

地衣芽孢杆菌胞外耐高温 α -淀粉酶的研究

孔显良 王俊英 江洪涛* 姜丽萍

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

地衣芽孢杆菌 (*Bacillus Licheniformis*) 突变株 7902 培养液离心后的上清液, 于 75 °C 至 100 °C 作用, α -淀粉酶活力基本上随温度提高呈直线上升。酶液在不加 Ca^{2+} 和无任何保护剂条件下于 90 °C 处理 60 分钟, 95 °C 处理 20 分钟, 酶活力均能保留 90% 以上。培养液经硫酸铵分段沉淀、Sephadex G-50 凝胶过滤和制备垂直平板电泳纯化, 经 PAGE 鉴定为一条带, 纯酶比活提高 49.3 倍, 淀粉酶法区带定位鉴定证明提纯样品是 α -淀粉酶。SDS 凝胶电泳测定分子量为 68000。金属离子 Ca^{2+} 、 Li^{+} 、 Mg^{2+} 等对酶有激活作用, 而 Al^{3+} 、 Ag^{+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 等有一定的抑制作用。

关键词 地衣芽孢杆菌; 耐高温 α -淀粉酶; 纯化

α -淀粉酶在动植物、微生物中均能产生, 而只有微生物来源的酶能进行工业化生产。微生物中许多种类均能产生 α -淀粉酶, Buchanan 等^[1] 描述了 *Bacillus* 属 48 个种中有 32 个能产生 α -淀粉酶, 但产生耐高温酶的菌种较少。Campbell^[2] 1955 年首先从凝聚芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) 纯化出耐高温的 α -淀粉酶, 接着又有由枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、嗜热芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*)^[3]、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)^[4,5] 中分离出来该酶。Madeson 等^[6] 研究出从 *B. licheniformis* 产生耐高温 α -淀粉酶能在 110 °C 液化淀粉, 并首先应用于生产。胡学智等^[7,8] 经过多年努力获得了产耐高温 α -淀粉酶的高产菌株。本文报道地衣芽孢杆菌诱变株产生的胞外耐高温 α -淀粉酶的热稳定性及其酶的纯化。

材 料 和 方 法

(一) 菌种和培养方法

采用地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) ATCC9789 经亚硝基胍 (NTG)、紫外线 (UV) 和 Co^{60} 反复多次诱变, 最后获得突变株 7902, 比原菌株产耐高温 α -淀粉酶活力提高 46 倍。在含普通牛肉膏、蛋白胨、玉米粉和少量无机盐组成的液体培养基里, 在 37 °C 振荡培养 3-4 天。

(二) 主要仪器及化学试剂

高速冷冻离心机 (J2-21, Beckman); 721 型分光光度计 (上海第三分析仪器厂); 恒温恒压电泳仪 (北京东方仪器厂)。可溶性淀粉 (浙江省菱湖化工试剂厂) 当天使用当天配制。Sephadex G-50 (Pharmacia), 丙烯酰胺 (上海试剂厂), 甲叉双丙烯酰胺 (Serva), 十二烷基硫酸钠 (SDS) (E. Merck)。

本文于 1991 年 11 月 30 日收到。

本工作为国家“七五”攻关项目内容之一。

* 山东大学微生物系 91 届毕业生。

(三) 分析方法

1. 酶活力测定方法^[9]: 采用比色法进行, 在 60 °C pH6.0 条件下, 1 分钟水解 0.1mg 可溶性淀粉所需酶量为 1 个酶活力单位。
2. 蛋白含量测定^[10]: 采用 Folin-酚试剂法, 在波长 680nm 测吸光度。
3. 酶纯度鉴定: 采用聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳 (PAGE), 按 Davis 法^[11] 进行鉴定, 凝胶浓度 7%, 电极缓冲液 pH 8.3, 用考马斯亮蓝 R-250 染色。
4. 酶区带定位法, 采用淀粉酶鉴定方法^[12]。
5. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 按 Weber-Osborn 方法进行^[13]。

结 果 和 讨 论

(一) 耐高温 α -淀粉酶的热稳定性

酶的热稳定性试验均采用发酵液经 10000r/min 离心后的上清液。

1. 酶作用的最适温度: 地衣芽孢杆菌 7902 耐高温 α -淀粉酶在 pH6.0 的淀粉溶液中, 于不同温度的水浴中反应测定酶活力, 由图 1 表明, 从 75 °C 开始直到 100 °C, 酶活力基本上随着温度升高成直线上升。

