

麦芽四糖淀粉酶产生菌的筛选与发酵条件的研究*

严自正 余晓红 李梅 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从290个土样中分离到1380株细菌, 加上本所其他课题组提供的细菌共1870株, 其中有707株能分解淀粉, 经过复筛、纸层析鉴定有3株菌的淀粉酶酶解液中主要产物是麦芽四糖, 进一步用 β -淀粉酶水解为麦芽糖, 用葡萄糖淀粉酶水解为葡萄糖, 确证为麦芽四糖。其中最优秀菌株为537.1, 其酶解产物中麦芽四糖占90%, 而其他两株菌的酶解产物中除麦芽四糖外, 还有较多的麦芽糖及麦芽三糖, 因此选择了537.1作为形成麦芽四糖淀粉酶的优良菌株, 经鉴定, 该菌属于产碱菌(*Alcaligenes sp.*)。

菌株537.1产酶的较好条件为: 培养基中麦芽糖1.5%, 蛋白胨0.5%, 起始pH7-7.5, 在27-28℃振荡培养48h。

菌株537.1培养液可以酶解谷类、薯类和野生植物淀粉生成麦芽四糖。

关键词 麦芽四糖淀粉酶; 产碱菌; 糖苷酶

麦芽四糖淀粉酶(1,4- α -D-Glucan maltotetraohydrolase EC 3.2.1.60)顺序切割糖链的非还原性末端的第四个 α -1,4葡萄糖苷键, 产物为麦芽四糖, 是淀粉酶类中的第三个外切型酶^[1]。该酶由Robyt和Ackerman在1971年首次从斯氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)中得到。1987年Takasaki报道, 由环芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)中也可得到麦芽四糖淀粉酶。该酶可用来制造麦芽四糖。这种糖具有低甜度、低渗透压和低粘度等优点, 适用于作甜味剂的填充剂及制造高级糖果、糕点和饮料, 还可用于试剂、医药、化工及机械等行业, 因此该酶逐渐引起人们的兴趣^[4-7]。国内至今没有见到有关该酶的研究报告。本文报道了麦芽四糖淀粉酶的产生菌的分离、筛选、较佳发酵条件以及用筛选出的菌的培养液对不同种类的淀粉进行酶解等的结果。

材料和方法

(一) 菌种、培养基及培养条件

1. 菌种: 大部分由土壤中分离, 部分由本所其他课题组提供。

2. 培养基及培养条件:

(1) 牛肉汁琼脂培养基: 斜面或平皿, 28-30℃, 培养1-3天。

(2) 分解淀粉培养基(%): 马铃薯淀粉0.5, 牛肉膏0.5, 酵母膏0.5, 蛋白胨1, NaCl 0.5, 琼脂2。0.55kg/cm²灭菌30min。倒平皿28-30℃, 培养1-3天。

(3) 发酵基础培养基(%): 马铃薯淀粉2, 蛋白胨0.5, 酵母膏0.2, KH₂PO₄ 0.2, (NH₄)₂HPO₄ 0.6, FeSO₄·7H₂O 0.01, MgSO₄·7H₂O 0.05, NaCl 0.1, pH 7.0。2.0×20cm试管装8ml, 0.55kg/cm²灭菌30min。28-30℃振荡培养3天。

(二) 主要仪器及试剂

本文于1991年7月20日收到。

* 国家自然科学基金资助项目和中国科学院资助项目。部分内容发表在1988年全国生会化会议论文摘要p252。本所徐婉学先生提供全部土样, 周慧玲先生协助菌种鉴定, 林业科学院协助用HPLC测定麦芽四糖, 一并致谢。

TN-3F温度梯度振荡器(日本东洋科学株式会社), 721分光光度计(上海第三分析仪器厂), J2-21高速冷冻离心机(Beckman), 5850pH计(Cole-Parmer)。麦芽 β -淀粉酶(上海生化所东风试剂厂), 红曲霉葡萄糖淀粉酶(本实验室制备)^[8], 麦芽三糖(G_3) (不纯)及麦芽四糖(G_4) (Sigma), 低聚糖(无锡轻工业学院及江苏宜兴米厂)。

