

产碱菌外切异麦芽三糖水解酶的产生和性质

程秀兰 凌 嵩* 杨 敬 张树政

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 从污染的右旋糖酐溶液中分离出一株外切异麦芽三糖水解酶(Exo isomaltotriohydrolase, 1,6- α -D-Glucan isomaltotriohydrolase EC 3.2.1.95)产生菌,经鉴定为产碱菌(*Alcaligenes* sp.)。研究了酶的产生条件和基本性质。产酶最适培养基组成(%):右旋糖酐 1.5、鱼粉蛋白胨 1、酵母抽提物 0.1、牛肉膏 0.3、甲醇 2, pH 8.0, 250ml 三角瓶中装 20ml 培养基,于 26°C 200r/min 旋转摇床上振荡培养 48 小时。酶的最适作用温度和 pH 分别为 50°C 和 pH 6.5-7.5,在 pH 5.0-10.6 范围内稳定。在 40°C 保温 24 小时酶活力基本不变,50°C 保温 8 小时剩余酶活力为 71.8%,保温 24 小时剩余酶活力为 44.2%,在 55°C 酶活力的半寿期为 10 小时。金属离子 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 对酶强烈抑制,水解右旋糖酐的终产物为异麦芽三糖,酶的作用方式为外切型。

关键词 产碱菌,异麦芽三糖水解酶,产生条件和性质

右旋糖酐酶在微生物中分布很广,主要是真菌,也存在于细菌、放线菌中。国外关于真菌右旋糖酐酶的报道很多,如青霉(*Penicillium*)^[1-2]、曲霉(*Aspergillus*)^[3]、穗霉(*Spi曲霉*)^[4]、毛壳霉(*Chaetomium*)^[5]、镰孢霉(*Fusarium*)^[6]等的右旋糖酐酶。我们也报道过真菌右旋糖酐酶产生菌的筛选^[7]、淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)右旋糖酐酶的形成^[8]、焦曲霉(*Aspergillus ustus*)右旋糖酐酶的提纯和性质等^[9]。细菌右旋糖酐酶报道的比较少,如拟杆菌(*Bacteroides*)^[10]、乳杆菌(*Lactobacillus*)^[11]、链球菌(*Streptococcus*)^[12]和短杆菌(*Brevibacterium*)^[13]等的右旋糖酐酶。研究最多最深入的是真菌右旋糖酐酶,如绳状青霉(*Pen. funifoliosum*)^[14]和细丽毛壳霉(*Chaetomium gracile*)^[5]等的右旋糖酐酶。已报道的所有真菌右旋糖酐酶几乎都是内切型的,细菌酶仅有 Sugiura 等人报道的褐色短杆菌(*Brevibacterium fuscum*)^[13]酶是产生异麦芽三糖的外切型右旋糖酐酶,尚未见其它报道。此外,这些酶仅 Yamaguchi^[15]等人报道的短杆菌酶最适作用 pH 为 8.0,其余的右旋糖酐酶的最适作用 pH 都在 4.0-6.5 之间^[4]。

我们从污染的右旋糖酐溶液中分离得到了一株产碱菌,是未见报道的异麦芽三糖水解酶产生菌,其酶的最适作用 pH 为 6.5-7.5,在 pH 5.0-10.6 稳定,水解右旋糖酐的终产物只有异麦芽三糖,这是非常罕见的外切型右旋糖酐酶(1,6- α -D-Glucan isomaltotriohydrolase)。

本文报道酶的产生条件和基本的酶学性质。

* 山东大学生物系生物化学专业 1991 年毕业生。

本文于 1992 年 7 月 24 日收到。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养基

1.1.1 菌种:产碱菌(*Alcaligenes* sp.),从污染的右旋糖酐溶液中分离得到的,由微生物研究所细菌研究室周惠玲先生鉴定。

1.1.2 培养基:(1)牛肉汁斜面培养基(%):牛肉汁补加蛋白胨 1、NaCl 0.5、琼脂 1.5, pH7.0。(2)发酵基础培养基(%):牛肉汁补加右旋糖酐 1.0、鱼粉蛋白胨 1.0、酵母提取物 0.1、 K_2HPO_4 0.1、 KH_2PO_4 0.1、 $MgSO_4$ 0.1, pH8.0, $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$ 灭菌 30 分钟。

