

短杆菌异淀粉酶产生菌选育 及酶作用性质研究

王 武 周晓宏

(无锡轻工业学院) (商业部谷物油脂化学所)

摘要 研究和讨论了一株短杆菌异淀粉酶的筛选,诱变,产酶条件及部分酶学特性。结果是摇瓶发酵液中酶活单位最高可达 520u/ml。酶作用最适 pH 可低至 5.0,最适温度可高至 55℃。该酶对多种不同的含 α -1,6-葡萄糖苷键的底物皆具有良好的水解作用。水解产物的分子量分布情况类似于假单胞菌异淀粉酶。

关键词 异淀粉酶;短杆菌

0 前 言

异淀粉酶(EC3.2.1.9),又称 α -1,6-葡萄糖苷酶,能水解支链淀粉分支点的 α -1,6-葡萄糖苷键。目前世界上以酶法(α -淀粉酶和糖化酶)生产淀粉糖的最高转化率 DE 值为 96,若过程中再加入异淀粉酶,水解残余的 α -1,6 糖苷键,则可使 DE 值提高至 97%以上。1959 年以来,许多研究单位对异淀粉酶进行了开发研究,已经发现诸如假单胞菌,产气气杆菌等几十种微生物能产生异淀粉酶。其中大批量生产的有丹麦 NOVO 公司研制并生产的普鲁兰酶,已用于果葡糖浆,高麦芽糖浆生产和啤酒外加酶法糖化工艺。由于糖化酶作用 pH 较低(pH4.5~5.0),作用温度较高(55℃~60℃),在淀粉糖工业中与糖化酶配合使用的异淀粉酶如具有相似的作用 pH 和作用温度范围,则能大大开拓其市场。目前,一株国内现有的异淀粉酶产生菌(产气气杆菌)所产的酶的特性尚不够理想(酶作用最适 pH5.8,温度为 50℃),因此,本研究旨在开发一种能耐更低 pH,更高温度的异淀粉酶新酶种。

1 材料与方 法

1.1 分离源

各种含支链淀粉的土壤

1.2 培养基

收稿日期:1993-04-26

1.2.1 常规细菌培养基 A

1.2.2 糯米淀粉筛选培养基 B

糯米淀粉 2% KNO₃ 0.1%
 NaCl 0.05% K₂HPO₄ 0.05%
 MgSO₄ · 7H₂O 0.001% 琼脂 2%
 pH 7.0

1.2.3 异淀粉酶发酵培养基 C

可溶性淀粉 1.5% KCl 0.05%
 蛋白胨 0.05% MgSO₄ · 7H₂O 0.05%
 NH₄Ac 0.8% FeSO₄ · 7H₂O 0.01%
 K₂HPO₄ · 3H₂O 0.1%
 pH 7.0

1.2.4 假单胞菌异淀粉酶发酵培养基 D^[1]

1.3 主要试剂

玉米支链淀粉 SIGMA
 假单胞菌异淀粉酶 SIGMA
 普鲁兰 SIGMA
 NTG FLUKE 公司

1.4 测定方法

1.4.1 异淀粉酶活力测定 参照文献[2],酶作用温度改为 55℃,反应体系 pH 改为 5.0

1.4.2 普鲁兰酶活力测定 参照文献[3],[4]测定,普鲁兰酶活单位为上述条件下,每分钟可产生 1μmol 还原糖所需的酶液量。

1.4.3 α-淀粉酶活力测定 参照文献[2].

1.4.4 β-淀粉酶活力测定 参照文献[2].

1.4.5 糖化酶活力测定 参照文献[2].

1.4.6 β-葡聚糖酶活力测定^[5]

1.5 发酵基本条件

25ml 培养液装 250ml 三角瓶中,于旋转式摇瓶机 200r/min、32℃培养 96h.

