

# 超嗜热古菌耐热酸性 $\alpha$ -淀粉酶的发酵条件和酶学性质研究\*

王淑军<sup>1,2</sup> 陆兆新<sup>1①</sup> 秦松<sup>3</sup> 吕明生<sup>2</sup> 李富超<sup>3</sup> 刘红飞<sup>2</sup> 邓祥元<sup>3</sup>

(1. 南京农业大学食品科技学院 南京 210095; 2. 江苏省海洋生物技术重点建设实验室 淮海工学院 连云港 222005;  
3. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**提要** 对一株分离自深海热液口的超嗜热古菌(*Thermococcus* sp. HJ21)菌株进行了 $\alpha$ -淀粉酶发酵条件的优化和酶学性质的研究。该菌株发酵 9 h 后到达产酶高峰, 产酶温度范围为 60—90℃, 其最适产酶温度为 80℃。产酶 pH 范围为 5.0—9.0, 最适产酶 pH 为 7.5。产酶 NaCl 浓度范围为 0.5%—4.0%, 2.5% 为最适宜 NaCl 浓度。糖原、淀粉、麦芽糖、酵母膏和蛋白胨促进产酶。该菌株产生的 $\alpha$ -淀粉酶的分子量为 51.4 kDa, 酶的最适作用温度为 95℃, 在 100℃ 仍有 60% 的酶活力。酶在 90℃ 的半衰期为 5 h, 在 100℃ 2 h 仍有 40% 的残余酶活, 酶的热稳定性不依赖 Ca<sup>2+</sup>。酶的最适作用 pH 为 5.0, pH 4.5 仍有 80% 的酶活力, pH 在 5.5—7.0 较稳定(80℃ 4 h)。金属离子 1 mmol/L 的 Mg<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Sr<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>对酶有激活作用, Cu<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>对该酶均有抑制作用。

**关键词** 超嗜热古菌, 热球菌属,  $\alpha$ -淀粉酶, 产酶条件, 酶学性质

**中图分类号** TQ925

超嗜热微生物(Hyperthermophiles)主要为最适生长温度为 80—110 范围的古菌(Archaea)和细菌, 主要分布在 80—115 的超热的自然环境中, 包括海平面 4000 m 以下的海底热液口、深海热海底沉积物和流质喷气孔等环境中。来源于超嗜热微生物的酶显示了独特的特性: 具有极高的热稳定性, 通常能抵抗化学变性剂, 如表面活性剂、有机溶剂和高酸高碱环境, 其催化功能优于目前在各种工业生产中应用的酶。因此, 超嗜热微生物酶已作为研究在极端条件下酶的进化、酶的稳定性和酶的活性机制、蛋白质结构和功能的关系以及生物催化性的模型。目前国外研究的超高温酶在分子生物学、淀粉加工、纤维素的降解、乙醇的生产和化学的合成工业已有广泛的应用(Vieille *et al.*, 2001)。

$\alpha$ -淀粉酶为  $\alpha$ -1,4-葡聚糖-4-葡聚糖水解酶( $\alpha$ -1,4-

glucan-4-glucanohydrolase EC.3.2.1.1), 是最重要的工业酶制剂之一, 已被广泛应用在食品、发酵、纺织、造纸和制药等诸多行业(Gupta *et al.*, 2003)。目前工业用 $\alpha$ -淀粉酶主要来自嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*), 这些酶的最适作用条件为 90 和 pH 6.0, 存在的主要问题是热稳定性差, 高于 100 和 pH 低于 6.0 时易失活, 热稳定性依赖 Ca<sup>2+</sup>的保护 (Marc *et al.*, 2002)。

可以在 80—110 范围内生长的超高温菌, 是 $\alpha$ -淀粉酶最重要的潜在来源, 国外已报道产高温 $\alpha$ -淀粉酶的超嗜热微生物主要为乌兹炽热球菌(*Pyrococcus woesei*)、强烈炽热球菌(*P. furiosus*)、热水高温球菌(*Thermococcus hydrothermalis*)、*Thermococcus profundus*、*Desulfurococcus mucosus*、*Pyrodictium abyssi*、

\* 江苏省“六大人才高峰”第三批资助项目: 06-A-017 号, 江苏省教育厅自然科学基金项目: 06KJB550004 号, 江苏省海洋生物技术重点建设实验室项目: 2006HS008 号, 连云港市自然科学基金项目: KK06076 号。王淑军, 教授, E-mail: shujunwang86@hotmail.com

通讯作者: 陆兆新, 教授, 博士生导师, E-mail: luzhaixin@njau.edu.cn

收稿日期: 2008-03-04, 收修改稿日期: 2008-04-08

海生葡萄状嗜热菌(*Staphylo thermus marinus*)、嗜热网络球杆菌(*Dictyoglomus thermophilum*)、海栖热袍菌(*Thermotoga maritime*)(Vieille *et al.*, 2001; Bertoldo *et al.*, 2002), 其中来源于 *Pyrococcus woesei*、*Pyrococcus furiosus*、*Thermococcus hydrothermalis*、*Thermococcus profundus* 和 *Thermotoga maritime* 等中  $\alpha$ -淀粉酶基因已被克隆和表达达到常温宿主细胞中(Léveque *et al.*, 2000a)。国内近几年开展了从超嗜热微生物中克隆  $\alpha$ -淀粉酶基因的研究, 如将强烈炽热球菌的  $\alpha$ -淀粉酶基因在不同常温宿主中表达(沈微等, 2003; 李辉等, 2005), 以及海栖热袍菌的  $\alpha$ -淀粉酶基因在大肠杆菌中的表达的研究(王希菊等, 2005)。