1.1.3 培养方法:将菌种接入牛肉汁斜面,于 28℃ 培养 24 小时便可使用。液体培养:将菌龄为 12—20 小时的种子液按 2% 的接种量接入装有 30ml 培养基的三角瓶中,于 30℃ 200r/min 摇床上振荡培养 3 天。

1.2 主要生化试剂

分子量为 7 万的右旋糖酐(天津空军总院药厂),右旋糖酐 T-2000(Pharmacia)、异麦芽糖和异麦芽三糖(Sigma)。

1.3 主要分析方法

1.3.1 酶活力测定:用 Somogyi-Nelson 测还原糖法,见文献[7]。酶活力单位:在 50℃ pH7.0 条件下,每分钟产生 $1\mu\text{mol}$ 还原糖所需的酶量为 1 个酶活力单位。

1.3.2 酶解产物分析:用硅胶薄层色谱法^[16]。展开剂为正丁醇:乙酸:水=3:3:2 (v/v),显色剂是 1.6g 邻苯二甲酸溶于 100ml 水饱和的正丁醇溶液中,加 0.9ml 苯胺。

1.3.3 总糖的测定:采用蒽酮法^[17]。1ml 酶液加 2ml 蒽酮试剂,于沸水浴中煮沸 15 分钟,用 721 型分光光度计在 620nm 处比色测定吸光度(A)值,再根据标准曲线,计算总糖的量。

2 结果和讨论

2.1 酶的产生条件

2.1.1 培养基初始 pH 对产酶的影响:用 2mol/L HCl 和 NaOH 将基础培养基调至不同 pH,灭菌后按 2% 接入培养 20 小时的种子液,30℃ 培养 3 天,培养液离心除菌体,测定上清液中的酶活力(图 1)。

pH8.0 时酶活力最高,pH7.0 以下 9.0 以上酶活力下降。培养基起始 pH8.0 左右为适宜。

2.1.2 不同碳源对产酶的影响:用各种碳水化合物代替基础培养基中的右旋糖酐,浓度为 1%,调至 pH8.0,接种培养后测定培养上清液的酶活力,同时分别以各自的钝化了的酶液作为对照。在试验的 12 种碳水化合物中,右旋糖酐能诱导酶的大量形成,发酵液酶活力为 8.9u/ml,用环状糊精为碳源时酶活力为 0.27u/ml,蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、可溶性淀粉、果糖、玉米淀粉、半乳糖、棉籽糖、山梨糖为碳源时均不产生异麦芽三糖酶。这与文献报道的绝大多数右旋糖酐酶是诱导酶的结果是一致的。右旋糖酐的浓度以 1.5% 为最佳。

2.1.3 不同氮源对产酶的影响:在含有 0.1% 的酵母提取物的基础培养基中添加各种氮

源,除玉米浆的浓度为2%外,其它氮源浓度均为1%,灭菌前用2mol/L NaOH和HCl分别调至pH8.0,接种培养后测定酶活力(表1)。结果表明,用有机氮源的都比用无机氮源的酶活力高,其中鱼粉蛋白胨为氮源时酶活力最高,大豆蛋白胨次之。

表1 不同氮源对产酶的影响

Table 1 Effect of different nitrogen sources

on enzyme formation

氮源 Nitrogen source	酶活力 Enzyme activity (units/ml)
鱼粉蛋白胨 Fish peptone	11.3
大豆蛋白胨 Soy bean peptone	10.8
血胨 Blood peptone	10.7
酪蛋白 Casein	10.0
胰蛋白胨 Tryptone	8.9
牛肉膏 Beef extract	8.7
聚肽 polypeptone	8.5
玉米浆 Corn steep liquor	7.4
NaNO ₃	6.0
NH ₄ NO ₃	4.3
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.3

