



海南大学学位论文原创性声明和使用授权说明

原创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品或成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律结果由本人承担。

论文作者签名：朱梦

日期：2010年6月8日

学位论文版权使用授权说明

本人完全了解海南大学关于收集、保存、使用学位论文的规定，即：学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权海南大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。本人在导师指导下完成的论文成果，知识产权归属海南大学。

保密论文在解密后遵守此规定。

论文作者签名：朱梦

日期：2010年6月8日

导师签名：

日期：2010年6月8日

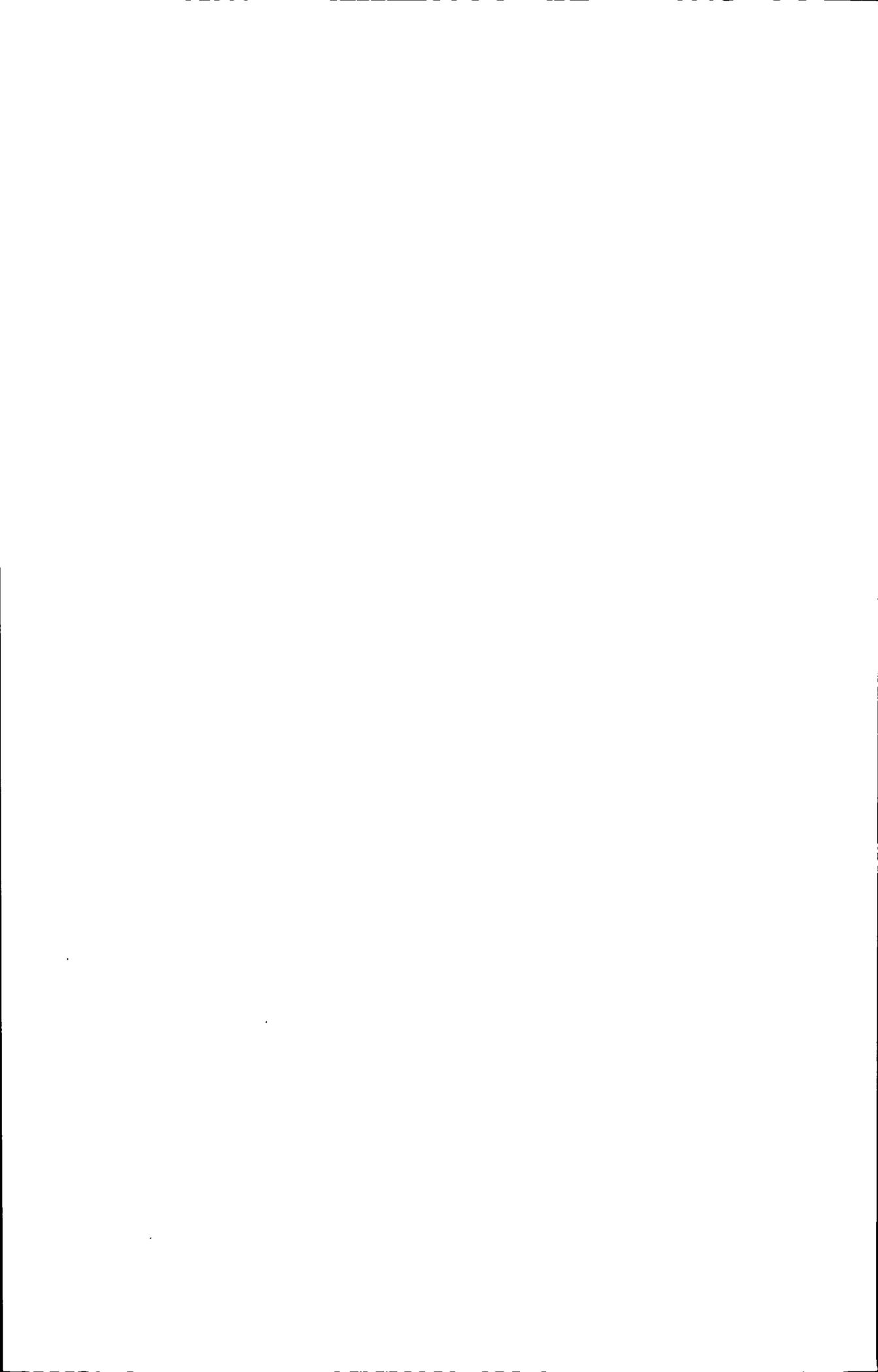
本人已经认真阅读“CALIS 高校学位论文全文数据库发布章程”，同意将本人的学位论文提交“CALIS 高校学位论文全文数据库”中全文发布，并可按“章程”中规定享受相关权益。同意论文提交后滞后： 半年； 一年； 二年发布。

论文作者签名：朱梦

日期：2010年6月8日

导师签名：

日期：2010年6月



摘 要

本研究从海南海口、三亚、儋州等地采集的样品中分离得到了62株产普鲁兰酶的菌株，并通过筛选得到了一株产普鲁兰酶能力较强的菌株BCT-1，该菌株的初始酶活力为0.357U/mL。

通过菌株形态特征、菌落特征、生理生化鉴定，并结合16S rDNA基因序列分析，对菌株进行了初步分类鉴定。该菌株为革兰氏阴性杆菌，无芽孢，无鞭毛，没有运动性，菌体呈短杆状。在分离平板培养基上菌落为白色或者微黄色、较粘稠，边缘不整、表面凹凸不平且没有色素分泌；对该菌做的25项生理生化鉴定的结果表明，各项指标与不动杆菌相似；由16S rDNA基因序列分析可以知道该菌株的16S rDNA 序列与不动杆菌属中乙酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticu*)的相似性达到97.8%，综合以上各项鉴定指标判定该菌为不动杆菌属，将该菌株命名*Acinetobacter* sp.BCT-1。

通过单因素实验和响应面 (Response Surface Analysis, RSA) 分析对 *Acinetobacter* sp.BCT-1 产普鲁兰酶的发酵培养基和产酶条件进行了优化，优化后的培养基的配方和产酶条件为：玉米淀粉 19.97g/L；酵母膏 10.45g/L；硫酸铵 5g/L；MgSO₄·7H₂O 0.5g/L；FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L，初始 pH 值 5.4；接种量 8%，装液量为 150mL/500mL，培养温度 30℃培养，摇瓶转速 200r/min。优化后产酶水平为 2.656U/ml，与优化前的产酶水平 0.357 U/ml 相比提高了 7.45 倍。

通过硫酸铵沉淀，Sephadax G-75 凝胶过滤，DEAE sepharose Fast Flow 强阴离子柱层析等方法对酶进行分离纯化后，纯化后的比活力是 9.97U/mg，与纯化前的 1.57 U/mg 相比，纯化倍数为 6.35，回收率为 6.2%。用 SDS-PAGE 检测出酶的分子量为 58KDa 左右，该普鲁兰酶的最适作用温度为 50℃，在 55℃之间时保温 20min 后，残余酶活力达到 55%以上；最适作用 pH 为 8.2，该酶在 pH6.0~9.0 范围内保持较稳定的活性。Ca²⁺，Mn²⁺，Mg²⁺对酶有较强的激活作用，Ba²⁺，Fe²⁺，Cu²⁺，Co²⁺，Zn²⁺ 和 Hg²⁺对酶有一定的抑制作用。在底物特异性试验中，该酶对普鲁兰糖利用率最高，其次为可溶性淀粉，糯米淀粉，玉米淀粉，支链淀粉，利用率最低的为马铃薯淀粉。

关键词：普鲁兰酶；鉴定；不动杆菌；优化；酶学性质



Abstract

In this research, 62 pullulanase-producing strains were isolated from samples taken from Haikou, Sanya, Danzhou in Hainan province. After screening, one highly pullulanase-producing strain BCT-1 was obtained. The initial enzyme activity of this strain is 0.357U/ml.

According to the characteristics of morphology and bacteria colony, physiology and biochemistry identification and 16S rDNA gene sequence analysis, the strain was preliminarily identified. It was observed that the cells of this strain were short rod shaped, Gram⁻, non-motile, no spores, no flagella. The isolated colonies in the medium plate is white or pale yellow, viscous, the edge of the cell is not sharp, the surface of the cell is ragged and no pigment secretion. The results of 25 physiological and biochemical identification indicated that this strain was basically similar with *Acinetobacter*. 16S rDNA gene sequence analysis indicated that the similarity of the strain BCT-1 and *Acinetobacter calcoaceticu* reached 97.8 %. Based on the above results, the strain BCT-1 was identified as *Acinetobacter* sp and named as *Acinetobacter* sp. BCT-1.

One-factor experiment and Response Surface Analysis (RSA) were carried out to optimize the medium composition and fermentation conditions of BCT-1. The optimum medium and fermentation conditions were: corn starch 19.97g / L; yeast extract 10.45g / L; sulfate ammonium 5g / L; MgSO₄ · 7H₂O 0.5g / L; FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g / L, initial pH 5.4; amount of inoculation is 8%, 500 mL flask containing medium 150 mL, incubation temperature is 30 °C and shaking at 200 r/min, fermentation time is 72 h. The optimum pullulanase activity was 2.656 U/ml, which was 7.45 times of the initial pullulanase activity, 0.357 U/ml.

The pullulanase enzyme was purified by sulphate precipitation, Sephadax G-75 gel filtration, ion-exchange chromatography on DEAE sepharose Fast Flow. The molecular weight of the pullulanase was estimated to be 58 KDa by SDS-PAGE. The specific activity is 9.97U/mg, comparing with the initial activity 1.57 U/mg, purified fold is 6.35, and recovery percent is 6.2%. The pullulanase of the optimum temperature is 50 °C. When the enzyme was incubated at 55 °C for 20min, there was 55% residual activity. The enzyme was active in the range of pH6.0 ~ 9.0. Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ activated the pullulanase activity, while Ba²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Zn²⁺ and Hg²⁺ inhibited the enzyme activity. In the test of substrate specificity, the pullulan was the optimum substrate to this enzyme, followed by soluble starch, sticky rice starch, corn starch, amylopectin, potato starch.

Keywords: pullulanase; identification; *Acinetobacter* sp.; optimization; enzyme properties



目 录

摘要.....	I
Abstract.....	II
第一章 序言	1
1.1 淀粉酶概述	1
1.1.1 淀粉	1
1.1.2 淀粉酶及其分类	2
1.2 微生物脱支酶	2
1.3 普鲁兰酶	4
1.3.1 普鲁兰酶的基本介绍	4
1.3.2 普鲁兰酶国内外研究概况和发展趋势	6
1.4 普鲁兰酶的应用	12
1.4.1 普鲁兰酶使支链淀粉变为直链淀粉	12
1.4.2 普鲁兰酶与 β -淀粉酶配合使用生产麦芽糖	12
1.4.3 用于啤酒外加酶法糖化	12
1.4.4 普鲁兰酶与其它淀粉酶配合使用	13
1.4.5 普鲁兰酶在高葡萄糖浆生产中的应用	13
1.4.6 普鲁兰酶在改性淀粉食品生产中的应用	13
1.4.7 普鲁兰的其他用途	14
1.5 研究目的及意义	14
1.6 研究内容	15
第二章 普鲁兰酶产生菌的筛选及产酶条件的优化	16
2.1 材料与方法	16
2.1.1 分离样品来源	16
2.1.2 试剂与设备	16
2.1.3 主要试剂的配制	16
2.1.4 培养基配制	17
2.1.5 分离方法	17
2.1.6 普鲁兰酶活力的测定	17
2.1.7 BCT-1 摇瓶产酶条件的优化	19
2.1.8 响应面(RSA)优化实验	20
2.2 结果与分析	21
2.2.1 平板筛选	21
2.2.2 葡萄糖标准曲线	21
2.2.3 摇瓶产酶条件的优化	22
2.2.4 响应面优化实验设计及结果	29
2.3 小结	32
第三章 普鲁兰酶的分离与纯化	34

3.1 材料与方法.....	34
3.1.1 菌种来源.....	34
3.1.2 试剂.....	34
3.1.3 培养基.....	34
3.1.4 实验仪器.....	34
3.1.5 试剂配制.....	34
3.1.6 实验方法.....	35
3.2 结果与分析.....	38
3.2.1 蛋白质标准曲线.....	38
3.2.2 普鲁兰酶的硫酸铵沉淀.....	38
3.2.3 Sephadax G-75 凝胶层析结果.....	39
3.2.4 DEAE sepharose Fast Flow 强阴离子柱层析结果.....	40
3.2.5 SDS-PAGE 检测酶的分子量.....	40
3.3 小结.....	41
第四章 菌株 BCT-1 产普鲁兰酶酶学性质分析.....	43
4.1 材料与方法.....	43
4.1.1 试剂.....	43
4.1.2 实验仪器.....	43
4.1.3 实验方法.....	43
4.2 结果与分析.....	44
4.2.1 最适作用温度和最适作用 pH 值.....	44
4.2.2 酶的热稳定性以及 pH 稳定性测定结果.....	45
4.2.4 酶动力学 K_m 值测定.....	47
4.2.5 酶的底物特异性.....	47
4.2.6 金属离子对酶活力的影响结果.....	48
4.3 小结.....	48
第五章 菌株 BCT-1 的分类鉴定.....	50
5.1 材料与方法.....	50
5.1.1 菌株来源.....	50
5.1.2 试剂.....	50
5.1.3 实验仪器.....	50
5.1.4 培养基.....	50
5.1.5 实验方法.....	50
5.2 结果与讨论.....	54
5.2.1 培养性状及形态特征.....	54
5.2.2 生理生化特征.....	54
5.2.3 菌株 16S rDNA 序列分析.....	55
5.3 小结.....	57
第六章 结 论.....	59
参考文献.....	61

第一章 序言

1.1 淀粉酶概述

1.1.1 淀粉

淀粉是葡萄糖的高聚体，是植物体贮存的养分，广泛存在于种子，根和茎中，也是制糖工业及发酵工业上最常用的原材料。淀粉可分为直链淀粉和支链淀粉，不同植物合成直链淀粉和支链淀粉的比例与植物的种类，品种以及生长时期有关^[1]。工业上，使用的谷类淀粉大多含有15%~20%的直链淀粉和75%~80%的支链淀粉。直链淀粉(结构如图1.1所示)是葡萄糖仅以 α -1, 4-糖苷键连接而成的长链化合物。支链淀粉(结构如图1.2所示)除葡萄糖分子以 α -1, 4-糖苷键连接成直链外，还有 α -1, 6-糖苷键的存在，大约每20~25个葡萄糖单位就有一个分支点。 α -1, 6-糖苷键分解程度直接影响到淀粉的利用率^[2]。

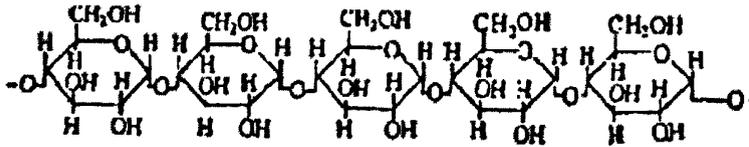


图 1.1 直链淀粉结构示意图

Fig1.1 The structure of starch

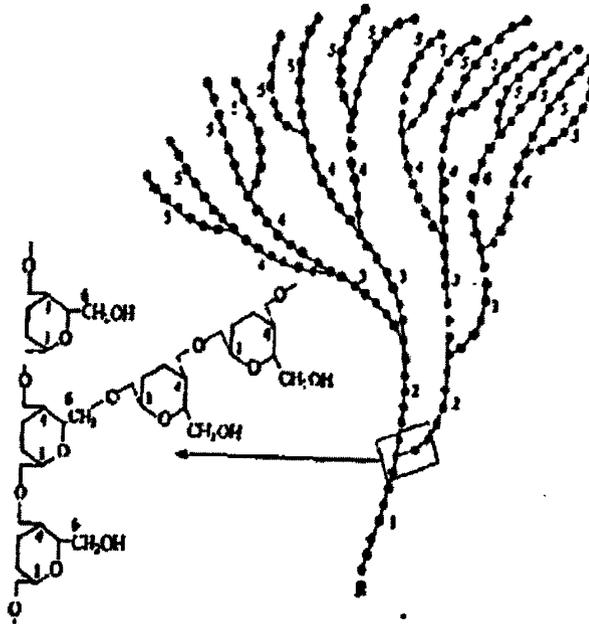


图 1.2 支链淀粉结构示意图

Fig1.2 The structure of amylopection

1.1.2 淀粉酶及其分类

淀粉酶是能够将淀粉或糖原水解为糊精和更小的分子(包括葡萄糖单位在内)的一大类酶的统称,广泛存在于动物、植物和微生物中^[3]。淀粉酶是一类非常重要的酶,产量占酶制剂市场份额的25%^[4]。淀粉酶在食品工业、纺织工业、造纸工业、洗涤剂工业、医药、分析化学等众多领域有着非常重要的用途^[5]。尽管可以通过植物、动物和微生物等多种途径得到淀粉酶,但是目前能够在工业上得到应用的淀粉酶绝大多数都是来自于微生物^[6]。

淀粉酶根据其水解产物和作用底物专一性的不同可以分为四类:α-淀粉酶、β-淀粉酶,葡萄糖淀粉酶(γ-淀粉酶)和脱支酶。其中葡萄糖淀粉酶是外切酶,其余三种均为内切酶,其介绍见表1.1。在大规模应用α-淀粉酶、β-淀粉酶、葡萄糖淀粉酶的淀粉工业中,由于直链淀粉和支链淀粉结构上的差异造成了其被淀粉酶水解产物的不同。在淀粉加工过程中,淀粉通过液化(95-105℃,pH5.5-6.2)和糖化(57-63℃,pH4.0-4.5)这两个步骤后,直链淀粉可被α-淀粉酶、β-淀粉酶水解为麦芽糖;而支链淀粉由于含有5%~6%的α-1,6-糖苷键,只有当加入脱支酶后,才能使支链淀粉彻底水解。由于支链淀粉的存在阻碍淀粉的分解,影响到淀粉的利用率和产品的质量^[7-9],并且在大多发酵工业中,原料在总生产成本中都占据着较大的比重^[10]。因为脱支酶的对支链淀粉的分解利用有着重大的作用,所以,世界各国为了改善淀粉酶对淀粉的作用效果,提高支链淀粉的利用率,减少成本,纷纷投入大量人力物力用于研究开发脱支酶,以此来提高经济效益。

1.2 微生物脱支酶

脱支酶系统名为支链淀粉-1,6-葡聚糖水解酶(EC3.2.1.9),能催化水解支链淀粉、糖原以及相关的大分子化合物中的α-1,6-糖苷键。

1931年,日本的Nishinura首次在酵母中提出了淀粉脱支酶(DBE)这个概念,同时对支链淀粉进行染色时也检测到了该酶的活性,从而将其命名为“支链淀粉合成酶”^[11]。随后,人们在马铃薯块茎和水稻胚乳中发现了同样的酶,并发现该酶不能合成淀粉,而是能够水解支链淀粉分枝上的α-1,6-糖苷键,从而生成直链淀粉,由此这种酶被命名为淀粉脱支酶,在其后的研究中各国科学家发现,微生物中的细菌,真菌和放线菌均能产生淀粉脱支酶。据不完全统计,在国内外已报道的菌株中,细菌有十余种,其中多数为杆菌,如*Bacillus flavorcaldarius*^[12],*Aerobacter aerogene*^[13],*Anaerobranca gottschalkii*^[14],*Desulfuroeoccus mucosus*^[15],*Pseudomonas amyloclavata*^[16],*Cytophaga*^[17]等;酵母仅有*Saccharomyces cerevisia*^[18]和*Lipomyces konnenkoae*^[19]两种。目前我国尚无具备大规模工业化生产淀粉脱支酶能力的企业。我国所需要的淀粉脱支酶全部进口自丹麦Novo enzyme公司(由酸性普鲁兰芽孢杆菌*B. acidopullulyticus*生产)和美国的Genencor公司,且价格高昂。近年来,国内不少学者

致力于筛选和培养新的产酶菌株，期望筛选出能产生适应不同目标的淀粉脱支酶的野生菌株，并运用基因工程技术加以改造，使其能够增加与底物的亲和性，并通过优化产酶条件，以得到产酶量大、酶活力高、稳定性好的产淀粉脱支酶菌株，从而实现该酶低成本，国产化生产的目标。

表 1.1 几种常见淀粉酶的作用特点

Tab.1-1 Several normal kinds of amylolytic enzyme

名 称	系统名称	作用特点		分布
		作用方式和专一性	产物及表现现象	
α -淀粉酶	α -1,4 葡聚糖 葡聚糖 水解酶	内切。从淀粉分子内部随机切割 α -1,4 键，不切 α -1,6 键。	α -糊精及麦芽寡糖，二糖和葡萄糖，使淀粉粘度下降，还原糖增加慢。	很广，唾液，麦芽，真菌，细菌等。
β -淀粉酶	α -1,4 葡聚糖 麦芽糖 水解酶	外切，从非还原性末端依次切割麦芽糖单位。 遇到 α -1,6 键便停止作用，不能切割，也不能通过。	麦芽糖和 β -极限糊精，还原糖增加快，粘度降低不明显，碘显色反应变紫红色。	甘薯，大豆，大麦，麦芽，细菌等。
葡萄糖淀粉酶	α -1,4 葡聚糖 葡萄糖 水解酶	外切，从非还原性末端依次切割葡萄糖单位。 遇到 α -1,4 键或 α -1,6 键都能水解。	葡萄糖，还原糖增加很快，粘度降低慢。	动物组织，真菌，细菌等。
脱支酶	葡萄糖 α -1,6-葡聚糖 水解酶	内切，水解支链淀粉和糖原中的 α -1,6 糖苷键。	生成直链淀粉，碘显色反应蓝色加深。	肝脏，植物，真菌，细菌等

