

产低温淀粉酶的海洋真菌筛选及研究

张 刚¹ 汪天虹¹ 张臻峰¹ 汪 浩¹ 肖 天²(¹ 山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)(² 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 从黄、东海的近海海底泥样中分离到 6 株产淀粉酶活力较高的丝状真菌, 对其中产淀粉酶活力最高的 *Penicillium* sp. FS 010441 号菌株产酶条件及酶学性质进行了初步研究。该菌最适生长温度为 15 ℃, 最高生长温度为 40 ℃, 在 0 ℃也可生长, 是典型的耐冷菌。对 *Penicillium* sp. FS 010441 进行固体培养每克干曲酶活达 2 622 U。*Penicillium* sp. FS 010441 所产低温淀粉酶最适作用 pH 值为 6.0, 最适反应温度为 40 ℃, 但在 0 ℃也表现出一定酶活, 而在 15 ℃有较强的酶活。该低温淀粉酶在洗涤、食品、饲料、制药和酿酒等行业可望有广泛的应用前景。

关键词 淀粉酶, 青霉, 冷适应酶, 海洋真菌

淀粉酶是一种用途极广的生物催化剂, 广泛应用于造纸、食品、医药工业, 如饴糖、啤酒、黄酒、葡萄糖、味精、抗生素等行业; 用于高质量的丝绸、人造棉、化学纤维退浆; 制成不同品种的工业酶、医用酶、诊断酶等; 在洗涤剂工业中, 作为洗涤剂酶与碱性蛋白酶、脂肪酶一起添加于洗衣粉中制成多酶洗衣粉等, 具有极广泛的用途。但目前商品生产的淀粉酶为中温酶, 在 0~20 ℃常温范围活力很低, 不适于食品、饲料、纺织和洗涤剂工业的低温条件而限制其应用^[1]。

在常年温度不超过 5 ℃的高纬深海海底分布有多种冷适应微生物(包括嗜冷菌与耐冷菌, 都能在接近 0 ℃下生长, 最高生长温度分别为 20 ℃与 40 ℃), 它们通过产生冷活性酶来调节其生理代谢活动以适应低温环境, 故成为科研工作者筛选低温微生物的理想场所。陈秀兰等人^[2]从海水中分离到产低温蛋白酶的微生物, Jean Pierre 等人^[3]也报道从北极分离到的嗜冷细菌可产热不稳定性 α -淀粉酶。Jean Pierre, Georges Feller 等人通过结构分析, 认为冷活性酶在低温下表现出较强的催化活性与其蛋白结构的强柔韧性有关, 这种结构可在较低的能耗下发挥催化作用, 而较高的酶催化活性又弥补了低温时反应速率的降低。从资源丰富的海洋微生物中筛选获得低温淀粉酶, 研究酶发酵与制备工艺, 克隆基因并在适宜的宿主系统中进行高效表达, 不仅可以为造纸、食品、医药等工业提供新酶品种, 还可为深入了解低温酶作用机理提供实验数据和创造条件。目前国内外尚无海洋真菌产冷适应性淀粉酶的报道。

作者从黄、东海海底淤泥样品中分离出 6 株产淀粉酶活力较高的真菌, 并对其中低温淀粉酶活力最高的一株菌 *Penicillium* sp. FS 010441 的生长特性及所产淀粉酶粗酶液的性质进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

中国科学院海洋研究所于 2000 年 10 月在黄、东海 28°10′~35°00′N, 121°1′~127°47.5′E 范围内, 水深 25~1 000 m 处采集泥样 9 个。

1.2 培养基

1.2.1 察氏培养基: 常规配方, 由陈海水配制。

1.2.2 土豆培养基: 常规配方, 由陈海水配制。

1.2.3 富集培养基: (1) 麸皮 1%, 淀粉 1%, KCl 0.05%, NaNO₃ 0.2%, K₃PO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, 1 kg/cm² 灭菌, 自然 pH, 陈海水配制。(2) 淀粉 2%, KCl 0.05%, NaNO₃ 0.2%, K₃PO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, 1 kg/cm² 灭菌, 自然 pH, 陈海水配制。

1.2.4 筛选培养基: 察氏固体培养基加麸皮 15% 及 Triton 0.1%, 自然 pH, 1 kg/cm² 灭菌, 陈海水配制。

1.2.5 发酵培养基: (1) 液体发酵培养基: 淀粉 0.5%, 麸皮 1.3%, Tryton 0.5%, Yeast Extract

第一作者: 张刚, 出生于 1978 年, 在读硕士研究生。E-mail: 2001zg@163.com

收稿日期: 2001-09-06; 修回日期: 2001-10-17

0.5%, NaCl 1%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, $1 \text{ kg}/\text{cm}^2$ 灭菌, 自然 pH, 陈海水配制。(2) 固体发酵培养基: 每个 300 ml 三角瓶加麸皮 10 g, 12 ml 陈海水(1% 尿素), 玉米粉 0.5 g, $1 \text{ kg}/\text{cm}^2$ 灭菌。