2.1.4 培养温度对产酶的影响:在L型试管中分别加入3ml培养基,灭菌后接入种子液,在15—35℃的梯度摇床上培养3天,测定酶活力(图2)。在25—28℃之间,酶活力都比较高。培养温度以26℃左右为适。

2.1.5 通气量对产酶的影响:在250ml三角瓶中分别加入10、20、30、40、60、80、100ml培养基,接种培养后,分别加水到原来的体积,测定上清液中的酶活力。结果表明,在250ml三角瓶中加入20ml培养基的酶活力最高,装30ml的次之,说明在适当的条件下加大通气量能促进酶的产生。

2.1.6 金属离子对产酶的影响:在培养基中分别加入不同的金属离子(终浓度为0.005%),培养后测定酶活力,以不加金属离子的酶活力为对照。表2结果说明, Ca²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺促进酶的形成, Zn²⁺、Co²⁺和 Cu²⁺抑制酶的形成。因此,可在培养基中加入适量的 Ca²⁺和 Mn²⁺以促进酶的产生。

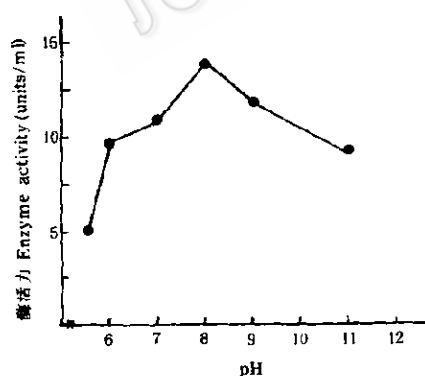


图1 培养基初始 pH 对酶形成的影响

Fig. 1 Effect of initial pH of medium on enzyme formation

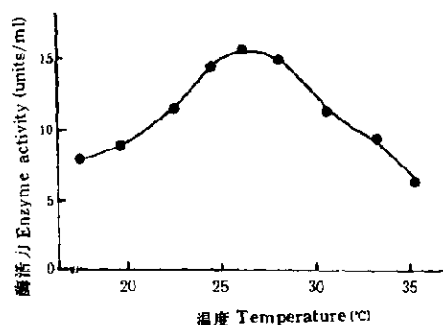


图2 培养温度对产酶的影响

Fig. 2 Effect of temperature on enzyme formation

2.1.7 有机溶剂对产酶的影响:在培养基中加入不同的有机溶剂,灭菌,接入种子液,培养后测定酶活力。表 3 表明,在培养基中加入 2%的甲醇,可使酶产量增加 34%。这一结果与 Yamaguchi 等人研究的乙醇和甲醇能促进短杆菌(*Brevibacterium*)^[15]右旋糖酐酶的产生是很相似的。分析原因,可能是甲醇作为碳源被菌利用,又改善了细胞壁的通透性,使酶容易释放到胞外。

表 3 有机溶剂对产酶的影响

Table 3 Effect of organic solvent on enzyme formation

溶剂 Solvent	浓度 Concn(%)	酶活力 Enzyme activity (units/ml)
对照 Control	None	15.4
甲 醇 Methanol	0.5	16.0
	2.0	20.7
	3.0	18.0
乙 醇 Ethanol	0.5	11.9
	2.0	14.3
	3.0	13.4
丙 酮 Acetone	0.5	10.6
	2.0	15.0
	3.0	16.9
乙酸乙酯 Ethyl Acetate	0.5	13.9
	2.0	11.9
	3.0	12.8
乙酸丁酯 Butyl Acetate	0.5	14.0
	2.0	16.4
	3.0	18.9

