

一株碱性淀粉酶产生菌的分离及酶学特性分析

卢争辉, 何家亨, 张桂敏* (湖北大学生命科学学院, 湖北武汉 430062)

摘要 [目的] 筛选出能用于生物印染的碱性淀粉酶产生菌。[方法] 利用 Horikoshi 培养基从农田土壤中分离碱性淀粉酶产生菌, 并采用 DNS 法和碘量法测定粗酶液中淀粉酶的酶学性质。[结果] 共分离到 9 株碱性淀粉酶产生菌, 对其中水解圈最大的菌株 703 进行 16S rDNA 序列同源性比对, 结果显示其与嗜碱性芽孢杆菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 的 16S rDNA 序列一致性达 100%。对该菌发酵粗酶的酶学性质研究表明该碱性淀粉酶的最适温度为 50 ℃, 最适 pH 为 9.5, 50 ℃ 下处理 30 min 后酶活残存 74.7%。[结论] 该研究筛选出了能用于生物印染的碱性淀粉酶产生菌, 所产淀粉酶热稳定性较好, 且具有强的碱耐受性, 表明该酶具有应用于生物印染的潜在利用价值。

关键词 碱性淀粉酶; 16S rDNA 序列; *Bacillus pseudofirmus*; 酶学性质

中图分类号 S188, Q939.9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)07-02857-03

Isolation of Alkaline Amylase Producing Bacteria and Analysis of the Enzymatic Characteristics

LU Zheng-hui et al (College of Life Science, Hubei University, Wuhan, Hubei 430062)

Abstract [Objective] To isolate a strain capable of producing alkaline amylase that can apply in textile printing and dyeing. [Method] Alkaline amylase producer was isolated from agricultural soil by Horikoshi culture medium, and the enzymatic characteristics were analyzed by iodometry method and DNS method. [Result] Nine strains with alkaline amylase activity were obtained, the one with the best enzymatic activity was designated as 703, 703 was identified by its morphological characteristics and 16S rDNA sequence homology, the 16S rDNA sequence of the isolate 703 shows high identity (100%) with facultative alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4. The maximal activity of amylase from fermentation supernatant was observed at 50 ℃ and pH 9.5. More than 74.4% of the residual activity was remained after preincubating at 50 ℃ for 30 minutes. [Conclusion] The amylase has a good thermostability, and exhibits a strong alkali tolerance, the enzyme activity was high over a wide pH range, especially in the pH value (9.5 - 10.5). The enzymatic characteristics indicate its potential application value in textile printing and dyeing.

Key words Alkaline amylase; 16S rDNA sequence; *Bacillus pseudofirmus*; Enzymatic characteristics

传统的纺织印染生产工艺一般采用化学煮练法对棉布进行漂白前预处理, 即在高温强碱条件下去掉浆粉和棉布的果胶, 但因该方法对环境污染严重, 耗能耗水, 且对织物质量影响很大^[1], 已不能适应当今社会对生态环境保护的发展要求, 因此亟需发展生态整理、绿色染整的生物酶退浆处理。在纺织印染的酶前处理中, 一般采用淀粉酶退浆, 然后再添加果胶酶去除织物表面的果胶, 因果胶易溶于碱性条件, 所以煮练环节用的主体果胶酶为碱性果胶酶, 从而可达到更好的处理效果, 且对织物无损伤。随着对环境保护的日益重视, 开发能在棉织品印染工业等碱性环境中发挥作用的淀粉酶引起了研究者的关注, 碱性淀粉酶应用于纤维素棉织物的退浆, 具有退浆时间短, 织物退浆率高, 节约水、能耗、碱性废水排放量少等优点^[2], 更重要的是退浆处理后不需调节 pH 值就可使用碱性果胶酶进行精炼处理, 从而可同时添加淀粉酶和果胶酶, 使一步法退浆和煮练成为可能, 因此在棉织品印染中具有极大的应用价值。

