

高产 α - 转移葡萄糖苷酶菌株的选育 及其产酶条件研究

毕金峰¹, 魏宝东², 李长彪²

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100094 2. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: α - 转移葡萄糖苷酶是生产低聚异麦芽糖的关键酶。本文成功选育一株高产 α - 转移葡萄糖苷酶菌株 ASP-2。并对该菌株进行了固态发酵条件优化, 结果表明: 麸皮和水的质量比为 1:1, 35℃ 培养 48h 时产酶量及酶活较高, ASP-2 菌株生长的最适 pH 值为 6.0, 碳源和氮源不是该菌株在此培养基中产酶的必需元素, 从降低生产成本的角度考虑, 可以不用。

关键词: α - 转移葡萄糖苷酶; 菌株; 选育; 产酶条件

Studies on Screening by Mutating Strain of Producing Alpha-Transglucosidase and Its Conditions for Producing Alpha-Transglucosidase

BI Jin-feng¹, WEI Bao-dong², LI Chang-biao²

(1. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China 2. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Alpha-transglucosidase is a critical enzyme of producing isomaltoligosaccharide. In this paper, strain ASP-2 of producing α -transglucosidase was obtained by screening experiments. The optimum conditions for fermentation in solid-state were: bran:water (m/m) = 1:1, culture temperature and duration were 35℃ and 48h respectively, the optimum pH value was 6.0. Carbon sources and nitrogen sources were not necessary nutrition for producing enzyme in this culture medium, so they needn't be added in the culture medium in order to reduce production cost.

Key words: α -transglucosidase strain; screening conditions for producing α -transglucosidase

中图分类号: Q936

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)10-0049-05

收稿日期: 2004-06-16

作者简介: 毕金峰(1970-), 男, 副教授, 博士后, 从事食品化学与生物技术研究。

荧光假单胞菌 AR4 是一株能够利用淀粉水解糖高产 2 KGA 的菌株。氮源、碳氮比、发酵培养基的起始 pH 值、通气量、温度等因素对该菌的产酸均有明显的影响。在适宜培养条件下, 该菌的摇瓶产酸及发酵转化率分别可达 13.5% 和 90% 左右。

参考文献:

- [1] 孙文敬, 白照熙, 谢红, 等. 我国 D-异抗坏血酸钠的研究和生产现状[J]. 微生物学通报, 1990, 17(3): 170-172.
- [2] 孙文敬, 赵峰梅, 黄惠英, 等. 抗噬菌体菌株荧光假单胞

菌 A46 在 D-异抗坏血酸钠工业生产中的应用研究[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(7): 8-11.

- [3] 赵峰梅, 孙文敬, 王慕华, 等. 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌荧光假单胞菌 K1005 抗噬菌体菌株的选育[J]. 工业微生物, 2000, 30(4): 45-49.
- [4] 孙文敬, 赵峰梅, 郭金权, 等. 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌球状节杆菌 K1022 抗噬菌体菌株的选育[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(6): 36-39.
- [5] Misenheimer T J, R F Anderson, A A Lagoda et al. Production of 2-ketogluconic acid by *Serratia marcescens*[J]. Appl Microbiol, 1965, 13(2): 393-396.

α -转移葡萄糖苷酶(α -transglucosidase E.C.2.4.1.24) 又称 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase E.C.3.2.1.20),它可以从低聚糖类底物的非还原性末端切取 α -1,4糖苷键,释放出葡萄糖,或将游离出的葡萄糖残基以 α -1,6糖苷键转移到另一个糖类底物上,从而得到非发酵性的低聚异麦芽糖(以下简称IMO,主要包括异麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖等)、糖脂或糖肽等。该酶既具有水解能力,又具有转移能力,故对其命名说法不一^[1~3]。 α -转移葡萄糖苷酶在自然界中分布广泛,种类繁多,性质各异,几乎存在于所有生物体内,在人类的糖原降解及动物、植物和微生物的糖类代谢方面具有重要的生理功能。它作为工业化生产IMO的关键酶制剂备受国内外食品工业界的重视。国外生产的 α -转移葡萄糖苷酶大部分为纯酶,酶活较高。国内研究主要以粗酶液为主^[4~11]。本文从筛选产 α -转移葡萄糖苷酶的菌株入手,诱变选育出高产 α -转移葡萄糖苷酶菌株,并进行了菌株固态发酵产酶条件优化研究,确定了最佳产酶条件,为该酶的分离提纯、酶学性质研究及国产化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:碳黑曲霉3.2587、肉桂色曲霉3.583购于中国科学院微生物所;3324(黑曲霉)、3042(米曲霉)、U408(黑曲霉)、4426(黑曲霉)、H332(黑曲霉)、4063(根霉)由实验室保存;其余五十多株曲霉由本地土壤中分离、筛选。

