



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104877931 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 02

(21) 申请号 201510222162. 4

(22) 申请日 2015. 05. 03

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 8425 2013. 11. 01

(71) 申请人 华南理工大学

地址 511458 广东省广州市南沙区环市大道  
南路 25 号

(72) 发明人 崔春 周池虹伶 赵谋明 赵强忠

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 何淑珍

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

C12N 9/80(2006. 01)

C12R 1/07(2006. 01)

权利要求书1页 说明书2页  
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

解淀粉芽孢杆菌及其在发酵产谷氨酰胺酶中的应用

(57) 摘要

本发明公开了解淀粉芽孢杆菌及其在发酵产谷氨酰胺酶中的应用。该解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) SWJS22 于 2013 年 11 月 1 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为 CGMCC No. 8425。本发明筛选了淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) SWJS22 产谷氨酰胺酶的原料, 其培养、发酵条件简单, 遗传性质稳定。

1. 株解淀粉芽孢杆菌( *Bacillus amyloliquefaciens*)SWJS22, 该菌于 2013 年 11 月 1 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为 CGMCC No. 8425。

2. 权利要求 1 所述解淀粉芽孢杆菌( *Bacillus amyloliquefaciens*)SWJS22 在发酵生产谷氨酰胺酶中的应用。

## 解淀粉芽孢杆菌及其在发酵产谷氨酰胺酶中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及深海中微生物筛选及发酵领域,具体涉及解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)SWJS22 及其在发酵产谷氨酰胺酶中的应用。

### 背景技术

[0002] 解淀粉芽孢杆菌是一种好氧型产芽孢的革兰氏阳性杆状细菌。该菌在自然界分布广泛,在植物体内,土壤,深海泥中均有分布。该菌易分离培养,代谢产物较为丰富,具有较强的胞外蛋白分泌能力,是蛋白酶、谷氨酰胺酶、淀粉酶、 $\beta$ -糖苷酶等一些主要酶制剂的理想生产菌株,同时也具有广谱抗菌活性和较强的抗逆能力,且稳定性较好,生长快,很适合作为生防菌大量生产和应用。

[0003] 谷氨酰胺酶(EC 3. 5. 1. 2)是催化谷氨酰胺水解生成谷氨酸和氨的一种酶。而谷氨酸是食品中重要的鲜味增强氨基酸,且有广泛的应用,故谷氨酰胺酶具有十分重要的作用。最近有研究也发现由于谷氨酰胺酶可以结合,或者交替天冬酰胺酶,所以在癌症治疗上有很重要的作用,特别是急性的淋巴细胞白血病。

[0004] 本发明保存的这株解淀粉芽孢杆菌 SWJS22 是从深海海泥中筛选出来的,具有耐低温、高盐、高压的环境的特点,具有陆生微生物所不具备的特性。探究发现该菌能产谷氨酰胺酶,且安全性较高,具有较大的商业利用价值,并探讨了其发酵性能和条件以及该酶的特性。

### 发明内容

[0005] 本发明目的是提供了解淀粉芽孢杆菌及其在发酵产谷氨酰胺酶中的应用。

[0006] 本发明的可生产谷氨酰胺酶的深海菌株,为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)SWJS22,该菌于 2013 年 11 月 1 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所,保藏编号为 CGMCC No. 8425。

[0007] 本发明对保藏号为 CGMCC No. 8425 的菌株进行形态学及生理生化鉴定,有以下特征:(1)菌落形态:白色,形状不规则,表面有颗粒感,乳头状凸起,不透明,边缘呈波状;(2)细胞形态:直杆状,链状排列,周生鞭毛,革兰氏阳性;(3)生理生化特征:可在 4-40℃ 环境中生长,好氧,能耐受 25% (wt) 氯化钠,能水解明胶、淀粉、酪素、柠檬酸盐,能利用硫酸铵、硝酸铵,可利用果糖、葡萄糖、甘露醇、木糖为碳源,吲哚反应、V.P. 反应、甲基红试验、接触酶和氧化酶试验为阳性,能产过氧化氢酶,不产硫化氢。

