

软腐芽孢杆菌 D20 产环糊精葡萄糖基转移酶的条件和酶性质

淡家林 徐纯锡 任永娥

(中国科学院微生物研究所, 北京)

软腐芽孢杆菌 (*Bacillus macerans*) D20 菌株在适宜培养基中产大量环糊精葡萄糖基转移酶。玉米淀粉、硫酸铵和麦麸是适合的营养物质。酶反应最适 pH 为 5.5, 温度为 50°C, 酶用量为 500U/g 以上。 α -、 β -和 γ -CD 产量比约为 61:32:7。据此, 作者认为, 该菌株可用于环糊精生产工业。

关键词 软腐芽孢杆菌; 环状糊精; 环糊精葡萄糖基转移酶

作者等于 1950 年分离到一批有明显产环糊精葡萄糖基转移酶能力的软腐芽孢杆菌 (*Bacillus macerans*)^[1], 这些菌株在微生物所保藏室保存 36 年以后, 产酶活力仍高, 证明它们的产酶能力可以长期保持。这类菌株所产的酶作用于淀粉, 生成以 α -为主的环糊精 (以下简称 CD), 不同于产 β -CD 为主的嗜碱杆菌^[2], 是另一类型的产酶细菌。这类细菌所产酶的性质前人已有报道^[3-5]。本文报道菌株中产酶能力较强的 D20 菌株的产酶条件和酶性质。

材料和方法

(一) 酶的制备

基础培养基用玉米淀粉为碳源, 硫酸铵为氮源, 麦麸为其它营养物质, 碳酸钙为中和剂。

摇瓶发酵: 250 ml 三角瓶装液 50 ml, 接入种液 1 ml, 每样重复 4 份。37°C 旋转摇床培养发酵 4 日, 离心取上清液, 加 3 倍体积的丙酮沉淀酶, 风干成酶粉。酶粉糊精化活力为 160,000 U/g。

罐发酵: 用 16L 自控自记发酵罐, 装液 10L, 加豆油 15ml 作消泡剂, 灭菌后接入摇瓶种液 0.5L, 37°C 保温, 通气 10L/min, 罐压 1kg/cm², 300r/min 搅拌, 不控制 pH 进行发酵。发酵完毕, 离心去细胞, 加入变性淀粉 3—4g/100ml, 7°C 搅拌 10 小时吸附酶, 静止沉淀淀粉, 抽滤, 室温风干

成酶粉。酶粉糊精化活力为 80,000U/g。

(二) 酶活力测定

按 Horikoshi 等修改的 Fuwa 法^[6]进行测定, 改用 pH5.5、0.2mol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲液。

(三) 环糊精分析

1. 定性: 酶反应液用纸层析和薄层层析分开产物, 与标准试剂对照鉴定, 显微镜下观察环糊精-碘复合物结晶和呈色反应。按 French 法^[7]进行有机溶剂沉淀试验。

2. 定量: (1) 化学分析: 蒽酮-硫酸法^[8]测酶反应液总糖; 小林等法^[9]测总 CD; Vikmon 法^[10]测 β -CD; Kato 等法^[11]测 γ -CD; 总 CD 减去 β -和 γ -CD 为 α -CD。 δ -CD 以上产量微小, 未计。(2) 高压液相层析分析: 用 Waters 公司高压液相层析仪。分析条件为, 层析柱: carbohydrate analysis; 检测仪: RI 4x; 流动相: CH₃CN:H₂O=65:35; 流速: 1.7ml/min; 温度: 25°C。

(四) 试剂

α -、 β -和 γ -CD 来自日本林原生化研究所和美国 Sigma 公司, β -CD 还来自日本和光纯药株式会社, β -和 γ -CD 还来自作者自制产品。纯葡萄糖淀粉酶用作者筛选的根霉 (*Rhizopus* s.p.) 制取, 含酶活力 9,000U/g。其他试剂和材料均为国产。

本文于 1980 年 10 月 10 日收到。

微生物所中试厂协助罐发酵试验, 吴诚华同志代作高压液相层析分析, 特此致谢。

结果和讨论

(一) 产酶条件

1. 碳源的影响: 用 3% 的不同淀粉原

料作碳源进行发酵试验, 发酵后测酶活力。(表 1)。玉米粉、大米粉、甘薯粉和玉米淀粉都是适合的碳源。碳源浓度, 以玉米淀粉为例, 10—30g/L 均适合(表 2)。