淀粉酶是一种最早实现工业生产并且是迄今为止用途最广、产量最大的商品化酶, 占全球酶制剂市场份额的 25% ~ 33%^[3], 尤其是酸性淀粉酶已广泛应用于淀粉原料液化、青贮饲料、白酒酿造、味精生产、药物开发、烘焙工业、柠檬酸和衣康酸等有机酸的工业化生产等方面^[4-8]。近年来已有一些嗜碱菌产生碱性淀粉酶的研究报道, Wan 等报道的碱性

淀粉酶在 50 ℃、pH 9.5 时具有最高酶活^[9]。Dastager 等报道的来自链霉菌属的淀粉酶在 pH 9.0 和 45 ℃ 条件下具有最大酶活^[10], Pardeep 等报道的淀粉酶最适 pH 和最适温度分别为 9.0 和 60 ℃^[11], Selim 对来自于嗜热脂肪杆菌 HP3 的淀粉酶进行了研究, 发现该酶的最适 pH 为 9.0, 最适温度为 55 ℃^[12], 虽然对碱性淀粉酶的研究日益增多, 但至目前为止碱性淀粉酶仍未实现工业化应用。因此, 笔者对采自水稻田的土样进行分析, 旨在分离出能应用于纺织品退浆的碱性淀粉酶产生菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源。用于分离碱性淀粉酶产生菌的土样采自湖北省天门市水稻田。

1.1.2 培养基。分离菌种采用 Horikoshi 培养基^[13]: 可溶性淀粉 10.0 g/L, 多肽 5.0 g/L, 酵母抽提物 5.0 g/L, KH₂PO₄ 1.0 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/L, Na₂CO₃ 10.0 g/L。其中 Na₂CO₃ 配置成 10% 的浓度单独灭菌, 使用前按比例混合。固体培养基加 1.5% 的琼脂粉。

1.2 细菌的筛选、鉴定及酶活测定

1.2.1 筛选方法。将 1 g 土壤样品悬浮于无菌水中, 经梯度稀释后, 取 0.2 ml 悬液涂布于 Horikoshi 平板上, 37 ℃ 培养 48 h, 将其中不同培养特征的单菌落再分别接种于 Horikoshi 平板上, 37 ℃ 培养 48 h 后喷洒卢革氏碘液, 周围形成透明水解圈的菌落即为具有水解淀粉能力的菌株。将水解圈最大的淀粉酶产生菌转接到 Horikoshi 液体培养基中, 37 ℃、200 r/min 振荡培养 48 h, 离心取上清即为粗酶液。

基金项目 国家 863 课题(2012AA022203C)资助。

作者简介 卢争辉(1989-), 男, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 研究方向: 分子酶学。* 通讯作者, 副教授, 从事微生物与分子酶学研究, E-mail: zhangguimin@hubu.edu.cn。

收稿日期 2013-01-25

1.2.2 显微形态观察。用传统方法对分离出的细菌进行显微形态观察,如革兰氏染色、芽孢染色^[14]。

1.2.3 16S rDNA 扩增及序列分析。抽提分离菌株的总DNA,并以其为模板,利用16S rDNA的通用引物^[15](正向引物27F:5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物1492R:5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')进行PCR扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳检测验证后回收目的片段,测序,进行BLAST同源比对。

1.2.4 酶活力测定。二硝基水杨酸法(DNS法)^[16]:将50 μl适当稀释的粗酶液与450 μl预热的1%可溶性淀粉溶液混匀,在设定温度下反应15 min,反应结束后加800 μl DNS试剂,煮沸5 min,冷水冷却,测540 nm处的光吸收值。将粗酶液沸水浴5 min,离心取上清后做同样处理作为对照。设3个重复。

碘量法(国标法)^[17]:将50 μl适当稀释的粗酶液与1 ml预热的1%可溶性淀粉溶液混匀,在设定温度下反应15 min,反应结束后吸取1 ml反应液,加到预先盛有0.5 ml HCl和5 ml稀碘液的试管中,摇匀,测660 nm处的光吸收值。将粗酶液沸水浴5 min,离心取上清后做同样处理作为对照。设3个重复。

