测将整瓶培养液过滤, 把滤纸和残留的真菌菌体在105℃下干燥8h后, 在干燥器中冷却至室温, 称重, 得到真菌菌体干重。

1.2.8 最适pH和最适温度 50℃下, 分别测定重组酶在pH2.5~11.0的4种不同缓冲液(50mmol/L, 柠檬酸缓冲液pH2.5~5.5, MES缓冲液pH5.0~7.0, 磷酸缓冲液pH6.0~8.5, 甘氨酸-NaOH缓冲液pH8.5~11.0)中的酶活, 以最高酶活作为100%; 分别于30~90℃测定酶活(50mmol/L MES缓冲液pH7.0), 以最高酶活作为100%。结果为三次实验数据的平均值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产酶菌株筛选

利用含单一碳源的葡聚糖筛选平板按1.2.1方法筛选, 共筛选得到产葡聚糖酶真菌菌株12株, 经摇瓶发酵和酶活测定, 发现一株真菌产酶活较高, 为56.4U/mL。该菌株在40~60℃范围内生长良好, 低于25℃基本不生长, 最适生长温度45℃。PDA培养基45℃培养5d的单菌落正面颜色呈白色(图1A), 背面呈淡

浅褐色(图1B)。

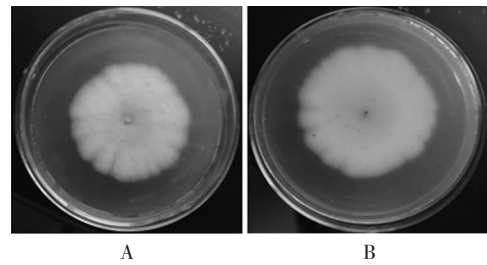


图1 拟青霉FLH30培养5d 单菌落正面(A)及背面(B)  
Fig.1 Colony morphology of *Paecilomyces* sp. FLH30 after growth 5d on PDA.

石炭酸-棉兰染色的菌丝有隔, 核均一(图2A); 孢子呈卵圆形, 分生孢子梗类似扫帚状分枝(图2B)。因此, 根据菌落外观形态、颜色, 孢子和孢子梗形态<sup>[11]</sup>, 初步鉴定该菌株为拟青霉属, 菌株命名为 *Paecilomyces* sp. FLH30。

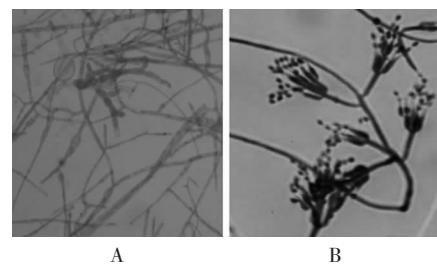


图2 拟青霉FLH30菌丝(A)、分生孢子梗及孢子(B)图  
Fig.2 The mycelium, conidiophore and conidiospore of *Paecilomyces* sp. FLH30

### 2.2 葡聚糖酶底物特异性分析

用50mmol/L, pH7.0的磷酸缓冲液配制1% (w/v) 的大麦葡聚糖、地衣多糖和昆布多糖, 加入适当稀释的粗酶液, 测定酶活, 结果见表1。

表1 拟青霉FLH30葡聚糖酶底物特异性

Table 1 Analysis of substrate specificity of glucanase from *Paecilomyces* sp. FLH30

| 底物      | 主要连接键               | 酶活(U/mL) |
|---------|---------------------|----------|
| 大麦β-葡聚糖 | 1,3-1,4-β-(glucose) | 56.4     |
| 地衣多糖    | 1,3-1,4-β-(glucose) | 38.8     |
| 昆布多糖    | 1,3-β-(glucose)     | 12.2     |

由表1中数据可以看出, 粗酶液对大麦葡聚糖有较高的酶活, 对地衣多糖和昆布多糖的酶活分别为大

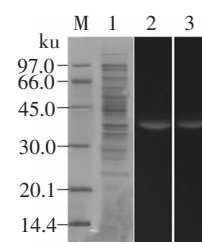


图3 拟青霉FLH30产葡聚糖酶酶谱  
Fig.3 Zymogram analysed of glucanase from *Paecilomyces* sp. FLH30