[0008] 保藏号为 CGMCC No. 8425 菌株经 16S rDNA 鉴定,测得基因片段长度为 1449bp,具体基因序列见序列表 1。将获得的基因序列输入 Genbank,应用 Blast 程序将获得的基因序列与数据库中基因序列进行对比。结果显示与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的 16S rDNA 序列同源性为 99%。将此结果结合菌株形态学及生理生化鉴定特征,确定该菌为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

[0009] 保藏号为 CGMCC No. 8425 菌株通过单因素试验对其液体发酵产蛋白酶条件进行了优化。

[0010] 本发明公开了解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) SWJS22 产谷氨酰胺酶的条件, 其培养、发酵条件简单, 遗传性质稳定。由于该菌株来源于深海, 所分泌的谷氨酰胺酶具有特殊的性质, 并且关于该菌株的文献报道以及谷氨酰胺酶的文献均不多, 因此, 对开发新型深海菌株及酶制剂的研究中, 具有重要意义。

#### 附图说明

[0011] 图 1 为不同碳源对解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) SWJS22 发酵产谷氨酰胺酶活力的影响对比图。

#### 具体实施方式

[0012] 以下结合实例对本发明的实施作进一步说明, 但本发明的实施和包含不限于此, 需指出的是, 以下若有为特别详细说明之处, 均是本领域技术人员可参照现有技术实现的。

[0013] 富集及种子培养基: 胰蛋白胨 10g, 酵母膏 5g, 蔗糖 10g, 硫酸铁 0.1g, 硫酸锰 0.001g, 硫酸铜 0.001g, 去离子水 1L, pH7.0。

[0014] 酪蛋白培养基: 酪蛋白 10g, 牛肉浸粉 3g, 氯化钠 5g, 磷酸氢二钾 2g, 琼脂 15g, 去离子水 1L, pH7.3-7.5。

[0015] 发酵培养基: 豆粕 18.8g, 面粉 4.7g, 去离子水 16.5g。

[0016] 解淀粉芽孢杆菌 CGMCC No. 8425 固体发酵产谷氨酰胺酶的原料筛选

固体发酵培养基的原料筛选: 将活化好的对数生长期的种子液, 以 2% 的接种量, 接到固体发酵也里面, 于 37℃ 下恒温发酵 48h, 结束发酵后, 测其谷氨酰胺酶酶活。

[0017] 采用 121℃ 下干蒸 5min 的豆粕, 做主要氮源; 对碳源进行筛选, 选用面粉, 小麦粉, 麦麸, 玉米淀粉, 花生粉; 豆粕: 筛选的碳源: 去离子水以质量比 4:1:3.5 混合, 做为固体培养基发酵, 结果如图 1 所示。

[0018] 编号 CGMCC No. 8425 菌株的遗传稳定性

表 1 为不同发酵温度对解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) SWJS22 发酵产谷氨酰胺酶活力的遗传稳定性。

[0019] 表 1

传代次数	1	2	3	4	5	6
谷氨酰胺酶酶活 GTU/g	0.242±0.066	0.245±0.043	0.353±0.0454	0.346±0.0016	0.339±0.0185	0.322±0.0432

将保藏的编号 CGMCC No. 8425 菌株连续传代培养, 并测其谷氨酰胺酶酶活, 以酶活力作为评价遗传稳定性的指标。结果如表 1, 传代 6 次, 谷氨酰胺酶酶力保持在 0.3GTU/g 左右, 表明菌株有较好的遗传稳定性。

6

CCTCTGTCACTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTG  
TGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCT  
TCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACGAGATTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTG  
CCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT  
CCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT  
GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGA  
CGTCCTATCTCTAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGC  
TCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAA  
TGCGTTAGCTGCAGACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGT  
ATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTG  
TTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTT  
CCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGAGCCCTTTACGCCAAT  
AATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTA  
CCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATC  
ACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG  
CCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCA  
CCAAGTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTTCA  
GACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACC  
CGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATAGCACCCCCATCC

