

## 两类嗜碱细菌产生环状糊精葡萄糖基转移酶的条件 和酶性质的比较

淡家林 王世卓 徐冠珠 徐纯锡

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从土壤里分离到两类在碱性培养基中生长并产生环状糊精葡萄糖基转移酶的细菌, 一类与国外已在工业生产中使用的芽孢杆菌相似, 另一类为无芽孢的杆状细菌, 尚未见报道。两类细菌的代表菌株, 芽孢杆菌 32-2 要求的产酶因子以酵母膏最好; 无芽孢杆菌 52-2 号则用玉米浆最好。碳源和氮源也有所不同。52-2 产酶过程比 32-2 稍晚, 酶反应条件基本相近。

两类细菌的酶作用于淀粉的产物, 均以  $\beta$ -环状糊精为主,  $\gamma$ -和  $\alpha$ -环状糊精产量很小。

实验结果表明, 嗜碱的无芽孢杆菌用于生产环状糊精, 不比嗜碱芽孢杆菌逊色, 这类细菌的发现, 必将为选育优良生产菌种扩大来源。

**关键词** 环状糊精葡萄糖基转移酶; 嗜碱细菌

环状糊精在食品、医药、农业、轻工业和其他工业中有广泛的用途, 近年来受到人们的重视。

环状糊精是葡萄糖基在环状糊精葡萄糖基转移酶作用下环化转移而成的。已知有几种芽孢杆菌和不产芽孢的肺炎克氏杆菌能产生此酶<sup>[1]</sup>。我们从分离到的嗜碱细菌中, 发现两类细菌产生这种酶, 一类为芽孢杆菌, 与 Horikoshi 等<sup>[2,3]</sup>报道的细菌相似; 另一类为无芽孢的杆菌, 但不同于克氏杆菌。本文报道两类细菌的代表株产酶条件和酶性质的比较。

### 材料和方法

#### (一) 菌株

好碱芽孢杆菌 32-2 和无芽孢杆菌 52-2。

#### (二) 酶的制备

按 Horikoshi 等的方法<sup>[2,3]</sup>。基础培养基为 (g/l): 可溶性淀粉 10, 蛋白胨 5, 酵母膏 5,  $K_2HPO_4$  1,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2,  $Na_2CO_3$  10, 30°C 摇床培养 4 天, 离心除去菌体, 加三倍体积的丙酮沉淀酶, 减压干燥。或将培养基离心后的上清液作为酶液。

#### (三) 生长测定

取 1ml 培养液, 加水至 10ml, 于 560nm 波长比色。

#### (四) 酶活性测定

按 Horikoshi 等修改的 Fuwa 法<sup>[1]</sup>。即 0.01 ml 适当稀释的酶液加 0.2M 甘氨酸-NaOH-NaCl 缓冲液 (pH8.5) 溶解的 0.2% 直链淀粉溶液 0.3 ml, 40°C 反应 10 分钟, 加 0.5M 醋酸 1ml 中止反应, 加 0.5ml 0.02% 碘溶液显色, 稀释至 10ml, 在 700nm 测定吸光度。如用马铃薯淀粉, 改为 0.01ml 酶液加 0.2% 马铃薯淀粉液和 0.2M 的 pH8.5 缓冲液各 0.2ml, 40°C 反应 10 分钟, 加 0.5M 醋酸溶液中止反应, 加 0.005% 碘液 3ml, 稀释至 10ml, 比色。标准的碘-淀粉色降低 10% 定为一个酶活性单位。

#### (五) 环状糊精的鉴定

酶反应液通过纸层析和薄层层析进行定性测定。显微镜下观察环状糊精-碘复合物结晶和呈色反应。按 French 法<sup>[4,5]</sup>进行有机溶剂复合物沉淀试验。提纯的样品进行旋光度和红外吸收光谱测定。

本文于 1982 年 2 月 3 日收到。

本所林桂坚同志协助测定旋光度和红外吸收光谱, 特此致谢。

## (六) 试剂

$\alpha$ -、 $\beta$ -、和  $\gamma$ -环状糊精来自日本林原生化研究所(林原)和美国 Sigma 公司。 $\beta$ -环状糊精也来自林原和光纯药株式会社。

## 结 果

## (一) 产酶条件

1. 培养时间: 培养中逐日取样测定生长和酶活性, 结果见图 1。由图 1 看出, 32-2 和 52-2 菌株分别在培养第三天和第四天酶活性最高。细胞生长都在第三天达到最高, 三天以后生长测定值降低, 部分菌体成粘液状, 不易分散, 52-2 菌株更明显, 可能影响测定值。

