

Bacillus sp. HA-1 菌株的选育及特性研究

王雁萍¹, 陈林海¹, 李宗伟¹, 秦广雍¹, 李宗义², 谈重芳¹, 段宇珩¹, 霍裕平¹

(1. 河南省离子束生物工程重点实验室 河南 郑州 450052;

2. 河南师范大学生命科学学院 河南 新乡 453007)

摘要:应用 N^+ 离子注入诱变技术对环糊精葡萄糖基转移酶产生菌进行诱变选育高产菌株。筛选到产酶水平是出发菌株1.6倍的菌株*B. sp.* HA-1, 该菌株于5m³生产罐上发酵24h产酶能力达到6800IU/ml。酶转化25%木薯淀粉生成 α -环糊精, 12h转化率达到85%。该菌株产酶具有良好的传代稳定性, F₂~F₂₀代产酶水平是F₁代的98.11%~102.66%。

关键词: N^+ 离子注入; 环糊精葡萄糖基转移酶; α -环糊精; 选育; 发酵

Breeding of CGTase Processing Strain with N^+ Ion Implantation

WANG Yan-ping¹, CHEN Lin-hai¹, LI Zong-wei¹, QIN Guang-yong¹, LI Zong-yi²,

TAN Zhong-fang¹, DUAN Yu-heng¹, HUO Yu-ping¹

(1. Henan Provincial Key Laboratory of Ion Beam Biotechnology, Zhengzhou 450052, China;

2. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: With N^+ ion implantation, a high-yield cyclodextrin glucanotransferase processing strain *Bacillus sp.* HA-1 was selected, with CGTase activity level 1.6 times of that of original strain. Its CGTase activity reached 6800 IU/ml when cultivated for 24 hours in 5m³ fermentor. Using the CGTase to transform 25% tapioca starch into α -CD, the conversion rate in 12 hours is 85%. The CGTase activity of F₂~F₂₀ are ranged from 98.11% to 102.66% as compared with F₁, which proves that the genetic quality of *B. sp.* HA-1 strain is stable.

Key words: N^+ ion beam implantation; cyclodextrin glucanotransferase; α -cyclodextrin; breeding; fermentation

中图分类号: O933

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0161-04

离子束注入是20世纪80年代中期兴起的一种新的生物诱变技术。由于它具有集动量、能量与质量于一体的协同作用,并且可以在损伤较轻的情况下获得较高的突变率,引起国内外学者的极大关注。应用离子束注入技术,许安^[1]等改良巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和氧化葡萄糖杆菌(*Glucobacter sp.*)获得VC生产菌创国内外二步法发酵糖酸转化率新高,摩尔转化率达到97.5%。姚建铭^[2]等筛选到花生四烯酸得率为4.0g/L的高产菌株(*Mortierella alpina*)_{149-N18},较国外专利(96192002.5)得率提高近1倍。其它,如米根霉(*Rhizopus oryzae*)^[3]、麦角甾醇产生菌(*Saccharomyces cerevisiae*)^[4]、林可霉素产生菌(*Streptomyces lincolnensis*)^[5]等的离子束诱变育种也都取得了显著成效。

应用环糊精葡萄糖基转移酶(cyclodextrin glycosyl transferase, CGTase)可进行 α -环糊精(α -

cyclodextrin, α -CD)的生产^[6]和对一些糖类和配糖物进行化学改性^[7-8]。 α -CD作为添加剂或包埋材料应用于食品、医药等领域^[9-11],具有用量大且无毒副作用的特点。目前,国内外对CGTase和 α -CD的需求量逐年增加,但由于生产中普遍存在着菌种产量低、发酵成本高等问题,限制了它们的扩大生产和应用。本研究旨在利用 N^+ 离子注入技术对CGTase产生菌进行诱变,选育适合 α -CD工业生产的具有良好发酵特性及遗传稳定性的高产菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌种

Bacillus sp. 02-1-29由郑州市医药科技开发中心提供的原始菌株经0.5kGy γ -射线诱变后得到。

收稿日期: 2005-11-09

基金项目: 河南省科技攻关项目(001160201)

