

# 高温 $\alpha$ - 淀粉酶产生菌的筛选及酶学性质研究

朱何东 陈远钊 常 峰 吴 飞 胡 承 王忠彦

(四川大学生命科学学院生物资源和生态环境教育部重点实验室, 四川 成都 610064)

**摘要:** 从酒厂高温曲中筛选到一株产高温  $\alpha$ -淀粉酶的野生菌株,经初步鉴定为链霉菌,命名为 *Streptomyces* sp. 1109。在 45 条件下,该菌株固体发酵产酶活力达到 169.13 u/g。通过酶学性质研究,该酶反应最适温度为 85 ,最适 pH 为 6.5,具有较高的热稳定性。

**关键词:** 微生物; 高温  $\alpha$ -淀粉酶; 筛选; 酶学性质

中图分类号: TS261.1; Q814; Q55 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2006)05-0030-03

## Screening of a Thermostable $\alpha$ -amylase-producing Strain and Its Zymologic Properties

ZHU He-dong, CHEN Yuan-zhao and CHANG Feng et al.

(Biological Resources & Ecological Environment Key Lab of Education Ministry, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

**Abstract:** A thermostable  $\alpha$ -amylase-producing strain was screened from high-temperature distilled yeast, which was identified as streptomycete and named *Streptomyces* sp. 1109. The activity of  $\alpha$ -amylase produced by the strain was 169.13 u/g under solid state fermentation at 45 . The characteristics of the  $\alpha$ -amylase were also studied. The enzyme was thermostable and its optimum temperature and pH were at 85 and as 6.5 respectively.

**Key words:** microbe; thermostable  $\alpha$ -amylase; screening; zymologic properties

淀粉酶是水解淀粉和糖原酶类的统称,是最早实现工业化生产,迄今为止用途最广、产量最大的酶制剂品种<sup>[1]</sup>。高温  $\alpha$ -淀粉酶通常是指在高温下具有最适反应温度的淀粉酶<sup>[2]</sup>,是淀粉加工中有重要用途的一种酶,广泛应用于酿酒、食品、医药、纺织和环境治理等行业<sup>[3]</sup>,已经成为工业上用量最多的酶之一<sup>[4]</sup>。能产生高温  $\alpha$ -淀粉酶的菌种主要是芽孢杆菌属的凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)、嗜热芽孢杆菌(*B.stearotherophilus*)、地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)<sup>[5]</sup>和属于古细菌的 *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei*, *Thermococcus profundus* 等<sup>[6]</sup>,目前工业生产中使用的高温淀粉酶主要来自地衣芽孢杆菌及其突变株。本研究从酒厂高温曲中分离得到一株能向胞外分泌高温淀粉酶的菌株,经初步鉴定为链霉菌,命名为 *Streptomyces* sp. 1109,本文为该菌筛选过程及所产高温  $\alpha$ -淀粉酶酶学性质的研究结果。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

四川某白酒酿造企业高温曲。

#### 1.1.2 培养基

平板筛选培养基: 高氏 1 号培养基, 重铬酸钾 25 mg/L<sup>[7]</sup>。

种子培养基: 蛋白胨 0.5%, 酵母膏 0.5%, 可溶性淀粉 3%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%, pH 7.0~7.2, 121 灭菌 20 min。

产酶液体培养基: 同种子培养基。

产酶固体培养基: 麦麸 水为 1 1.5, 250 mL 三角瓶装量 25 g, 自然 pH 值, 121 灭菌 20 min。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌种初筛

称取样品 5 g 加入装有 50 mL 无菌水的小三角瓶中, 振荡均匀后静置, 取上清液做浓度梯度稀释, 取一定量涂布于平板筛选培养基, 45 倒置培养 7 d, 待长出菌落后挑取有明显透明圈的单菌落, 转接, 经平板划线法得到纯种。

