

产胞外 β -葡萄糖苷酶乳酸菌的筛选及其酶学性质的初步研究*

万振堂, 杨丽杰

(东北农业大学, 乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨, 150030)

摘 要 用荧光底物法从 20 种可利用纤维二糖的乳酸菌中筛选出 10 株产胞外 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌, 在 MRS 培养基中筛选出粗酶液酶活较高的 1 株植物乳杆菌 KLDS1.0320, 进一步研究了其产酶的特点、酶学性质, 结果表明, 植物乳杆菌 KLDS1.0320 产生的胞外 β -葡萄糖苷酶受底物纤维二糖的诱导, 但与底物浓度有关。粗酶液酶活的最适 pH 为 4.8, 最适温度为 37℃。在 pH 值为 4.0, 温度为 48℃ 条件下仍具有酶活力。

关键词 乳酸菌, β -葡萄糖苷酶, 纤维二糖

β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase) 广泛存在于从微生物到脊椎动物的各种生物中, 它能够分解多种 β -葡萄糖苷, 如水杨苷 (salicin)、纤维二糖 (cellobiose)、纤维三糖 (cellotriose)、纤维四糖 (cellotetrose) 和对硝基苯- β -D-葡萄糖苷 (pNPG) 等。在食品风味物质的释放和纤维素降解中具有重要作用^[1]。

资料表明, 一些乳酸菌可以利用纤维二糖 (或纤维三糖) 作为碳源, 表明某些乳酸菌可能含有分解纤维二糖的 β -葡萄糖苷酶^[2]。另外乳酸菌可以将葡萄糖进一步发酵成乳酸, 实现糖化的同时进行发酵 (SSF)。既解除了葡萄糖对 β -葡萄糖苷酶的抑制作用又可以将纤维素经纤维素酶降解产生的葡萄糖和纤维二糖转化成乳酸。乳酸菌与纤维素酶的联合作用在开发农作物植物纤维转化成一种稳定且可再生的原料 (例如乳酸, 生物乙醇) 工艺中有着很大的潜力^[3,4]。在食品研究中, 乳酸菌 β -葡萄糖苷酶近来被应用到大豆异黄酮植物雌激素的降解中, 并取得较好的效果^[5-7]。然而国内外 β -葡萄糖苷酶的研究大多集中于真菌。对于乳酸菌来源的 β -葡萄糖苷酶研究报道较少。国外曾经有报道研究植物乳杆菌、干酪乳杆菌、德氏乳杆菌均可以产生具有相当酶活力的 β -葡萄糖苷酶, 其中有的为胞外酶, 有的为胞内酶, 说法不一^[8]。本研究从 20 种乳酸菌中筛选到 10 株具有胞外酶活性的乳酸菌, 并进一步筛选出产酶量较高的一株乳酸菌, 初步研究了其产酶性质和酶学活性。

1 材料与仪器

1.1 试验菌株

第一作者: 在读硕士研究生 (杨丽杰为通讯作者)

* 国家自然科学基金 (No. 30771578)

收稿日期: 2008-10-30, 改回日期: 2009-03-09

东北农业大学乳品科学教育部重点实验室菌种库提供的 20 种乳酸菌, 菌种来源为酸奶和青贮。

1.2 培养基

培养基: MRS 培养基组成: 蛋白胨 10.0 g, 牛肉膏 10.0 g, 酵母抽提物 5.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 三水醋酸钠晶体 5.0 g, 吐温-80 1 mL, 柠檬酸三铵 2.0 g, K_2HPO_4 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.05 g, 蒸馏水 1000 mL。固体培养基加入琼脂 15.0 g, 121℃ 高压蒸汽灭菌 15 min。将上述培养基中碳源用 10.0 g 纤维二糖替代即为纤维二糖 MRS 培养基 (以下称为 CMRS)。

1.3 主要试剂

化学试剂: PNPG (对硝基苯- β -D-葡萄糖苷), MUGlc (4-甲基伞形酮- β -D-吡喃葡萄糖苷), 纤维二糖 (cellobiose) 均为 Sigma 公司产品, Bradford 试剂盒为北京百泰克公司产品, 其余均为国产分析纯试剂。