1.3 普鲁兰酶

1.3.1 普鲁兰酶的基本介绍

普鲁兰酶(Pullulanase, EC.3.2.1.41)^[20]是一种能够专一性切开支链淀粉分支点中的 α -1, 6-糖苷键, 从而剪下整个侧枝, 形成直链淀粉的一类脱支酶^[21]。该酶能将最小单位的支链分解, 最大限度地利用淀粉原料, 因此在工业上有着重要应用价值, 是一种需求量较大的酶类。最初, 研究者发现这种酶能够水解普鲁兰糖的 α -1, 6-糖苷键, 故称其为普鲁兰酶^[7]。

普鲁兰糖(Pulullan)中文亦译为茁霉多糖、出芽短梗孢糖、普聚多糖, 该糖是出芽孢梗霉产生的胞外多糖, 以 α -1, 6-糖苷键结合麦芽糖构成同型多糖为主, 即葡萄糖按 α -1, 4-糖苷键结合成麦芽三糖, 两端再以 α -1, 6-糖苷键同另外的麦芽三糖相结合, 如此反复连接而成高分子多糖^[22]。

普鲁兰酶作用于普鲁兰糖的机制如图 1.3 所示。然而并非所有淀粉、糖原和糊精中的 α -1, 6-糖苷键都能在热力促进作用下被该酶水解, 水解发生的基本条件是, 在 α -1, 6-糖苷键的两端至少有 2 个 α -1, 4-糖苷键相连的 D-葡萄糖^[23]。

国外学者经过深入的研究, 根据普鲁兰酶水解产物的不同和底物专一性将其分为四种类型, 详细介绍见表 1.2^[24]。

表 1.2 普鲁兰酶种类

Table 1.2 Pullulanase class

Pullulanase class	作用位点	水解产物
Pullulanase I	还原性末端 α -1,4 糖苷键	葡萄糖
Pullulanase II	普鲁兰糖和支链寡聚糖 α -1,6 糖苷键	麦芽三糖和直链寡聚糖
Pullulanase III	α -1,6 糖苷键	α -麦芽糖基-(1,6)-D-葡糖
Neopullulanase	α -1,6 糖苷键	潘糖

普鲁兰酶能专一性地切断支链淀粉中的 α -1, 6-糖苷键, 这一性质决定了它在改善淀粉酶对淀粉的作用效果、提高淀粉利用率、降低原料消耗、提高产品质量及开发新的产品方面有着相当巨大的价值, 在淀粉加工工业中有着重要的用途和良好的市场前景。

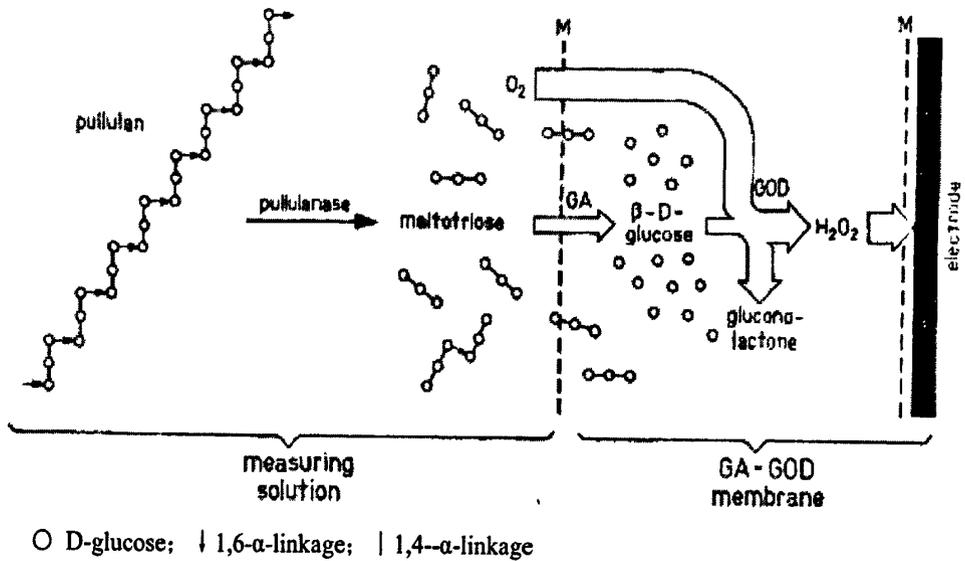


图 1.3 普鲁兰酶作用于普鲁兰糖机制^[25]

Fig.1.3 Action pattern of pullulanase on pulluan

普鲁兰酶的单独使用可以将支链淀粉转变为直链淀粉，这种转化率可以达到 100%^[26]。在淀粉的加工过程中，普鲁兰酶与糖化酶协同作用，能够加速糖化的过程，提高糖的利用率。另外普鲁兰酶还能与 β -淀粉酶协同作用来提高麦芽糖的产量^[27]。同时普鲁兰酶可应用于饴糖生产，啤酒酿造，酒精生产制造，洗涤剂工业^[28]。普鲁兰酶也可以用来研究碳水化合物的结构。由于普鲁兰酶这种新型的淀粉酶的广泛用途，该酶的研究和生产也日益受到世界各国的重视^[29]。

目前，许多普鲁兰酶的基因已经被克隆，但对普鲁兰酶的晶体结构(见图 1.4)报道并不多。根据序列相似性对糖苷酶水解键水解酶的分类，可以判断普鲁兰酶属于 α -淀粉酶第 13 家族。这个家族中包含了 30 多种酶，大致可分三大类：水解酶、转移酶、异构酶。这些酶能够水解和合成 α -1,1、 α -1,2、 α -1,3、 α -1,4、 α -1,5、 α -1,6 糖苷键，该家族的很多酶结构已经被报道，他们都为 $(\beta/\alpha)_8$ 的结构^[21]。通过生物信息学的研究表明，这个家族的蛋白质的酶活性中心都是 $(\beta/\alpha)_8$ 折叠筒这一共同结构(见图 1.6)，命名为结构域 A。第 13 家族中的大多数酶也具有结构域 B，它是位于 $(\beta/\alpha)_8$ 折叠筒中第三个 β 片层与第三个 α 螺旋之间的一段序列。结构域 B 的结构和长度差异较大，推测其功能是与底物的结合有关。紧接着 $(\beta/\alpha)_8$ 折叠筒后，还有结构域 C，紧接着结构域 C 是部分家族成员还有的结构域 D。

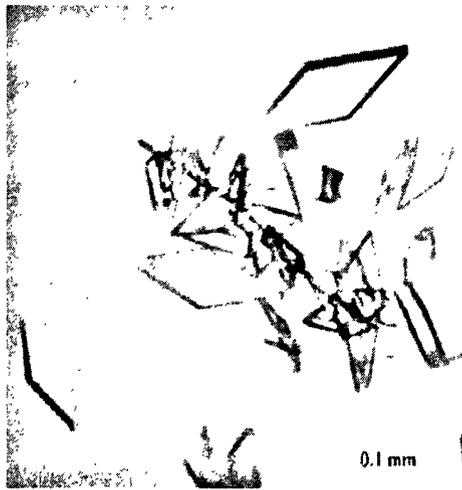


图 1.4 普鲁兰酶的晶体结构^[30]

Fig.1.4 The three-dimensional structures of pullulanase

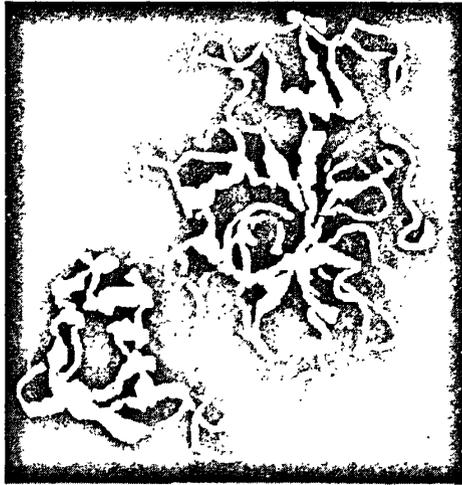


图 1.5 $(\beta/\alpha)_8$ 折叠筒^[21]

Fig1.5 TIM barrel of 2taa(Taka-amylase)

1.3.2 普鲁兰酶国内外研究概况和发展趋势

1.3.2.1 普鲁兰酶的主要产生菌株

1.3.2.1.1 酸性普鲁兰酶的产生菌株

在 1961 年, Bender 和 Wallenfels 最先通过产气杆菌 *Aerobacter aerogenes*(典型菌为肺炎克雷伯氏杆菌)发酵获得了普鲁兰酶, 该酶具有良好的酶学性能(酶作用最适 pH 5.5~6.0, 最适温度为 50℃)^[31]。之后, 经过世界各国的科研人员广泛深入的研究, 在不同地区发现许多不同的微生物都能产该酶, 并筛选出了一些适用于工业化生产的优良菌株。

1969 年, Brock 等^[32]从美国黄石公园分离并报道了水生栖热菌 *T. aquaticus* 产普鲁兰酶后, 栖热菌抗高温的特点引起广大的研究者的关注。

1975年日本的 Yoshiyuki Takasaki^[33]发现蜡状芽孢杆菌覃状变种 *B. cereus* var. *mycoides* 能同时产普鲁兰酶和 β -淀粉酶。最佳产酶条件为 pH6.0-6.5, 温度 50℃, 最大转化率(淀粉水解产生麦芽糖)大约为 95%。酶学性质研究中发现, 此酶在 pH5.0, 温度 60℃ 依然保持大部分活性。

八十年代初, 丹麦 Novo 公司^[34-35]获得嗜酸性的高产普鲁兰酶芽孢杆菌 *B. acidophilus* 并投入巨资开发研究, 并于 1983 年在日本和欧洲市场同时进行商品名 Promozyme 的产品销售。该普鲁兰酶产品有 Promozyme200L (200PUN/g), Promozyme 600L (600PUN/g) 两种类型。温度对酶活的影响在 pH5.0、60℃ 时酶活最大, 45℃ 和 68℃ 时活力仍为 60℃ 的二分之一, 20℃ 时相对酶活小于 20%; 在温度为 60℃ 时, pH5.0 左右酶活最大, pH4.0 和 pH6.0 时酶活降至 50% 以下, pH3.3 时酶活接近 0; 在 60℃, pH4.5-5.5 时, 72h 后仍可以保留 50%-65% 的酶活。目前, Promozyme 这类产品已占领了世界的大部分市场份额, 是应用最广、产量最大的普鲁兰酶。

在 1985 年, 美国威斯康星大学的 H.H.Hyun 和密歇根州立大学的 J.G.Zeikus 对耐热产硫梭菌 (*Clostridium thermosulfurogenes*) 的报道, 他们深入研究了通过此菌和高温产硫化氢梭状芽孢杆菌 (*Clostridium thermohydrosulfuricum*) 共同培养以提高酶产量的机理^[36]。

1986 年, Plant 等^[37]从水生栖热菌 *T.sp.*YT-1 中检测到 I 型普鲁兰酶, 该酶最适温度 75℃、pH5.5, 分子量为 65KDa。Kim 等^[38]从 *T. caldophilus* GK-24 中分离出了相同分子量的 I 型普鲁兰酶。pH5.5 时, 75℃ 活性最大, 可彻底水解普鲁兰糖为麦芽三糖, 并能切割极限糊精、可溶性淀粉、支链淀粉和糖原的 α -1, 6 糖苷键。

到 1987 年, 德国的 E.Madi 和 G.Antranikian 等也报道了一株能同时产 α -淀粉酶、普鲁兰酶和葡萄糖淀粉酶的菌种: 耐热产硫梭菌 (*Clostridium thermosulfurogenes*)。该菌种产普鲁兰酶最适反应温度为 70℃~75℃, 最适作用 pH 为 4.9~5.2^[39]。

1988 年, Kuriki 等人^[40]从 *B.stearothermophilus* 中分离到新的普鲁兰酶。该酶能有效的水解普鲁兰糖成潘糖, 并能水解少量淀粉。

1990 年, Saha 等^[41]从火山温泉中分离到胞内、胞外均产耐热、耐酸普鲁兰酶 II 型的嗜热厌氧菌 *Thermoanaerobacter* sp.B6A, 其最适作用温度 75℃、pH5.0。1991 年, Suzuky 等人^[42]分离高温芽孢杆菌 *B. flavocaldarius* KP1228。

1993 年, Brown 等^[43]从两株嗜热厌氧古细菌激烈火球菌 *Pyrococcus furiosus* 和栖热球菌 *Thermococcus litoralis* 中分离到 II 型普鲁兰酶。1995 年, Rudiger 等^[44]人分离到一株产耐热普鲁兰酶的伍氏火球菌 *P. woesei*, 该酶的分子量为 90KDa, 最适酶活温度 100℃、pH6.0。

1995 年 Kim 等^[45]分离到产 II 型普鲁兰酶 *B. circulans* F-2, 用淀粉酶抑制 Hg^{2+} 和普鲁兰酶抑制剂 Co^{2+} 对其酶活抑制结果发现其两种活性在同一肽链的不同位点, 因

此将其命名为淀粉酶—普鲁兰酶 (amylase-pullulanase enzyme, APE), 有别于同一活性位点的淀粉普鲁兰酶 (amylopullulanase)。

2000年, Duffner 等人^[46]报道了一株能产耐热普鲁兰酶 II 的极端嗜热厌氧古细菌黏质脱硫球菌 *Desulfurococcus mucosus*, 该菌所产普鲁兰酶除能分解普鲁兰糖的 α -1, 6 糖苷键外, 还能切割淀粉、多糖、支链淀粉和环糊精内 α -1, 4 糖苷键, 产生麦芽三糖和麦芽糖, 因此这是一种新型的能分解环糊精的普鲁兰酶。

2001年, 唐宝英等人^[47]筛选得到一株产耐热耐酸普鲁兰酶的芽孢杆菌 *Bacillus*.sp.EM24-19, 其普鲁兰酶最适作用温度 75℃、最适 pH 为 4.6, 该酶学性质接近 Novo 公司的普鲁兰酶, 适用于淀粉糖化的工业生产。

1.3.2.1.2 碱性普鲁兰酶的主要产生菌株

碱性普鲁兰酶在 pH6.0~11.0 有较稳定的酶活, 且具有较高的热稳定性。在碱性条件下能专一性水解茁霉多糖、淀粉、糖原、支链淀粉和相应低聚糖中的 α -1, 6 糖苷键。与酸性普鲁兰酶不同的是, 碱性普鲁兰酶是洗涤剂的一种有效添加剂, 从而拓宽了该酶在工业生产中的应用。

Aar 和 Igarashi^[48] 在 1992 年也发现了产碱性普鲁兰酶的栖热菌菌株 *Thermus*。

1994年, Lee 等人^[49]从土壤中分离得到一株产耐热、耐碱 II 型普鲁兰酶的芽孢杆菌 *Bacillus* sp.XAL6-1。该普鲁兰酶同一活性位点同时具有 α -淀粉酶和普鲁兰酶活性, 产物为麦芽糖和麦芽三糖。

2002年, 马晓军等^[50]选育到一株高产稳定耐热的碱性普鲁兰酶生产菌株芽孢杆菌 *Bacillus* sp.SX-12。对该菌的原生质体经紫外诱变处理后, 酶活提高 2.8 倍。该普鲁兰酶最适作用温度 55℃、最适 pH10.0~10.5, 可应用于洗涤业作为添加剂。

2002年, Bertoldo 等^[51]对哥氏厌氧分支杆菌 *Anaerobranca gottschalkii* 基因测序发现该菌携带普鲁兰酶基因。对该基因进行重组克隆得出酶分子量 96KDa, 最适作用温度 70℃、pH8.0。此外, 闪烁杆菌 *Fervidobacterium pennivorans* 和栖热孢菌 *Thermotoga maritima* 也含有相似的普鲁兰酶基因。

1.3.2.2 普鲁兰酶主要产生菌株的酶学特性

见表 1.3 所示。

1.3.2.3 普鲁兰酶产生菌的同源性比较

用 MEGA version3.1(Kumar, Tamura, Nei 2004)对 20 株原核微生物所产普鲁兰酶的氨基酸序列与无乳链球菌 *Streptococcus agalactiae* 所产的常温普鲁兰酶、小麦的普鲁兰酶及 *Pseudomonas* sp.所产异淀粉酶进行序列同源比对 (图 1.6)。结果显示:

1) 部分酶序列同源性与菌种相关, 如栖热菌所产普鲁兰酶同源性较高, 可达 99%, 部分菌种如高温厌氧杆菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 与热产硫磺热厌氧杆菌 *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* 和芽孢杆菌的 *Bacillus thuringiensis* 与枯草

芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 同源性也可达 99%;

2) 部分酶序列虽来自不同类微生物,如来自 *Thermotoge maritima* 与 *F.pennivorans* 的普鲁兰酶, 然而酶同源性仍可达到 99%;

3) 普鲁兰酶的类型与序列同源性高低没有绝对的关系, 如 *A.gottschalkii* 的 I 型普鲁兰酶与 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 的 II 型普鲁兰酶同源性可达 86%;

4) 耐热普鲁兰酶序列与常温菌的序列差异不大, *S.agalactiae* 与 *Bacillus* sp.KSM-1876 的同源性高达 99%。而 *C. beigernecki* 与小麦的普鲁兰酶序列同源性有 54%;

5) 由序列分析可看出同为淀粉脱支酶的普鲁兰酶与异淀粉酶亦有较高同源性。

表 1.3 产普鲁兰酶主要菌株及其酶学特性

Table 1.3 The strains producing thermostable pullulanase and properties of enzymes

Strain	Class	Amino acid residue	Molecule weight/KDa	Optimum pH	Optimum T/°C	Reference
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i>	I	NA	NA	4.5	60	55
<i>B. subtilis</i> TU	I	718	NA	7.0~7.5	60	57
<i>B. stearothermophilus</i> TRS40	III	588	62	6.0	60~65	58
<i>B. flavorcaldarius</i> KP1228	I	475	55	6.3	75~85	59
<i>Bacillus</i> sp. XAL.601	II	NA	224.5	9	70	60
<i>B. circulans</i> F-2	II	NA	NA	4.6	75	61
<i>Bacillus</i> sp. SX-12	NA	NA	NA	10~15	55	63
<i>Thermus</i> sp. YT-1	I	NA	65	5.5	75	65
<i>T. caldophilus</i> GK-24	I	NA	65	5.5	75	66
<i>T. thermophilus</i> HB8	II	994	80	NA	70	67
<i>Thermoanaerobacter</i> sp. B6A	II	1481	440	5.0	75	71
<i>Anaerobranca gottschalkii</i>	I	865	96	8.0	70	72
<i>Pyrococcus furiosus</i>	II	NA	110	NA	98	73
<i>Thermococcus litoralis</i>	II	NA	119	NA	90	73
<i>P. woesei</i>	II	NA	90	6.0	100	74
<i>Desulfurococcus mucosus</i>	II	686	66	5.0	85	75

NA, not available

1.3.2.4 基因工程技术在普鲁兰酶研究上的应用

随着基因工程技术的发展, 从上世纪八十年代起, 利用基因工程技术改造菌种,

使低产菌成为高产菌并减少下游工艺的成本,也逐渐应用于普鲁兰酶的研究与开发中。1984年,日本科学家利用 RP4: Mucts 把 *Klebsiella aerogenes* 中的普鲁兰酶基因体内转移入大肠杆菌并得以有效表达,但最终得到的普鲁兰酶的酶活水平不高且表现型极不稳定。1985年 Takizawa 通过把普鲁兰酶基因克隆入多拷贝载体 pBR322,得到比野生菌株酶活水平高 20~40 倍的工程菌,此工程菌能保持高水平酶活力 14 天。

1999年, Teague W. Martin 等人从 *Bacillus naganoensis* (ATCC 53909) 中分离出了普鲁兰酶基因,并在枯草芽孢杆菌中得到了表达,所产生的重组普鲁兰酶在 60℃ 时测得最适反应 pH 为 5.01,在 pH 4.5 条件下测得最适温度为 62.5℃;在 pH 4.5, 60℃ 保温 55h 后仍有 50% 残余酶活,具有较好的热稳定性,因此该重组普鲁兰酶具有很好的应用特性^[52-53]。1998年 Kim 等^[54]从 *T. sp. Im6501* 中克隆到普鲁兰酶基因 (AF060205)。2001年, Kanae 等^[55] Im6501 基因序列为基础设计引物,从 *T. thermophilus* HB8 中克隆到普鲁兰酶基因 (AB054527),在 *E. coli* 中表达得到分子量为 80KDa 的普鲁兰酶,但其表达量较低。

