

高温放线菌V₄菌株热稳定β-淀粉酶的产生及其性质的研究

周蓓芸 郑幼霞

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

高温放线菌 V₄ 菌株 (*Thermoactinomyces* sp. V₄) 产生的 β-淀粉酶最适反应温度为 70℃, 最适 pH 为 6, 酶的热稳定性良好, 50℃ (4h) 不失去酶活力, 55℃ (2h) 保持最初活力的 92%, 酶对可溶性淀粉的水解率达 77%, 纸层析结果显示水解产物主要为麦芽糖, 经旋光测定, 水解产物具有 β-构型。巯基抑制剂对此 β-淀粉酶无抑制作用。V₄ 菌株同时产生异淀粉酶及少量的 α-淀粉酶。

关键词 β-淀粉酶; 耐热性; 麦芽糖; 高温放线菌

β-淀粉酶是一类重要的淀粉水解酶, 它作用于淀粉分子非还原性末端的 α-1,4 糖苷键, 产生麦芽糖。在啤酒工业、饴糖及高麦芽糖浆、纯麦芽糖浆的生产中用途很广。目前国内外工业用 β-淀粉酶多来源于高等植物如麦类、高粱、大豆和甘薯等。这不但浪费粮食而且使生产工艺复杂费时, 所以近年来国内外已注意寻找微生物源的 β-淀粉酶, 但它们大多为不耐热^[1,2], 不能适应实际生产的高温环境。本文报道由高温放线菌 V₄ 菌株产生的热稳定 β-淀粉酶粗酶的性质和特点。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌株^[3]: 高温放线菌 V₄ 菌株 (*Thermoactinomyces* sp. V₄) 从采自云南的土样中分离得到。斜面培养 55℃, 发酵培养 45℃。

2. 培养基: (1) 斜面培养基 (g/L): KNO₃ 1, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, NaCl 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.01, 蛋

白胨 10, 可溶性淀粉 20, 琼脂 30, pH 7.2—7.4; (2) 发酵培养基 (g/L): 可溶性淀粉 30, 酵母膏 5, Tryptone 5, CaCl₂·2H₂O 0.5, MnCl₂·4H₂O 0.5, MgCl₂·7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 1, pH 7.0—7.2。

(二) 方法

1. 粗酶制备: 将孢子接入发酵培养基中, 45℃, 150rpm 摇床培养 48h, 离心 (5000rpm) 即得粗酶液。

2. β-淀粉酶活力测定^[2]: 将 5ml 2% 可溶性淀粉、1ml 磷酸缓冲液 (0.02 mol/L, pH 6), 3.9ml 蒸馏水置于试管中, 55℃ 恒温水浴预热 5min, 加酶液 0.1ml, 保温 30min, 立即取出在沸水中煮 5min, 冷却后用 DNS 法测定还原糖。在上述条件下, 每小时产生 1mg 麦芽糖的酶量为一个酶活力单位。

3. α-淀粉酶活力测定: 将 20ml 2% 可溶性淀粉、5ml 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH 6) 混和, 在 60℃ 水浴中平衡温度后, 加入 0.5ml 酶液, 充分混匀, 即刻记

本文于 1990 年 4 月 23 日收到。

时。定时取出0.5ml 反应液放入预先盛有1.5ml 比色稀碘液的试管中, 当颜色逐渐由紫色转变成棕色, 与标准颜色相同(1ml 标准糊精与 3ml 标准稀碘液反应的颜色)即为反应终点, 记录时间(t)。

计算: 淀粉酶活力单位

$$= (60/t \times 20 \times 2\% \times n) \div 0.5$$

式中n为酶的稀释倍数

4. 异淀粉酶活力测定: 5ml 1% 可溶性支链淀粉(Amylopectin Sigma), 1ml 醋酸-醋酸钠缓冲液(0.1mol/L, pH5.8)与1ml酶液混匀后, 立即吸出1ml于预先盛有12.5ml 0.01mol/L H₂SO₄溶液的试管中作为空白。然后将反应液放置在50℃恒温水浴中保温1h, 冷却, 吸取1ml反应液于预先盛有12.5ml 0.01mol/L H₂SO₄的样品管中。样品管和空白管各加1ml 0.01mol/L 碘液, 定容至 25ml, 摇匀, 常温放置15min, 620nm 比色。一个酶活力单位(u)定义为 1 小时内, 620nm 处引起光密度值增加0.01的酶量。

