

低温淀粉酶菌株 C2 的分离鉴定及其产 低温淀粉酶的酶学性质

冯旭明 迟乃玉 张庆芳*

(大连大学 生物工程学院 辽宁省海洋微生物生物工程技术研究中心 辽宁 大连 116622)

摘要: 获得低温淀粉酶高产菌株, 确定该菌株所产淀粉酶的酶学性质。从大黑山(大连)污泥中筛选菌株, 通过菌株的形态特征、生理生化 and 16S rDNA 序列鉴定确定其种属, 对其酶学性质进行初步研究。获得 1 株低温淀粉酶高产菌株 C2, 经鉴定其为微小杆菌属, C2 所产低温淀粉酶最适反应温度为 25 °C, 酶的热稳定性比较差, 最适 pH 为 7.5, Ca^{2+} 和 Fe^{2+} 对该酶有激活作用, Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Go^{2+} 等抑制酶活性。经薄层层析(TLC)鉴定酶解产物为葡萄糖, 说明该菌株具有产生低温淀粉糖化酶的能力。菌株 C2 所产淀粉酶符合低温淀粉酶性质, 值得进一步研究。

关键词: 低温淀粉酶, 16S rDNA, 微小杆菌, 酶学性质

Screening and identification of cold-active amylase strain C2 and its amylase characterization

FENG Xu-Ming CHI Nai-Yu ZHANG Qing-Fang*

(Bioengineer College, Dalian University, Liaoning Technology of Marine Microbiological Engineering Research Center, Dalian, Liaoning 116622, China)

Abstract: Strain producing cold-active amylase want to be isolated. Enzymatic properties of the strain will be determined. Screening strains from The Black mountant. Determine its species by its morphological, the physiological and biochemical properties and 16S rDNA sequence analysis, to study its enzymatic properties. A strain C2 producing cold-active amylase was identified as *Exiguobacterium* sp.. Enzymatic properties showed that the optimum pH value is 7.5 and the optimum reaction temperature is 25 °C, but the thermal stability of the enzyme is relatively poor. The amylase activity was activated by Ca^{2+} and Fe^{2+} , and was inhibited by Cu^{2+} , Ni^{2+} and Go^{2+} . By the identification of TLC, the product of enzymolysis is glucose. It is indicates that the strain can product cold-active starch glucoamylase. Amylase produced by strain C2 in line with the nature of cold-active amylase, it deserves to be further researched.

* 通讯作者: Tel: 86-411-87402624; ✉: zqf7566@126.com
收稿日期: 2011-06-16; 接受日期: 2011-09-26

Keywords: Cold-active amylase, 16S rDNA, *Exiguobacterium* sp., Enzymatic properties

淀粉酶是水解淀粉和糖原酶类的总称, 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^[1]。目前国内外市场中常用的淀粉酶一般都是中温或高温淀粉酶, 最适酶活温度一般都在 50 °C 左右, 在 0–20 °C 低温范围活力很低, 不适于食品、饲料、纺织和洗涤剂、制药等要求低温处理的条件而限制其应用。而低温淀粉酶的最适酶活温度一般在 40 °C 以下^[2], 与中高温淀粉酶相比, 低温淀粉酶在食品、洗涤、制药等多个领域有无法替代的优越性。也正因为低温淀粉酶在低温环境下能保持高活性, 就大大缩短了发酵处理时间, 减少了高价的供热系统, 节约了能源, 对环保有一定的贡献。因此自 20 世纪 70 年代以来, 世界上已有许多实验室在从事低温淀粉酶的研究。有些低温淀粉酶已经用于工业生产。相信随着研究的持续深入及生物工程技术的充分利用, 低温淀粉酶工业应用前景将会更广阔^[3–7]。

本文从大黑山(大连)污泥中分离到一株低温淀粉酶高产菌株, 并对其酶学性质进行了初步研究, 拟为低温淀粉酶工业化生产和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要药品及试剂: 可溶性淀粉(天津市科密欧化学试剂有限公司)。

1.1.2 样品: 辽宁大连大黑山泥土样品 6 个、水样 2 个。

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 富集培养基(g/L): 可溶性淀粉 10, 蛋白胨 2 牛肉膏 1, K_2HPO_4 1, $MSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, NaCl 0.5, 水 1 000 mL, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.2.2 平板分离培养基(g/L): 可溶性淀粉 4, 蛋白胨 10, 牛肉膏 5, K_2HPO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, NaCl 0.5, 琼脂 18, 水 1 000 mL, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.2.3 种子培养基(g/L): 蛋白胨 10, 牛肉膏 3, 葡