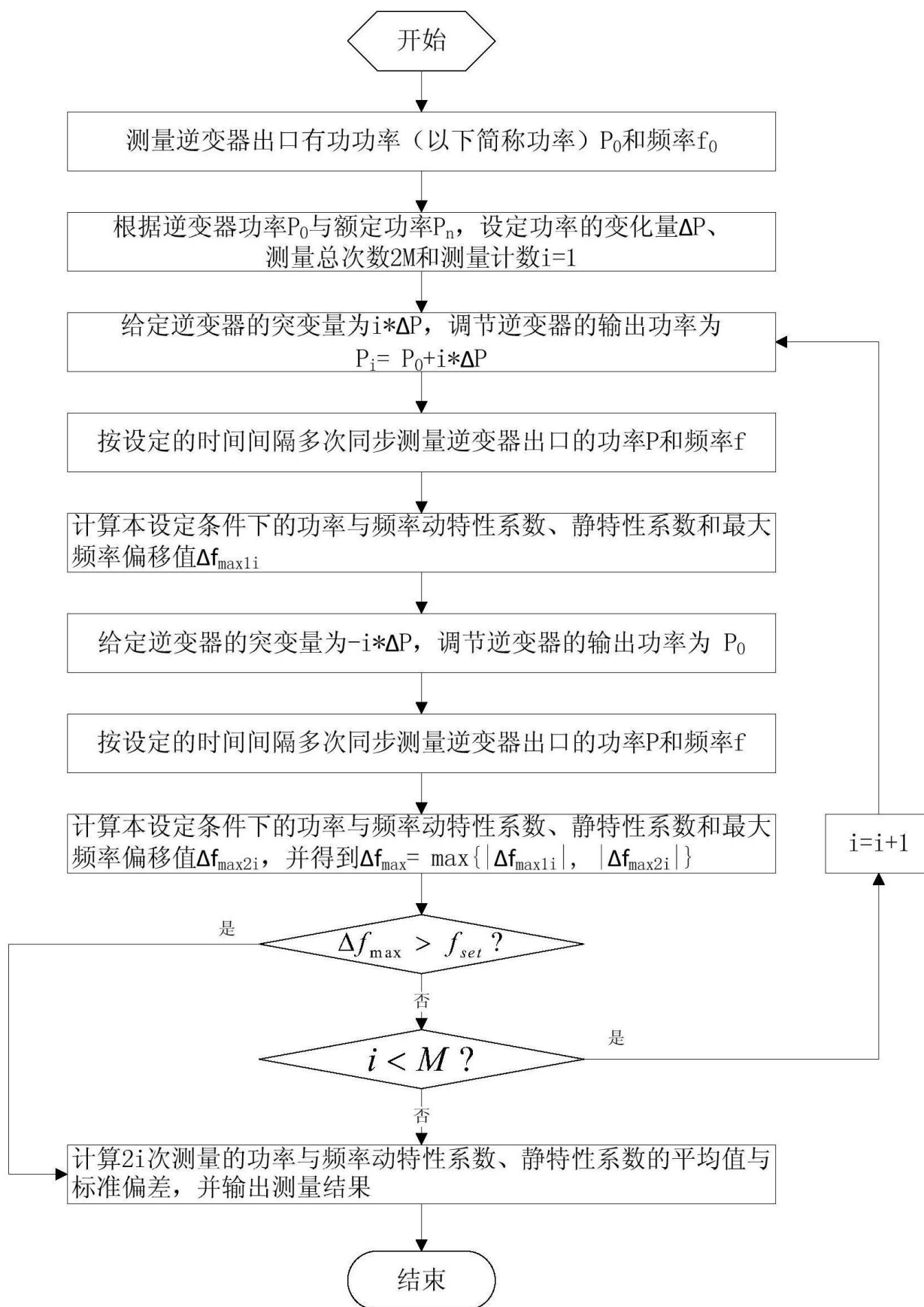


图 1