

## 短小芽孢杆菌 289(pBX96) $\alpha$ -淀粉酶的性质

马明 杨丽珠 王诚一 郑宏\* 蒋如璋

(南开大学生物系生物工程研究室, 天津 300071)

将巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)  $\alpha$ -淀粉酶基因克隆到短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 中获得表达。将该工程菌发酵液的上清液, 经硫酸铵分级盐析和 DEAE-纤维素柱层析, 得到纯化的  $\alpha$ -淀粉酶。此酶的最适 pH 为 6.0; 在 pH 5—8 之间稳定; 最适反应温度为 55℃; 金属离子  $Zn^{2+}$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ag^{+}$  对酶有明显的抑制作用;  $Ca^{2+}$ 、 $Na^{+}$ 、 $K^{+}$  对酶略有激活作用;  $3 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  对氯汞苯甲酸 (PCMB) 对酶有 95% 的抑制作用; 其免疫性质与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 所产生的  $\alpha$ -淀粉酶相同。

**关键词** 短小芽孢杆菌 289(pBX96);  $\alpha$ -淀粉酶; 免疫性质

蒋如璋等人由巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 克隆得到了  $\alpha$ -淀粉酶 (EC 3.2.1.1) 基因, 并在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中表达, 确定该  $\alpha$ -淀粉酶基因所编码的是糖化型  $\alpha$ -淀粉酶<sup>[1]</sup>。在此基础上, 又利用原生质体转化法将质粒 pBX96 转入短小芽孢杆菌 289 (*Bacillus pumilus* 289) 中, 获得表达水平高于枯草芽孢杆菌 (pBX96) 的菌株。

该  $\alpha$ -淀粉酶与淀粉液化芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 和地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 所产生的  $\alpha$ -淀粉酶不同, 而与枯草芽孢杆菌的  $\alpha$ -淀粉酶具有同源性, 将可溶性淀粉水解成葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖, 随水解时间的延长, 葡萄糖量增高<sup>[1]</sup>。因此在受控条件下, 可由淀粉生产糖浆用于发酵工业, 具有开发价值。本文报道短小芽孢杆菌 (pBX96)  $\alpha$ -淀粉酶的免疫学和一些酶学性质。

## 材料和方法

### (一) 菌种

枯草芽孢杆菌 168 (*Bacillus subtilis* 168)、地衣芽孢杆菌 ATCC27811 (*Bacillus licheniformis* ATCC 27811) 均系本室保藏。短小芽孢杆菌 289 (*Bacillus pumilus* 289) (pBX96) 本室构建。

### (二) 培养基

LB 培养基<sup>[2]</sup>: 用于细菌培养。LBS 培养基为含有 2% 可溶性淀粉的 LB 培养基, 用于液体发酵。

### (三) 化学试剂

DEAE-纤维素 (DE-32) 购自 Whatman 公司; 可溶性淀粉购自浙江菱湖化工厂;

本文于 1991 年 1 月 10 日收到。

\* 现址: 武汉生物制品研究所。

对氯汞苯甲酸(PCMB)为广州化学试剂厂出品; Freund 佐剂购自美国 Difco 公司; 液化型  $\alpha$ -淀粉酶、枯草芽孢杆菌 168 糖化型  $\alpha$ -淀粉酶均为本实验室自制;  $\beta$ -淀粉酶为德国 Merck 公司产品。

#### (四) 测定方法

1.  $\alpha$ -淀粉酶活性测定: 0.5ml 1% 的可溶性淀粉, 在 55℃ 恒温水浴中预热 3 分钟, 加入同时预热的酶液 0.5ml, 保温反应 3 分钟, 用 DNS 法<sup>[3]</sup>测定还原糖。在上述条件下, 每分钟水解淀粉产生 1  $\mu$ mol 麦芽糖量定为一个酶活力单位。

2. 蛋白质测定: 采用 Lowry 法<sup>[4]</sup>

#### (五) $\alpha$ -淀粉酶的纯化

将短小芽孢杆菌 289(pBX96), 接入 LBS 培养基, 37℃ 往复摇床培养 48 小时, 离心后取上清液, 以 35—65% 饱和度  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分级盐析, 盐析物经透析脱盐后上 DEAE-纤维素层析柱。收集淀粉酶高活性部分, 浓缩冻干后即为实验用酶制剂。

