

# 环麦芽糊精葡聚糖转移酶高活性的土壤微生物菌种筛选

袁普伟<sup>1,2</sup>, 黄建新<sup>1</sup>, 王 璋<sup>2</sup>

1(西北大学生命科学学院, 陕西 西安, 710069) 2(中国食品发酵工业研究院, 北京, 100027)

**摘 要** 根据环麦芽糊精葡聚糖转移酶(CGTase)催化淀粉和糊精生成环状糊精(CD), 环状糊精可以吸附筛选培养基中的刚果红和甲基橙使菌落周围形成透明圈, 且透明圈越大, 透明度越好, CGTase的转糖基活性越高的酶催化特性, 设计筛选模版, 进行产酶菌株分离筛选。经初筛、复筛得到了YS-19和YS-40的2株转糖基活性较高CGTase菌种, 酶活分别为2.90 U/mL和3.15 U/mL。

**关键词** 环麦芽糊精葡聚糖转移酶, 分离筛选, 土壤微生物, 透明圈

环麦芽糊精葡聚糖转移酶(cyclodextrin glucanotransferase, EC 2.4.1.19), 简称CGTase。1903年, Schardinger<sup>[1]</sup>首先发现浸麻芽孢杆菌(*Bacillus macerans*)可以催化淀粉生成环状糊精(cyclodextrin, CD), 推测可能有这种酶的存在; 1942年Tilben等<sup>[2]</sup>从浸麻芽孢杆菌中分离得到了CGTase, 至今已从30余种微生物中分离得到了该酶<sup>[1,2]</sup>, 如环状芽孢杆菌(*B. circulans*)、巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、嗜热脂肪法芽孢杆菌(*B. stearothermophilis*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、假单胞杆菌(*Pseudomonas* sp.)、微球菌属(*Micriococcus* sp.)等<sup>[3]</sup>。

现在已知CGTase是一种多功能酶, 具有环化活性、偶合活性和歧化活性, 此外, 一些CGTase还具有一定的水解酶活性。日本林原生物化学研究所与冈山大学药学系的研究人员利用CGTase的转糖基活性催化淀粉或CD的葡萄糖基转接到L-抗坏血酸L(Vc)的2位碳原子上生成2-O- $\alpha$ -D吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸(2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-L-ascorbic, AA-2G)。这种化合物由于在Vc的2位-OH上有葡萄糖基掩蔽保护, Vc的被氧化作用下降, 稳定性明显提高, 在水溶液中特别稳定, 本身虽无直接还原性, 但可由细胞膜上葡萄糖苷酶水解成Vc, Vc被转运到体内。因此, AA-2G与Vc具有相同的溶胶原活性, 能增强抗体产生和人体皮肤纤维原细胞的胶原合成, 加强Vc的抗氧化性, 预防由紫外线照射造成的急性炎症等, 而且对热、Cu<sup>2+</sup>、抗坏血酸氧化酶等引起的强氧化降解有显著抗性。AA-2G安全无毒, 可作为稳

定剂、品质改良剂、生理活性剂、紫外线吸收剂、化学和医药原料, 用于食品、饮料、医药等工业中<sup>[4,5]</sup>。特别是近年来用于化妆品中, 其抑制黑色素形成的能力比其它的Vc衍生物都要强, 因素而受到了高度关注, 但国内目前报道较少见。本实验室对产CGTase微生物菌种进行筛选, 获得了活性较高的微生物菌株, 从而有助于生物转化生产AA-2G的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 土壤样品

参照土壤样品采集标准方法<sup>[6]</sup>, 在不同地点采集9个土壤样品。

#### 1.1.2 主要化学试剂

$\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -环状糊精,  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和AA-2G购自美国Sigma公司; 刚果红、甲基橙、L-抗坏血酸等分别为生化试剂或分析纯化学试剂。

#### 1.1.3 培养基

细菌培养及一般保藏培养基采用淀粉培养基。

筛选培养基参照Hong-Ki Jun<sup>[5]</sup>所用筛选培养基进行改良, 可溶性淀粉5 g, 蛋白胨2.5 g, 酵母膏2.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 g, 刚果红0.1~0.2 g, 甲基橙0.1~0.2 g, 琼脂8~9 g, 蒸馏水1 000 mL, pH7.0。

摇瓶发酵培养基: 可溶性淀粉1%, 葡萄糖0.5%, 蛋白胨0.5%, 酵母浸粉0.5%, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05% g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01%, pH7.0。

