

嗜盐碱性淀粉酶产生条件和性质的初步研究*

田新玉 周培瑾 王大珍

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘 要 从我国内蒙古自治区察汗淖碱湖分离到一株能产胞外嗜盐碱性淀粉酶的极端嗜盐嗜碱杆菌(*Natronobacterium* sp.) C-212, 该菌产酶的最适 pH 和 NaCl 浓度分别为 9.5 和 20%, 最适碳源为可溶性淀粉, 氮源为复合蛋白胨。酶反应最适温度为 50℃, pH 为 8.5, NaCl 浓度为 2.6 mol/L, 该酶在 pH9.5 最稳定, NaCl 可增加酶的热稳定性, 酶降解可溶性淀粉的主要产物为葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖及其他寡糖。

关键词 淀粉酶, 嗜盐嗜碱杆菌

极端嗜盐菌和嗜盐嗜碱菌都属于古细菌(Archaeobacteria), 尽管这类菌的某些菌株能水解淀粉, 但对它们的胞外淀粉酶却研究得很少^[1]。Nachum 和 Bartholomew 报道了嗜盐杆菌产生的淀粉酶及一般特性^[2]; Good 和 Hartman 研究了盐生盐杆菌(*Halobacterium halobium*)淀粉酶的性质^[3]; Oren 报道了嗜盐菌(*Halobacterium sodomense*)产生的葡萄糖苷酶^[4]; Grant 和他的同事从非洲肯尼亚碱湖分离到几株嗜盐嗜碱菌^[5]; Tindall 等将 3 株杆菌和一株球菌鉴定为嗜盐菌科两个新属, 即嗜盐嗜碱杆菌属(*Natronobacterium*)和嗜盐嗜碱球菌属(*Natronococcus*)^[6], 但这些菌都不水解淀粉。最近我们从内蒙碱湖中分到一株产胞外淀粉酶的极端嗜盐嗜碱杆菌, 酶的最适 pH 较高(pH8.5), 酶的最适反应和热稳定性对 NaCl 依赖性极强, 这与极端嗜盐嗜碱菌生境有着密切的关系, 研究这些酶的性质对阐明嗜盐嗜碱菌酶系特征和极端环境适应机理有着重要意义。

本文报道极端嗜盐嗜碱菌淀粉酶的产生条件及酶的一般特性。

1 材料和方法

1.1 菌种

从我国内蒙古自治区碱湖分离到的 100 多株嗜盐嗜碱菌中筛选出一株能产生胞外淀粉酶的菌株 C-212, 该菌鉴定为嗜盐嗜碱杆菌(*Natronobacterium* sp.)^[7]。

1.2 培养条件及粗酶制备

产酶培养基组成(g/L): 可溶性淀粉 10.0, 复合蛋白胨(日本大五荣株式会社)5.0, 酵母粉(Oxoid)5.0, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, NaCl 200, Na_2CO_3 10.0 (Na_2CO_3 单独灭菌, 用前混合)。培养条件: 按 1%(V/V)接种量将种子液接种于装在 500ml 三角瓶的 100 ml 培养基中, 于 37℃、230 r/min 旋转摇床振荡培养 3 天, 离心

* 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1993 年 3 月 31 日收到。

($10000\times g$, 4°C) 20 分钟, 收集上清液作为粗酶液。

1.3 酶活力测定

采用改良的碘蓝值法^[8]测定酶活力。在 0.3 ml 2% 可溶性淀粉溶液(用 pH8.5, 含 2.6 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液配制)中, 加 0.1 ml 用上述缓冲液适当稀释的粗酶液, 于 50°C 下保温 20 分钟, 然后加入 0.5 ml 1.0 mol/L 醋酸以终止反应, 加 KI-I_2 液显色, 用 721 分光光度计测定 A_{700} 。在上述测定条件下, 每分钟水解 $100\mu\text{g}$ 淀粉所需的酶量定义为 1 个酶活力单位。

