

嗜碱菌碱性淀粉酶的研究*

田新玉 马延和 周培瑾 王大珍

(中国科学院微生物研究所, 北京)

分离自内蒙古自治区察汗淖碱湖的嗜碱菌株 No. 10-1, 好气, 运动, 细胞杆状, 革兰氏染色阴性。该菌生长 pH 范围为 8.0—13.0, 最适生长 pH 10.0—11.0, 为专性嗜碱菌。在含淀粉培养基中产生胞外碱性淀粉酶, 最适产酶条件是: 碳源为土豆淀粉, 氮源为复合蛋白胨, NaCl 浓度为 2.0%, Na_2CO_3 浓度为 1.0—1.5% (pH 9.9—10.5)。酶的最适反应 pH 为 10.0, 稳定 pH 8.0, 最适反应温度为 50℃。作用于直链淀粉其水解产物为 β -构型, 主要产物是麦芽糖, 其次为麦芽三糖、葡萄糖和麦芽四糖。嗜碱菌 No. 10-1 产生的酶为碱性 β -淀粉酶。

关键词 嗜碱菌; 碱性 β -淀粉酶

淀粉酶是最早研究的酶类之一, 中性或酸性淀粉酶已在食品、纺织和医药等工业广泛应用^[1]。随着工业发展, 不断要求具有新性质的酶, 碱性淀粉酶就是其中之一。这类酶最适反应 pH 在碱性范围, 与其他酶配合可作为洗涤剂的添加剂、用于纺织品退浆, 以及淀粉作粘结剂的粘度调节剂等^[2]。七十年代以来已报道了许多嗜碱菌产生的碱性淀粉酶^[3]。1972 年发现芽孢杆菌的 β -淀粉酶其最适 pH 为 9.2^[4], 相继还发现嗜碱芽孢杆菌产生最适 pH 10.0 的 α -淀粉酶^[5], 嗜碱假单胞菌产生耐 pH 10.0 的 α -淀粉酶^[2], 形成麦芽六糖的碱性 α -淀粉酶等^[6], 1989 年, Nakamura 详细地叙述了碱性淀粉酶的研究状况^[7]。

本文报道了产碱性淀粉酶菌株的分离, 筛选, 产酶条件和酶的某些性质。

材料和方法

(一) 样品来源

用于分离菌种的样品采自内蒙古自治区乌杜淖、察汗淖和哈马台等天然碱湖的底泥和水样。

(二) 培养基及分离筛选方法

分离菌种采用修饰的 Horikoshi^[8] 培养基 (g/L): 可溶性淀粉 20.0, 复合蛋白胨 (polypeptone) 5.0, 酵母粉 5.0, K_2HPO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, NaCl 5.0, Na_2CO_3 10.0, Na_2CO_3 单独灭菌, 用前混合。固体培养基加 1.5% (W/V) 洋菜。

少量样品悬浮于无菌水中, 取一两滴悬浮液直接涂平板, 于 37℃ 培养 24—48 小时, 挑选单菌落划线纯化。纯化的菌株再于固体平板上培养, 喷洒 KI-I₂ 溶液, 菌落周围形成无色透明圈者为具有水解淀粉能力的菌株。然后接入液体培养基, 37℃ 振荡培养两天, 测定酶活力, 以筛选酶的高产菌株。

(三) 菌种特征鉴定

主要根据《伯杰氏细菌学鉴定手册》(第八版)^[8]和《一般细菌常用鉴定方法》^[9]进行初步鉴定, 使用的培养基添加 1.0% (W/V) Na_2CO_3 。

(四) 产酶条件试验

基础培养基改变碳源、氮源及其他无机盐含量, 确定最佳产酶条件。

本文于 1990 年 2 月 5 日收到。

* 本课题为国家自然科学基金资助项目。

(五) 粗酶制备

250ml 三角瓶中装 50ml 培养基, 接种斜面菌体, 37℃ 振荡培养 24 小时作种子液, 按接种量 1% (V/V) 转接于装在 500 ml 三角瓶(内装 100ml 培养基)中, 于 37℃ 振荡培养 30 小时后 $10000 \times g$ 离心 20 分钟除去菌体, 向上清液中缓慢加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 75% 饱和度, 置 4℃ 过夜, 离心收集沉淀物, 并溶于小量缓冲液 (0.05 l/omL $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, pH8.0) 中, 对相同缓冲液透析, 透析后的酶液即为粗酶液。

(六) 酶活力测定

用修饰的碘兰值方法测定酶活力^[10]。加 KI-I_2 溶液显色后, 用 721 型分光光度计测定 A_{700} 。规定每分钟水解 $100 \mu\text{g}$ 淀粉所需的酶量为 1 个淀粉酶活力单位。