1.3 固体发酵粗酶液的制备

将孢子悬液接入固体培养基 15°C , 160 r/min, 每 12 h 翻动一次, 培养 7 d 后, 每瓶固体发酵液加入 100 ml 蒸馏水捣碎, 40°C 水浴振荡 2~3 h 后, 4°C 过夜浸泡后, 用滤纸过滤即得粗酶液。

1.4 淀粉酶活力测定

采用 Yoo 改良法, 反应体系为 5 ml 0.5% 淀粉(pH 6.0 醋酸缓冲液) 加 0.5 ml 酶液, 40°C 反应 5 min 后, 加 0.1 mol/L HCl 5 ml 终止反应。取 0.5 ml 反应液加于 5 ml 0.4 mol/L I₂ KI 溶液显色, 620 nm 测光密度。1 活力单位定义为 5 min 内水解 1 mg 淀粉的酶量。

$$A(U/ml) = D \times (R_0 - R) / R_0 \times 100$$

A: 酶活; R_0 : 底物加淀粉液的光吸收值; R: 反应物加淀粉液的光吸收值; D: 酶的稀释倍数。

2 结果与分析

2.1 海底真菌的富集与产低温淀粉酶真菌的筛选

将 1 g 土样加入盛有 10 ml 无菌水中振荡均匀后, 取 5 ml 悬浮液加入 25 ml 富集培养基中, 15°C , 160 r/min 振荡培养 3~5 d 后, 转接至新鲜培养基中, 重复操作 5~6 次。将培养好的 1 ml 富集培养液用无菌海水稀释后涂布筛选培养基平板, 15°C 培养 2~3 d, 将有透明圈的真菌挑出, 保藏于察氏或土豆培养基斜面。

按照上述方法筛选出产淀粉酶活力较高的 6 株丝状真菌, 分别编号为 FS 010441, FS 010444, FS 10771, FS 010996, FS 011004 和 FS 011006, 接入种子培养基中培养 2 d(15°C , 160 r/min), 然后按 15% 接种量接入液体发酵培养基, 15°C , 160 r/min, 培养 5 d, 取发酵液离心后取上清液测酶活。从 $29^\circ00' \text{N}$, $122^\circ30' \text{E}$, 水深 52 m 处所采土样中分离到编号为 FS010441 的菌株所产酶活明显高于其他菌株(数据略)。作者对其产酶特性及酶学性质进行了研究。

2.2 菌株鉴定

用平板上插入盖玻片的察氏培养基平板培养 *Penicillium* sp. FS010441。在菌落生长的不同时期对该菌进行观察。该菌菌落形态为: 基内菌丝白色, 孢子丝绿色、菌落表面干粉状、无皱褶、边缘整齐。菌丝形态为: 菌丝有隔、孢子为分生孢子、孢子丝末端为帚状分

支、有分生孢子梗、未见有性孢子、未见孢子囊和子囊壳等组织、未见特化的细胞和组织体。因此初步确定该菌为青霉菌(*Penicillium*), 命名为 *Penicillium* sp. FS010441。

2.3 最适生长温度及产酶条件研究

将孢子悬液涂布平板, 在不同温度下培养并测量单菌落直径, 得其最适生长温度为 18°C , 最高生长温

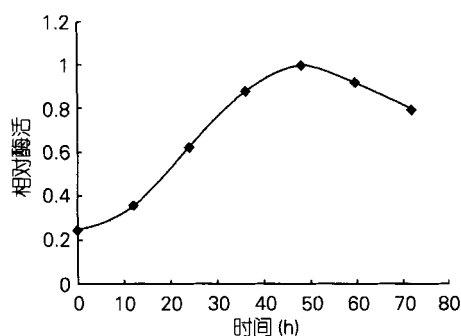


图1 *Penicillium* sp. FS 010441 产淀粉酶曲线
Fig.1 The curve of amylase production by *Penicillium* sp. FS 010441

度为 40°C (图略)。

将该菌接入种子培养基培养两天后按接种量 15% 接入固体培养基, 15°C 继续培养 5 d, 每隔 12 h 取样测固体发酵物酶活(图1)。由图1可见在培养 7 d 时产酶活力最高。