表 1 不同碳源对产环糊精葡萄糖基转移酶的影响

Table 1 Effect of various carbon source on cyclodextrin glucosyl-transferase production

碳源 Carbon source	酶活力 Enzyme activity (U/ml)
无 None	1,080
大米粉 Rice powder	3,460
玉米粉 Corn powder	3,330
玉米淀粉 Corn starch	3,650
甘薯粉 Sweet potato powder	3,410
鲜马铃薯 Fresh potato	0

表 2 碳源浓度对产环糊精葡萄糖基转移酶的影响

Table 2 Effect of the concentration of carbon source on cyclodextrin glucosyl-transferase production

玉米淀粉浓度 Conc. of corn starch (g/L)	酶活力 Enzyme activity (U/ml)
0	1,340
10	3,360
20	3,090
30	3,450
40	2,330

表 3 不同氮源对产环糊精葡萄糖基转移酶的影响

Table 3 Effect of various nitrogen source on cyclodextrin glucosyl-transferase production

氮源 Nitrogen source		酶活力 Enzyme activity (U/mL)
种类 Kind	用量 Amount(g/L)	
无 None	0	1,350
硫酸铵 Ammonium sulfate	10	3,030
蛋白胨 Peptone	10	1,760
尿素 Urea	5	0
豆饼 Soya bean cake	10	0

2. 氮源的影响: 用不同的含氮物质作为氮源进行发酵, 结果见表 3。硫酸铵是最适宜的氮源, 浓度以 2.5—5.0g/L 为好(表 4)。

3. 辅助营养物质: 加用不同辅助营养物质进行发酵, 结果见表 5。麦麸效果最

好, 再添加酵母膏, 效果不显著。麦麸最适用量为 30g/L(表 6), 发酵后液体的 pH 为 6.0。在此麦麸用量下, 碳酸钙有可能使发酵液保持产酶最适的 pH。

4. 无机物: 表 7 为加不同无机物发酵的结果。碳酸钙对于保持适合产酶的 pH

表 4 氮源浓度对产环糊精葡萄糖基转移酶的影响
 Table 4 Effect of the concentration of nitrogen source on cyclodextrin glucosyl-transferase production

(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	酶活力 Enzyme activity (U/ml)
0	0
2.5	2,470
5.0	2,480
7.5	1,830
10.5	1,320

表 5 不同营养物质对产环糊精葡萄糖基转移酶的影响
 Table 5 Effect of various nutrients on cyclodextrin glucosyl-trasferase production

营养物质 Nutrients		酶活力 Enzyme activity (U/ml)
种类 Kind	用量 Amount(g/L)	
无 None	0	0
麦麸 Wheat bran +酵母膏 Yeast ext.	30 +5	2,920
麦麸 Wheat bran 酵母膏 Yeast ext.	30 5	2,880 790
米糠 Rice bran	30	1,570
麦芽 Malt	30	360
玉米浆 Corn steep liquor	30	130

表 6 麦麸用量对产环糊精葡萄糖基转移酶的影响
 Table 6 Effect of the amount of wheat bran on cyclodextrin glucosyl-transferase production

麦麸 Wheat bran (g/L)	终 pH Final pH	酶活力 Enzyme activity (U/ml)
0	7.5	0
5	7.0	1,220
10	5.0	2,410
20	6.0—6.5	3,250
30	6.0	4,360
40	6.0	3,390
50	5.0	2,815

很有必要。使用碳酸钙再添加镁离子不影响终 pH,可能有助于酶的增产。单独用镁盐,既不能保持产酶 pH,又严重影响产酶。添加钾和磷酸根离子不利于产酶,铁有严重影响。显然,控制发酵液的 pH 在 6.0 左右是产酶的重要因素之一。

5. 油脂: 表 8 显示,用花生油和菜子油作发酵中的消泡剂稍有不利,吐温 80

(单油酸聚氧乙烯山梨醇)不影响产酶,豆油效果较好。

6. 产酶过程: 罐发酵中,溶解氧的消耗量反映细胞的呼吸强度和增殖旺盛程度。图 1 显示,最大量的溶氧消耗在接种后 30—42 小时之间开始产酶,以后溶氧的消耗逐渐减少,直到接近停止,酶活力直线增加,84 小时达最大量。种液细胞健壮,

表 7 无机物对产环糊精葡萄糖基转移酶的影响

Table 7 Effect of inorganic substances on cyclodextrin glucosyl-transferase production

