

一种用于植物树胶酶产生菌筛选 和酶学研究的不溶性产色底物

陈 中 孚*

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

筛选产生植物树胶酶、特别是耐高温的植物树胶酶的微生物菌株, 对采油工业有很大的实用意义。测定粘度变化或单糖含量的筛选方法, 或则费时, 或则专一性不强, 需要探索更好的方法。

一些多聚物如淀粉、纤维素、甲壳质, 葡聚

糖等, 可与活性染料 remazol brilliant blue R 共价结合形成不溶性底物^[1-3]。在相应酶作用下, 这类不溶性底物能定量释放出可溶性蓝色色素, 因此它可被用来专一、简便、快速地测定相应酶

* 承潘家瑾同志协助照相, 谨致谢意。

的活力。本文报道利用皂仁胶或田菁胶与艳蓝 K3R 形成的不溶性产色底物筛选产生植物树胶酶菌株,以及研究有关酶学特性的试验结果。

材 料 和 方 法

一、不溶性底物的制备

参照 Rinderknecht 等^[1]的方法制备。将 25 克皂仁胶(或田菁胶)慢慢加入 550 毫升煮沸的含 150 克无水硫酸钠的溶液中,搅拌半小时。然后加入艳蓝 K3R 5 克,加热搅拌半小时,再加入 16% 的磷酸三钠热溶液 65 毫升,搅拌半小时后放置令其冷却。用自来水漂洗不溶性底物以除去多余染料,俟上清液变成无色时,用 70% 乙醇和蒸馏水轮流洗涤数次,直至上清液完全无色。底物于 55—60℃ 烘箱中烘干,研细备用。

二、酶活力的测定

在 1.5 毫升 0.1M pH 6.0 的磷酸缓冲液中加入 5—10 毫克不溶性底物,在一定温度下保温 2—5 分钟后,加入待测菌株的培养液,或经离心(3000 转/分,15 分钟)后的上清液 0.5 毫升,静置反应一定时间(如 10 分钟)后,加入 1 毫升 0.3 NNaOH 溶液中止反应,3000 转/分离心 10 分钟后,吸出上清液,在分光光度计上读取波长 625 毫微米处的光密度值。

三、产酶菌株的筛选

(一) 用液体培养物筛选

同酶活力测定法。产酶菌株能分解不溶性底物,上清液呈蓝色;不产酶菌株培养液之上清液无色。

(二) 用固体培养基筛选

在 100 毫升融化的琼脂培养基中加入经 70% 乙醇灭菌的不溶性底物 500 毫克,摇匀,倒入培养皿中。不溶性底物在 60—80℃ 中仍较

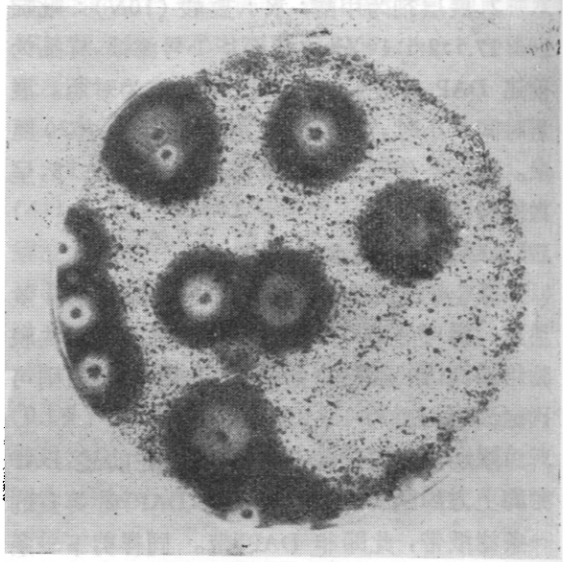


图 1 产酶菌株嗜热芽孢杆菌(*Bacillus thermophilus*) Al-H 577 在含不溶性底物的培养基上,55℃培养 14 小时后,菌落周围出现蓝色圈。背景中分散的细小颗粒为不溶性底物。