5. 水解产物的纸层析: 新华一号滤纸, 上行层析, 展开溶剂为吡啶: 正丁醇: H₂O(4:6:3), 显色剂为苯胺-二苯胺, 105℃烘干至显色。

6. 试剂配制: (1) 5%糊精溶液: 称取糊精 5g, 煮沸溶解, 冷却定容后过滤, 放置过夜用于旋光测定。(2) 标准糊精液: 称取30mg糊精, 悬浮于少量水中, 再倾入烧开的水中, 冷却后定容至50ml。(3) 碘原液: 称取碘11g, 碘化钾22g, 加水溶解定容至 500ml。(4) 标准稀碘液: 取碘原液15ml, 加碘化钾8g, 加水定容至 200ml。(5) 比色稀碘液: 取碘原液 2ml, 加碘化钾20g, 加水定容至500ml。(6) 苯胺-二苯胺试剂: 按10g/L苯胺: 10g/L二苯胺: 85%磷酸 = 5:5:1混合, (用丙酮新鲜配制)

结 果

(一) β-淀粉酶对可溶性淀粉水解产物的纸层析

5%可溶性淀粉(0.01mol/L, pH6 磷酸缓冲液配制)5ml 与 5ml 发酵粗酶液(200u/ml)相混合, 55℃反应后, 不同时间取样层析, 结果如图1a所示。V₄菌株β-淀粉酶水解可溶性淀粉时起初含有寡聚糖色斑, 随着水解时间的增加, 麦芽糖含量逐渐增多, 麦芽三糖逐渐减少, 并伴有少量葡萄糖产生, 这说明 V₄ 菌株发酵粗酶中有α-淀粉酶存在。经测定, 粗酶中α-淀粉酶含量极少(表1)。用浓缩的发酵酶液水解可溶性淀粉, 层析结果(图1b)更明显地表明最终水解产物主要为麦芽糖。

(二) β-淀粉酶对可溶性淀粉水解产物的旋光值测定^[4]

将90ml 5%糊精溶液, 5ml V₄ 菌株β-淀粉酶发酵粗酶液(400u/ml)及 5ml 0.5mol/L pH5 醋酸缓冲液在室温(22.5℃)反应, 间隔20, 40, 90min 各取样30ml, 加5% HgCl₂ 0.4ml, 其中15ml 测旋光值A(旋光管长10cm), 另 15ml 在沸水浴中保持 1min, 冷却后室温放置 4h 以上, 测旋光值 B, 结果(图2)显示水解产生的糖具有β-构型。

(三) 巯基抑制剂对 V₄ 菌株β-淀粉酶活性的影响

测定了巯基抑制剂 N-乙酰马来酰亚胺(NEM)及对氯汞苯甲酸(PCMB)对β-淀粉酶粗酶活力的影响, 结果(表2)显示 V₄ 菌株β-淀粉酶不受巯基抑制剂的影响, 这与大麦等高等植物的β-淀粉酶、*Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* subsp. *mycoides*^[6], *Bacillus polymyxa* No. 72^[7]的β-淀粉酶不同, 它们都明显地受到