2. 碳源: 在基础培养基中改用不同碳源, 各加 1%。培养四日后的生长和产酶情况见表 1。菌株 32-2 以可溶性淀粉作碳

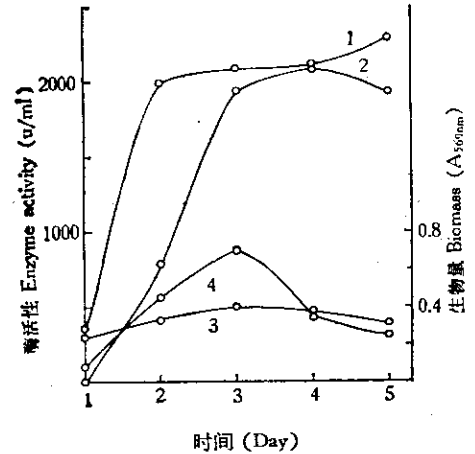


图 1 培养时间与产酶的关系

Fig. 1 Time course of enzyme formation

1. 菌株 32-2 酶活性 Enzyme activity of strain 32-2
2. 菌株 52-2 酶活性 Enzyme activity of strain 52-2
3. 菌株 32-2 生物量 Biomass of strain 32-2
4. 菌株 52-2 生物量 Biomass of strain 52-2

表 1 不同碳源对产酶的影响

Table 1 Effects of various carbon sources on enzyme production

碳 源 Carbon source	生物量 Biomass (A <sub>560nm</sub> )		酶活性 Enzyme activity (u/ml)	
	菌株 Strain			
	32-2	52-2	32-2	52-2
蔗糖 Sucrose	0.63	0.55	0	0
马铃薯淀粉 Potato starch	0.58	0.46	670	1050
红薯淀粉 Sweet potato starch	0.54	0.43	650	1660
玉米淀粉 Corn starch	0.49	0.36	590	1230
可溶性淀粉 Soluble starch	0.53	0.50	900	1060

源, 产酶活性最高。菌株 52-2 以红薯淀粉最佳, 在蔗糖中生长好, 但不产酶。

3. 氮源: 基础培养基中加入不同氮源。蛋白胨、酵母膏和  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  各加 1%, 混合使用时各加 0.5%, 用玉米浆时取上清液按 5% 量加入。由表 2 可见, 32-2

菌株在蛋白胨加酵母膏的培养基中产酶活性最高, 52-2 菌株在加玉米浆时产酶活性最高, 说明两菌株要求的产酶因子有所不同, 氮源也有差异。

4. pH: 将菌种接入基础培养基后, 加入  $\text{CaCO}_3$ , 再用无菌  $\text{NaOH}$  或  $\text{H}_2\text{SO}_4$  液调

节到需要的 pH,先用 pH 试纸粗测,最后用 pH 计测出精确 pH 值\*。培养后测定酶活性,得图 2 结果。32-2 和 52-2 菌株最适 pH 各为 8.7 和 9.5 左右。

(二) 酶的性质

1. 酶反应的最适 pH 和 pH 对环状糊精产量的影响: 酶活性测定方法中,各加入不同 pH 的 0.2M 缓冲液,保持不同 pH,测定活性。另取 0.5ml 0.5% 的可溶性淀粉溶液作底物,分别加不同 pH 的 0.2M 缓冲液 0.5ml 和 0.01ml 适当稀释的酶液,在 40℃ 放置 2 小时,加醋酸停止反应,加碘液、定容、比色,以对照作 100% 计算不同 pH 中环状糊精的产率。结果见图 3 和图 4。pH 对两菌株的酶活性的影响大致相似,都是在 pH 低时活性较高, pH4.5—4.8 和 7.7 都出现有反应高峰; 52-2 菌株的酶在 pH10.1 还有一小峰。图 3 和图 4 还表明,酶在过高或过低的 pH 中活性小,环状糊精生成率低。

2. 酶对 pH 的稳定性: 0.01ml 适当稀释的酶液加不同 pH 的 0.1M 缓冲液 0.1ml,在 40℃ 处理 30 分钟,加 pH8.5 的 0.2M 甘氨酸-NaCl-NaOH 缓冲液配制的 0.08% 马铃薯淀粉溶液 0.5ml,按前法测定酶活性。

