

# 茁霉多糖酶产生菌株 A<sub>3345</sub> 的选育<sup>\*</sup>

王义良 张添元 罗进贤

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

**摘要** 报道以产茁霉多糖酶的产气气杆菌 (*Aerobacter aerogenes*) 为出发菌株, 采用亚硝基胍、紫外线、亚硝酸等交叉或复合处理的方法, 以突变株中筛选出一株产茁霉多糖酶活力较高的 A<sub>3345</sub> 菌株. 摇瓶试验表明该菌株在藤尾培养基中, 30℃ 发酵 4 d, 酶活力在  $7.5 \times 10^6$  U/L 以上. 比原出发菌株提高 110%. 该酶反应的最适 pH 5.2~6.4, 最适温度为 50℃ 左右.

**关键词** 茁霉多糖酶, 产气气杆菌, 诱变

**分类号** TQ 920.1

茁霉多糖酶在医药、食品、发酵等行业有广泛的用途. 应用于啤酒外加酶法糖化, 可节省麦芽, 提高啤酒的产品质量; 用于酒精工业, 增加出酒率等<sup>[1~3]</sup>. 已知茁霉多糖酶由某些酵母、细菌和放线菌产生, 在某些高等植物和动物的脏器中也有所发现, 但他们所产的酶活力低, 不能应用于生产, 目前研究和应用较多的是产气气杆菌, 其所产酶活力仍不够高, 为选育高酶活性的菌株, 人们正在采用基因工程技术<sup>[4,5]</sup>和常规的理化诱变方法. 如能选育出茁霉多糖酶高产菌株, 对于发展酶制剂工业, 充分利用淀粉资源、节约粮食将有重要的作用. 本文主要报道茁霉多糖酶产生菌株 A<sub>3345</sub> 的诱变选育及其产生的茁霉多糖酶的一般性质.

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

产气气杆菌 (*Aerobacter aerogenes*) 由赵因平博士提供.

### 1.2 培养基

细菌活化用 L<sub>1</sub>B 培养基 (10% 蛋白胍, 10% NaCl, 5% 酵母提取物, pH 7.2). 斜面保存用 L<sub>1</sub>B 培养基加 1.5% 的琼脂. 平板初筛用斜面培养基另加 1% 的支链淀粉.

摇瓶发酵采用藤尾 (D.M) 培养基 A (可溶性淀粉 10%, CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 8%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5%, KCl 0.5%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1%, 蛋白胍 0.5%). 以上培养基皆在 1 kg/cm<sup>2</sup> 压力下灭菌 30 min.

\* 广东省自然科学基金资助项目

收稿日期: 1994-09-10 王义良, 男, 51岁, 副教授

### 1.3 培养条件

斜面及平板菌种在恒温箱中 30℃培养 2 d.

诱变处理菌体的培养: 出发菌株接种于 5 mL LB液体培养基中, 置于旋转摇床 (200 r/min) 30℃培养 2 d.

摇瓶发酵: 500 mL三角瓶中装 100 mL藤尾培养基, 转入 5 mL培养过夜的菌液. 于旋转摇床 (200 r/min). 30℃培养 4 d.

### 1.4 诱变处理方法

1.4.1 亚硝基胍 (NTG) 处理 见文献 [6].

1.4.2 紫外线 (U.V) 处理 收集对数期的菌体, 用无菌水稀释到一定浓度后涂平板, 在紫外灯 (20 W) 下 35 cm处照射 10 s, 用黑布包好, 置 30℃培养.

1.4.3 亚硝酸 (HNO<sub>2</sub>) 处理 见文献 [7].

1.4.4 亚硝酸与紫外线复合处理 先按亚硝酸处理, 涂平板后即用紫外线处理, 然后黑布包好, 置于 30℃培养.

### 1.5 突变株的筛选

1.5.1 平板初筛 随机挑取诱变处理后生长的单菌落, 转到含支链淀粉的初筛平板, 并同时接 1株出发菌株作对照, 一式二份, 于 30℃培养 3 d, 取其中一份加入 0.1% 碘液. 有酶活的菌落周围出现蓝色圈, 从中挑出蓝圈与菌落比值较大的菌株进行复筛.

1.5.2 摇瓶复筛 经平板初筛挑出的菌落, 转接于 5 mL LB培养液中过夜, 转入摇瓶发酵 4 d, 离心收集发酵液, 适当稀释测定其酶活力, 挑出酶活力高的菌株保存.