萄糖 1, NaCl 5, 水 1 000 mL, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.2.4 发酵培养基(g/L): 可溶性淀粉 10, 蛋白胨 5, 牛肉膏 5, NaCl 3, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, 水 1 000 mL, pH 7.0; 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。250 mL 的三角瓶, 装液量为 100 mL。培养温度 20 °C, 摇床转速为 140 r/min。

1.3 菌株筛选方法

取 5 g 土样(或 5 mL 水样)加入 50 mL 带有小玻璃珠的无菌水中, 充分振荡摇匀后静置片刻, 用移液枪吸取 1 mL 上清液加入富集培养基中, 置于 20 °C、150 r/min 冷冻恒温振荡器培养。培养 48 h 后将富集液用无菌水进行不同的梯度稀释(10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9})。用移液枪吸取稀释液 0.1 mL 涂布于筛选平板, 于 20 °C 恒温培养箱中培养 60 h 后加稀碘液^[8], 以菌落周围是否出现水解透明圈及透明圈大小和 20 °C 摇床培养 48 h 的液体发酵培养后的淀粉酶活力为筛选指标。

1.4 粗酶液的制备方法

将发酵液在 4 °C 于 8 000 r/min 离心 15 min, 取上清液用蒸馏水透析, 磁力搅拌器缓慢搅拌, 每隔 4 h 换一次水, 透析 24 h 尽量除尽其中的无机盐离子。经过此步骤后提取的酶为粗酶液。

1.5 酶活测定方法

2%的可溶性淀粉糊化液 2.0 mL 加入到 25 mL 具塞比色管, 添加 pH 6.4 柠檬酸柠檬酸-钠缓冲液 2 mL, 30 °C 预热 10 min, 加入 1.0 mL 酶液, 于 30 °C 恒温振荡(180 r/min)反应 10 min 后, 加入 DNS 试剂 2 mL 终止反应; 摇匀, 置沸水浴中煮沸 5 min。取出后流水冷却, 加蒸馏水定容至 20 mL。以灭活的酶液管作为空白调零点, 在 520 nm 波长下比色测定吸光度值^[9]。酶活单位定义: 在分析条件下, 1 min 释放 1 μ mol 的还原糖所需的酶量定义为 1 个酶活力单位。

1.6 菌株表型特征分析

1.6.1 形态学观察: 在平板培养基上观察菌落形态; 在光学显微镜(油镜)下观察菌体形态特征。

1.6.2 生理生化鉴定: 参照《伯杰氏细菌手册》第 8

版相关内容进行。

1.7 菌株分子生物学鉴定

采用酚氯仿抽提法, 提取菌株 DNA。应用 16S rDNA 引物: 正向引物 P1 (5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3')和反向引物 P2 (5'-AAGTCGTAACAA GGTAACC-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (50 μ L): Ex Taq (5 U/ μ L) 0.25 μ L, 10 \times Ex Taq Buffer 5.0 μ L, dNTP mixture 5.0 μ L, 上游 Primer 1.0 μ L, 下游 Primer 1.0 μ L, 补加 ddH₂O 到 50 μ L。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 52 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物直接送上海生工生物工程技术有限公司测序。测得 1 424 bp 的 16S rDNA 基因核苷酸序列, 输入 GenBank 数据库, 进行 BLAST 比对, 获取 16S rDNA 基因序列相似度高的菌种。采用 ClustalX 进行多序列匹配比对, 通过 MEGA 4.1 软件计算出序列的系统进化距离, 采用 Neighbor-Joining 构建系统进化树^[9]。

1.8 酶学性质的初步研究

1.8.1 酶解产物薄层层析(TLC)方法分析: 首先将薄层层析用硅胶薄板于 110 $^{\circ}$ C 活化 0.5 h。取一定量的粗酶液(方法 1.4), 用毛细吸管进行点样。展开剂为正丁醇: 冰乙酸: 水(2:1:1, V/V/V), 置层析缸内在室温下展开约 40 min, 待展开剂前沿走至距板上端 1 cm 处取出自然晾干, 喷显色剂(苯胺-二苯胺), 于 80 $^{\circ}$ C 烘箱中干燥 15 min 左右, 直到薄板上显示出清晰的斑点。