(三) 酶活力测定及活力单位定义

反应总体积5ml, 1%可溶性淀粉, pH 6.6 0.05mol/L磷酸缓冲液, 适量酶液, 50℃保温10min, 然后在100℃下10min停止反应, 用DNS法^[9]测定反应液中还原糖, 对照用失活的酶。在上述反应条件下, 每小时释放1mg的还原糖(以葡萄糖作标准曲线)所需酶量, 定义为一个酶活力单位(u)。

(四) 酶解产物鉴定

(1) 纸层析法: 新华I号滤纸, 展开剂为正丁醇: 吡啶: $H_2O = 6:4:3$, 上行展开2—3次; 显色剂为4%苯胺丙酮: 4%二苯胺丙酮: 85%磷酸 = 5:5:1; 层析后滤纸用显色剂浸湿, 然后在80℃烤箱中5—10min, 糖呈蓝色斑点。

(2) HPLC法: Sugar Park-1柱, 90℃、 H_2O 洗脱, 流速0.7ml/min, 检测器RZ, 8X, G₄作标准。

结 果

(一) 菌种筛选

1. 菌种分离: 用牛肉汁培养基分离了来自海南、广州、南京及无锡的土样290个, 共挑出单菌落1380个, 接入斜面。

2. 分解淀粉的菌种筛选: 将上述分离到的细菌以及其他课题组提供的细菌490株共1870株, 接入有淀粉的平皿培养

基上, 培养后, 加入0.01mol/L碘液, 在菌落周围出现透明圈(水解圈)者有707株细菌。

3. 产麦芽四糖淀粉酶菌种的复筛选: 将上述707株菌分别接入发酵基础培养基。培养后, 用滤纸片沾上培养液贴于用pH6.6磷酸缓冲液配制的淀粉板上。淀粉板在37℃或50℃保温后, 加碘液, 在淀粉板上透明圈直径大于0.8—1cm的共有173株。将这173株菌的培养液离心后取上清液与pH6.6 2%淀粉溶液反应。反应液用纸层析鉴定其中的组份, 结果有3株菌的酶解产物以麦芽四糖为主, 其中537.1的酶解液在纸层析上仅有麦芽四糖的斑点, 而其他两株菌除麦芽四糖外, 还有麦芽糖和麦芽三糖斑点(图1)。

4. 酶解产物进一步确证: 将三株菌(537.1、537.2及288)的淀粉酶解液分别加麦芽 β -淀粉酶及红曲霉葡萄糖淀粉酶保温, 作用后将此作用液再用纸层析鉴定, 结果见图1。537.1的淀粉酶解液经 β -淀粉酶作用后全部为麦芽糖, 经葡萄糖淀粉酶作用后大部分为葡萄糖, 少量为麦芽糖。从而可以确证537.1的酶解产物为麦芽四糖。其它两株菌的酶解产物也是以麦芽四糖为主, 说明这3株菌均产麦芽四糖淀粉酶。最后将537.1培养液酶解可溶性淀粉后的酶解液, 用纸层析分离后定量测定, 以及用HPLC方法测定酶解液, 结果在酶解液中麦芽四糖占90%左右。以下试验均用537.1进行。

5. 菌种鉴定: 将537.1反复涂平皿, 证明菌落是均一的, 乳白色, 略暗。菌体短杆及杆状, 周身鞭毛, 格兰氏染色阴性, 氧化葡萄糖并产酸, 氧化酶和接触酶阳性, 石蕊牛奶产碱, 根据这些性状, 该菌应属产碱菌(*Alcaligenes sp.*)^[10]。