1.5.3 酶活力测定法 在 10 mL比色管中加入 1% 可溶性糯米淀粉溶液 5 mL, 0.1 mol/L pH 5.8醋酸缓冲液 1 mL, 酶液 1 mL摇匀后立即吸出 1 mL混合液至预先吸有 13 mL 0.005 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的 25 mL比色管中作为反应零时的对照. 样品管于 50℃水浴中反应 30 min, 反应混合液迅速用水浴冷却至室温, 吸取 1 mL反应液加入装有 13 mL 0.005 mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的比色管中, 终止反应, 再加入 1 mL 0.01 mol/L碘液, 用蒸馏水定容至 25 mL, 摇匀放置 15 min, 在 620 nm波长处用 1 cm厚度的比色皿测定样品与反应零时的光密度之差  $\Delta A$ .

在上述条件下, 反应 1 h, 使光密度在 620 nm波长处增加 0.01所需酶量为一个酶活力单位.

$$\text{一个酶活力单位 (u/mL)} = \Delta A / 0.01 \times 2n$$

$n$  为发酵液稀释倍数

## 2 结果与讨论

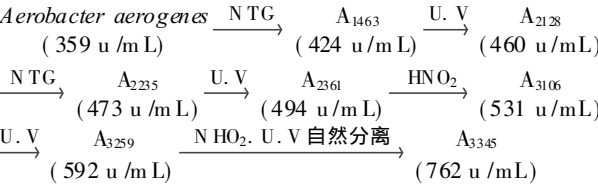
### 2.1 产气杆菌生长曲线及产酶曲线

摇瓶发酵 24 h后, 每隔 12 h取 5 mL发酵液分别测定菌体浓度 ( $A_{600}$ )<sup>①</sup> 及离心后取上清液测酶活力. 得菌生长曲线和产酶曲线 (见图 1). 表明取培养 4 d后的发酵液测酶活力比较适合.

<sup>①</sup> 由无锡酶制剂厂提供

2.2 诱变处理结果

以产气气杆菌为出发菌株,经过多次诱变处理及自然分离,得到 A<sub>3345</sub>实变株.诱变选育谱系如下:



从选育谱系中可看出诱变作用使菌株酶活力的提高是渐进的.累积的.而复合处理的效果较为显著,经多次物理化学因素交叉和复合处理,自然分离选育出来的突变株 A<sub>3345</sub>.其所产酶活力均在 760~ 840 u/mL,比原出发菌株的酶活力提高 110%.

2.3 酶的一般性质

2.3.1 酶的类型 将 A<sub>3345</sub>菌株接在含有 1% 苕霉多糖琼脂培养基<sup>[8]</sup>平板上,30℃培养 3 d后,用丙酮沉淀培养基中的苕霉多糖,形成乳浊色的背景,而菌落周围由于苕霉多糖已被分解而显现清晰的透明圈.说明 A<sub>3345</sub>突变株产生的异淀粉酶能够分解苕霉多糖,称苕霉多糖酶或普鲁兰酶.

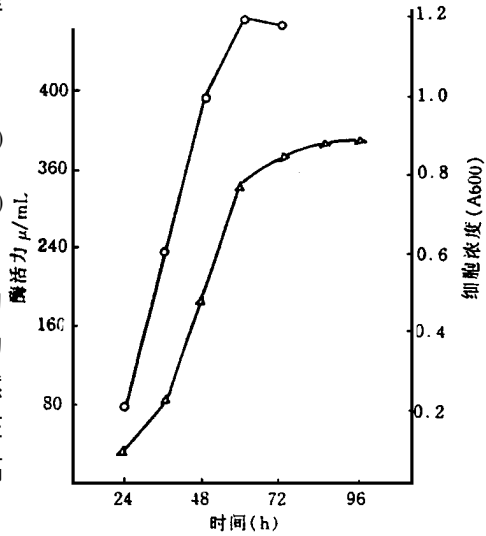


图 1 产气气杆菌生长 (○) 和产酶 (△) 曲线

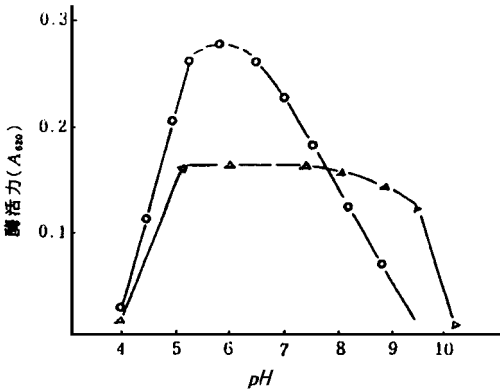


图 2 pH对酶活动的影响

酶的最适 pH (-○-) 是 5.2~ 6.4

苕霉多糖酶在 pH 5~ 9之间稳定 (-△-)