1.8.2 温度对酶活力的影响: 分别测定粗酶液在

10 $^{\circ}$ C、15 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C 时的酶活性; 同时, 将另一组粗酶液分别置于 25 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C、75 $^{\circ}$ C 水浴中保温 1 h, 立即冷却并测定剩余酶活力。

1.8.3 pH 对酶活力的影响: 分别测定粗酶液在 pH 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 缓冲液体系下的酶活性。

1.8.4 金属离子对酶活力的影响: 在酶反应体系中分别加入 0.01 mol/L 的 Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺、Co²⁺ 9 种金属离子, 并设置不加金属离子空白组, 然后测定各组的酶活。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与鉴定

最终筛选出 4 株淀粉水解圈直径与菌落直径比较大的菌株, 经摇瓶发酵复筛, 获得一株高活性的低温淀粉酶菌株 C2, 通过单因素法和响应面法对发酵条件进行优化后, 在发酵培养基中酶活可达到 23.7 U/mL。其生理生化鉴定见表 1。

C2 菌株在 15 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C 下的透明圈与菌落直径比值(mm)分别为 4.0(8/2)、7.3(22/3)、5.0(20/4)、3.7(11/3)、3.0(9/3), 其最适生长温度在 20 $^{\circ}$ C 左右, 比常温淀粉酶类生产菌低 10 $^{\circ}$ C 左右, 与文献报道的产低温淀粉酶类的低温微生物生长温度一致。形态学观察菌落呈淡黄色, 色素不扩散; 菌体杆状, 不生孢, 不抗酸,革兰氏染色阴性。C2 菌株和相关菌株的亲缘关系见图 1。

表 1 菌株 C2 的常规生理生化反应特征 Table 1 Tradition taxonomical properties of the strain C2			
鉴定指标 Indentification index	鉴定结果 Indentification result	鉴定指标 Indentification index	鉴定结果 Indentification result
革兰氏实验 Gram test	—	葡萄糖产酸 Glucose acid production	+
芽孢染色 Spore stain	—	明胶水解 Gelation hydrolysis	+
穿刺培养 Stab culture	兼性厌氧	麦芽糖水解 Maltose test	+
接触酶实验 Catalase test	+	酪素水解 Casein hydrolysis	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	蔗糖实验 Sucrose test	+
氧化酶实验 Oxidase test	+	半乳糖实验 Galactose test	+

序列分析结果表明, 菌株 C2 的 16S rDNA 序列全长 1 424 bp, 将序列输入 GenBank 进行相似度比较, 与 *Exiguobacterium indicum* (AJ 846291.1) 的亲缘性达到 99.37%, 结合菌株的形态和生理生化特征, 菌株初步鉴定为 *Exiguobacterium* sp.。

2.2 低温淀粉酶酶学性质的初步研究

2.2.1 酶降解产物分析: 取一定量粗酶液, 按照酶活测定方法进行酶解反应, 以薄层层析法鉴定酶解产物, 其中 A 组为葡萄糖(单糖)标准样品, B 组为酶解产物, C 组为麦芽糖(二糖)标准样品, 结果见图 2。

由图 2 可知酶解产物中有葡萄糖, 说明此菌产生的低温淀粉酶能将可溶性淀粉降解成葡萄糖, 即粗酶液中含有低温淀粉糖化酶组分。糖化酶具有多型性, 即同一菌株会产生多个组型的糖化酶, 淀

粉糖化酶是其中一个组型, 因为它具有淀粉结构域, 所以能够吸附到淀粉颗粒上直接将淀粉水解为葡萄糖。

2.2.2 酶作用最适温度: 由图 3 可以看出, 酶的最适作用温度为 25 °C, 45 °C 以后酶活性急剧下降, 在 15 °C–30 °C 范围内, 酶活力保持在 80% 以上, 具有低温酶的特性。在低温条件下, 相对嗜温型酶而言, 来自低温微生物的酶反应所需时间更短^[10–11], 这是低温淀粉酶的应用优势。

2.2.3 酶热稳定性: 由图 4 可见, 该菌株所产低温酶的热稳定性较差, 温度低于 45 °C 的情况下酶活力比较好, 但是当温度超过 45 °C 以后, 酶活力迅速下降。在 65 °C 处理该低温酶 1 h, 仅有 20% 的酶活力剩余, 75 °C 时, 酶活全部丧失。

