

嗜热真菌 *Thermomyces lanuginosus* 热稳定 α -淀粉酶的纯化及特性*

李多川 杨依军 彭友良 沈崇尧

(中国农业大学植保系 北京 100094)

周培瑾 黄亦存

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 嗜热真菌 *Thermomyces lanuginosus* 在液体培养基中于 50℃ 静止培养 14 d, 培养液经硫酸铵分级沉淀、DEAE-Toyopearl 离子交换层析、Butyl-Toyopearl 疏水层析、Sephacryl S-300 分子筛层析和 FPLC MonoQ 离子交换层析, 得到了凝胶电泳均一的淀粉酶。纯酶与淀粉反应不同时间后, 用碘色反应法和 DNS 法测定淀粉和还原糖量, 结果显示淀粉量在开始时迅速下降, 但还原糖的量却增加很慢; 产物经 TLC 层析分析为麦芽糖和少量葡萄糖。由此说明它为 α -淀粉酶。用 SDS-PAGE 和 Sephacryl S-300 分子筛层析测定分子量为 56 000, 不具亚基。酶反应最适温度和 pH 分别为 65℃ 和 4.5~5.0。在 pH 4.6 条件下, 酶在 50℃ 是稳定的; 60℃ 保温 1h, 仍保留 94% 的原酶活性; 酶在 70℃ 的半衰期为 10min。钙离子对酶有激活作用。酶对糖原和糊精有一定的水解能力。

关键词 嗜热真菌, *Thermomyces lanuginosus*, α -淀粉酶

α -淀粉酶 (α -amylase, EC 3.2.1.1.) 是一种具有内切活性的淀粉酶, 可将淀粉水解为麦芽糖、麦芽寡糖及少量葡萄糖, 是淀粉转化为葡萄糖过程中的主要酶类之一。它已在酿酒、食品、医学、纺织等工业上得到广泛的运用。热稳定 α -淀粉酶是目前开发的新酶种。由于它具有重要的工业价值, 致使人们积极寻找产生该酶的新菌株。近几年, 从嗜热真菌 (thermophilic fungi) 中分离热稳定的 α -淀粉酶的研究引起人们的注意。国外已从几种嗜热真菌 (*Mucor pusillus*, *Talaromyces emersonii*, *Thermomyces lanuginosus*) 中纯化出热稳定的 α -淀粉酶^[1, 2, 3], 但国内现在还未见有这方面的研究报道。本文报道从中国分离到的嗜热真菌 *Thermomyces lanuginosus* α -淀粉酶的纯化及一般性质。

1 材料和方法

1.1 菌种、培养基及培养条件

1.1.1 菌种: *Thermomyces lanuginosus* 由作者分离获得。

* 国家教育委员会高等学校博士点基金资助。

本文于 1996 年 1 月 20 日收到。

1.1.2 培养基 (YPS): 1000 ml 培养基中含: 可溶性淀粉 15.0 g; 酵母浸膏 4.0 g; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g; Vogel's 微量元素液 0.1 ml。用浓盐酸调 pH 到 6.5^[4]。

1.1.3 培养条件: 将 *Thermomyces lanuginosus* 接种在含 30% 琼脂的 YPS 固体培养基的培养皿中, 50 °C 培养 7 d 后, 用含 0.05% (v/v) Triton X-100 的无菌水洗下分生孢子, 四层纱布过滤, 滤液为孢子悬浮液 (每毫升孢子悬浮液含 10^6 个孢子)。把 1 ml 孢子悬浮液接种到含 50 ml 的 YPS 液体培养基中的三角瓶中 (共 40 瓶), 50 °C 条件下静止培养 14 d 后, 过滤, 8000 g 离心 30 min, 上清液为粗提酶液^[3]。