收稿日期: 2006-01-14

作者简介: 朱何东(1981-), 男, 浙江诸暨人, 硕士研究生, 研究方向: 工业及食品微生物。

通讯作者: 王忠彦。

### 1.2.2 菌种复筛

初筛菌种接种于种子培养基, 45℃, 150 r/min 摇床培养 72 h。种子液以 10% 接种量接种于产酶液体培养基, 相同条件培养 72 h, 发酵液 10000 r/min 离心 5 min, 取上清液测酶活。

### 1.2.3 固态发酵产酶

5 mL 种子液接种于产酶固体培养基中, 45℃ 培养 72 h。称取固体培养基 5 g, 加入 pH6.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (0.5% NaCl) 20 mL 浸泡 3 h, 过滤, 10000 r/min 离心 5 min 取上清液, 即粗酶液, 测定酶活。

### 1.2.4 酶活测定方法<sup>[8,9]</sup>

取 5 mL 0.5% 可溶性淀粉溶液, 在 70℃ 水浴中预热 10 min, 加入适当稀释的酶液 0.5 mL, 准确反应 5 min 后, 用 5 mL 0.1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。取 0.5 mL 反应液与 5 mL 稀碘液显色, 在 620 nm 处测光密度。以 0.5 mL 水代替 0.5 mL 反应液为空白, 以不加酶液 (加同体积的缓冲液) 为对照。

酶活力根据下式计算:

$$\text{酶活力} = (R_0 - R) / R_0 \times 50 \times D \times 4$$

式中:  $R_0$ ,  $R$ ——分别表示对照和反应液的光密度;

$D$ ——为酶的稀释倍数。

并调整  $D$  使  $(R_0 - R) / R_0$  在 0.2~0.7 之间。

酶活定义: 在 70℃, pH 6.0 条件下, 5 min 内水解 1 mg 淀粉的酶量为一个活力单位。

### 1.2.5 菌种鉴定方法

参照《微生物分类学》<sup>[10]</sup>、《放线菌分类基础》<sup>[11]</sup>和《伯杰细菌鉴定手册 (第八版)》<sup>[12]</sup>等文献方法, 以形态和培养特征为主, 生理生化特性及生态特性为辅。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种的筛选

从样品中筛选得到一株产酶较高的野生菌株 Streptomyces sp. 1109, 液体发酵酶活为 56.47 u/mL, 固态发酵酶活为 169.13 u/g。

### 2.2 菌种鉴定结果

该菌菌落较小, 中央有皱褶 (见图 1), 气生菌丝白色, 基内菌丝微黄色, 较发达。孢子丝直, 孢子柱状、杆状, 表面光滑 (见图 2)。菌株可在 20~50℃ 之间生长, 最适温度在 40~45℃ 之间, 菌株对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌均无抗性。该菌在不同培养基上的培养特征见表 1, 在培养过程中均无可溶性色素产生。该菌生理生化特性见表 2。综合以上结果, 将该菌初步鉴定为链霉菌, 命名为 Streptomyces sp. 1109。

### 2.3 酶学性质的初步研究

#### 2.3.1 酶反应最适 pH 值

用不同 pH 值的缓冲液配制可溶性淀粉溶液, 测定酶活力, pH 值范围为 4~8, 结果如图 3 所示, 酶反应的最适 pH 值为 6.5。

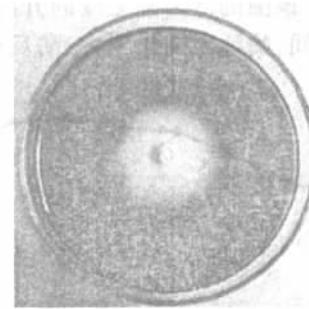


图 1 菌株在筛选培养基上产生的水解圈

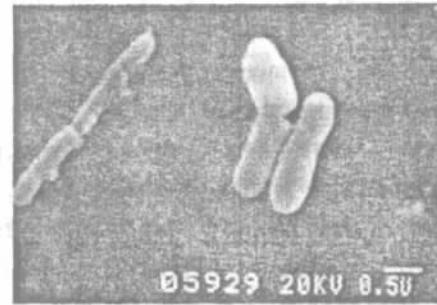


图 2 菌株孢子扫描电镜照片

表 1 菌株在不同培养基上的培养特征

培养基	气生菌丝	基内菌丝
高氏 1 号琼脂	白色	微黄色
查氏琼脂	灰白	亮白
葡萄糖天门冬素琼脂	微白色	黄色
无机盐淀粉琼脂	白色	灰黄色
葡萄糖酵母膏琼脂	微白	微黄
酪氨酸琼脂	白色	乳白色
马铃薯块	灰白	乳脂色