2. 酶的热稳定性: 酶液在不加 Ca^{2+} 和任何保护剂条件下, 在 90 °C 和 95 °C 的水浴中分别处理不同时间, 冷却后在 60 °C 测定酶活力。从图 2 可见, 90 °C 处理 30 分钟酶活力保留 98%, 40 分钟、50 分钟和 60 分钟分别保留 94%、91% 和 90%。95 °C 处理 20 分钟酶活力能保留 90% 以上, 30 分钟、40 分钟和 50 分钟分别保留 69%、57% 和 36%。

3. Ca^{2+} 对酶热稳定性的影响: 在酶液中分别加入不同量的 Ca^{2+} , 然后在 95 °C 恒温水浴中处理 15 分钟, 冷却后测定酶活力。表 1 表明, 在酶液中加入 2.0 - 10.0mmol/L 的 Ca^{2+} , 对酶的热稳定性有一定保护作用。

(二) 耐高温 α -淀粉酶的纯化

1. 粗酶制备: 发酵酶液经 10000r/min 冷冻离心 30 分钟, 取上清液, 经硫酸铵分段沉淀, 使终饱和度达到 70%, 结果以 40% 饱和度的酶活力和比活最高。

2. 凝胶过滤: 将 40% 硫酸铵饱和度的沉淀溶解液上事先平衡好的 Sephadex G-50 柱, 用 0.1mol/L pH6.0 的三羟甲基甲烷 [Tris-(hydroxymethylamino)methane] 缓冲液洗脱, 收集有酶活力的洗脱液为下步使用。

3. 电泳提纯: 用垂直板电泳制备纯酶, 电泳缓冲液 pH 为 8.3, 凝胶浓度为 7%, 电泳后, 先在胶板的两侧各切一长条, 一条置于考马斯亮兰 G-250 中快染, 定蛋白带, 一条用

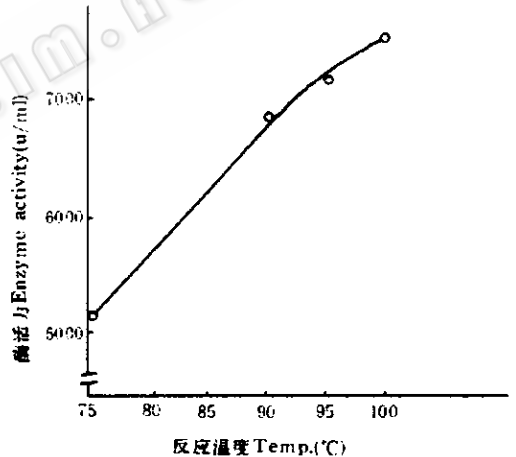


图 1 反应温度对酶活力的影响
Fig. 1 Effect of temperature on the activity of α -amylase from *Bacillus licheniformis* 7902

酶区带定位法检测, 确定 α -淀粉酶的区带, 然后把有 α -淀粉酶活性的区带切下, 用定量蒸馏水浸泡, 以下各步试验均用此纯酶液。

4. 凝胶电泳鉴定酶的纯度: 用聚丙烯酰胺盘状凝胶电泳进行鉴定, 考马斯亮蓝 G-250 染色。从图 3-A 看出, PAGE 纯化后为一条带。

5. 酶的区带定位鉴定: PAGE 后, 将胶用淀粉酶法鉴定提纯样品, 结果见图 3-B, 提纯后的样品染色只有一条透明区带, 且此位置与用考马斯亮兰染色的纯酶样品的条带位置一致, 证明此带是 α -淀粉酶。

