

# 一种新型淀粉酶的鉴定及其产酶菌株的筛选\*

张应玖<sup>1\*\*</sup> 朱学军<sup>1</sup> 关 键<sup>2</sup> 李吉平<sup>2</sup> 薛 雁<sup>1</sup>

(吉林大学生命科学学院 长春 130023)<sup>1</sup> (解放军军需大学 长春 130062)<sup>2</sup>

**摘要:** 对筛选到的菌株 ZX99 产生的一种新型淀粉酶(异麦芽低聚糖酶)进行了分析鉴定。ZX99 菌株能产生一种胞外淀粉酶, 该酶能催化淀粉的降解产生异麦芽低聚糖。对原产酶菌株 ZX99 多次进行紫外线照射诱变后, 获得了优良、稳定的变异菌株 BS3.232, 其产酶水平为原株的 160%。产物薄层层析证明, 该酶能催化淀粉的降解, 产生异麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖和异麦芽四糖等低聚糖, 但对普鲁兰基本不起作用, 由此证明它是一种不同于新型普鲁兰酶(neopullulanase)和传统淀粉酶(amylase)的一种新型淀粉酶。

**关键词:** 异麦芽低聚糖, 新型淀粉酶, 芽孢杆菌, 筛选

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0038-04

## IDENTIFICATION OF A NEW TYPE OF AMYLASE AND MUTAGENESIS OF STRAIN ZX99 SECRETING THE ENZYME FOR PRODUCTION OF ISOMALTOOLIGOSACCHARIDE

ZHANG Ying-Jiu ZHU Xue-Jun GUAN Jian LI Ji-Ping XUE Yan HAO Li-Ming ZHAO Wen-Bin  
(College of Life Science, Jilin University, Changchun 130023)

**Abstract:** This paper reported a new type of amylase (neoamylase) secreted by a *Bacillus* strain ZX99. The enzyme was a kind of ectoenzyme that could catalyze starch into isomalto-oligosaccharide effectively, but could not act on pullulan as substrate. The strain *Bacillus* ZX99 was mutated by ultraviolet ray and a mutant strain BS3.232 was screened. The activity of the neoamylase produced from BS3.232 increased by 60% over that from ZX99 under the same conditions. The results of thin-layer chromatography of products from starch and pullulan catalyzed by the enzyme demonstrated that the enzyme was different from neopullulanase and can be used to produce isomaltoligosaccharide from starch, including iso-

\* 吉林省自然科学基金资助项目 (No.990545)

\* \* 联系人 E-mail: yingjiu-cn@sina.com

作者还有: 郝黎明<sup>2</sup> 赵文斌<sup>2</sup>

收稿日期: 2001-08-09, 修回日期: 2002-02-25

maltose, panose, isomaltotriose, isomaltotetose.

**Key words:** Isomaltooligosaccharide, Neomylase, *Bacillus*, Screening

随着淀粉工业和食品发酵工业的飞速发展,一些传统的甜味剂对人体的危害已经逐渐被揭示出来,如蔗糖易引起龋齿,过量摄取能导致肥胖、糖尿病、动脉硬化和肠胃病等疾病。因此,在世界性的保健食品热潮中,一类具有蔗糖的甜味和食品加工特性的健康性、功能性甜味剂——新型低聚糖正不断受到人们的青睐,异麦芽低聚糖就是其中的一员,它不但不会引起龋齿,而且对人体肠道内的双歧杆菌有良好的增殖作用。异麦芽低聚糖又称异麦芽寡糖或分枝低聚糖,是一类由葡萄糖连接而成的分子中至少有一个 $\alpha$ -1,6糖苷键、单糖数在2~5不等的一类低聚糖,主要包括异麦芽糖、潘糖(6- $\alpha$ -D-葡萄糖基麦芽糖)、异麦芽三糖、异麦芽四糖等,在自然界中,异麦芽低聚糖只在一些传统的发酵食品中有很少量的分布<sup>[1]</sup>,因此目前世界各国都是采用生物技术,以淀粉等葡聚多糖为原料酶促降解生产异麦芽低聚糖。我国淀粉资源非常丰富,它具有分布广、产量大、价格低廉、生产不受季节的限制等特点,因此以淀粉为原料生产异麦芽低聚糖是一条可行的途径。我们在进行多糖的酶促转化的研究中筛选出一株芽孢杆菌,发现它在一定的条件下能产生一种新型的淀粉酶,该酶能催化淀粉降解产生异麦芽低聚糖。本文对该酶进行了初步的分析鉴定,为该酶的进一步研究和应用奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及培养基<sup>[2]</sup>