本文中主要报道一株来自深海热液口处的超高温古菌 HJ21 产  $\alpha$ -淀粉酶的条件和酶学性质, 为进一步酶基因的克隆和表达打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

一株分离自海底热液口的超高温古菌热球菌(*Thermococcus* sp. HJ21), 由淮海工学院江苏省海洋生物技术重点实验室保藏。

### 1.2 培养基

改良的 YPS 培养基: 基础盐溶液 1000 ml, 微量盐溶液 10 ml, 1%  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5 ml, N-P 混合液 10 ml,  $500 \times \text{Fe EDTA}$  溶液 2 ml, 0.02% 刃天青溶液 5 ml, PIPE 3.35 g, 酵母粉 3 g, 蛋白胨 3 g, 麦芽糖 5 g, 硫 5 g, pH 6.5。基础盐溶液(g/L):  $\text{NaCl}$  19.6,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  3.3,  $\text{KCl}$  0.5,  $\text{KBr}$  0.05, 硼酸 8.8; 微量盐溶液(g/L):  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.005;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.2;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1;  $\text{KBr}$  0.05;  $\text{KI}$  0.05;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.1;  $\text{NaF}$  0.05;  $\text{LiCl}$  0.05;  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  0.05,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{V}_2\text{O}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.005,  $\text{H}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.002,  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  0.005,  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.005,  $\text{BaCl}$  0.005;  $100 \times \text{N-P}$  混合液(g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  43.0,  $\text{NaNO}_3$  60.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.6;  $500 \times \text{Fe EDTA}$  溶液(g/L):  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.54;  $\text{Na-EDTA}$  2.06。

### 1.3 培养基的制备和产酶发酵方法

培养基高压灭菌后, 加入硫和无菌的麦芽糖液, 再在自制的仪器上抽真空充氮气, 反复几次。接种前加入  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  5% (W/V) 并使之最终浓度为 0.025%, 在 88 反应 10 min, 培养基变为黄色时开始接种。菌株用注射器以 5% 接种量接入改良的 YPS 培养基, 88 静止培养 9 h(Jolivet *et al.*, 2004)。

## 1.4 产酶条件

**1.4.1 发酵时间对产酶的影响** 将菌株接入到 YPS 培养基中, 在 88 下静置培养不同时间, 每 3 h 取出两瓶测酶活力。

**1.4.2 发酵温度对产酶影响** 分别在不同温度下进行产酶发酵实验, 培养 9 h 后取出测定酶活。

**1.4.3 培养基 pH 值对产酶的影响** 在改良的 YPS 培养基中加入下列不同的缓冲液(10 mmol/L): 4.0—6.0(MES 缓冲液), pH 6.5—7.0 (PIPES 缓冲液), pH 7.5—8.5(HEPES 缓冲液), pH 9.0—10.0 (Tris-HCl 缓冲液), 在 88 培养 9 h, 测定酶活。

**1.4.4 培养基 NaCl 浓度对产酶的影响** 在培养基中加入 NaCl, 使之终浓度分别为 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4% 和 5%, 在 88 培养 9 h, 测定酶活。

**1.4.5 接种量对产酶的影响** 菌株接种量分别为 0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、7% 和 10% 进行发酵试验。

**1.4.6 不同碳氮源对产酶的影响** 去除培养基中的麦芽糖, 分别在培养基加入终浓度为 0.5% 的各种碳源进行产酶发酵试验。去除培养基中的蛋白胨、酵母膏, 分别加入终浓度为 0.3% 的各类氮源进行产酶发酵试验。

## 1.5 酶的纯化

参考文献(Kwak *et al.*, 1998)进行选择 65% 硫酸铵饱和度的盐析透析液, 通过快速蛋白纯化系统(FPLC, Bio-Rad, USA)采用 DEAE、丁基疏水层析和葡聚糖凝胶 G-75 层析等各种层析柱对酶进行分离纯化。

## 1.6 酶学性质

**1.6.1 酶蛋白分子量的检测** 采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用含有 0.3% (W/V) 淀粉的 0.1% SDS-10% PAGE(浓缩胶 4%, 分离胶 10%)(Brown *et al.*, 1964) 进行分子量和活性的检测。电泳后将凝胶切块, 蛋白染色用考马斯亮蓝 R-250(Bio-Rad, USA)染色, 活性带放入含有 2.5% (V/V) Triton X-100 的 50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.5) 溶液中, 在室温下复性 1 h, 再放在乙酸钠缓冲液(pH 5.0)中, 95 反应 1—2 h, 用含有 0.15% (W/V)  $\text{I}_2$  和 1.5% (W/V) KI 溶液染色 2 min, 在深色背景下的亮带即为淀粉酶活性带。

**1.6.2 酶的作用温度** 将酶分别在 50 到 100 (水浴)和 110 (高压灭菌锅)温度下, 分别用 pH 5.0、pH 5.5 的乙酸钠溶液(50 mmol/L)配置的 1% 淀粉溶液作为底物进行酶活测定。

**1.6.3 酶的热稳定性** 取适量酶液(添加或不添加  $\text{Ca}^{2+}$ , 终浓度为 5 mmol/L)分别在不同温度(80、90 和 100 )下保温 5 h, 每隔 0.5 到 1 h 取出一组样品, 迅速置于 4 冰箱内, 待保温结束后统一在标准条件下测定残余酶活, 以未处理的酶液的酶活设为 100%。