1.2 酶活性测定

酶活性测定用碘色反应法^[3]。2 ml 1% 可溶性淀粉溶液、1.2 ml 0.1 mol/L pH 4.6 醋酸缓冲液、0.4 ml 0.5 mol/L $CaCl_2$ 混和预热 (60 °C) 后, 加 0.6 ml 酶液, 60 °C 条件下反应 10 min 后, 加 0.8 ml 1 mol/L HCl 终止反应, 吸取 1 ml 反应液加标准碘液 2 ml, 在 620 nm 处比色测光密度。一个酶活单位定义为每分钟水解 10 mg 淀粉所需酶蛋白的量。

1.3 酶的分离纯化

1.3.1 硫酸铵分级沉淀: 粗提酶液中加固体硫酸铵至饱和度 90%, 过夜, 8000 g 离心 30 min, 弃上清液, 将沉淀溶于少量 0.05 mol/L pH 5.0 的醋酸缓冲液中, 在 0.05 mol/L pH 5.0 的醋酸缓冲液中透析 24 h。

1.3.2 DEAE-Toyopearl 离子交换层析: 将透析后酶液施于经 0.05 mol/L pH 5.0 的醋酸缓冲液平衡的 DEAE-Toyopearl 柱 (DEAE-Toyopearl 凝胶为日本 TOSOH 株式会社产品, 柱大小为 1.0 × 20 cm)。酶蛋白先用 240 ml 0.05 mol/L pH 5.0 醋酸缓冲液洗脱至 A_{280} 不变后, 再用 120 ml 0.05 mol/L pH 5.0 的醋酸缓冲液和 120 ml 含 0.3 mol/L NaCl 的相同缓冲液中进行线性梯度洗脱, 流速 0.75 ml/min, 3 min 收集 1 管。层析后收集活性部分, 进行疏水层析。

1.3.3 Butyl-Toyopearl 疏水层析: DEAE 层析后的酶液加固体硫酸铵至饱和度 50% 后, 施于经含 50% 饱和度硫酸铵的 0.05 mol/L pH 5.0 醋酸缓冲液平衡的 Butyl-Toyopearl 柱 (Butyl-Toyopearl 凝胶为日本 TOSOH 株式会社产品, 柱大小为 1.0 × 20 cm)。酶蛋白先用 120 ml 含 50% 饱和度硫酸铵的 0.05 mol/L pH 5.0 醋酸缓冲液洗脱至 A_{280} 不变, 再用 150 ml 含 50% 饱和度硫酸铵的 0.05 mol/L pH 5.0 醋酸缓冲液和 150 ml 不含硫酸铵的 0.05 mol/L pH 5.0 醋酸缓冲液进行线性梯度洗脱, 流速 0.75 ml/min, 4 min 收集 1 管, 层析后收集活性酶液, 用超滤离心管 (Centriplus-30, 美国 Amicon, Inc. 公司产品) 浓缩至 2 ml 后进行分子筛层析。

1.3.4 Sephacryl S-300 分子筛层析: 将 Butyl-Toyopearl 层析后浓缩的 2 ml 酶液施于经 0.05 mol/L pH 5.0 醋酸缓冲液平衡的 Sephacryl S-300 柱 (Sephacryl S-300 凝胶为 Pharmacia 公司产品, 柱大小为 1.6 × 100 cm)。酶蛋白用 0.05 mol/L pH 5.0 的醋酸缓冲液洗脱, 流速 0.4 ml/min, 2.5 min 收集 1 管, 层析后收集活性部分, 用超滤离心管浓缩至 1 ml 后进行 FPLC MonoQ 离子交换层析。

1.3.5 FPLC MonoQ 离子交换层析: 将分子筛层析后浓缩的 1 ml 酶液施于经 0.05

mol/L pH 5.0 醋酸缓冲液平衡的 MonoQ HR 5/5 柱 (Pharmacia 公司产品)。酶蛋白先用 10 ml 0.05 mol/L pH 5.0 醋酸缓冲液洗脱至 A_{280} 不变,再用 5 ml 0.05 mol/L pH 5.0 的醋酸缓冲液和 5 ml 含 0.15 mol/L NaCl 的相同缓冲液中进行线性梯度洗脱,最后用 50 ml 含 0.15 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L pH 5.0 醋酸缓冲液和 50 ml 含 0.2 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L pH 5.0 醋酸缓冲液进行线性梯度洗脱,流速为 1 ml/min, 1 min 收集 1 管。活性酶液用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳确认。