表 2 金属离子对产酶的影响

Table 2 Effect of metal ions on enzyme formation

离子 Ion	酶活力 Enzyme activity (units/ml)
对 照 Control	9.80
Ca ²⁺	17.50
Mn ²⁺	14.30
Ni ²⁺	11.08
Fe ²⁺	10.30
Zn ²⁺	4.30
Co ²⁺	3.10
Cu ²⁺	1.80

2.1.8 产酶时间过程:将在 26℃培养 12 小时的种子液按 2%的接种量接入装有 20ml 培养基(pH 8.0)的 250ml 三角瓶中,在相同温度下振荡培养,每 6 小时取样一次,测定酶活力、菌体生长量、残糖和 pH 值。由图 3 看出,在发酵前期,随着菌体的迅速增殖,酶活力不断地增加,培养到 30 小时菌体增殖到最大密度,碳源将耗尽,酶活力很高,继续培养到 72 小时,酶活力不再增加,在整个发酵过程中,pH 值略有上升。因此,以培养 48 小时为宜。

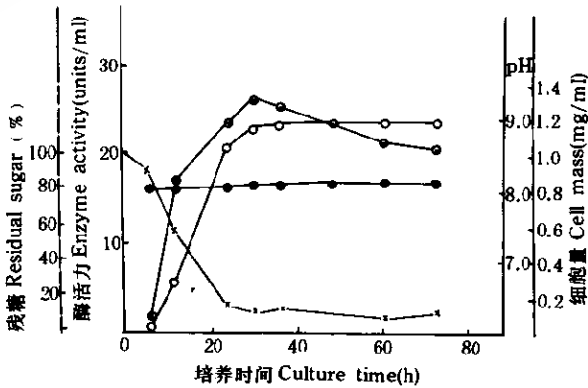


图 3 产碱菌产酶时间过程

Fig. 3 Time course of enzyme production

○—○酶活力 Enzyme activity; ●—● pH;
⊙—⊙细胞量 Cell mass; x—x 残糖 Residual sugar

2.2 酶的基本性质

2.2.1 酶作用最适温度:在不同温度下测定酶活力(图4)。酶作用最适温度为 50—55℃。

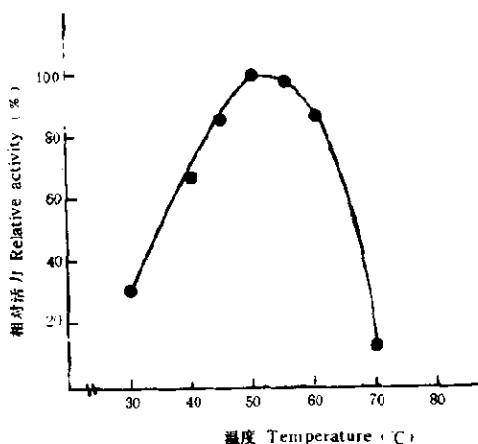


图4 温度对酶活力的影响

Fig. 4 Effect of temperature on enzyme activity

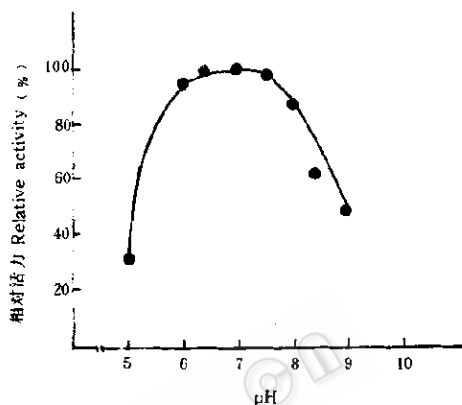


图5 pH对酶活力的影响

Fig. 5 Effect of pH on enzyme activity

2.2.2 酶作用最适 pH: 在 50℃ 0.1mol/L 的不同 pH 下 (pH4.0—7.5 为柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液, pH7.5—9.0 为硼酸缓冲液) 测定酶活力(图5)。酶作用最适 pH 为 6.5—7.5。

