

枯草芽孢杆菌 BF7658 α -淀粉酶的性质

王桂芬* 蒋如璋 吴立云 陈启民 耿运琪

(南开大学生物系生物工程研究室, 天津)

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) BF7658 产生的 α -淀粉酶 (EC 3.2.1.1) 在免疫学上与解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 产生的液化型 α -淀粉酶相同。并且二者的 α -淀粉酶的淀粉水解产物的层析谱带相同, 分子量相等(约 55000 道尔顿), 等电点相近 (5.12 和 5.28); *B. subtilis* Marburg 168 α -淀粉酶分子量为 64000 道尔顿, 等电点为 6.12。因此, *B. subtilis* BF7658 产生的 α -淀粉酶是液化型 α -淀粉酶。因而建议将 *B. subtilis* BF7658 改名为 *B. amyloliquefaciens* BF7658。

关键词 枯草芽孢杆菌 BF7658; 解淀粉芽孢杆菌; 液化型 α -淀粉酶; 糖化型 α -淀粉酶

工业上生产中温 α -淀粉酶的主要菌种为枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 和解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens*。二者产生的酶虽都是中温酶, 但理化特性明显不同: 前者产生的 α -淀粉酶属糖化型^[1-5], 后者为液化型^[3, 5-8]。这两种类型的酶的免疫学性质也不同, 无论是采用 Ouchterlony 双向扩散平板法还是液体中和法都无交叉免疫反应的迹象^[3-7]。说明这两种类型酶的高级结构相差甚远。另一方面, 不同菌株产生的糖化型淀粉酶以及不同菌株甚至不同菌种产生的液化型 α -淀粉酶与相应的型代表种的抗血清之间都具有明显的交叉反应^[1, 3, 5, 6, 9, 10]。说明型内蛋白质高级结构的相似性。

我们由于基因工程研究的需要, 对我国 α -淀粉酶产生菌 *B. subtilis* BF 7658 产生的 α -淀粉酶的性质进行了比较研究, 结果证明该酶与 *B. subtilis* 168 产生的糖化型 α -淀粉酶的分子量、等电点和交叉免疫反应以及淀粉水解产物不同, 而与 *B. amyloliquefaciens* 产生的液化型 α -淀粉酶的性质相近。

材料和方法

(一) 菌株

B. subtilis 168 由中国科学院遗传研究所提供。*B. subtilis* BF7658 由天津酶制剂厂提供。*B. amyloliquefaciens* AS1.1099 由中国科学院微生物所提供。

(二) 培养基

LB^[11] 固体培养基用作斜面和平板培养基, 液体产酶培养基为含 2% 淀粉及 2 mmol/L CaCl_2 的 LBS 培养基。

(三) 淀粉酶样品的制备

将待测菌株接种 LBS 培养基, 37℃ 摇床培养 30h, 收集发酵液, 并于 5000 r/min 离心除菌体, 含酶上清液以 90% 饱和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 于 4℃ 盐析过夜, 8000 r/min 离心 15 min。沉淀溶于 10 mmol/L Tris-HAc pH 7.5 (含 2 mmol/L $\text{Ca}(\text{Ac})_2$) 缓冲液中, 并对相同缓冲液透析, 过 DEAE 纤维素柱。经三倍柱体积缓冲液洗去非吸附杂质后, 用 0.02—0.5 mol/L NaCl 梯度洗脱。收集活性部分, 浓缩后再对 2 mmol/L $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ 透析, 即为 α -淀粉酶样品。

(四) 酶活力测定

本文于 1987 年 6 月 19 日收到。

* 生物系中心实验室。

以 Fuwa 法^[12]测定 α -淀粉酶活性, 酶活性单位定为 37℃ 保温 10 min 水解 1 mg 可溶性淀粉的酶量。

(五) 酶和试剂

B. subtilis BF7658 的精制 α -淀粉酶由中国科学院微生物研究所惠赠; *B. amyloliquefaciens* α -淀粉酶 (Sigma A6380) 购自 Sigma 公司。

(六) 抗血清的制备

将 Sigma 商品 α -淀粉酶和 BF7658 精制 α -淀粉酶分别与含卡介苗的完全 Freund 佐剂混合, 注射纯种非近交系喜马拉雅雌性家兔, 每次注射液内含 1 mg α -淀粉酶, 经四次注射(第一周两次, 以后每周一次)后, 取血检测效价, 适时由心脏取血, 置室温 4h, 并 4℃ 过夜, 取血清。抗血清经 56℃ 处理 30 min, 使补体失活后, 分装小瓶, 置 -20℃ 冷藏备用。