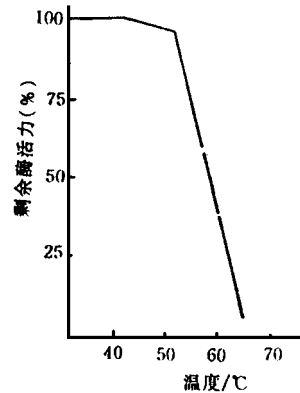


图 3 酶的热稳定性

2.3.2 酶反应的最适 pH与 pH稳定性 培养到 96h的发酵液经离心除去沉淀菌体,用硫酸铵盐析,取 30%~ 45%硫酸铵饱和度的部分,离心收集沉淀加水溶解.透析,得较纯的酶液供酶性质研究用.

反应系统的其他成分不变,加入反应系统的缓冲液仍然为 0.1 mol/L.在适当酶量存在下,在不同 pH的缓冲液中进行反应,测定其相对酶活力.结果见图 2.

由图 2 可见酶反应的最适 pH 为 0.2~6.4. 其最适 pH 受缓冲液影响, 在 pH 5.8 的醋酸缓冲液中比在相同 pH 值的柠檬酸缓冲液中所测得的酶活性高 83%. 这与产气气杆菌 10016 菌株异淀粉酶最适 pH 受缓冲液影响一致.

提纯酶液在不同 pH 的缓冲液中, 置于 40℃ 保温 1 h, 立即冷却, 用 0.2 mol/L pH 5.8 醋酸缓冲液调回 pH, 然后测酶活. 表明茁霉多糖酶在 pH 5~9 之间稳定. (图 2)

2.3.3 最适温度与热稳定性 分别在 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃, 65℃, 70℃ 测酶活, 结果表明最适温度为 50℃ 左右.

酶液分别在上述各温度中水浴保温 10 min, 立即冷却, 适当稀释后测定酶活力. 结果见图 3. 说明该酶在 50℃ 以上不稳定.

从以上结果可以说明 A<sub>3345</sub> 产的茁霉多糖酶的这些性质与产气气杆菌 10016 异淀粉酶的性质相似<sup>[3]</sup>.

## 参 考 文 献

- 1 William M Fogarty, Debranching Enzymes. Microbial Enzymes and Biotechnology. New York 1983. 41~47
- 2 张树政主编. 异淀粉酶制剂工业, 北京: 科学出版社, 1984. 512~531
- 3 江西食品发酵工业科学研究所. 产气气杆菌 10016 异淀粉酶的研究. 微生物学报, 1976, 16 (4): 282~290
- 4 Noboru T, Yoshikatsu M. Intergeneric transfer of the pullulanase gene between *Klebsiella aerogenes* and *Escherichia coli* by in vivo genetic manipulation. Agric Biol Chem, 1984, 48 (6): 1452~1458
- 5 Noboru T, Yoshikatsu M. Cloning of the pullulanase gene and overproduction of pullulanase in *Escherichia coli* by and *Klebsiella aerogenes*. Applied and Environmental Microbiology Feb, 1985, 294~298
- 6 上海市应用微生物展览会编. 微生物的选种和育种. 上海: 上海人民出版社, 1972. 13~21
- 7 微生物诱变育种编写组. 微生物诱变育种. 北京: 科学出版社, 1973. 39~43
- 8 程池. 普鲁兰酶 *Promozyme zool* 及其生产菌种. 食品与发酵工业, 1992, 6. 72~76

## Selection of Pullulanase Producing Strain A<sub>3345</sub>

Wang Yiliang\*      Zhang Tianyuan      Luo Jinxian

**Abstract** A *Aerobacter aerogenes* mutant producing high pullulanase activity was selected by reciprocal or mixed treatment of the parental strain with NTG; U. V and HNO<sub>2</sub>. The pullulanase activity of the selected strain is 750 u/mL in Teng Wei (D M) medium (A) after 4 days incubation at 30℃, which is 110% higher than the parental strain. The optimal pH and temperature is 5.2~6.4 and 50℃ respectively.

**Keyword** pullulanase, *Aerobacter aerogenes*, mutagenesis

\* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275