注: M: 蛋白低分子量标准; 泳道1: 发酵液;  
泳道2: 大麦葡聚糖底物; 泳道3: 昆布多糖底物。

麦葡聚糖的68.7%和21.6%。为考察拟青霉FLH30是否产多个葡聚糖酶,取发酵液进行大麦葡聚糖和昆布多糖的酶谱分析。结果显示,两种底物的酶谱都只有一条透明带(图3),且大小一致,分子量约36.2ku,说明拟青霉FLH30产一种葡聚糖酶,且为典型的 $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶。

### 2.3 拟青霉FLH30产葡聚糖酶条件

**2.3.1 不同碳源对产酶的影响** 在含有蛋白胨和酵母粉各10g/L的基础盐培养基中,分别添加20g/L的经粉碎过60目筛的玉米芯、玉米杆、大麦麸皮、稻草粉、米糠和甘蔗渣5种碳源进行产酶实验,180r/min,45℃培养3d,结果见图4。由图4可知,以大麦麸皮和米糠产酶效果较好,其中以大麦麸皮为碳源时葡聚糖酶活可达85.2U/mL。因此选用大麦麸皮为碳源进行后续产酶实验。

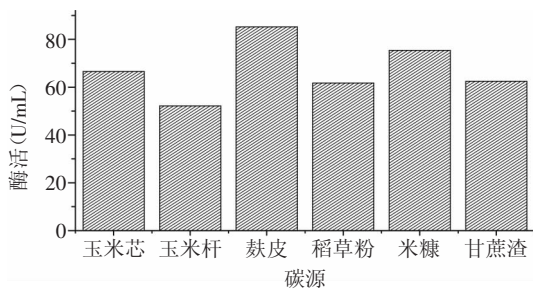


图4 不同碳源对产酶的影响

Fig.4 Effect of carbon sources on enzyme production

**2.3.2 碳源添加量对产酶的影响** 含有蛋白胨和酵母粉各10g/L的基础盐培养基中,分别添加不同量大麦麸皮进行产酶实验,结果表明,在大麦麸皮含量为40g/L时,酶活最高(图5)。随大麦麸皮含量的增加,酶活反而有下降的趋势,可能是含量过高的麸皮影响培养基的流动性,降低氧传递速率所致。

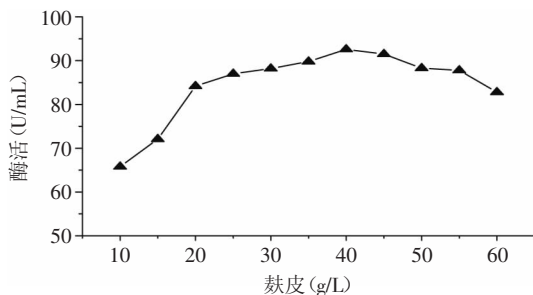


图5 碳源含量对产酶的影响

Fig.5 Effect of carbon concentration on enzyme production

**2.3.3 氮源对产酶的影响** 通过添加不同种类和数量的氮源进行实验,45℃培养3d,测定发酵液酶活,确定产酶的最佳氮源(表2)。结果表明,复合氮源酵母粉+蛋白胨对菌株产葡聚糖酶具有明显的促进作用。实验结果同时表明,添加玉米浆(固型物质量分数50%)可促进酶的产生,可能是由于玉米浆中成分复杂,营养成分全面所致。

**2.3.4 培养基起始pH对产酶的影响** 以 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲体系配制浓度为100mmol/L,不同pH(4.0~8.0)的培养基,接种等量的孢子悬浮液,45℃培养3d,测定酶活(图6)。起始pH对菌株产酶有明显的影响,最适产酶起始pH为6.5左右,在pH低于5.0及pH

表2 氮源对产酶的影响

Table 2 Effect of nitrogen sources on enzyme production

| 氮源                           | 浓度            | 酶活 (U/mL) |
|------------------------------|---------------|-----------|
| 牛肉膏                          | 10g/L         | 80.4      |
| 玉米浆                          | 10mL/L        | 91.4      |
| 蛋白胨                          | 10g/L         | 87.5      |
| 酵母粉                          | 10g/L         | 88.7      |
| 酵母粉+蛋白胨                      | 10g/L+10g/L   | 92.2      |
| 酵母粉+蛋白胨+玉米浆                  | (10+10+5)mL/L | 95.4      |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 2.5g/L        | 85.6      |
| $\text{NH}_4\text{Cl}$       | 2.5g/L        | 82.5      |
| $\text{NH}_4\text{NO}_3$     | 2.5g/L        | 78.9      |
| 尿素                           | 2.5g/L        | 76.2      |