1.4 淀粉降解产物的分析

将 2% 的可溶性淀粉溶液 2.0 ml 加到 5.0 ml 酶液中, 40°C 保温 12 小时。反应混合液经过 Sephadex G-10 柱脱盐, 浓缩, 在新华 1 号滤纸上层析。溶剂系统为醋酸-吡啶-水 (12 : 5 : 4, V/V), 用硝酸银显色剂显色。

2 结果

2.1 产酶条件

2.1.1 NaCl 浓度对细胞生长和产酶的影响:嗜盐嗜碱菌 C-212 在碱性培养基中生长和产酶均受 NaCl 浓度的影响(图 1-A), 当 NaCl 浓度低于 10% (W/V) 时, 菌体生长受抑制, 几乎不产酶; 在 NaCl 为 15% 到 30% (W/V) 时, 菌体生长良好, 并产生相当量的胞外淀粉酶。菌体生长和产酶的最适 NaCl 浓度为 20% (W/V)。

2.1.2 pH 对菌体生长和产酶的影响:用 1.0 mol/L NaOH 代替 Na_2CO_3 调节培养基的 pH 进行菌体生长和产酶试验, 表明菌体生长和产酶均需较高的 pH。生长和产酶的 pH 范围为 8.0—11.0, 最适 pH 为 9.5 左右(图 1-B)。

2.1.3 碳源和氮源对产酶的影响:改变培养基中碳源种类进行产酶试验。结果表明, 糊精、可溶性淀粉、马铃薯淀粉、小麦淀粉或玉米淀粉等均可作为产酶碳源, 其中以可溶性淀粉最佳。但是该菌不能利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖或乳糖等糖类。

改变培养基中氮源进行生长和产酶试验, 表明菌株 C-212 可利用牛肉膏、蛋白胨、水解酪素或复合蛋白胨作氮源进行生长并产酶, 其中以复合蛋白胨和水解酪素最好, 几乎不利用无机氮。

2.2 酶的一般性质

2.2.1 NaCl 和温度对酶活力的影响:在给定 NaCl 浓度及 pH8.5 的条件下, 测定不同温度时的酶活力。当 NaCl 浓度为 2.6、3.4 和 4.3 mol/L 时, 酶反应分别在 50、54 和 58°C 出现最高酶活力(图 2), 表明嗜盐碱性淀粉酶对 NaCl 的要求受温度的影响。温度越高, 酶反应需要的 NaCl 浓度越高。同时可看出酶的最适温度为 50°C , NaCl 浓度为 2.6 mol/L。

2.2.2 pH 对酶活力和稳定性的影响:在不同 pH 值条件下分别于 50°C 、2.6 mol/L NaCl 及 60°C 、4.3 mol/L NaCl 反应液中测定了酶活力, 发现在上述两种情况下酶的最适 pH 都在 8.5 左右(图 3-A), 说明酶的最适 pH 不受温度和 NaCl 浓度的影响。

酶液用含 2.6 mol/L NaCl 的不同 pH 值缓冲液稀释, 于 50°C 保温 30 分钟, 然后在 pH8.5 测剩余酶活力, 结果表明淀粉酶在 pH9.0 至 10.5 时最稳定, 当 pH 值低于 6.0 或高于 12.0 时, 则淀粉酶完全失活(图 3-B)。

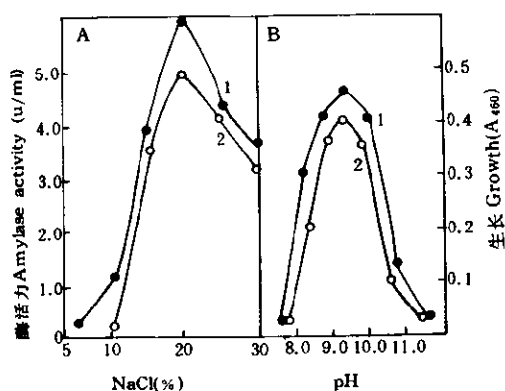


图 1 NaCl 浓度(A)和 pH(B)对细胞生长和产酶的影响

Fig. 1 Effects of NaCl concentration (A) and pH (B) on the cell growth and production of amylase

1. 生长 Growth;
2. 酶活力 Activity.