1.3 细菌的酶学性质分析

1.3.1 温度对酶活性的影响。用pH 9.0的0.05 mol/L Glycine-NaOH缓冲液配制底物,加入适量稀释的粗酶液,反应混合物分别在30、40、50、60、70℃环境下反应15 min。反应结束后用碘量法测定还原糖含量,反应最大值设定为100%,试验重复3次,所得数据用Microsoft Excel(Office 2003)分析。

1.3.2 pH对酶活性的影响。用不同pH值缓冲液配制底物,在最适温度下预热7 min,加入适量粗酶液,反应15 min,用DNS法测还原糖。其中用到2种不同的0.05 mol/L缓冲体系:0.05 mol/L Tris-HCl(pH 7.5~9.0)和0.05 mol/L Glycine-NaOH(pH 9.0~11.0)。试验重复3次,所得数据用Microsoft Excel(Office 2003)分析。

1.3.3 热稳定性的测定。在最适pH条件下,将粗酶液分别放置在50和60℃环境下,每隔5 min取一次样,测酶的残留活性,将未经保温处理酶液的酶活定为100%。

2 结果与分析

2.1 碱性淀粉酶产生菌的分离 从采集的土壤样品中共分离得到9株不同培养特征的碱性淀粉酶产生菌,其中菌株703的水解圈最大(图1A),该菌株单菌落呈圆形、乳白色、不透明,表面湿润、粘稠、易挑起(图1B)。革兰氏染色与芽孢染色显示该菌为革兰氏阳性菌,杆状,芽孢椭圆形,端生。

2.2 碱性淀粉酶产生菌703的16S rDNA鉴定 抽提703的总DNA,利用引物27F和1492R进行PCR扩增,扩增片段测序后进行BLAST比对,结果显示,该菌株的16S rDNA序列与菌株*Bacillus pseudofirmus* OF4(GenBank accession no. CP001878)具有100%的一致性^[18-19],与*B. pseudofirmus* DSM 8715(GenBank accession no. NR026139.1)^[20]只有1个



图1 碱性淀粉酶产生菌703的水解圈(A)和菌落特征(B)

核苷酸的差别,与*B. pseudofirmus* 124-1(GenBank accession no. AB201799.1)和A-40-2(GenBank accession no. AB201795.1)有2个核苷酸的差别,与*B. pseudofirmus* FTU(GenBank accession no. AF406790.1)^[21]有3个核苷酸的差别。因此初步确定该菌为*B. pseudofirmus* 703。

2.3 温度对碱性菌703产淀粉酶活性的影响 在不同温度下测定该酶的酶活,结果显示(图2),该酶的最适作用温度为50℃。温度高于40℃后,该酶酶活增加较明显,45~60℃范围内酶活较高,相对酶活分别在70%以上;在温度超过60℃后,酶活急剧降低,70℃时的相对酶活仅为27%,说明该酶是中温酶。

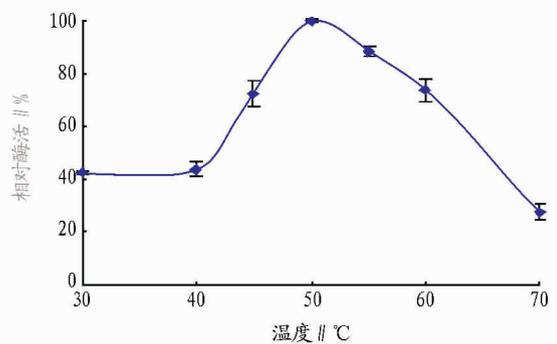


图2 温度对碱性菌703产淀粉酶活性的影响

2.4 pH对碱性菌703产淀粉酶活性的影响 在该酶最适作用温度50℃下测酶在不同pH值下的酶活,结果如图3所示,该酶最适作用pH为9.5,在pH 10.0与0.5时的相对酶活分别为96.2%与84.1%,在pH为11时,相对酶活仍有58.4%,说明该酶是碱性淀粉酶。