#### (六) 抗血清制备

将分离纯化的  $\alpha$ -淀粉酶的冻干粉溶于生理盐水, 取一定量酶蛋白与完全 Freund 佐剂混合, 注射家兔, 每次注射 0.35mg 酶蛋白, 经 4 次注射(每周一次)后, 由耳静脉取血测效价, 适时从颈动脉放血, 血液在室温放置 4 小时后分离血清, 血清在 56℃ 保温 30 分钟, 使补体失活, 分装试管, -70℃ 保存备用。

#### (七) 免疫交叉反应

采用 Ouchterlony 双向扩散平板法<sup>[5]</sup>和液体中和法<sup>[6]</sup>。

#### (八) 淀粉水解率测定

取 105℃ 恒重的可溶性淀粉 1g, 配制成 49ml 溶液, 装入带塞的试管中, 加入  $\alpha$ -淀粉酶 1ml (约 700 单位), 55℃ 保温, 不同时间取样, 测还原糖量。同一浓度的可溶性淀粉溶液, 用 25% HCl 在沸水浴中水解 2.5 小时, 中和稀释后测得的还原糖量为 100%, 计算酶对淀粉的水解率。

## 结 果 和 讨 论

#### (一) 免疫学反应

采用 Ouchterlony 双向免疫扩散法测定, 结果表明短小芽孢杆菌 289(pBX96) $\alpha$ -淀粉酶的抗血清与枯草芽孢杆菌 168  $\alpha$ -淀粉酶有免疫交叉反应, 而与地衣芽孢杆菌 ATCC 27811  $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 葡萄糖淀粉酶则无交叉反应(图 1)。采用免疫中和反应也得类似的结果, 见图 2。

由此证明, 短小芽孢杆菌 289(pBX96)  $\alpha$ -淀粉酶和枯草芽孢杆菌 168  $\alpha$ -淀粉酶具有高度同源性, 均为糖化型  $\alpha$ -淀粉酶<sup>[1,7]</sup>。

#### (二) 淀粉酶的性质

1. pH 对酶活性的影响: 在 pH 3.0—8.0 磷酸-柠檬酸缓冲液和 pH 9.0—10.0 碳酸钠缓冲溶液中测定酶活力, 结果见图 3-A。酶作用最适 pH 为 6.0。

用上述不同 pH 缓冲液分别配制  $\alpha$ -淀粉酶溶液, 在 30℃ 放置 5 小时后, 测定剩余酶活力, 该酶在 pH 5.0—8.0 范围内活性稳定。

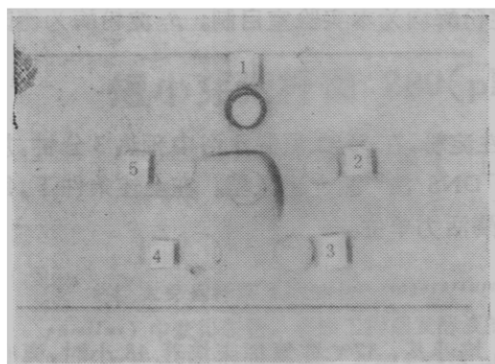


图1 不同 $\alpha$ -淀粉酶样品的双向免疫扩散

中央孔为抗 $\alpha$ -淀粉酶(短小芽孢杆菌 289 (pBX96))血清;孔1: 枯草芽孢杆菌 289  $\alpha$ -淀粉酶;孔2: 枯草芽孢杆菌 168  $\alpha$ -淀粉酶;孔3:  $\beta$ -淀粉酶;孔4: 黑曲霉葡萄糖淀粉酶;孔5: 地衣型芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶

Fig. 1 Double immunodiffusion test of different  $\alpha$ -amylases

Center well: antiserum against  $\alpha$ -amylase (*B. pumilus* pBX96); well 1: *B. pumilus* 289 ( $\alpha$ -amylase); well 2: *B. subtilis* 168 ( $\alpha$ -amylase); well 3:  $\beta$ -amylase; well 4: *A. niger* glucoamylase; well 5: *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylase

