

嗜热菌来源的生淀粉酶分离纯化及其酶学性质

董永存, 刘洋, 陈源源, 牛丹丹, 张梁, 石贵阳, 王正祥*

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江南大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘要: 从嗜热菌库中分离到两株能水解生淀粉的菌株 173 和 174, 通过扩增和测定两株菌的 16S rDNA 序列并进行比对结果表明, 所分离两株菌属于 *Geobacillus* 属的细菌。液体摇瓶发酵菌株 173、174, 其产生的生淀粉酶(简称 RSDE173、RSDE174)活力分别达 14.5 U/mL 和 12.9 U/mL。通过生淀粉吸附-熟淀粉洗脱系统和 TOYOPEARL HW-55F 系统进行分离纯化, 得到纯化的 RSDE173 和 RSDE174, 纯化倍数分别为 50 和 29, 活力回收率分别为 34%和 41%。有关 RSDE173 和 RSDE174 酶学性质研究显示, 对熟淀粉水解的最适作用温度均为 70 °C, 而对生淀粉水解则分别在 50 ~60 °C 和 40 ~60 °C 下表现出高水解活力; 对不同底物的最适作用 pH 值均为 5.0~5.5; 它们对大多数试验离子的敏感性较低, 但个别离子如 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 对 RSDE173 或 Cu^{2+} 对 RSDE174 的酶活力有一定的抑制作用。纯化的这两种生淀粉酶对不同来源生淀粉的底物专一性并不相同。RSDE173 底物专一性顺序为红薯淀粉 > 小麦淀粉 > 玉米淀粉 > 木薯淀粉 > 糯米淀粉; 而 RSDE174 的糯米淀粉 > 小麦淀粉 > 红薯淀粉 > 玉米淀粉 > 木薯淀粉。RSDE173 对生红薯淀粉有很好的降解, 其水解糊化淀粉与生红薯淀粉的比值为 1.48; 而 RSDE174 优先降解生糯米淀粉, 其相应比值为 1.69。

关键词: 嗜热菌; 生淀粉酶; 分离纯化

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 02-0169-07

生淀粉酶一般指可以直接作用、水解或糖化未经蒸煮的淀粉颗粒的酶, 可能包括 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、普鲁兰酶等酶^[1~5]。许多微生物包括细菌、酵母、丝状真菌和放线菌都发现能够产生生淀粉酶^[1~5]。基于节能和工艺简化的要求, 生淀粉酶在酿造、食品、造纸、纺织等领域应用中具有潜在应用价值^[6]。目前报道的生淀粉酶作用温度一般在 30°C~40°C, 由于淀粉水解过程中为了防止杂菌污染需要适当加热, 至少要达到 60°C^[2]。因此, 这一特性限制了其在淀粉糖等工业的应用。此外, 淀粉加水形成的乳浊液的 pH 值一般为 5.8~6.5 范围, 由于制糖工业中循环工艺的应用, 淀粉水解过程中的 pH 通常在 5.0 左右。因此, 寻找获得具有一定耐热性能和较低

作用 pH 的生淀粉酶, 对现行相关工业的工艺体系的技术升级和改造、以及对其酶分子的结构特征和催化机制等深入研究, 均具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 69 株分离自云南地区的嗜热菌和中温细菌, 经鉴定并保藏于江南大学中国高校工业微生物资源和信息中心(<http://cicim-cu.jiangnan.edu.cn>)。

1.1.2 主要酶和试剂: *Pfu* DNA 多聚酶购自上海 Sangon 公司; PCR 产物纯化试剂盒为上海华舜生物技术有限公司产品; 其他试剂药品均为国产或进口的分析纯和生化试剂。

基金项目: 新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0497); 国家高技术发展计划(2006AA020204)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-510-85918121; E-mail: zxwang@jiangnan.edu.cn