无机物 Inorganic substances		终 pH Final pH	酶活力 Enzyme activity (U/ml)
种类 Kind	用量 Amount(g/L)		
无 None	0	5.0	170
CaCO ₃	5	6.0	2,980
CaCO ₃	10	6.5	3,060
CaCO ₃ + MgSO ₄ · 7H ₂ O	5+12	6.5	3,400
CaCO ₃ + K ₂ HPO ₄	5+5	5.0	2,100
4MgCO ₃ · Mg(OH) ₂	5	5.0	522
铁屑 Iron filings	20		980

表 8 油脂对产环糊精葡萄糖基转移酶的影响

Table 8 Effect of oil on cyclodextrin glucosyl-transferase production

油脂 Oil		酶活力 Enzyme activity (U/ml)
种类 Kind	用量 Amount (g/L)	
无 None	0	3,240
豆油 Soyabean oil	1.5	3,460
吐温 Tween 80	1.0	3,110
花生油 Peanut oil	1.5	2,800
菜子油 Rape seed oil	1.5	2,820

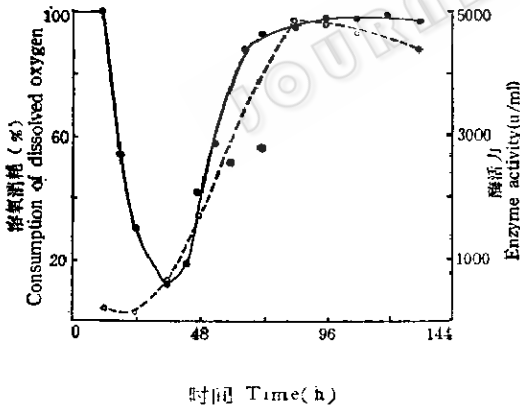


图 1 发酵产酶过程

Fig. 1 The course of cyclodextrin glucosyl-transferase production in fermentation
 ○---○酶活力 Enzyme activity; - - - - 溶氧消耗 Consumption of dissolved oxygen

溶氧最大消耗时间可提早 12 小时,但产酶时间未明显提前。无论溶氧消耗时间是否提早,发酵至 60 小时,产酶均在 2,500U/ml 以上,84 小时达最大产量(图略)。

根据以上各项试验,产酶的最适培养

基为 (g/L): 玉米淀粉 30, 硫酸铵 2.5—5.0, 麦麸 30, 碳酸钙 5。发酵中用豆油作消泡剂最适。发酵液应不含铁离子。产酶最大量时间约为 3.5 日。

(二) 酶性质

1. pH 对酶活力和稳定性的影响: 将不同 pH 的缓冲液分别保持在 40° 和 50°C 测定酶活力(图 2), 在 pH5.5 左右酶活力最高。温度 50°C 时 pH7.0 以上只表现约 30% 的酶活力。将 0.01ml 酶液置于不同 pH 的 0.2mol/L 缓冲液中, 40°C 放置 30 分钟, 再加 0.4mol/L 的 pH5.5 缓冲液调至 pH5.5, 加淀粉溶液测酶活力(图 3), 酶在 pH8.0—10.0 的缓冲液中最稳定。

2. 温度对酶活力和稳定性的影响: 在不同温度下测酶活力, 结果见图 4。最高酶活力表现在 50—60°C 之间。酶在 pH5.5 缓冲液中加钙离子 5mol/L, 在不同温度下加热 30 分钟, 按常法测酶活力(图 5)。

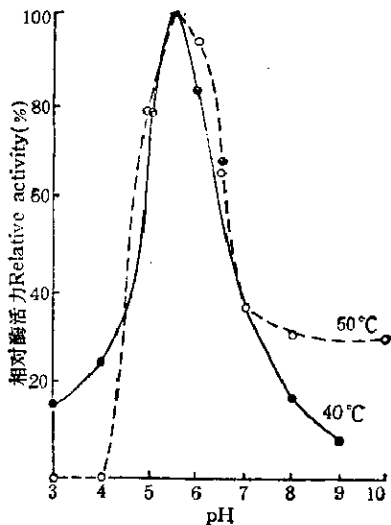


图2 pH对环糊精葡糖基转移酶活力的影响
 Fig. 2 Effect of pH on enzyme activity
 缓冲液: pH3.0—8.0 柠檬酸-柠檬酸钠
 pH9.0—13.0 甘氨酸-NaOH-NaCl
 Buffer: pH 3.0—8.0 Citric acid-Na citrate
 pH 9.0—13.0 glycine-NaOH-NaCl