芽孢杆菌(*Bacillus*) ZX99,为本研究组保存。

所用培养基为:(1)牛肉汤培养基:新鲜牛肉绞碎、煮沸,取其上清液,调pH7.0,灭菌、备用;(2)Md培养基:蛋白胨10.0g,葡萄糖1.0g,酵母膏4.0g,NaCl 3.0g,脱脂牛奶10.0g,NaCl 5.0g,CaCl<sub>2</sub> 20.0g,L-Try 0.1g,pH 7.2定容至1L;(3)牛奶培养基:蛋白胨0.5g,酵母膏0.25g,脱脂牛奶10.0g,pH7.2,定容至1L;(4)酵母膏蛋白胨培养基:酵母膏5.0g,蛋白胨10.0g,NaCl 5.0g,pH 7.0~7.2,定容至1L。

### 1.2 酶活力测定<sup>[3]</sup>

在10mL试管中依次加入5%可溶性淀粉溶液1mL,2mol/L(pH6.0)乙酸缓冲液0.5mL,蒸馏水3mL,于60℃水浴中预热5min后,加入酶液0.5mL,使总体积为5mL。保温30min后,立即取出并加入1mL酶终止液,沸水煮沸5min,冷却,6,000r/min离心5min。取上清液0.5mL,于25mL试管中依次加入1.5mL,3,5-二硝基水杨酸,水1.5mL,混匀,沸水中煮5min,加水至25mL。测定OD<sub>520</sub>。

酶活力单位定义:30min催化淀粉水解产生相当于1 $\mu$ mol葡萄糖还原端的酶量为1个酶活力单位(U)。

### 1.3 胞外酶的鉴定

菌株ZX99液体培养后,将部分发酵液离心(5000r/min、10min),分离上清液与菌体。将菌体细胞破碎后,分别测定发酵液、上清液和菌体中酶的活力。

### 1.4 菌株ZX99的紫外线诱变与优良变异株的筛选

在无菌条件下挑取单菌落,于无菌0.2mol/L(pH6.0)磷酸缓冲液中,振荡5min制

成菌悬液。在距紫外灯 30cm 处照射一定时间后, 于 60℃ 平板培养 36h。挑取存活菌的单菌落, 60℃ 液体培养 36 h 后, 分析各培养液中酶的活性。选取活力较高的菌株做进一步诱变筛选。

### 1.5 产物的薄层层析分析

酶促反应液: 在 10mL 试管中依次加入 5% 可溶性淀粉溶液 1mL, 2mol/L (pH6.0) 乙酸缓冲液 0.5mL, 蒸馏水 3.0mL, 于 60℃ 水浴中预热 5min 后, 加入酶液 0.5mL, 使总体积为 5mL。保温 60min 后, 沸水煮沸 10min, 冷却后直接进行产物分析。

将酶促反应液与各种标准低聚糖溶液同时进行薄层层析, 阴性对照为加入无活性酶的反应液。

硅胶 G 板、自制薄层板: 150 $\mu$ m 厚, 105℃ 活化 30min。

展开剂: 乙酸乙酯: 乙酸: 甲醇: 水 (12: 3: 3: 2), 室温, 上行展开二次。

储液: A 液: 4g 二苯胺溶于 100mL 丙酮中; B 液: 4mL 苯胺溶于 100mL 丙酮中。

显色剂: 储液 A + 储液 B + 20mL 85% 磷酸, 混匀。

显色条件: 在 70℃ ~ 80℃ 烘箱中, 烘烤 5 ~ 10min。

## 2 结果

### 2.1 培养基的选择

根据菌株 ZX99 的生长特性, 分别选用牛肉汤培养基、Md 培养基、牛奶培养基和酵母膏蛋白胨培养基进行菌株 ZX99 的平板培养。观察发现, ZX99 在所选用的 4 种培养基上均生长良好。用 4 种培养基液体培养后, 分别测定培养液中新型淀粉酶的水平, 结果牛奶培养液和 Md 培养液中酶活力较高, 酶浓度分别为 9.8 和 9.3 (U/mL), 而牛肉汤培养液和酵母膏蛋白胨培养液中酶活力较低, 酶浓度分别为 2.1 和 0.98 (U/mL)。可见, 虽然选用的培养基均适合 ZX99 的生长, 但菌株的产酶水平却有明显的差异, 其中用牛奶培养基培养, 产酶水平为最高。因此选择牛奶培养基作为 ZX99 的培养基。

### 2.2 胞外酶的鉴定

ZX99 用牛奶培养基培养后, 按方法 3 分别测定发酵液、上清液和菌体细胞内新型淀粉酶的活力, 结果发酵液和离心上清液中酶活力一致, 而菌体细胞内无活力, 这说明, 菌体细胞内不含有该酶, 菌体产生的新型淀粉酶都分泌到了胞外发酵液中, 即该酶系胞外酶。

### 2.3 ZX99 的诱变及高产酶菌株的筛选

对原产酶菌株 ZX99 按方法 4 进行诱变, 每次诱变后经平板培养、液体培养, 测定存活菌株的产酶水平, 结果见下表。

由表 2 可知, ZX99 经一次紫外线照射后, 产酶水平有明显的提高, 约为原菌株的 127%, 对 BS3.2 再次进行诱变后, 产酶水平又进一步提高了, 但继续诱变, 产酶水平