1.6 诱变方法

1.6.1 诱变出发株在培养基 A 斜面上活化 18h,接种入液体培养基 A,摇瓶 7h 后,离心收集菌体,以 0.2mol pH6.0 的磷酸缓冲液洗涤三遍,玻璃珠打散菌团块后,制成 10⁸ 细胞/ml 的菌悬液。待诱变。

1.6.2 紫外诱变处理 取 4ml 菌悬液置于平皿中,无菌条件下以 15W 紫外灯 30cm 距离照射一定时间,照毕在平皿中加入 2x 培养基 A,静止培养 2h,再稀释涂布于培养基 B 培养 2d.

1.6.3 NTG 诱变处理 NTG 溶于 100ml 丙酮,再以磷酸缓冲液(pH6.0)稀释 10 倍,配制成 1mg/ml NTG 溶液。然后按一定比例与菌悬液混合,30℃,处理 1h,后以大量稀释法终止反应,涂布培养基 B 平板。

1.7 酶水解产物分子量分布测试法

取 25ml 溶于 pH5.0 醋酸缓冲液的 1mg/ml 玉米支链淀粉溶液加入酶 10 单位,于 52℃ 作用 20h,加热灭酶,离心取上清液 6ml,于 Sephadex-G50 上柱,再以 0.2mol pH7.3 的磷酸钠-磷酸缓冲液洗脱,分部收集洗脱组分,以苯酚硫酸法测定^[5]。

2 结果与讨论

2.1 产生异淀粉酶菌株选育

2.1.1 土样初筛 考虑到富含支链淀粉的分离源中可能会存在着产异淀粉酶的微生物,故选择富含支链淀粉的土壤作为分离源。土样经制作成悬液后,涂布于培养基 B 平板,平板分为两组,甲组 pH5.5,乙组 pH7.0,分别于 28℃ 和 32℃ 培养。甲组筛选平板适合于真核微生物生长,而乙组适合于原核微生物生长。培养两天后以碘液染色平板。发现甲组平板上出现了一些具有无色透明圈而不具有蓝色变色圈的菌落,镜检表明这些菌落多有酵母,乙组平板上出现的菌落中有 3 个菌落周边出现蓝色变色圈,将这三个菌落进一步纯化后保藏,命名为 I₂, I₁₃, I₁₈。初筛的根据是,异淀粉酶可专一性水解 α-1,6-糖苷键,使支链淀粉解枝成直链状,故与碘液接触后呈蓝色,因此,出现无色变色圈的菌落仅具有水解 α-1,4-糖苷键的酶类,而出现蓝色变色圈的菌落才有可能产生异淀粉酶。

2.1.2 野生株的诱变改良 利用培养基 D 对初筛获得的三株野生菌株进行产酶水平比较发现其中 I₂ 的产酶水平达 7u/ml,故选择 I₂ 作为进一步诱变的出发株。

通过 NTG 处理浓度与致死率关系的测试,得知 500μg/ml NTG 处理造成 I₂ 致死率为 90%。以 500μg/ml NTG 进行诱变处理后,挑取菌落在培养基 A 和培养基 B 平板上对应点种,2d 后,对培养基 B 平板进行碘液染色,再从培养基 A 上挑出对应于蓝色变色圈较大的菌落,进行摇瓶培养测试酶活。过程中结合产酶条件的摸索,使首批变异株中的 BI25 的产酶水平达 200u/ml。同样条件下再次诱变,获得了二次变异株 BI25,其产酶水平达 350u/ml。

对菌株进行了若干特性研究时,发现原出发株可产生多糖,造成发酵液有一定的粘度,两轮 NTG 诱变大大提高了酶活水平,却未能降低其产胞外多糖的水平。因而第三轮诱变选用紫外线处理。BI251 经紫外线处理 15sec 后,挑到发酵粘度较小的变异株 BI2516,再以 300μg/ml NTG 诱变之,最后得到 BI25164,其产酶水平平均达 460u/ml,发酵粘度比原出发株降低。

最后一轮诱变选用 300μg/ml NTG 是因为 500μg/ml NTG 造成 BI2516 的致死率达 100%,同样剂量的诱变剂对原出发株和紫外诱变变异株的致死率造成如此大的差异,可以解释为紫外变异株产生胞外多糖水平降低,使得靠多糖保护细胞抵御外界因子渗入细胞的能力降低,故对 NTG 的敏感程度大大提高。