**1.6.4 酶的作用 pH** 以不同 pH 缓冲液配制的 1% 的可溶性淀粉溶液作为底物, 在 95 下测定酶活力, 不同 pH 值的缓冲液为: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH3.0—4.0); 50 mmol/L 乙酸钠缓冲液(pH4.0—6.0); 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH6.0—7.5); 50 mmol/L Tris-盐酸缓冲液 (pH7.5—9.0)。

**1.6.5 酶的 pH 稳定性** 采用两种方法。第一种方法为: 取 50  $\mu\text{l}$  酶液与 200  $\mu\text{l}$  浓度为 0.04 mol/L 的各种不同 pH 的 Britton-Robinson 缓冲液(pH4—11)混合 (Rauen *et al.*, 1964), 在 80、90 和 100 水浴中保温 1 h, 测残余酶活, 以未处理的酶液的酶活设为 100%。第二种方法为: 将 50  $\mu\text{l}$  酶液与 150  $\mu\text{l}$  不同 pH 的缓冲液混合, 缓冲液分别为 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH4.0); 50 mmol/L 乙酸钠缓冲液(pH5.0—5.5); 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 6.0—7.0)50 mmol/L Tris-盐酸缓冲液 (pH8.0—9.0), 在 80 水浴锅中保温不同时间, 分别在 0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h 取出在标准条件下测定残余酶活, 以未处理的酶液的酶活设为 100%。

**1.6.6 金属离子、化学试剂对酶的作用** 将各种金属离子与酶液混合, 使其最终浓度分别达到 1.0 mmol/L 和 5.0 mmol/L, 然后在 95 下测酶活。将各种常用化

学试剂与酶液混合, 使其最终浓度分别为 1 mmol/L 和 5 mmol/L, 测酶活, 均以未处理的酶液的酶活设为 100%。

**1.6.7 动力学常数的测定** 将酶液分别与不同浓度的可溶性淀粉溶液混合, 在 95 反应 10 min, 测定酶活力, 求得  $K_m$  和  $V_{\max}$  (Li *et al.*, 2007)。

**1.7 淀粉酶活力的测定**

将 10  $\mu\text{l}$  酶液加入到 190  $\mu\text{l}$  1% 的可溶性淀粉乙酸钠缓冲液(50 mmol/L, pH 5.0)中, 在 95 水浴中反应 30 min, 用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定还原糖。酶活力单位定义: 在一定条件下, 每分钟催化产 1  $\mu\text{g}$  葡萄糖的酶量为一个活力单位。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株产酶条件

**2.1.1 产酶时间、温度、pH 和 NaCl 浓度对产酶的影响** 作者的研究发现, 菌体生长在 3 h 进入对数生长期, 9 h 进入平衡期。菌株 HJ21 主要产胞外淀粉酶, 随着培养时间延长产酶增多, 在菌株生长的平衡期产酶达到最高, 以后很快减少。产酶温度范围为 60—90, 低于 60 高于 90 产酶很少, 最适产酶温度为 80 (图 1a); 产酶 pH 范围为 5.0—9.0, 当 pH 低于 4 或高于 10 时不产酶, 最适产酶 pH 为 7.5(图 1b); 产酶 NaCl 浓度范围为 0.5%—4.0%, 2.5% 为最适宜 NaCl 浓度(图 1c); 菌株接种量为 5% 时产酶较好。

**2.1.2 培养基中不同碳氮源对产酶的影响** 分别进行了以蛋白胨、酵母膏、硫酸铵、胰蛋白胨、豆饼

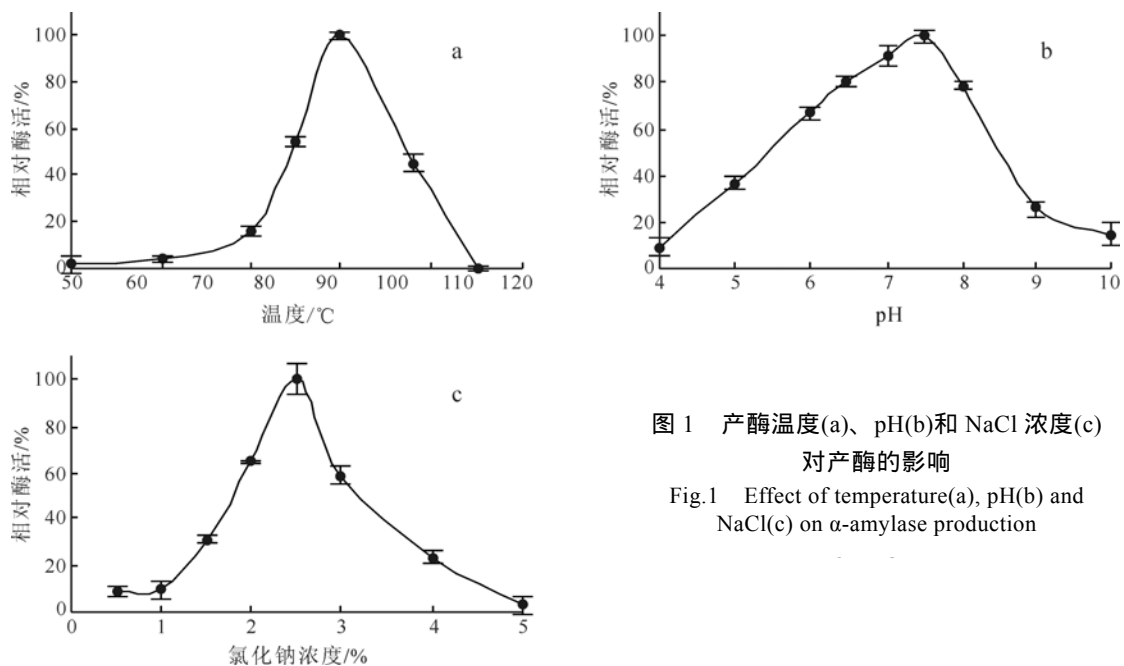


图 1 产酶温度(a)、pH(b)和 NaCl 浓度(c)对产酶的影响

Fig.1 Effect of temperature(a), pH(b) and NaCl(c) on  $\alpha$ -amylase production