(七) 免疫交叉反应

采用 Ouchterlony 双向扩散平板法^[13]和液体中和法^[14]。

(八) 蛋白质电泳

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳按 Laemmli 方法^[15]进行。采用 6—16% 梯度胶。以考马斯亮兰 R-250 显色。 α -淀粉酶复性按 Freidberg 操作^[16], 复性用含 2 mmol/L $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ 水溶液。复性后将凝胶铺在含 0.1% 的可溶性淀粉的 1% 琼脂糖平板上, 置 50℃ 保温 1h 40min 后, 用碘蒸汽显活性带。

等电聚焦电泳在 Pharmacia 公司的恒功率电源 ECPS 3000/150 和平床电泳仪 FBE3000 上进行。基本操作按该公司推荐的方法。两性电解质 Pharmalyte 3—10; 以等电点测定校正盒 (pI 3.5—10.3) 为样品 pI 值校正参比物。

(九) 淀粉水解产物的薄层层析

采用欧阳章报导的方法^[17], 硅胶 G 中含 0.05% 羧甲基纤维素。

结 果

(一) 淀粉酶的免疫学比较

采用 Ouchterlony 双向扩散法测定了 *B. amyloliquefaciens* AS1.1099 和 *B. subtilis* BF7658 产生的 α -淀粉酶对 Sigma

α -淀粉酶抗血清的沉淀反应, 结果显示, 彼此都能形成连续的沉淀线; 而 *B. subtilis* 168 α -淀粉酶与抗血清之间不形成沉淀线 (图 1)。

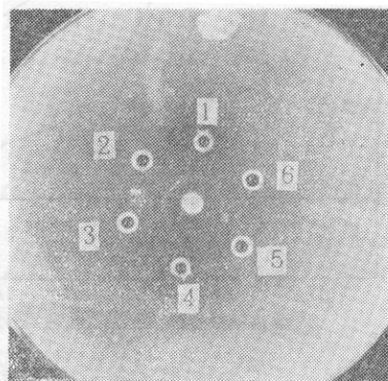


图 1 不同 α -淀粉酶样品的双向免疫扩散测验
中央孔内为抗 α -淀粉酶 (Sigma A6380) 兔血清; 1 和 4 孔为 BF7658 α -淀粉酶 (本室制备); 2 孔为 BF7658 α -淀粉酶; 3 和 6 孔为 AS1.1099 α -淀粉酶; 5 孔为 168 α -淀粉酶。

Fig. 1 Double immunodiffusion test of α -amylases

Center well: antiserum raised against commercial *B. amyloliquefaciens* α -amylase (Sigma A6380); well 1 & 4: BF7658 α -amylase (this lab.); well 2: BF7658 α -amylase; well 3 & 6: AS1.1099 α -amylase; well 5: 168 α -amylase.

Sigma 的 α -淀粉酶抗血清对不同来源 α -淀粉酶的中和能力见图 2。中和效率虽有差别, 但 AS1.1099 和 BF7658 α -淀粉酶都能被中和, 而对 *B. subtilis* 168 α -淀粉酶全无中和作用。这一结果与 Ouchterlony 双向扩散法测定结果一致。

(二) 分子量及等电点测定

采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定 BF7658 和 AS1.1099 α -淀粉酶的分子量相等, 约为 55000 道尔顿; 168 α -淀粉酶的分子量约为 64000 道尔顿 (图 3)。用等电聚焦电泳测定三者的等电点分别为 5.12 和 5.18、5.28 和 5.42 以及 6.12 (图 4)。即 BF7658 α -淀粉酶的分子量和等电点都更接近于 *B. amyloliquefaciens*。

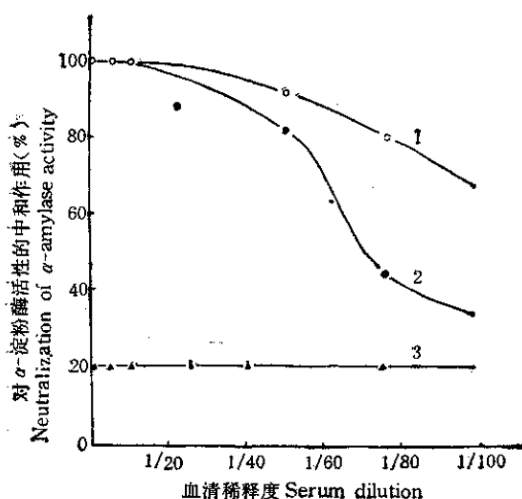


图2 不同稀释度的 α -淀粉酶 (Sigma 产品) 抗血清对 α -淀粉酶活力的中和作用

Fig. 2 Neutralisation of the activity of α -amylases by antiserum against α -amylase (Sigma)

1. 1.48 units of α -amylase from AS1.1099
2. 1.52 units of α -amylase from BF7658
3. 1.40 units of α -amylase from 168