近年来,基因工程在普鲁兰酶的研究进展速度大大加快,相继有许多普鲁兰酶基因被克隆、测序、在大肠和枯草杆菌中表达,但真正形成产业化的却并不多。目前已用于克隆和表达普鲁兰酶基因的微生物见表 1.4。

表 1.4 用于表达克隆和表达普鲁兰酶基因的微生物

Tab.1.4 Microbial sources for cloning and expression of the pullulanase genes

Origin of the cloned pullulanase gene	Expression system	Reference
<i>Bacillus naganoensis</i> ^[53]	<i>Bacillus subtilis</i>	18
<i>Desulfurococcus mucosus</i> ^[56]	—	19
<i>Bacillus acidopullulyticus</i> ^[57]	—	20
<i>Bacillus deramifacans</i> ^[57]	—	20
<i>Rhodotermus martnus</i> ^[57]	—	20
<i>Pseudomonas amyloclerana</i> ^[57]	—	20
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ^[58]	<i>Bacillus subtilis</i>	21
<i>Klebsiella</i> ^[59]	—	22
<i>Thermopjilic thermus</i> ^[60]	<i>Escherichia coli</i>	23
<i>Pyrococcus woesei</i> ^[60]	<i>Escherichia coli</i>	24
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i> ^[61]	<i>Escherichia coli</i>	25
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ^[62]	<i>Escherichia coli</i> & <i>Bacillus subtilis</i>	26
<i>Thermus sp. AMD-33</i> ^[63]	<i>Escherichia coli</i> & <i>Bacillus subtilis</i>	27
<i>Thermoanaer obiumbrockii</i> ^[63]	<i>Bacillus subtilis</i>	28
<i>Bacillus sp. KSM137</i> ^[64]	<i>Bacillus subtilis</i>	29

从以上这些资料数据可以看出,关于基因工程技术在普鲁兰酶研究领域的应用很多,这证实运用基因工程手段来提高普鲁兰酶产量是有效果的。至今我国虽已有从微生物中克隆出普鲁兰酶基因,构建基因工程体系,得到新的普鲁兰酶的报道^[65],但仍然没有在工业上的运用。综上所述,从目前普鲁兰酶的应用和研究现状来看,以后研究和发展的方向主要有以下三个方面:

- 1) 通过构建基因工程菌株,提高酶的产量和活性,降低生产成本,实现普鲁兰酶的产业化;
- 2) 利用定点突变技术提高其应用方面的酶学特性,如改变其对底物的亲和性、pH 适性和耐热特性等;
- 3) 从工业应用方面来看,目前普鲁兰酶主要是在以淀粉为原料的淀粉糖和酿造行业中应用广泛,因此高活性液体普鲁兰酶的开发具有巨大的市场。

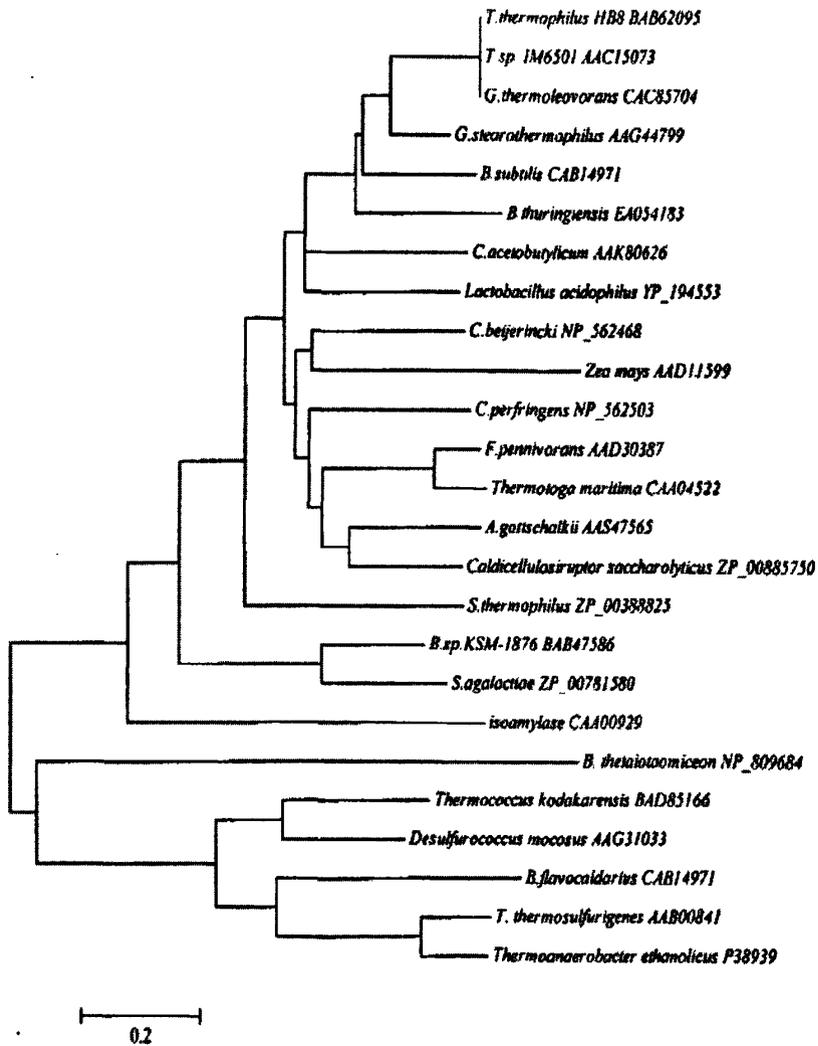


图 1.6 耐热普鲁兰酶蛋白氨基酸序列进化树

Fig1.6 N-J common dermatophytes of thermostable pullulanase

1.4 普鲁兰酶的应用^{[3][7]}

由于普鲁兰酶能够专一性地切开支链淀粉分支点中的 α -1, 6 糖苷键, 剪下整个侧支后形成直链淀粉, 因此该酶最早应用在淀粉、糖原及其它有关化合物细微分子结构等领域的理论研究。近年来, 普鲁兰酶作为脱支酶类中的一个重要新酶种, 应用于以淀粉为原料的食品等工业部门, 大规模地提高了淀粉的利用率和生产效率。普鲁兰酶可以单独使用, 亦可与其它酶配合使用, 能达到更好的效果。

1.4.1 普鲁兰酶使支链淀粉变为直链淀粉

直链淀粉具有凝结成块、易形成结构稳定凝胶的特性, 可作为强韧的食品包装薄膜, 这种薄膜对氧和油脂有良好的隔绝性, 且涂布开展性好, 适合于作为食品的保护层。其醋酸衍生物又可作为纺织纤维, 还用于浆纱、纤维上光以及作为胶粘剂、包扎材料等。直链淀粉还适合于淀粉软糖制造, 也可用作果酱增稠剂以及肉食品加工。随着环境的日益恶化, 在食品工业中提倡使用可被生物降解的薄膜, 直链淀粉在这些方面也具有较大的发展前途。一般谷物淀粉中, 直链淀粉含量仅占 20%, 支链淀粉含量约为 80%, 工业上每生产 1 吨直链淀粉就有 4 吨副产品的支链淀粉。美国虽然通过遗传育种的方法得到含直链淀粉 60% 的玉米新品种, 但不适于大田生产。国外已采用普鲁兰酶, 使支链淀粉变为直链淀粉。据报道, 采用此法收得率可达 100%^[27]。

1.4.2 普鲁兰酶与 β -淀粉酶配合使用生产麦芽糖

高浓度麦芽糖浆具有不易结晶, 吸湿性小等特点, 在食品工业中有着广泛的用途。此外, 高浓度麦芽糖浆还可用于医药上作为糖尿病和肝病患者以及手术后的营养补给品。为获得高纯度的麦芽糖, 以前常用的方法是先用细菌 α -淀粉酶进行液化, 再用麦芽中的 α -淀粉酶进行糖化, 然后再向其中加入乙醇以除去极限糊精使麦芽糖结晶, 但是成本高, 收率仅为 30%。而用普鲁兰酶与 β -淀粉酶配合使用, 能提高底物的水解程度, 提高麦芽糖的产率, 有利于生产麦芽糖浆, 麦芽糖收率可达到 70% 以上。

1.4.3 用于啤酒外加酶法糖化

在啤酒酿造的糖化过程中, 麦芽是酿造啤酒的主要原料, 麦芽中提供的分解淀粉 α -1, 4-糖苷键是 α -淀粉酶、 β -淀粉酶和分解淀粉 α -1, 6-糖苷键的 R-酶(植物普鲁兰酶)。在工业生产中为了节约麦芽用量, 采用外加酶法糖化, 即在减少麦芽用量的前提下, 增加淀粉质辅助原料的比率, 并加入适当种类的酶制剂进行糖化。要使大麦及其他原料完全糖化, 需要外加 α -淀粉酶和能够分解 α -1, 6-糖苷键的普鲁兰酶等制剂。如果分解淀粉 α -1, 6-糖苷键的酶活性不足, 淀粉分解就不完全, 其结果是可发酵性糖含量低, 制成的啤酒发酵度达不到要求。采用普鲁兰酶与 α -淀粉酶协同作用, 效果较好, 其分解产物主要是麦芽糖和少量麦芽多糖。啤酒外加酶法糖化工艺已在世界范围内被广泛接受, 普鲁兰酶的使用能完全分解原辅料中的淀粉, 降低麦芽汁 β -极限糊精含量, 大幅度提高发酵度。

世界范围内被广泛接受,普鲁兰酶的使用能完全分解原辅料中的淀粉,降低麦芽汁 β -极限糊精含量,大幅度提高发酵度。

近年兴起的干啤酒的主要特色就是发酵度高,一般在72%以上,苦味低,日味淡爽,原麦汁浓度低,比较符合大众消费口味。而要获得如此高的发酵度,必须提高麦汁中可发酵性糖的含量,由于大麦中有45%~50%的支链淀粉,有较多的 α -1,6糖苷键,必须加脱支酶才能有效地提高麦汁中可发酵性糖含量。由于由细菌发酵得到的异淀粉酶和由根霉及黑曲霉产生的糖化酶它们的应用条件不符合麦汁生产和干啤酒的酿造,所以在麦汁生产和干啤酒的酿造过程中一般要加普鲁兰酶才行。该酶一般在糖化时加入1.5%(V/W),通过外加酶制剂协同糖化后可得到麦汁极限发酵度大于78%的10度麦汁,配合使用高发酵度的啤酒酵母,可以酿造出优级干啤酒。因此,普鲁兰酶在干啤酒生产中得到了很好的应用,具有广阔的应用前景。

1.4.4 普鲁兰酶与其它淀粉酶配合使用

普鲁兰酶可和除 α -淀粉酶以外的其它淀粉酶配合使用,也得到了良好的效果。如与糖化型淀粉酶配合使用,使淀粉糖化完全。将液化后的每克淀粉添加11单位糖化型淀粉酶和3单位普鲁兰酶,可以生成99.1%的D-葡萄糖。另外也可将普鲁兰酶用于酒精工业提高淀粉出酒率。我国目前以淀粉为原料生产酒精的工厂,大都用甘薯为原料。甘薯原料的淀粉大约由20%直链淀粉和80%支链淀粉所组成,因此在酒精发酵中加入普鲁兰酶,可使淀粉发酵率提高1%-3%,淀粉出酒率提高1.2%。

1.4.5 普鲁兰酶在高葡萄糖浆生产中的应用^[66]

高转化率的葡萄糖浆可用来生产结晶葡萄糖,也可作为高果糖浆的原材料。七十年代,全酶法水解淀粉成葡萄糖的生产发展很快,全世界葡萄糖浆的年产量约为300万吨,但是因为糖化酶对淀粉的 α -1,6糖苷键作用速度较慢,从而影响淀粉的最终水解度。虽然降低淀粉浆浓度或增加糖化酶量都能提高淀粉的水解度,但前者必将影响企业效益,后者不仅会增加成本而且会导致葡萄糖聚合生成异麦芽糖。加入普鲁兰酶既能提高 α -1,6糖苷键的水解速度,降低糖化酶用量,也不会发生聚合反应。由酶法生产葡萄糖后,该产物可进一步转化为葡萄糖醇、葡萄糖酸等一系列衍生物,可使该酶在医药领域大显身手。

1.4.6 普鲁兰酶在改性淀粉食品生产中的应用^[67-68]

近年来随着经济的发展和人民生活水平的提高,人们对淀粉制品的品质提出了越来越高的要求,通过各种方法对淀粉进行改性以改良淀粉品质一直是科技工作者和生产厂家的研究热点。

1.4.2.1 抗消化淀粉生产中的应用

抗消化淀粉(resistant starch 或 enzyme-resistant starch, RS),又称抗酶解淀粉或抗性淀粉,是指不能在人体小肠中消化吸收,但在结肠内可被微生物发酵利用的那部分

淀粉。抗消化淀粉对人体血糖水平、肥胖、癌症、脂质代谢和能量等方面有重要生理功能。因此被广泛应用于碳水化合物、脂肪食品、低脂人造奶油等，或作为一种单独的添加剂加入功能性食品配方中。国外已有工业化生产的抗消化淀粉产品问世。目前，国内外报道的抗消化淀粉生物制备主要采用酶脱支降解。用普鲁兰酶将马铃薯淀粉、玉米淀粉或甘薯淀粉进行处理后再经糊化老化处理可增加抗消化淀粉的含量。

1.4.2.2 歧化环糊精生产中的应用

环糊精(cyclodextrin, CD)是由淀粉在生物酶的作用下降解所产生的一种由多个D-吡喃型葡萄糖通过 α -1, 4-糖苷键连接的环状低聚糖化合物。但环糊精和其包接化合物的溶解性较差,影响了该产品的应用。利用普鲁兰酶的转移和缩合作用将麦芽糖基等与环糊精以 α -1, 6-糖苷键相连,得到改性后的歧化环糊精,可改善其溶解性。Shiraishi等研究了普鲁兰酶逆向合成歧化环糊精的条件,普鲁兰酶用量(100-200)U/gCD, pH4.0-4.5, 温度60℃-70℃,各种环糊精的转化率都超过40%。Sakano等报道的固定化普鲁兰酶连续生产歧化环糊精,不仅能连续生产提高酶的使用效率,而且能减少酶的分离程序,提高产品的品质。

1.4.2.3 缓慢消化淀粉

缓慢消化淀粉(slowly digestible starch, SDS)指那些能在小肠中被完全消化吸收但速度较慢的淀粉,主要指一些生的未经糊化的淀粉。缓慢消化淀粉具有特殊的生理功能,如缓慢吸收、持续释放能量、有助于维持血糖稳态,预防和治疗各种疾病。因此,缓慢消化淀粉可应用于开发特定保健食品、热量持续型运动饮料等产品。缓慢消化淀粉由大部分无定形成分和小部分有序结构的双螺旋成分构成,所以淀粉经过普鲁兰酶处理后产生更多的短链,他们通过氢键与疏水作用进行排列和交连,聚集形成结晶结构即产生缓慢消化淀粉。Guraya H S等采用普鲁兰酶脱支处理大米淀粉可最大限度得到缓慢消化淀粉,其制备工艺为每100g蜡质淀粉用10g普鲁兰酶脱支处理4h后在1℃储藏。王萍等研究了采用普鲁兰酶脱支处理制备大米缓慢消化淀粉工艺,缓慢消化淀粉含量达到58g/100g。

1.4.7 普鲁兰的其他用途

此外,普鲁兰酶在研究燃料乙醇发酵^[69]与多糖合成有关酶的作用机制^[7]方面也是十分有效的工具。总之,普鲁兰酶无论作为酶制剂还是食品工业的加工助剂均有广阔的发展前景。总之,普鲁兰酶无论作为酶制剂还是食品工业中的加工助剂均有广阔的发展前景。当前已较成熟地应用于高葡萄糖浆、高麦芽糖浆和干啤酒生产中。在其它领域(医药等)亦有应用的报道。

1.5 研究目的及意义

自上世纪70年代起,酶制剂产业经历了近半个世纪的发展,现已形成一个富有活力的高新技术产业。过去10年里,国际酶制剂产业的生产技术发生了根本性的变

化,以基因工程和蛋白质工程为代表的分子生物学技术的不断进步和成熟,以及对各个应用行业的引入和实践,把酶制剂产业带入了一个全新的发展时期。伴随着全球经济一体化的经济浪潮,世界生物技术产业也在全球范围内进行着产业结构和产品结构的调整,世界酶制剂产业表现活跃。

淀粉酶作为一类酶制剂不仅在我国,而且在世界上都拥有巨大的应用价值,尤其是近年来随着生物质能开发的兴起,以淀粉为原料生产乙醇等工业中应用广泛。然而我国的淀粉酶开发并不完善,虽然对 α -淀粉酶、 β -淀粉酶以及葡萄糖淀粉酶等的研究开发已经有了较高的水平,但对于脱支酶尤其是普鲁兰酶的研究水平仍不够深入,使其工业化应用受到了极大的限制。到目前为止,我国使用的普鲁兰酶都需从国外进口。全世界仅有丹麦 Novo 公司的 *Bacillus acidopullulyticus* 和美国 Genencor 公司的 *B. deramificans* 等少数几个菌的工业化生产工艺报道。Novo 公司生产的商品名为 Promozyme 的酶制剂,该产品占领了中国乃至世界 95% 以上的市场份额。

因此,为了改变对进口产品的依赖,填补我国这一领域的空白,寻找一条国产化的道路。本实验研究的目的在于利用海南丰富的微生物资源,筛选出高产的普鲁兰酶菌株,对酶进行分离纯化,测定酶学性质,并对菌株进行了初步鉴定,旨在为克隆到良好性能的普鲁兰酶基因并将其用于高产基因工程菌做前期准备。

1.6 研究内容

- 1) 产普鲁兰酶菌株的筛选及产酶条件的优化;
- 2) 菌株所产普鲁兰酶的纯化;
- 3) 酶学性质的研究;
- 4) 菌种的初步鉴定。

第二章 普鲁兰酶产生菌的筛选及产酶条件的优化

菌种是工业发酵生产酶的重要条件。因此,筛选到产量高的菌种对以后的研究有着重要的意义。海南岛是我国生物多样性极为丰富的热带地区,有热带雨林,红树林自然保护区以及海洋资源,还有许多高温的温泉,如蓝洋,南田,七仙岭等,这为产耐热普鲁兰酶菌株的筛选提供了有利的条件。

2.1 材料与方法

2.1.1 分离样品来源

本研究所用的土样和水样,取自海口,儋州,三亚等地的农田,温泉以及海水中,共采集样品 47 份。

2.1.2 试剂与设备

普鲁兰糖 (Pullulan), 支链淀粉, Sigma 公司; 可溶性淀粉, 蛋白胨, 酵母膏, 酵母粉, 上海生工; 3, 5-二硝基水杨酸, 广东光华化学厂有限公司; 琼脂粉, 广东环凯微生物科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。

实验仪器和设备: 灭菌锅 (HVE, 日本 Hirayama 公司); 高速冷冻离心机 (Sigma2-16, 德国 Sigma 公司); 精密数显酸度计 (Delta320-S, 上海梅特勒-托利多仪器厂); 电子天平 (AR2140, 奥豪斯国际贸易有限公司); 数字显示电热培养箱 (宁波海曙赛福实验仪器厂); 高压蒸汽灭菌锅 (HVE, 日本 Hirayama 公司); 自动双重纯水蒸馏器 (1810B, 上海晶凌玻璃有限公司); 恒温摇床 (HQ45HYA, 中国科学院武汉科学仪器厂); 水浴锅 (LVF6, Grant Instruments(Cambridge)Ltd); 电热恒温干燥箱 (Q/BKYY31-2000, 上海跃进医疗器械厂)、无菌操作台 (FD-01, 苏州净化设备厂); 紫外分光光度计 (Spectrumlab 53 Power, 中国 Leng Tech 公司); 无菌操作台 (FD-01, 苏州净化设备厂)。

2.1.3 主要试剂的配制

DNS 试剂: 称取酒石酸钾钠 122.1674g, 放入 400ml 去离子水中, 加热溶解后再加入 3, 5-二硝基水杨酸 3.15g, 继续加热溶解后加入氢氧化钠 10.5g, 加热溶解后加入苯酚 2.5g, 加热溶解加入 $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.9972g(期间加热温度控制在 60°C 以内), 冷却后去离子水定溶至 500ml, 贮于棕色瓶中避光保存, 放置 2 周后使用。

碘试剂: 称取 2.2g 碘、4.4g 碘化钾, 用去离子水将其完全溶解后定溶至 100ml, 贮于棕色瓶中避光保存。

普鲁兰糖溶液 (0.5%): 称取普鲁兰糖 0.50g, 加入 90ml 去离子水, 充分溶解后定溶至 100ml。

磷酸缓冲溶液 (pH6.0、0.2M 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液): 将配制好的 0.2M 磷酸氢二钠和磷酸二氢钠溶液以 12.3:87.7 比例混合。

2.1.4 培养基配制

分离培养基: 糯米淀粉25.0g, 蛋白胨5.0g, 酵母膏5.0g, KH_2PO_4 0.5g, K_2HPO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, 琼脂25.0g, 加水定溶至1000 ml, pH6.0。

鉴别培养基: NaCl 2.0g; 酵母膏2.0g; 蛋白胨10.0g; 红色普鲁兰糖3.0g; 琼脂 25.0g; pH 7.0。

保藏培养基: 同分离培养基成分;