2.2.3 酶的 pH 稳定性: 将酶液与 0.1mol/L 不同 pH 的缓冲液 (pH4.0—9.0 同上, pH9.0—10.6 为甘氨酸-NaOH 缓冲液) 一起在 40℃ 保温 30 分钟, 立即置冰水浴中, 调 pH 到 7.0, 再按常规测定酶活力(图6)。该酶在 pH5.0—10.6 范围是稳定的。

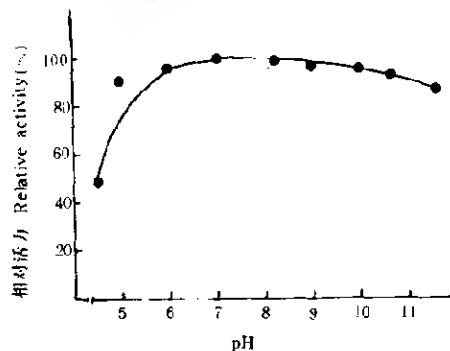


图6 pH对酶稳定性的影响

Fig. 6 Effect of pH on stability of enzyme

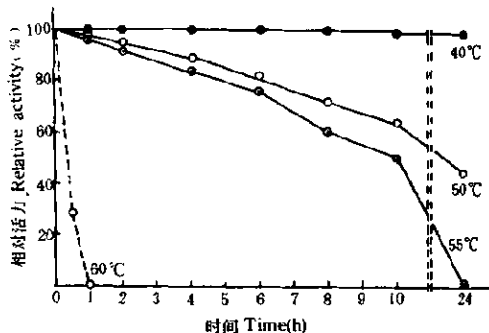


图7 温度对酶稳定性的影响

Fig. 7 Effect of temperature on stability of enzyme

2.2.4 酶的热稳定性: 用 0.2mol/L、pH7.0 的磷酸缓冲液将酶液稀释 1 倍, 分别置 40℃、50℃、55℃ 和 60℃ 保温不同时间, 测定剩余酶活力, 以在最适 pH 条件下来保温的酶液活力为 100%(图7)。在 40℃ 保温 24 小时酶活力基本不变, 在 50℃ 保温 8 小时剩余酶活力

为 71.8%,保温 24 小时剩余酶活力为 44%,在 55℃ 酶的半寿期为 10 小时,60℃ 保温 30 分钟,剩余酶活力为 30%。该酶在 40℃ 以下是稳定的。

2.2.5 化学试剂对酶活性的影响:酶液与试液一起在 40℃ 保温半小时(终浓度为 1.25mol/L, pH7.0),然后测定剩余酶活力,以不加化学试剂的酶液活力为 100%。试验了 18 种离子, Hg^{2+} 对酶完全抑制, Ag^+ 强烈抑制, Cu^{2+} 有较强烈的抑制作用,其它离子对酶活力无明显影响。

2.2.6 酶解产物的分析:将 1ml 酶液(约 25 个单位)和 5ml 5% 的右旋糖酐 T-2000 溶液在 50℃ 反应不同时间,在沸水浴中煮沸 5 分钟终止反应。反应液在硅胶 G 薄层板上进行层析,分析酶解产物。如图 8 所示,从作用 10 分钟到 24 小时,均为单一的异麦芽三糖斑点,只是随着作用时间的延长,异麦芽三糖斑点逐渐增大。这一结果表明该酶的作用方式为外切型,仅与 Sugiura 等人报道的褐色短杆菌(*Brevibacterium fuscum*)^[13] 酶对右旋糖酐的作用方式相同。

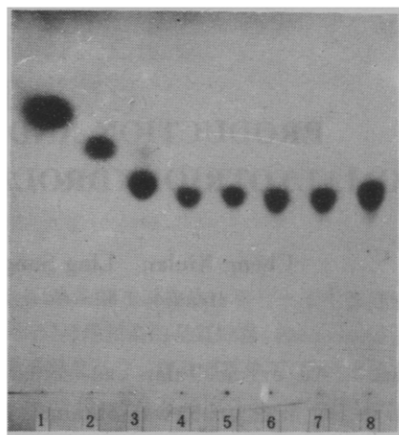


图 8 酶解产物的薄层层析图谱

Fig. 8 TLC pattern of enzymatic products of dextran

1. 葡萄糖 Glucose; 2. 异麦芽糖 Isomaltose;
3. 异麦芽三糖 Isomaltotriose; 4. 10 min;
5. 30 min; 6. 2h; 7. 4h; 8. 24h.