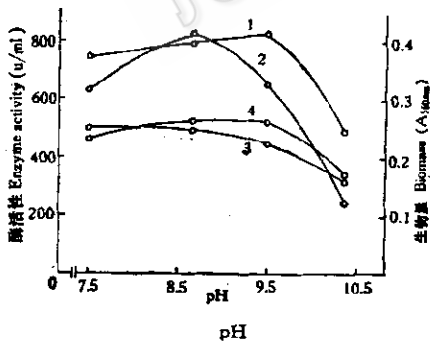


图 2 pH 对产酶的影响

Fig.2 Effect of pH on enzyme production

- 1. 菌株 52-2 酶活性 Enzyme activity of strain 52-2(u/ml)
- 2. 菌株 32-2 酶活性 Enzyme activity of strain 32-2(u/ml)
- 3. 菌株 52-2 生物量 Biomass of strain 52-2
- 4. 菌株 32-2 生物量 Biomass of strain 32-2

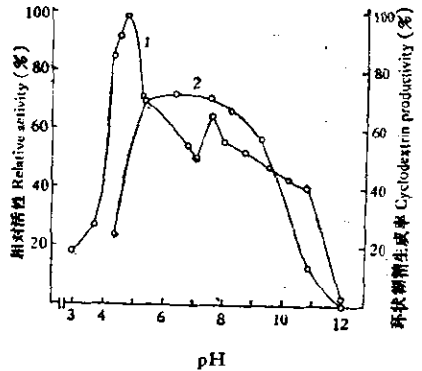


图 3 pH 对菌株 32-2 酶活性的影响

Fig. 3 Effect of pH on enzyme activity from strain 32-2

- 1. 酶活性 Enzyme activity
- 2. 环状糊精生成率 Cyclodextrin productivity (%)
- pH 3.0 Glycin-HCl buffer
- pH 3.75—4.75 NaAc-HCl buffer
- pH 5.6—8.0 Tris-Maleic acid buffer
- pH 8.7—12 Glycin-NaCl-NaOH buffer

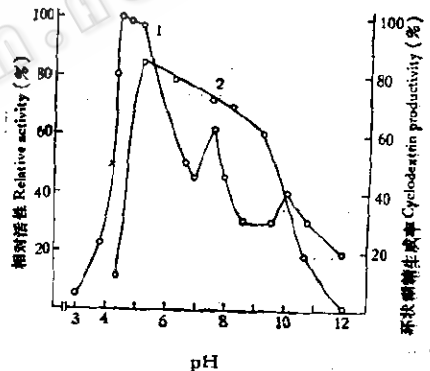


图 4 pH 对菌株 52-2 酶活性的影响

Fig. 4 Effect of pH on enzyme activity from strain 52-2

图例同图 3 The same legend as figure 3

酸-NaCl-NaOH 缓冲液配制的 0.08% 马铃薯淀粉溶液 0.5ml,按前法测定酶活性。图 5 结果指出,酶在 pH5.3—9.5 之间基本稳定,这是处理 30 分钟的情况。又如图 3 和图 4 所示,酶在不同 pH 中处理 120 分钟,其稳定范围大约为 pH5.3—8.5。由此

\* 测 pH 的这瓶不进行培养,按此瓶所加的 NaOH 或 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的量在无菌条件下加到其他瓶中,然后进行培养测定。

表 2 不同氮源对产酶的影响

Table 2 Effects of various nitrogen sources on enzymes production

氮源 Nitrogen source	生物量 Biomass (A) ( $A_{560nm}$ )		酶活性 Enzyme activity (U/ml)	
	菌株 Strain			
	32-2	52-2	32-2	52-2
$(NH_4)_2HPO_4$	0	0	0	0
蛋白胨 Peptone	0.31	0.48	450	0
酵母膏 Yeast extract	0.21	0.20	930	140
蛋白胨+酵母膏 Peptone + yeast extract	0.17	0.24	1110	700
玉米浆 Corn steep liquor	0.31	0.38	720	1070

可见,随着处理时间增加,酶对 pH 的稳定范围将逐渐缩小。此外,52-2 菌株的酶耐 pH 的范围比 32-2 菌株稍大。

3. 温度对酶活性的影响: 在不同温度中测定酶活性的结果见图 6。52-2 菌株在 65℃ 表现最高活性; 32-2 菌株在 65—70℃ 的活性最高。

4. 酶的热稳定性: 将酶液加入含有  $2\mu M CaCl_2$  的 pH8.5 的缓冲液中,在不同温度中处理 10 分钟,然后在 50℃ 分别测定活性,结果见表 3。32-2 菌株的酶在 55℃ 时活性已明显降低; 52-2 菌株在 60℃ 时还保留 90% 的活性。可见菌株 52-2 产的酶的耐热能力大于 32-2 菌株产的酶。