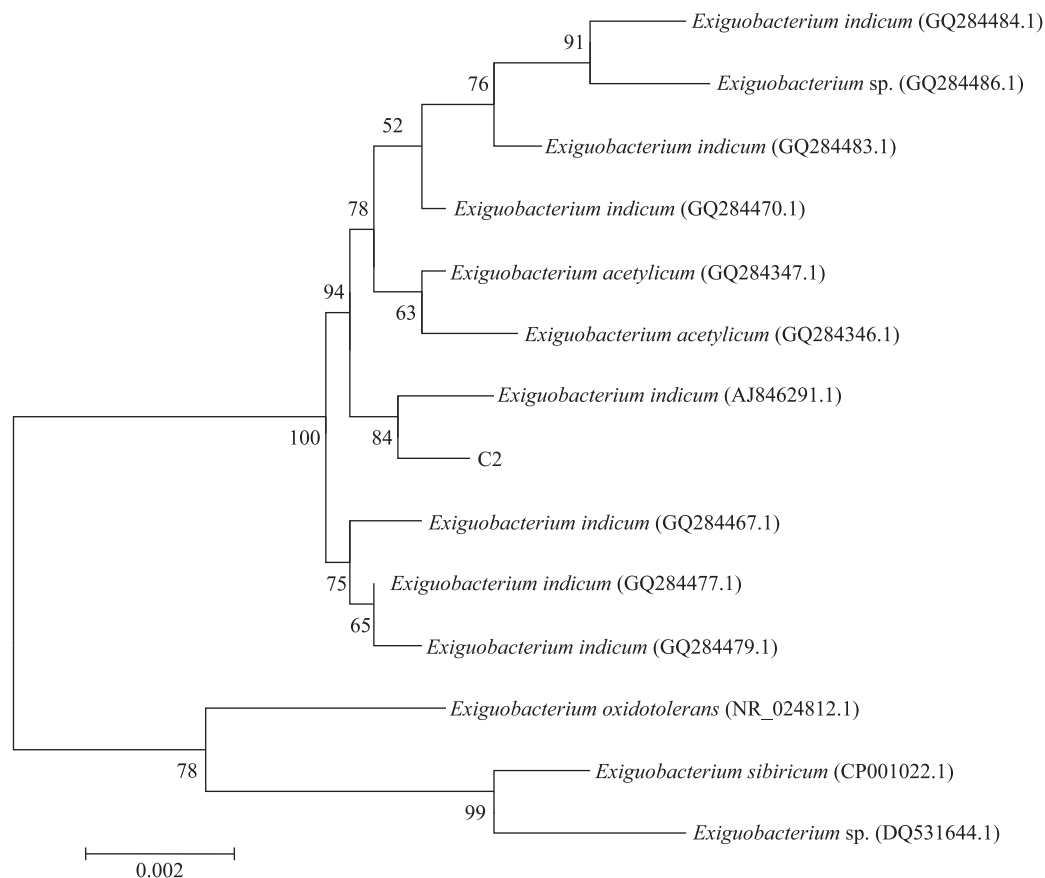


图 1 菌株 C2 基因系统发育进化树

Fig. 1 Phylogenetic trees for 16S rDNA sequence of C2

注: 发育树节点的数字表示 Bootstrap 值(自举 1 000 次), 括号内的数字是在 GenBank 上的序列登录号, 线段 0.002 代表 1/500 进化距离单位。
Note: Numbers at nodes present bootstrap percentages (based on 1 000 samplings). The numbers in parentheses are accession numbers of sequences in GenBank. Scale bar: 0.002 nucleotide substitution per 500 nucleotides of 16S rDNA sequence.

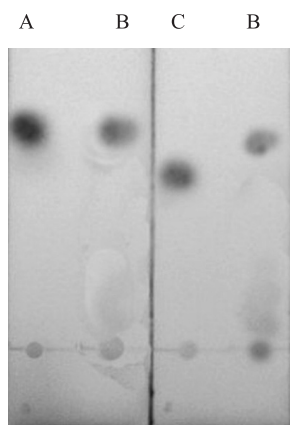


图2 C2粗酶液降解可溶性淀粉产物TLC分析

Fig. 2 TLC profile of the end product of soluble starch hydrolysed by the enzyme

注: A: 葡萄糖; B: 酶解产物; C: 麦芽糖.