## 1.2 方法

### 1.2.1 土样的制备

参照文献<sup>[6]</sup>的方法。

第一作者: 在读硕士研究生(王璋教授为通讯作者)。

收稿日期: 2007-12-05

1.2.2 CGTase 生产菌种的挑选

根据产酶微生物所合成的 CGTase 将可溶性淀粉转化生成 CD,而 CD 能吸附培养基中的色素刚果红和甲基橙形成透明圈,且透明圈越大,就能反映 CGTase 活性越大等酶催化作用效果特征,通过在筛选培养基分别添加一定量的色素以及控制适当的琼脂浓度,将土壤样品在无菌条件下分别进行 10 倍梯度稀释,制成  $10^{-1} \sim 10^{-8}$  系列,然后分别取 0.2 mL 不同稀释度的样品涂布筛选培养基,37℃ 培养 3d 后,选取产生透明圈较大的菌落转接到 PDA 平板进行菌株纯化后,挑出,斜面保藏。

1.2.3 CGTase 生产菌种的初筛

对初步挑选出菌种的初筛采用平板分析法,将菌种依次点接在筛选培养基上,37℃ 培养 48h 后,对菌落大小、透明圈大小和透明度进行观察测定,筛选 CGTase 活性可能比较高的菌株作为初筛选出菌种。

1.2.4 CGTase 生产菌种的复筛

对初筛选出的菌种进行复筛,将各菌种接种于摇瓶发酵培养基,37℃ 摇瓶培养 48 h。发酵液在 3 000 r/min 低温离心 10 min 除菌体,得上清液,测定酶活。

1.2.5 CGTase 转糖基活性的测定

根据 Jun 等人的方法<sup>[5]</sup>进行适当改进,4%糊化淀粉 2 mL,2% L-抗坏血酸 2 mL 和发酵上清液 2 mL,在 pH6.25,45℃ 条件下反应 20 h,然后加入 0.2 mL 的 1mmol/L CuSO<sub>4</sub> 除去未反应的残余 L-抗坏血酸,再向反应体系中加入 10U 的 α-葡萄糖苷酶,40℃ 反应 16 h。不加发酵液的作为空白对照。反应液稀释 50 倍后在 260 nm(紫外分光光度计)下测定其吸光度值,根据不同浓度的 AA-2G 标准品制作标准曲线,并用于定量分析计算各发酵样品中 AA-2G 含量。1 酶活单位(1U)定义为上述条件下,将底物转化生成 10mg 的 AA-2G 产物所需的酶量。

2 结 果

2.1 产酶微生物的分离

有报道,含有 CGTase 的微生物可以利用纤维素或(和)淀粉作为碳源,因此,选择土样时挑选了含有丰富纤维素或淀粉的腐生土样,腐生土样的不同稀释度下可产生透明圈的菌落数大大多于其他土样,其中  $10^{-7}$  稀释度的腐生土样平均每个培养皿有 16 个可形成透明圈的菌落,而其他土样在同样稀释度下平均仅有 7 个形成透明圈的菌落。不同土壤中样品的基本情况见表 1,共挑选得到 85 株初筛菌株。

表 1 不同土壤样品的基本情况

编号	采集地点	土壤类型	pH 值	土壤所含菌类	形成透明圈微生物菌落数( $10^{-7}$ )
1	元大都遗址公园	壤土	6.0	放线菌,细菌,真菌	4
2	元大都遗址公园	沃土	6.5	放线菌,细菌	8
3	元大都遗址公园	腐生土	6.1	放线菌,细菌,真菌	15
4	星吧路旁湖边树林	壤土	6.4	放线菌,细菌,霉菌	5
5	星吧路旁湖边树林	沃土	6.0	放线菌,细菌	7
6	星吧路旁湖边树林	腐生土	6.0	放线菌,细菌,真菌	16
7	北大未名湖边小树林	壤土	6.2	放线菌,细菌	5
8	北大未名湖边小树林	沃土	6.4	放线菌,细菌	9
9	北大未名湖边小树林	腐生土	6.2	放线菌,细菌,真菌	16

2.2 初筛与复筛

首先将挑选出的 85 株菌种进行初筛分析,绝大部分微生物都可以在筛选培养基平板上很好地生长,并显示出典型的红色到深红色的菌落形态特征和清晰透明的浅黄色到橙黄色的透明色圈,菌落直径与透明圈直径的比值从 0.25 到 0.76 不等。但也有少部分菌株在筛选培养基平板上不生长,菌落极小,或者透明色圈不明显,很模糊,因此,这部分菌株均淘汰弃去。对得到的 72 株菌株进行复筛。

复筛时通过摇瓶培养测定 CGTase 活性。其中,在初筛平板上表现出透明圈较大、色泽特征明显、清晰透亮的 9 株微生物的菌落直径、透明圈直径、透明

度及酶活分析结果如表 2 所示。

表 2 复筛菌种的培养结果

菌株	菌落大小 /mm	透明圈直径 /mm	透明度	酶活 /U · mL <sup>-1</sup>
YS-6	12	35	+++	2.56
YS-13	15	37	+++	2.65
YS-19	15	40	++	2.90
YS-26	15	37	+++	2.76
YS-31	10	25	+++	2.07
YS-40	12	40	+++	3.15
YS-55	15	30	+++	1.98
YS-57	12	35	+++	2.53
YS-69	14	30	++	2.10