ZX99 诱变及菌株酶活力分析

诱变次数	最佳诱变时间 (min)	菌株	平均酶活力 (U)	酶活力变化 (%)
原始菌种	0	ZX99	9.8	100
第一次诱变	1.0-1.5	BS3.2	12.4	127
第二次诱变	1.0-1.5	BS3.232	15.6	160
第三次诱变	1.0-2.0	BS3.232n	15.4	157

则不再提高。因此 ZX99 经二次紫外线照射后, 筛选出了比 ZX99 更优良的变异株 BS3.232, 其产酶水平约为原菌株

的160%。将BS3.232再用图1所示的不同培养基培养后,测定酶活力,结果证明仍以牛奶培养基为最佳。

## 2.4 酶底物特异性与反应产物分析

分别以淀粉和普鲁兰为底物,进行彻底的酶促反应。反应后用碘试剂分析证实淀粉反应体系中已无淀粉和糊精存在。薄层层析分析转化产物,结果如图1所示。

图1表明,淀粉在菌株BS3.232产生的新型淀粉酶的作用下,转化生成了多种低聚糖,其中包括有麦芽糖、麦芽三糖、异麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖和异麦芽四糖,但却只产生了极少量的葡萄糖,而普鲁兰在此酶的作用下只产生了少量的葡萄糖和异麦芽糖,并无其它低聚糖。此结果证明,新型淀粉酶能有效地将淀粉转化为异麦芽低聚糖。

## 3 讨论

本研究对原筛选出的菌株ZX99产生的淀粉酶进行了初步的研究,证明该酶为胞外酶,由于胞外酶的分选纯化过程比较简单、省时,利于工业生产中应用,因此该酶具有良好的应用前景。对原菌株ZX99进行紫外诱变,结果表明经二次诱变后变异株的产酶水平最高,比原菌株提高了160%。酶底物特异性与反应产物分析结果证明,菌株产生的淀粉酶是一种不同于传统淀粉酶的新型淀粉酶,异麦芽低聚糖的产生表明该酶不但能催化淀粉水解,而且同时具有转苷的作用,这一点与报道的新普鲁兰酶相同。1988年Kuriki等<sup>[4]</sup>发现某种芽孢杆菌在一定的条件下能产生一种新型普鲁兰酶(命名为新普鲁兰酶),该酶能催化普鲁兰水解产生潘糖。进一步的研究证实,新普鲁兰酶不同于传统的普鲁兰酶,它同时具有水解和转苷的作用<sup>[5-7]</sup>。1993年,Kuriki等<sup>[1]</sup>又利用此酶直接作用淀粉生产了异麦芽低聚糖浆。此方法与传统工艺相比,即提高了低聚糖的产率,又简化了生产工艺。图1的结果说明,上述新型淀粉酶是一种完全不同于新普鲁兰酶的淀粉酶,对普鲁兰基本不起作用,但能有效地催化淀粉降解产生低聚糖。应用该酶制剂以淀粉为原料生产异麦芽低聚糖将有远大的发展前景。

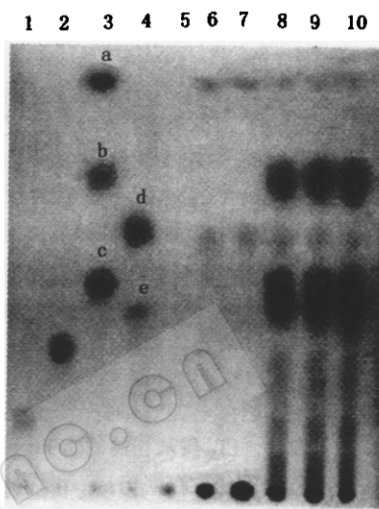


图1 淀粉、普鲁兰酶促转化产物的薄层层析分析

- 1 异麦芽四糖, 2 异麦芽三糖,
- 3 葡萄糖(a)、麦芽糖(b)、
- 麦芽三糖(c), 4 异麦芽糖(d)、
- 潘糖(e), 5 阴性对照,
- 6~7 普鲁兰酶促反应液,
- 8~10 淀粉酶促反应液

## 参考文献

- [1] Kuriki T, Yanase M, Takata H, *et al.* Appl Environ Microb, 1993, 59 (4): 953~959.
- [2] 刘军, 陈向东, 彭珍荣. 微生物学通报, 1998, 25 (5): 302~303.
- [3] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 等. 生化实验方法和技术, 北京: 科学出版社, 1982.11.
- [4] Kuriki T, Okada S, Imanaka T. J Bacteriol, 1988, 170: 1554~1559.
- [5] Imanaka T, Kuriki T. J Bacteriol, 1989, 171: 369~374.
- [6] Kuriki T, Takata H, Okada S, *et al.* J Bacteriol, 1991, 173: 6147~6152.
- [7] Takata H, Kuriki T, Okada S, *et al.* J Biol Chem, 1992, 267: 18447~18452.