Note: A: Glucose; B: Enzymatic hydrolysate; C: Maltose.

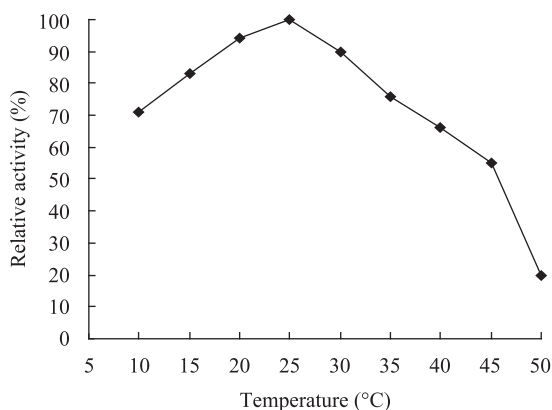


图3 反应温度对酶活的影响

Fig. 3 The effect of temperature on relative activity

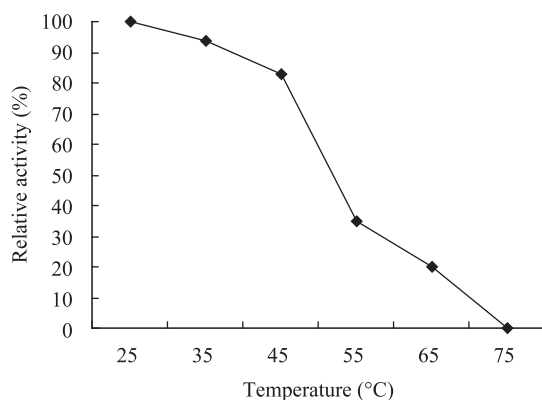


图4 低温淀粉酶的热稳定性

Fig. 4 Thermal stability of cold-active amylase

2.2.4 酶作用最适pH: 在酶反应最适温度下, 分别用pH为4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0和9.5的柠檬酸盐缓冲液, 按照低温淀粉酶的酶活力测定方法测定酶活, 其测定结果如图5所示。

由图5可知, 该低温淀粉酶最适反应pH为7.5; 在pH 7.0–8.5之间均有80%以上的酶活, 说明此酶适宜于中性偏碱的反应环境。但pH升至9.0时, 酶活急剧下降, 说明此酶耐碱性较差。

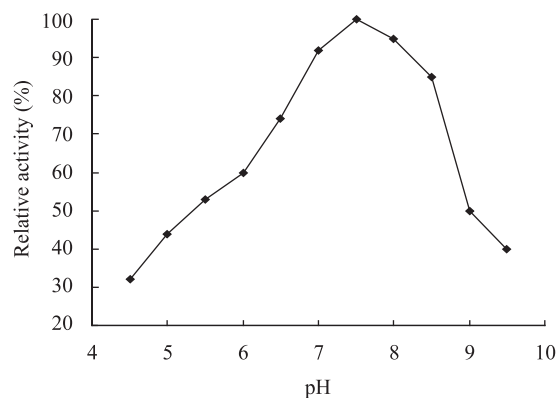


图5 pH对酶活的影响

Fig. 5 The effect of pH on relative activity

2.2.5 不同金属离子对酶活性的影响: 由图6可以看出, Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 金属离子对酶有不同程度的激活作用, 其中 Ca^{2+} 的激活效果最大, Fe^{2+} 次之; 而 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 等对酶有较强的抑制作用, 可能是由于 Cu^{2+} 等可以跟蛋白作用区域结合从而抑制酶的活性。