上述层析过程均在 4 °C 条件下进行。蛋白用 Pharmacia 公司的紫外检测仪 (UV-M II) 进行检测。

1.4 蛋白含量测定

蛋白含量测定用 Lowry 法^[5],以牛血清白蛋白为标准。

1.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 及活性染色

用 SDS-PAGE 确认 α -淀粉酶的纯度和测定它的分子量^[6],凝胶浓度为 10%,标准蛋白为上海生化所东风生化技术公司生产的低分子量标准蛋白。 α -淀粉酶经 SDS-PAGE 后,恢复活性^[7]后进行活性染色^[3]。

1.6 Sephacryl S-300 分子筛层析测定分子量

用 Sephacryl S-300 分子筛层析进一步确定 α -淀粉酶的分子量。方法同 1.3.4。标准蛋白同上。

1.7 酶解产物的薄层层析

100 μ l 2% 可溶性淀粉、100 μ l 0.1 mol/L pH 4.6 醋酸缓冲液 (含 0.05 mol/L CaCl_2) 混合后,加 200 μ l 纯酶液,60 °C 反应 2 h 后,取反应液进行薄层层析 (TLC)。层析用的标准糖为麦芽糖和葡萄糖,推动剂为正丁醇-乙醇-水 (5:3:2) 溶剂,显色液为 50% 硫酸溶液。层析板为 PK6F SILICA GEL 60A (Whatman 公司产品)^[3]。

1.8 淀粉水解速率测定

5 ml 1% 可溶性淀粉溶液、3 ml 0.1 mol/L pH 4.6 醋酸溶液、1 ml 0.5 mol/L CaCl_2 溶液混和预热 (60 °C) 后,加 1.5 ml 酶液,60 °C 下反应不同时间 (0、5、10、20、30、60、120 min) 后取样,分别测定剩余的淀粉量和形成的还原糖的量。淀粉测定用碘色反应法,还原糖测定用 DNS 法^[8]。

2 结果

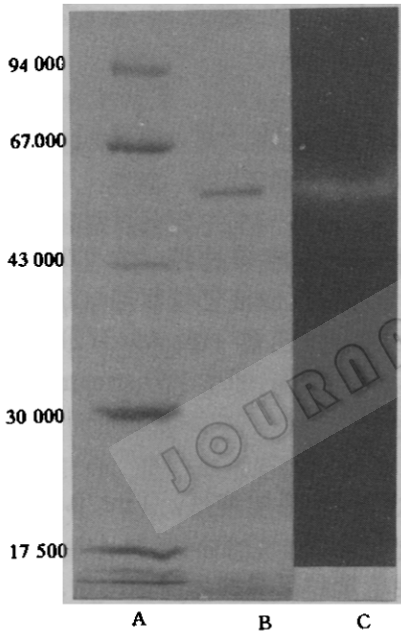
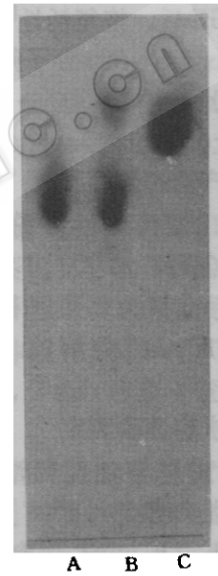
2.1 酶的纯化及鉴定

粗提酶液经硫酸铵分级沉淀、DEAE-Toyopearl 离子交换层析、Butyl-Toyopearl 疏水层析、Sephacryl S-300 分子筛层析和 FPLC MonoQ 离子交换层析后,经 SDS-PAGE 电泳确认,已纯化为一蛋白带,活性染色证明该蛋白带就是淀粉酶带 (图 1)。各步所获酶的产率和纯化倍数见表 1。