作者简介: 王雁萍(1971-),女,博士研究生,研究方向为离子束诱变工业微生物菌种选育。

1.1.2 培养基

平板分离及斜面培养基^[11]；优化前发酵培养基^[11]；优化后发酵培养基组成：糊精 20g，玉米浆 50ml，K₂HPO₄ 2g，(NH₄)₂SO₄ 0.2g。玉米粉 20g，玉米浆 50ml，K₂HPO₄ 2g，MgSO₄·7H₂O 0.2g。

1.1.3 试剂

-CD 标准品 中国药品生物制品检定所。

1.2 仪器与设备

Titan离子注入机 俄罗斯；ZP-96旋转摇瓶机 四川长征制药厂；752型紫外光栅分光光度计 上海分析仪器总厂；BIOTECH-10JS自动不锈钢发酵罐(10L) 上海保兴生物设备工程有限公司；5 m³发酵罐 -环糊精生产单位生产线上的设备；30m³转化罐及 -环糊精提取设备 均为 -环糊精生产单位生产线上的设备。

1.3 样品处理及离子束诱变

将固体培养基上生长 30h 左右的芽孢杆菌制成菌悬液，取 0.1ml 均匀涂布于灭菌平皿中心一薄层，无菌风干后立即进行 N⁺ 离子注入，能量 30keV，剂量范围 10¹⁴ ~ 10¹⁶ ions/cm²，注入后立即用无菌水洗脱菌斑，稀释涂皿，置于 28℃ 培养箱中培养。

1.4 筛选方法

初筛：取 28℃ 生长 2d 的单菌落，视菌落周围淀粉水解圈大小，挑选相对水解圈与菌落直径之比较大的单菌落划线于固体培养基，待长出后挑取单菌落接斜面保存。

复筛：将初筛到的单菌株分别接种于装有 30ml 液体发酵培养基的 250ml 三角瓶中，于 28℃、230r/min 条件下培养一定时间后测定酶活力，挑选产酶活力高的菌株。

1.5 酶活力测定^[11]

1.6 -CD 的测定^[12]

1.7 传代方法

亲代菌株划线于固体斜面，28℃ 培养 1~2d，长出的菌落视为 F1。同时将 F1 与亲代菌株进行斜面划线传代，将长出的菌落分别视为 F2、F1，再同时将 F2、F1、亲代菌株进行斜面划线传代，将长出的菌落分别视为 F3、F2、F1，以此类推。

1.8 -CD 的含量测定方法

按照中华人民共和国药典 2000 版(二部)的规定，用高效液相色谱法，条件为：色谱柱为 C₁₈ 柱(250 × 4.6mm)，进样量 20 μl，流动相为甲醇：水 = 15:85，于室温条件下，流速为 1ml/min，以示差折光检测器进行测定。

2 结果与分析

2.1 B.sp. HA-1 菌株的选育

对出发菌株 B.sp. 02-1-29 进行剂量范围为 1 × 10¹⁴ ~

1 × 10¹⁶ ions/cm² 的 N⁺ 离子注入诱变。经过 7 个轮次的诱变选育，得到菌株 B.sp. HA-1，其产酶能力是 B.sp. 02-1-29 菌株的 1.6 倍。

2.2 B.sp. HA-1 菌种鉴定

B.sp. HA-1 菌株经过中国科学院微生物所鉴定为芽孢杆菌属，生理生化指标测试结果见表 1。B.sp. HA-1 菌株的 16S rRNA 经测定共有 659 个核苷酸，与 GenBank 中芽孢杆菌属各个种 16S rRNA 核苷酸序列相比对，最高相似度为 96%，与之有 96% 相似度的菌株有 4 个，它们是 B.sp. 17-1、B.sp. 13、B.sp. (DSM 8717) 和 B.sp. MLB-2。

表 1 B.sp. HA-1 菌株生理生化测试结果

Table 1 Results of physiological and biochemical test of B.sp. HA-1

实验项目	结果	实验项目	结果
革兰氏染色	阳性	利用葡萄糖产气	-
细胞形状	杆状	利用柠檬酸盐	-
细胞直径 > 1 μm	-	硝酸盐还原	+
形成芽孢	+	50℃ 生长	-
芽孢膨大	-	pH5.7 生长	-
芽孢圆形	-	7% NaCl 生长	+
接触酶	+	厌氧生长	-
氧化酶	-	VP 试验	-