1.1.2 培养基

固体斜面培养基(PDA):马铃薯去皮,切碎,称取200g,切成条或块,加水1000ml,煮沸30min,双层纱布过滤,取滤液,用水补足至1000ml,加入葡萄糖50g、琼脂20g,pH值自然。

摇瓶液体培养基:饴糖10%或马铃薯汁20%、 NH_4C 12%、 K_2HPO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%,pH值自然。

察氏培养基:蒸馏水(或自来水)1000ml、 NaNO_3 3g、 K_2HPO_4 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 KCl 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g、蔗糖30g、琼脂20g。

固体麸皮培养基:麸皮(沈阳市东大面粉厂)、水、营养物。

1.2 主要仪器

HZQ—F160全温振荡培养箱 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司制造;全自动显微照相设备 奥林巴斯光学工业株式会社,日本;高速冷冻离心机 himac CR21G,日本;高效液相色谱仪 Waters 600E,美国。

1.3 试验方法

1.3.1 相对酶活测定方法

国际酶学委员会规定:在一定条件下(pH值、温度、离子强度等),1min内将1微克分子的底物转化为产物的酶量定为一个国际单位(I.U.)。本试验用直接滴定法测定 α -转移葡萄糖苷酶作用于一定浓度的底物(麦芽糖)生成产物还原糖的量,用消耗反应液体积来间接反映 α -转移葡萄糖苷酶的酶活,即相对酶活。通过试验证明用直接滴定法测还原糖所消耗的酶反应液体积来反映酶活与定量测定趋势一致,可以说明消耗的反应液体积越多,反应液中还原糖含量越低,则在单位时间内 α -转移葡萄糖苷酶水解底物(麦芽糖)的能力越差,即相对酶活越低;反之相对酶活越高。

1.3.2 还原糖测定方法—直接滴定法。

1.3.3 纸层析法

点样量为1.5 μl 。展开剂为正丁醇:吡啶:水=6:4:3。层析条件:在室温条件下,上行展开12~15h,风干后再展开1次;显色条件为70~80℃烘箱中烘烤5~10min。显色剂:显色剂A为二苯胺,称4g溶于100ml丙酮中;显色剂B为苯胺,吸4ml溶于100ml丙酮中;A+B+20ml 85%磷酸混合而成,该显色剂现用现配。

2 结果与分析

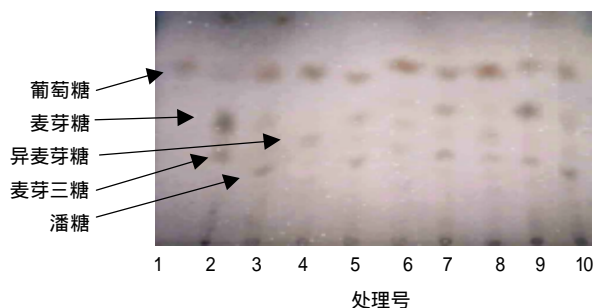
2.1 菌株诱变选育

2.1.1 产 α -转移葡萄糖苷酶菌株的初筛

用PDA培养基进行土壤中霉菌菌株的筛选、分离与纯化,将所有试验菌株进行试管斜面培养基活化。接种到液体和固体培养基中,于30℃恒温摇床中120r/min下培养2~3d,当长出大量菌体,并有少量孢子出现时终止培养。制取酶液,进行酶反应试验,在不同时间点样纸层析。根据纸层析结果分析该菌株是否产 α -转移葡萄糖苷酶,即看是否出现生成异麦芽糖、潘糖点。经过多次筛选,从试验的近五十株霉菌中筛选出4株产 α -转移葡萄糖苷酶菌株,4株菌所产酶的酶反应18h纸色谱见图1。经若干次重复试验,只有U408菌产酶稳定,糖化和转苷能力强,确定U408(以下简称U)作为出发菌株。