(二) 发酵条件

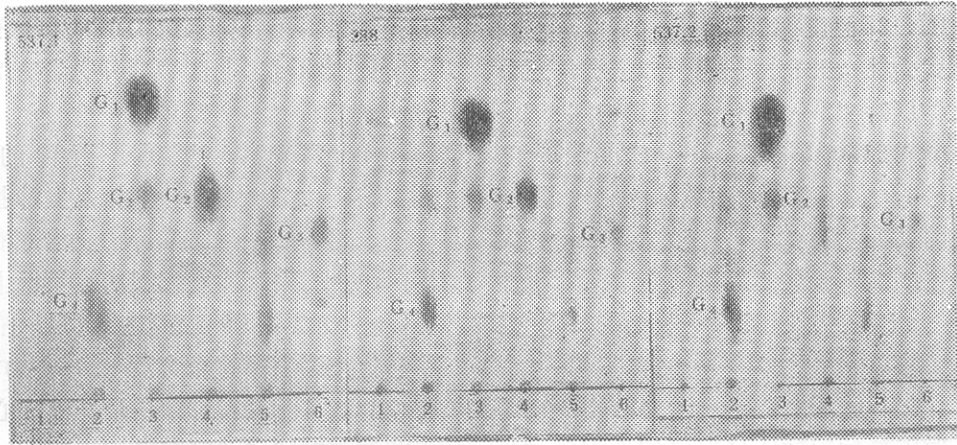


图 1 不同菌株的淀粉酶解液纸层析图

Fig.1 Paper chromatograms of soluble starch hydrolyzed by culture filtrate of various strains

1. Control (inactivated enzyme) 2. Hydrolysate of starch 3. Hydrolysate of starch+glucoamylase 4. Hydrolysate of starch+β-amylase 5. Hydrolysate of starch+maltotriose(impure) 6. Maltotriose(impure)

1. 碳源及其浓度：基础培养基中马铃薯淀粉用糯米淀粉、可溶性淀粉、玉米粉、糊精、麦芽糖、葡萄糖、果糖、蔗糖或甘油代替。结果表明培养基中加麦芽糖后

产酶活力最高，马铃薯淀粉次之，葡萄糖、果糖及蔗糖似乎抑制酶的产生。试验了不同浓度的麦芽糖及马铃薯淀粉，结果均以1.5%浓度为好(表1)。

表 1 不同浓度的碳源对产酶的影响

Table 1 Effect of carbon source concentration on the production of maltotetraose-forming amylase

Carbon source Concn. (%)	Maltose				Potato starch			
	1	1.5	2	3	1	1.5	2	4
Enzyme activity(u/ml)	694.8	1086.5	538.4	3.2	175.9	251.4	69.1	3.2

2. 氮源及其浓度：基础培养基中的蛋白胨用小带鱼粉、大豆蛋白胨、天冬酰胺以及无机氮源来代替，不同氮源对产酶的影响见表2。试验了蛋白胨、大豆蛋白胨等的浓度，在0.5—2%范围内酶活力相差不多。

表 2 不同氮源对产酶的影响
Table 2 Effects of various nitrogen sources on the production of maltotetraose forming amylase

Nitrogen sources	Cell growth (A _{660nm})	Activity (u/ml)
Fish meal	19.4	127.3
Soy bean peptone	22.5	111.1
Asparagine	15.9	94.9
Peptone	16.9	69.8
NH ₄ Cl	18.1	50.7
(NH ₄) ₂ SO ₄	16.6	28.0
Urea	17.0	18.3
NaNO ₃	16.8	8.6
NH ₄ NO ₃	18.1	0.0
Beef extract	17.2	0.0

3. 培养基 pH：培养基经过灭菌，pH会下降。试验了不同 pH，培养基灭菌后 pH7.0—7.5 对产酶较有利。

4. Ca²⁺影响：将基础培养基中的 NaCl 用 CaCl₂ 代替，酶活力可以提高 1/2。

5. 培养温度：将活化的菌株接入基础培养基，用温度梯度振荡器培养 3 天，

测定酶活力。结果表明, 在27℃酶活力最高, 超过30℃, 酶活力下降(图 2)。

反应 3h, 然后在沸水浴中 10min 停止反应。将淀粉酶解液进行纸层析, 用低聚糖

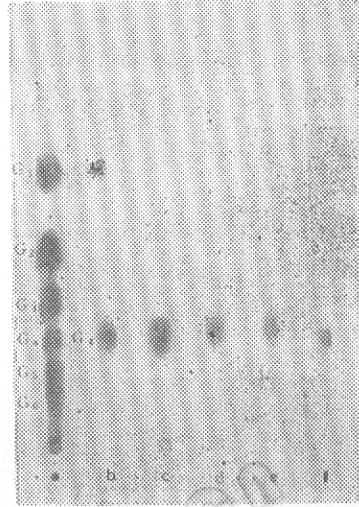
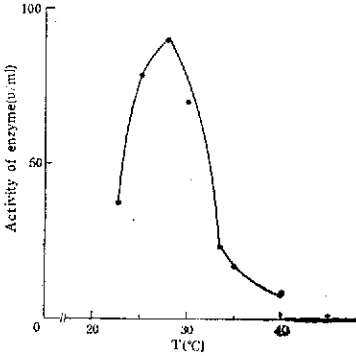