5. 酶对各种淀粉的作用: 取 0.5ml 各

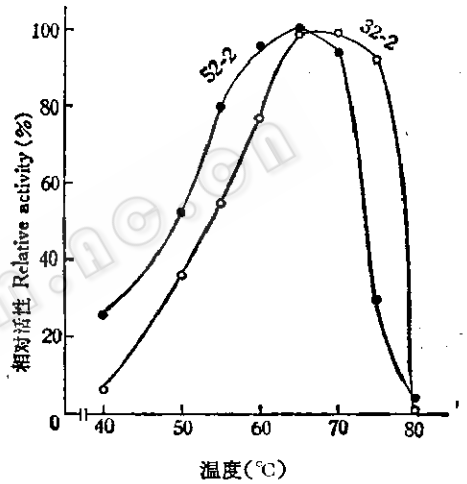


图 6 温度对酶活性的影响

Fig. 6 Effect of temperature on enzyme activity

表 3 酶的热稳定性

Table 3 The stability of enzyme to heating

温度 Temperature (°C)	相对酶活性 Relative activity of enzyme	
	菌株 Strain	
	32-2	52-2
50	100	100
55	73	100
60	70	90
65	52	60
70	0	13
75	0	0
80	0	0

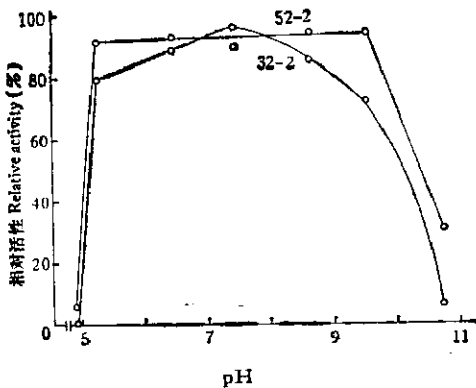


图 5 酶的 pH 稳定性

Fig. 5 The stability of enzyme under different pH

种淀粉溶液,加 0.2M 的 pH8.5 缓冲液 0.5 ml,适当稀释的酶液 0.01ml,在 50℃ 作用 2 小时,经比色测定,结果列入表 4。酶对可溶性淀粉和红薯淀粉作用相近,比其他两种淀粉高,马铃薯淀粉稍次,玉米淀粉最低。52-2 菌株的酶对四种淀粉的作用均大于 32-2 菌株。

表 4 酶对不同淀粉的作用结果

Table 4 Hydrolysis of the enzyme on different sources of starch

淀粉种类 Starch	水解率 Hydrlysis (%)	
	菌株 Strain	
	32-2	52-2
玉米 Corn	63.5	77.3
马铃薯 Potato	65.5	85.9
红薯 Sweet potato	74.2	89.7
可溶性淀粉 Soluble starch	76.9	88.9

### (三) 酶作用产物的分析

将 2% 的马铃薯淀粉溶液调 pH 至 8.5,加酶液 10%,在 40℃ 作用 24 小时,然后离心,取上清液进行纸层析。展开剂用 65% 的正丙醇,下行展开。显色用 0.2% 的碘丙酮溶液,显色后, $\alpha$ -环状糊精斑点为蓝紫色, $\beta$ -型为黄色, $\gamma$ -型为黄褐色,与试剂样品相同(见图 7)。按常法进行硅胶薄层(层析聚酰胺薄膜)和微晶纤维薄层层析并显色后,结果相同(图略)。

取酶作用液二滴置载玻片上,滴加稀碘液一滴,风干后在显微镜下观察,可见大量  $\beta$ -和  $\gamma$ -环状糊精碘复合物方片状结晶;52-2 菌株样品中有少量蓝色六角形和针状的  $\alpha$ -环状糊精碘复合物结晶,32-2 菌株样品中较少见到。