2.1.2 U菌株培养方式试验

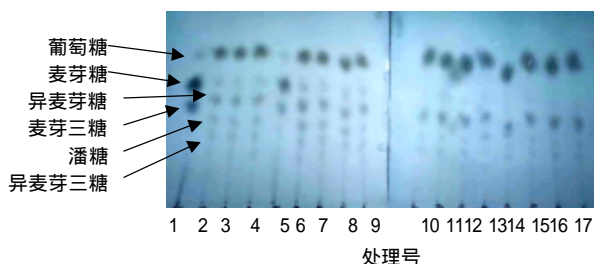
曲霉既可液体培养,又可固体培养。本文在此方面进行了研究,发现该菌固体培养所产酶的酶活明显高于液体培养所产的酶,确定采用固体培养方式。图2为其中U菌株固体培养所产酶的酶反应纸层析结果,进一步证明该菌产 α -转移葡萄糖苷酶。采用固体培养基,进行产细胞内外酶研究,证明该菌产的 α -转移葡萄糖



注：1、2号分别为葡萄糖、麦芽糖样品，3~10号为4株菌制取的粗酶液酶反应结果。

图1 酶反应纸色谱

Fig. 1 Paper chromatogram of enzyme reaction



注：1、5号处理为商品麦芽糖样品纸层析结果，2、3、4、6~17为反应5~47h的结果。

图2 固体培养U菌株所产酶液反应的纸色谱

Fig. 2 Paper chromatogram of enzyme reaction solution produced by solid culture

苷酶可以分泌到细胞外，属于胞外酶。

2.1.3 U菌株的诱变选育

挑取活化好的U菌株孢子一环，放于带玻璃珠的无菌水中振荡摇匀，用稀释倍数法稀释 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 倍，选取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 三个稀释度，吸取 $50 \mu\text{L}$ 涂于平板培

表1 U菌株诱变选育结果

Table 1 Results of mutation with strain U

诱变株号 Mutation strain	耗糖体积(ml) Volume of sugar consumption(ml)	诱变株号 Mutation strain	耗糖体积(ml) Volume of sugar consumption(ml)
1	11.40	11	11.23
2*	10.50	12	11.15
3	11.25	13	11.50
4	11.20	14	11.00
5	11.25	15	11.20
6	10.81	16	12.40
7	11.55	17	11.45
8	11.18	18	11.30
9	11.95	19	13.25
10	11.20	C K	11.30

养基中，进行紫外诱变处理。挑取诱变菌若干株，转移到试管斜面上培养，待长出大量孢子后，进行固体发酵培养，提取酶液，进行酶反应试验。CK为未诱变处理的对照，结果见表1。可见U菌株经诱变后，产酶能力有所变化，其中2、6号诱变菌株酶活提高较明显，而16、19号诱变株酶活降低。经多次重复试验证明2号诱变菌株性能稳定，产酶明显提高，确定为目标菌株(以下简称ASP-2)。

2.1.4 ASP-2遗传稳定性

取诱变菌株ASP-2连续转接10代，取不同代菌株在同一条件下进行固体培养，测定不同代菌株的产酶情况，结果见图3。可见诱变菌株传10代以后相对酶活并未明显降低，说明遗传性状比较稳定。

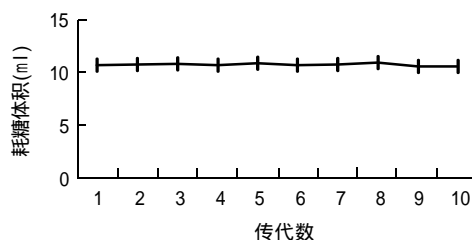


图3 ASP-2菌株遗传稳定性

Fig. 3 Genetic stability of strains ASP-2

2.1.5 ASP-2菌株形态观察

ASP-2菌株(右图)菌丝较短，白色，成熟时孢子呈棕褐色，较小。在显微镜下观察结果见图4。

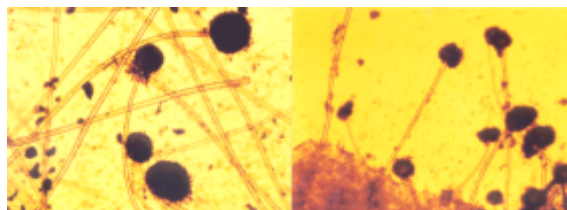


图4 ASP-2菌株形态(右)(40×16)