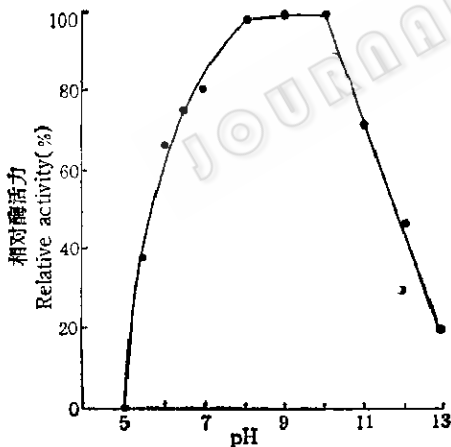


图3 环糊精葡糖基转移酶对 pH 的稳定性
 Fig. 3 The stability of enzyme under different pH value

50°C 以下加热 30 分钟,酶完全稳定。50°C 以上开始失活,60°C 完全失活。

3. 金属离子的影响: 各金属离子的硫酸盐 (Ca²⁺ 为 Cl⁻ 盐) 配成适当浓度,取 0.1ml 加到按常法测定酶活力的反应体系

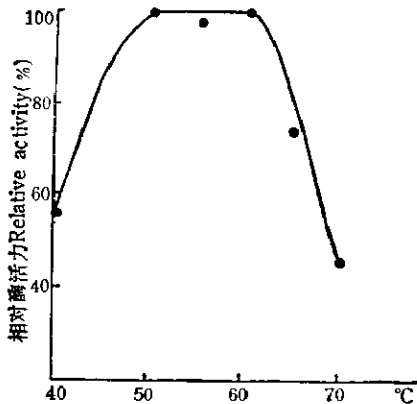


图4 温度对环糊精葡糖基转移酶活力的影响
 Fig. 4 Effect of temperature on enzyme activity

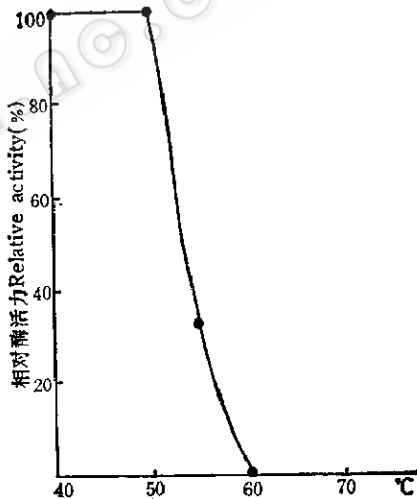


图5 环糊精葡糖基转移酶的热稳定性
 Fig. 5 The thermostability of enzyme

中,使达到表列的最后浓度,测酶活力(表9)。所试几种金属离子只有 Fe³⁺ 影响显著,不仅抑制产酶,也严重降低酶的活力。

4. 酶对不同淀粉原料的利用: 称取烘干淀粉原料 0.21g, 在 10ml 水中充分糊化,加酶液 0.01ml, 50°C 静止反应 18 小时,离心,取上清液 5ml, 加三氯乙烯 0.5ml, 剧烈振荡 2 分钟,离心去上清液, 100—105°C 烘 4 小时,称重,结果见表 10。

表 9 金属离子对环糊精葡萄糖基转移酶活力的影响
Table 9 Effect of metallic ions on enzyme activity

金属离子 Metal ion	浓度 Conc. (mol/L)	酶活力 Enzyme activity (U/ml)
Ca ²⁺	20 × 10 ⁻³	1,590
Mn ²⁺	1 × 10 ⁻³	1,540
Mg ²⁺	5 × 10 ⁻³	1,680
Fe ³⁺	1 × 10 ⁻³	970
Fe ²⁺	5 × 10 ⁻³	620
无 None	0	1,630

表 10 不同淀粉产环糊精的比较
Table 10 The production of CD from various starch

淀粉种类 Kind of starch	原料含淀粉 Content of starch in raw material (g/100g)	反应液淀粉浓度 Starch conc. in reaction solution (g/100ml)	总 CD 产量 Total CD yield (%)
马铃薯淀粉 Potato starch	81.23	1.71	40.75
甘薯淀粉 Sweet potato starch	86.40	1.81	42.57
玉米淀粉 Corn starch	81.33	1.71	41.07
米粉 Rice powder	75.75	1.59	36.38