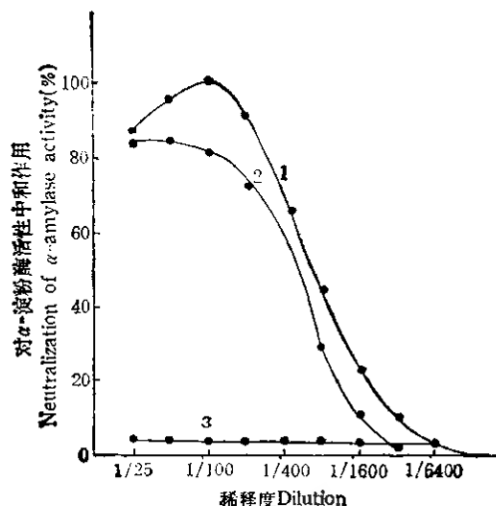


图2 短小芽孢杆菌 289  $\alpha$ -淀粉酶抗血清对 $\alpha$ -淀粉酶活力的中和反应

Fig. 2 Neutralization of the activity of  $\alpha$ -amylases by antiserum against *B. pumilus* (pBX96)  $\alpha$ -amylase

1. *B. pumilus* (pBX96)  $\alpha$ -amylase; 2. *B. subtilis* 168  $\alpha$ -amylase; 3. *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylase

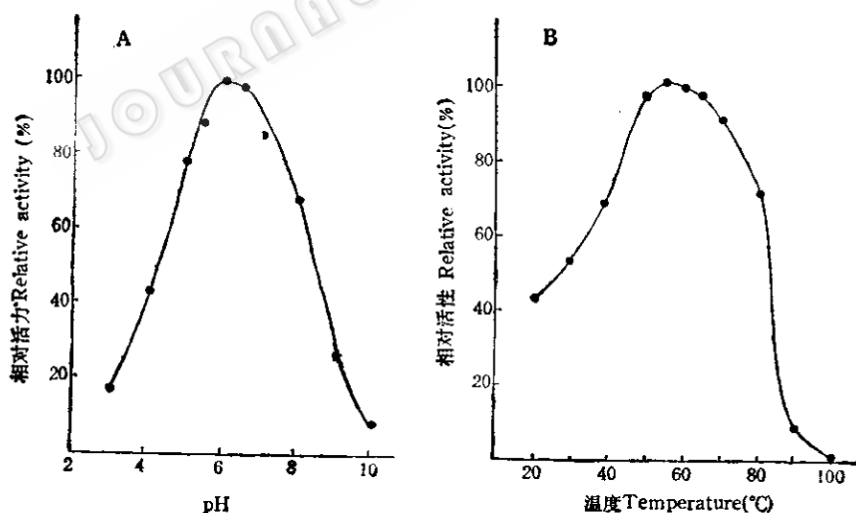


图3 pH(A)和温度(B)对酶活力的影响

Fig. 3 Effect of pH (A) and temperature (B) on the activity of  $\alpha$ -amylase

2. 酶作用的最适温度: 在不同温度下测定酶活力, 结果见图 3-B, 酶作用的最适温度为 55 $^{\circ}$ C。

3. 酶的热稳定性: 以 0.02mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.5) 配制酶液, 在不同温度下保温

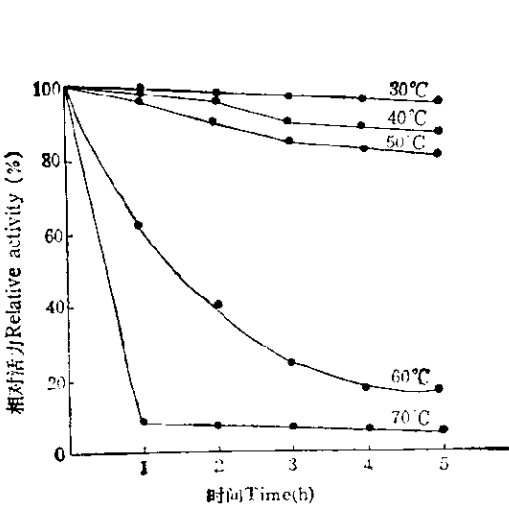


图 4 温度对  $\alpha$ -淀粉酶稳定性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on  $\alpha$ -amylase stability