作者简介: 董永存(1980-), 女, 云南腾冲人, 硕士研究生, 研究方向为工业微生物学和育种学。

收稿日期: 2007-02-05; 修回日期: 2007-11-09

1.1.3 培养基和培养条件

筛选产生生淀粉酶的菌株用生淀粉培养基(每升含有 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母浸提物、5 g NaCl、10 g 生玉米淀粉),添加 2%琼脂即为生淀粉固体培养基。生淀粉单独灭菌,140℃干热灭菌 2 h。培养在 50℃进行。摇瓶培养条件为 50℃,150 r/min。

1.2 菌株形态与理化特性检测

将菌株接种 LB 平板,65℃培养 12 h 后观察菌落的大小、形态。用扫描电子显微镜观察细菌细胞的形态特征;生理生化指标的测定参照有关文献[7]进行。

1.3 16S rDNA 序列分析

参照文献[8]方法进行。采用通用引物(正向引物:5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3';反向引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 扩增条件为:94℃ 4 min,94℃ 30 s,52℃ 60 s,72℃,180 s,循环 30 次;72℃,10 min。扩增产物经纯化后,送上海 Sangon 公司测序。将菌株 173 和 174 的 16S rDNA 与 GenBank 数据库中的核酸序列进行相似性分析。

1.4 酶活力测定

底物为 1%的玉米淀粉颗粒悬浮液,用 pH5.5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制。5 mL 离心管中分别加入 1 mL 底物、0.1mL 酶液,在 50℃恒温振荡(150 r/min)反应 1 h 后,再加入 2 mol/L NaOH 溶液 0.05 mL 终止反应,反应液 5000 r/min 离心 5 min,取上清液测定还原糖的量。在以上分析条件下,1 min 释放 1 μg 还原糖所需酶的量定义为一个酶活力单位(U)。

酶的糊化淀粉酶活力测定方法与生淀粉酶活力测定方法相同,作用底物为糊化的玉米淀粉。将 pH5.5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制的 1%生玉米淀粉溶液,在沸水浴中加热使玉米淀粉颗粒完全溶解。此溶液即为 1%糊化淀粉溶液。

1.5 酶的纯化

将筛选到的菌株接种发酵培养基培养 24 h。发酵液于 5000 r/min 离心 5 min 取上清,即得粗酶。1 L 粗酶液中加入 15 g 玉米淀粉颗粒,混匀后室温静置 1 h,5000 r/min 离心 10 min 收集淀粉颗粒,缓冲液洗涤 2 次。然后加入用适量缓冲液配制的 2%糊化淀粉溶液洗脱酶。测定酶活力和蛋白含量。TOYOPEARL HW-55F 纯化系统:参照有关文献[9]进行。

1.6 蛋白质浓度测定

采用考马斯亮蓝(Coomassie blue)法测定蛋白质

浓度^[9]。

1.7 电泳

参考文献[10]进行 SDS-PAGE。分离胶为 10%和 5%。SDS-PAGE 用考马斯亮蓝 R-250 摇床染色 1 h。

1.8 酶活性影响

1.8.1 温度:为了确定酶的最适反应温度,将酶与底物在 pH5.5 及不同温度即 40℃~80℃条件下,反应 1 h 后分别测定酶活力,以最高酶活力为 100%,其余酶活力与之相比计算相对酶活力。在相对稳定的 pH5.5 下,使酶在某个温度下保温不同的时间,按上述方法测定酶活力,以未保温(4℃保存)的酶活力为 100%,确定酶的温度稳定性。

1.8.2 酸碱(pH):用不同 pH 值的 0.1 mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制底物,将酶与底物反应 1 h 分别测定酶活力。以最高酶活力为 100%,其余酶活力与之相比计算相对酶活力,确定酶的最适反应 pH。将酶在不同的 pH 值条件下保温相同的时间,分别测定残留酶活,与未保温酶的酶活力相比,计算百分比。缓冲液同上。

1.8.3 离子:在相同体系中分别加入终浓度为 2 mM 的离子,包括一价离子 K⁺和 Na⁺,二价离子 Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、Co²⁺、Cu²⁺,以及柠檬酸盐离子和 EDTA 负离子,测定酶活力。以未加离子条件下测定的酶活力为 100%,其余酶活力与之相比,观察离子对酶活力的影响。