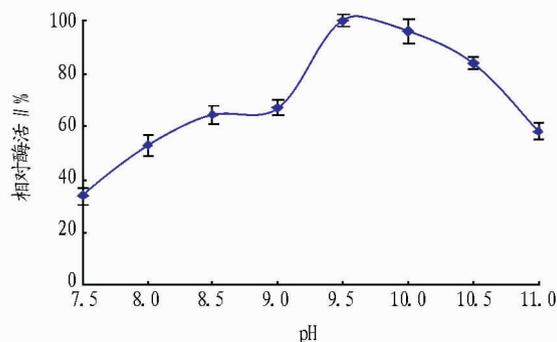


图3 pH对碱性菌703产淀粉酶活性的影响

2.5 碱性菌703产淀粉酶的热稳定性 不加底物将粗酶液分别在50和60℃下处理0~30 min,然后在最适作用pH

(9.5)下测残余酶活,结果显示(图4),该酶在50与60℃下孵育30min后,残余酶活分别为74.7%与45.3%,说明该酶的热稳定性有待提高,接下来的工作将主要集中在提高该酶的热稳定性上。

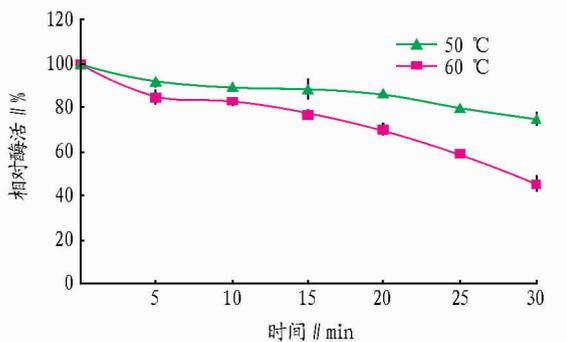


图4 碱性菌703产淀粉酶的热稳定性

3 讨论

本研究从稻田土壤样品中共分离到9株能在碱性条件下生长的淀粉酶产生菌,对其中水解圈最大的菌株703进行形态分析和分子鉴定,揭示该菌是兼性嗜碱菌*B. pseudofirmus*,该菌的pH生长范围为7.5~11.4,能经受环境pH的突然大幅度增加,这一特性很好地解释了试验能从稻田中分离得到兼性嗜碱菌的原因。

粗酶液的酶学性质分析显示,分离得到的菌株*B. pseudofirmus* 703所产淀粉酶最适温度为50℃,最适pH为9.5,Dastager等^[10]、Pardeep等^[11]及Selim^[12]报道的淀粉酶最适pH都为9.0,与此相比,该酶具有更强的碱耐受性。在热稳定性方面,Dastager等^[10]报道的淀粉酶最适温度为45℃,60℃时酶活丧失75%~85%,相比之下703所产淀粉酶在60℃下处理30min仍残余近50%的活性,具有更好的热稳定性。该酶的性质表明该酶能满足纺织品退浆等工业对淀粉酶中温耐碱的要求,能与碱性果胶酶相结合对棉织品进行一步化处理,具有潜在的工业应用价值。在今后的工作中,笔者将从该菌克隆淀粉酶基因,通过异源表达提高产量,降低生产成本,以使碱性淀粉酶能在纺织品印染中得到广泛使用。

参考文献

[1] 王雷. 棉织物生物酶前处理探究[D]. 上海: 东华大学, 2006.
 [2] 蒲宗耀, 陈松, 黄玉华. 耐碱耐温淀粉酶对织物退浆工艺研究[C]//2008 诺维信全国印染行业节能环保年会. 苏州: [出版者不详], 2008.
 [3] NGUYEN Q D, REZESSY-SZABO J M, CLAEYSSENS M, et al. Purification and characterization of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2002, 31: 345–352.