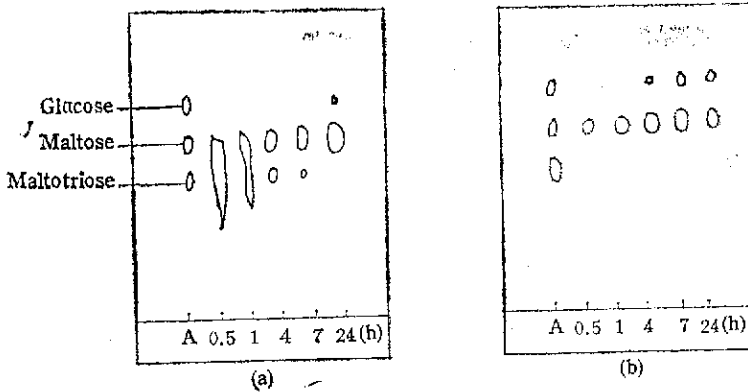


图 1 V_4 菌株淀粉酶水解产物纸层析图

Fig. 1 Paper chromatogram of starch hydrolytic product by V_4 amylase

(a) 粗酶液水解产物 (b) 浓缩粗酶液水解产物

Hydrolytic product of starch by crude enzyme solution (a) and concentrated crude enzyme solution (b)

表 1 粗酶中几种淀粉酶含量

Table 1 Content of several amylase in crude enzyme solution

发酵液批号 Batch	β -淀粉酶活力 β -amylase activity (u/ml)	α -淀粉酶活力 α -amylase activity (u/ml)	异淀粉酶活力 Isoamylase activity (u/ml)
1	271	1.73	
2	247.5	1.34	
3	200		1100
4	276		1490
5	292		1540

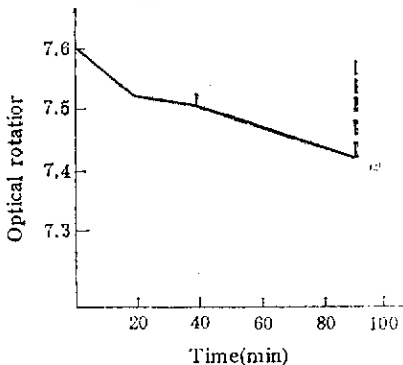


图 2 V_4 菌株 β -淀粉酶水解产物的变旋值

Fig.2 Mutarotation of β -amylase hydrolysate

巯基抑制剂的影响,但与Marsuall^[8]报道的*Bacillus polymyxa*及Napier^[9]报道的*Bacillus circulans*的 β -淀粉酶相同,

它们都不受巯基抑制剂的影响。

(四) V_4 菌株 β -淀粉酶对可溶性淀粉水解率的测定

将1g可溶性淀粉用40ml磷酸缓冲液(0.01mol/L pH6)配制,再加1ml β -淀粉酶发酵粗酶液(192u/ml),55℃反应,隔时间取样测定还原糖含量,求淀粉水解率(以同样浓度的可溶性淀粉用盐酸水解后测定的还原糖量为100)。结果(图3)表明酶解4h后,淀粉水解率即达77%,而一般报道认为 β -淀粉酶对可溶性淀粉的水解率为50—60%。此 β -淀粉酶的水解率较高的原因可能与粗酶液中同时含有异淀粉酶有关,经测定,粗酶中异淀粉酶活力为1100u/ml以上(表1)。

表 2 巯基抑制剂对 V_4 菌株 β -淀粉酶的影响
Table 3 Effect of sulfhydryl reagents on V_4 β -amylase

酶液 Enzyme (ml)	1mmol/L NEM (ml)	2mmol/L PCMB (ml)	β -淀粉酶活力 β -amylase activity (u/ml)
1	0.2		255
1		0.2	249
1			250

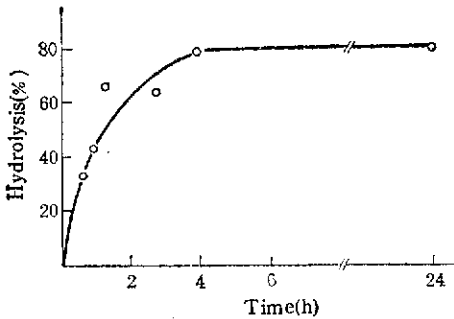


图 3 V_4 菌株 β -淀粉酶对可溶性淀粉水解率
Fig. 3 Percentage of enzymolysis on soluble starch

(五) 温度对 β -淀粉酶活性的影响

将淀粉酶分别在 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 $^{\circ}\text{C}$ 测定酶活力, 结果(图 4)表示酶在 70 $^{\circ}\text{C}$ 活力最高。