1.8.4 底物专一性:向 25 mL 三角瓶中分别加入 2 mL 酶液(RSDE173 为 2 U/mL,RSDE174 为 2 U/mL)、2 mL pH5.5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、0.1 g 生玉米淀粉。对照将酶液换成蒸馏水。50℃恒温振荡反应 5 h,离心收集淀粉颗粒,蒸馏水洗涤 2 次,室温晾干。Quanta-200 扫描电子显微镜下观察淀粉颗粒。

分别以生红薯淀粉、小麦淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉和糯米淀粉及糊化玉米淀粉为底物。按照标准方法测定生淀粉酶活力和糊化淀粉酶活力。计算酶水解糊化淀粉的酶活力与水解较适生淀粉底物酶活力的比值。

2 结果

2.1 菌种筛选及鉴定

2.1.1 菌种筛选:将分离自云南地区的 69 株细菌分别点生淀粉平板,50℃培养 24 h。获得 2 株透明圈直径较大的嗜热菌(图 1)。

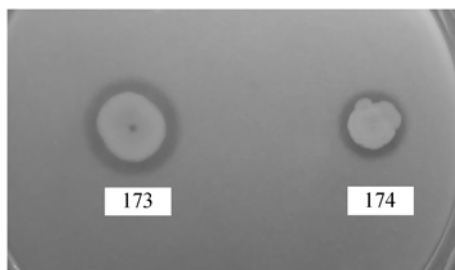


图 1 菌株 173 和 174 对生淀粉的降解

Fig. 1 Digestion of raw starch by strains 173 and 174 grown on plate.

2.1.2 菌株形态与理化特性检测: 菌株 173 在 LB 平板上 65 °C 培养 12 h 后形成直径为 0.5 cm ~ 1.6 cm、黄色、光滑、边缘整齐的扁平菌落,革兰氏染色呈阳性,短杆状细胞,产芽孢,芽孢椭圆形,端生或次端生。该菌的生长温度范围是 50 ~ 75 °C; 而菌株 174 特性,除菌落呈浅黄色、生长温度范围为 30 ~ 75 °C 外,其它与菌株 173 相同。图 2 为 LB 平板培养收集菌株 173 和 174 的扫描电镜照片。

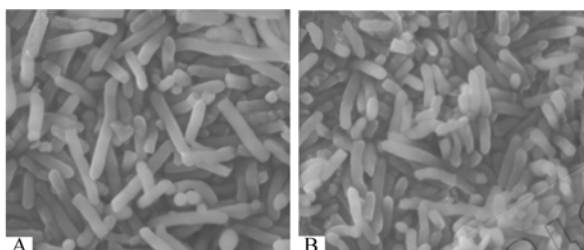


图 2 菌株 173 和 174 的扫描电镜照片

Fig. 2 Scanning electron micrographs of strain 173 and 174 (10000 \times). A: Strain 173; B: Strain 174.

2.1.3 16S rDNA 序列分析: 用通用引物进行 PCR 扩增,获得菌株 173 和 174 的 16S rDNA 的部分序列,经

DNA 序列测定其长度分别为 1391 bp 和 1369 bp, 已分别登录 GenBank (登录号分别为 EF392652 和 EF392653)。将两株菌的 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库中进行同源性比对,结果显示同源性较高的菌株中,99%以上都是 *Geobacillus* 属细菌。同样将所得序列在线测定归属,结果表明两株菌属于 *Geobacillus* 属的细菌,与 *Geobacillus thermoleovorans*(99%)、*Geobacillus kaustophilus* HTA426(99%)、*Geobacillus stearothermophilus* strain BGSC W9A31(99%)有很高的同源性。由于 *Geobacillus* 属的各种间 16S rDNA 序列的相似性水平高于 96.5%^[11, 12], 所以菌株 173 和 174 的种名确定有待进一步详细鉴定, 现暂时命名为 *Geobacillus* sp. 173 和 *Geobacillus* sp. 174, 已保藏于中国高校工业微生物资源和信息中心(<http://cicim-cu.sytu.edu.cn>, 保藏号: *Geobacillus* sp. 173 为 CICIM B1649, *Geobacillus* sp. 174 为 CICIM B1650)。