纯酶经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定,分子量为 56 000 (图 1)。纯酶与标准蛋白一起进行 Sephacryl S-300 分子筛层析时,该酶被洗脱的体积大于标准蛋白中的磷酸化酶 b (分子量为 94 000) 的洗脱体积,而与牛血清白蛋白 (67 000) 和肌动蛋白

表1 *Thermomyces lanuginosus* α -淀粉酶的纯化Table 1 Purification of α -amylase from *Thermomyces lanuginosus*

步骤 Step	总体积 Total volume /ml	总蛋白 Total protein /mg	酶比活 SA /U · mg ⁻¹	酶总量 Total activity /U	酶产率 Yield /%	纯化倍数 Purification fold
Crude Extract	860	172.40	6.0	1032.0	100.00	1.0
90% (NH ₄) ₂ SO ₄	72	38.88	21.30	828.0	80.23	3.6
DEAE-Toyopearl	24	7.20	78.33	564.0	54.65	13.1
Butyl-Toyopearl	17	2.04	141.70	289.0	28.00	23.6
Sephacryl S-300	6	0.30	172.00	51.6	5.00	28.7
FPLC MonoQ	8	0.24	200.00	48.0	4.65	33.3

图1 *Thermomyces lanuginosus* α -淀粉酶的 SDS-凝胶电泳及活性染色示意图A. 标准蛋白; B. α -淀粉酶; C. 活性染色。Fig.1 SDS-PAGE of α -amylase from *Thermomyces lanuginosus* and standard protein samplesA. Standard protein; B. α -amylase;
C. Activity staining.图2 *Thermomyces lanuginosus* α -淀粉酶与淀粉反应后产物的层析图A. 麦芽糖 (M); B. α -淀粉酶与淀粉反应后的产物; C. 葡萄糖 (G)。Fig.2 TLC of hydrolysates from soluble starch with α -amylase from *Thermomyces lanuginosus*

A. Maltose (M); B. Hydrolysate from soluble starch; C. Glucose (G)。

(43 000) 的洗脱体积接近 (数据未列)。因此该淀粉酶没有亚基。

纯酶与底物淀粉反应后, 产物经 TLC 分析为麦芽糖和少量葡萄糖 (图 2), 证明该淀粉酶具有 α -淀粉酶的特性。

2.2 酶的一般性质

2.2.1 反应最适温度: 在不同温度下测定酶活性, 结果见图3。酶作用的最适温度为 65°C 。

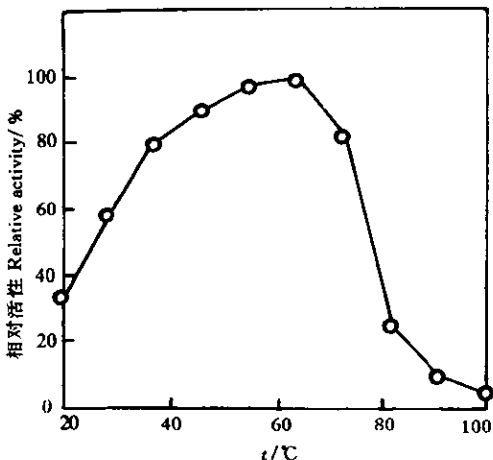


图3 温度对 *Thermomyces lanuginosus* α -淀粉酶活性的影响

Fig.3 Effect of temperature on activity of α -amylase from *Thermomyces lanuginosus*

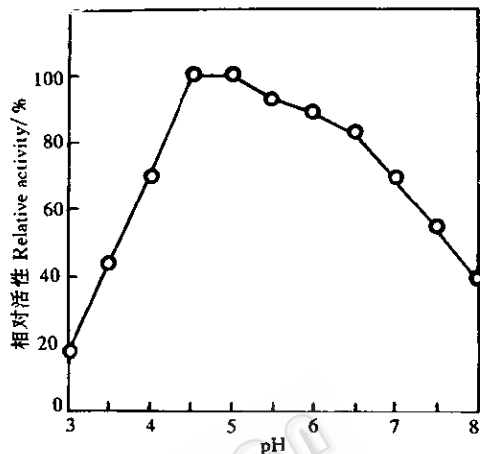


图4 pH对 *Thermomyces lanuginosus* α -淀粉酶活性的影响

Fig.4 Effect of pH on activity of α -amylase from *Thermomyces lanuginosus*

2.2.2 反应最适 pH: 在不同 pH 值的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中测定酶活性, 结果见图4。酶作用最适 pH 4.5 ~ 5.0。