1.4 仪器

仪器设备: GL-21M 冷冻离心机 (上海市离心机机械研究所), Leica 倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司), JY92-2D 超声波破碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司), 680 型全自动酶标仪 (美国 BIO-RAD), DU 800 紫外/可见分光光度计 (美国 Beckman 公司), Delta 320 pH 计。

2 试验方法

2.1 乳酸菌生长曲线的绘制

对试验乳酸菌进行常规的 MRS 培养基生长曲线的绘制, 以此确定各株乳酸菌的生长阶段。

2.2 产胞外 β -葡萄糖苷酶乳酸菌的筛选

采用 MUGlc 荧光底物法。用牙签挑取各株乳酸菌涂印到另外的 MRS 平板上, 待菌落长出后在其周

围涂上 100 μ L 的 10 mmol/L 的 4-甲基伞形酮- β -D-吡喃葡萄糖苷(用乙酸-乙酸钠缓冲液溶解, pH = 5.5), 37 $^{\circ}$ C 继续培养 5 h, 在紫外灯(波长 300 nm)下检测菌落荧光的产生。

2.3 对硝基苯酚(pNP)标准曲线的制作

取 0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.10, 0.125, 0.15 mmol/L 不同浓度的 pNP(用乙酸-乙酸钠缓冲液溶解, pH5.0)1 mL, 加入 2 mL 1 mmol/L 的 Na₂CO₃, 充分混匀后, 在紫外分光光度计上于 400 nm 条件下比色, 记录吸光度值。

2.4 粗酶液的制备

将产酶乳酸菌进行 MRS 培养基培养, 当培养到稳定期时(*OD*₆₀₀值估计), 5 000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 条件下离心, 收集上清液 S1 和菌体, 将上清液用 0.2 μ m 的微孔滤膜过滤后置 -20 $^{\circ}$ C 保存。用乙酸-乙酸钠缓冲液(pH5.5)重悬菌体, 5 000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 条件下离心, 重复 1 次。置超声波破碎仪上进行破壁, 破壁条件为: 400 w, 间歇时间 30 s, 破壁时间 5 min。离心收集上清液 S2, 进一步定位 β -葡萄糖苷酶产生的细胞部位。

2.5 粗酶液酶活力(enzyme activity, EA)的测定

取 200 μ L 上清液 S1 和 S2, 加入 800 μ L PNPG(溶于乙酸-乙酸钠缓冲液, pH5.5), 置 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中反应 4 h。后加入 2 mL 1 mol/L 的 Na₂CO₃ 终止反应, 用紫外分光光度计 400 nm 条件下比色。每小时催化生成 1 μ mol 对硝基苯酚所需的酶量为 1 个酶活力单位(1U)。

2.6 粗酶液蛋白浓度的测定(Bradford 法)

按 Bradford 试剂盒说明, 用酶标仪绘制标准蛋白(牛血清蛋白)定量标准曲线, 用酶标板于 570 nm 条件下测定上述粗酶液的蛋白浓度。

2.7 培养时间对乳酸菌 β -葡萄糖苷酶产量的影响

按 2% 接种量将乳酸菌接入 100 mL CMRS 培养基中三角烧瓶 37 $^{\circ}$ C 条件下静止培养, 分别在 2, 6, 12, 18, 24, 30 h 时, 取 5 mL 菌液离心, 测定酶活。

2.8 碳源对乳酸菌产酶量的影响

选择上述试验后酶活较大的乳酸菌, 分别用质量浓度为 1% 的纤维二糖、2% 纤维二糖、5% 纤维二糖、1% 葡萄糖、2% 葡萄糖、5% 葡萄糖作为发酵培养基碳源, 绘制乳酸菌的生长曲线。并在稳定期取菌液离心制作粗酶液, 进行酶活测定。

2.9 pH 值对乳酸菌 β -葡萄糖苷酶粗酶液酶活的影响

将 β -葡萄糖苷酶粗酶液用 3 mol/L 醋酸溶液和 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 4.0, 4.3, 4.5, 4.8, 5.0, 5.2, 5.5, 5.8, 6.0, 6.3。并配制相同 pH 值的 4 mmol/L 的 PNPG。在 37 $^{\circ}$ C 恒温条件下进行酶活反应。确定最佳酶活 pH 值。