2.2 生淀粉酶 RSDE173、RSDE174 的分离纯化与分析鉴定

从筛选鉴定的 *Geobacillus* sp. 173 和 *Geobacillus* sp. 174 分离纯化生淀粉酶 RSDE173 和 RSDE174 的总结见表 1。1000 mL 液体摇瓶发酵菌株 173、174, 其产生的生淀粉酶(RSDE173、RSDE174)活力分别达 14.5 U/mL 和 12.9 U/mL。通过生淀粉吸附-熟淀粉洗脱系统和 TOYOPEARL HW-55F 系统进行分离纯化, 获得纯化倍数分别为 50 和 29 的 RSDE173 和 RSDE174, 其中活力回收率分别为 34%和 41%。

分离纯化生淀粉酶的电泳鉴定见图 3。经过生淀粉吸附-熟淀粉洗脱系统和 TOYOPEARL HW-55F 凝胶柱纯化, RSDE173 和 RSDE174 在 10% SDS-PAGE

表 1 生淀粉酶 RSDE173 和 RSDE174 的分离纯化情况

Table 1 Purification of the raw-starch-digesting amylase from *Geobacillus* sp. 173 and 174

Step	Total protein /mg		Total activity /unit		Specific activity /(unit/mg)		Purification /fold		Yield /%	
	173	174	173	174	173	174	173	174	173	174
Crude extract	8.2×10^3	3.6×10^4	1.45×10^4	1.29×10^4	0.6	0.8	1.0	1.0	100	100
Starch adsorption	619	733	1.3×10^4	1.1×10^4	21	15	35	19	89	85
TOYOPEARL HW-55F	166	230	5.0×10^3	5.3×10^3	30	23	50	29	34	41

胶中鉴定为约 54 kDa 的蛋白质。

2.3 酶活性影响

影响酶活性的因素很多,如温度、酸碱、离子及抑制剂等。本工作中主要考察了温度、酸碱、离子对生淀粉酶 RSDE173 和 RSDE174 的影响。

2.3.1 温度: 为了测定酶的最适反应温度,将分离纯

化的生淀粉酶 RSDE173 和 RSDE174 与底物生玉米淀粉在不同温度条件下反应 1 h, 以酶活力最高为 100%, 其余酶活力与之相比计算相对酶活力。如图 4-A 所示, RSDE173、RSDE174 对熟淀粉水解的最适作用温度均为 70 °C, 而对生淀粉水解则分别在 50 ~ 60 °C 和 40 ~ 60 °C 下表现出高水解活力。

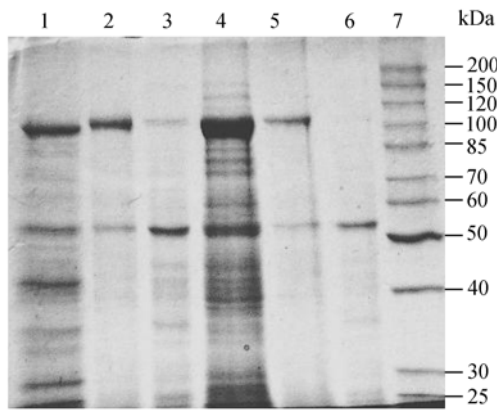


图 3 纯化后的生淀粉酶的电泳分析

Fig. 3 Analysis of purified raw-starch-digesting amylase by electrophoresis. Analysis of SDS-PAGE (10% gel) and staining with Coomassie blue. Lane 1: culture supernatant of *Geobacillus* sp 173; lane 2: RSDE173 purified by raw starch adsorption-desorption system; Lane 3: RSDE173 purified by TOYOPEARL HW-55F column; Lane 4: culture supernatant of *Geobacillus* sp 174; Lane 5: RSDE174 purified by raw starch adsorption-desorption system; Lane 6: RSDE174 purified by TOYOPEARL HW-55F column; Lane 7: fermentas protein marker SM0661.