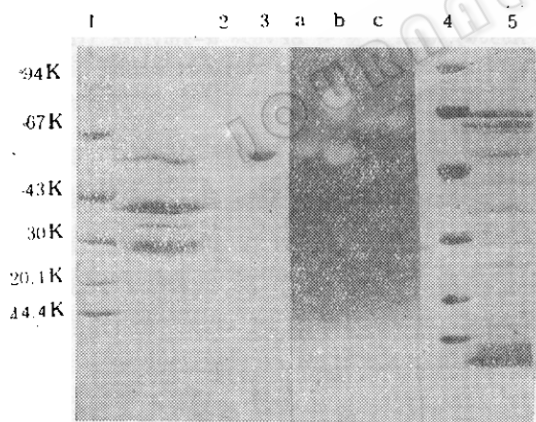


图3 α -淀粉酶 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

- 1, 4. 分子量标准 (Pharmacia); 2. BF7658 α -淀粉酶; 3. AS1.1099 α -淀粉酶; 5. 168 α -淀粉酶; a, b 和 c 示与 2, 3 和 5 相对应的 α -淀粉酶活性带的位置。

Fig. 3 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of α -amylases

- Lanes 1, 4. molecular weight markers; 2. BF7658 α -amylase; 3. AS 1.1099 α -amylase; 5. 168 α -amylase; a, b, c. show α -amylase activity bands correspond to lanes 2, 3 and 5.

(三) 酶解产物的薄层层析

可溶性淀粉经不同来源的 α -淀粉酶彻底水解的产物的薄层层析谱见图5。*B. subtilis* BF7658 α -淀粉酶和*B. amylo-liquefaciens* AS1.1099 α -淀粉酶的淀粉水解产物相同。可以明显区分为葡萄糖、

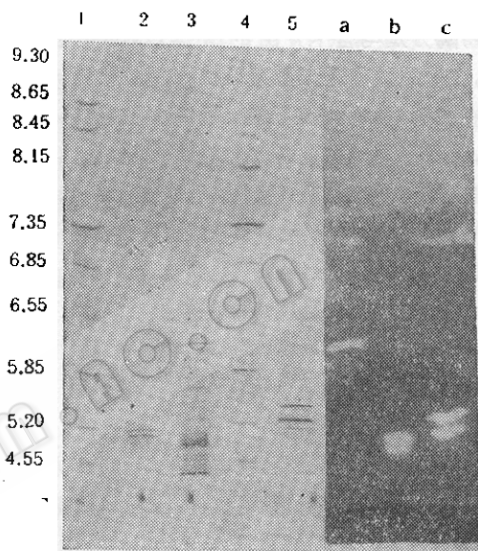


图4 α -淀粉酶的等电聚焦电泳

- 1, 4: pI 标准 (pI 3.5—10.3) (Pharmacia); 2: BF7658 α -淀粉酶 (pI=5.12 和 5.18); 3: 168 α -淀粉酶 (pI=6.12); 5: AS1.1099 α -淀粉酶 (pI=5.28 和 5.42); a, b 和 c 分别示 168、BF7658 和 AS1.1099 α -淀粉酶活性带的位置

Fig. 4 Isoelectric focusing electrophoresis of α -amylases

- Lanes 1 and 4: calibration kit for pI (pI 3.5—10.3, Pharmacia); 2: BF7658 (pI = 5.12 and 5.18); 3: *B. subtilis* 168 (pI = 6.12); 5: *B. amyloliquefaciens* AS1.1099 (pI = 5.28 and 5.42); a, b and c: active bands of α -amylase 168, BF7658 and AS1.1099 respectively.

麦芽糖、麦芽三糖等5个斑点。而*B. subtilis* 168 α -淀粉酶的淀粉水解产物基本上为葡萄糖和麦芽糖。

讨 论

长期以来国内科研、生产和使用单位

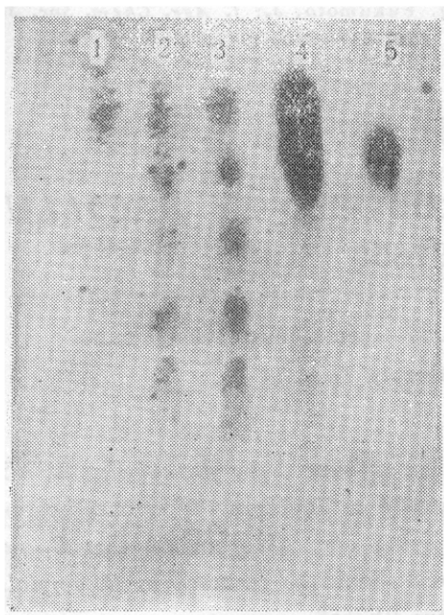


图5 不同 α -淀粉酶彻底水解可溶性淀粉其产物的薄层层析谱

1: 葡萄糖; 2: AS1.1099 α -淀粉酶; 3: BF7658 α -淀粉酶; 4: 168 α -淀粉酶; 5: 麦芽糖

Fig. 5 Pattern of thin layer chromatography of soluble starch digested completely by different α -amylases