2.10 温度对乳酸菌 β -葡萄糖苷酶粗酶液酶活的影响

将 β -葡萄糖苷酶粗酶液和底物 PNPG 分别于 20、25、30、32、34、37、40、42、45、48、50 $^{\circ}$ C 反应 4 h, 测定不同温度条件下粗酶液的酶活, 并确定粗酶液酶活的最适温度。

2.11 几种金属离子对乳酸菌 β -葡萄糖苷酶酶活的影响

配制 0.05 mol/L 的金属离子溶液, 分别为 Na⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、K⁺, 取 500 μ L 与等体积的粗酶液混合, 调节 pH 至 4.8, 后进行酶活测定。以相同条件下的粗酶液酶活作为对照(设为 100%), 其他的金属离子酶活与粗酶液酶活的比值, 作为抑制或者激活的参考^[9]。

3 结果与分析

3.1 乳酸菌在 MRS 培养基中的生长曲线(略)

3.2 MUGlc 法筛选胞外 β -葡萄糖苷酶乳酸菌结果

MUGlc 法筛选胞外 β -葡萄糖苷酶乳酸菌的结果见表 1。

表 1 MUGlc 法筛选产胞外 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌结果

菌株编号	菌株中文名称	拉丁菌名	荧光	无荧光
KLDS1.0314	植物乳杆菌	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	
KLDS1.0316	植物乳杆菌	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	
KLDS1.0318	植物乳杆菌	<i>Lactobacillus plantarum</i>		-
KLDS1.0320	植物乳杆菌	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	
KLDS1.0624	植物乳杆菌	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	
KLDS1.0327	嗜酸乳杆菌	<i>Lactobacillus acidophilus</i>		-
KLDS1.0356	嗜酸乳杆菌	<i>Lactobacillus acidophilus</i>		-
KLDS1.0357	嗜酸乳杆菌	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	
KLDS1.0360	嗜酸乳杆菌	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	

菌株编号	菌株中文名称	拉丁菌名	荧光	无荧光
KLDS1.0365	嗜酸乳杆菌	<i>Lactobacillus acidophilus</i>		-
KLDS1.0380	嗜酸乳杆菌	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	
KLDS1.0384	嗜酸乳杆菌	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	
KLDS1.8701	嗜酸乳杆菌	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	-
KLDS1.0310	德氏乳杆菌德氏亚种	<i>L. delbrueckii. subsp. delbrueckii</i>		-
KLDS1.0311	德氏乳杆菌德氏亚种	<i>L. delbrueckii. subsp. delbrueckii</i>		-
KLDS1.0407	干酪乳杆菌	<i>Lactobacillus casei</i>		-
KLDS1.0368	植物乳杆菌	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	
KLDS1.0610	植物乳杆菌	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	
KLDS1.0401	玉米乳杆菌	<i>Lactobacillus zeae</i>	+	

注：“+”代表阳性，紫外灯 300 nm 波长下能够发出荧光；“-”，代表阴性。

MUGlc 荧光底物法广泛应用于 β -葡萄糖苷酶的检测,用该方法筛选产胞外 β -葡萄糖苷酶的细菌,简便快捷灵敏^[10]。结果显示,所选的植物乳杆菌 (*L. plantarum*) 都能产生胞外 β -葡萄糖苷酶,大部分的嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*) 亦能产生胞外 β -葡萄糖苷酶。干酪乳杆菌 (*L. casei*) 虽能利用纤维二糖,但没有检测到胞外 β -葡萄糖苷酶,这与结果一致。本实验室保存的德氏乳杆菌德氏亚种 (*L. delbrueckii. subsp. delbrueckii*) 不能利用纤维二糖,这可能与菌种的特异性有关。