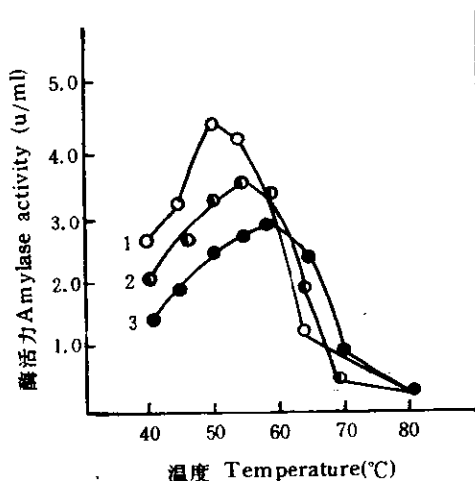


图 2 NaCl 浓度和温度对酶活力的影响

Fig. 2 Effects of NaCl concentration and temperature on amylase activity

1. 2.6 mol/L NaCl;
2. 3.4 mol/L NaCl;
3. 4.3 mol/L NaCl.

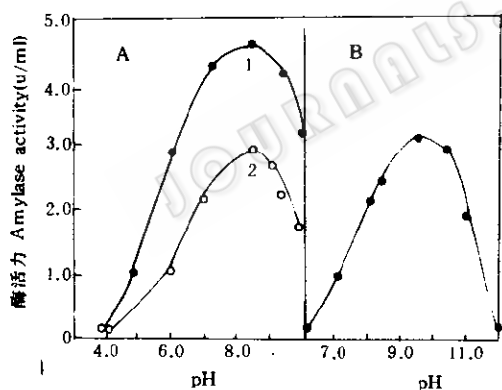


图 3 pH 对淀粉酶活力(A)和稳定性(B)的影响

Fig. 3 Effect of pH on amylase activity (A) and stability (B)

1. 2.6 mol/L NaCl, 50°C;
2. 4.3 mol/L NaCl, 60°C.

2.2.3 酶的热稳定性:用 pH8.5 的甘氨酸-NaOH 缓冲液适当稀释酶液,然后加 NaCl 到一定浓度,于不同温度保温 20 分钟,冰浴冷却,按常规法测剩余酶活力,结果如图 4。当 NaCl 浓度为 1.0 mol/L 时,酶很不稳定,50°C 完全失活;NaCl 为 2.0 mol/L 时,40°C 稳定,55°C 失活;2.6 mol/L NaCl 时,50°C 稳定,65°C 失活;4.0 mol/L NaCl 时,55°C 稳定,70°C 失活,此结果表明 NaCl 浓度的增加,提高了淀粉酶的热稳定性。

2.2.4 透析试验:酶液在 4°C 对含不同 NaCl 浓度的缓冲液(pH8.5)透析 24 小时,然后按常规法测酶活力。结果表明,NaCl 低于 0.5 mol/L 时,淀粉酶完全失活,保持酶的稳定性至少需 1.0 mol/L 的 NaCl。

2.2.5 可溶性淀粉酶解产物分析:应用纸层析法检测嗜盐嗜碱菌 C-212 淀粉酶水解可溶

性淀粉的产物,以标准寡糖作对照,如图 5 所示。主要降解产物为葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖和其他寡糖。

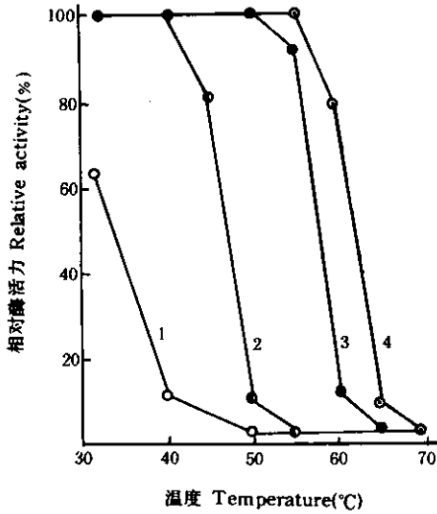


图 4 NaCl 浓度对淀粉酶热稳定性的影响

Fig. 4 Effect of NaCl concentration on heat stability of amylase

- 1. 1.0 mol/L NaCl; 2. 2.0 mol/L NaCl;
- 3. 2.6 mol/L NaCl; 4. 4.0 mol/L NaCl.