异淀粉酶诱变株 BI25164 的诱变谱系见表 1。

表 1 诱变谱系

菌株	诱变手段	产酶水平(u/ml) (pH5.0)	胞外多糖
I ₂		7	++
↓	← 500μg/ml NTG	(未经条件优化)	

续表 1

菌株	诱变手段	产酶水平(u/ml) (pH5.0)	胞外多糖
BI 25		200	++
↓ ←	500 μ g/ml NTG		
BI 251		350	++
↓ ←	Uv	15 sec	
BI 2516		350	+
↓ ←	300 μ g/ml NTG		
BI 25164		460 (最高达 520)	+

2.2 菌种鉴定

菌株 I₂ 经普通显微镜观察,确认为细菌。I₂ 培养于培养基 A 固体斜面 18h 后,进行形态和生理生化初步鉴定,结果如下:

显微镜观察	革氏染色	阳性
	细胞形态	短杆状
	分裂方式	二分分裂
	芽孢生成	无
透射电镜观察	细胞产胞外多糖	
	无鞭毛或纤毛	
部分酶学特性	接触酶	阳性
	蛋白酶	阴性
	溶菌酶处理胞外多糖,不分解,说明不是肽聚糖。	
发酵性测试	发酵葡萄糖,产气不产酸	
	发酵乳糖,产气不产酸。	
需氧性	半固体穿刺试验,菌体长在穿刺线上,为兼性厌氧。	

对照细菌学手册,菌株 I₂ 初步鉴定为短杆菌属(*Brevibacterium* sp.)。又因该菌可产生异淀粉酶,故以 BI 命名变异株系列, I 代表异淀粉酶(Isoamylase)。短杆菌产生较高异淀粉酶水平的研究尚未见报道。

2.3 产酶条件研究

2.3.1 碳、氮源对产酶的影响 研究比较了几种不同的淀粉和糖对短杆菌异淀粉酶生成的影响。在培养基 C 基础上几种不同的碳水化合物分别按 1% 的浓度配入培养基, 30℃, 发酵 96h, 测定异淀粉酶生成情况, 结果如表 2。

表 2 碳源对产酶的影响

碳源	蔗糖	乳糖	葡萄糖	甘露糖	麦芽糖	糯米淀粉	可溶性淀粉
I ₂ 酶活 (u/ml)	0	20	2	6	14	40	110

由此可见可溶性淀粉是短杆菌产异淀粉酶的最佳碳源。

不同的氮源对产酶的影响也进行了比较, 结果如表 3(氮源浓度为 0.8%) NH₄Ac 为最佳氮源。

表 3 不同氮源对产酶的影响

氮源	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NH_4Cl	NH_4Ac	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	KNO_3
I_2 酶活 (u/ml)	69	80	155	37	72

接着对碳、氮源浓度对产酶的影响进行了测试。试验结果见图 1。由此可看出,在酶产量还未大幅度提高之前,1.5%的可溶性淀粉为碳源,0.8%的 NH_4Ac 为氮源时,菌株 I_2 产酶水平达到高峰。

2.3.2 pH 对产酶的影响 把培养基分别配成 pH6.0,7.0,8.0,测试培养基 pH 对异淀粉酶生成的影响,发现 pH6.0 时,发酵过程不产酶, pH8.0 时产酶水平仅为 pH7.0 时的 1/4。故确定 pH7.0 为最合适培养基 pH 条件。

2.3.3 产酶过程曲线 各种发酵产酶

最佳条件确定后,对最终变异株 BI 25164 产酶过程进行了测试,结果如图 2。从图 2 可以看出,发酵 60h 以后才开始产酶,发酵 96h,产酶达到高峰。酶活可达 520u/ml。另外伴随着产酶的开始,pH 开始缓慢下降,直至产酶达高峰时,pH 下降至 6.5。