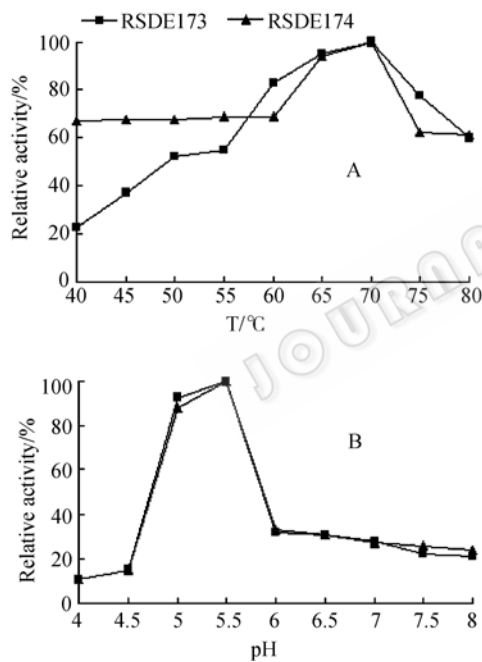


图 4 温度和 pH 对酶活力的影响

Fig. 4 Effect of temperature (A) and pH (B) on amylase activity.

将酶在 70°C 预保温 1h, 以未保温(4°C 保存)为对照, 然后在标准条件下测定水解生淀粉的酶活力, 结果 70°C 预保温 1h 的 RSDE173 和 RSDE174 分别还显示 86% 和 91% 的酶活力, 表明其具有较好耐热性。

2.3.2 酸碱 (pH): 为了测定酶的最适反应 pH, 将 RSDE173 和 RSDE174 与底物生玉米淀粉在不同 pH 条件下 50 反应 1h, 以酶活力最高为 100%, 其余酶

活力与之相比计算相对酶活力。如图 4-B 所示, RSDE173 和 RSDE174 的最适反应 pH 在 pH5.0~5.5。

将 RSDE173 和 RSDE174 在不同 pH 下室温放置 1h, 再分别在标准条件下测定水解生淀粉的酶活力结果显示, 在 pH5.0~9.0 范围内均有较好的酶活力, 表明其在该 pH 范围内较稳定; 而 pH 值低于 4.0 或高于 10.0 时无任何可测的酶活力, 提示在这些 pH 条件下可能失去酶活性构象。

2.3.3 离子: 通过向反应体系中添加终浓度为 2 mmol/L 不同离子, 比较酶活力的结果见表 2。RSDE173 和 RSE174 对大多数试验离子包括 Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、EDTA 负离子和柠檬酸盐离子等的敏感性较低, 但个别离子如 Co²⁺、Cu²⁺对 RSDE173 或 RSDE174 的酶活力有一定的抑制作用。

表 2 离子对酶活性的影响
Table 2 Effect of ions on enzyme activity

Ion	Related Activity /%	
	RSDE173	RSDE174
None	100	100
Na ⁺	96	99
K ⁺	94	99
Mg ²⁺	97	97
Ca ²⁺	101	105
Mn ²⁺	99	99
Co ²⁺	85	93
Cu ²⁺	60	70
Zn ²⁺	92	97
Citrate	97	96
EDTA	95	98

2.4 底物专一性

图 5 是玉米淀粉颗粒的扫描电镜照片 (1000×), 表明 RSE173(B)和 RSE174(C)对生玉米淀粉的显著降解作用, 经酶作用 5h 的淀粉颗粒出现不同大小和深度的孔隙, 最大的孔穿进淀粉的内层, 有的可以看见淀粉颗粒的内部结构, 也有少数破裂、成层的淀粉颗粒出现。

RSE173 和 RSE174 对各种生淀粉底物及糊化玉米淀粉的水解情况总结于表 3。RSE173 对各种生淀粉降解的强弱顺序为: 红薯淀粉 > 小麦淀粉 > 玉米淀粉 > 木薯淀粉 > 糯米淀粉; 而 RSE174 的为: 糯米淀粉 > 小麦淀粉 > 红薯淀粉 > 玉米淀粉 > 木薯淀粉。RSE173 水解糊化玉米淀粉与水解生红薯淀粉的比值为 1.48; 而 RSE174 水解糊化玉米淀粉与水解生糯米淀粉的比值为 1.69。