6. 纯化结果: 分别测定各步样品的酶活力及蛋白含量, 结果见表 2, 经过纯化后的 α -淀粉酶纯度提高 49.3 倍。

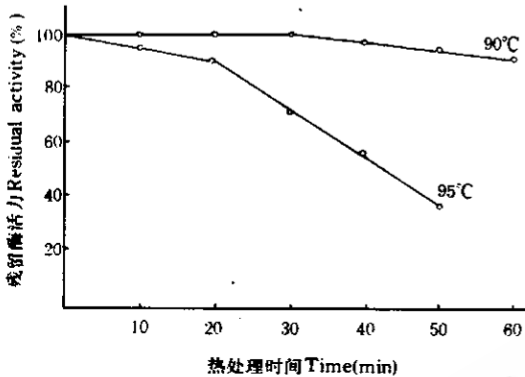


图 2 酶的热稳定性

Fig. 2 Heat stability of thermostable α -amylase

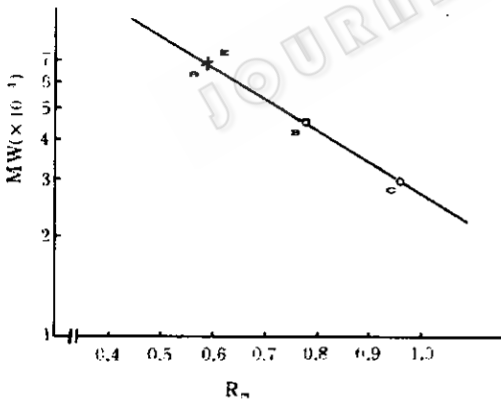


图 4 SDS 凝胶电泳测耐高温 α -淀粉酶分子量

Fig. 4 Molecular weight of thermostable α -amylase was measured by SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

- A. 牛血清白蛋白 Bovine Albumin (68000);
 B. 卵蛋白 Albumin, Egg (45000);
 C. 碳酸酐酶 Carbonic Anhydrase (29000);
 E. 地衣芽孢杆菌 7902 耐高温 α -淀粉酶
 Thermostable α -amylase from
B. licheniformis 7902

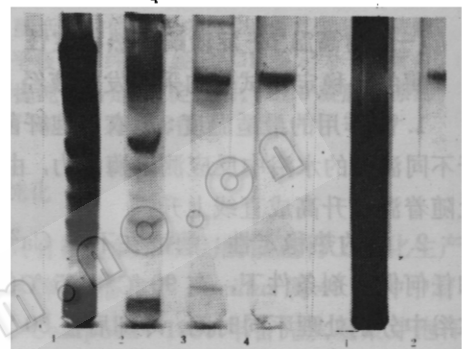


图 3 α -淀粉酶各步纯化的 PAGE 图
 Fig. 3 PAGE patterns of samples from different step of purification of the enzyme

- A: 1. 培养滤液 Culture supernatant;
 2. 硫酸铵分段沉淀 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation precipitation;
 3. Sephadex G-50 凝胶过滤 Gel filtration;
 4. 垂直板 PAGE 纯化 Slab PAGE purification

- B: 1. 酶区带定位法 白色区带表示酶水解淀粉的位置, 黑色表示未被酶水解的淀粉与碘的复合物
 Starch hydrolysis pattern of polyacrylamide gel with the purified enzyme. The white zone represents area of enzyme hydrolyzed starch against the dark background of the starch-iodide complex;
 2. 考马斯亮兰染色法
 The protein was stained with Coomassie Brilliant Blue.

(三) 分子量的测定

将样品及已知分子量的标准蛋白用含 1% SDS、1% 巯基乙醇液在 100 °C 处理 5 分钟, 然后进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用标准蛋白分子量对数与其相对迁移率作图 (图 4), 查出地衣芽孢杆菌突变株 7902 的分子量为 68000。

表 1 Ca^{2+} 浓度对酶热稳定性的影响
Table 1 Effect of Ca^{2+} on heat stability of enzyme

Ca^{2+} (mmol/L)	0	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0	50.0
残留酶活力								
Residual enzyme activity (u/ml)	4192	4212	4219	4315	4486	4521	4521	4452

表 2 地衣芽孢杆菌 7902 耐高温 α -淀粉酶的纯化
Table 2 Purification of thermostable α -amylase from *B. licheniformis* 7902

步 骤 Step	总酶活力 Total activity(u)	总蛋白 Total protein(mg)	比活 Specific activity(u/mg)	得率 Yield(%)		提纯 Purification(fold)
				Activity	Protein	
培养滤液 Supernatant of culture	607246.4	1102.0	551	100	100	1.0
硫酸铵分段 (NH_4) ₂ SO ₄ Fractionation	196081.0	36.1	5432	32.3	3.28	9.9
Sephadex G-50 凝胶过滤 Gel filtration	181935.6	15.3	11901	30.0	1.39	21.6
垂直板型 凝胶电泳提纯 Gel electrophoresis purification	74042.9	2.7	27192	12.2	0.25	49.3