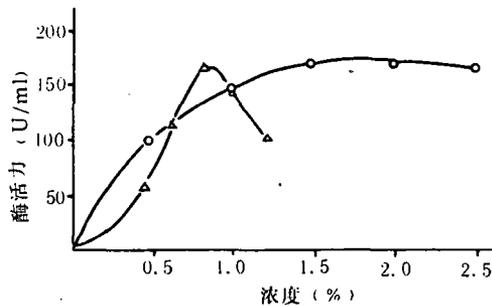


图 1 碳、氮源浓度对产酶的影响

—○—碳源 —△—氮源

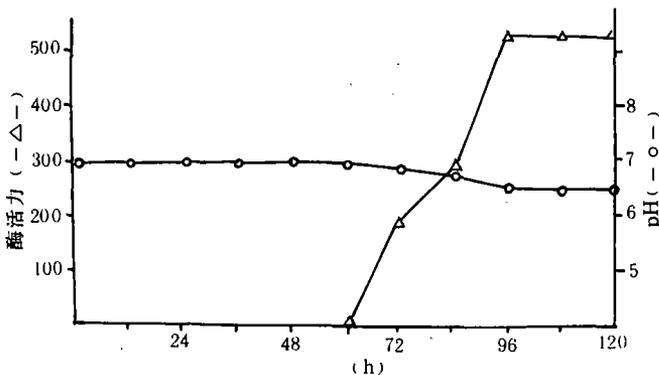


图 2 菌株 BI 25164 产酶过程曲线

通过调整碳源,配制混合碳源的办法得以解决。

2.4 酶作用特点研究

2.4.1 短杆菌葡萄糖苷酶系活力初步分析 初步研究表明,短杆菌的葡萄糖苷酶是胞外酶。当发酵液中的菌体与上清液分离后,以超声波破碎菌体,与上清液比较异淀粉酶活力,发现发酵液酶活力中 90% 存在于上清液部分。胞内虽含有少量的异淀粉酶(尚未分泌出),但比例很小。其他葡萄糖苷酶的情况亦类似,故以发酵液进行葡萄糖苷酶系分析,结果见表 4。

从表中可看出短杆菌 BI 25164 所产的葡萄糖苷酶中,含有极少量的 α -1,3-葡萄糖苷酶,和少量的 α -1,4-葡萄糖苷酶(主要是糖化酶),后者对于菌株能以淀粉为唯一碳源而言是关键酶类。 α -1,6-葡萄糖苷酶则是短杆菌所产的主要葡萄糖苷酶,它能以糯米支链淀粉,

工业生产上总是尽量缩短发酵周期,以提高效益,由于时间关系,关于改良发酵工艺,缩短产酶周期的试验未能进行。经分析,由于短杆菌所产的 α -1,4-葡萄糖苷酶的活力非常低(见后面部分),在发酵培养基中的淀粉为唯一碳源虽能刺激(或诱导)异淀粉酶的生成,但发酵前期却未能提供足够的糖以供细胞的吸收,故造成产酶前滞期偏长,这一问题可以通

玉米支链淀粉,普鲁兰为底物,说明其具有很广的底物范围,在酶促反应时对 α -1,6-键之间的距离和分布并无特异性要求,是一种很有应用前景的 α -1,6-葡萄糖苷酶。

2.4.2 酶促反应条件 酶促反应条件的研究主要围绕pH、温度和金属离子的影响而进行的。

酶促pH条件的比较是在温度为52℃时进行的结果如图3。从中可以看出,pH为3.5时,酶反应体系中仍有15%左右的酶活力,随着pH逐步提高至5.0时,酶活达最高点,pH继续升高至6.0,酶活仅略为下降,故确定酶的最适pH为5.0。