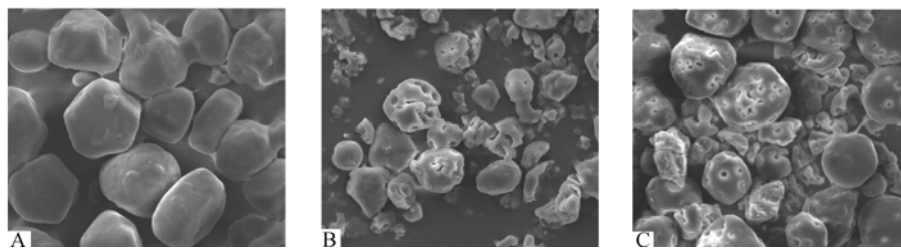


图 5 玉米淀粉颗粒的扫描电镜照片(2400×)

Fig. 5 Scanning electron micrographs of digested corn starch granules (2400×). The partially digested corn starch granules were prepared as described in 'Materials and Methods' and used in the sample for scanning electron microscopy. A: corn starch granule without digestion; B: corn starch granule digested by RSDE173; C: corn starch granule digested by RSDE174.

表 3 酶对不同底物的水解情况

Table 3 Enzyme activities on various substrates

Substrates	RSE173		RSE174	
	Activity/(U/mg)	Ratio*	Activity/(U/mg)	Ratio
<u>Raw starches</u>				
Corn	27.6	0.84	19.1	0.50
Potato	12.4	0.38	35.1	0.92
Wheat	30.6	0.93	26.1	0.69
Sweet potato	32.8	1.00	23.1	0.61
Sticky rice	21.6	0.66	38.1	1.00
<u>Gelatinized corn starch</u>	48.4	1.48	64.2	1.69

* The ratios of their related activities for digesting the gelatinized starch and the above best substrates are 1.48 (RSDE 173 to sweet potato starch) and 1.69 (RSDE 174 to sticky rice starch), respectively.

3 讨论

由于生淀粉酶可以节约能量、简化生产工序,在食品和酿造等工业中具有重要应用前景^[13]。从上个世纪 80 年代开始就有生淀粉酶的研究报道^[14]。许多微生物可以产生生淀粉水解酶,其中以丝状真菌^[15-17]和细菌^[18,19]为主。目前国内尚未有耐热生淀粉酶的报道,从国外报道的耐热生淀粉酶看,最适作用温度一般在 50℃~60℃,而嗜热细菌 *Geobacillus stearothermophilus* 所产生的生淀粉酶作用温度高达

70℃。本文研究的 RSDE173 在 50℃~65℃有较高的生淀粉酶活力,而 RSDE174 在更宽的温度范围 40℃~65℃有生淀粉降解能力。与报道的耐热生淀粉酶相比,当反应体系的 pH 在 5.0~5.5 之间时,RSDE173 和 RSDE174 表现最高酶活力,而已报道的耐热生淀粉酶的最适作用 pH 值一般为 6.0^[2,20-22]。表 4 比较了不同来源的耐热生淀粉酶的酶学特性。此外,通过研究离子对酶活力的影响表明,我们分离纯化的两个耐热生淀粉酶都不依赖于 Ca²⁺。因此,生淀粉酶 RSDE173 和 RSDE174 具有潜在的工业应用价值。

表 4 各种生淀粉酶性质比较

Table 4 Comparison of raw starch digesting amylase

Resources	Topt.	pHopt.	pH stability	Thermo-stability	Suitable substrate	Reference
<i>Geobacillus</i> sp. 173	70	5.0~5.5	4.5~9.0	30-90	Sweet potato	This study
<i>Geobacillus</i> sp. 174	70	5.0~5.5	4.5~9.0	30-90	Sticky rice	This study
<i>Streptomyces</i> sp	50~60	6.0	6.0	50	Wheat	[2]
<i>Bacillus subtilis</i> 65	60	6.0	6.0~9.0	60	Waxy corn	[20]
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	70	—	—	—	Wheat	[21]
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	50	6.0	—	30~90	Potato	[22]

—, not determined.