(七) 水解产物的分析

于 37℃ 用适当稀释的酶液水解直链淀粉, 并于不同反应时间取样, 在 Whatman No. 1 滤纸上层析, 溶剂系统为醋酸乙酯:吡啶:水(12:5:4, V/V), 用 AgNO_3 显色剂显色。

(八) 旋光度测定

按修饰的 Robyt 和 French 方法^[11]测定底物被降解产生的异头碳原子构型。底物为 0.2% (W/V) 直链淀粉(溶于 0.02 mol/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液, pH 7.5)。将 10ml 用相同缓冲液稀释的酶液加到 50ml 底物中, 并做对照。50℃ 反应 60 分钟后, 将降解液及对照调至 pH6.5, 用 Perkin-Elmer 241 型旋光仪测旋光度, 然后再将降解液和对照用 NaOH 溶液调至 pH10.0 测旋光度。

(九) 试剂

可溶性淀粉和土豆淀粉为上海化学试剂厂产品, 复合蛋白胨为日本大五荣化学株式会社产品, 直链淀粉为 Sigma Chemi-

cal Co. 产品。

结 果

(一) 嗜碱菌 No. 10-1 的特征

菌株 No. 10-1 分离自内蒙古自治区察汗淖碱湖泥沙样品, 从 258 株菌中筛选出淀粉酶活力较高的菌株。该菌细胞杆状, 运动, 严格好气; 革兰氏染色阴性, 接触酶阴性, 可水解凡明胶、酪蛋白和淀粉, 还原硝酸盐成硝酸盐。最适生长 NaCl 浓度为 5.0% (W/V), NaCl 浓度高于 8.0% (W/V) 不生长。该菌生长的 pH 范围 8.0—13.0, 最适生长 pH 为 10.0—11.0, 属于专性嗜碱菌。关于该嗜碱菌的分类学地位将另作报道。

(二) 产酶条件

1. 碳源和氮源对生长和产酶的影响:

菌株 No. 10-1 在含不同碳源和氮源培养基中培养 30 小时后以 A_{660} 表示生长, 用常规法测定无细胞提取液的酶活力。试验结果(表 1)表明, 土豆淀粉、木薯淀粉和可溶性淀粉均能促进细胞生长及酶的生物合成, 而葡萄糖、蔗糖和乳糖等虽适合菌体生长, 但产酶量很低。

氮源对生长和产酶的影响(表 2)表明, 复合蛋白胨和酵母粉为最适氮源, 该菌几乎不利用无机氮源生长和产酶。

2. Na_2CO_3 浓度对生长和产酶的影响:

菌株 No. 10-1 在含不同 Na_2CO_3 浓度的液体培养基中, 振荡培养 30 小时后, 测定生长与产酶活力, 检测结果(图 1)表明, 最适生长 Na_2CO_3 浓度为 0.5—1.5% (W/V), 无 Na_2CO_3 时几乎不生长, 当浓度超过 2.0% 时细胞生长受抑制, 酶活下降。由此看来, 最适产酶的 Na_2CO_3 浓度为 1.0—1.5% (W/V), 与此相应的 pH 为 9.9—10.5。

3. NaCl 浓度对细胞生长和产酶的影响

表 1 不同碳源对生长和产酶的影响

Table 1 Effects of various carbon sources on growth and amylase formation

碳源 Carbon sources	细胞生长 Growth (OD ₅₅₀)	相对活力 Relative activity(%)
土豆淀粉 Potato starch	0.840	100
小麦淀粉 Wheat starch	0.840	79
可溶性淀粉 Soluble starch	0.960	95
玉米淀粉 Corn starch	1.050	85
木薯淀粉 Cassava starch	0.836	90
糊精 Dextrin	0.760	84
葡萄糖 Glucose	0.650	15
麦芽糖 Maltose	0.632	60
蔗糖 Sucrose	1.030	15
乳糖 Lactose	0.765	14