图 2 不同培养温度对产酶活力的影响
Fig.2 Effect of temperature on the production of maltotetraose-forming amylase

6. 麦芽四糖淀粉酶的产生过程: 将活化的菌种接入基础培养基, 测定不同培养时间的菌体生长情况及酶活力(图 3)。该菌24h即产酶, 48h达最高, 生长进入稳定期后期, 酶活力会迅速下降。

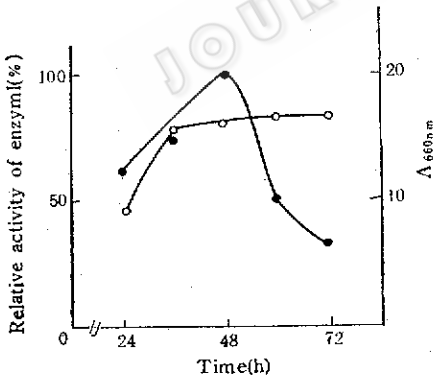


图 3 菌株537.1产酶的时间过程
Fig.3 Time course of maltotetraose-forming amylase production by 537.1
—●—Relative activity —○—Cell growth

(三) 酶解淀粉试验

1. 酶解不同种类的淀粉: 菌株537.1的培养液与0.5%可溶性淀粉, 糯米淀粉、马铃薯淀粉、玉米淀粉、山芋淀粉、芭蕉粉、大米粉及山芋粉等在 pH6.6、50℃

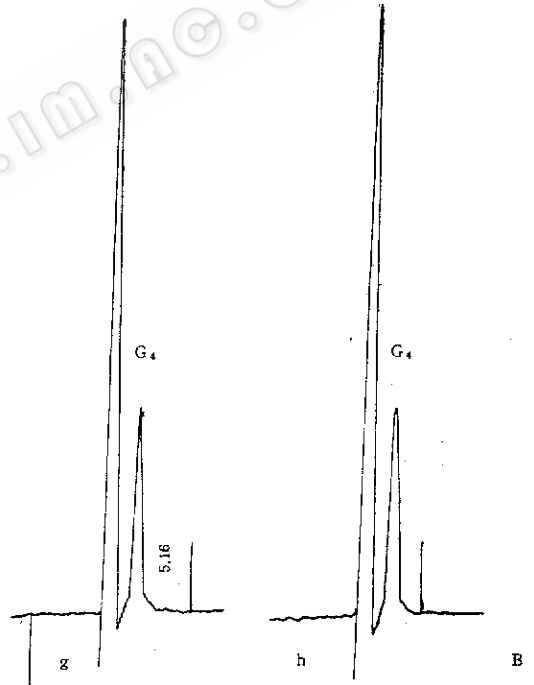


图 4 不同来源的淀粉酶解产物的层析图
Fig.4 Chromatograms of starch from various sources hydrolyzed by culture filtrate of strain 537.1

A: Paper chromatogram B: HPLC
a: Maltooligosaccharides(control), b: Maltotetraose(control), c: soluble starch, d: banana powder, e: rice meal, f: Cornmeal, g: cornstarch, h: Glutinous rice starch;

和麦芽四糖作标准, 或者用HPLC分析, 用麦芽四糖作标准。以上不同种类的淀粉、薯类或谷类粉均能被酶解成麦芽四糖, 部分结果见图4。在层析纸上部分样品除麦芽四糖外, 还出现微量的麦芽糖及麦芽三糖斑点, 以及在原点残留没有被水解的物质。此外, 还将537.1培养液对可溶性淀粉作用不同时间, 然后纸层析, 结果见图5, 说明即使作用24h, 主要产物仍为麦芽四糖。



图5 537.1培养液作用于可溶性淀粉不同时间的纸层析图

Fig.5 Paper chromatogram of soluble starch hydrolyzed with culture filtrate of strain 537.1 at different time intervals