3.3 对硝基苯酚标准曲线及 Bradford 蛋白浓度测定标准曲线

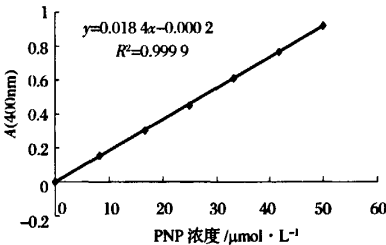


图1 对硝基苯酚(PNP)标准曲线

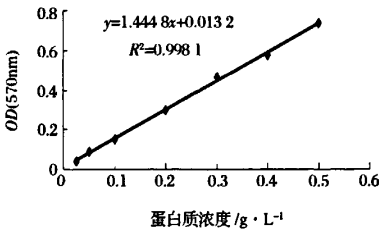


图2 Bradford 蛋白浓度测定牛血清标准曲线

3.4 乳酸菌 β -葡萄糖苷酶粗酶液酶活的测定结果

根据标准曲线,乳酸菌 β -葡萄糖苷酶粗酶液酶活酶活(EA)计算公式如下:

$$EA = (A_{400} + 0.002) \times 54.3478 \times \text{稀释倍数} / \text{反应时间}$$

$$\text{比活力} = EA / \text{粗酶液蛋白浓度}$$

表2 MRS 培养基条件下产胞外酶乳酸菌粗酶液酶活

菌株	胞外酶 S1 酶活 /U · L ⁻¹	比活力 /U · g ⁻¹	胞内酶 S2 酶活 /U · L ⁻¹
KLDS1.0357	52.32	545.98	ND
KLDS1.0320	54.74	1012.77	ND
KLDS1.0314	42.16	475.52	ND
KLDS1.0624	51.35	565.96	ND
KLDS1.0401	9.91	149.02	ND
KLDS1.0316	36.40	437.92	ND
KLDS1.8701	43.12	317.76	ND
KLDS1.0380	39.64	560.68	ND
KLDS1.0384	41.39	485.80	ND
KLDS1.0610	11.57	110.09	ND

注:ND 表示未测出。

表2 结果显示,植物乳杆菌 KLDS1.0320 在 MRS 培养基条件下胞外酶粗酶液的酶活较高,嗜酸乳杆菌 KLDS1.0380 和植物乳杆菌 KLDS1.0624,从青贮中筛选的玉米乳杆菌 KLDS1.0401 产胞外 β -葡萄糖苷酶的能力较弱^[11]。而酶活力测定试验表明产胞外 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌,其胞内似乎没有 β -葡萄糖苷酶。由于本试验用的是未经纯化的 β -葡萄糖苷酶粗酶液,所以在酶活力或者比活力上较其他真菌来源的 β -葡萄糖苷酶的酶活低,但乳酸菌 KLDS1.0320 属于食品级的微生物,可以直接作为酶源用于发酵,生产食用的 β -葡萄糖苷酶,无需纯化。

3.5 培养时间对植物乳杆菌 KLDS1.0320 产酶的影响

结果显示,植物乳杆菌 KLDS1.0320 在 MRS 培养基或者 CMRS 培养基中生长到稳定期前期时粗酶液的酶活 (pH5.0, 37℃ 条件下) 最大,表明在稳定期前期 β -葡萄糖苷酶的产量最高, β -葡萄糖苷酶的合成与乳酸菌生长同步,属于同步合成型水解酶。但随着培养时间的延长, β -葡萄糖苷酶可能被体系中的蛋白水解酶水解,导致酶活下降。同时在本试验中随着培养基中乳酸菌的生长,培养基中 pH 的下降,也可