2.2.3 酶的热稳定性: 将酶液与 0.1 mol/L 醋酸缓冲液 (pH 4.6, 含 0.05 mol/L CaCl_2) 在不同温度下保温不同时间后立即在冰浴中冷却, 在 60°C 条件下测酶活, 以不经保温的酶活为 100%, 结果见图5。*Thermomyces lanuginosus* 的 α -淀粉酶有较高的热稳定性, 酶在 50°C 条件下是稳定的; 60°C 保温 1 h, 仍保留 94% 的原酶活性; 70°C 的半衰期为 10 min。

2.2.4 酶的底物特异性: 将酶液与淀粉、糖原和糊精反应后用 DNS 法测定还原糖以估算酶活性^[8], 以可溶性淀粉为底物的酶活为 100%; 该酶与麦芽糖和 PNPG 反应后用 TLC 分析是否有葡萄糖形成, 无葡萄糖形成则活力为 0, 结果见表2。该酶能水解淀粉, 对糖原和糊精有较低的水解能力, 不能水解麦芽糖和 PNPG。

2.2.5 不同金属离子对酶活性的影响: 在测定系统中加入不同的金属离子, 使其终浓度为 0.05 mol/L 。在标准条件下测定酶活性, 以不加金属离子的酶活为 100%, 结果见表3。钙离子对酶有激活作用, 无钙离子酶活性下降。其它离子均对酶活性有抑制作用, 其中铁离子、铜离子和汞离子抑制作用最大。

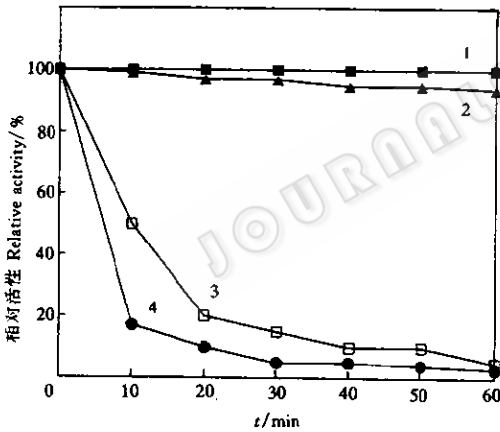
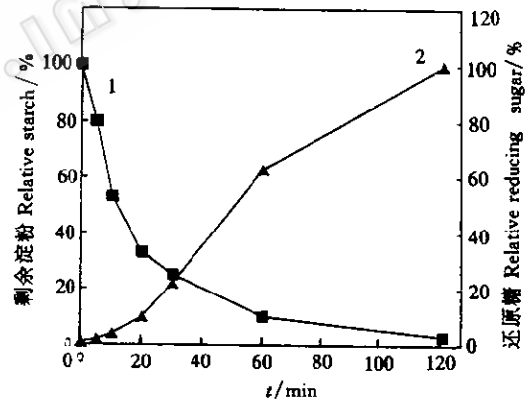
2.2.6 淀粉水解速率: 酶液与淀粉反应不同时间后, 分别测定剩余的淀粉和形成的还原糖, 结果见图6。该酶与淀粉反应后, 在 20 min 内淀粉的量迅速下降至 33%, 而还原糖的形成量仅为 10% (以 0 min 的淀粉量为 100%, 120 min 的还原糖为 100%), 表现为内切酶的特性。

表2 *Thermomyces lanuginosus* α -淀粉酶的底物特异性Table 2 The substrate specificity of α -amylase from *Thermomyces lanuginosus*