另外,在对筛选的两株嗜热菌进行鉴定的过程中,我们发现其形态学、培养特征、部分生理生化具有典型

的 *Geobacillus* 属的特征,从 16S rDNA 序列比分析结果看,它们与 *Geobacillus thermoleovorans*(99%)、

Geobacillus kaustophilus HTA426(99%)、*Geobacillus stearothermophilus* strain BGSC W9A31(99%)有很高的同源性, 所以 *Geobacillus* sp. 173 和 174 的种名确定有待进一步详细鉴定。*Geobacillus* 是 2001 年新命名细菌属, 该属开始有 8 个种, 目前已经超过 20 个种, 种间 16S rDNA 序列的同源性 96%以上。为了进一步确定 *Geobacillus* sp. 173 和 174 的分类种, 我们还将进行与其系统发育关系密切的典型菌株的 DNA-DNA 杂交试验和 *recN* 序列分析等工作。

参 考 文 献

- [1] Jeang CL, Lee YH, and Chang LW. Purification and characterization of a raw-starch digesting amylase from a soil bacterium—*Cytophaga* sp. *Biochem Mol Biol Int*, 1995, 35: 549–557.
- [2] Kaneko T, Ohno T, and Ohisa N. Purification and characterization of a thermostable raw starch digesting amylase from a *Streptomyces* sp. isolated in a milling factory. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69: 1073–1081.
- [3] Kumar S, Satyanarayana T. Purification and kinetics of a raw starch-hydrolyzing, thermostable, and neutral glucoamylase of the thermophilic mold *Thermomucor indicaeuseudaticae*. *Biotechnol Prog*, 2003, 19: 936–944.
- [4] Matsubara T, Ben Ammar Y, Anindyawati T, *et al.* Degradation of raw starch granules by alpha-amylase purified from culture of *Aspergillus awamori* KT-11. *J Biochem Mol Biol*, 2004, 37: 422–428.
- [5] Novotny JF. Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleovorans*, a thermophilic hydrocarbon-utilizing species. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 2393–2396.
- [6] Nakajima R, Imanaka T, and Aiba S. Nucleotide sequence of the *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase gene. *J Bacteriol*, 1985, 163: 401–406.
- [7] Hot GJ, Krieg RN, Sneath HAP, *et al.* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994.
- [8] Zeigler D R. Application of a *recN* sequence similarity analysis to the identification of species within the bacterial genus *Geobacillus*. *Int J Syst Evol Microbio*, 2005, 55: 1171–1179.
- [9] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 2000.
- [10] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 等. 生物化学实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [11] Nazina TN, Tourova TP, Poltarau AB, *et al.* Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermogluco-sidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermogluco-sidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int J Syst Evol Microbio*, 2001, 51: 433–466.
- [12] 周卫民, 杨世忠, Nazina T N, 等. *Geobacillus* 研究进展. 微生物学杂志(*Journal of Microbiology*), 2005, 25: 46–49.
- [13] Shinsaku H, Yuji T, Takehiro I, *et al.* Occurrence of an Affinity Site apart from the Active Site on the Raw-Starch-Digesting but Non-Raw-Starch-Adsorbable *Bacillus subtilis* 65 alpha-Amylase.. *Appl Environl Microbio*, 1990, 56: 2584–2586.
- [14] Itkor P, Tsukagoshi N, and Udaka S. Purification and properties of divalent cation-depending raw-starch-digesting a-amylase from *Bacillus* sp B1018. *J Ferment Bioeng*, 1989, 68: 247–251.
- [15] Morita H and Fujio Y. High specific activity of raw starch digesting-glucoamylase producing *Rhizopus* sp A-11 in liquid culture. *Starch*, 1997, 49: 293–296.
- [16] Oates CG. Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends Food Sci Technol*, 1997, 8: 375–379.
- [17] Okolo BN, Ezeogu LI, and Ebisike CO. Raw starch digesting amylase from *Thermoactinomyces thalophilus* F13. *World J Microbiol Biotechnol*, 1996, 12: 637–638
- [18] Kelly CT, Mctigue MA, Doyle EM, *et al.* The raw starch-degrading alkaline amylases of *Bacillus* sp IMD 370. *J Ind Microbiol*, 1995, 15: 446–448.
- [19] Achi O, Njokuobi A. Production of raw starch saccharifying amylase by *Bacillus alvei* grown on different agricultural substrates. *World J Microbiol Biotechnol*, 1992, 8: 206–207.
- [20] Hayashida S, Teramoto Y, Inoue T. Production and characteristics of raw-potato-starch-digesting alpha-amylase from *Bacillus subtilis* 65. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54: 1516–1522.
- [21] Kim J, Nanmori T, Shinke R. Thermostable, raw-starch-digesting amylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55: 1638–1639.
- [22] Iefuji H, Chino M, Kato M, *et al.* Raw-starch-digesting and thermostable alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning and sequencing. *Biochem J*, 1996, 318: 989–996.