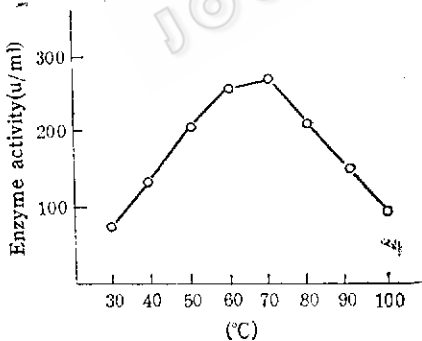


图 4 温度对 β -淀粉酶活力的影响
Fig. 4 Effect of temperature on β -amylase activity

(六) 酶的热稳定性

将发酵液(232u/ml)在不同温度中保温, 定时取样测定其残余淀粉酶活力, 结果(图 5)表明: V_4 菌株 β -淀粉酶粗酶的热稳定性较好, 50 $^{\circ}\text{C}$ 保温 4h 不失活, 55 $^{\circ}\text{C}$

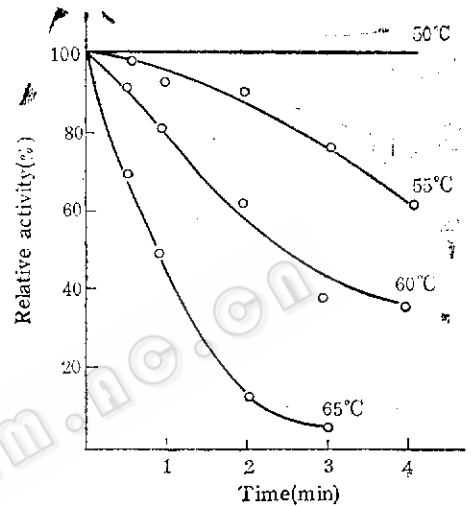


图 5 V_4 菌株 β -淀粉酶的热稳定性
Fig. 5 Heat stability of β -amylase

保温 2h 有最初活力的 92%, 65 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30min, 仍有最初活力的 73%。

(七) pH 对 β -淀粉酶活性的影响

酶活力测定系统中, 各自加不同 pH 的缓冲液 (0.2mol/L Na_2HPO_4 -柠檬酸

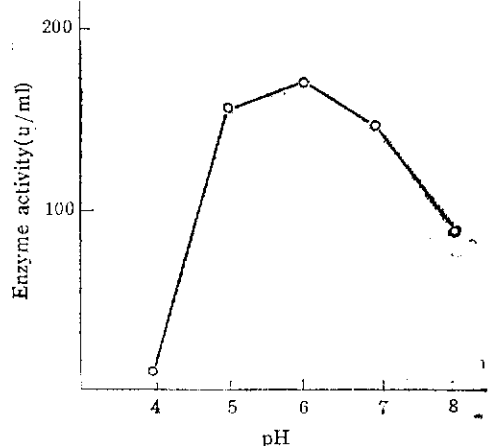


图 6 pH 对 β -淀粉酶活力的影响
Fig. 6 Effect of pH on β -amylase

缓冲液), 55°C 反应测酶活力, 结果(图 6) 显示酶的最适 pH 为 6。

(八) 酶的 pH 稳定性

将 2ml 酶液在 2ml 不同 pH 缓冲液中保温(40°C) 5h 后, 测酶活力, 结果(图 7) 显示 V₄ 菌株 β-淀粉酶在 pH7 时最稳定, 在 pH6—8 内相对较稳定。