种子培养基: 蛋白胨10.0g, 牛肉膏3.0g, NaCl 5.0g, 加水溶定溶至1000 ml, pH6.0。

发酵培养基: 玉米淀粉20.0g, 酵母膏10.0g, KH_2PO_4 1.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, FeSO_4 0.01g, 加水定溶至1000 ml, pH6.0h。

培养基灭菌条件: 高压蒸汽灭菌锅 121℃, 灭菌 20min。

2.1.5 分离方法

2.1.5.1 土壤样品的预处理

各样品在采集时均用无菌的塑料袋或塑料小瓶封装, 编号登记后, 4℃保存。

2.1.5.2 菌种的分离及筛选

2.1.5.3 产酶菌株的分离与初筛

具体步骤如下:

- 1) 称取土样 5g 至 45ml 无菌生理盐水中, 加入玻璃珠充分震荡后静置 1 小时;
- 2) 取土样上清液和水样 100 μ l 于试管中, 做梯度稀释, 取适宜稀释度涂板, 于电热恒温培养箱中 30℃培养 48h;

- 3) 在分离平板中滴加浓度为 1% 的碘液适量, 挑取有透明圈者, 划线分离纯化, 30℃培养 24h;

- 4) 把有透明圈的菌株转入鉴别培养基, 于温箱中培养 48h 后, 把在红色普鲁兰板上能产生分解圈的菌株, 挑选出继续纯化两次, 作为复筛对象。

2.1.5.4 菌种的保藏

从 30℃条件下培养 3 天的平板上挑细菌的单菌落接种于分离培养基相同的斜面上作菌种的初步保藏。

2.1.5.5 产酶菌株的复筛

将初筛得到的纯化后的菌种, 用牙签少量挑取, 加入装有 20ml 种子培养基的三角瓶中于 30℃的温度培养 16 小时。再将种子培养液倒入装有 40ml 发酵培养基的三角瓶中, 置于回转式恒温调速摇瓶柜中进行好氧发酵, 转速为 200r/min, 30℃发酵 48h, 测定发酵液中普鲁兰酶活力。

2.1.6 普鲁兰酶活力的测定

2.1.6.1 DNS 比色法原理^[70]

还原糖是指含自由醛基或酮基的单糖(如葡萄糖)和某些具有还原性的双糖(如

麦芽糖)。它们在碱性条件下,可变成非常活泼的烯二醇。遇氧化剂时,具有还原能力,烯二醇本身则被氧化成糖酸及其他产物。

黄色的 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂与还原糖在碱性条件下共热后,自身被还原为棕红色的 3-氨基-5-硝基水杨酸。在一定范围内,反应液里棕红色的深浅与还原糖的含量成正比,在波长为 540nm 处测定溶液的吸光度,查对标准曲线并计算,便可求得样品中还原糖的含量。

2.1.6.2 葡萄糖标准曲线的制作

取 7 支 20ml 具塞刻度试管编号,按表 2.1 分别加入浓度为 1mg/ml 的葡萄糖标准液、蒸馏水和 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂,配成不同葡萄糖含量的反应液。将各管摇匀,在沸水浴中准确加热 5min,取出,冷却至室温,用蒸馏水定容至 20ml,加塞后颠倒混匀,在分光光度计上进行比色。调波长 540nm,用 0 号管调零点,测出 1-6 号管的光密度值。以光密度值为纵坐标,葡萄糖含量(mg)为横坐标,绘出标准曲线。

表 2.1 葡萄糖标准曲线制作

Table 2.1 Glucose standard curve

管号	1mg/ml 葡萄糖标准液 (ml)	蒸馏水(ml)	DNS(ml)	葡萄糖含量(mg)	光密度值 (OD _{540nm})
0	0	2	1.5	0	
1	0.2	1.8	1.5	0.2	
2	0.4	1.6	1.5	0.4	
3	0.6	1.4	1.5	0.6	
4	0.8	1.2	1.5	0.8	
5	1.0	1.0	1.5	1.0	
6	1.2	0.8	1.5	1.2	

2.1.6.3 普鲁兰酶活力的测定方法

取发酵液 5000r/min 离心 10 分钟后得到上清酶液,于洁净试管中加入 0.5%的普鲁兰糖溶液 1ml 和 pH 6.0 的磷酸缓冲液 1ml,60℃水浴预热 5 分钟,然后加入酶液 1ml,60℃水浴中保温 30min。取出加入 1.5 mlDNS 试剂(过量),沸水浴 5min 显色,之后流水冷却,测定 OD₅₂₀ 根据标准曲线计算反应生成的还原糖量。各溶液加入顺序及对照、空白加入顺序见表 2.2。

酶活定义:在 60℃条件下作用,每分钟产生的相当于 1 μ mol 葡萄糖还原力的酶活定义为一个酶活单位。酶活力计算公式:

$$\text{酶活} = \frac{(\text{OD}_A - \text{OD}_B) \times 4.5 \times C}{180 \times 30 \times 10^{-3}}$$

4.5: 反应体系体积, ml

C: 标准曲线中斜率

180: 葡萄糖分子量, g/mol

30: 反应所用时间, min

10⁻³: 单位换算倍数

比活力定义: 每 mg 酶蛋白所具有的酶活力单位数。

$$\text{比活(U/mg)} = \frac{\text{酶活(U/ml)}}{\text{溶液蛋白浓度(mg/ml)}}$$

表 2.2 普鲁兰酶活力检测方法

Tab2.2 The method of pullulanase activity decetion

Solution	SampleA	SampleB	Control
NaHPO ₄ -NaH ₂ PO ₄ pH6.0/ml	1	2	2
0.5% pullulan/ml	1	-	1
	60°C pre-heating for 5min		
Fermentation broth/ml	1	1	-
	60°C pre-reacting for 30min		
DNS solution/ml	1.5	1.5	1.5

Reacting in boiling water for 5min, cool down, detect OD_{520nm}

Calculate the enzyme activity according to the glucose criterion curve

2.1.7 BCT-1 摇瓶产酶条件的优化

2.1.7.1 优化实验前的单因素实验

2.1.7.1.2 不同碳源对产酶的影响

在发酵培养基中加入 2.5%的不同碳源, 保持其他成分不变, 在相同的培养条件下摇瓶发酵, 检测菌株 BCT-1 的产酶情况

2.1.7.1.3 最佳碳源浓度对产酶的影响

将碳源的浓度设定为 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 其他成分不变,

测定碳源浓度对产酶的影响。

2.1.7.1.4 不同氮源对产酶的影响

为了研究氮源对产酶的影响，分别选取了几种常用的无机和有机氮源进行研究。

2.1.7.1.5 最佳氮源浓度对产酶的影响

将氮源的浓度设定为 0.5%，0.75%，1%，1.25%，1.5%，1.75%，2%，其他成分不变，测定氮源浓度对产酶的影响。

2.1.7.1.6 培养基初始 pH 对产酶的影响

在碳氮源优化的基础上，将发酵培养基的初始 pH 调为 4.0，4.5，5.0，5.5，6.0，6.5，7.0，7.5，8.0，分别接入相同量的菌种，在同一条件下进行发酵培养，测定产酶水平。

2.1.7.1.7 培养温度对产酶的影响

在前优化的基础上，配制发酵培养基，不同的温度下进行发酵产酶，测定酶活。

2.1.7.1.8 接种量对产酶的影响

在 500ml 的三角瓶中，装入 150ml 上述优化发酵培养基，接入种子液，每 100ml 培养液接种量分别为 4ml，6ml，8ml，10ml，12ml，14ml，16ml，18ml，在同一条件下进行发酵培养，测定其对产酶的影响。

2.1.7.1.9 摇瓶装液量对产酶的影响

在 500ml 的三角瓶中分别装入 50ml，100ml，150ml，200ml，250ml 的上述优化发酵培养基，接入菌种同量菌种，在同一条件下进行培养，测定其对产酶的影响。

2.1.7.1.10 摇床转速对产酶的影响

分别在 120r/min，150r/min，180r/min，200 r/min，220r/min 转速以及静止培养条件下进行摇瓶发酵培养，保持其他培养条件不变，测定其对产酶的影响。

2.1.8 响应面(RSA)优化实验

Box及其合作者于20世纪50年代提出并完善了响应面分析法(Response Surface Analysis, RSA)^[71]，该法是将试验分析和数学建模相结合后形成的最经济合理的实验设计。采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系，通过对回归方程的分析把因子与试验结果（响应值）的关系函数化，以此对因子进行面分析，研究因子与响应值之间、因子与因子之间的相互关系，来寻求最优工艺参数，弥补了以前在微生物培养基优化方面的不足，是解决多变量问题的一种统计方法。它以回归法作为函数恒算工具，通过多项式近似，RSA在优化实验研究中应用频繁，是降低开发成本、优化加工条件、提高产品质量、解决生产过程中等实际问题的一种有效方法，它已广泛地应用于农业、生物、食品、化学、制造等领域^[72]。

2.2 结果与分析

2.2.1 平板筛选

本研究从海南各地区采集土样和水样共计 47 份，经过含有糯米淀粉的培养基平板的初筛，选取与碘液反应出现兰色透明圈(图 2.1)的菌株，共计 85 株。然后接种入鉴别培养基平板，筛选得到 62 株能分解红色普鲁兰糖(部分酶活力检测结果表 2.1)，出现白色透明圈(图 2.2)的菌株。通过 DNS 法检测酶活力后，选择酶活力较高的菌株 BCT-1 作为后期研究的对象。



图 2.1 淀粉平板筛选

Fig2.1 The blue transparent halo in starch medium

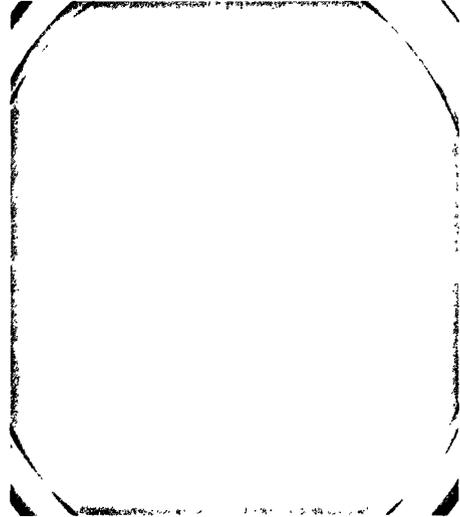


图 2.2 红色普鲁兰糖平板筛选

Fig2.2 The transparent halo in red medium

2.2.2 葡萄糖标准曲线

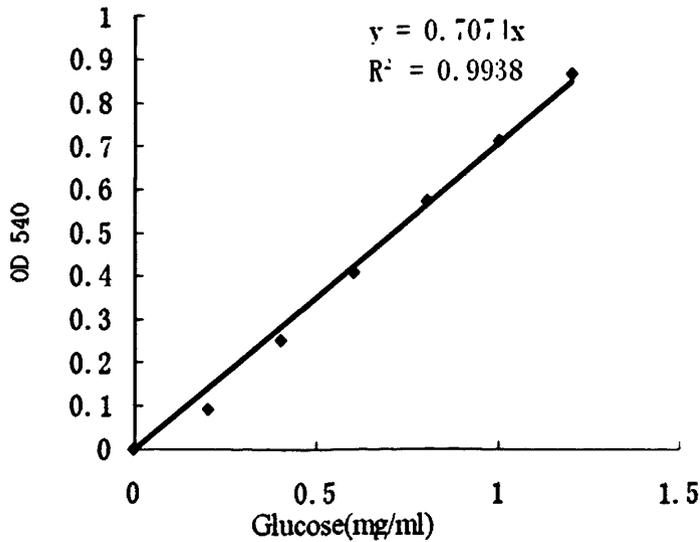


图 2.3 葡萄糖标准曲线

Fig2.3 Glucose criterion curve

表 2.1 初筛出菌株的酶活力检测结果

Table 2.1 The results of the enzyme activity of the pre-screened strains

编 号	酶活 U	编 号	酶活 U	编 号	酶活 U
18-5-1	0.050697	20-2	0.1184895	23-2	0.088425
12-1	0.020043	25-4	0.17685	93 度-1	0.4403565
4-4	0.0784035	21-1	0.209862	24-4	0.005895
14-2	0.001179	LGJ-5	0.024759	21-2	0.0135585
29-1	0.049518	60 度	0.1809765	11-2	0.07074
29-3	0.04716	29-3	0.010611	4-2	0.173313
27-3-2	0.050697	17-6-1	0.0159165	1-4	0.1102365
17-7-2	0.1786185	C 水-32	0.001179	11-3	0.055413
LGJ-4	0.107289	19-2	0.104931	30-4	0.185103
23-4	0.033012	22-4-2	0.0182745	10-3	0.020043
27-3-1	0.0041265	3-2	0.0795825	7-4	0.189819
4-5	0.001179	12-2	0.323046	10-2	0.136764
6-2	0.0784035	20-1	0	9-1	0.036549
22-4-1	0.135585	93 度-2	0.205146	9-3	0.0300645
8-3	0.0784035	17-3-2	0.0005895	30-3	0.1397115
14-1	0.073098	6-3	0.1267425	26-1	0.319509
21-1-12	0.0206325	12-4	0.1656495	BCT-1	0.357237
21-3	0.089604	21-3	0.0501075	23-2	0.088425
11-1	0.1161315	8-1	0.0418545	93 度-1	0.4403565
26-2	0.2210625	20-2	0.1184895	24-4	0.005895
4-3	0.020043	25-4	0.17685	21-2	0.0135585
21-1-2	0.017685	21-1	0.209862	11-2	0.07074
18-1	0.0277065	LGJ-5	0.024759	4-2	0.173313
11-3	0.055413	60 度	0.1809765	1-4	0.1102365
30-4	0.185103	30-3	0.1397115	24-4	0.005895
10-3	0.020043	26-1	0.319509	21-2	0.0135585
7-4	0.189819	BCT-1	0.357237	11-2	0.07074
10-2	0.136764	23-2	0.088425	4-2	0.173313
9-1	0.036549	93 度-1	0.4403565	1-4	0.1102365

2.2.3 摇瓶产酶条件的优化

2.2.3.1 优化实验前的单因素实验结果

2.2.3.2 碳源对产酶的影响

碳源是培养基的主要组成成分之一,是菌体生长所需要的能量以及菌体产生的代谢产物中的碳素主要来源。在发酵过程中常用的碳源包括葡萄糖、木糖、果糖等单糖,蔗糖、麦芽糖等寡糖以及淀粉、糊精等多糖等糖类。不同微生物对碳源的需求不同,碳源的种类和浓度对产物的形成也有不同影响^[73]。

2.2.3.2.1 碳源种类对产酶的影响

为了寻找最适宜菌种生长且利于后期产酶的发酵培养基成分,本实验首先比较了几种碳氮源对菌种生长及产酶的影响。所选的碳源有可溶性淀粉、糊精、菊粉、糯米粉、葡萄糖、蔗糖、支链淀粉、普鲁兰糖、马铃薯淀粉、玉米淀粉、玉米粉和乳糖,将同量的菌种接入不同成分的发酵培养基,发酵 48h,其结果如图 2.4 所示。

粉、葡萄糖、蔗糖、支链淀粉、普鲁兰糖、马铃薯淀粉、玉米淀粉、玉米粉和乳糖，将同量的菌种接入不同成分的发酵培养基，发酵 48h，其结果如图 2.4 所示。

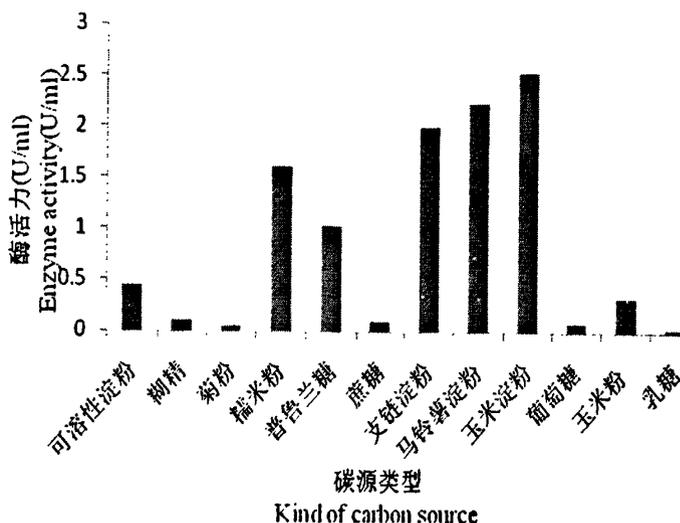


图2.4 碳源对产酶的影响

Fig.2.4 The effect of carbon source on enzyme production

从图2.4可以看出，玉米淀粉是所选的几种碳源中最利于产酶的。因此，玉米淀粉是产普鲁兰酶的最佳碳源，其次是马铃薯淀粉，支链淀粉，糯米粉。

2.2.3.2.2 玉米淀粉初始浓度对产酶的影响

碳源是发酵培养基中的主要物质，是构成细胞物质碳架的基础。从图2.5可以看出。当浓度从10g/L~20g/L时，普鲁兰酶酶活随着玉米淀粉浓度的增加而增大，当玉米淀粉浓度为20g/L时，产酶达到最大。当玉米淀粉的浓度超过20g/L后，随着浓度的增加酶活力逐渐降低。

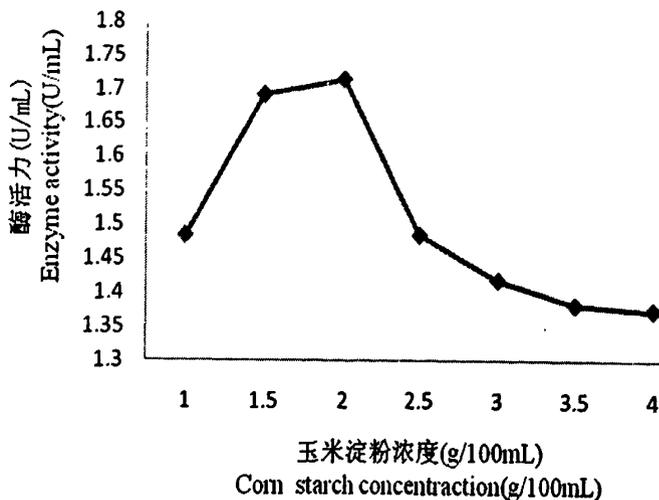


图2.5 玉米淀粉浓度对产酶的影响

Fig.2 .5 Effect of corn starch concentration on enzyme production

2.2.3.3 氮源对产酶的影响

微生物细胞物质中所含的氮素和含氮次生代谢产物中的氮素主要来源于培养基中的氮源，氮源分为两类：有机氮源和无机氮源。常用的有机氮源有黄豆粉、玉米浆粉、豆饼粉、酵母膏、鱼粉、酵母粉等，它们含有大量蛋白质和氨基酸以及少量其他营养物质，因此微生物在含有有机氮源的培养基中生长较快且旺盛。常用的无机氮源主要有铵盐和硝酸盐等。虽然菌体对无机氮源的吸收比有机氮源快，但是当其被利用后，会引起培养环境pH值的改变。

2.2.3.3.1 氮源类型对产酶的影响

不同的微生物利用氮源的种类和能力有所不同^[74-75]。本实验以 20g/L 的玉米淀粉为碳源，其余培养基成分同上，分别加入 10g/L 的牛肉膏、黄豆粉、酵母粉、酪蛋白、蛋白胨、酵母膏、豆饼粉、玉米浆粉、硫酸铵、氯化铵、硝酸铵和乙酸铵为氮源。结果如图 2.6。

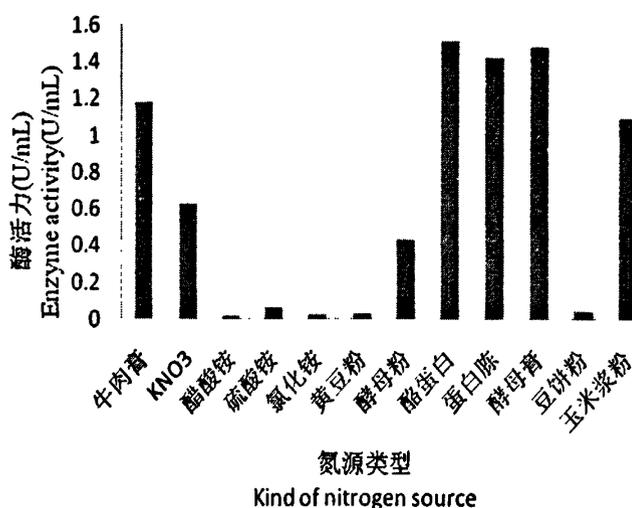


图2.6 氮源对产酶的影响

Fig.2.6 The effect of nitrogen source on enzyme production

由图 2.6 可知酪蛋白对产酶的效果最佳，酵母膏稍低，但是由于酪蛋白价格较高，不利于以后的工业生产运用，因此选择价格相对较低的酵母膏作为发酵培养基的最佳氮源，同时还可以看出以有机氮源产酶效果明显比无机氮源产酶效果好。