粉、酪蛋白为氮源的产酶发酵试验,结果表明,培养基中加入酵母粉和蛋白胨利于产酶(表 1)。分别进行了以葡萄糖、麦芽糖、可溶性淀粉、糖原、纤维素、纤维二糖、果糖、木糖、乳糖、蔗糖为碳源的产酶发酵试验,结果表明,糖原、淀粉和麦芽糖作为碳源产酶最高,其他如葡萄糖等则较低(表 2),添加糖原较淀粉和麦芽糖更有利于 HJ21 菌株产淀粉酶。

2.2 酶学性质

2.2.1 酶纯化和分子量 对菌株 HJ21 产生的  $\alpha$ -淀粉酶通过硫酸铵盐析、DEAE 离子交换层析、丁基疏水层析、葡聚糖凝胶 G-75 层析进行了纯化(表 3),在 SDS-PAGE 上  $\alpha$ -淀粉酶的活性染色带与考马斯亮蓝染色带一致,其分子量为 51.4 kDa (图 2)。

2.2.2 酶作用温度和热稳定性 菌株 HJ21 产生的  $\alpha$ -淀粉酶在 pH 为 5.0 或 5.5,酶的最适作用温度均为 95 ,在 100 仍有 60%的酶活力(pH 5.0)(图 3a),酶

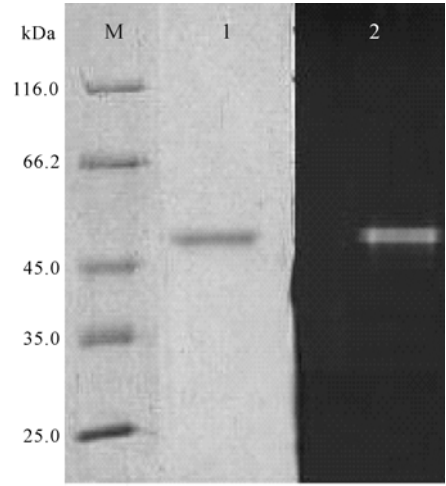


图 2 淀粉酶的 SDS-PAGE 电泳图  
Fig.2 SDS-PAGE of the  $\alpha$ -amylase  
1. 酶蛋白的考马斯亮蓝染色; 2. 酶蛋白的活性染色带;  
M.标准蛋白

表 1 培养基中氮源对产酶的影响  
Tab.1 Effect of nitrogen source on  $\alpha$ -amylase production

氮源	酵母膏	蛋白胨	硫酸铵	胰蛋白胨	酪蛋白	豆饼粉
相对酶活(%)	100	75.5	46.3	21	20.8	32.3

表 2 培养基中碳源对产酶的影响  
Tab.2 Effect of carbon source on  $\alpha$ -amylase production

碳源	麦芽糖	葡萄糖	纤维素	纤维二糖	糖原	果糖	木糖	淀粉	蔗糖	乳糖
对酶活(%)	50.8	14.1	13.6	30.1	100	10.8	32.3	81.5	17.2	22.6

表 3  $\alpha$ -淀粉酶纯化结果  
Tab.3 Purification result of  $\alpha$ -amylase

纯化步骤	总酶活(U/mg)	总蛋白(mg)	比酶活(U/mg)	纯化倍数	得率(%)
发酵上清液	300 000	600	500	1	100
65%硫酸铵盐析	242 000	400	605	1.2	80.7
DEAE-Sepharose Fast Flow	112 000	114	982.5	2.0	37.3
疏水层析	65 000	62	1048.4	2.1	21.7
G-75 凝胶过滤	27 000	18	1500	3	9

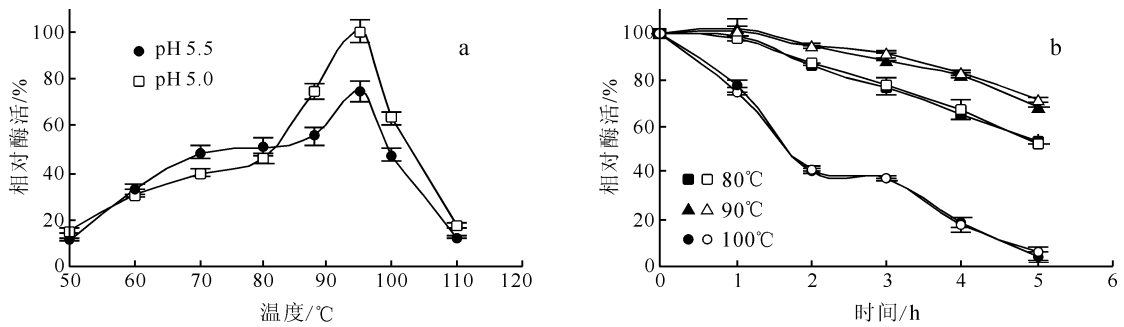


图 3 酶作用温度对酶活的影响(a)和酶的热稳定性(b)  
Fig.3 Effects of temperature on enzyme activity (a) and stability (b)  
添加 5 mmol/L  $Ca^{2+}$ 溶液(空心),不添加 5 mmol/L  $Ca^{2+}$ 溶液(实心)