Fig. 4 Morphology of strain ASP-2(right)(40 × 16)

2.2 ASP-2菌株固态发酵产酶条件研究

2.2.1 麸皮加水量对产酶的影响

在10g干麸皮中分别加入5、10、15、20、25ml蒸馏水，用玻璃棒搅匀，密封后于60℃水浴锅中保温1h，并于121℃灭菌60min，冷却。接种ASP-2菌株孢子悬浮液0.5ml于5个不同处理中，用玻璃棒搅匀后放于35℃条件下培养48h。准确称取培养好的麸曲3g，加入30ml蒸馏水，室温浸泡6h，5000r/min离心20min(4℃)，取上清液作为粗酶液。取5ml具塞刻度试管若干，分别加入1ml 20%麦芽糖、1ml pH5.4的缓冲液，在55℃水浴锅中保温5min后，加入上述不同处理的酶液

1ml, 反应1h后灭酶(沸水浴中5min), 测定不同处理的相对酶活, 结果见图5。可知该菌在加入10、15ml水时, 固态培养菌所产酶的酶活较高, 观察发现菌丝生长状态良好。确定最佳麸皮和水的质量比为1:1。

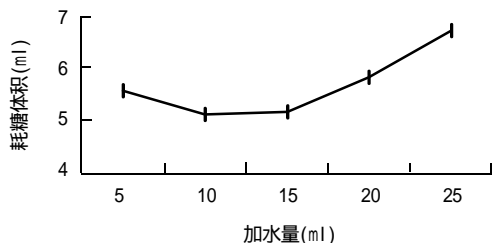


图5 加水量对相对酶活的影响

Fig.5 Effect of water quantity on relative enzyme activity

2.2.2 麸皮 pH 值对产酶的影响

配制不同 pH 值的磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液, 称取麸皮 10g, 加入不同 pH 值的缓冲液 10ml, 其他操作方法同 2.2.1, 测定不同处理的相对酶活, 结果见图 6。可知 ASP-2 菌在 pH 值 6.0 时培养, 产酶酶活较高。定期观察菌株生长状况时发现, 在此 pH 值条件下生长状况良好。

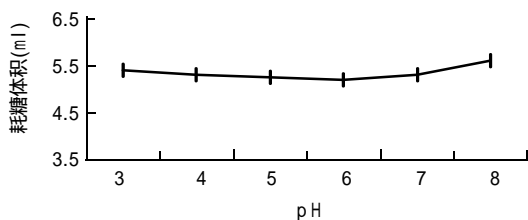


图6 pH值对相对酶活的影响

Fig.6 Effect of pH value on relative enzyme activity

2.2.3 培养温度对菌生长及产酶的影响

称取麸皮 10g, 按 1:1 比例加水, 其他操作方法同 2.2.1, 结果见图 7。可知 35℃ 是该菌的最适生长及产酶温度。定期观察菌株生长状况时发现, 30℃ 和 35℃ 处理, 菌体生长状况良好。

2.2.4 最佳产酶时间试验

麸皮和水的比为 1:1, 接种量为 1ml, 定期观察菌

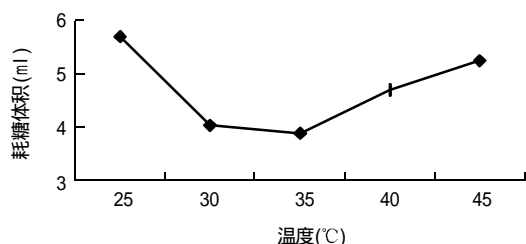


图7 温度对相对酶活的影响

Fig.7 Effect of temperature on relative enzyme activity

株生长状况, 并定期取样制取酶液, 进行酶反应, 结果见图 8。观察发现培养 48h 时, ASP-2 菌已长出孢子, 菌丝体量达到最大值。酶活测定结果可知培养 48h 时, 酶活已经较高, 确定最佳培养时间为 48h。