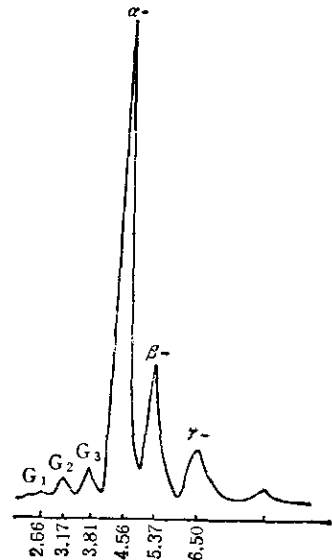
大米淀粉利用稍差, 其他三种淀粉效果相近。

5. 反应用酶量: 马铃薯淀粉 3.17g/100ml 的悬液 10ml, 糊化, 加入含不同酶量的酶液 0.01ml, 50℃ 反应 18 小时, 测 CD 产量。在此反应条件下, 每克淀粉需酶 500 单位以上。酶用量增多, 产量未见增加。

根据以上各项试验, 酶反应最适条件为: pH5.5 左右, 温度 50℃, 底物可用马铃薯淀粉、玉米淀粉、甘薯淀粉, 酶用量应在 500U/g 以上, 反应液应不含铁离子。

(三) 酶反应产物分析

1. 定性: 滤纸和微晶纤维薄层点样, 用 65% 正丙醇溶液展开, 0.2% 碘丙酮溶液显色, 分别显出紫色 α -CD、黄色 β -CD 和橘黄色 γ -CD 碘复合物斑点。碘复合物在显微镜下可见六角形紫色 α -CD-碘复合物结晶及黄色方片状 β -和 γ -CD-碘复合物结晶。反应液加三氯乙烯或四氯化碳振



保留时间 Retention time (min)

图 6 环糊精葡萄糖基转移酶反应产物
高压液相层析图谱

Fig. 6 HPLC chromatography of the products by the reaction of cyclodextrin glucosyl-transferase

G₁, G₂, G₃: 分别为葡萄糖 glucose, 麦芽糖 maltose, 麦芽三糖 maltotriose

α -, β -, γ -: α -CD, β -CD, γ -CD

表 11 α -、 β -和 γ -CD 产量比
Table 12 Ratio of α -、 β - and γ -CD in the product of enzyme reaction

	化学分析 Chemical analysis (%)	高压液相层析分析 HPLC analysis (%)
总 CD	100.00	100.00
α -CD	59.76	61.68
β -CD	31.40	32.02
γ -CD	8.86	6.30

荡,均得白色沉淀。

2. 定量: 3g/100ml 马铃薯淀粉糊化液 50ml, 加酶 600U/g, 50℃ 静止反应 24 小时, 100℃ 灭酶活性, 定量分析产物得表 11 结果。高压液相层析图谱见图 6。

参 考 文 献

- [1] 淡家林等: 黄海, 发酵与菌学特辑, 11(4-5): 105-1113, 1950; 12(2): 29-38, 1951。
[2] 淡家林等: 微生物学报, 24(1): 80-85, 1984; 25(1): 7-12, 1985。
[3] Kitaitata, S. et al.: *Agr Biol. Chem.*, 38: 378-

- 395, 1974。
[4] Kabayashi, S. et al.: *Carbohydr. Res.*, 61: 229-238, 1978。
[5] Stavn, A. et al.: *Carbohydr. Res.*, 75: 243-250, 1979。
[6] Horikoshi, K. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 40: 735, 1976。
[7] French, D. et al.: *Die Stärke*, 15: 280, 1963。
[8] Helbert, J. et al.: *Anal. Chem.*, 28: 1098, 1956。
[9] 小林昭一等: 淀粉科学, 21: 131-137, 1974。
[10] Vikman, M.: *Ist Int. Symp. Cyclodextrin, Budapest* (ed. Szejtli, J.), D. Reidel Pub. Co., Dordrecht, Holland, p. 68-74, 1982。
[11] Kato, T. et al.: *Anal. Chem.*, 56: 1738-1746, 1984。

STUDIES ON THE CONDITIONS OF CYCLODEXTRIN GLUCOSYL-TRANSFERASE PRODUCTION AND ENZYME PROPERTIES OF *BACILLUS MACERANS* D20

Dan Jialin Xu Chunxi Ren Yonge

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The studies on the conditions of enzyme production and the properties of enzymatic reaction, We have proved that the strain *Bacillus macerans* D20 can produce much cyclodextrin glucosyl-transferase in suitable medium, and it is a usefull culture in the in-

dustrial production of cyclodextrins.

Key words

Bacillus macerans; Cyclodextrin; Cyclodextrin glycosyl-transferase