的热稳定性不依赖于  $\text{Ca}^{2+}$ , 且热稳定性好, 酶在 90 的半衰期为 5 h, 100 2 h 仍有 40% 的酶活(图 3b)。

**2.2.3 酶作用 pH 和 pH 稳定性** 菌株 HJ21 产生的  $\alpha$ -淀粉酶的最适作用 pH 为 5.0, 在 pH 4.5 仍有 80% 的酶活力, 是酸性淀粉酶(图 4a)。菌株 HJ21 产生的  $\alpha$ -淀粉酶在不同 pH 的 Britton-Robinson 缓冲液中分别在 80、90 和 100 处理 1 h, pH 在 5.5—6.0 均较稳定(图 4b), 而在不同 pH 的缓冲体系中, 80 处理 2 h, 在 pH 5.0 较稳定; 80 处理 4 h, 在 pH 5.5—7.0 比较稳定, 在 pH 6.0 的缓冲液中显示较高的稳定性(图 4c)。

#### 2.2.4 金属离子和化学试剂对酶活力的影响

1 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$  对酶的活性没有作用, 5 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$  对酶反而有较弱的抑制作用(表 4)。1 mmol/L 和 5 mmol/L 浓度的  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  对酶具有抑制作用, 其中的  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  对该酶具有较强的抑制作用。1 mmol/L 的尿素、碘乙酸、三氯乙酸和二硫苏糖醇溶液对酶的抑制作用较弱, 1 mmol/L 和 5 mmol/L N-溴代丁二酰亚胺则具有较强抑制作用(61%和 13.5%)(表 5)。

**2.2.5 动力学常数的测定** 淀粉酶的  $K_m$  和  $V_{\max}$  分别为 1.6 mg/ml 和 0.347 mg/(ml·min)。

### 3 讨论

淀粉的水解过程通常包括两步: 液化和糖化。在

液化阶段, 淀粉颗粒在喷射罐 105—110 经过 5 min 的高温喷射糊化变成液状。这一过程的关键是控制温度和 pH。理想的液化条件是 105—110, pH 4.5—5.0。如果糊化温度低于 105, 则淀粉糊化不完全, 将影响后续的过滤过程。高 pH 值将导致副产品和色素物质形成。但目前使用的  $\alpha$ -淀粉酶(来自 *Geobacillus stearothermophilus* 和 *Bacillus licheniformis*)最适作用条件为 90, pH 6, 在温度高于 100 和 pH 小于 6 时, 会使酶失活(Marc *et al*, 2002)。由于淀粉浆的天然 pH 大约在 4.5, 这样需要调节 pH 到 5.8 或者是更高, 温度降到 90, 还要添加  $\text{Ca}^{2+}$  以维持热稳定性才能进行液化。在糖化过程中, 由于葡萄糖淀粉酶都来自嗜温菌, 最适条件是温度 60, pH 4.2—4.5, 这样液化后进行糖化时还需要将温度从 90 降到 60, pH 调回到 4.2—4.5, 两次的 pH 调整增加了加工费用, 同时为了精制最终产物, 需要用离子交换法除去那些添加的盐(Vieille *et al*, 2001)。因此来源于嗜嗜热微生物的嗜嗜热酶能在高温下作用且具有很好的热稳定性而成为目前研究的热点。

热球菌属自 1983 年首次从意大利的 Vulcano 一个含海水的湖中分离到(Zillig *et al*, 1983), 目前热球菌属 16S rDNA 碱基序列提交到 Genbank 有 180 多株, 已有文献报道鉴定到种的有 30 种((Jolivet *et al*,

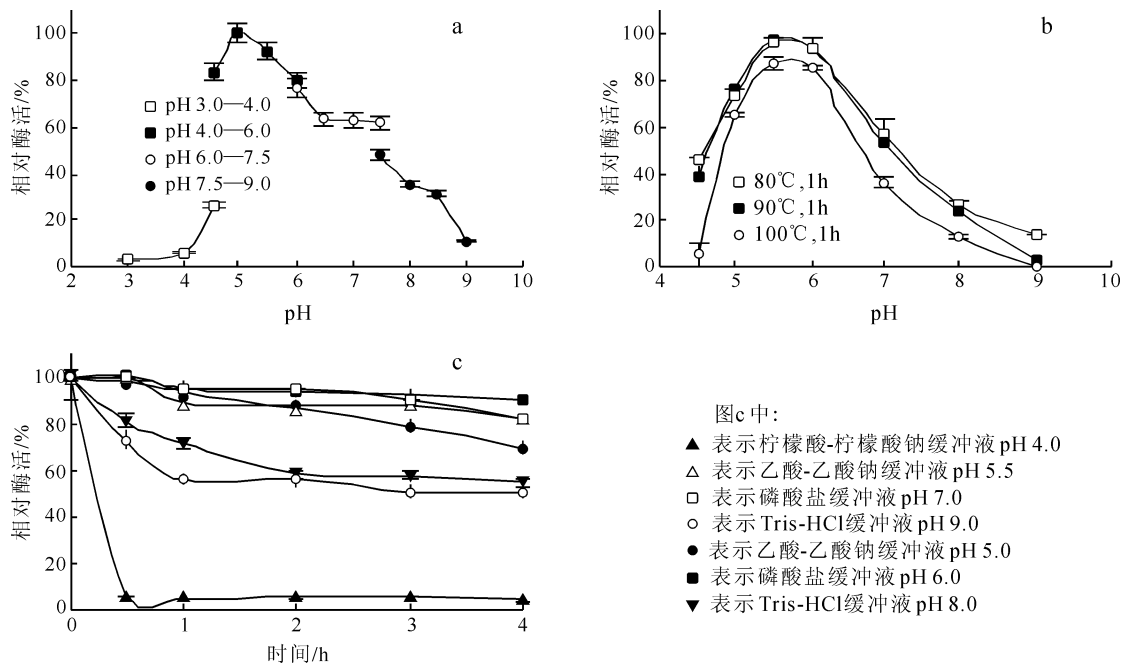


图 4 酶作用 pH 对酶活的影响(a)和酶 pH 稳定性(b,c)