2.3 B.sp. HA-1 菌株的发酵特性

应用优化后培养基配方(起始 pH8~9)，高产菌株 B.sp. HA-1 经过摇瓶种子培养 18h 左右，以 10% 接种量接种于 10L 发酵罐进行发酵。发酵条件为：风量比 1:1、搅拌转速 300r/min、温度 28℃。发酵过程中菌体增长如图 1 所示。图 1 显示，5~40h 菌体生长处于旺盛的对数增长期，40h 左右进入稳定期，维持 14h 左右，而后进入衰亡期，菌体量逐渐减少。比较菌体增长曲线与产酶曲线可知，在菌体对数增长期，菌体产酶与菌体增长呈现一致的变化趋势，但与菌体增长相比，菌体产酶有滞后效应，即在菌体增长速度变缓的对数增长后期(20~40h)产酶速率高于菌体增长速度最快的对数增

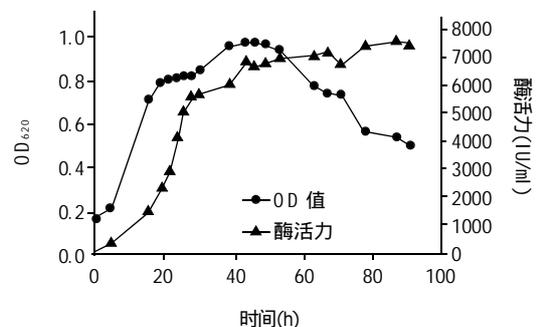


图 1 B.sp. HA-1 菌株菌体增长与产酶曲线
Fig.1 Bacterial growth and the CGTase activity curve of B.sp. HA-1 strain

长期前期(5~20h)。当菌体增长进入稳定期,产酶趋于高峰。

2.4 B.sp. HA-1 菌株的生产性能

2.4.1 CGTase 的工业生产

应用高产菌株 *B.sp.* HA-1 在 5m³ 发酵罐进行 CGTase 的生产,种子培养基及发酵培养基均采用优化培养基配方。将在起始 pH8.0~9.0、27~29 条件下 300L 种子罐中培养约 20h 左右的种子以 5% 的接种量接入 5m³ 发酵罐,在 pH8.0~9.0、风量比 1:1、27~29 条件下发酵,24h 产酶能力均可达到 6800IU/ml。明显高于目前国内 -CD 生产厂家生产用菌种(发酵 30h,产酶 3000IU/ml 左右)。在 5m³ 生产罐中发酵产酶到达高峰的时间较在 10L 罐发酵有所提前,这可能与 5m³ 生产罐的搅拌效果较好有关。

2.4.2 CGTase 转化淀粉生产 -CD

应用 *B.sp.* HA-1 菌株发酵产生的 CGTase 在 30 m³ 转化罐中对 25% 木薯淀粉进行转化,12h 生成 -CD 的转化率为 85%, -CD 的液相色谱图见图 2。产物 -CD 经过河南省分析检测中心检测,各项指标均优于中国药典 2000 年版的标准规定,测定结果见表 2。

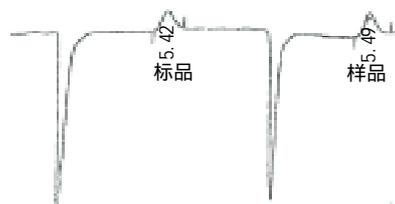


图 2 -CD 的液相色谱图

Fig.2 High performance liquid chromatogram spectrum of -CD

表 2 -CD 分析测试结果

Table 2 Analysis test results of -CD

指标	样品 -CD	标准 -CD
含量 (%)	98.9	96~102
Cl ⁻ (%)	0.009	<0.018
残糖 (%)	0	<0.2
干燥失重 (%)	12.6	<14
灼烧残渣 (%)	0.0046	<0.1
重金属 (%)	<0.001	<0.0001
pH 值	6.3	5.0~8.0