注:+++ ,透明圈透明度很好; ++ ,透明度较好; + ,透明度一般; ± ,透明度差; - ,不透明。

从表1可见,菌落直径与透明圈直径的比值从0.3到0.5,比值越小可能反映出CGTase的活性越大。其中,YS-40菌株的比值为0.3,而CGTase活性为最高的3.15 U/mL,而且透明色圈的透明度表现为清楚透亮的良好色度。

### 3 讨 论

通过对土样中的产生CGTase微生物的分离筛选结果分析发现,产酶微生物大多存在于含有较多纤维素或淀粉多糖的腐生土壤中,这进一步验证了国外学者的理论推测结果。虽然具体的生物学、生态学的理论和机理尚不清楚,可能是由于CGTase能帮助微生物来更充分地利用土壤中的纤维素或淀粉多糖。因此,这一土壤选择的出发点是合理的。

产酶微生物分离筛选过程中,首先筛选模版的设计非常重要,简单、便利、快捷、经济性,而且针对性强、特异性高是主要关键因素。实验根据CGTase的催化作用特性,经前期初步试验分析比较后,确定了筛选培养基和分析鉴别判断标准,实验结果也证明这一方法确实可行。菌种初筛培养10 h左右后开始形成菌落,同时菌落周围开始出现透明圈,即微生物合成并分泌到胞外的CGTase利用培养基中的淀粉生成了CD,CD吸附了周围的刚果红和甲基橙色素而出现了透明圈,因此,琼脂种类与用量控制也很关键。通过对复筛数据的分析,发现菌落大小相差不大时,透明圈越大,透明度越好,CGTase转糖基活性越高,菌落直径与透明圈直径的比值在0.4以下的菌株表现了较高的酶活性,而且稳定性好,色泽清晰。其中,YS-19和YS-40的2菌株的透明圈直径均为40 mm,酶

活力分别达到了2.90 U/mL和3.15 U/mL。虽然国内外有关CGTase活性单位的定义不尽一致,但从本研究分离筛选得到的微生物菌株所表现出的酶活水平来看,YS-40已呈现出接近国外最高活力的CGTase酶性水平。

总之,通过本研究所设计的筛选培养基以及菌落形成透明圈与色泽特征分析鉴别的筛选CGTase微生物的方法可行,快捷、有效,大大降低了菌种筛选过程中的工作量,为生物转化法生产AA-2G提供了有利保障。

### 参 考 文 献

- 1 Alexandra Tonkova, Bacterial cyclodextrin glucanotransferase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22: 678~686
- 2 Takano T, Fukuda M, Monma M, et al. Molecular cloning, DNA nucleotide sequencing and expression in *Bacillus subtilis* cells of the *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene [J]. J Bacteriol, 1986, 166: 1 118~1 122
- 3 Terada Y, Yanase M, Takata H, et al. Cyclodextrins are not the major cyclic  $\alpha$ -1,4-glucans produced by the initial action of cyclodextrin glucanotransferase on amylase[J]. J Biol Chem, 1997, 272: 15 729~15 733
- 4 黄敏,袁娟平. 生物转化法生产2-O- $\alpha$ -D-吡啶型葡萄糖基-L-抗坏血酸的研究进展[J]. 工业微生物, 2004, 34(2): 41~44
- 5 Hong-Ki Jun. Studies on the synthesis of 2-O- $\alpha$ -glucopyranosyl L-ascorbic acid cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus* sp. JB-13[J]. Journal of Food and Nutrition, 1998, 3(3): 225~229
- 6 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术书册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 394~400

## Screening of High Cyclodextrin Glucanotransferase Productive Microbial Strains

Yuan Puwei<sup>1,2</sup>, Huang Jianxin<sup>1</sup>, Wang Zhang<sup>2</sup>

1 (College of Life Science, Northwest University, Xi-An 710069, China)

2 (China National Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

**ABSTRACT** Cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) is a unique enzyme that catalyzes the conversion of starch and dextrin to cyclodextrin (CD), which absorbs congo red and methyl orange contained in the selective medium and forms clear and transparent color zone. The size and the clearance of the transparent zone can refer the activity of CGTase transglucosylation. After the primary isolation and secondary screening, 2 strains named YS-19 and YS-40 with high transglucosylation potential were obtained. Their activity were 2.90 U/mL and 3.15 U/mL, respectively.

**Key words** cyclodextrin glucanotransferase (CGTase), screening, soil microorganisms, transparent zone