作用液脱色,过滤,浓缩,在冰箱中放置后,可析出边长达 3mm 的近正方体的  $\beta$ -环状糊精结晶。

$\beta$ -环状糊精结晶再提纯,得到纯  $\beta$ -环状糊精产物。产物测定旋光度为  $[\alpha]_D^{25}$

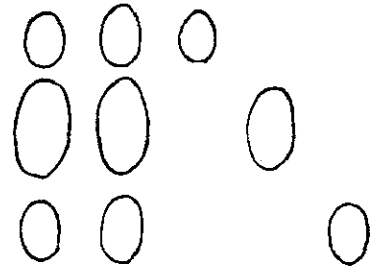


图 7 酶反应产物环状糊精的纸层析图谱

Fig. 7 Paper chromatogram of produced cyclodextrin

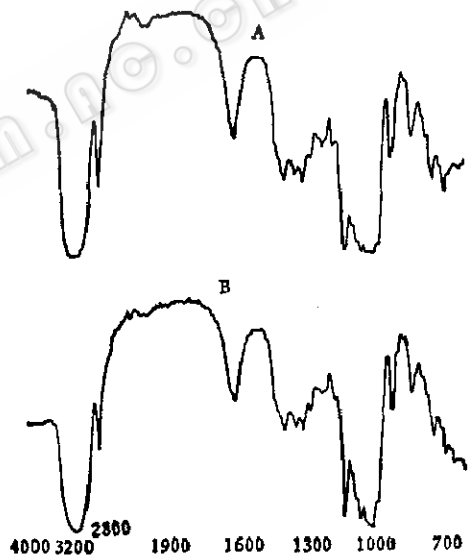


图 8  $\beta$ -环状糊精的红外吸收光谱

Fig. 8 IR spectrum of  $\beta$ -cyclodextrin

A. 菌株 52-2 酶产物 Product by enzyme from strain 52-2

B. 林原试剂 Reagent from Hayashibara Biochem. Lab. Inc.

(水) = 160.2° (二次平均值)。林原生化研究所试剂产品的旋光度为 160.2°。

测定纯  $\beta$ -环状糊精产物的红外吸收光谱,同林原生化研究所的试剂比较,图谱

相同(见图8);同Sigma的试剂比较也相同(图略)。

将纸层析斑点剪下,溶入水中,以蒽酮法定量,初步测得各个环状糊精的产量比为 $\alpha:\beta:\gamma = 1:7.4:1.7$ ;百分比为9.9:73.2:16.8%。32-2和52-2菌株测定结果基本一致。纸层析定量方法比较粗放,容易受低聚糖和直链糊精干扰,尚待其他方法测定确切比例。

以上各项鉴定证明,两个菌株的酶都能转化淀粉成三种环状糊精,产量以 $\beta$ -型最大,其次为 $\gamma$ -型, $\alpha$ -型最少。

## 讨 论

嗜碱无芽孢的杆菌是迄今尚未见报道的环状糊精葡萄糖基转移酶产生细菌。代表株52-2号的产酶条件和酶的性质与

Horikoshi等的嗜碱芽孢杆菌比较,在碳源、氮源方面有所不同;酶的性质大致相近,淀粉利用率、耐热能力和pH稳定性稍优于芽孢杆菌。缺点是产酶时间稍迟。此外,两菌株的酶在反应中产生的环状糊精的种类和比例十分近似,我们认为,嗜碱无芽孢的杆菌同样适用于环状糊精的工业生产。这类细菌的发现,必将扩大优良生产菌种的选育范围。

## 参 考 文 献

- [1] 小林昭一, 貝沼圭二: 发酵と工业, 36: 176, 1978.
- [2] Nakamura M. & K. Horikoshi: *Agric. Biol. Chem.*, 40: 735, 1976.
- [3] Horikoshi K. et al.: U. S. Patent, 4, 135, 977, 1979.
- [4] French D.: *Advance carbohydrate chemistry*, 12: 189, 1957.
- [5] French D. et al.: *Die Stärke*, 15: 280, 1963.

# STUDIES ON THE CONDITIONS FOR CYCLODEXTRIN-GLUCOSYL TRANSFERASE PRODUCTION BY TWO TYPES OF ALKALIPHILIC BACTERIA AND FOR ENZYMIC REACTION

Dan Jialin Wang Shizhu Xu Guanzu Xu Chunxi

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Cyclodextrin-glucosyl-transferase was produced by two types of alkaliphilic bacteria, a strain of spore-forming bacteria and a strain of non-spore-forming bacteria. Yeast extract and corn steep liquor were the best nutrients for enzyme production by the strains of spore-forming and non-spore forming bacteria respectively. The suitable carbon and nitrogen sources for enzyme production were confirmed. There was no signi-

ficant difference in the conditions for enzymic reaction in these two cultures. Beta-cyclodextrin was the main product of the enzyme reaction. The discovery of cyclodextrin-glucosyl-transferase produced by non-spore-forming bacteria enlarged the scope for searching this enzyme.

### Key words

Cyclodextrin-glucosyl-transferase; Alkaliphilic bacteria