表 2 菌株的生理生化特性

项目	特征	项目	特征	项目	特征
明胶液化	+	木糖	+	半乳糖	+
淀粉水解	+	葡萄糖	+	乳糖	+
牛奶凝固	-	果糖	+	麦芽糖	+
牛奶酪化	-	鼠李糖	-	卫茅醇	-
纤维素水解	-	蔗糖	+	菊糖	-
硝酸盐还原	+	棉子糖	+	山梨醇	+
产生 H <sub>2</sub> S	-	甘露醇	+		
阿拉伯糖	+	肌醇	+		

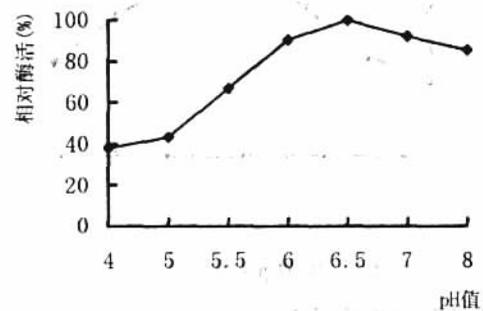


图 3 在不同 pH 值下的酶活比较

#### 2.3.2 酶反应最适温度

在不同温度下测定酶活力, 范围为 40~100℃, 结

果如图4所示。该酶的活力随温度的升高而缓慢升高,在70~90 之间,酶活力变化不大,酶反应的最适温度为85 。

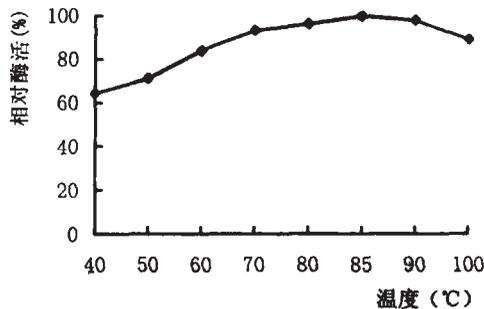


图4 在不同温度下的酶活比较

### 2.3.3 酶的温度稳定性研究

将粗酶液在70 ,80 ,90 水浴保温不同时间,立即置于冰水中冷却,在70 下测定残余酶活,以不经保温的酶活为100%,其结果见图5。该酶具有较高的热稳定性,在70 下保温1h,仍保留81%的酶活;80 下保温1h,残留酶活为36%左右;在90 下,稳定性较差,保温15min后,残留酶活只剩44%,1h后仅剩12%。

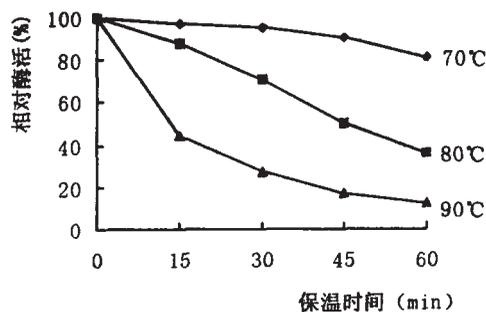


图5 酶的热稳定性

### 2.3.4 酶的pH稳定性研究

用0.1 mol/L的HCl或NaOH调节粗酶液pH至3.0~9.0,在室温下放置1h后,测定残余酶活,结果见图6。从图6中可看出,该酶在pH值6.0~7.0范围内较稳定。