3 讨论

从碱湖分离到的极端嗜盐嗜碱菌 C-212 可在含盐碱性培养基中良好生长并产生胞外嗜盐碱性淀粉酶(haloalkaline amylase),该酶有许多性质不同于已报道的嗜盐菌或嗜碱菌产生的淀粉酶,与嗜盐菌淀粉酶比较,最大区别在于该菌的酶最适 pH 较高(8.5),相比之下, *Halobacterium* sp. 淀粉酶的为 5.6^[2], *H. halobium* 为 6.4—6.6^[3],中等嗜盐菌 *Micrococcus* sp. 为 6—7^[9];而 *H. sodomense* 的酶则为 7.4^[4]。该酶与嗜碱菌^[10]产生的淀粉酶的明显区别是酶反应需要 NaCl,其最适浓度为 2.6 mol/L。该酶要求高浓度的 NaCl 以保持其稳定性。由于高浓度 NaCl 的存在给酶的纯化带来一定困难,关于该酶的特征还有待纯化后进一步研究。

致谢 北京农业大学的龙涛曾参加部分研究工作,特此致谢。

参 考 文 献

[1] Gibbons N E. *Can J Microbiol*, 1957, 3: 249—255.
[2] Nachum R, Bartholomew J W. *Bacteriological Proceedings*, 1969, 137—138.
[3] Good W A, Hartman P A. *J Bacteriol*, 1970, 140: 601—603.
[4] Oren A. *Current Microbiol*, 1983, 8: 225—230.

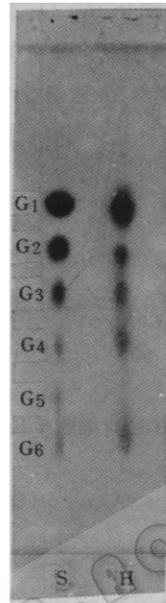


图 5 可溶性淀粉酶解产物的纸层析谱

Fig. 5 Paper chromatogram of hydrolysates of soluble starch by the amylase

G1, G2, G3, G4, G5 和 G6 分别代表葡萄糖及其寡糖
S: 标准寡糖 Oligosaccharide;
H: 水解产物 Hydrolysate.

- [5] Grant W D, Tindall B J. Microbial Growth and Survival in Extreme Environment. In: Gould G W, Corry J E L ed. *Microbes in Extreme Environments*. New York: Academic Press, 1986. 25—54.
- [6] Tindall B J et al. *System Appl Microbiol*, 1984, **5**: 41—57.
- [7] Wang D, Tang Q. Natronobacterium from Soda Lakes in China. In: Hattori T ed. *Recent Advance in Microbial Ecology (ISME)*. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1989. 68—72.
- [8] Yamaguchi K et al. *J Gen Appl Microbiol*, 1969, **15**: 97—107.
- [9] Onishi H. *J Bacteriol*, 1972, **109**: 570—574.
- [10] Horikoshi K. *Agr Biol Chem*, 1971, **35**(11): 1783—1791.

STUDIES ON PRODUCTION AND SOME PROPERTIES OF HALOALKALINE AMYLASE

Tian Xinyu Zhou Peijin Wang Dazhen

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

Abstract An extreme haloalkalophilic bacterium C-212 which could produce an extracellular amylase was isolated from Cha-han-nao soda lake in Inner Mongolia. The optimal NaCl concentration for production of amylase was 20% (W/V) and the optimal pH was 9.5. The fine applied carbonhydrate was soluble starch and nitrogen source was polypeptone. Amylase from the strain C-212 required 2.6 mol/L NaCl at 50℃ for maximal activity. The optimal pH for amylase activity was about 8.5. The optimal pH for enzyme stability was 9.5. The thermal stability of the enzyme was increased in higher concentration of NaCl. Soluble starch was hydrolyzed by the enzyme and the major products of hydrolysis were glucose, maltose, maltriose and other oligosaccharides.

Key words Amylase; Haloalkalophilic bacterium