2.2.3.3.2 酵母膏初始浓度对产酶的影响

在发酵培养基的配制过程中，氮源的加入量不足，会导致菌体的繁殖量较少，从而影响产物的产量；但氮源加入量过多，会使菌体的生长过于快速和旺盛，不利于代谢产物的积累。

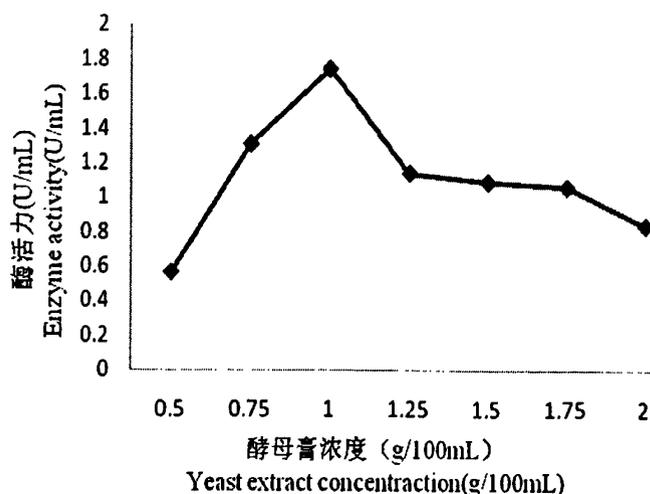


图2.7 酵母膏浓度对产酶的影响

Fig.2.7 Effect of Yeast extract concentration on enzyme production

由图2.7可以看出酵母膏浓度为10g/L时产酶最高。而其浓度小于10g/L时，产酶下降很快，是由于添加的酵母膏浓度较少时，菌体生长很微弱，所以在缺少足够的菌体时普鲁兰酶的形成也受到了很大的抑制。当酵母膏浓度增大时，有利于菌体的生长，但过多的酵母膏可能其中的其它成分对普鲁兰酶的合成代谢起到了负面作用，使产酶水平下降。因此，最佳氮源初始浓度为10g/L。

2.2.3.4 发酵初始 pH 对产酶影响的结果

pH 对微生物生长和产物合成的非常重要，是影响发酵过程中各种酶活的重要因素^[76]，pH 对微生物生长、繁殖和产物形成的影响主要表现在以下几方面：1) pH 值能够使微生物细胞原生质膜的电荷发生改变，从而影响微生物对营养物质吸收，代谢产物的生成，从而影响整个新陈代谢过程。2) pH 直接影响酶的活性^[77]。pH 影响培养基中某些重要营养物质的营养成分的结构，从而影响微生物对其的利用。3) pH 的改变往往引起菌体代谢途径的改变，使代谢产物发生变化。

若 pH 不当，会严重影响菌体的生长和产物的合成。所以，在发酵时需要调控发酵液的 pH，使其在适应的 pH 下提高普鲁兰酶的产量。

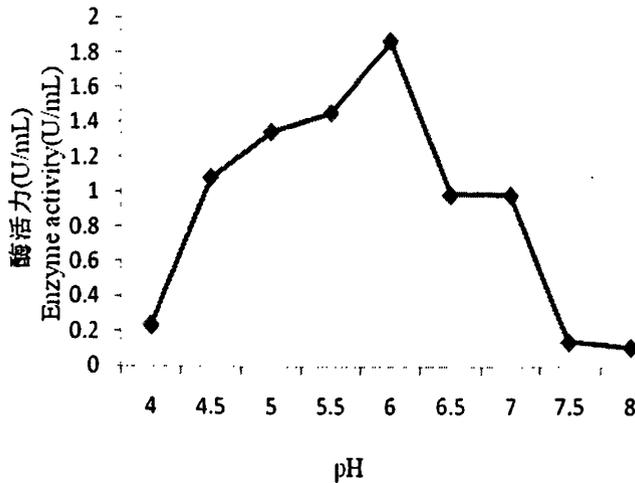


图2.8 发酵初始pH对酶活力的影响

Fig.2.8 The effect of initial pH culture medium on enzyme production

大多数微生物都有最适 pH 范围以及变化的上下限,若是超过其上限或下限,微生物可能无法忍受而自溶。本实验将培养基的初始 pH 值调至 4.0~8.0,比较发酵液中的普鲁兰酶的活性。如图 2.8 所示, pH 值在 4.0~6.0 的范围内,普鲁兰酶活性随着 pH 的升高而增加;当 pH 值超过 6.0 后,普鲁兰酶活性急剧下降。所以,选择发酵培养基的初始 pH 为 6.0。

2.2.3.5 发酵温度对菌体生长的影响

微生物的生长和产物的合成都是在各种酶催化下进行的,温度不仅能够影响各种酶反应的速率,还能改变某些蛋白质的性质。且温度对发酵液的粘度,基质分解和吸收速度以及氧在发酵液中的溶解度都有较大的影响^[77]。因此,在发酵过程中,有效地控制温度对于生物生长和目的产物的生成至关重要。

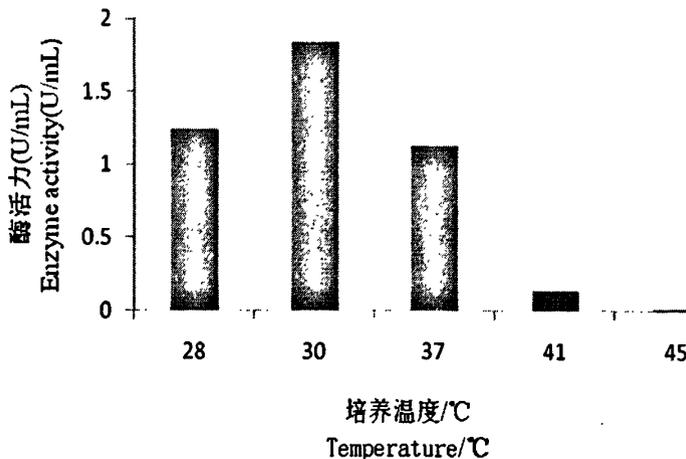


图2.9 培养温度对产酶的影响

Fig.2.9 The effect of temperature on enzyme production

本实验分别采用28℃、30℃、37℃、41℃、45℃五个不同培养温度，同时对BCT-1本实验酶活性的影响进行了研究。由图2.9可以看出，在同样的培养条件和培养时间内，30℃培养条件下的普鲁兰酶酶活比其他温度条件下的酶活高，因此，BCT-1最佳发酵温度为30℃。

2.2.3.6 菌体接种量对产酶的影响

加入的种子液体积与培养液体积的比例就叫做接种量。接种量的大小也是生产菌种在发酵过程中生长繁殖的速度快慢的重要因素之一。因此，确定最佳的接种量对目的产物的产生必不可少。发酵培养基摇瓶试验中，将培养16-24h的种子培养液按照接种量为4%，6%，8%，10%，12%，14%，16%，18%取样分别加入相同的发酵培养基中。测定普鲁兰酶的酶活力，结果见图2.10。

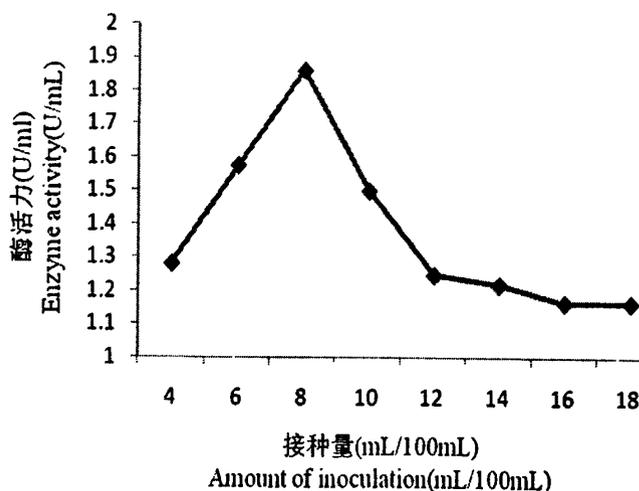


图2.10 接种量对产酶的影响

Fig.2.10 The effect of amount of inoculation on enzyme production

由图2.10可见，接种量在4%~8%之间时，普鲁兰酶酶活性随接种量增加而增大；接种量达到8~12%时，普鲁兰酶酶活性下降迅速，可能是因为接种量过大，菌体生长过快，营养物质消耗过大，菌体衰老较早，影响产量及转化率。当接种量为12%~18%时，普鲁兰酶酶活力相差不大。因此，选择8%为最适接种量。

2.2.3.7 摇瓶装液量对产酶的影响结果

溶解氧浓度是发酵过程中影响细胞密度的一个重要参数。溶解氧的过高或过低都会影响菌体的正常生长和产物的合成。在本实验中保持培养基成分及其他培养条件不变，仅仅改变摇瓶的装液量，在500ml的三角瓶中，分别装入50ml, 100ml, 150ml, 200ml, 250ml的培养液，观察其对产普鲁兰酶酶的影响，结果见图2.11。

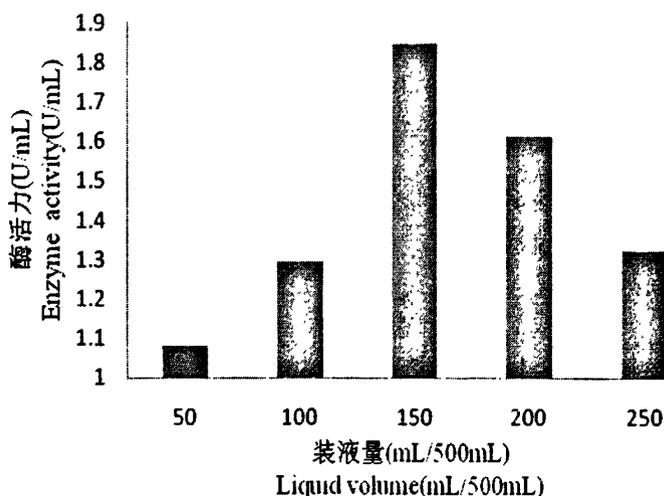


图2.11 摇瓶装液量对产酶的影响

Fig.2.11 The effect of liquid volume on enzyme production

实验结果表明,装液量为50ml/500ml~150ml/500ml时,产普鲁兰酶酶活力逐渐增大;当装液量为200ml/500ml~250ml/500ml时,普鲁兰酶酶活力减小。因此, BCT-1 发酵的最佳装液量为150ml/500ml。

2.2.3.8 摇床转速对产酶的影响结果

发酵液的溶氧浓度与摇床的转速也有一定的关系。在一定范围内,随着转速的增大,溶氧浓度也会明显增高。但当转速过高,又会由于过分剧烈的机械搅拌造成细胞伤害,影响菌体生长,从而影响其代谢产物的生成^[77]。发酵培养基灭菌接种后,其他条件不变,分别摇床转速调至静止培养, 120 r/min, 150 r/min, 180 r/min, 200 r/min, 220 r/min, 240 r/min。结果见图 2.12。

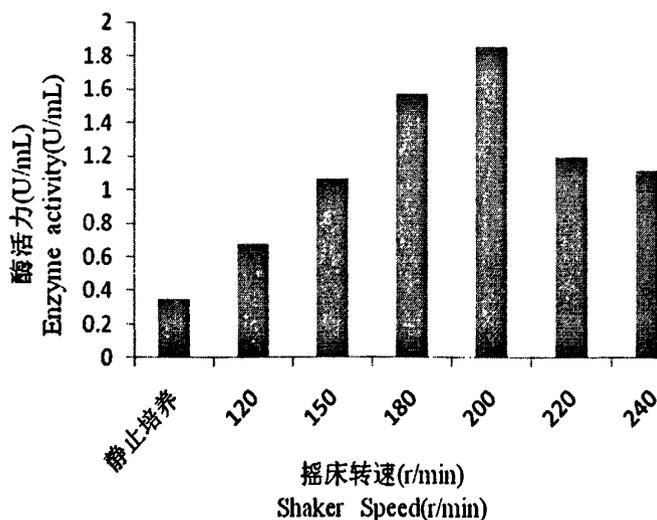


图2.12 摇床转速对产酶的影响

Fig.2.12 The effect of shaker speed on enzyme production

结果显示, 转速为 120 r/min~200 r/min 时, 普鲁兰酶活力随转速的提高而增大; 当转速高于 200 r/min 后, 普鲁兰酶活力随转速的提高而下降。表明, BCT-1 发酵最佳转速为 200r/min。

2.2.4 响应面优化实验设计及结果

通过单因素分析, 确定了各个成分的最适浓度, 但单因素分析却没有考虑因素间的交互作用。碳源浓度, 氮源浓度, pH 值通常是产酶培养基中关键因素。因而本实验拟采用响应面分析法(Response Surface Analysis, RSA) 来重点考察玉米淀粉、酵母膏和 pH 值 3 个因素之间的相互联系及对发酵产酶的影响。根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理^[78], 以玉米淀粉、酵母膏和 pH 值 3 个因素为自变量, 以普鲁兰酶活力为响应值, 本文进行了三因素三水平的 RSA 试验, 15 个试验点可分为两类: 其一是析因点, 自变量取值在 x_1 , x_2 , x_3 所构成的三维顶点, 共有 12 个析因点; 其二是零点, 为区域的中心点, 零点试验重复 3 次, 用以估计实验误差, 每次试验得到的普鲁兰酶活见表 2.4。并用国际上最常用的统计软件 SAS v8.1 对实验数据进行回归分析, MATILAB 软件作图, 并通过微分方法计算预测的最佳点^[78]。试验因素与水平的选取见表 2.3, 试验安排及结果见表 2.4。

表 2.3 实验因素水平表

Table 2.3 Range and levels of the experiments

名称	玉米淀粉 (g/L)	酵母膏 (g/L)	pH
编号	X_1	X_2	X_3
1	30	15	7.0
水平 0	20	10	6.0
-1	10	5	5.0

表 2.4 响应面分析试验安排与普鲁兰酶酶活力

Table 2.4 Experimental design and results of Box-behnken design for pullulanase activity

实验批次	X ₁	X ₂	X ₃	响应值 Y (U/ml)
1	-1	0	-1	2.558
2	-1	-1	0	0.366
3	-1	1	0	0.337
4	-1	0	1	0.073
5	0	-1	-1	0.126
6	0	1	-1	2.243
7	0	0	0	2.383
8	0	0	0	2.499
9	0	0	0	2.244
10	0	-1	1	0.394
11	0	1	1	0.192
12	1	0	-1	0.897
13	1	-1	0	0.182
14	1	1	0	2.183
15	1	0	1	0.551

表 2.5 响应面实验方差分析

Table 2.5 The variance analysis result of response surface

test										
Master Model						Predictive Model				
Source	DF	SS	MS	F	Pr > F	DF	SS	MS	F	Pr > F
X1	1	0.02868	0.02868	0.121186	0.741929	1	0.02868	0.02868	0.121186	0.741929
X2	1	1.888596	1.888596	7.980115	0.036895	1	1.888596	1.888596	7.980115	0.036895
X3	1	2.661124	2.661124	11.24437	0.020256	1	2.661124	2.661124	11.24437	0.020256
X1*X1	1	1.621392	1.621392	6.851066	0.047243	1	1.621392	1.621392	6.851066	0.047243
X1*X2	1	1.030225	1.030225	4.353135	0.091314	1	1.030225	1.030225	4.353135	0.091314
X1*X3	1	1.14383	1.14383	4.833165	0.079249	1	1.14383	1.14383	4.833165	0.079249
X2*X2	1	3.288025	3.288025	13.89329	0.013608	1	3.288025	3.288025	13.89329	0.013608
X2*X3	1	1.34444	1.34444	5.680827	0.062896	1	1.34444	1.34444	5.680827	0.062896
X3*X3	1	1.762582	1.762582	7.44765	0.041328	1	1.762582	1.762582	7.44765	0.041328
Model	9	13.9176	1.5464	6.534192	0.026206	9	13.9176	1.5464	6.534192	0.026206
Error	5	1.183314	0.236663			5	1.183314	0.236663		
Total	14	15.10091				14	15.10091			

注: $F_{0.01}(9, 5)=10.16$, $F_{0.05}(9,5)= 4.77$

从表2.5可以看出: $F_{0.01}(9,5)=10.16$, $F_{0.05}(9,5)= 4.77$, $F_{\text{方程}}=6.534192$, 所以, $F_{0.01}(9,5) > F_{\text{方程}} > F_{0.05}(9,5)$, 这说明回归方程在 $F_{0.05}$ 的水平上显著。模型可信度分析(见

表2.6) 中复相关系数的平方 $R^2=0.9216$, 说明模型对菌株BCT-1产普鲁兰酶过程的拟合度是92.16%, 因此回归方程给菌株BCT-1发酵生产普鲁兰酶提供了一个合适的模型。

表2.6模型可信度分析

Table 2.6 The reliability analysis of the model.

	Master Model	Predictive Model
Mean	1.148133	1.148133
R-square	92.16%	92.16%
Adj. R-square	78.06%	78.06%
RMSE	0.48648	0.48648
CV	42.37138	42.37138

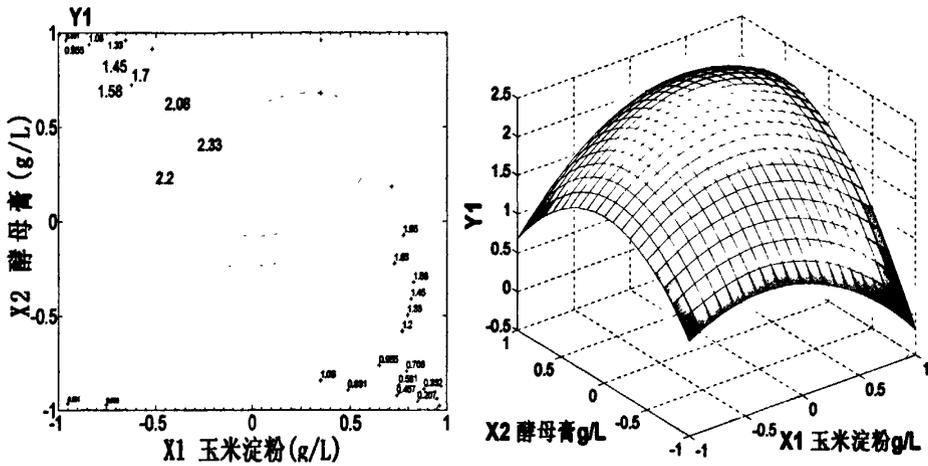


图 2.13 $Y=f(X1, X2)$ 的响应面立体分析及其等高线图 (Fixed levels: $X3=0$)

Fig2.13 Response surface and contour plots for $Y=f(X1, X2)$ (Fixed levels: $X3=0$)

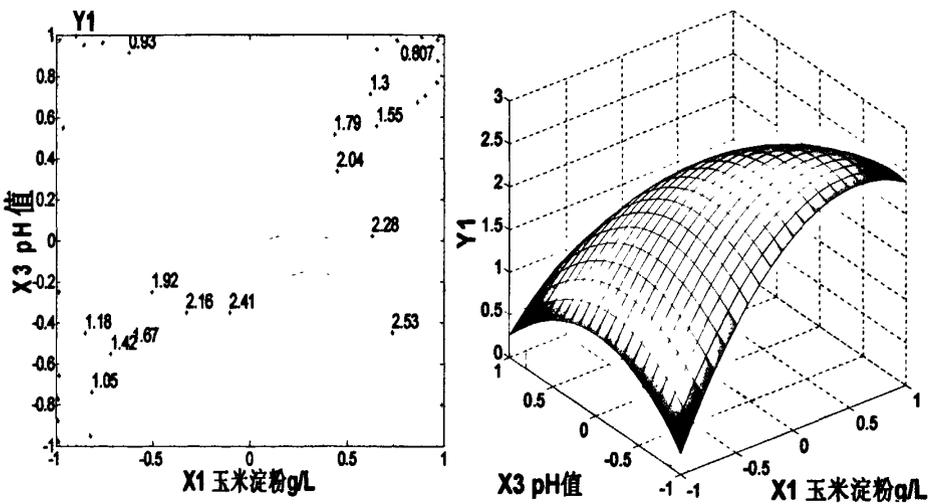


图 2.14 $Y=f(X1, X3)$ 的响应面立体分析及其等高线图 (Fixed levels: $X2=0$)

Fig2.14 Response surface and contour plots for $Y=f(X1, X3)$ (Fixed levels: $X2=0$)

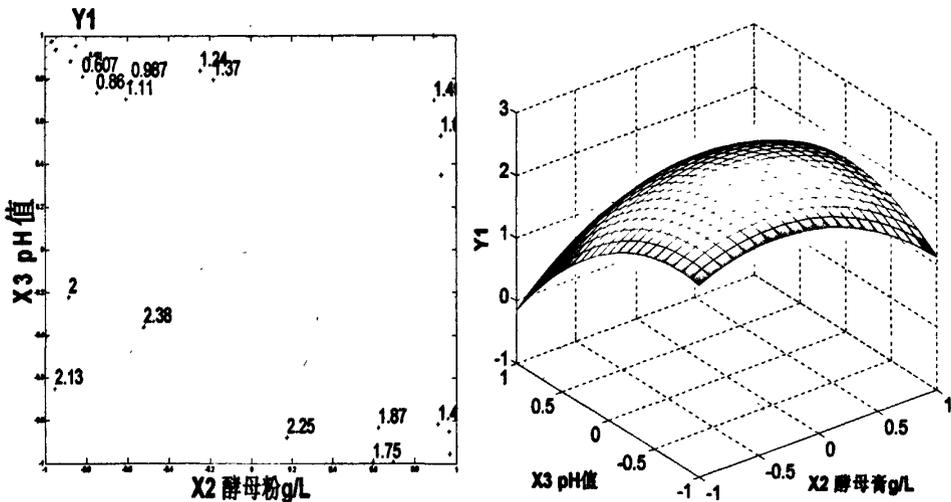


图 2.15 Y=f(X2,X3)的响应面立体分析及其等高线图 (Fixed levels:X2=0)