酶促温度条件的比较是在pH5.0的条件下进行的,从图3中看出最适温度为50℃,但

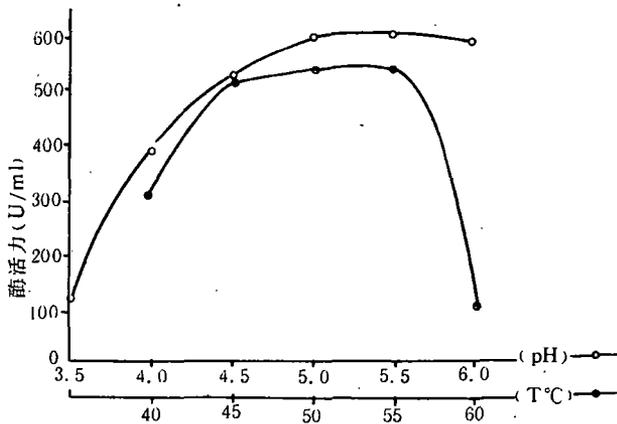


图3 酶促反应pH和温度条件研究

温度升高到55℃时,酶活力并无明显下降。与现行的其他异淀粉酶相比(最适温度 $\leq 50^\circ\text{C}$, pH ≥ 5.5)具有酶促反应最适pH降低,最适温度提高的优势。

研究过程中发现EDTA对酶活产生彻底抑制,说明异淀粉酶酶促反应时需要金属离子作为辅因子。实验中以多种一价两价和三价离子进行测试。结果表明,一价离子对酶活力有正向影响,其中 Li^+ 可使酶活提高50%,二价离子中的大多数对酶活的促进作用不强,

但 Zn^{2+} 离子可使酶活提高35%。有趣的是三价离子 Al^{3+} , Fe^{3+} 对酶活产生了彻底抑制造成酶活为零。各种金属离子的浓度皆为1mmol/L,关于浓度变化对酶活的影响尚未进行。

2.4.3 解枝产物分布情况比较 三种不同的异淀粉酶——即SIGMA公司的假单胞菌异淀粉酶(PI),无锡酶制剂厂的产气气杆菌异淀粉酶(AI)和本研究所获的短杆菌异淀粉酶(BI)的水解产物分布情况的比较。作法是用三种不同的酶在完全相同的条件下对玉米支链淀粉进行水解,水解产物分别以Sephadex-50G进行柱层析,测定水解程度和淀粉断链后分子大小分布情况^[6]。结果见图4。

从图中可以看出,三种异淀粉酶都能使玉米支链淀粉得到一定程度的水解。其中PI对底物水解后产生了两个明显的峰区(峰区II和III),说明SIGMA公司的假单胞菌异淀粉酶具有良好的解枝作用,峰区II为支链淀粉的B链,峰区III为支链淀粉的A链。水解产物中几乎不含小分子的低聚糖和单、双糖,说明该酶的纯度很高。AI对底物水解后产生了一个很集中的峰区(峰区I),其分子量范围略窄于峰区II,但峰面积大于峰区II。值得注意的是AI并未产生类似于峰区III范围的水解产物,这可能表明AI实际上不是产气气杆菌的异淀粉酶,而是富含外切型 α -1,4-葡萄糖苷酶的酶制剂。进一步在糯米淀粉平板上点样进行碘染

表4 短杆菌BI 25164 葡萄糖苷酶系活力分析

酶活	酶活单位 (U/ml)	方法
α -淀粉酶活力	0	SKB法 ^[2]
β -淀粉酶活力	0	还原糖法 ^[2]
糖化酶活力	1	SP法 ^[2]
β -葡聚糖酶活力	0.0752	还原糖法 ^[5]
异淀粉酶活力 (可溶性糯米淀粉)	300	碘法 ^[2]
(玉米支链淀粉)	460	碘法 ^[2]
普鲁兰酶活力	1.925	还原糖法 ^[3]

色,只出现无色透明圈,而未见蓝色变色圈,说明上述的酶样品不含 α -1,6-异淀粉酶,而含有 α -1,4-葡萄糖苷酶。这是因为酶样取自市售的产气气杆菌异淀粉酶酶制剂,可能由于货架期