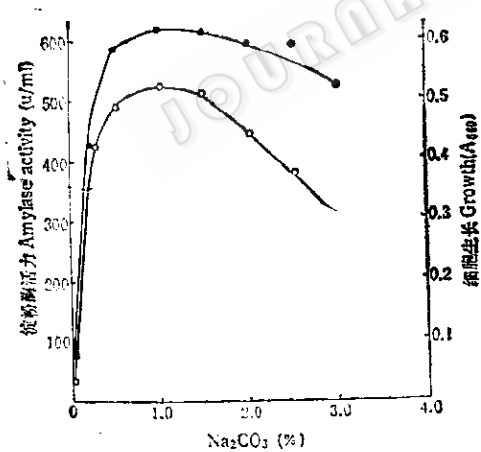


图 1 碳酸钠浓度对生长和产酶的影响

Fig. 1 Effect of Na_2CO_3 concentration on growth and amylase formation

○——○ 菌生长 Growth;
●——● 酶活力 Enzyme activity

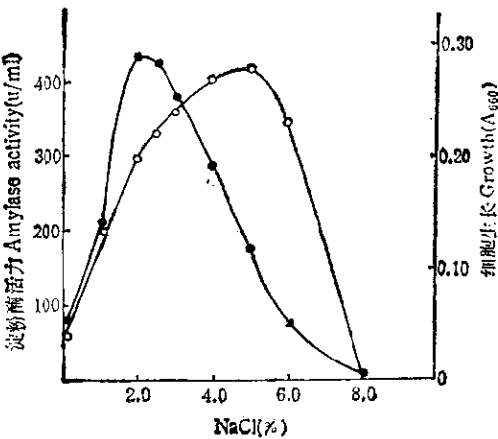


图 2 NaCl 浓度对生长和产酶的影响

Fig. 2 Effect of NaCl concentration on growth and amylase formation

○——○ 菌生长 Growth;
●——● 酶活力 Enzyme activity

响：嗜碱菌 No. 10-1 在碱性培养基中生长和产酶均受 NaCl 浓度的影响 (图 2)，

无 NaCl 或 NaCl 浓度超过 8.0%(W/V)

表2 不同氮源对生长和产酶的影响

Table 2 Effect of various nitrogen sources on growth and amylase formation

氮源 Nitrogen sources	细胞生长 Growth (OD ₆₆₀)	相对活力 Relative activity (%)
复合蛋白胨 Polypeptone (大丘类)	0.655	100
酵母膏 Yeast extract (Oxoid)	0.655	81
细菌蛋白胨 Bact. peptone (Difco)	0.565	52
酵母膏 Yeast extract (Difco)	0.545	43
水解酪素 Casamino acid (Difco)	0.195	7.4
牛肉膏 Beef extract (上海)	0.255	19
细菌蛋白胨 Bact. peptone (Oxoid)	0.345	63
胰蛋白胨 Tryptone (Difco)	0.408	54
大豆粉 Soya bean powder	0.395	2
玉米浆 Corn steep liquor	0.755	0
尿素 Urea	+	20
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	0
NH ₄ Cl	-	0
NH ₄ CH ₃ COO	-	0
NH ₄ H ₂ PO ₄	+	3

+: 略生长 Weak growth; -: 不生长 No growth

时,菌的生长和产酶量均受抑制,最适生长 NaCl 浓度为 5.0% (W/V),产酶的最适浓度为 2.0% (W/V)。

通过条件试验确定了菌株 No. 10-1 产碱性淀粉酶的培养基成份如下 (g/L): 土豆淀粉 15.0, 复合蛋白胨 10.0, K₂HPO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.2, NaCl 20.0, Na₂CO₃ 15.0。

在装有 100ml 上述培养基的 500ml

三角瓶中,接种 1% (V/V) 的种子液,于 37℃, 230r/min 旋转摇床上振荡培养,不同时间取样,测定细胞生长和产酶时间过程,以及 pH 变化。结果表明(图 3),该菌在碱性培养基中生长很快,培养 16 小时达到静止期,约 28 小时酶活力最高,达到 800u/ml。培养液 pH 随菌体生长略发生变化,开始从 10.5 降至 9.0,最后回升到 pH9.3。

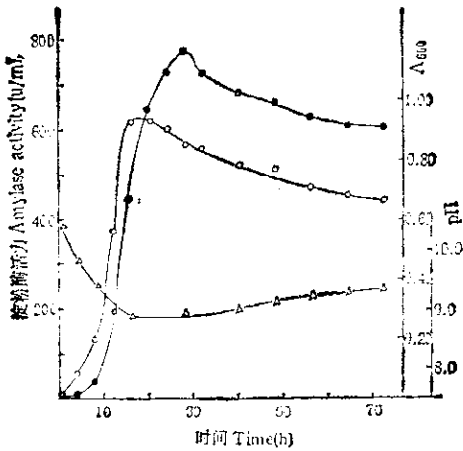


图3 嗜碱菌 No. 10-1 产生淀粉酶的时间曲线

Fig. 3 Time course of amylase formation by alkalophilic bacterium No. 10-1

- 菌生长 Growth;
- 酶活力 Enzyme activity;
- △—△ pH

(三) 碱性淀粉酶的某些性质

1. pH 对酶活力和稳定性的影响: 将酶与底物在不同缓冲液中进行反应 (0.05 mol/L 醋酸钠-醋酸缓冲液, pH4.0—5.0; 0.05mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液, pH6.0—8.0; 0.05mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液, pH9.0—10.0; 0.05mol/L Na_2CO_3 -NaOH 缓冲液, pH11.0—13.0), 测定酶活力, 测定结果(图 4-A)表明, 该酶在 pH 10.0 时显示最高酶活力。