Fig.2.15 Response surface and contour plots for Y=f(X2,X3) (Fixed levels:X2=0)

以普鲁兰酶酶活力为响应值,运用SAS程序进行回归拟合后,所得回归方程(编码后)如下:

$$Y_1 = 2.3743 + 0.05995X_1 + 0.4859X_2 - 0.5768X_3 - 0.6632X_1^2 - 0.9442X_1X_2 - 0.6914X_1X_3 + 0.5075X_2^2 + 0.5347X_2X_3 + 0.5798X_3^2$$

运用 SAS 程序对回归方程进行方差分析见表 2.5

由图 2.13、2.14、2.15 可看出 X_1 、 X_2 和 X_3 存在极值点。为了求出最佳点的编码值,对回归方程取一阶偏导等于零并整理得:

$$0.05995 - 1.3264 X_1 - 0.9442 X_2 - 0.6914 X_3 = 0$$

$$0.4859 - 0.9442 X_1 + 1.1015 X_2 - 0.5347 X_3 = 0$$

$$-0.5768 - 0.6914 X_1 + 0.5347 X_2 - 1.1596 X_3 = 0$$

$$\text{解得: } X_1 = -0.0353, X_2 = 0.4362, X_3 = -0.6137.$$

代入回归方程解得到预测的普鲁兰酶最优产量 $Y = 2.656 \text{ U/ml}$ 。最佳点计算后得:培养基中玉米淀粉质量浓度为 19.965 g/L , 酵母膏质量浓度为 10.4362 g/L , pH 值为 5.386。考虑到实际操作的便利,确定培养基的最优配方为:玉米淀粉质量浓度为 19.97 g/L , 酵母膏质量浓度为 10.45 g/L , pH 值 5.4。

为了证实预测的结果,用以上得到的最优配方重复实验 3 次,平均普鲁兰酶酶活力 $2.68 \pm 0.05 \text{ U/ml}$, 预测值 $Y = 2.656 \text{ U/ml}$ 与实验值之间良好的拟合性证实了模型的有效性,回归方程为普鲁兰酶的发酵生产提供了一个合适的模型。

2.3 小结

(1) 本研究从海南儋州、海口、三亚等地的高温热泉,海洋,农田,下水道中采集到泥水样品,将这些样品按需要稀释后涂布到平板固体分离培养基上,培养 48h 后

挑取生长出来的单菌落进行进一步平板划线分离纯化,纯化后,对这些菌株进行了低温保藏。将这些菌株针对普鲁兰酶进行平板筛选,在加有糯米淀粉的平板培养基上培养菌株48h后,用碘液进行显色,根据菌种水解糯米淀粉产生的透明圈大小得到了62株具有普鲁兰酶活力的菌株,将这62株菌株接入含有红色普鲁兰糖的鉴定培养基中培养48h后,选取产生透明圈的菌株进行复筛。最后将这些菌株接种到液体发酵液取上清液检测普鲁兰酶活力,发现这62株菌株都具有普鲁兰酶活力,其中有23株菌的酶活在0.10U/ml以上,其中0.20u/ml以上的有7株,最高酶活力达0.357 U/ml,可见不同菌株间普鲁兰酶活力相差较大。

(2) 通过对发酵培养基成分单因素和响应面的优化,得到的最佳培养基和培养条件是:玉米淀粉, 19.97g/L; 酵母膏, 10.45g/L; 硫酸铵, 5g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L。培养基初始pH5.4, 接种量8%, 装液量150ml/500ml, 摇床温度30℃培养, 摇瓶转速为200r/min, 发酵周期72h。普鲁兰酶酶活力从原来的0.357 U/ml提高至2.656U/ml, 提高了7.45倍。

第三章 普鲁兰酶的分离与纯化

3.1 材料与方法

3.1.1 菌种来源

优化培养后的普鲁兰酶高产菌株: BCT-1

3.1.2 试剂

硫酸铵, 广州化学试剂厂; 丙烯酰胺、N, N, 一二甲基丙烯酸胺、考马斯亮蓝 G250 和 R250, 为上海生物工程公司产品; Sepherdex G-75 分子筛凝胶为索莱宝分装; DEAE sepharose fast Flow 为 Amersham Pharmacia 公司产品, 索莱宝分装; 小牛血清白蛋白(BSA) 均为 Sigma 公司产品。其余试剂均为国产分析纯产品。

3.1.3 培养基

种子培养基: 见 2.4。

发酵培养基: 见 2.4。

3.1.4 实验仪器

灭菌锅 (HVE, 日本 Hirayama 公司); 高速冷冻离心机 (Sigma2-16, 德国 Sigma 公司); 精密数显酸度计 (Delta320-S, 上海梅特勒-托利多仪器厂); 电子天平 (AR2140, 奥豪斯国际贸易有限公司); 数字显示电热培养箱 (宁波海曙赛福实验仪器厂); 高压蒸汽灭菌锅 (HVE, 日本 Hirayama 公司); 自动双重纯水蒸馏器 (1810B, 上海晶凌玻璃有限公司); 电热恒温干燥箱 (Q/BKYY31-2000, 上海跃进医疗器械厂); 无菌紫外分光光度计 (Spectrumlab 53 Power, 中国 Leng Tech 公司); 无菌操作台 (FD-01, 苏州净化设备厂); 超声波破碎机 (JY92-II, 宁波新芝科学仪器研究所); 真空冷冻干燥机 (LGJ-10, 北京四环科学仪器厂)。

3.1.5 试剂配制

30%分离胶贮液: 29.2%丙烯酰胺, 0.8% N' N-亚甲基双丙烯酰胺, 过滤后棕色瓶 4℃保藏(储存不超过 2 周)

分离胶缓冲液: 1.5 mol/L Tris-HCl pH 8.8, 过滤后 4℃保存

浓缩胶缓冲液: 1.0 mol/L Tris-HCl pH 6.8, 过滤后 4℃保存

电极缓冲液: Tris-Base 3.0g, 甘氨酸 14.4 g, SDS 1.0g, 双蒸水定容至 1000ml, 室温保存。

样品缓冲液: SDS 0.5g, 50%甘油 5ml, 巯基乙醇 0.25ml, 1%溴酚蓝 2ml, 浓缩胶缓冲液 2.5ml 定容至 50 ml。

考马斯亮兰R-250染色液配制：称取 1g考马斯亮兰R-250溶于500ml无水乙醇、100ml冰醋酸，将溶液稀释到1000ml，试剂终浓度为0.1% 考马斯亮兰R-250、50%乙醇和10%冰醋酸。

考马斯亮蓝 G-250 储存液配制：称取 0.1gG-250 溶于 50ml 95% 乙醇，加入 100ml85%(m/v)磷酸，将溶液稀释到1000ml，试剂终浓度为0.01% 考马斯亮蓝G-250，4.7%(m/v)乙醇和8.5%(m/v)磷酸。

3.1.6 实验方法

3.1.6.1 普鲁兰酶活性测定

酶活测定采用DNS法，见2.5.3

3.1.6.2 总蛋白的测定

蛋白含量测定采用 Bradford 的方法，以牛血清白蛋白为标准，这是一种迅速、可靠的通过染色法测定溶液中蛋白含量的方法^[79]。

(1) 原理

Bradford 检测法基于考马斯亮蓝 G-250 有红、蓝两种不同颜色的形式。在一定浓度的乙醇及酸性条件下，可配成淡红色的溶液，当与蛋白质结合后，产生蓝色化合物，反应迅速而稳定。反应化合物在 465-595nm 处有最大吸收值，化合物颜色的深浅与蛋白浓度的高低成正比，因此检测 OD595 的值可计算蛋白含量。

(2) 试剂

①考马斯亮蓝 G-250 储存液

②标准蛋白溶液：用 0.15mol/L NaCl 配制成 1mg/L 蛋白溶液。

③ 缓冲液：pH7.2，50mM 的磷酸盐缓冲液

(3) 实验测定方法

考马斯亮蓝标准曲线的绘制：

1) 取 7 支试管，分别加入 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8ml 标准蛋白溶液，用蒸馏水补足 1ml。

2) 取 8 支试管，0 号管加入 0.1ml 蒸馏水，1-7 号管依次加入 0.1ml 的标准蛋白溶液，然后加入 5ml 蛋白质染色剂，充分振荡混合，10min 后于 595nm 测定吸光值以蛋白质浓度为横坐标，光吸收值为纵坐标，绘制标准曲线作为定量的依据。

测定方法：

取 0.1ml 酶液，加入 5ml 的考马斯亮蓝 G-250 储存液，充分振荡混合。显色 10min 后，在紫外分光光度计上测定 OD595 的值。另做一空白实验，方法同上，仅酶液用等体积的缓冲液代替。

$$\text{蛋白含量} = \frac{\text{OD}_A - \text{OD}_B}{C}$$

式中 OD_A : 样品 A 的 OD595

OD_B : 对照 B 的 OD595

C: 标准曲线中斜率

3.1.6.3 普鲁兰酶的纯化

3.1.6.3.1 普鲁兰酶粗酶液的制备

本实验先对菌株 BCT-1 的发酵上清液经浓缩后, 取浓缩液 20ml, 进行沉淀试验, 加入研细的硫酸钱粉末, 使体系硫酸铵饱和度分别达到 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 依次沉淀离心后测上清液和沉淀的剩余活力, 测定最佳盐析浓度。

粗酶液的制备: 发酵上清液 → 旋转蒸发浓缩 → 缓慢加入研细的固体硫酸铵粉末至最佳饱和度, 置于层析冷柜中放置 1hr, 室温下 $12000 \times g$ 离心 15min, 去除上清, 收集沉淀物溶于 0.02M 磷酸缓冲液 pH6.0 中, 在层析冷柜中用相同的缓冲液透析 24hr, 中间换液几次, 直到透析液中检测不到 SO_4^{2-} 为止, 收集透析后的酶液, DNS 法检测酶活。酶液于 -20°C 下冷冻过夜, 次日放入真空冷冻干燥器中冻干处理, 所得冻干粉于 -20°C 中保藏待用。

3.1.6.3.2 Sephadax G-75 凝胶过滤

1) 凝胶的处理和装柱

Sephadex G-75 凝胶干粉, 称取 12g 凝胶干粉, 500ml 蒸馏水浸泡, 将烧杯放入沸水浴中水浴 30min, 水浴期间不断搅拌悬液, 勿使凝胶颗粒沉底。使用 $16 \times 100\text{cm}$ 的层析柱, 关闭出水口加入凝胶过滤洗脱缓冲液至 1/3 柱高, 缓慢加入经过处理的凝胶, 当凝胶沉降至柱高约 3cm 时, 打开出水口使缓冲液流出。不断添加凝胶直至合适的柱体积为止, 柱表面保持 1-3cm 的凝胶过滤洗脱缓冲液。

2) 平衡

装好的层析柱使用前, 用洗脱缓冲液在柱压 0.2Mpa、流速 0.5ml/min 下平衡 30min, 使柱床稳定。层析柱应均匀、无气泡、柱顶交换层表面平坦。用蓝色葡聚糖 2000 在上述条件下走柱, 色带均匀下降, 说明柱子均匀可以使用, 否则需重装。

3) 上样和洗脱

小心移出柱床表面的缓冲液, 使溶液与胶面相切, 取粗酶液 3ml 在接近胶面 1cm 高的柱内壁转动加样, 使样品尽可能快地覆盖胶面, 打开出水口, 使样品进入凝胶, 待样品与胶面相切时关闭出水口, 用洗脱缓冲液加满层析柱。在柱压 0.1Mpa、流速 0.5 ml/min 条件下洗脱, 自动分部收集, 每管收集 3ml, 测定每个收集管淀粉酶活力和总蛋白含量。整个过程在波长 280nm 下检测样品光吸收, 样品由自动组分收集仪收集。

3.1.6.3.3 DEAE sepharose Fast Flow 强阴离子柱层析

1) 装柱: 将层析柱垂直放置, 用配置好的缓冲液冲洗柱子 (1.6cm×20cm), 留少量缓冲液于底部。DEAE-Sephacryl FF 为湿胶, 到出 30ml 胶, 慢慢倒去胶中含有的乙醇溶液, 加入缓冲液后控制胶浓度为 75%左右。

2) 平衡: 待胶自然沉降后, 用 pH7.5 的 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液进行柱子平衡, 流速约为 5ml/min。当流出缓冲液和平衡缓冲液的 pH 一样时, 柱已平衡。

3) 上样和洗涤: 将上步 Sephadex G-75 凝胶过滤后所得样品上样至用缓冲液预平衡好的 DEAE sepharose fast flow 层析柱中, 用平衡缓冲液洗涤, 洗至紫外检测仪吸光度约平稳。

4) 洗脱: 以含 0~1.0mol/L NaCl 的同一缓冲液进行线形梯度洗脱, 洗脱流速为 2ml/min。用全自动收集仪收集洗脱峰, 将收集的洗脱峰用 DNS 法检测酶活。

5) 柱子的再生: 用过的离子交换柱用 2M NaCl 清洗过后平衡后即可再用, 多次使用后可用 1N NaOH 清洗, 去离子水洗, 然后用 2M NaCl 洗, 去离子水洗, 柱子可保存于 4℃冰箱中。

3.1.6.4 SDS-PAGE 流程

1) 制备凝胶板

用电泳仪胶条密封玻璃板侧边, 将 12%的分离胶均匀加入玻璃板孔隙内, 使凝胶的高温至玻璃板 2/3 左右。加入少量双蒸水进行水封。静置约 1-1.5h, 聚合完成, 凝胶与水封之间可见清晰的水平界面。吸去胶面上的水, 用浓缩胶缓冲液冲洗胶面 2 次, 加入 5%浓缩胶凝胶, 安装梳板, 静置约 1-1.5h, 聚合完成。

2) SDS-PAGE 电泳

凝胶凝固后, 加入 SDS-PAGE 电极缓冲液。待测蛋白质浓缩液加入等量的 SDS-PAGE 样品缓冲液, 沸水浴中加热 5min, 每个上样孔上样 10 μ L。20mA 板稳流电泳至样品进入分离胶后, 将电流恒定至 30 mA/板, 电泳至溴酚蓝前沿离玻璃板下沿 1-2cm 处。

3) 染色与脱色

将电泳完毕的凝胶先用蒸馏水冲洗 2-3 次, 除去表面的 SDS, 有利于染色, 小心将胶取出, 置于大培养皿中, 加至少 5 倍于凝胶体积的染色液 (0.25%考马斯亮蓝 R-250+20%磺基水杨酸), 放置过夜, 倾出染色液, 加入醋酸脱色液, 缓慢摇动, 数小时更换一次脱色液, 直至蓝色背景褪去, 出现清晰的蛋白条带。

3.2 结果与分析

3.2.1 蛋白质标准曲线

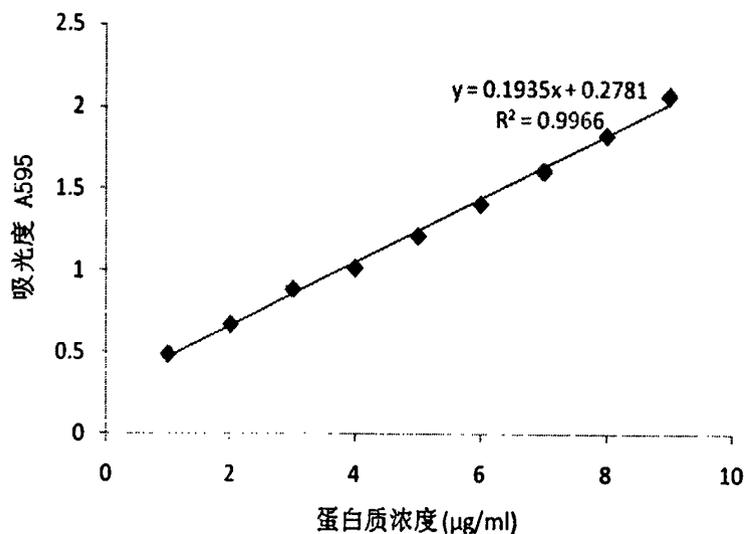


图 3.1 蛋白标准曲线

Fig3.1 Fig3.1Protein criterion curve

3.2.2 普鲁兰酶的硫酸铵沉淀

选取 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、这 8 个饱和度做普鲁兰酶的硫酸铵沉淀，离心、回溶沉淀后，分别测定上清液和沉淀中普鲁兰酶酶活。如图 3.2 所示，随着硫酸铵加入量的增大，上清液中的残余酶活越来越少。当硫酸铵加入量从 60% 到 70% 时上清液中残余酶活的变化较大；沉淀的酶活在硫酸铵饱和度为 40% 以下时上升趋势不明显，在饱和度为 50% 以上后酶活上升的也很快。浓度到了 70% 时，可能由于盐浓度过大导致部分蛋白变性，酶活有了下降的趋势，因此，我们在硫酸铵浓度分级沉淀的浓度选择时，选择了 60% 的浓度。

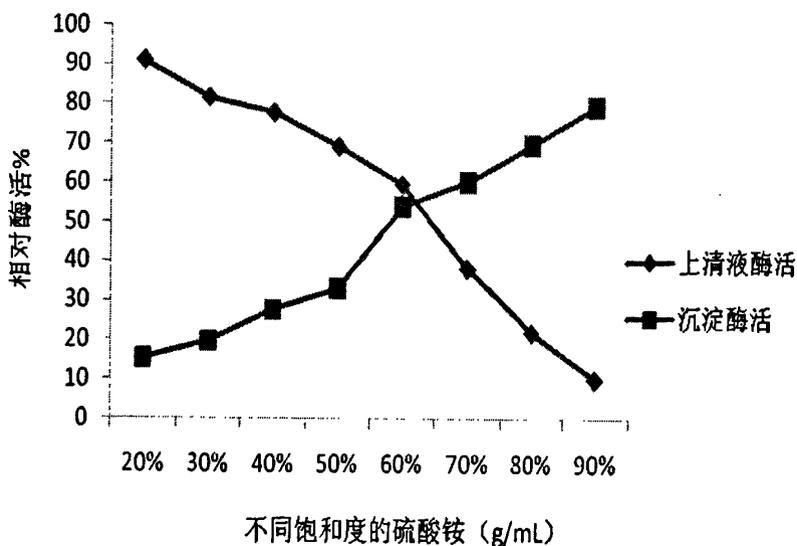


图 3.2 不同硫酸铵饱和度对酶活的影响

Fig3.2 The effect of different ammonium sulfate saturation on the activity

3.2.3 Sephadax G-75 凝胶层析结果

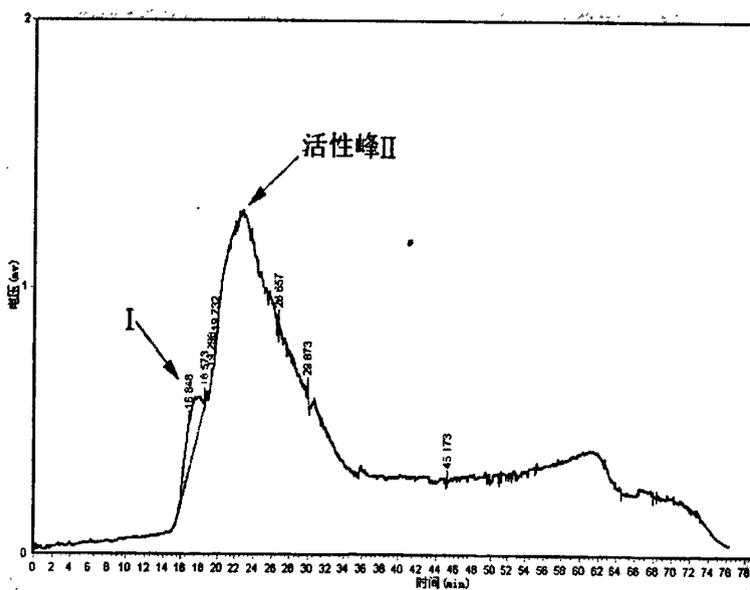


图 3.3 Sephadax G-75 凝胶层析结果

Fig 3.3 Gel filtration by Sephadax G-75

3.2.4 DEAE sepharose Fast Flow 强阴离子柱层析结果

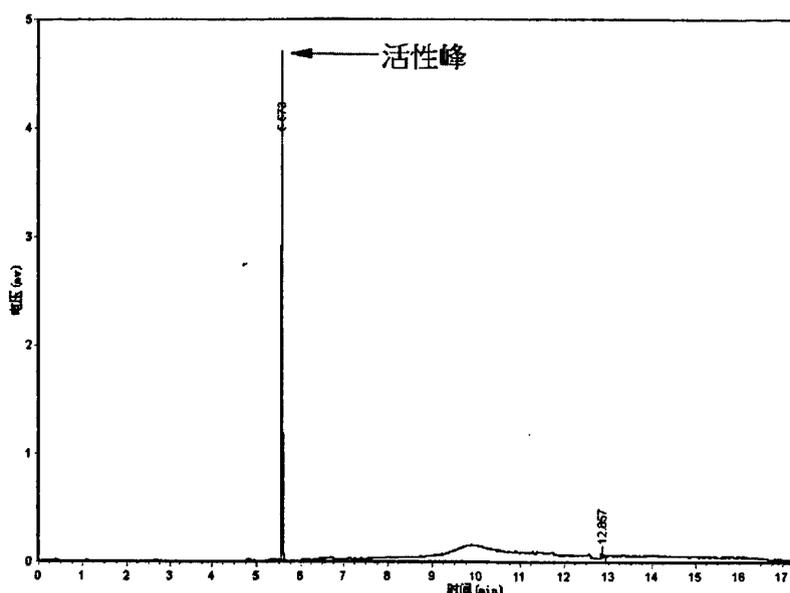


图 3.4 DEAE sepharose Fast Flow 强阴离子柱层析结果

Fig 3.4 The result of DEAE sepharose Fast Flow ion exchange chromatograph

表 3.1 酶的纯化结果

Table 3.1 The result of the purification

Steps	Total protein(mg)	Total activity(U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purified fold
Crude extract	170.7	268	1.57	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	90.9	228.4	2.51	53.3	1.59
SphadaxG-75	40.8	193	4.72	23.9	3.01
DEAE sepharose FF	10.7	107.2	9.97	6.2	6.35