2.4 淀粉酶性质的初步研究

2.4.1 酶最适反应温度 取上述固体发酵物

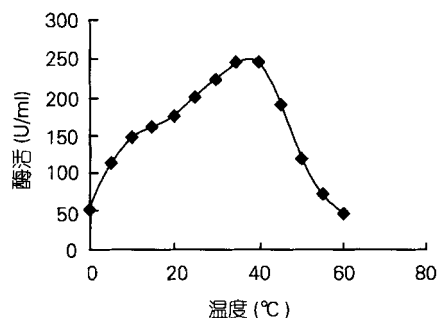


图2 温度对 *Penicillium* sp. FS 010441 淀粉酶活性的影响
Fig.2 The effect of temperature on amylase activities produced by *Penicillium* sp. FS010441

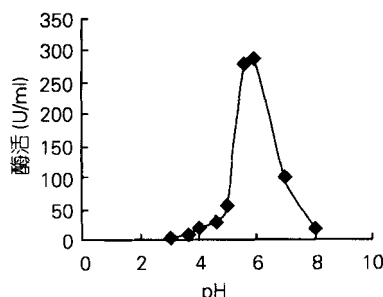


图3 pH值对 *Penicillium* sp. FS 010441 淀粉酶活性的影响
Fig.3 The effect of pH on amylase activities produced by *Penicillium* sp. FS 010441

制备浸出液,按 Yoo 改良法测其酶活(图2)。由图2可见 40℃ 时酶活力最高。

2.4.2 酶最适作用 pH 值 配制 pH 值分别为 3.0, 3.6, 4.0, 4.6, 5.0, 5.6, 6.0, 7.0, 8.0 的淀粉溶液(Na_2HPO_4 柠檬酸缓冲液),于 40℃ 保温 10 min 后,按 Yoo 改良法测不同 pH 之下的酶活。如图3可见 pH 6.0 时酶活力最高。

2.4.3 酶的热稳定性 分别在 40, 50, 60, 80℃ 下测量酶的热稳定性。发现 40℃, 20 min 后有 87.5% 酶活残留, 2 h 后仍有 45% 酶活残留。50℃, 20 min 后仅

有 12.5% 酶活残留。60℃ 20 min 后仅有 10% 酶活残留。而 80℃ 2 min 酶活就仅有 11.2%, 5 min 后酶活完全丧失。可见该酶的热敏感性强,在高温下不稳定。

3 结论

作者从黄、东海近海海底污泥样品中筛到 1 株产淀粉酶活力较高的青霉菌,所产淀粉酶最适反应温度为 40℃,在 15℃ 下仍有较高酶活,0℃ 以下可表现出一定酶活力,属冷适应酶。该酶具有较好的工业应用前景,如在干啤酿制中常规使用的耐高温淀粉酶,经巴氏灭菌后仍有较高酶活残存而继续产糖,影响干啤风味。使用对热敏感的低温淀粉酶可避免此问题。对 *Penicillium* sp. FS 010441 淀粉酶各组分的分离纯化及基因克隆等工作目前正在进行中。

参考文献

- 1 辛明秀,周培瑾.冷适应微生物产生的冷活性酶,微生物学报,2000,40(6):661~664
- 2 陈秀兰,张玉忠,高培基.渤海湾浅表海水中产低温蛋白酶适冷菌的筛选,海洋科学,2000,24(9):42~45
- 3 Chessa J. P. et al. Purification and characterization of the heat-labile α -amylase secreted by the psychrophilic bacterium TAC 240B, Can. J. Microbiol, 1999, 45: 452~457

SCREENING AND CHARACTERIZATION OF THE PSYCHROPHILIC AMYLASE-PRODUCING FUNGUS

ZHANG Gang¹ WANG Tian-hong¹ ZHANG Zhen-feng¹ WANG Hao¹ XIAO Tian²

(¹ State Key Lab. of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, 250100)

(² Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Received: Sep. 6, 2001

Key Words: Amylase, *Penicillium*, Psychrophilic enzyme, Marine fungi

Abstract

6 strains of psychrophilic amylase-producing fungi were isolated from the near sea mud of the Yellow Sea and the East China Sea. One *Penicillium* sp. denominated FS 010441 with high amylase production was further studied on growth characteristics and the enzyme properties. The optimum and highest growth temperatures for *Penicillium* sp. FS 010441 are 15℃ and 40℃, respectively. The optimum temperature for the amylase is 40℃ and the optimum pH is 6.0. But even under 0℃, the enzyme still shows some activities. It is expected that the cold-adapted amylase could be used in cold washing, food and fodder industry and so on.

(本文编辑:刘珊珊)