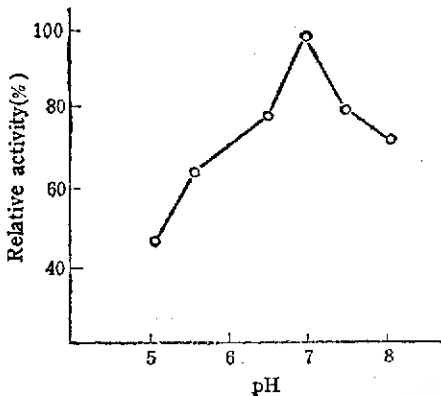


图 7 V₄ 菌株 β-淀粉酶的 pH 稳定性
Fig. 7 pH stability of β-amylase

讨 论

从以上的实验结果表明, V₄ 菌株发酵产生的粗酶液中, 至少存在三种淀粉酶即

β-淀粉酶、α-淀粉酶及异淀粉酶, 从对淀粉水解产物的纸层析分析显示: 随着水解时间的增加, 寡聚糖逐渐转化成麦芽糖, 其最终产物除少量的葡萄糖外, 大量堆积麦芽糖。这表明 β-淀粉酶是主要的酶种, α-淀粉酶含量很少, 这和几种酶的含量测定相一致。粗酶液对淀粉的水解率, 4h 即达到 77%, 这是一个很好的特性, 而一般报道 β-淀粉酶对淀粉的水解率不超过 60%, 因为 β-淀粉酶只能水解淀粉分子中的 α-1,4 糖苷键。本文表 1 所示的数据指出 V₄ 菌株的粗酶液中, 除 α-、β-淀粉酶外, 还有活力较高的异淀粉酶, 异淀粉酶是脱支链淀粉酶, 它能作用于支链淀粉支链处的 α-1,6 糖苷键, 将侧链切下变成分子较小的直链淀粉, 使 α-、β-淀粉酶能继续水解, 这可能是 V₄ 菌株粗酶液所以能高效率水解淀粉的原因, 异淀粉酶的存在增加了 V₄ 菌株的实际使用价值。

本实验结果还说明 V₄ 菌株有较好的耐热性, 与其它细菌的 β-淀粉酶相比^[9,10], 它的耐热性要高得多, 这符合实际生产的要求。至今国内外尚未有耐热 β-淀粉酶进行实际应用的报道, 所以对 V₄ 菌株耐热性 β-淀粉酶的进一步研究开发具有重大的意义。

参 考 文 献

- [1] Shine, R. et al.; *J. Ferment. Technol.*, 53: 698, 1975.
- [2] 何秉旺等; 微生物学报, 23(1): 75, 1983.
- [3] 周蓓芸、郑幼霞; 生物化学及生物物理学报, 22: 95, 1990.
- [4] 不破英次等; 日本农艺化学会志, 26: 194, 1952.
- [5] Higashihara, M. et al.; *Agri. Biol. Chem.*, 38: 1023, 1974.
- [6] Takasaki, Y.; *Agri. Biol. Chem.*, 40: 1515, 1976.
- [7] Murao, S. et al.; *Agri. Biol. Chem.*, 43: 719, 1979.
- [8] Bacon, J.S.D.; *Microbiol Polysaccharides and Polysaccharases* Edited by Berkeley, R.C.W. et al., p. 339, 1979.
- [9] Thomas, M.; *J. Gen. Microbiol.*, 118: 67, 1980.
- [10] Forgatry, W.M. et al.; *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 25: 229, 1975.

Studies on Properties of Thermostable β -amylase from *Thermoactinomyces* sp. *V₄*

Zhou Beiyun Zheng Youxia

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica)

Crude β -amylase produced by *Thermoactinomyces* sp. *V₄* has an optimum temperature at 70°C and was quite stable at 50°C, 92% of original activity remained after treatment at 55°C for 2h. The enzyme was most active at pH6—8. The conversion rate of soluble starch to maltose was about 77% under the catalysis of crude enzyme. The mutarotation of the products from dextrin by the enzyme confirmed that the formed maltose was in β -form. Sulfhydryl reagents had no effect on the β -amylase.

Key words

β -amylase; heat-stability; maltose; *Thermoactinomyces*

敬告读者

本刊自今年起取消综述与评论栏目，只刊登研究论文及简报。