能会影响 *L. plantarum* KLDS1.0320 β -葡萄糖苷酶的基因的表达^[12,13]。

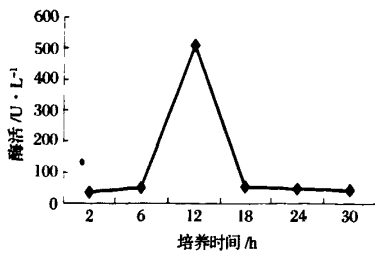


图3 培养时间对植物乳杆菌 KLDS1.0320 产酶的影响

3.6 两种碳源对乳酸菌 KLDS1.0320 产酶量的影响

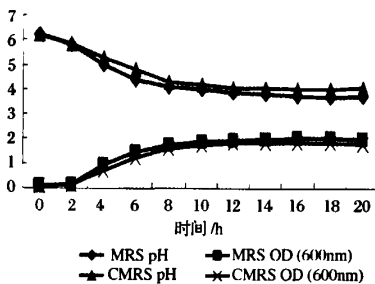


图4 植物乳杆菌 KLDS1.0320 在 2 种不同碳源培养基中的生长曲线

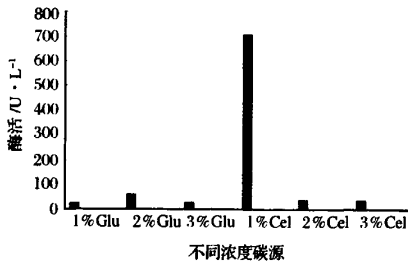


图5 不同碳源浓度对植物乳杆菌 KLDS1.0320 β -葡萄糖苷酶活的影响

作为植物乳杆菌 KLDS1.0320 生长的 2 种碳源,在 MRS 培养基条件下, β -葡萄糖苷酶粗酶液的酶活(pH5.0,37℃)为 54.74 U/L,而在 CMRS(1% 纤维二糖为唯一碳源)培养基条件下, β -葡萄糖苷酶粗酶液的酶活(pH5.0,37℃)为 702.51 U/L,表明纤维二糖作为 β -葡萄糖苷酶的水解底物,对乳酸菌 β -葡萄糖苷酶的表达具有诱导作用,这与 Adsul 等^[14]的研究结果一致。但 CMRS 培养基中纤维二糖浓度达到 2%、3% 时,乳酸菌 KLDS1.0320 β -葡萄糖苷酶粗酶液的酶活却下降至 32.10、32.85 U/L,说明底物浓度会影响到乳酸菌 KLDS1.0320 β -葡萄糖苷酶的分泌。用葡萄糖作为碳源时,也出现类似的结果,关于底物浓

度与乳酸菌 KLDS1.0320 β -葡萄糖苷酶产量的效应关系值得进一步研究。

3.7 温度对 KLDS1.0320 β -葡萄糖苷酶粗酶液酶活的影响

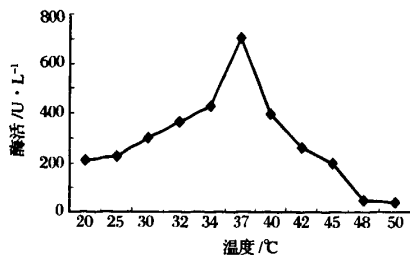


图6 温度对 *L. plantarum* KLDS1.0320 β -葡萄糖苷酶酶活的影响

从 CMRS 培养基中获得的 *L. plantarum* KLDS1.0320 的 β -葡萄糖苷酶粗酶液在 pH 为 5.0 时,测得的不同温度条件下 *L. plantarum* KLDS1.0320 的酶活变化,结果显示在 20~45℃,该酶粗酶液具有较稳定的酶活力,最大酶活出现在 37℃ 时,而温度超过 50℃ 该酶基本失去活性了,这与 *L. plantarum* KLDS1.0320 的生长温度要求一致。而这种温度适中性的 β -葡萄糖苷酶在青贮纤维素降解的体系中被认为有良好的效果^[15]。

3.8 pH 值对 KLDS1.0320 β -葡萄糖苷酶粗酶液酶活的影响

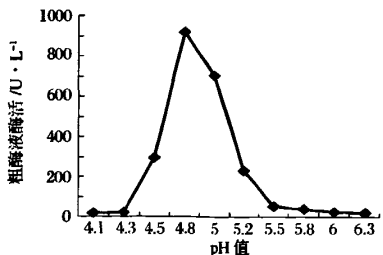


图7 pH 值对 KLDS1.0320 β -葡萄糖苷酶粗酶液酶活的影响

从 CMRS 培养基中获得的 *L. plantarum* KLDS1.0320 的 β -葡萄糖苷酶粗酶液在 37℃,测得不同 pH 下 KLDS1.0320 β -葡萄糖苷酶粗酶液酶活,结果显示该酶在 pH 4.5~5.2 酶活较稳定,其中在 pH4.8 时达到最大酶活 917.85 U/L,表明该酶属于酸性 β -葡萄糖苷酶,在酸性环境条件下有着潜在的应用价值。