Fig.4 Effect of pH on enzyme activity and the stability

表4 金属离子对 $\alpha$ -淀粉酶活的影响  
Tab.4 The effect of metal ions on  $\alpha$ -amylase activity

金属离子	相对活性(%)	
	1 mmol/L	5 mmol/L
对照	100	100
Ca <sup>2+</sup>	101.0	91.6
Co <sup>2+</sup>	120.5	71.8
Ba <sup>2+</sup>	110.5	89.7
Hg <sup>2+</sup>	86.8	0
K <sup>+</sup>	110.1	104.9
Pb <sup>2+</sup>	58.6	1.3
Mn <sup>2+</sup>	84.7	36.9
Ni <sup>2+</sup>	82.8	74.4
Mg <sup>2+</sup>	125.1	108.7
Sr <sup>2+</sup>	115.1	102.2
Li <sup>+</sup>	101.2	97.5
Ag <sup>+</sup>	88.7	75.8
Al <sup>3+</sup>	54.1	11.8
Cu <sup>2+</sup>	49.0	0.6
Na <sup>+</sup>	106.2	115.6
Fe <sup>3+</sup>	60.3	51.3
Zn <sup>2+</sup>	77.3	8.4

表5 化学试剂对 $\alpha$ -淀粉酶活的影响  
Tab.5 Effect of chemical reagents on the amylase activity

化学试剂	相对酶活(%)	
	1 mmol/L	5 mmol/L
对照	100	100
尿素	92.2	87.1
三氯乙酸	95.4	78.3
十二烷基硫酸	84.9	81.6
碘乙酸	91.3	83.7
乙二胺四乙酸	78.6	54.9
N-溴代丁二酰亚胺	61	13.5
二硫苏糖醇	89.4	61

2004; Cambon-Bonavita *et al*, 2003; Atomi *et al*, 2004; Kuwabara *et al*, 2005; Bae *et al*, 2006; Kuwabara *et al*, 2007; Pikuta *et al*, 2007)。作者用自行设计的培养装置培养了热球菌 *Thermococcus* sp. HJ21, 并从培养液中检测到了 $\alpha$ -淀粉酶的活性, 但活性较低。为了获得大量的酶, 以便于酶性质的研究和酶基因的克隆表达, 作者对影响产酶的几个主要因素进行了研究。对来源常温细菌和真菌的淀粉酶的产酶条件研究较多 (Gupta *et al*, 2003), 但对影响古菌产酶因素报道很少。

菌株 HJ21 为热球菌属 (*Thermococcus*), 是异养、嗜热厌氧的古细菌, 生长温度范围为 55—94, 最适

生长温度为 88; 生长 pH 范围为 5.0—9.0, 最适 pH 6.5; 生长 NaCl 浓度为 1.0%—5.0%, 最适浓度为 2%(另文报道)。研究发现, 菌株 HJ21 $\alpha$ -淀粉酶产生的温度、pH 和 NaCl 浓度范围与菌株生长条件基本一致。培养基中不同碳氮源对 $\alpha$ -淀粉酶的产出有很大的影响, 酵母粉和蛋白胨利于产酶, 这与菌株生长一致。糖原、淀粉和麦芽糖作为碳源产酶最高, 其他如葡萄糖等则较低, 与 Kwak 等报道的 *T. profundus* 产淀粉酶基本一致 (Kwak *et al*, 1998)。本研究发现添加糖原较淀粉和麦芽糖更有利于 HJ21 菌株产淀粉酶, 这与菌株生长不同, 对菌株的生长, 麦芽糖、葡萄糖和淀粉较好, 糖原较差。分析原因可能是在深海热液口缺乏淀粉等物质, 而糖原是这些环境中的微生物和动物产生的主要的储存物质, 淀粉酶实际的底物可能是存在这些环境的微生物和动物产生的糖原, 并且在这些极端微生物的代谢中起着重要作用 (Bertoldo *et al*, 2002; Léveque *et al*, 2000)。

尽管热球菌属 16S rDNA 碱基序列提交到 Genbank 有 180 多株, 但报道产 $\alpha$ -淀粉酶的菌种主要为 *T. litor*, *T. guaymasensis*, *T. aggregans*, *T. celer*, *T. profundus*, *T. fomicolans*, *T. hydrothermalis* 和 *T. thioreducens* (Léveque *et al*, 2000; Chung *et al*, 1995; Lee *et al*, 1996; Bernhardsdotter *et al*, 2004<sup>1)</sup>), 其中对酶进行纯化和酶学性质研究得较深入, 主要为 *T. profundus*, *T. hydrothermalis* 和 *T. Thioreducens* (Kwak *et al*, 1998; Chung *et al*, 1995; Lee *et al*, 1996; Bernhardsdotter *et al*, 2004<sup>1)</sup>)。国内对嗜嗜热微生物产生 $\alpha$ -淀粉酶的研究主要集中在强烈炽热球菌 (*Pyrococcus furiosus*) 和海栖热袍菌 (*Thermotoga maritime*) 两种嗜嗜热微生物上 (沈微等, 2003 a,b; 李辉等, 2005; 王希菊等, 2005), 对热球菌属 (*Thermococcus*) 产淀粉酶未见报道。