测定 pH 对酶稳定性影响是将酶在上述不同缓冲液中, 于 45℃ 保温 20 分钟, 然后按常规方法测剩余酶活力。测定结果(图 4-B)表明, 该酶在 pH8.0 时稳定性最好。

2. 温度对酶活及稳定性的影响: 在图 5 所示的不同温度按常规方法测定酶活力。测定结果(图 5-A)表明, 碱性淀粉酶的最适反应温度为 50℃。30℃ 时, 酶活力为最适酶活的 50%。60℃ 时, 酶活仅为最适酶活的 10%。

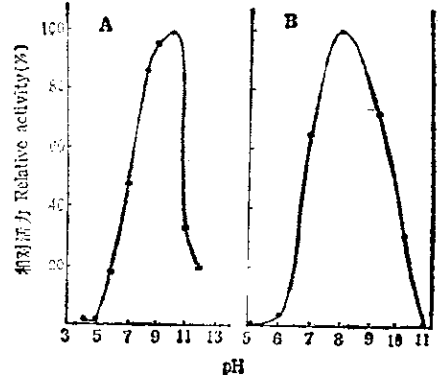


图4 pH 对酶活力 (A) 和稳定性 (B) 的影响

Fig. 4 Effect of pH on activity (A) and stability (B) of the enzyme

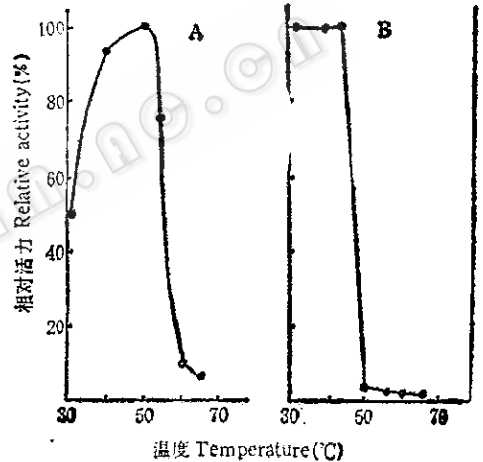


图5 温度对酶活力 (A) 及热稳定性 (B) 的影响

Fig. 5 Effect of temperature on activity (A) and heat stability (B) of the enzyme

用 pH8.0 缓冲液适当稀释的酶液, 在图 5-B 指定的温度保温 15 分钟, 然后按常规方法测定剩余酶活力, 以未保温对照酶活力为 100%。测定结果(图 5-B)表明, 30—45℃ 酶活力为 100%, 60℃ 时则完全失活。

3. 酶降解淀粉的产物分析: 0.1ml 酶液与 1.0ml 1.0% (W/V) 直链淀粉溶液 (用 NH_4OH 调至 pH10.0) 混合, 于 37℃ 保温, 在图 6 所示反应时间取样进行纸层析, 表明直链淀粉降解的最终产物是葡萄