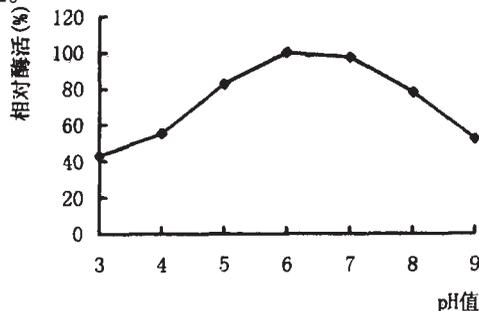


图6 酶的pH稳定性

### 2.3.5 Ca<sup>2+</sup>对酶耐热性研究

取粗酶液添加不同浓度的Ca<sup>2+</sup>,浓度范围为0.01~0.05 mol/L,在90 水浴保温30min,立即用冰水冷却,测定残余酶活,以不加Ca<sup>2+</sup>的酶活为100%,其结果见图

7。从图7中可知,Ca<sup>2+</sup>能增强酶的耐热性,当Ca<sup>2+</sup>浓度在0.02 mol/L时作用最大,当浓度继续增大时,酶的耐热性不再提高而呈降低趋势。

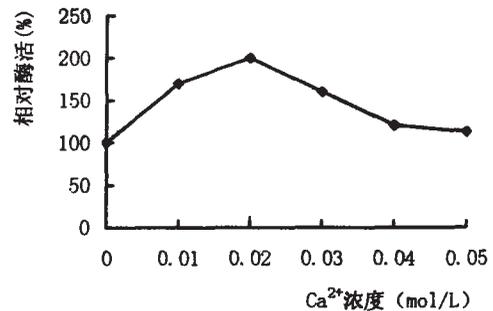


图7 对酶耐热性的影响

## 3 结论

从白酒酿造企业高温曲中分离得到一株能向胞外分泌高温淀粉酶的菌株,其最适生长温度为40~45 ,经初步鉴定为链霉菌,命名为Streptomyces sp. 1109。该菌株液体发酵产酶,发酵液酶活为56.47 u/mL,固态发酵产酶活力为169.13 u/g。通过对该酶的酶学性质研究,发现其最适反应pH值为6.5,最适反应温度为85 ,在pH值6.0~7.0范围内稳定性较好。该酶具有较高的热稳定性,在70 下保温1h,酶活力仅损失19%,而在更高的温度下失活较快,Ca<sup>2+</sup>能明显增强其耐热性,当Ca<sup>2+</sup>浓度在0.02 mol/L时作用最大。

### 参考文献:

- [1] 张树政. 酶工业制剂[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 王福荣, 唐景春. 耐高温 - 淀粉酶活力测定法的研究[J]. 食品与发酵工业, 1995, (2): 27- 30.
- [3] 张强, 刘成君, 蒋芳, 等. 耐高温 - 淀粉酶产生菌的分离鉴定及发酵条件与酶性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(2): 34- 37.
- [4] 王磊, 周新宇, 唐上华, 等. 耐高温 - 淀粉酶基因在枯草杆菌染色体上的整合、扩增及表达的研究[J]. 工业微生物, 1998, 28(1): 7- 12.
- [5] 卢涛, 舒丹, 张杰, 等. 高温 - 淀粉酶产生菌的选育[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2002, 39(6): 1131- 1133.
- [6] 唐雪明, 王正祥, 诸葛健. 具有工业应用价值的高热稳定性极端酶[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(5): 65- 70.
- [7] 徐丽华, 杨宇容, 姜成林. 云南土壤放线菌生态分布的研究[J]. 微生物学报, 1996, 36(3): 220- 226.
- [8] Young JYoo, Juan Hong, Randolph T. Hatch. Comparison of - amylase activities from different assay methods[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1987, 30: 147- 151.
- [9] 史永昶, 姜涌明, 樊颢, 等. 蛋白酶对解淀粉芽孢杆菌 - 淀粉酶活力的影响[J]. 微生物学通报, 1995, 22(1): 23- 24.
- [10] 张纪忠. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990.
- [11] 阮继生. 放线菌分类基础[M]. 北京: 科学出版社, 1977.
- [12] R.E.布坎南, N.E.吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984.