稳定。待平板制备好后,将待测菌接种在此固体培养基上,培养一定时间后,如菌落周围出现蓝色圈,即该菌株可产植物树胶酶(见图1)。

结 果

一、产酶菌株的筛选

用来自胜利油田勘探开发规划研究院微生物组分离保藏的 31 株菌(包括化水菌、稠化菌、乳化菌和糖化菌),观察对上述不溶性底物的分解能力。结果表明,无论用液体或固体培养基筛选,都能获得有分解能力的 11 株菌。其中 10 株是有较高水化水基压裂液活力的化水菌。该 11 株菌在诱导培养液中生长的浊度和植物树胶酶活力,列于表 1。诱导培养液是在肉汁蛋白胨培养基中加入 2% 皂仁胶。

二、应用不溶性产色底物研究植物树胶酶的性质

表 1 11 株产酶菌株产酶能力的比较

菌 株	B ₁	Al-H577	D11-1	6-285-2	D-1	6-495-5	H577	6-491-4	D11-2 H577	M4-10	6-499-1
生长浊度 (660毫微米光密度)	0.517	0.500	0.480	0.485	0.461	0.503	0.588	0.475	0.423	0.485	0.493
酶 活 力 (625毫微米光密度)	0.911	0.965	0.953	0.780	0.517	0.835	0.815	0.795	0.508	0.875	0.748

将待测菌株接种在诱导培养基中,于55℃或适宜温度,在摇瓶中振荡培养20小时,测定植物树胶酶活力。用此系统研究了 Al-H 577 菌株(经中国科学院林业土壤研究所鉴定为嗜热芽孢杆菌)所产该种酶的一系列特性,结果如下。

(一) 酶量、底物量与反应时间的关系
结果见图 2—4。

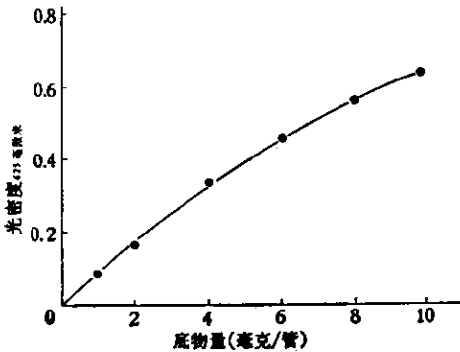


图 2 不同底物量时的酶反应曲线
(50℃, pH6.0, 反应 10 分钟)

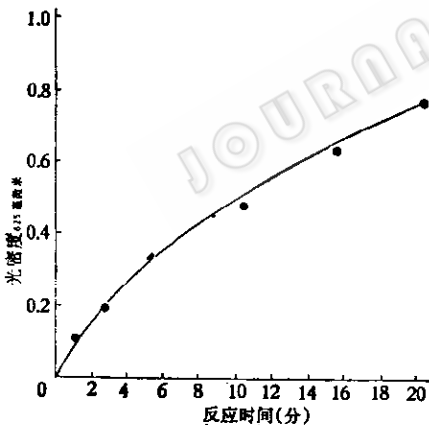


图 3 不同反应时间的酶反应曲线
(50℃, pH6.0, 每管底物 7 毫克)

(二) 各种碳源对菌株产生植物树胶酶的影响
结果见表 2。

(三) 酶反应的 pH 曲线、温度曲线和热稳定曲线
分别见图 5、6、7。

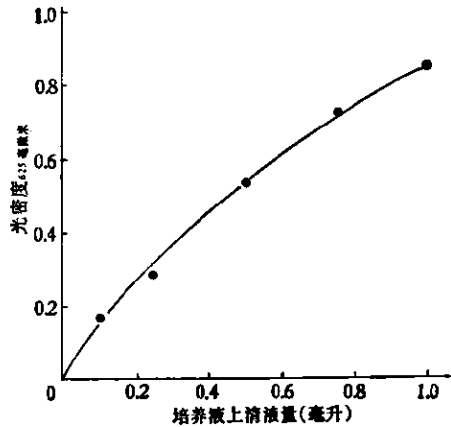


图 4 不同酶量时的反应曲线
(50℃, 10 分钟, pH6.0, 每管底物 7 毫克)

表 2 各种碳源对菌株产生植物树胶酶的影响
(底物 7 毫克/管, 反应温度为 50℃, 碳源最终浓度 0.5%)