HJ21 产生的 $\alpha$ -淀粉酶的分子量为 51.4 kDa, 与 *T. hydrothermalis* 的相近 (53.6 kDa) (L veque *et al*, 2000), 略高于 *T. profundus* (42 kDa) (Kwak *et al*, 1998; Chung *et al*, 1995; Lee *et al*, 1996) 和 *T. thioreducens* (43 kDa) (Bernhardsdotter *et al*, 2004<sup>1)</sup>)。

HJ21 产生的 $\alpha$ -淀粉酶 (THJA) 和国外已报道热球菌属中的 *T. profundus*, *T. hydrothermalis* 和 *T. Thioreducens* 所产淀粉酶相比, 菌株 HJ21 所产生的淀粉酶具有以下优点: 1) THJA 的最适作用温度为 95, 在 100 时还有最大酶活的 60%, 其最适作用温度比来源于 *T. profundus* (80), *T. hydrothermalis* (75—85) 和 *T. thioreducens* (90) 等菌株的高温淀粉酶的

高(Kwak *et al*, 1998; Léveque *et al*, 2000; Lee *et al*, 1996; Bernhardsdotter *et al*, 2004<sup>1)</sup>)。THJA 酶的半衰期为 90 min, 5 h。在 100 °C 保温 2 h 和 3 h 仍有超过 40% 和 30% 的活性, 其耐热性明显高于 *T. profundus* 所产的淀粉酶(在 90 °C, 10—75 min)(Kwak *et al*, 1998; Lee *et al*, 1996)。2)  $\text{Ca}^{2+}$  是淀粉酶的活性所必需的(Gupta *et al*, 2003),  $\text{Ca}^{2+}$  对大部分古菌包括 *T. hydrothermalis* 和 *T. profundus* 所产生的酶具有激活作用(Léveque *et al*, 2000), 但本试验中发现, 1 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$  对 THJA 酶活性几乎没有作用, 5 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$  对酶活性反而有较弱的抑制作用。THJA 的热稳定性不依赖于  $\text{Ca}^{2+}$ , 使之该酶有较好的应用前景。3) THJA 酶在 pH 5.0 具有最大酶活性, 在 pH 4.5 时有 80% 的最大酶活, 性能优于 *T. profundus* 和 *T. thioreducens* (Kwak *et al*, 1998; Chung *et al*, 1995; Bernhardsdotter *et al*, 2004<sup>1)</sup>)。将 *Thermococcus* 属中有文献报道的淀粉酶发酵上清液的比活进行了比较, 结果发现 *T. sp.* HJ21 产生的淀粉酶发酵上清液的比活较高, 大约为 *T. hydrothermalis* 或 *T. celer* 的 10 或 100 倍(Kwak *et al*, 1998, Legin *et al*, 1998; Canganella *et al*, 1994)。

用  $\alpha$ -淀粉酶基因序列的保守区域设计引物, 通过聚合酶链式反应(PCR)的方法获得了 *Thermococcus sp.* HJ21  $\alpha$ -淀粉酶基因的部分序列(共 1164 bp), 编码 388 个氨基酸。利用 Swiss Model 预测该基因产物的三级结构, 显示其具有典型的  $\alpha$ -淀粉酶的 $(\beta/\alpha)_8$  桶状结构。

分离自深海热液口的菌株 HJ21 产生胞外的  $\alpha$ -淀粉酶的酶学性质与目前工业常用的来自 *Geobacillus stearothermophilus* 和 *Bacillus licheniformis* 所产生的  $\alpha$ -淀粉酶相比, 具有在 95 °C pH 5.0 有较高活性, 有较好热稳定性、耐酸性以及热稳定性不依赖于  $\text{Ca}^{2+}$  的这些特点, 使得该酶具有较好的工业应用前景。

菌株 HJ21 除产生高温  $\alpha$ -淀粉酶外, 还能产生高温的热稳定性良好的普鲁兰酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶, 且产生的普鲁兰酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶与  $\alpha$ -淀粉酶的性质类似(另文报道), 因此可望在淀粉一步转化葡萄糖的工艺中一起发挥作用。

### 参 考 文 献

- 王希菊, 蒋宇, 邵蔚蓝, 2005. 海栖热袍菌胞外 $\alpha$ -淀粉酶在 *E-coli* 中的高效表达. 微生物学通报, 32(4): 25—30
- 李辉, 郭建强, 岳丽丽等, 2005. 重组超耐热酸性  $\alpha$ -淀粉酶的分离纯化及其性质研究. 微生物学报, 45(4): 547—550
- 沈微, 华国强, 王正祥等, 2003a. 古菌 *Pyrococcus furiosus* 嗜热  $\alpha$ -淀粉酶基因在酿酒酵母中的表达. 微生物学通报, 30(3): 22—25
- 沈微, 王正祥, 刘吉泉等, 2003b. 古细菌 *Pyrococcus furiosus* 嗜热  $\alpha$ -淀粉酶基因在大肠杆菌中的表达. 食品与发酵工业, 29(3): 10—14
- Atomi H, Fukui T, Tanaka T *et al*, 2004. Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. Archaea, 1: 263—267
- Bae S S, Kim Y J, Yang S H *et al*, 2006. *Thermococcus onnurineus* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon Isolated from a deep-sea hydrothermal vent area at the Pacmanus Field. J Microbiol Biotechnol, 11: 1826—1831
- Bertoldo C, Antranikian G, 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. Curr Opin Chem Biol, 6: 151—160
- Brown S H, Costantino H R, Kelly R M, 1964. Characterization of amylolytic enzyme activities associated with the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. Appl Environ Microbiol, 56: 1985—1991
- Canganella F, Andrade CM, Antranikian G, 1994. Characterization of amylolytic and pullulytic enzymes from thermophilic archaea and from a new *Fervidobacterium* species. Appl Microbiol Biotechnol, 42: 239—245
- Cambon-Bonavita M A, Lesongeur F, Pignet P *et al*, 2003. Extremophiles, thermophily section, species description *Thermococcus atlanticus* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the Mid-Atlantic Ridge. Extremophiles, 7: 101—109
- Chung Y C, Kobayashi T, Kanai H *et al*, 1995. Purification and properties of extracellular amylase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus* DT5432. Appl Environ Microbiol, 61: 1502—1506
- Gupta R, Gigras P, Mohapatra H *et al*, 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry, 38: 1599—1616
- Jolivet E, Corre E, L'Haridon S *et al*, 2004. *Thermococcus marinus* sp. nov., and *Thermococcus radiotolerans* sp. nov., two hyperthermophilic archaea from deep-sea hydrothermal vents that resist ionizing radiation. Extremophiles, 8: 219—227
- Kuwabara T, Minaba M, Iwayama Y *et al*, 2005. *Thermococcus coalescens* sp. nov., a cell-fusing hyperthermophilic archaeon from Suiyo Seamount. Int J Syst Evol Microbiol, 55: 2507—25714