Purification and Characterization of Thermostable Amylases from Two Bacterial Species

Yongcun Dong, Yang Liu, Yuanyuan Chen, Dandan Niu, Liang Zhang, Guiyang Shi, Zhengxiang Wang*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education and School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Two thermophilic bacterial isolates, strain 173 and strain 174, with raw starch-digesting activities were selected from thermophilic bacteria growing in hot spring of Tengchong County, Yunnan Province, China. By amplification, sequencing and alignment analysis of 16S ribosomal DNAs, they were identified as members of genus *Geobacillus*. In shaker flask culture *Geobacillus* sp. 173 produced 14.5 U/mL amylase and for *Geobacillus* sp. 174 with 12.9 U/mL. Both amylases were purified by starch absorption-desorption and chromatograph. The amylases from strain 173 and strain 174 purified to about 50 and 29 folds were respectively achieved with an overall yield of 34% and 41%. The maximum gelatinized-starch-digesting activity of the purified amylases were at 70°C and pH 5.0~5.5. The high raw-starch-digesting activity of these enzymes were observed at 50°C~60°C (from strain 173) and 40°C~60°C (from strain 174). Both enzymes were not sensitive to ions including mental ions (Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺) and others (EDTA, Citrate), but were slightly inhibited by ions such as Co²⁺, Cu²⁺ for amylase from strain 173 and Cu²⁺ for amylase from strain 174. Both enzyme had specificity of starch substrates.

Keywords: thermophilic bacilli; raw-starch-digesting amylase; purification and characterization

Supported by the Program of New Century Excellent Talents in University (NCET-04-0497) and the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA020204)

*Corresponding Author: Tel: +86-510-85918121; E-mail: zxiwang@jiangnan.edu.cn

Received: 5 February 2007/ Revised: 9 November 2007

2008年《微生物学报》改用新的“稿件远程处理系统”

自2006年本刊开通使用了“稿件远程处理系统”，因软件使用不畅，本刊决定2008年改用新的稿件处理系统，随之也不得不更换网站名称。由此会给作者和专家带来不便，敬请大家谅解！

2007年12月31日之前的来稿，依然使用原网站 <http://journal.im.ac.cn/xuebao> 进行投稿、查询和审稿，直到稿件处理终结为止。2008年1月1日以后，本刊的旧网站的投稿窗口将关闭，所有投稿将在新系统下进行。

2008年1月1日以后的投稿，将在新的网站 <http://journals.im.ac.cn> 上操作，原有的“作者库”将全部导入新的系统，凡是进行过网上投稿的作者仍然可以使用原来的“用户名”和“口令”，不必再重新注册。新系统使用起来会非常方便！欢迎大家进行在线投稿、查询、修稿和审稿。

衷心感谢广大读者、专家对本刊的支持！