3.2.5 SDS-PAGE 检测酶的分子量

取各纯化步骤所得纯化样品 10 μ L, 各加入 10 μ L 变性剂, 混匀后于沸水中水浴 5min, 14000rpm 离心 5min, 上样, 以 Marker 为对照, 每孔 20 μ L, 电泳结束后用考马斯亮兰法染色。电泳结果如图 3.5。

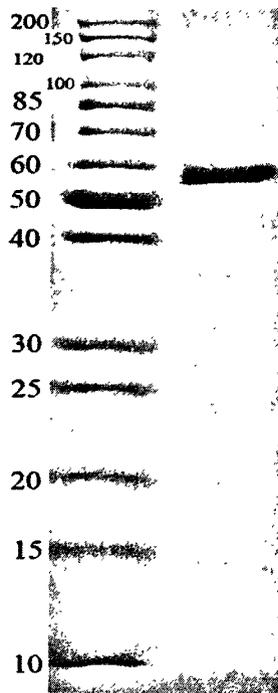


图 3.5 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig3.5 The result of SDS-PAGE

左条代为 Marker, 单位为 KDa; 右条带为 DEAE sepharose Fast Flow 强阴离子柱层析纯化后的样品

3.3 小结

酶蛋白提纯是为了增加酶产品的纯度或活性, 酶蛋白纯化的要求是将需要的目的蛋白质其他成分特别是不需要的杂蛋白中分离出来, 同时仍保留该酶完整的物理结构和生理生化性质。因为不同的蛋白质在氨基酸的序列和数目且多肽主链上氨基酸残基的极性及其所带电荷等物理、化学以及生物学特性上存在众多差异, 这样我们才能利用这些不同的性质将需要的目的蛋白从复杂的混合物中分离分离出来。在蛋白质分离纯化的过程中, 外界条件如离子浓度、pH 及温度等因素对分离纯化结果有着重要的影响。因此能否分离纯化得到我们需要的酶蛋白, 各种参数的选择至关重要。例如外界温度对酶蛋白的影响较大, 温度越高, 越容易变性, 最终会造成酶失活, 所以活性酶蛋白的分离纯化要保持在 4℃ 进行。又如 pH 值的选择也是酶蛋白分离纯化的关键, 选择适宜 pH 能够使目酶蛋白更加稳定。

蛋白的纯化一般分为两个阶段: 粗分阶段和精细纯化阶段。粗分阶段的目的是将目的蛋白和其他杂质如 DNA、RNA 等分开, 同时为了将体积大、浓度低的样品进行浓缩, 我们先将样品高速离心除去菌体和杂质后用旋转蒸发仪进行浓缩, 但为了防止蛋白质的变性, 温度不能过高。后用浓度为 60% 的硫酸铵进行沉淀, 迅速将蛋白与杂质分开, 要

注意在硫酸铵的加入时,要防止局部浓度过高,这样会导致某些蛋白质的不可逆沉淀,一般要将温度控制在4℃以内,缓慢加入硫酸铵。在硫酸铵沉淀以后要用透析袋进行透析脱盐。精细纯化阶段是要将目的蛋白与那些大小及理化性质相近的蛋白区分开。该阶段常采用柱层析如离子交换层析、葡聚糖层析、高效液相色谱或超滤等方法。本实验在这一阶段采用了 sephadex G-75 层析和 DEAE sepharose Fast Flow 强阴离子柱层析。凝胶颗粒内部具有多孔网状结构,当样品加到凝胶柱上后,颗粒接近或大于网眼的分子,它们随着溶剂在凝胶颗粒之间向下流动,移动速度快,先出层析柱;而颗粒小于网眼的分子可渗入凝胶网眼之中,阻滞作用大,移动速度慢,因而后出层析柱。在层析柱的出口处,我们用多个试管分步收集洗脱液,就可将混合物中各组分彼此分离。实验证明,通过两次柱层析后效果较好,蛋白得到了有效的分离。

菌株 BCT-1 在发酵培养基发酵培养后,离心收集发酵上清,旋转蒸发浓缩,硫酸铵盐析后,经 SePhadexG75 凝胶层析和 DEAE sepharose Fast Flow 强阴离子柱层析后得到的普鲁兰酶蛋白经过 SDS-PAGE 凝胶电泳检测计算其分子量大约在为 58KDa 左右。据报道大部分的普鲁兰酶的分子量在 50-100kD 左右^[80-84],但也有些报道的普鲁兰酶的分子量低于 50KDa,如 Mercier et.al^[84]报道的 *Aerobacter aerogenes* 所产的普鲁兰酶的分子量为 5.6 KDa。这说明普鲁兰酶系是一个庞大的家族,由于其理化性质上的多样性,体现了不同来源的普鲁兰酶具有不同等电点和酶学性质,所以不同来源的普鲁兰酶的分子量差距很大。

第四章 菌株 BCT-1 产普鲁兰酶酶学性质分析

耐热普鲁兰酶 BCT-1 经过分离纯化,经电泳检测为纯酶后,对酶学性质进行了研究,主要包括最适作用温度和热稳定性、最适 pH 和 pH 稳定性、金属离子依赖性、酶促反应的动力学常、酶的底物特异性等方面的研究。

4.1 材料与amp;方法

4.1.1 试剂

普鲁兰糖, Sigma 公司; 可溶性支链淀粉, Fluka 公司; Trisbase, Amreseo 公司。其他各种无机盐均为国产分析纯试剂。

可溶性支链淀粉溶液(0.5%): 称取可溶性支链淀粉 0.509, 加入约 90ml 去离子水中, 加热溶解过程加入少量的碱液, 使得淀粉可以充分溶解, 之后定容至 100ml。

可溶性淀粉溶液(0.5%): 称取可溶性淀粉 0.509, 加入约 90ml 去离子水中, 加热溶解, 之后定容至 100ml。

普鲁兰糖溶液(0.5%)、DNS 试剂、磷酸缓冲溶液见 2.3。

纯化后的普鲁兰酶配制成 0.05mg/ml 的溶液。

4.1.2 实验仪器

UV 型分光光度计((Spectrumlab 53 Power, 中国 Leng Tech 公司), 恒温摇床 (HQ45HYA, 中国科学院武汉科学仪器厂); 数字式酸度计 (Delta320-S, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司); 数显恒温培养箱 (宁波海曙赛福实验仪器厂), 数显恒温水浴锅 (LVF6, Grant Instruments(Cambridge)Ltd); 冷冻高速离心机 (Sigma2-16, 德国 Sigma 公司)。

4.1.3 实验方法

4.1.3.1 酶的最适作用温度和最适作用 pH

在相同的反应体系条件下, 将其反应温度设为 30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃, 80℃, 90℃, 用 DNS 法测定温度对酶活的影响, 并确定该酶的最适反应温度。

在同一温度条件下, 配制不同的 pH 缓冲液体系: 醋酸缓冲液(0.2M, pH3.7-5.5)、磷酸缓冲液(0.2M, pH6.0-8.0)、Tris-Hcl(0.02M, pH5.5-9.0)、Gly-NaOH(0.05M, pH9.5-10.5)。将 pH 设为 2.8, 3.4, 4, 4.6, 5.2, 5.8, 6.4, 6.8, 7.2, 7.8, 8.2, 8.6, 9, 9.6, 10.6, 按照 DNS 法测定不同 pH 对酶活的影响, 并确定该酶的最适 pH 值。

4.1.3.2 酶的热稳定性和 pH 稳定性的测定

将纯化后的酶液在 50℃, 55℃, 60℃, 65℃分别保温 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90min 后, 按常规方法测定残余的酶活力, 做出温度-残余酶活曲线图, 得出酶的温度稳定范

围。以未保温酶液的酶活力为 100%。

用磷酸缓冲体系和 Tris-HCl 缓冲体系配制 pH 为 3.6, 4.0, 4.6, 5.2, 6.0, 6.4, 7.2, 8.2, 8.6, 9.0 的缓冲液, 将同量的酶液和同量的缓冲液相混合, 在温度为 50℃ 的水浴锅中放置 1h 后, 按常规方法测定其残余酶活力, 做出 pH-残余酶活的曲线图, 得出酶的 pH 稳定值。以 pH 为 6.0 时的酶活力为 100%。

4.1.3.3 动力学参数 K_m 值测定

在 pH 为 6.0, 温度 50℃ 的体系中, 将配制浓度依次为 0.08、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 和 1.4 的 100ml 的普鲁兰糖溶液, 置于水中预热 5min, 各加 1ml 酶液, 反应 5min。以 1ml 蒸馏水代替普鲁兰糖溶液加入相同的体系中作空白对照, 同时进行反应。用 DNS 法测定还原糖量, 得到不同底物浓度时的初速度值(以每分钟生成的葡萄糖量表示)。利用双倒数作图法求得 K_m 值。

4.1.3.4 酶的底物特异性的测定

酶只能专一地催化一定结构或者一些架构相似的化合物使这些化合物产生化学反应。酶在受到诱导之后和底物形成互补的形状。底物一旦结合上去, 就能诱导酶蛋白的构象发生相应的变化, 从而使酶和底物契合形成酶-底物络合物。

将酶反应底物由可溶性淀粉、支链淀粉、普鲁兰糖、玉米淀粉、糯米淀粉和马铃薯淀粉所取代。按照 DNS 法测定酶活力。

4.1.3.5 金属离子对酶活影响

在测定酶活力的反应体系中分别加入终浓度为 0.005M 的不同金属离子 Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} 和 Hg^{2+} , 按常规方法测定酶活力。未加金属离子的酶活力为 100%。

4.2 结果与分析

4.2.1 最适作用温度和最适作用 pH 值

在不同的温度, 相同 pH 值的作用条件下, 以最高的酶活力为 100%, 其余酶活与最高酶活的比值为纵坐标, 温度为横坐标, 做出温度-酶活力的关系曲线。如图 4.1。

在不同 pH 值, 相同温度的作用条件下, 以最高的酶活力为 100%, 其余酶活与最高酶活的比值为纵坐标, pH 值为横坐标, 做出 pH-酶活力的关系曲线如图 4.2。

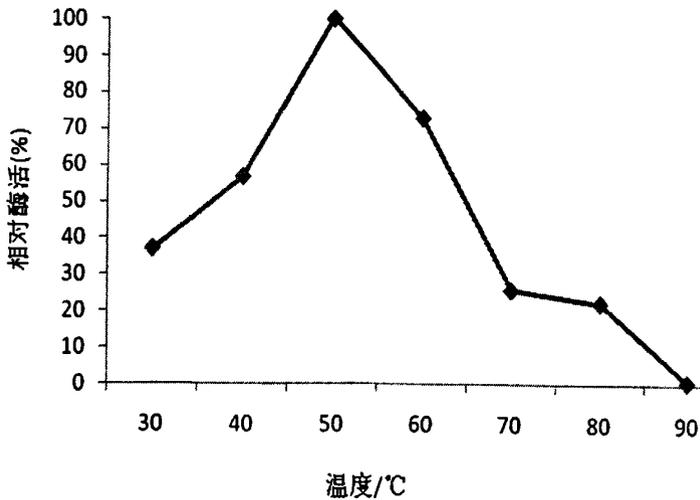


图 4.1 温度-酶活关系曲线

Fig4.1 The curve of temperature and enzyme activity

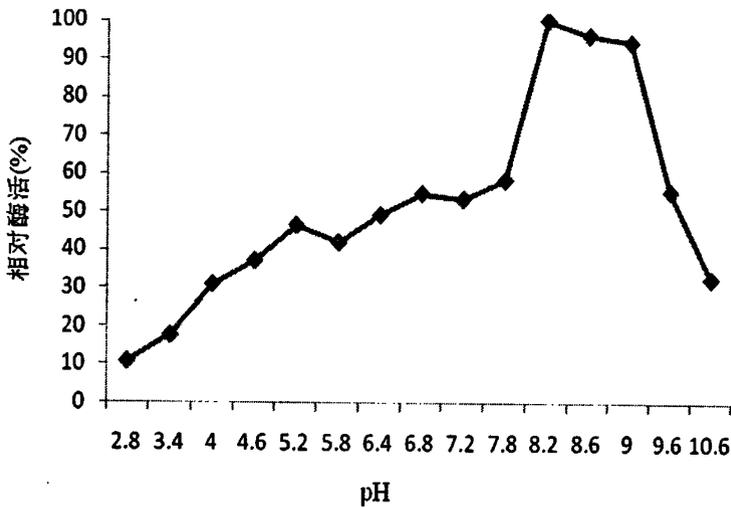


图 4.2 pH 值-酶活关系曲线

Fig 4.2 The curve of pH and enzyme activity

如图可以看出，温度为 50°C 时，酶活力值为最高。因此该酶的最适温度是 50°C。按照相同的选择方法，配置不同 pH 值梯度的缓冲液反应后测得酶活由图 4.2 可以看出，该酶的 pH 适应性较广，在 pH 值为 2.8~9.6 范围内都有活性，在碱性环境下都有较高的活性，而在 pH 值 8.2 时表现出活性最高，因此，该酶的最适 pH 值为 8.2 属于碱性普鲁兰酶。

4.2.2 酶的热稳定性以及 pH 稳定性测定结果

相同的酶液稀释至一定浓度，取 10ml 在 50°C，55°C，60°C，65°C 分别保温 5，10，15，20，30，60，90min 后，按常规方法测定残余的酶活力。以未保温的酶液的酶活力

为 100%。具体测定结果见图 4.3，酶在 55℃ 下保温 20min 后仍保存有较高的原酶活性，但随着温度的升高，酶活性损失较大。60℃ 和 65℃ 下的半衰期分别为 10min，8min。

分别将相同的酶液稀释至一定浓度后，与不同 pH 值的缓冲液混合，50℃ 保温 1h 后取出按照常规方法测定酶活。设初始酶活的 pH 值为 100%。结果如图 4.4，显示 pH6.4~9.0 范围内都有较高活性，说明该酶为碱性普鲁兰酶。

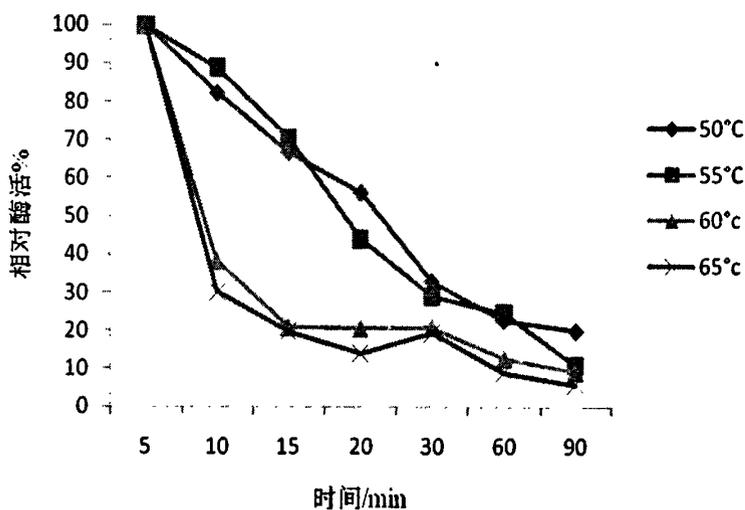


图 4.3 酶的温度稳定性

Fig4.3 The thermostability of BCT-1

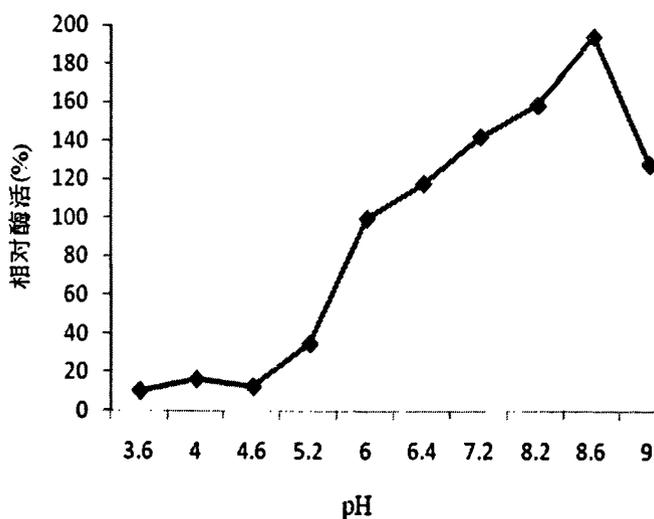


图 4.4 pH 值稳定性结果

Table4.4 The pH resistance of BCT-1

4.2.4 酶动力学 K_m 值测定

K_m 值对某一特定酶来说是个常数, 该值可以表示酶与底物亲和力的大小, 判断这种底物是否是酶的最适底物。 K_m 值越大, 酶与底物亲和力越小; K_m 值越小, 酶与底物亲和力越大。当酶促反应处于 $v=1/2 V_{max}$ 时, 可从米氏方程式得 $K_m = [S]$ 。由此可知, K_m 值是酶促反应速度为最大速度一半时的底物浓度。它的单位与底物浓度一样, 是摩尔 / 升 (mol/L)。按照 4.2.3.3 方法分别测定酶在不同底物浓度下的反应速度 v_i , 分别对底物浓度 s_i , v_i 求倒数, 根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法作图, 图 4.5 所示, 得到以下形式米氏方程:

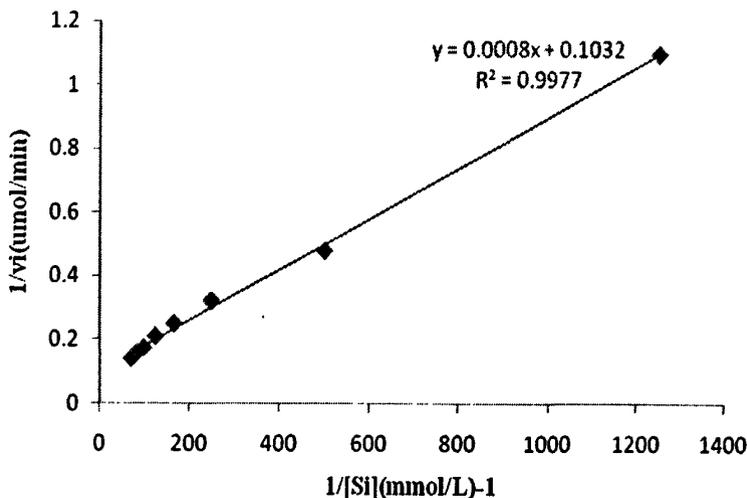


图 4.5 普鲁兰酶的双倒数方程

Fig4.5 Lineweaver-Burk polts of pullulanase

$1/v_i = 0.0008(1/[S_i]) + 0.1032$, 又由 $1/V_{max} = 0.1032$, $K_m/V_{max} = 0.0008$ 通过回归方程计算出, 普鲁兰酶的 K_m 值为 0.00775 mg/ml 。此相关文献报道普鲁兰酶的 K_m 值为 0.00692 mg/ml , 则说明 BCT-1 所产的普鲁兰酶对底物的亲和力较高。

4.2.5 酶的底物特异性

将酶作用底物可溶性淀粉、支链淀粉、普鲁兰糖、糯米淀粉、玉米淀粉以及马铃薯淀粉配制成浓度为 0.5% 的溶液, 按照常规方法测定酶活力值。如图 4.6 可知, 普鲁兰糖为最适底物, 各淀粉原料作为底物的酶活力值大小顺序依次为: 普鲁兰糖 > 可溶性淀粉 > 糯米淀粉 > 玉米淀粉 > 支链淀粉 > 马铃薯淀粉。