2.5 B.sp. HA-1 菌株产酶传代稳定性研究

将高产菌株 *B.sp.* HA-1 连续传 20 代,同时分别接种于装有 30ml 液体发酵培养基(优化培养基配方,起始 pH9)的 250ml 三角瓶中于 28、230 r/min 条件下发酵,40h 各代菌株产酶活力的测定结果见表 3。若将 F1 产酶水平记为 100%,则 F2~20 产酶水平变化范围为 98.11%~102.66%。其中 F6 的产酶活力最低,但与 F1 相比较, $p > 0.05$,说明两代菌株产酶水平没有显著差

表 3 B.sp. HA-1 菌株 F1~F20 代产酶水平
Table 3 Enzyme activity of F1~20 of B.sp. HA-1

酶活力($\bar{X} \pm S$, IU/ml)		酶活力($\bar{X} \pm S$, IU/ml)	
F1	7303 ± 163	F11	7262 ± 113
F2	7428 ± 86	F12	7331 ± 168
F3	7372 ± 120	F13	7483 ± 42
F4	7441 ± 84	F14	7386 ± 113
F5	7206 ± 163	F15	7344 ± 190
F6	7165 ± 121	F16	7275 ± 125
F7	7386 ± 55	F17	7234 ± 150
F8	7358 ± 111	F18	7303 ± 73
F9	7497 ± 64	F19	7441 ± 133
F10	7234 ± 97	F20	7386 ± 111

异。*B.sp.* HA-1 传代结果表明,该菌株具有良好的遗传稳定性。

3 结论

应用离子注入技术诱变葡萄糖基转移酶生产菌,效果良好,选育出的菌株 *B.sp.* HA-1 与目前国内研究^[13-14]水平相比,具有产酶水平高、发酵时间短、遗传稳定性好和对发酵原料适应性强的特点。目前,该菌株已成功应用于工业生产,其产酶水平较国内生产厂家普遍采用的菌株提高一倍,且大幅度地缩短了发酵时间。

温度对 *B.sp.* HA-1 菌株产酶的影响较大,分别在 25、28、34 及 37 条件下发酵,酶活力测定结果显示 28 条件下发酵产酶水平最高。因此选定 28 为最佳发酵温度。

在发酵过程中,菌体量与菌体产酶密切相关,当菌体增长进入稳定期,产酶趋于高峰。因此,在生产过程中,可根据菌体增长情况判断放罐时间,较为准确且简单易行。

参考文献:

- [1] 许安,姚建铭,余增亮. 离子注入改良维生素 C 二步发酵混合菌研究() 2-酮基-L-古龙酸高产菌系 IPPM-1028 的选育[J]. 工业微生物, 1998, 28(4): 21-24.
- [2] 姚建铭,王纪,王相勤,等. 离子注入花生四烯酸产生菌诱变选育[J]. 生物工程学报, 2000, 16(4): 478-481.
- [3] 古绍彬,葛春梅,汪青宏,等. 产 L2 乳酸根霉 PW352 特性及低能离子注入诱变高产菌株研究[J]. 工业微生物, 2004, 34(1): 12-16.
- [4] 蒋海波,王纪,姚建铭,等. 离子注入麦角甾醇酵母选育研究[J]. 工业微生物, 2000, 30(2): 1-3.
- [5] 刘瑞华,李铁. 氮离子注入林可霉素产生菌诱变高产菌株[J]. 中国抗生素杂志, 2002, 27(7): 392-393.
- [6] TONKOVA A. Bacterial cyclodextrin glucotransferase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22: 678-686.
- [7] PARK D C, KIM T K, LEE Y H. Characteristic of transglucosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase in the heterogeneous enzyme reaction system using extrusion starch as a glucosyl donor[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22: 217-222.
- [8] MARTIN M T, CRUCES M A, ALCALDE M, et al. Synthesis of

特异性抗肠出血性大肠杆菌 O157:H7 内毒素鸡卵黄抗体的制备

宋宏新¹, 刘晓阳¹, 程 军¹, 李书丰²

(1. 陕西科技大学生命科学与工程学院 陕西 咸阳 712081; 2. 德州职业技术学院 山东 德州 253034)