底物 Substrate / %	相对酶活性 Relative activity / %	底物 Substrate / %	相对酶活性 Relative activity / %
Starch	100	Maltose	0
Dextran	20	PNPG	0
Glycogen	12		

表3 金属离子对 *Thermomyces lanuginosus* α -淀粉酶活性的影响Table 3 Effect of metal cations on the activity of α -amylase from *Thermomyces lanuginosus*

金属离子 Metallic ion	相对酶活性 Relative activity / %	金属离子 Metallic ion	相对酶活性 Relative activity / %
CaCl ₂	120	FeCl ₃	62
NaCl	94	ZnCl ₂	83
BaCl ₂	82	CuCl ₂	47
MgCl ₂	96	HgCl ₂	44
MnCl ₂	91	H ₂ O	100

图5 *Thermomyces lanuginosus* α -淀粉酶的热稳定性Fig.5 Kinetics of thermostability of α -amylase from *Thermomyces lanuginosus*
1.50 °C; 2.60 °C; 3.70 °C; 4.80 °C.图6 *Thermomyces lanuginosus* α -淀粉酶对淀粉的水解速率

1. 淀粉; 2. 还原糖.

Fig.6 Time course of hydrolysis of soluble starch by the α -amylase from *Thermomyces lanuginosus*
1.Starch; 2.Reducing sugar.

从以上结果分析可知, 本文纯化的淀粉酶是一种 α -淀粉酶。

3 讨论

Jensen 等用 DEAE 离子交换层析和疏水层析两个步骤首次纯化了 *Thermomyces*

lanuginosus 中的 α -淀粉酶, 纯化了约 25 倍, 使比活由培养滤液中的 26.2 U / mg 提高到 660 U / mg^[3]。本文经五个步骤纯化了该菌的 α -淀粉酶, 纯化 33.3 倍, 使比活由 6.0 U / mg 提高到 200 U / mg。两种方法相比, 本文的纯化方法比较复杂, 有待进一步纯化。

本文纯化的 *Thermomyces lanuginosus* α -淀粉酶与 Jensen 等纯化的该菌的 α -淀粉酶相比, 主要性质基本相似^[3, 9], 它们很有可能是同一种 α -淀粉酶。纯化的 α -淀粉酶与可溶性淀粉反应后, 终产物是麦芽糖和少量葡萄糖。Jensen 等纯化的 α -淀粉酶与可溶性淀粉反应后, 终产物仅有麦芽糖而无葡萄糖^[3], 这可能是由于形成的葡萄糖很少而在 TLC 上检测不出的原因。

Jensen 等报道 *Thermomyces lanuginosus* 在 YPS 液体培养基上 50 °C 条件下静止培养 14 d 后淀粉酶活性最高, 我们也采用了他们的方法。虽然这种方法所需培养基成份简单, 高温也可防止一些杂菌的污染, 但生产起来仍较困难。一是时间长, 二是温度高, 这将增加生产的成本。解决这一问题的一条途径是应用基因克隆的手段, 将 *Thermomyces lanuginosus* 的淀粉酶基因克隆到嗜温细菌和嗜温真菌中。国外已有将嗜热真菌 *Talaromyces emersonii* 的 α -淀粉酶基因克隆到 *E. coli* 和人的 HeLa 细胞中的报道^[10, 11]。

Thermomyces lanuginosus 分布广泛, 至今还未发现使动物和植物致病的报道^[12]。用该菌的发酵液饲喂小白鼠未发现它有为反常和死亡的表现 (结果未列出)。因此, 该菌用于酿造和发酵, 产生毒性的可能性不大。