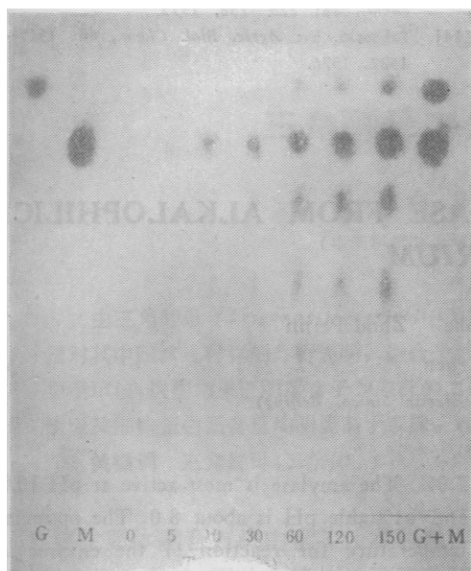


图6 碱性淀粉酶水解直链淀粉产物的纸层析谱

Fig. 6 Paper chromatogram of hydrolyzates of amylose by alkaline amylase

G: 葡萄糖 Glucose

M: 麦芽糖 Maltose

糖、麦芽糖、麦芽三糖和麦芽四糖,从图6中斑点颜色深浅判断,麦芽二糖的量大于其他糖。

相同条件下于37℃和50℃用酶降解 β -环糊精,检测结果表明,该酶不水解 β -环糊精。

4. 降解产物异头碳原子构型: 因为碱可以催化变异旋光反应,如果加碱到产生 β -构型的产物中,旋光度增加;若加碱到 α -构型的产物中,则旋光度下降^[11]。检测结果表明,酶水解底物过程中旋光度下降,反应60分钟后加碱到降解物中,旋光度增加,说明碱性淀粉酶水解直链淀粉的产物中含有 β -构型异头碳原子。由此可以认为菌株 No. 10-1 产生的酶是碱性 β -淀粉酶。

讨 论

芽孢杆菌属的菌产生 β -淀粉酶已有

许多报道^[12-14],可是直到1972年 Boyer 等^[4]才首次发现 *Bacillus* NRRL B-3881 产生的碱性 β -淀粉酶,这种酶的最适反应温度为50℃,水解淀粉的主要产物是麦芽糖,产物为 β -构型。就这方面而言,我们所得到的菌株 No. 10-1 产生的淀粉酶与芽孢杆菌 NRRL B-3881 的酶相同。然而,菌株 No. 10-1 的淀粉酶与芽孢杆菌 NRRL B-3881 的酶有两点明显区别:一是后者能水解 β -环糊精,与底物作用不需要还原末端,属于内作用(end-attack)机制,而前者不能水解 β -环糊精,属于外作用(exo-attack)机制。其次是芽孢杆菌 NRRL B-3881 的酶最适反应 pH 为9.2, pH10.0 时酶的活力只相当于 pH9.2 时的55%,菌株 No. 10-1 酶的最适反应 pH 为10.0, pH9.0 时酶活力仍保持最适酶活的90%以上,这意味着菌株 No. 10-1 的酶是迄今报道的耐碱性最高的 β -淀粉酶。有关这种酶的纯化及性质研究正在进行中。

参 考 文 献

- [1] 陈陶声:近代工业微生物学,第316—337页,上海科学技术出版社,上海,1982年。
- [2] 小林信夫等:特许可报,5272,1975。
- [3] Horikoshi, K. et al.: Alkalophilic Microorganism, A New Microbial World, p. 101—104, Japan Scientific Societies' press, Tokyo, 1982.
- [4] Boyer, E. W. et al.: *J. Bacteriol.*, 110: 992—1000, 1972.
- [5] Horikoshi, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 35: 1783—1791, 1972.
- [6] Takasaki, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 46: 1539—1547, 1982.
- [7] Nakamura, N.: *Bio. Industry.*, 16: 15—24, 1989.
- [8] Buchanan, R. E. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- [9] 中国科学院微生物研究所细菌分类组:一般细菌常用鉴定方法,科学出版社,北京,1978年。
- [10] Fuwa, H.: *J. Biochem.*, 41: 585, 1954.
- [11] Robyt, J. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 104:

- 338—345, 1964.
- [12] Tilden, E. B. et al.: *J. Bacteriol.*, **43**: 527, 1942.
- [13] Fogarty, W. M. et al.: *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **25**: 229—238, 1975.
- [14] Takasaki, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**: 1515—1522, 1976.
- [13] Fogarty, W. M. et al.: *J. Appl. Chem. Biotechnol.*

STUDIES ON ALKALINE AMYLASE FROM ALKALOPHILIC BACTERIUM

Tian Xinyu Ma Yanhe Zhou Peijin

Wang Dazhen

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The strain of alkalophilic *Bacterium* No. 10-1 isolated from Cha-han-nuo soda lake of China is an aerobic, motile, gram negative, rod shaped bacterium. It belongs to the obligately alkalophilic *Bacterium*. The *Bacterium* does not grow in neutral media and produces an alkaline amylase from alkaline media containing starch. The optimum pH for growth is about 10.0—11.0. The optimum carbon and nitrogen sources for production of the enzyme are potato starch and polypeptone, respectively. The optimum Na_2CO_3 concentration is 1.0—1.5% and NaCl

2.0%. The amylase is most active at pH 10.0 and its stable pH is about 8.0. The optimum temperature for reaction of the enzyme is 50°C at pH 10.0. The products hydrolyzed from amylose have the β -configuration. The final products are maltose, maltotriose, glucose and maltotetraose, in which maltose the main one.

Key words

Alkalophilic bacterium; Alkaline β -amylase