高于8.0时,酶活显著下降。菌株在pH4.5~6.0之间,虽然生长良好,但产酶活较低,可能与酶蛋白的耐酸性及菌株此pH条件下产酶能力有关;在pH高于7.5时,菌株生物量降低,可能是影响产酶的主要原因。

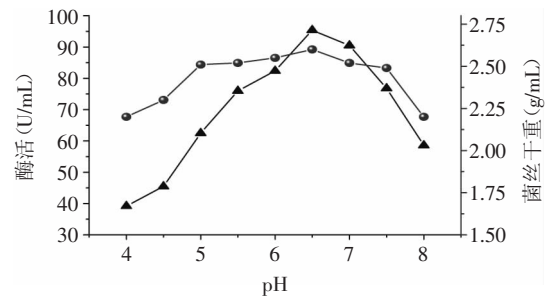


图6 培养基起始pH对产酶的影响

Fig.6 Effect of initial pH on enzyme production

注:▲:酶活;●:菌丝干重。

**2.3.5 培养温度对产酶的影响** 接种后的培养液分别于30~60℃培养3d后,取发酵液测定酶活,结果见图7。可见培养温度对产酶有显著影响,最适产酶温度为45℃,与最适温度相同,当温度高于50℃后,酶活下降,但仍处在较高水平。同时表明,该菌株为耐热真菌和具有较好的酶耐热性。

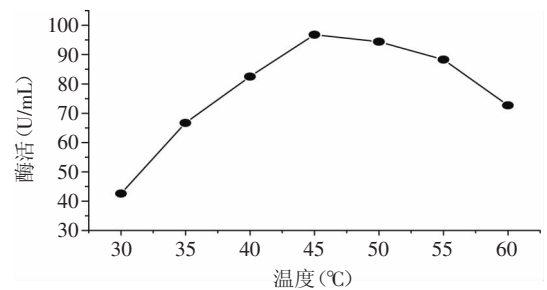


图7 培养温度对产酶的影响

Fig.7 Effect of temperature on enzyme production

**2.3.6 培养时间对产酶的影响** 在上述优化条件下,分别培养不同时间,每隔12h取样分析酶活。结果表明,在培养96h时,酶活最高,达132.4U/mL,随后出现缓慢下降(图8),而此时,并没有出现菌丝自溶现象,可能是由于菌株产酶速率大于酶失活速率所致。

### 2.4 葡聚糖酶最适pH和最适温度

拟青霉FLH30所产 $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶最适pH约7.0(图9a),在pH5.5~7.5之间,酶活可达最高酶活