嗜热真菌 *Thermomyces lanuginosus* 是真核生物中生长上限温度最高的一种真菌^[13], 有可能成为真核生物中产生胞外热稳定酶的最佳菌株^[4]。该菌产生的 α -淀粉酶比目前应用的常温真菌 (mesophilic fungi) *Aspergillus oryzae* 和 *A. awamori* 的 α -淀粉酶以及丹麦 NOVO 公司的 “Fungamyl” 真菌 α -淀粉酶具有较高热稳定性和最适反应温度^[14 ~ 17], 这可能在工业上有意义。该 α -淀粉酶比国内市场上大量生产的 BF7658 α -淀粉酶的最适 pH 偏酸 1 ~ 2 个 pH 单位, 这可能在消化药剂的开发上有价值。目前, 国内市场 α -淀粉酶品种单一, 开发新的 α -淀粉酶品种势在必行。因此, 对该菌进行深入研究具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Somuti G A, Steinberg D H. *Indust Microbiol*, 1980, 21: 327 ~ 337.
- [2] Bunni L, McHale L, McHale A P. *Enzyme Microb Technol*, 1989, 11: 370 ~ 375.
- [3] Jensen B, Olsen J, Allermann K. *Can J Microbiol*, 1988, 34: 218 ~ 223.
- [4] Jensen B, Wiebe M G, Robson G D et al. *Mycol Res*, 1993, 97: 665 ~ 669.
- [5] Lowry O H, Rosebriugh N J, Randall R J. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265.
- [6] Laemmli U K. *Nature*, 1970, 227: 680 ~ 685.
- [7] Chung Y C, Kobayashi T, Kanai K et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, 61: 1502 ~ 1506.
- [8] Somogyi M. *J Biol Chem*, 1952, 195: 19 ~ 23.
- [9] Jensen B, J Olsen. *Enzyme Microbiol Technol*, 1992, 14: 112 ~ 116.
- [10] Bunni L, Coleman D C, McHale L et al. *Biotechnology Letters*, 1992, 14: 1109 ~ 1114.
- [11] Bunni L, Hackett T J, McHale L et al. *Biotechnology Letters*, 1993, 15: 1095 ~ 1100.
- [12] Domsh K H, Gams W, Anderson T H. *Compendium of soil fungi*. Vol 1. London: Academic Press, 1980. 778 ~ 779.

- [13] Brock T B. Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperature. New York: Springer Verlag, 1978.
- [14] Sills A M, Sauders M E, Stewart G G. *Indust Microbiol*, 1983, **24**: 295 ~ 303.
- [15] Bhella R, Altosaar I. *Can J Microbiol*, 1985, **31**: 149 ~ 153.
- [16] Novo Industri A /S Fungamyl, 1982.
- [17] Fogarty W M, Kelly C T. Recent Advanced in Microbial Amylases. In: Fogarty W M, Kelly C T Microbial Enzymes and Biotechnology. 2nd ed. London and New York: Elsevier Science Publishers LTD, 1990. 71 ~ 132.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF A THERMOSTABLE α -AMYLASE FROM THE THERMOPHILIC FUNGUS *THERMOMYCES LANUGINOSUS*

Li Duochuan Yang Yijun Peng Youliang Shen Chongyao

(Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Zhou Peijin Huang Yicun

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract A thermostable α -amylase from the culture supernatant from 14-day-old static cultures grown on soluble starch of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* was purified to SDS-PAGE homogenous by ammonium sulfate fraction, DEAE-Toyopearl chromatography, Butyl-Toyopearl chromatography, Sephacryl S-300 chromatography and FPLC MonoQ chromatography. The hydrolysis of soluble starch by the purified α -amylase resulted in maltose and glucose as the end production. The molecular weight of the enzyme estimated with SDS-PAGE and Sephacryl S-300 was 56 000. The optimum condition for activity were pH 4.5 — 5.0, temperature 65 °C. The α -amylase was thermostable at 50 °C. The enzyme retained 94% activity after 1 h at 60 °C. The half life time of the enzyme was 10 min at 70 °C. The addition of Ca²⁺ had a stabilizing effect on the enzyme. Soluble starch was completely degraded by the α -amylase, whereas glycogen and dextran were hydrolysed to a lesser extent.

Key words Thermophilic fungi, *Thermomyces lanuginosus*, α -amylase