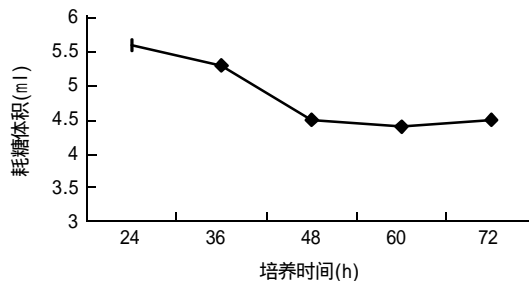


图8 培养时间对相对酶活的影响

Fig.8 Effect of culture time on relative enzyme activity

2.2.5 浸提时间对产酶的影响

麸皮和水的比为 1:1, 接种量为 1ml, 35℃ 培养 48h。按 1g 菌体加入 10ml 无菌水室温浸泡, 分别在不同时间离心取酶液, 并测定酶活, 结果见图 9。可知室温浸提 6h, 即获得较高酶活, 浸提时间延长到 24h, 酶活未见明显提高, 浸提时间过长, 可能引起霉菌的二次生长, 导致酶活降低。因此, 选择室温浸提 6h 即可。

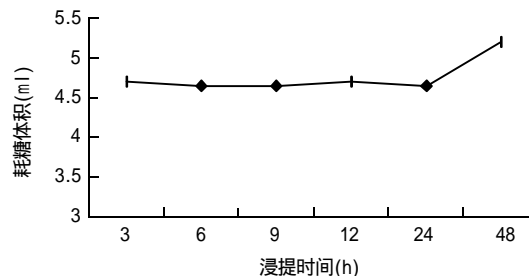


图9 浸提时间对酶活的影响

Fig.9 Effect of extracting time on relative enzyme activity

2.2.6 碳源对产酶的影响

配制 5% 的不同碳源。称取 10g 麸皮, 分别加入上述配好的溶液 10ml。每种碳源做两瓶, 一瓶接种 ASP-2 菌株, 一瓶做不接种的对照 (CK₁)。在相同条件下培养菌株, 制取酶液, 进行酶反应, 同时做不加碳源的接种 (CK₂) 对照, 结果见表 2。可知加入碳源但未接种的对照间差别不显著, 只有葡萄糖的还原能力略高些。不同碳源对产酶的影响较小, 加入葡萄糖碳源的相对酶活略高些, 但因葡萄糖本身还原能力也较强, 因此最终结果差异不显著。从降低生产成本上考虑, 以麸皮作培养基, 可不加其他碳源, 但当大规模生产时可适量加入。

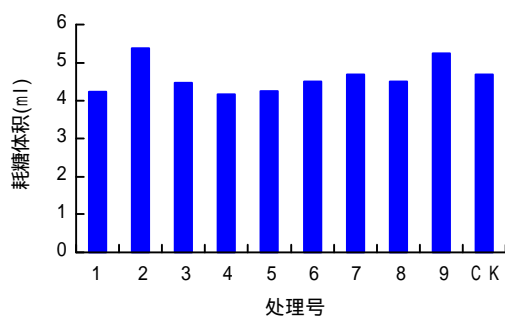
2.2.7 氮源对产酶的影响

配制 3% 的不同氮源, 取不同氮源溶液 10ml, 加

表2 碳源对相对酶活的影响(耗糖体积 ml)

Table 2 Effect of carbon sources on relative enzyme activity(volume of sugar consumption:ml)

碳源 Carbon sources		CK ₁	接种处理 Inoculated results	CK ₂
蔗糖	Sugar cane	15.10	7.85	
麦芽糖	Maltose	15.10	7.80	
葡萄糖	Glucose	14.65	7.75	
淀粉	Starch	15.50	7.90	
可溶性淀粉	Solubility starch	15.75	7.80	
				7.85



注: 处理号: 1(牛肉膏)、2(尿素)、3(L-谷氨酸)、4(蛋白胨)、5(酵母膏)、6(氯化铵)、7(硝酸铵)、8(硫酸铵)、9(磷酸氢二铵)、CK(未加氮源处理)