3.9 几种金属离子对乳酸菌 β -葡萄糖苷酶酶活的影响

表3 几种金属离子对乳酸菌 β -葡萄糖苷酶活的影响

金属离子	相对酶活%
Na ⁺	73.03
Mg ²⁺	92.12
Mn ²⁺	0
Ca ²⁺	88.41
K ⁺	81.63

注:表中的百分数均为金属离子粗酶液酶活与对照组酶活的比值。

结果显示, Na⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、K⁺ 对 *L. plantarum* KLDS1.0320 的 β -葡萄糖苷酶粗酶液均有不同程度的抑制作用,该浓度的 Mn²⁺ 更是能够使粗酶液发生蛋白沉淀,失去活性。

4 结论

本试验从 20 种可利用纤维二糖的乳酸菌中,利用荧光底物法筛选出产胞外 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌,结果表明乳酸菌产的胞外 β -葡萄糖苷酶对底物 MUGlc, PNPG, 纤维二糖均表现出酶活性,对 *L. plantarum* KLDS1.0320 产的 β -葡萄糖苷酶粗酶液的酶学性质进行了初步研究,结果显示该酶粗酶液酶活的最适 pH 为 4.8,最适温度为 37℃。在 pH 值为 4.0,温度为 48℃ 条件下仍具有酶活力,且该菌株产酶量与底物浓度存在诱导或者抑制关系,但具体还不清楚。

5 前景

产胞外 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌可直接应用到农作物纤维素降解或食品风味物质的释放中,具有较大的应用潜力。而该酶的基因又可用于基因工程菌的构建,提高产酶量,用途更为深远。该工作目前正在进行中。

参 考 文 献

1 Sestelo ABF, Poza M, Villa T C. β -Glucosidase activity in a *Lactobacillus plantarum* wine strain [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2004, 20: 633 ~ 637

2 凌代文,东秀珠. 乳酸菌分类学鉴定及实验方法[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998

3 Hassan K Sreenath, Ana B Moldes, Richard G Koegel. Lactic acid production from agriculture residues [J]. Biotechnology Letters, 2001, 23: 179 ~ 184

4 Ye Chen, Ratna R, Sharma-Shivappa. Ensiling Agricultural Residues for Bioethanol Production [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2007, 143(1): 80 ~ 92

5 Daniel O Otieno, John F Ashton, Nagendra P Shah. Evaluation of enzymic potential for biotransformation of isoflavone phytoestrogen in soymilk by *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* [J]. Food Research International, 2006, 39: 394 ~ 407

6 Daniel O Otieno, John F Ashton, Nagendra P Shah. Role of microbial strain and storage temperatures in the degradation of isoflavone phytoestrogens in fermented soymilk with selected β -glucosidase producing *Lactobacillus casei* strains [J]. Food Research International, 2007, 40: 371 ~ 380

7 Otieno DO, Ashton JF, Shah N P. Isoflavone phytoestrogen degradation in fermented soymilk with selected β -glucosidase producing *L. acidophilus* strains during storage at different temperatures [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 115: 79 ~ 88

8 Coulon S, Chemardin P, Gueguen Y, et al. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Lactobacillus casei* ATCC393 [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1998, 74: 105 ~ 114

9 王冬梅,李多川,孟军. 嗜热子囊菌光孢变种 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(5): 1007 ~ 1012

10 Kazuhiro Iwashita, Tatsuya Niagara, Hitoshi Kimura, et al. The *bglA* Gene of *Aspergillus kawachii* Encodes Both Extracellular and Cell Wall-Bound β -Glucosidases [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65 (12): 5 546 ~ 5 553

11 刘飞,杨丽杰,侯俊财. 青贮饲料中优良乳酸菌的分离鉴定[J]. 饲料工业, 2005, 26 (24): 22 ~ 25

12 Spano G, Rinaldi A, Ugliano M, et al. A β -glucosidase gene isolated from wine *Lactobacillus plantarum* is regulated by abiotic stresses [J]. Journal of Applied Microbiology 2005, 98: 855 ~ 861