- 1, maltooligosaccharides, 2, Maltotetraose,
- 3-8, Different time intervals (0, 4, 6, 8, 10, 24h, respectively)

讨 论

关于麦芽四糖淀粉酶活力, Robyt等^[2]报道的实验室斯氏假单孢菌培养液的酶活力为9.4IU/ml(相当于本文酶活力100u/ml左右)。537.1通过单因子发酵条件试验, 酶活力最高曾达1000u/ml左右, 如果进一步用正交试验, 会找到更佳的产酶条件, 酶活力可相应的提高, 为扩大试验及用于生产提供数据。

淀粉酶解产物中麦芽四糖的百分比问题, 文献中报道的环状芽孢杆菌的淀粉酶解产物中的麦芽四糖占30—40%^[11], 斯氏假单孢菌的短链淀粉的酶解产物中麦芽四糖达83.7(W/W)^[11], 而菌株537.1酶解淀粉后的寡糖中麦芽四糖可达90%左右, 说明该菌株所产生的淀粉酶可用于制造高纯度的麦芽四糖, 同时该酶可以水解各种来源的淀粉及含淀粉的原料, 还能酶解野生植物淀粉; 该菌系非致病性的^[10], 这些性质对于将来用于生产都是很有利的。

该酶和葡萄糖淀粉酶、 β -淀粉酶的催化作用相同点为顺序切割糖链的非还原性末端的 α -1,4葡萄糖苷键, 不同点是产物葡萄糖单元数目不同, 如果将这三种酶进行结构与功能的比较研究会具有较大的理论与实践意义, 必然会推动今后淀粉酶类的研究与应用。

参 考 文 献

- [1] Nakakuki, T. and K. Kainuma: *Chem. Economy & Engineering Review*, 16:23—30, 1984.
- [2] Robyt, J. F. and R. J. Ackerman: *Arch. Biochem. Biophys.*, 145:105—141, 1971.
- [3] Takasaki, Y.: Abstracts of Annual Meeting of Agric. Chem. Soc. of Japan; p77, 1987.
- [4] Yoshida, M. et al.: *Jpn. Soc. Starch Sci.*, 35:245—252, 1988.
- [5] Kimura, T. and M. Ogata: *Biotech. and Bioeng.*, 33:845—855, 1989.
- [6] Kubota, M. et al.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho Jp 88240784*, 1988.
- [7] Kimura, T. et al.: *Biotech. and Bioeng.*, 36:790—796, 1990.
- [8] 张树政等主编: *酶学研究技术*, p30, 科学出版社, 1987.
- [9] Reese, E. T. and M. Mandels: *Methods in Carbohydrate Chemistry* (R. L. Whistler, Ed.) Vol.3 Academic Press p.141, 1963.

- [10] Buchanan, R. E. and Gibbons N. E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Eighth Edition) Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1974. (中译本, p.359, 1984, 科学出版社).
- [11] 高峰, 发酵与工业, 41(6):477-489, 1983.

Screening of Bacterial Strains Producing Maltotetraose-forming Amylase and the Conditions for Enzyme Production

Yan Zizheng She Xiaohong Li Mei Zhang Shuzheng
(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

The authors isolated 1380 bacteria strains from 290 soil samples collected in China and 490 strains were granted by other research teams in this institute. By screening 707 strains showed starch-hydrolyzing activity. By further screening and paper chromatographic test, three strains with maltotetraose as the main product were obtained. The maltotetraose was further confirmed by treatment with β -amylase splitting to maltose and with glucoamylase to glucose. The most promising strain was 537.1, which produced maltotetraose about 90% (w/w) in the starch hydrolysate. While the other two strains produced more maltose and maltotriose besides maltotetraose. Strain 537.1 was tentatively identified as *Alcaligenes sp.*

The optimum conditions for enzyme production were as follows: medium composition, 1.5% maltose, 0.5% peptone with initial pH of 7.0-7.5; cultured at 27-28°C for 48 h on rotary shaker.

The culture filtrate of the strain 537.1 can hydrolyze starch and different kinds of cereal meal with a high yield of maltotetraose in the hydrolysate.

Key words

Maltotetraose-forming amylase, *Alcaligenes sp.*; glucosidase