1) Bernhardsdotter E C M J, Pusey M L, Ng J D *et al*, 2004. Cloning and Characterization of an alpha-amylase Gene from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus thioreducens*. Marshall Space Flight Center

- Kuwabara T, Minaba M, Ogi N *et al*, 2007. *Thermococcus celericrescens* sp. nov., a fast-growing and cell-fusing hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57: 437—443
- Kwak Y S, Akiba T, Kudo T, 1998. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus*, which hydrolyzes both  $\alpha$ -1, 4 and  $\alpha$ -1, 6 glucosidic linkages. *J Ferment Bioeng*, 86: 363—367
- Lee J T, Kanai H, Kobayashi T *et al*, 1996. Cloning, nucleotide sequence, and hyperexpression of  $\alpha$ -amylase Gene from an archaeon, *Thermococcus profundus*. *J Ferment Bioeng*, 82: 432—438
- Legin E, Copinet A, Duchiron F, 1998. Production of thermostable amylolytic enzymes by *Thermococcus hydrothermalis*. *Biotechnology Letters*, 20(4): 363—367
- Léveque E, Janeček S, Haye B *et al*, 2000a. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enz Microbiol Technol*, 26: 3—14
- Léveque E, Haye B, Belarbi A, 2000b. Cloning and expression of an  $\alpha$ -amylase encoding gene from the hyperthermophilic archaeobacterium *Thermococcus hydrothermalis* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *FEMS Microbiol Lett*, 186: 67—71
- Li H F, Chi Z M, Wang X H, 2007. Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. *Enz Microbiol Technol*, 40: 1006—1012
- Marc J E C, Maarel v d, Veen B v d *et al*, 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *J Biotech*, 94: 137—155
- Pikuta E V, Marsic D, Itoh T *et al*, 2007. *Thermococcus thio-reducens* sp. nov., a novel hyperthermophilic, obligately sulfur-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57: 1612—1618
- Rauen H M, *Biochemisches Taschenbuch*, 1964. Springer Verlag, Berlin, Germany, 2: 90—104
- Vieille C, Zeikus G J, 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol . Mol Biol Rev*, 65: 1—43
- Zillig W, Holz I, Janekovic D *et al*, 1983. The archaeobacterium *Thermococcus celer* represents a novel genus within the thermophilic branch of the archaeobacteria. *Syst Appl Microbiol*, 4: 88—94

## PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF THERMOSTABLE AND ACID-STABLE $\alpha$ -AMYLASE FROM HYPERTHERMOPHILIC ARCHAEON *THERMOCOCCUS* SP.

WANG Shu-Jun<sup>1,2</sup>, LU Zhao-Xin<sup>1</sup>, QIN Song<sup>3</sup>, LU Ming-Sheng<sup>2</sup>, LI Fu-Chao<sup>3</sup>,  
LIU Hong-Fei<sup>2</sup>, DENG Xiang-Yuan<sup>3</sup>

(1.College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095;  
2.Jiangsu key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang, 222005;  
3.Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

**Abstract** The production and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Thermococcus* sp. HJ21 are studied. The maximum enzyme production is achieved after 9 h cultivation. The ranges and the best points of  $\alpha$ -amylase production are 60—90 U, 80 U; 5.0—9.0, 7.5 in pH; and 0.5%—4.0%, 2.5% for NaCl concentration, respectively. The result shows that adding yeast extract, peptone, glycogen, starch, and maltose could enhance the enzyme production, and the strain HJ21 could produce extracellular thermostable and acid-stable  $\alpha$ -amylase. In addition, the molecular weight of the enzyme is estimated 51.4 kDa by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The maximal activity of  $\alpha$ -amylase occurs at 95 °C; the half-life of the enzyme is 5 h at 90 °C; and over 40% of them remain active 2 h after incubation at 100 °C. Meanwhile, no  $\text{Ca}^{2+}$  is required for thermostability. The enzyme remain stable in a wide pH range of 5.5 to 7.0 (at 80 °C 4 h), and best in 4.5—5.0. Moreover, the enzyme can be activated by  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , and  $\text{Na}^+$ , and inhibited by  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and  $\text{Al}^{3+}$ .

**Key words** Hyperthermophilic Archaeon, *Thermococcus*,  $\alpha$ -Amylase, Production, Characterization