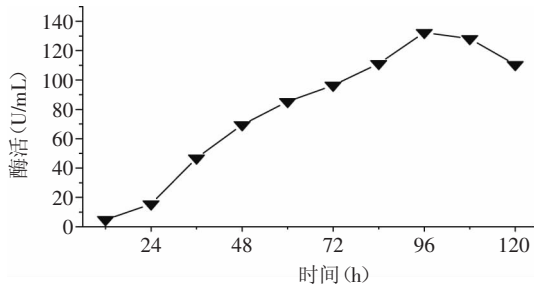


图8 培养时间对产酶的影响

Fig.8 Effect of time on enzyme production

的80%以上,最适作用温度约70℃(图9b),高于75℃,酶活显著降低。

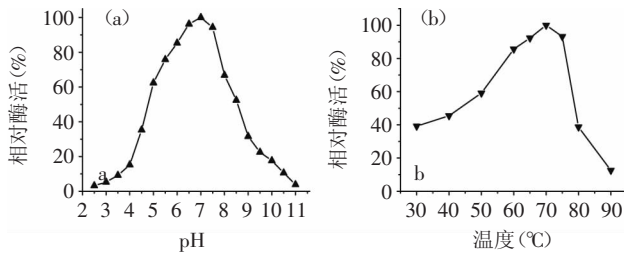


图9 葡聚糖酶最适pH和最适温度

Fig.9 The optimal pH and temperature of glucanase from *Paecilomyces* sp. FLH30

### 3 结论

从新乡关山土样及腐殖质筛选得到一耐热产 $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶真菌菌株,经菌落形态特征及分生孢子梗和分生孢子显微形态观察,初步鉴定为拟青霉(*Paecilomyces* sp. FLH30),其最适生长温度45℃,在40~60℃之间,生长良好。在培养温度为45℃,初始培养基pH6.5,以大麦麸皮为碳源,以蛋白胨、酵母粉和玉米浆为有机氮源,发酵4d,葡聚糖酶活达132.4U/mL。

该菌株所产 $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶最适pH约7.0,最适作用温度约70℃。在pH5.0~7.5之间及75℃以下,仍具有较高的酶活力,可较好地运用于啤酒、制糖及饲料工业。

### 参考文献

[1] Buliga GS, Brant DA, Fincher GB. The sequence statistics and

solution conformation of a barley(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan[J]. Carbohydrate Research, 1986, 157:139-156.

[2] McCarthy T, Hanniffy O, Savage AV, et al. Catalytic properties and mode of action of three endo- $\beta$ -glucanases from *Talaromyces emersonii* on soluble  $\beta$ -1,4- and  $\beta$ -1,3;1,4-linked glucans [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2003, 33(1-3):141-148.

[3] Bang ML, Villadsen I, Sandal T. Cloning and characterization of an endo- $\beta$ -1,3(4)glucanase and an aspartic protease from *Phaffia rhodozyma* CBS 6938 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(2):215-222.

[4] Boyce A, Walsh G. Production, purification and application-relevant characterisation of an endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase from *Rhizomucor miehei* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(4):835-841.

[5] Kawai R, Igarashi K, Yoshida M, et al. Hydrolysis of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan by glycoside hydrolase family 16 endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(6):898-906.

[6] Martín-Cuadrado AB, del Dedo JE, de Medina-Redondo M, et al. The *Schizosaccharomyces pombe* endo-1,3- $\beta$ -glucanase Eng1 contains a novel carbohydrate binding module required for septum localization [J]. Molecular Microbiology, 2008, 69(1):188-200.

[7] 王金玲,何国庆,吕长山. 响应面法优化康氏木霉产 $\beta$ -葡聚糖酶的液体发酵条件[J]. 食品工业科技, 2010, 31(9):204-207.

[8] 金欣,夏黎明. 厌氧真菌内切- $\beta$ -葡聚糖酶基因在里氏木霉中的重组与表达[J]. 高校化学工程学报, 2011(4):637-642.

[9] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 第三版. 北京:高等教育出版社,1999.

[10] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3):426-428.

[11] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.

[12] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227:680-685.

(上接第130页)

[9] Bahar T, Celebi SS. Characterization of glucoamylase immobilized on magnetic poly(styrene) particles[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 23:301-304.

[10] Bahar T, Celebi SS. Performance of immobilized glucoamylase in a magnetically stabilized fluidized bed reactor (MSFBR) [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26:28-33.

[11] Hong-tao Deng, Zhi-kang Xu, Zhen-mei Liu, et al. A comparative study on lipase immobilized Polypropylene microfiltration membranes modified by suga-reontaining polymer and polypeptide[J]. Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 2004, 28:95-100.

[12] Hong-tao Deng, Zhi-kang Xu, Zhen-mei Liu, et al.

Immobilization of candida rugosa lipases by adsorption on polypropylene hollow fiber microfiltration membranes modified by hydrophobic polypeptides[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 35(5):437-443.

[13] 彭立凤,刘新喜. 棉织物上SESA活化法固定化脂肪酶工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2001, 22(2):30-33.

[14] 杨昌英,潘家荣,钟珩,等. 醋酸纤维素固定化脂肪酶催化猪油合成单甘酯[J]. 湖北化工, 2002(6):20-21.

[15] 李脉,杨继国,杨博. 磷脂酶A<sub>1</sub>酶活测定方法的研究[J]. 现代食品科技, 2007, 23(8):80-82.

[16] 吴有炜. 实验设计与数据处理[M]. 苏州:苏州大学出版社, 2002:115-154.