

# 淀粉脱支酶生产菌株的平板筛选方法

程 池

(轻工业部食品发酵工业科学研究所, 北京 100027)

淀粉脱支酶 (Debranching Enzyme) 可以专一性地催化断裂淀粉中的  $\alpha$ -1, 6-葡萄糖苷键, 将支链淀粉转化为直链淀粉, 改善淀粉酶对淀粉的作用效果, 提高淀粉利用率。

自从 Bender 等<sup>(1)</sup>于 1961 年首先从细菌中发现脱支酶后, 国际上对产生这种酶的微生物进行了广泛研究, 筛选了一些适用于工业化生产的优良菌株<sup>(2-4)</sup>。国内虽然从 1973 年就开始脱支酶的研究工作, 但一直局限于典型菌株产气气杆菌<sup>(5)</sup>, 没有进行过大规模的广泛筛选工作, 至今没有见到有关筛选方法的文献报道。本文简要介绍几种产脱支酶菌种的琼脂平板筛选方法。

## (一) 底物显色法

和淀粉酶生产菌种的筛选方法相似。在基本培养基中添加 1% 的可溶性淀粉做为碳源, 灭菌后制成琼脂平板, 将菌样稀释后涂布其上, 在适宜温度下培养, 待菌落生成后, 用稀碘溶液显色, 菌株分泌出的胞外脱支酶能将可溶性淀粉降解生成直链淀粉。两者对碘溶液的呈色反应不同, 分泌脱支酶的菌株在琼脂平板上显

现清晰的深色菌圈。日本科学家高岐义幸用碘升华显色代替碘溶液显色, 效果更好, 碘升华显色是将培养皿倒置, 皿盖内放少许固体碘粉末, 数分钟后, 即可观察到显色反应。

碘显色法虽简便, 但有缺点: 碘对微生物有较强杀灭作用, 显色时间过长, 常使微生物活性减弱, 给进一步分离纯化带来麻烦; 有些产生脱支酶的菌种也分泌淀粉酶, 后者能将可溶性淀粉完全水解, 在平板上形成透明菌圈, 从而掩盖了脱支酶的作用。

## (二) 底物沉淀法

脱支酶分为两类: 普鲁兰酶 (Pullulanase) 和异淀粉酶 (Isoamylase)。普鲁兰酶的最小作用底物比异淀粉酶小<sup>(6)</sup>, 其工业应用价值也较大, 目前市场上的商品脱支酶都属于普鲁兰酶。用普鲁兰多糖代替淀粉作为筛选底物, 可以避免淀粉酶的干扰。

普鲁兰多糖 (Pullulan) 是微生物产生的一种粘多糖, 溶于水, 不溶于有机溶剂, 由麦芽三糖相互以  $\alpha$ -1, 6-糖苷键连结构成, 普鲁兰酶可将其降解为麦芽三糖单体, 异淀粉酶、 $\alpha$ -淀粉

酶和β-淀粉酶对其无作用<sup>(7)</sup>。

在基本培养基中加入0.3—0.5%的普鲁兰多糖为碳源，制成琼脂平板，待菌落生成后，将10毫升乙醇（或丙酮）倒于培养皿内，室温下保持2—5小时，培养基中的普鲁兰多糖在乙醇作用下沉淀形成不透明的乳浊色背景，分泌普鲁兰酶的菌落周围由于普鲁兰多糖已被分解而显现清晰的透明菌圈。

Morgan等<sup>(8)</sup>在1979年首先用沉淀法对26属计297株细菌进行过筛选，其中有138株表现出普鲁兰酶活性。Nielsen等<sup>(2)</sup>用沉淀法筛选到一株嗜酸性普鲁兰多糖分解芽孢杆菌(*Bacillus acidpullulyticus*)，该菌的突变株后来成为丹麦NOVO公司商品普鲁兰酶的生产菌株。

Nielsen筛选所用培养基为(%)：酵母膏1，蛋白胨1，琼脂2，(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.04，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1，CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.05，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6，同时加入0.5普鲁兰多糖做为碳源，培养基在灭菌前用5mol/L硫酸将pH调到3，灭菌后的pH值为4.8—5.2。琼脂平板培养基涂布接种菌样后，在30—37℃恒温培养，待菌落生成后，将丙酮倾倒在培养基上，培养基中的普鲁兰多糖由于丙酮作用从溶解状态沉淀析出，形成不透明的乳浊背景，而分泌普鲁兰酶的菌落周围由于普鲁兰多糖已被分解而显现清晰的透明菌圈。

沉淀法排除了淀粉酶的干扰，但由于平板培养基上的菌落需要在有机溶剂中浸泡几小时，不便于直接分离活体细胞。

### (三) 底物染色法

Kanno等<sup>(9)</sup>报道一种新的方法，用于鉴定和直接分离产生普鲁兰酶的微生物，不仅避免了显色和沉淀阶段对微生物的伤害以及交叉感染等，还可以一次区分出微生物的三种不同酶

系。

首先用与活性染料共价结合的方式制备出红色普鲁兰多糖和蓝色直链淀粉做为呈色底物。普鲁兰多糖和直链淀粉分别用Mikacion亮红和Remazol亮蓝染色，底物被分解时，颜色也随之消失。

在平板培养基中同时加入这两种底物，复合色形成紫色背景，在菌种培养过程中可能有三种情况发生：微生物分泌淀粉酶，则降解蓝色直链淀粉，显现红色菌圈；微生物分泌普鲁兰酶，则降解红色普鲁兰多糖，显现蓝色菌圈；如果微生物同时分泌淀粉酶和普鲁兰酶，则紫色消失，显现出透明菌圈。

脱支酶根据用途不同对酶系也有特殊要求，应用于制备高麦芽糖浆，要求必须是单一酶系，不含淀粉酶；而在干啤酒、葡萄糖生产中则可以是多酶体系，所以，底物染色法是目前最完善的一种产脱支酶菌株筛选方法。

### 参 考 文 献

1. Bender H et al. : *Biochem. Z.*, **334**: 79—95, 1961.
2. Nielsen G C et al. : UK Patent Application, GB2097405, 1982.
3. Hyun H H et al. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **49** (5): 1168—1173, 1985.
4. Antranikian G et al. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27** (1): 75—81, 1987.
5. 朱庆裴等：酶制剂工业（张树政主编），第512—531页，科学出版社，北京，1984年。
6. Harada T; *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **31** (2): 38—47, 1984.
7. 程池等：食品与发酵工业，**6**: 30—34, 1988.
8. Morgan F J et al. : *Journal Applied Bacteriology*, **46**: 291—294, 1979.
9. Kanno M et al. : *Agric. Biol. Chem.*, **49** (5): 1529—1530, 1985.

(1992-4-13收稿)