Lanes 1: glucose; 2: AS1.1099 α -amylase; 3: BF7658 α -amylase; 4: 168 α -amylase; 5: maltose

都认为 BF7658 α -淀粉酶的生产菌是 *B. subtilis*, 它所产生的是糖化型 α -淀粉酶, 然而本研究明确证明 BF7658 α -淀粉酶属液化型 α -淀粉酶。因为已知 *B. subtilis* 包括标准种 *B. subtilis* 168、W23 以及 *B. amylosaccharide* 和 *B. natto* 等产生的属糖化型 α -淀粉酶, 它们都能与针对 *B. subtilis* 168 α -淀粉酶制备的抗血清作用表现交叉免疫反应, 与液化型 α -淀粉酶全无交叉免疫反应^[4]。而 BF7658 α -淀粉酶与预期相反, 它只与针对抗 *B. amyloliquefaciens* 产生的液化型 α -淀粉酶制备的抗血清呈现交叉免疫反应。这说明 BF7658 α -淀粉酶的高级结构与 *B. amyloliquefaciens* 的液化型 α -淀粉酶相似, 而与 *B. subtilis* 糖化型 α -淀粉酶不同。

本文报导 BF7658 α -淀粉酶的等电点、分子量以及淀粉水解终产物成分都与 *B. subtilis* 168 不同, 而与 *B. amyloliquefaciens* α -淀粉酶接近或相同, 因而认为 *B. subtilis* BF7658 应是 *B. amyloliquefaciens* 的一个菌株。

B. amyloliquefaciens Fukumoto^[17,18] 作为一个独立物种是 1967 年正式从 *B. subtilis* 中分出来的^[15,9]; 而我国使用 BF7658 生产 α -淀粉酶始于 1965 年。因此 *B. subtilis* BF7658 的种名可能有误。至于根据上述资料 *B. subtilis* BF7658 是否应改为 *B. amyloliquefaciens* BF7658 或者称之为 *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* BF7658 还有待进一步商榷。

参 考 文 献

- [1] Mantsula, P. et al.: *J. Biol. Chem.*, 254: 8540—8547, 1979.
- [2] Yamazaki, H. et al.: *J. Bact.*, 156: 327—337, 1983.
- [3] Matruzaki, H. et al.: *Biophys. Bioch. Acta*, 365: 248—258, 1974.
- [4] Yamane, K. et al.: *Biophys. Bioch. Acta*, 295: 323—340, 1973.
- [5] Welker, N. E. et al.: *J. Bact.*, 94: 3681—3689, 1967.
- [6] Welker, N. E. et al.: *Biochem.*, 6: 3681—3689, 1967.
- [7] Takkiner, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 258: 1007—1013, 1983.
- [8] Chang, H. et al.: *Biochem. J.*, 185: 385—395, 1980.
- [9] Welker, N. E. et al.: *J. Bact.*, 94: 1124—1130, 1967.
- [10] Nakajima, R. et al.: *J. Bact.*, 163: 401—406, 1985.
- [11] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- [12] Fuwa, H. J.: *Biochem.*, 41: 583—603, 1954.
- [13] Ouchterlony, Ö.: *Handbook of Experimental Immunology*, (ed. Wein, D. H.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 655—705, 1967.
- [14] Laemmli, U. K.: *Nature*, 227: 680, 1977.
- [15] Friedberg, F. et al.: *J. Bact.*, 165: 819—824, 1986.
- [16] 欧阳章: *食品科学*, 1: 35, 1981.

[17] Fukumoto, J.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 19: 487—503, 1943.

[18] Fukumoto, J.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 19: 634—640, 1943.

PROPERTIES OF α -AMYLASE PRODUCED BY *BACILLUS SUBTILIS* BF7658

Wang Guifen Jiang Ruzhang Wu Liyun Chen Qimin Geng Yunqi

(Department of Biology, Nankai University, Tianjin)

The α -amylase (1,4-D-glucan glucanohydrolase; EC 3.2.1.1) produced by *B. subtilis* BF7658 immunologically is related to one produced by *B. amylolique faciens*. The same band patterns of starch hydrolysete hydrolysed by both kind of enzyme are shown on thin layer chromatography, but quite different from that of *B. subtilis* 168. Their molecular weight are the same (about 55000 daltons), and isoelectric points are very close (5.12 and 5.28). Therefore we conclude that the α -

amylase produced by *B. subtilis* BF7658 is belong to a liquefying type one, not a saccharifying one. We suggest that *B. subtilis* BF7658 should be renamed as *B. amylolique faciens* BF7658.

Key words

Bacillus subtilis BF7658; *Bacillus amyloliquefaciens*; Liquefying type α -amylase; Saccharifying type α -amylase