[4] YASUHIRO K, NAOKI T, HIDEKI O, TOSHIRO O, et al. Production of Acid-Stable α -amylase by *Aspergillus kawachii* during Barely Shochu-Koji Production[J]. *J Ferment Bioeng*, 1997, 84(3): 224–227.
 [5] TOSHIHIKO S, SHIGEYUKI N, KANEFUMI K, et al. Glucoamylase and acid-stable- α -amylase in koji for citric acid production[J]. *Bulletin of the Faculty of Agriculture Kagoshima University*, 1995, 45: 29–35.
 [6] LEPP C A, GILLIGAN S, TOBIN J J, et al. Development of a liquid stable alpha-amylase reagent for new Olympus AU6004(TM) [J]. *Chemistry Analyzer Clin Chem*, 1996, 42(6): 22–23.
 [7] KANNO M. A *Bacillus acidocaldarius* α -amylase that is highly stable to heat under acidic conditions[J]. *Agric Biol Chem*, 1986, 50: 23.
 [8] SUTTON A, DAWSON H, HOFF B, et al. Analytic Comparisons between 2 clinical chemistry analyzers[J]. *Can Vet J*, 1999, 40(4): 255–260.
 [9] WANG N, ZHANG Y, WANG Q, et al. Gene cloning and characterization of a novel α -amylase from alkaliphilic *Alkalimonas amylytica*[J]. *Biotechnol J*, 2006, 1: 1258–1265.
 [10] SYED D G, AGASAR D, PANDEY A. Production and partial purification of α -amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, 36: 189–194.
 [11] PARDEEP K, ASHISH V. Characterization and optimal production of alkaline α -amylase from *Bacillus* sp. DLB 9[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6(11): 2674–2681.
 [12] SELIM S A. Novel thermostable and alkalitolerant amylase production by *Geobacillus stearothermophilus* HP 3 [J]. *Nat Prod Res*, 2012, 26(17): 1626–1630.
 [13] FUKUMORI F, KUDO T, HORIKOSHI K. Purification and Properties of a cellulase from alkaliphilic *Bacillus* sp. No. 1139 [J]. *J Gen Microbiol*, 1985, 131: 3339–3345.
 [14] KOMAGATA K. The aerobic bacteria[M]//HASEGAWA T. Classification and identification of microorganisms. Tokyo: Japan Scientific Societies, 1985: 99–160.
 [15] GUSSOW D, GLACKSON T. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction[J]. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17: 4000.
 [16] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Anal Chem*, 1959, 31: 426–428.
 [17] 张蔚, 郭庆文, 吴炳炎, 等. GB 8275–2009, 食品添加剂- α -淀粉酶制剂[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
 [18] JANTO B, AHMED A, ITO M, et al. Genome of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 reveals adaptations that support the ability to grow in an external pH range from 7.5 to 11.4[J]. *Environ Microbiol*, 2011, 13(12): 3289–3309.
 [19] HIDEKI T, TERRY A K. Reidentification of facultatively alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 as *Bacillus pseudofirmus* OF4[J]. *Extremophiles*, 2000, 4: 19–22.
 [20] NIELSEN P, RAINEY F A, OUTTRUP H, et al. Comparative 16S rDNA sequence analysis of some alkaliphilic bacilli and the establishment of a sixth rRNA group within the genus *Bacillus* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, 117: 61–66.
 [21] MUNTYAN M S, TOUROVA T P, LYSENKO A M, et al. Molecular identification of alkaliphilic and halotolerant strain *Bacillus* sp. FTU as *Bacillus pseudofirmus* FTU[J]. *Extremophiles*, 2002, 6(3): 195–199.
 [22] 孙佑赫, 周开艳, 熊智. 一株产 α -淀粉酶细菌的分离、鉴定及酶学性质初步研究[J]. *华北农学报*, 2012(S1): 250–253.
 [23] 胡先望, 陈朋, 梁宁, 等. 产异淀粉酶嗜热菌选育及产酶条件的研究[J]. *湖南农业科学*, 2012(1): 8–11.
 [24] 刘雅琴, 陈海魁, 孔令全. α -淀粉酶产生菌的分离筛选与诱变选育[J]. *畜牧与饲料科学*, 2010, 31(9): 1–3.