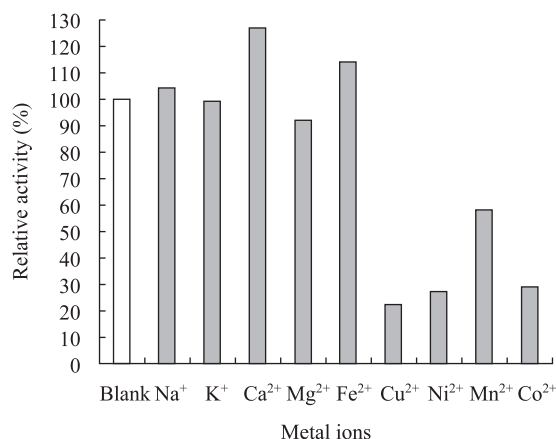


图6 金属离子对酶活的影响

Fig. 6 The effect of metal ions on relative activity

3 结论与讨论

(1) 经鉴定, 菌株 C2 属于微小杆菌属 (*Exiguobacterium* sp.), 国内少见有该属菌株产低温淀粉酶的报道, 因此菌株 C2 的研究对以后低温淀粉酶领域的基因工程研究和低温淀粉酶菌库的建立有着非常重要的意义。菌株 C2 最适生长温度 20 °C, 属于天然的低温菌, 低温环境中筛选出的菌, 能使得到的菌株具有天然的适应低温的优势^[7]。

(2) 菌株 C2 酶活力能够达到 23.7 U/mL, 同国内报道的低温淀粉酶菌株相比, 具有一定的研究价值^[8,12]。如对菌株 C2 加以诱变或者基因克隆操作, 进一步提高其酶活力, 或可用于工业生产。再加上其低温酶特点, 可大大缩短处理过程的时间并省却昂贵的加热系统等, 在节能方面也有相当大的进步^[10-11]。

(3) 经酶学性质研究, 该低温淀粉酶最适反应温度为 25 °C, 最适 pH 为 7.5, 且 pH 在 7.0-8.5 之间酶活性都相对良好, 该低温淀粉酶能够被 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 激活, Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 等能抑制其活性, 经 TLC 分析其主要组分为低温淀粉糖化酶。淀粉酶是一类非常重要的工业用酶, 已广泛应用于食品、医药、洗涤、环保、纺织等各个方面, 为人们的日常生活提供了很多方便^[13-16]。实验所得淀粉酶为糖化酶, 其适应低温及偏碱性环境的特性, 尤其在食品和洗涤行业有非常大的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] 高嘉安. 淀粉与淀粉制品工艺学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [2] Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, 62(3): 579-635.
- [3] 邓宇编. 淀粉化学品及其应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 1.
- [4] 钱海丰, 赵晓娟, 赵心爱. α -淀粉酶基因表达的调控[J]. 西北农业学报, 2003, 12(4): 87-90.
- [5] 杨依军, 李多川, 沈崇尧. 葡萄糖淀粉酶研究进展[J]. 微生物学通报, 1996, 23(5): 312-315.
- [6] 郑裕国, 曹晓如, 陆建卫, 等. α -淀粉酶发酵工艺条件实验研究[J]. 浙江工学院学报, 1994(2): 56-61.
- [7] 曾胤新, 俞勇, 蔡明宏, 等. 低温微生物及其酶类的研究概况[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(5): 83-88.
- [8] 王晓红, 茆军, 傅力, 等. 低温淀粉酶产生菌的筛选及酶学性质研究[J]. 农产品加工, 2007(1): 7-9.
- [9] 孙子羽, 迟乃玉, 王宇, 等. 低温生淀粉糖化酶菌株 RS01 分离及其酶学性质[J]. 微生物学通报, 2010, 37(2): 798-802.
- [10] 范光南, 傅世宗, 彩海洋. 极端环境微生物的研究概况[J]. 福建热作科技, 2000(2): 12-15.
- [11] 方金瑞, 黄维真. 海洋极端微生物的分离及其开发研究——I 嗜碱、嗜冷微生物的分离及其产生的活性物质[J]. 中国海洋药物, 1996(1): 5-9.
- [12] 李欣, 张丽萍, 程辉彩, 等. 耐低温兼性厌氧淀粉酶产生菌 Y89 的筛选及酶学特性[J]. 中国农学通报, 2011, 27(7): 107-111.
- [13] 王俊英, 孔显良. α -淀粉酶、糖化酶在食品工业中应用的现状和展望[J]. 微生物学通报, 1995(3): 140-141.
- [14] Gibson K. The importance of detergent amylases for whiteness maintenance[J]. Riv Ital Sostanze Grasse, 1998, 75(4): 207-211.
- [15] Hagihara H, Igarashi K, Hayashi Y, et al. Novel α -amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic bacillus isolate KSM-K38[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(4): 1744-1750.
- [16] Novozymes A/S. Stainzyme takes stain removal to a new level[J]. BioTimes, 2004, 1: 6.