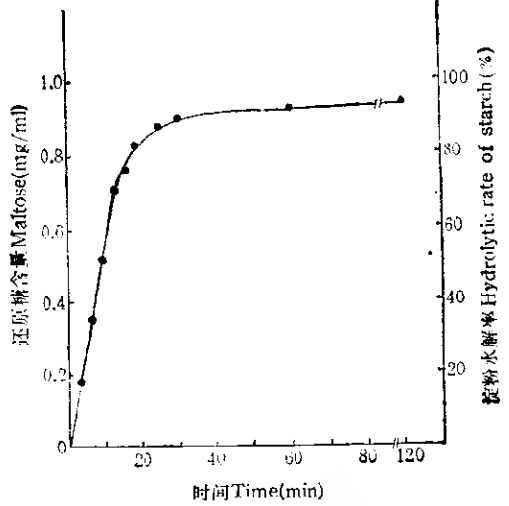


图 5  $\alpha$ -淀粉酶的水解率

Fig. 5 The hydrolytic rate of starch by  $\alpha$ -amylase

表 1 金属离子对  $\alpha$ -淀粉酶活力的影响

Table 1 Effect of metal ions on the activity of  $\alpha$ -amylase

金属离子 Metal ion	相对活力 Relative activity (%)
None	100
KCl	107
NaCl	108
MgSO <sub>4</sub>	100
ZnCl <sub>2</sub>	38.0
AgNO <sub>3</sub>	73.0
BaCl <sub>2</sub>	97.9
CaCl <sub>2</sub>	109.9
MnCl <sub>2</sub>	96.8
PbAc	17.8
CuSO <sub>4</sub>	16.9

不同时间,取出样品立即冷却,在 55℃ 下测定剩余酶活力,结果见图 4。糖化型  $\alpha$ -淀粉酶在 50℃ 下保温 5 小时,仍保留 80% 的原始酶活力。

4. PCMB 对酶活性的影响: 在酶反应体系中加入不同浓度的对氯汞苯甲酸(PCMB),测定酶活力。结果表明,  $3 \times 10^{-3}$  mol/L PCMB 抑制 95% 的酶活性,说明巯基是糖化型  $\alpha$ -淀粉酶催化活性所必需的。

5. 金属离子对酶活性的影响: 将酶液与金属盐溶液混合(反应液中的金属离子浓度为  $10^{-3}$  mol/L),室温放置 1 小时,测定剩余酶活力。结果(表 1)表明,  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{K}^{+}$  略能激活  $\alpha$ -淀粉酶<sup>[8]</sup>,而  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  对酶活性有明显的抑制作用。

(三) 淀粉水解率

测定短小芽孢杆菌 289(pBX96)  $\alpha$ -淀粉酶的淀粉水解率,结果见图 5 发现该酶对淀

粉水解率较高, 可达到 90%, 而枯草杆菌糖化型  $\alpha$ -淀粉酶作用于可溶性淀粉时, 水解率达到 70%<sup>[8]</sup>。因此该菌株具有开发前景。

### 参 考 文 献

- [1] 吕向阳、蒋如璋: 遗传学报, 2: 185—192, 1991。
- [2] Mantsula, P. et al.: *J. Biol. Chem.*, 254: 8540—8547, 1979。
- [3] 蒋传葵等: 工具酶的活力测定, 第 74—76 页, 上海科学技术出版社, 上海, 1982 年。
- [4] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951。
- [5] Ouchterlony, O.: *Handbook of Experimental Immunology*, (ed. Wein, D. H.), p. 655—705, Blackwell Oxford, 1967。
- [6] Yamane, K. et al.: *Biophys. biochem. Acta*, 295: 323—340, 1973。
- [7] Matruzaki, H. et al.: *ibid.*, 365: 248—258, 1974。
- [8] 张树政等: 酶制剂工业, 第 458—463 页, 科学出版社, 北京, 1989 年。

## STUDIES ON THE PROPERTIES OF $\alpha$ -AMYLASE PRODUCED BY *BACILLUS PUMILUS* 289 (pBX96)

Ma Ming Yang Lizhu Wang Chengyi Zheng Hong Jiang Ruzhang

(Laboratory of Biotechnology, Nankai University, Tianjin 300071)

The gene of  $\alpha$ -amylase of *Bacillus megaterium* was cloned and expressed in *Bacillus pumilus*. The purified enzyme was obtained by salting out of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and DEAE-cellulose chromatography. The optimum pH of enzyme is 6.0. It is stable between pH 5—8. The optimum temperature is 55°C. The activity of enzyme was inhibited by  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , and a little activated by  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ . When PCMB was added at the concentration of  $3 \times 10^{-3}$  mol/L, 95% of enzyme activity was inhibited. The properties of immunology of enzyme are the same as that of  $\alpha$ -amylase produced *Bacillus subtilis*.

**Key words** *Bacillus pumilus* 289;  $\alpha$ -amylase; Immunology