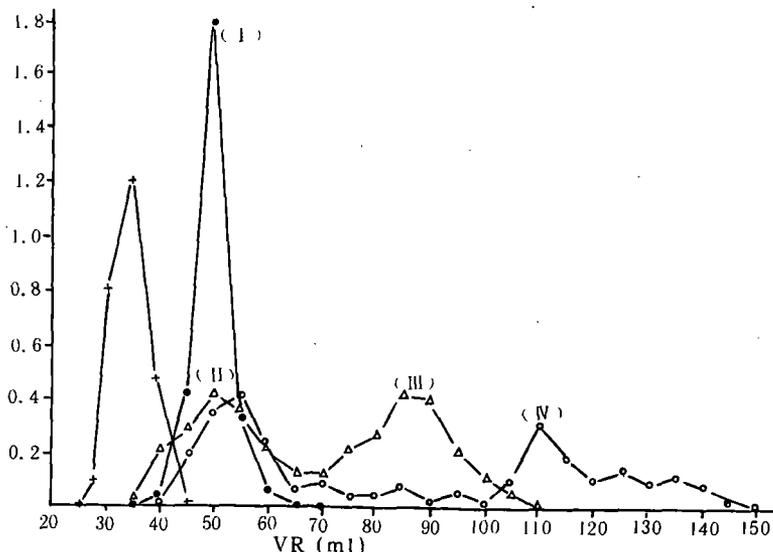


图4 三种不同异淀粉酶对支链淀粉作用后水解产物分布的比较

—+—原淀粉对照 —●— AI —△— PI —○— BI

已过,异淀粉酶活力已失活所致。BI对底物水解的情况较接近PI的情况,不过BI所产生的峰区Ⅳ比PI的峰区Ⅲ略为滞后,即水解产物的分子量区段略小些,另外峰区Ⅴ比PI的峰区Ⅲ滞后,且峰面积偏小。这可能说明了因为短杆菌异淀粉酶未经纯化,其中混杂有少量糖化酶,造成了异淀粉酶对支链淀粉切枝后产生的A链和B链被糖化酶进一步水解,致使A链分子区段的分子量下降。

短杆菌BI25164仍然能产生一定量的胞外多糖,影响了异淀粉酶的分离纯化,该菌的工业化应用有待于对菌株进一步改良,以期尽量降低胞外多糖的生成,尽量提高异淀粉酶的活力单位。

另外,由于暂时未能获得标准普鲁兰酶,短杆菌BI25164所产生的异淀粉酶具有普鲁兰酶活力,究竟是因混杂有普鲁兰酶所致,还是由于其本身具有多底物性所致,还有待于进一步研究确定之。

3 结 论

(1) 从土样中分离所得的短杆菌可产生胞外异淀粉酶(BI),经多次改良,酶活单位最高可达520U/ml。

(2) 酶促最适pH可低至5.0,最适温度可高至55℃,对范围较广的底物具有 α -1,6-葡萄糖苷酶水解作用。

(3) 该酶对玉米支链淀粉水解的产物分子量分布层析图较接近假单胞异淀粉酶的情况。

(4) 短杆菌BI25164经改良后仍产生一定量的胞外多糖,进一步降低多糖生成量后,可望得到工业化开发。

参 考 文 献

- 1 横林康之等. 日本特许公报. 1970;16788
- 2 张树政等. 酶制剂工业. 1984;531
- 3 Norman, B. E. Starch; 1982; 34(10):340
- 4 Yuzuru Suzuki etc. Europ, J Appl Microb Biotech, 1983; 17:14
- 5 日本食品工业学会编, 郑州粮食学院译. 食品分析法, 1986
- 6 蓝色葡聚糖使用说明书 Biocon Pty Ltd. (Australia), 1991

Breeding of *Brevibacterium* Isoamylase Producer and the Enzymatic Study

Wang Wu

(Wuxi Institute of Light Industry)

Zhou Xiaohong

(Institute of Cereal and Oil Chemistry, Ministry of Commerce)

Abstract A *Brevibacterium* Isoamylase (BI) producer was isolated and mutated. The optimal fermentation conditions for producing BI and the catalytic behaviours of the enzyme were initially studied. The enzymatic activity was raised to be 520u/ml in the broth (highest). The optimal pH for catalysis could be as low as 5.0 and the optimal temperature could be as high as 55°C. The enzyme hydrolyses well on different substrates which contain α -1,6-glucosidic bonds. The molecular distribution of hydrolyzed product from BI catalysis on corn amylopectin shows similar profile to that from *Pseudomonas* Isoamylase hydrolysis.

Key-words Isoamylase; *Brevibacterium*