致谢 产碱菌由中国科学院微生物研究所细菌室周惠玲先生鉴定,特此衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] Chalet L et al. *Appl Microbiol*, 1970, **20**(3):421—426.
- [2] Fukumoto J et al. *J Biochem*, 1971, **69**:1113—1121.
- [3] Hiraoka N et al. *J Biochem*, 1972, **71**:57—64.
- [4] 湊貞正. 日本農芸化学会志, 1983, **57**(2):155—166.
- [5] Hattori A et al. *Agr Biol Chem*, 1981, **45**(11):2409—2416.
- [6] Sugiura M et al. *Biochim Biophys Acta*, 1973, **309**:357—362.
- [7] 孙晋武, 程秀兰, 严自正, 等. 微生物学报, 1988, **28**(1):45—55.
- [8] 程秀兰, 孙晋武, 杨 敬, 等. 微生物学报, 1992, **32**(5):334—339.
- [9] 程秀兰, 孙晋武, 王海燕, 等. 微生物学报, 1992, **32**(3):218—226.
- [10] Takahashi N. *Microbiol Immunol*, 1982, **26**(5):375—386.
- [11] Bailey W R et al. *Biochem J*, 1959, **72**(1):49—54.
- [12] Barrett F J et al. *Anal Biochem*, 1986, **158**:365—370.
- [13] Sugiura M et al. *Biochim Biophys Acta*, 1974, **350**:61—70.
- [14] Simonson G L et al. *Appl Microbiol*, 1975, **30**(5):855—861.
- [15] Yamoguchi T et al. *Agr Biol Chem*, 1973, **37**(11):2527—2533.
- [16] 李春荣, 等. 复合多糖生化研究技术, 张惟杰主编. 上海:上海科学出版社, 1987. 65—68.

- [17] Leslie H. Methods of Biochemical Analysis, Glik D ed. New York: Interscience Publishers, INC. 1954. 1:226—229.

PRODUCTION AND PROPERTIES OF EXO-ISOMALTOTRIOHYDROLASE FROM *ALCALIGENES* SP.

Cheng Xiulan Ling Song Yang Jing Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract An extracellular exo-isomaltotriohydrolase (1, 6- α -D-Glucan isomaltotriohydrolase EC 3. 2. 1. 95) was obtained from culture broth of a dextran-degrading microorganism, which had been isolated from contaminated dextran solution and was identified as *Alcaligenes* sp. The formation conditions and some properties of the enzyme were studied. Maximal isomaltotriohydrolase formation was obtained when the strain was aerobically grown at 26°C for 48 h in a medium containing 1. 5% dextran, 1% fish peptone, 0. 1% yeast extract, 0. 3% beef extract, 2% methanol and trace amounts of inorganic salt, pH 8. 0. The enzyme had an optimal pH of 6. 5—7. 5 and an optimal temperature of 50—55°C. The enzyme was quite stable over the range of pH 5. 0—10. 6 and a temperature lower than 40°C. Residual activity was nearly 100% after incubated at 40°C for 24 h. The Half-life of enzyme activity was 10 h at 55°C. The enzyme was inhibited by Hg^{2+} and Ag^{+} . Isomaltotriose was the only digestion product of dextran. The result suggested that the enzyme is an exo-type dextranase, i. e. an isomaltotriohydrolase.

Key words *Alcaligenes* sp. , Exo-isomaltotriohydrolase, Enzyme formation and properties