摘要: 目的: 比较研究 LPS 和 O-SP 的免疫原性, 制备出特异性抗内毒素(LPS)鸡卵黄免疫球蛋白(egg yolk immunoglobulin, IgY), 用于对 *E. coli* O157:H7 的免疫预防及检测。方法: 分别用灭活 *E. coli* O157:H7 菌体、不同浓度内毒素(LPS)及 O- 特异性多糖链(O-SP)与不完全弗氏佐剂充分乳化后作抗原免疫临产蛋母鸡, 以水稀释法从卵黄中提取抗体, 阴离子交换色谱法实现对抗体的纯化, 间接 ELISA 及双向免疫扩散检测抗体产生效价与活性。结果与结论: 所制内毒素(LPS)和 O-SP 均有较好的免疫原性, 刺激鸡体后可产生高效价抗体, 灭活菌体、600 μg/ml LPS、1200 μg/ml LPS、2000 μg/ml LPS、O-SP 抗体产生效价最高可分别达 1:32000、1:28000、1:32000、1:12000、1:40000。结合离子交换色谱, 用 0.185 mol/L 的离子强度可实现一步洗脱纯化抗体, 制备出高纯度、高活性、特异性强的鸡卵黄免疫球蛋白 IgY, 为大肠杆菌 O157:H7 的感染防治提供了可靠的保证, 在此实验基础之上可进一步探讨应用特异性 IgY 对大肠杆菌 O157:H7 的检测。

关键词: *E. coli* O157:H7; 防治; 内毒素; 鸡卵黄抗体; 制备

Preparation Study on Specific Egg Yolk Antibody against Endotoxin of *Escherichia coli* O157:H7

SONG Hong-xin¹, LIU Xiao-yang¹, CHENG Jun¹, LI Shu-feng²

(1. College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 712081, China; 2. Dezhou Vocational and Technical College, Dezhou 253034, China)

Abstract: Objective: To produce specific chicken egg yolk immunoglobulin against lipopolysaccharide (LPS), used for preventing and detecting *E. coli* O157:H7 in comparison with the immunity of LPS and O-specific polysaccharide (O-SP). Methods: Hens, 25-week old, were immunized with *E. coli* O157:H7, LPS, O-SP respectively after being emulsified with incomplete Freund's adjuvant. By a simple method of water dilute of protein IgY to separate the antibody from egg yolk, purified by ion-exchange chromatograph, the IgY detected by SDS-PAGE and indirect-ELISA, and its immunologic competence was determined by double immunodiffusion. Results and Conclusion: The IgY titers of *E. coli* O157:H7 are obtained with 600 μg/ml LPS, 1200 μg/ml LPS and 2000 μg/ml LPS, as O-SP respectively 1:32000, 1:28000, 1:32000, 1:12000 and 1:40000. It is purified by ion exchange with 0.185 mol/L THS washing. The immunity of lipopolysaccharide and O-SP is strong. The IgY anti-O-SP produced by immunizing hens shows high titer, high purification and well specificity by chicken egg yolk immunoglobulin. The results provide scientific basis for preventing and infection curing by O157:H7 and further ways exploring of detecting O157:H7 with

收稿日期: 2005-11-01

作者简介: 宋宏新(1959-), 男, 教授, 研究方向为分子生物学及食品检测。

- [9] SZENTE L, SZEJTLI J. Cyclodextrins as food ingredients[J]. Trends in Food Science & Technology, 2004, 15: 137-142.
- [10] LOFTSSON T, MASSON M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2001, 225: 15-30.
- [11] DUCHENE D, WOUESSIDJEW D, PONCHEL G. Cyclodextrins and carrier systems[J]. Journal of Control Release, 1999, 62: 263-268.
- [12] 张树政. 酶制剂工业[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 545-549.
- [13] 陈国亮, 柴华丽, 杨琦. -环糊精测定方法的研究[J]. 化学试剂, 1990, 12(5): 308-310.
- [14] 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.