碳 源	菌的生长浊度 (660毫微米光密度)	酶 活 力 (625毫微米光密度)
未 加	0.50	0.15
葡 萄 糖	0.65	0.17
葡萄糖+皂仁胶	0.73	0.58
皂 仁 胶	0.64	0.69
田 菁 胶	0.70	0.64
甘 露 糖	0.66	0.20
半 乳 糖	0.54	0.13
乳 糖	0.46	0.11
蜜 二 糖	0.81	0.19
棉 子 糖	0.84	0.18
蔗 糖	0.60	0.14
可溶性淀粉	0.80	0.21

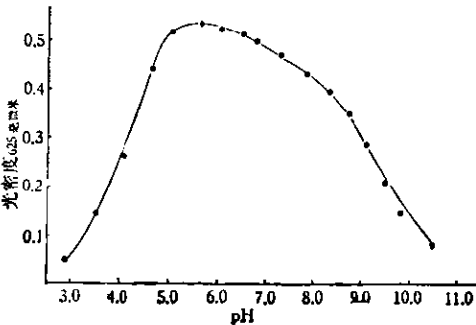


图 5 酶反应的 pH 曲线(55℃, 10 分钟, 每管含 5 毫克底物)

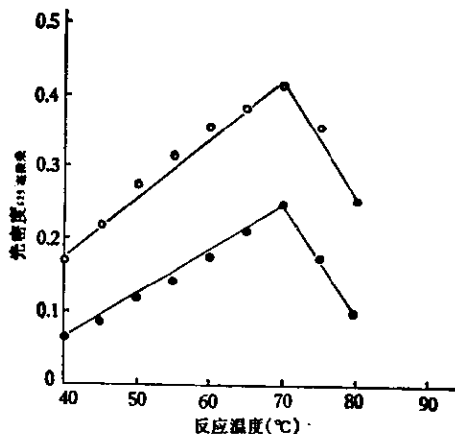


图 6 不同培养温度时酶反应的温度曲线

(pH6.0, 反应 10 分钟, 每管底物 5 毫克)

—○— 37°C 振荡培养 20 小时; —●— 50°C 振荡培养 20 小时

讨论和结论

植物树胶是一种半乳-甘露聚糖胶, 主链为以 $\beta 1-4$ 甘露糖苷键结合的甘露聚糖, 侧链上的半乳糖以 $\alpha 1-6$ 半乳糖苷键与主链相连接。嗜热芽孢杆菌 Al-577 菌株在含皂仁胶的培养基中 37°C 摇瓶培养 18 小时的培养液只能分解植物树胶—艳蓝 K3R 不溶性底物, 不能分解具有 $\alpha 1-6$ 半乳糖苷键的底物邻硝基酚- α -D-半乳糖苷。这说明该菌所产生的植物树胶酶分解植物树胶的主要作用点是分解 $\beta 1-4$ 甘露糖苷键。

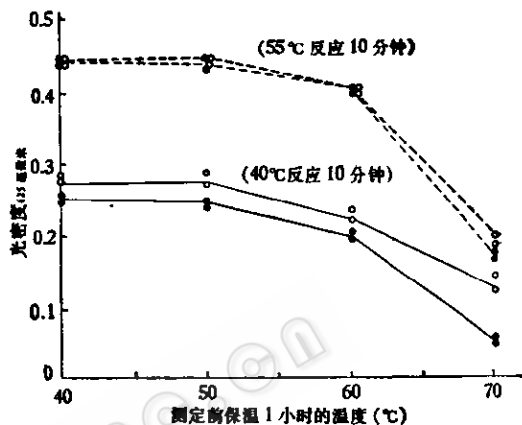


图 7 酶反应的热稳定曲线

—○— 50°C 振荡培养 24 小时培养物;

—●— 37°C 振荡培养 20 小时培养物

不溶性产色底物合成简单, 在高温中也比较稳定。从试验结果看, 这种底物较适用于筛选高温产酶菌株及研究有关酶的酶学特性。

参考文献

- [1] Rinderknecht, H., P. Wilding and B. Haverback: *Experientia*, **23**: 805, 1967.
- [2] Makinen, K. K. and I. K. Paunio. *Anal. Biochem.*, **39**: 202, 1971.
- [3] Yamasaki, N.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**: 1507, 1973.
- [4] Loida, Z.: *Histochemie*, **30**: 277, 1972.
- [5] Rinderknecht, H. M. C. Genkas, P. Silverman and B. J. Haverback: *Clin. Chim. Acta*, **21**: 197, 1968.