13 Marisa S Garro, Laura Aguirre, Graciela Savoy de Giori, et al. Biological activity of *Bifidobacterium longum* in response to environmental pH [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2006, 70: 612 ~ 617

14 Mukund Adsul, Jayant Khire, Kulbhushan Bastawde, et al. Production of Lactic Acid from Cellobiose and Cellotriose by *Lactobacillus delbrueckii* Mutant Uc - 3^v [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(15): 5 055 ~ 5 057

15 Dario Colombatto, Fergus L Mould, Mahalingeshwara K Bhat, et al. *In vitro* evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level [J]. Animal Feed Science and Technology, 2004, 111: 111 ~ 128

(下转第 37 页)

- acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology, 2003, 53: 1 537 ~ 1 544
- 9 王德斌. 快速制备抗原-佐剂乳化液新方法[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(6): 596 ~ 598
- 10 王延华, 李官成, Zhou Xiafu. 抗体理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2005. 203 ~ 224
- 11 Guo Fen, Li Shiqian, Chu Yanhui. High-level expression, polyclonal antibody preparation and sub-cellular localization analysis of mouse Rhox5 protein[J]. Protein Expression and Purification, 2007, 54 (2): 247 ~ 252
- 12 Kou Geng, Shi Shu, Wang Hao. Protein Expression and Purification, 2007, 52(1): 131 ~ 138
- 13 Xu Lihui, Chi Xiaoyun, Li Fengyao. Preparation and Identification of Human Soluble sPD-L1 and Its Antibodies[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2007, 23(1): 106 ~ 111

Preparation and Purification of Polyclonal Antibody Against *Alicyclobacillus acidoterrestris* from Apple Juice Concentrate

Wang Feng, Li JianKe, Liu Haixia, Jiang Kai

(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Shaanxi Xi'an 710062, China)

ABSTRACT In order to build the rapid detection method of *A. acidoterrestris* from the Apple Juice Concentrate (AJC) using the enzyme - linked immunoassay following, the polyclonal antibody against *A. acidoterrestris* was prepared in this paper firstly. We used the propagule and brood - gemma of the thermo tolerant bacteria as the immune antigen, which were separated from the AJC. Immune tests were performed on eight large ear white rabbits with ear vein intravenous and intramuscular injection way respectively and the polyclonal antibodies were obtained. Titers and specificities of the antibodies were detected by tube agglutination test. The polyclonal antibodies were purified by saturated ammonium sulfate and DEAE ion exchange chromatography, and verified by SDS - PAGE electrophoresis. The titers of polyclonal antibody obtained with ear vein intravenous and intramuscular injection way were 1 : 2 560 and 1 : 640, respectively. The results showed the antibody obtained by ear vein intravenous injection had higher titer and shorter immunization period than that obtained by intramuscular injection. The specificity and purification effect of antibody were well. The immunization procedure of rabbit with *A. acidoterrestris* from the AJC was built and its polyclonal antibody was obtained for the first time.

Key words apple juice concentrate, *A. acidoterrestris*, immunization procedure, polyclonal antibody

(上接第 32 页)

Screening Lactic Acid Bacteria to Produce Extracellular β -glucosidase and the Preliminary Studies of the Enzyme Properties

Wan Zhentang, Yang Lijie

(Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

ABSTRACT Fluorescent substrate method was used to screen lactic acid bacteria to produce extracellular β -glucosidase from 20 strains which can utilize cellobiose. Ten strains were selected. In MRS culture, higher crude enzyme activity was found in the *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0320. Further studies were carried out to examine the characteristics of its production and properties. The production of extracellular β -glucosidase by the KLDS1.0320 was induced by cellobiose, and depended on the concentration. The optimum pH of crude enzyme activity is 4.8 and the optimum temperature is 37°C. The enzyme still had activity in PH value of 4.0 and at the temperature of 48°C.

Key words Lactic acid bacterium, β -glucosidase, cellobiose