图10 氮源对ASP-2菌株相对酶活的影响

Fig.10 Effect of nitrogen sources on relative enzyme activity of strain ASP-2

入到10g 麸皮中, 灭菌接种, 定期观察结果, 并进行产酶分析, 结果见图10。

可知ASP-2菌株在1、4、5号氮源上生长较好, 产酶酶活较高。因此选择牛肉膏、蛋白胨、酵母膏三种氮源, 用1%、3%、5%三个浓度进一步做氮源试验, CK为加水试验, 结果见表3。可知不同浓度的氮源对菌株的影响不同。ASP-2菌株在牛肉膏中生长良好, 酶活较高, 几个浓度的处理均好于不加氮源的对照。但牛肉膏价格昂贵, 不利于降低生产成本。因测试结果与对照差异不显著, 故固体麸皮培养基中可不加氮源, 大规模生产时可寻找廉价氮源。

表3 氮源对相对酶活的影响(耗糖体积 ml)

Table 3 Effect of nitrogen sources on relative enzyme activity(volume of sugar consumption:ml)

氮源 Nitrogen sources	牛肉膏 Beef extract	酵母膏 Yeast extract	蛋白胨 Protein jelly
ASP-2(1%)	8.83	9.00	9.05
ASP-2(3%)	8.90	8.90	8.90
ASP-2(5%)	8.80	9.15	8.87
CK	9.10		

3 结 论

3.1 诱变选育出一株产 α -转移葡萄糖苷酶酶活较高的黑曲霉—U菌株, 其固体培养方式产酶酶活明显高于液体培养方式, 所产酶属于细胞外酶。通过紫外诱变, 选出一株诱变株ASP-2, 产酶量及酶活明显增加, 遗传稳定性好。

3.2 ASP-2菌株固态发酵产酶条件优化结果表明: 麸皮和水的质量比为1:1较好, 35℃培养48h时产酶量及酶活较高, 最适pH值为6.0, 碳源和氮源不是该菌在此培养基中生长的必需元素, 对菌的产酶量及酶活影响不大, 从降低生产成本的角度考虑, 可以不用。

参考文献:

- [1] Kuriki T, Yanase M, Takata H, et al. A new way of producing isomaltoligosaccharides syrup by using the transglycosylation reaction of neopullulanase[J]. Application of Environment Microbiology, 1993, 59: 953-959.
- [2] Tanriseven A, Dogan S. Production of isomaltoligosaccharides using dextranase immobilized in alginate fibers[J]. Process Biochemistry, 2002, 37: 1111-1115.
- [3] Kow D, Dey S, Ming L, et al. Reaction mechanism of isomaltoligosaccharide synthesis by α -glucosidase from *Aspergillus caibonarius*[J]. Biotechnology-Letters, 1994, 16(11): 1151-1156.
- [4] 陈必成, 扈芝香. 转移葡萄糖苷酶(transglucosidase E.C.2.4.1.24)生产异麦芽寡糖的研究[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25(4): 1-4.
- [5] 金其荣, 王晓晴. α -葡萄糖苷酶的初步研究及其在异麦芽低聚糖浆生产中的应用[J]. 食品科学, 1995, 16(4): 20-24.
- [6] 曹劲松, 王晓琴, 彭志英. 微生物酶法合成低聚糖的问题与策略[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25(4): 41-47.
- [7] 李江华, 邬敏辰, 房峻, 等. 黑曲霉固态发酵生产酸性 β -甘露聚糖酶[J]. 生物技术, 2002, 12(1): 26-28.
- [8] 孙建义, 李卫芬, 顾赛红. 木霉GXC产 β -葡聚糖酶条件和酶学性质[J]. 微生物学报, 2001, 41(4): 457-462.
- [9] 王静, 金征宇. 黑曲霉产葡聚糖酶的发酵条件优化及诱变育种[J]. 生物技术, 2002, 12(3): 8-9.
- [10] 董明盛, 江晓, 刘诚, 等. 胞外纤维酶产生菌的筛选及其产酶条件研究[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(1): 23-26.
- [11] 郑毅, 陈接锋, 吴松刚. 黑曲霉(*Aspergillus niger*)产 β -葡聚糖酶固态发酵优化的研究[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(12): 7-10.