(四) 金属离子对酶活力的影响

将下列各种金属化合物配成溶液和酶液混合, 使金属离子的终浓度为 5mmol/L, 60 °C 保温 30 分钟, 测定酶活力, 以不加金属离子的酶活力为 100%, 结果见表 3。其中 Ca^{2+} 、 Li^+ 和 Mg^{2+} 等对酶有激活作用, 而 Al^{3+} 、 Ag^+ 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 等有一定的抑制作用。

诱变株 7902 在 37 °C 培养产生的耐高温 α -淀粉酶具有很好的耐热性, 在实验室条件下目前仅能做到作用温度 100 °C, 酶活力继续增长, 如采用工业生产设备定能达到 Madsen 等^[6] 报道的 105—110 °C 的水平。地衣芽孢杆菌产生的耐高温 α -淀粉酶与枯草芽孢杆菌

表 3 金属离子对酶活力的影响
Table 3 Effects of various metal ions on activity of thermostable α -amylase

金属离子*	浓度	相对酶活力
Metal ions	Conc. (mmol/L)	Relative activity(%)
None	0	100.0
Li ₂ SO ₄	5.0	167.5
CaCl ₂	5.0	160.0
MgCl ₂	5.0	151.2
ZnCl ₂	5.0	110.8
CoCl ₂	5.0	91.6
FeSO ₄	5.0	70.4
MnCl ₂	5.0	62.7
AgNO ₃	5.0	24.6
CuSO ₄	5.0	24.4
Al ₂ (SO ₄) ₃	5.0	1.2

产生的 α -淀粉酶比较,不仅作用pH范围比较广泛,并对Ca离子的依赖性也低。William^[14]综述了该菌种产生的酶的分子量,它的幅度比较宽广,从22500到60000以上,本工作中测定出的分子量属此范围。

参 考 文 献

- [1] Buchaman, R. E. and N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1974.
- [2] Campbell, L. L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **54**: 154-161, 1955.
- [3] Manning, G. B. and L. L. Campbell: *J. Biol. Chem.*, **236**: 2952-2957, 1961.
- [4] Krishnan, T. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 430-437, 1983.
- [5] Saito, N.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**: 290-298, 1973.
- [6] Madsen, G. B. et al.: *Die Starke*, **25**: 304-308, 1973.
- [7] 胡学智等: *微生物学报*, **31** (4): 267-273, 1991.
- [8] 杨俊豪等: *微生物学通报*, **17** (5): 286-289, 1990.
- [9] Kazuo, Y.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **15** (1): 97-107, 1969.
- [10] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- [11] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**: 404, 1964.
- [12] 吴鹤龄等: *遗传学实验方法和技术*, 第274页, 高等教育出版社, 北京, 1983年.
- [13] Weber, K. and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244** (16): 4406-4412, 1969.
- [14] William, M. F.: *Microbial Enzymes and Biotechnology*, p. 7-12, Applied science publishers LTD, 1983.

STUDIES ON EXTRACELLULAR THERMOSTABLE α -AMYLASE FROM *BACILLUS LICHENIFORMIS*

Kong Xianliang Wang Junying Jiang Hongtao Jiang Liping

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Crude α -amylase was obtained from culture supernatant of *Bacillus licheniformis* mutant 7902. Enzyme activity increased as the temperature raised gradually from 75 to 100 °C. The enzyme was fairly stable retaining more than 90% of its original activity after 60 min at 90 °C and 20 min at 95 °C.

The enzyme was purified by ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-50 gel filtration and polyacrylamide slab gel electrophoresis. The specific activity of purified enzyme was 49.3 fold of the crude enzyme. The purified α -amylase was identified to be homogeneous by SDS electrophoresis. Molecular weight of this enzyme was 68000. Ca^{2+} , Li^{+} and Mg^{2+} ions enhanced the enzyme activity, whereas Al^{3+} , Ag^{+} , Cu^{2+} and Fe^{2+} inhibited it.

Key words Thermostable α -Amylase; *Bacillus licheniformis*; Purification