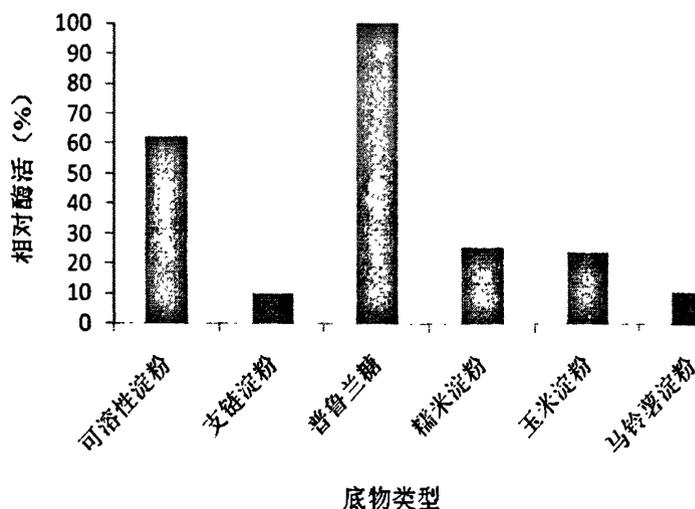


图 4.6 酶的底物特异性

Fig 4.6 The substrate speciality of the enzyme

4.2.6 金属离子对酶活力的影响结果

本实验中选择以下金属离子的氯化盐： Ca^{2+} ， Mn^{2+} ， Mg^{2+} ， Ba^{2+} ， Fe^{2+} ， Cu^{2+} ， Co^{2+} ， Zn^{2+} 和 Hg^{2+} 离子浓度均为 0.005M，因为以上某些金属离子与 pH6.0 的磷酸缓冲液会生成沉淀，因此选择 pH 6.0 左右的双蒸水作为缓冲溶液，各种金属离子对酶活力的影响结果（以未添加的酶液为空白其酶活力设为 100%，添加金属离子的酶液与其比值作为参考值）见表 4.1。

表 4.1 金属离子对酶活力的影响

Table 4.1 Effect of various metal ions on the activity of pullulanase

金属离子($5 \times 10^{-3}\text{M}$)	相对酶活 (%)	金属离子($5 \times 10^{-3}\text{M}$)	相对酶活 (%)
空白	100	Fe^{2+}	69
Mg^{2+}	109	Cu^{2+}	46
Mn^{2+}	112	Co^{2+}	9
Ba^{2+}	11	Zn^{2+}	38
Ca^{2+}	126	Hg^{2+}	2

由表 4.1， Ca^{2+} 对酶有较强的激活作用， Mg^{2+} ， Mn^{2+} 也有一定的激活作用， Ba^{2+} ， Fe^{2+} ， Cu^{2+} ， Co^{2+} ， Zn^{2+} 和 Hg^{2+} 对酶有一定的抑制作用，其中， Ba^{2+} ， Co^{2+} ， Hg^{2+} 对酶的抑制作用较强。

4.3 小结

菌株 BCT-1 所产普鲁兰酶的最适温度为 50°C ，在温度 30°C - 50°C 的范围内，酶活性随着温度的升高而增大，当温度超过 50°C 时，酶活性会迅速降低，

酶的最适作用 pH 为 8.2, 在 pH 为 8.2-9.0 之间该酶都具有较高的活性, 酶活性变化不大。且该酶 pH.6.4-9.6 之间仍 50% 以上的活性。说明该酶在弱酸到强碱的范围内都有较高酶活, 该酶使用范围较广。

酶在 55℃ 至 60℃ 之间保温 20min, 酶活力比较稳定, 仍有较高的活性。但是温度高于 60℃, 酶就比较容易丧失活性。

酶在 pH6.0-9.0 范围内保持较稳定的活性, 当 pH 低于 6.0, 酶活较低, 可以认为是一个碱性酶。

该酶米氏常数 K_m 值为 0.00775mg/ml, 相对于其他普鲁兰酶而言较低, 说明该普鲁兰酶对底物具有较好的亲和性, 最适底物在较低浓度就能达到较好的催化效果。

Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} 对酶有较强的激活作用, Ba^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} 和 Hg^{2+} 对酶有一定的抑制作用, 其中, Ba^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} 对酶的抑制作用较强。

各淀粉原料作为底物的酶活力大小为: 普鲁兰糖 > 可溶性淀粉 > 糯米淀粉 > 玉米淀粉 > 支链淀粉 > 马铃薯淀粉。

因此, 菌株 BCT-1 所产普鲁兰酶属于碱性酶, 因为该酶的活性较高, 与底物亲和力较强, 可在洗涤剂制造加工等工业应用方面有很大的前景。

第五章 菌株 BCT-1 的分类鉴定

5.1 材料与方法

5.1.1 菌株来源

实验室自分细菌, 编号为 BCT-1。

5.1.2 试剂

蛋白胨、酵母粉同 2.1.2; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (天根公司); Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega)。

5.1.3 实验仪器

灭菌锅 (HVE, 日本 Hirayama 公司); 高速冷冻离心机 (Sigma2-16, 德国 Sigma 公司); 精密数显酸度计 (Delta320-S, 上海梅特勒-托利多仪器厂); 电子天平 (AR2140, 奥豪斯国际贸易有限公司); 数字显示电热培养箱 (宁波海曙赛福实验仪器厂); 高压蒸汽灭菌锅 (HVE, 日本 Hirayama 公司); 自动双重纯水蒸馏器 (1810B, 上海晶凌玻璃有限公司); 恒温摇床 (HQ45HYA, 中国科学院武汉科学仪器厂); 水浴锅 (LVF6, Grant Instruments(Cambrige)Ltd); 电热恒温干燥箱 (Q/BKYY31-2000, 上海跃进医疗器械厂)、无菌操作台 (FD-01, 苏州净化设备厂); 紫外分光光度计 (Spectrumlab 53 Power, 中国 Leng Tech 公司); 电子显微镜 (XS-212, 南京江南光电 (集团) 股份有限公司)。

5.1.4 培养基

培养基配制: 见 2.1.4。

5.1.5 实验方法^[86-87]

5.1.5.1 培养形状及形态观察

5.1.5.1.1 BCT-1 在平板培养基的观察

挑取少量单菌落在固体培养基上划线, 置于 28℃ 恒温箱中培养, 培养 36-48h 后观察结果。主要记录形状和大小、颜色和光泽、表面是否隆起、边缘的形状、黏度和培养基颜色等性状特点。

5.1.5.1.2 BCT-1 在发酵液体培养基中的观察

挑取少量单菌落接入 NA 液体培养基中, 置于 28℃ 恒温摇床中培养 36-48h 观察结果。主要观察生长量、生长情况、有无沉淀和特殊气味等性状特点。

5.1.5.1.3 细菌运动的观察

配制半固体培养基, 用接种针沾取菌从培养基顶部针刺接种, 深度约为 3-5cm, 接种后放入 28℃ 培养 36-48h 后, 观察结果。

5.1.5.1.4 革兰氏染色法

革兰氏染色法采用的是结晶紫草酸铵染色法。革兰氏染色法一般包括初染、媒染、脱色、复染等四个步骤，具体操作方法如下：A、涂片固定；B、草酸铵结晶紫染 1-2 分钟，自来水冲洗；C、加碘液覆盖涂面染 1 分钟，水洗，用吸水纸吸去水分；D、加 95%酒精数滴，并轻轻摇动进行脱色，30 秒后水洗，吸去水分；E、蕃红染色液复染 1 分钟后，自来水冲洗。干燥，镜检。革兰氏阳性反应的细菌染成紫色，革兰氏阴性反应的细菌染成红色。

5.1.5.1.5 芽孢染色

采用孔雀绿藏红法。具体操作方法如下：A、将培养 24 小时左右的待测菌，作涂片、干燥、固定。B、滴加 3-5 滴孔雀绿染液于已固定的涂片上。C、用木夹夹住载玻片在火焰上加热，使染液冒蒸汽但勿沸腾，切忌使染液蒸干，必要时可添加少许染液。加热时间从染液冒蒸汽时开始计算约 4-5 分钟。D、倾去染液，待玻片冷却后水洗至孔雀绿不再褪色为止。E、用番红水溶液复染 2 分钟，水洗。F、待干燥后，置油镜观察。染色结果芽孢呈绿色，菌体呈红色。

5.1.5.2 生理生化鉴定

5.1.5.2.1 最适生长温度和最适生长 pH

通过测定发酵液的 OD_{480nm} 来确定菌株的生长量。将菌株 BCT-1 接种于 50ml 种子培养基中，于 250ml 的三角瓶中振荡培养 48hr，设定培养温度为 40、50、60、70、75 和 80℃。以不接菌株的培养基作为空白对照。

用缓冲液配制液体培养基，醋酸缓冲液(0.2M, pH3.7-5.5)；磷酸缓冲液(0.2M, pH6.0-8.0)Tris-HCl 缓冲液(0.05M, pH7.0-11.0。培养温度设置为 30℃，培养时间为 48hr。

5.1.5.2.2 细菌的耐受性测定

分别配制含有 1%，3%，5%，7%，9% NaCl 的液体培养基，加入 OD₆₀₀0.6ABS 的 500μl 菌悬液置于 28℃摇床中培养 36-72h，定期测定浑浊度。

5.1.5.2.3 细菌的好氧性和厌氧性

采用 HL 测定法进行测定：待培养基凝固后，用针刺接种 BCT-1，取两管接菌上面加一层石蜡油与凡士林混合物，深度约 1cm，用来隔绝空气；另外两管接菌的则不加石蜡油和凡士林混合物。同时，分别用两管不接菌的也不加石蜡油和凡士林混合物，两管不接菌的加石蜡油和凡士林混合物作为对照。在 28℃下培养，观察记录结果。

5.1.5.2.4 细菌对碳素化合物的利用和分解

主要测定 BCT-1 对葡萄糖，蔗糖，乳糖，麦芽糖，甘露醇，果糖，鼠李糖，甘露糖，木糖，普鲁兰糖这 9 种常用碳素类化合物的分解利用情况。每组设 3 个试管，试管 1 为 4.5ml 组合培养液，1ml10%灭菌的糖溶液和 5ul 摇菌培养至 OD₆₀₀ 达 0.6-0.8ABS 的菌悬液于试管中；1 号和 2 号为一次重复实验，3 号为空白对照，只加入 4.5ml 组合培养液

和 1ml10%灭菌的糖溶液。所有试管都置于 28℃ 的培养箱中进行培养 36-72h 后, 观察结果。

5.1.5.2.5 甲基红试验和 VP 试验

甲基红试验: 配制蛋白胨葡萄糖培养液, 灭菌 (121℃, 15min) 后, 用接种针沾取单菌落接入培养液中, 在 28℃ 下培养 48-96h 后, 取以上培养液 5ml, 加入甲基红试剂测定, 未接菌的培养液作为空白对照。

VP 试验: 用接种针沾取单菌落接种于灭菌 (121℃, 15min) 后的蛋白胨葡萄糖培养液中, 28℃ 下培养 2-4 天, 按每毫升加 0.1ml 40%KOH (含 0.3%的肌酸) 溶液, 置 48-50℃ 水浴 2 小时, 充分摇动后观察结果, 未接种的培养液作为对照。

5.1.5.2.6 硝酸盐的还原和反硝化实验

硝酸盐的还原: 将含有硝酸盐的培养液中接种待测的细菌, 培养 2-5 天后加入 Griess-Llosvary 试剂测定其中是否有亚硝酸盐, 未接种的培养液作为对照。

反硝化实验: 含 0.1%KNO₃ 的肉汁胨培养基调 pH7.2 至 7.4, 分装 5ml 到试管, 121℃ 灭菌 30min, 接菌后用灭菌凡士林封管。培养 7 天。阳性: 有气泡。

5.1.5.2.7 硫化氢的产生

将待测菌体穿刺接种到含有硫化氢指示剂 (如氯化铁) 的培养基中 28℃ 培养 2-4 天, 观察结果, 未接种的培养基作为对照。

5.1.5.2.8 吲哚的产生

采用 Kovacs 测定法进行测定。在培养 48h 后的蛋白胨水培养基中加入 3-4 滴乙醚, 摇动数次静置 1-3min, 待乙醚上升后, 沿试管徐徐加入 2 滴吲哚试剂, 在乙醚和培养物之间产生红色环状物为阳性反应。

5.1.5.2.9 淀粉水解

在一般肉汁胨琼胶培养基中加 0.2%的可溶性淀粉, 测定的细菌用划线的方法接种在平板上, 培养 2-5 天后在琼胶平板上加一层碘液, 观察测试结果。

5.1.5.2.10 氧化酶反应和接触酶反应

氧化酶反应: 培养皿中放入滤纸, 加入适量的 1%盐酸四甲基对苯撑二胺试剂, 用玻棒挑取 NA 培养基上的新鲜培养的细菌, 涂在滤纸上, 观察结果。不可用移植环或移植针挑取细菌, 不然可能产生假阳性反应。

接触酶反应: 取一环培养 24h 的菌体, 涂在干净的载玻片上, 加一滴 3%的双氧水, 观察结果。如有气泡产生, 则为接触酶阳性, 无气泡产生则为阴性。

5.1.5.2.11 明胶水解实验

蛋白胨 5g, 明胶 150g, 水 1000ml。调 pH7.4, 分装试管, 115℃ 灭菌 15min。穿刺接种, 在 20℃ 培养 14 天。阳性: 菌落周围明胶变为液体。

5.1.5.3 分子分类的研究

5.1.5.3.1 16S rDNA 扩增和序列测定

离心收集菌体后,用天根公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA 基因组,以该基因组 DNA 为模板 DNA 进行 PCR 扩增。引物以及 PCR 反应体系如表 5.1:

上游引物: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

下游引物: 5'-AAGGAGGTGATCCAAGCCGCA-3'

表 5.1 PCR 反应体系

Table 5.1 The system of PCR reaction

组分	含量 (μL)
10×PCR Buffer for ExTaq	5
10×dNTP Mixture	2
Up primer	2
Down primer	2
模板	2
Taq DNA Polymerase	1
ddH ₂ O	36
Total	50

PCR 反应条件: 94℃ 预变性 3 min, 再按照下列参数进行循环反应。94℃, 60s; 52℃, 40 s; 72℃, 1 min, 35 个循环; 72℃, 10 min。

5.1.5.3.2 PCR 产物的纯化及测序

PCR 产物用 Promega 公司的 Wizard® PCR Preps DNA Purification System 胶纯化回收试剂盒来纯化, 操作按照试剂盒说明书进行。

5.1.5.3.3 PCR 扩增产物与载体的连接

将以上回收的 1500bp 左右目标基因片断与线性克隆载体 pMD18-T 进行连接, 反应条件如下: 10×连接 buffer, 1.0 μL ; pMD18-T, 1.0 μL ; T4DNA 连接酶, 1.5 μL ; 目的基因片断, 2.5 μL ; 无菌双蒸水, 4.0 μL ; 总计 10.0 μL 。16℃ 保温反应 16h。

5.1.5.3.3 *E.coli* TOP10 的转化

将连接物通过热激法转化感受态 *E.coli* TOP10, 具体操作步骤如下:

- 1) 取两管 *E.coli* TOP10 感受态细胞 100 μL , 冰浴 5min;
- 2) 每管中加入 5 μL 重组质粒, 冰上放置 30min;
- 3) 42℃ 水浴热休克 90sec, 冰上放置 2-3min;

4) 取转化后的细胞悬液 100 μ L 转入到装有 800 μ L 预冷 LB 液体培养基的试管中, 37 $^{\circ}$ C, 150 rpm, 震荡培养 45-90 min;

5) 将 200 μ l 转化的菌液涂布于含 50mg/ml Amp, 涂有 40 μ l X-gal 和 7 μ l IPTG 的 LB 平板培养基上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养;

6) 随机挑选 10 个阳性菌落接入 5 ml 含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 150rpm, 振荡培养 8-12h;

7) 提取质粒, 进行 PCR 检测。

5.1.5.3.3 16S rDNA 扩增产物的测序及比较

将转化后经 PCR 检测的阳性菌落, 送上海生物工程公司测序。将所得 16S rDNA 序列利用 NCBI-Blast 软件在 GenBank 等数据库中进行同源性分析。

5.2 结果与讨论

5.2.1 培养性状及形态特征

菌株 BCT-1 为革兰氏染色阴性菌, 该细菌大小为(0.9-1.5) μ m \times (1.5-2.4) μ m, 菌体形状为短杆状, 无芽孢, 无运动性。平板上的菌落为白色或微黄色, 表面凹凸不平, 边缘不整齐, 菌体黏稠, 能拉丝, 如图 5.1, 5.2。菌株的生长温度为 25-40 $^{\circ}$ C, 生长 pH 为 4.0-9.0。

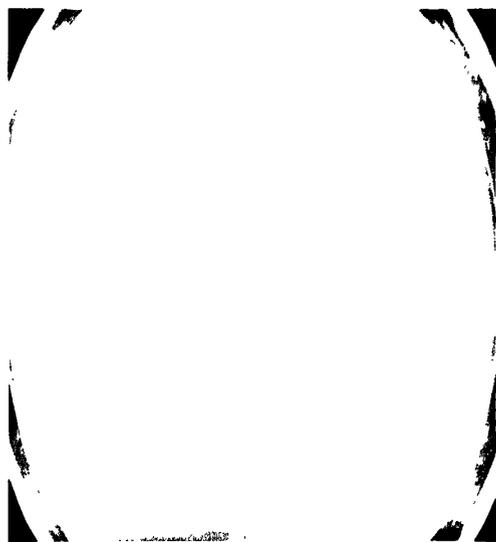


图 5.1 BCT-1 平板菌落形态

Fig5.1



图 5.2 BCT-1 革兰氏染色结果

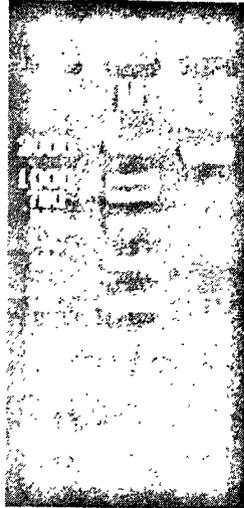
Fig5.2 The result of Gram stain for BCT-1

5.2.2 生理生化特征

菌株 BCT-1 生理生化特征如表 1 所示

5.2.3 菌株 16S rDNA 序列分析

菌株 BCT-1 的 16S rDNA 序列条带清晰可见，
为单一条带，如图 5.2 所示。



M:Marker

1: 16S rDNA PCR 扩增产物

图 5.2 BCT-116S rDNA 序列 PCR 产物结果

Fig.5.2 Electrophoresis result of Strain BCT-1 DNA

表 1 BCT-1 生理生化特性鉴定结果

Table 1 The physiological and biochemical characteristics of Strain BCT-1

测定项目	结果	测定项目	结果
需氧情况	好氧	葡萄糖利用	+
甲基红实验	+	蔗糖利用	+
V.P 实验	+	乳糖利用	+
淀粉水解	+	麦芽糖利用	+
水解明胶	-	甘露糖利用	+
接触酶实验	+	甘露醇利用	-
氧化酶实验	-	普鲁兰糖利用	+
鼠李糖利用	+	果糖利用	+
硫化氢实验	+	木糖利用	-
硝酸盐还原实验	+	耐盐性实验	大于 6%
反硝化实验	-		

测得 BCT-1 菌株 16S rDNA 序列如下：

5' —AACCTATGAAATGATTACGATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGA
 TTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAA
 GTCGAGCGGAGAGAGGTAGCTTGCTACTGATCTTAACGGCGGACGGGTGAGTAA
 TGCTTAGGAATCTGCCTATTAAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGGGATGCTAATAC
 CGCATACTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTAATAGATG
 AGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCT
 GTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAAAC
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAACCCCTGATCCA
 GCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGA
 GGAGGCTACTTTAGTTAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCA
 CCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCG
 GATTTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCC
 CCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTTCGATACTGGTTAGCTAGAGTGTGGGAGAGG
 ATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCG
 ATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGGG
 GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGC
 CGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTG
 GGGAGTACGGTTCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG
 CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGA
 CATAGTAAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTTACATACAGGT
 GCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
 AGCGCAACCCTTTTCCTTATTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACCTTTAAGGATAC
 TGCCAGTGACAAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTC AAGTCAACATGGCCCTT
 ACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCTACACAG
 CGATGTGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACT
 CGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAAT
 ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTTCACCA
 GAAGTAGCTAGCCTAACTGCAAAGAGGGCGGTTACCACGGTGTGGCCGATGACT
 GGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTTGGATCACCTC
 CTTAATCGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCCGGTTCCCT—3'

利用系统发育树软件 MEGA4.0 构建菌株 BCT-1 的系统发育树^[88-89] (图 2-2)。

从系统进化树上可以看出, 实验菌株 BCT-1 和其参照菌株 *Acinetobacter calcoaceticus* 的 16S rRNA 序列相似性为 97.8%。根据菌株 BCT-1 生理生化及分子生物学的鉴定结果, 初步断定菌株 BCT-1 为一株不动杆菌属(*Acinetobacter*)的一个种, 我们命名 *Acinetobacter*

sp.BCT-1。将其 16S rDNA 序列提交到 GenBank 得到的核苷酸序列的基因库登录号 (accession number) 为 HM068367。由以上实验数据显示该菌株可能是个新种, 但是仍需要进行近一步的实验证实。

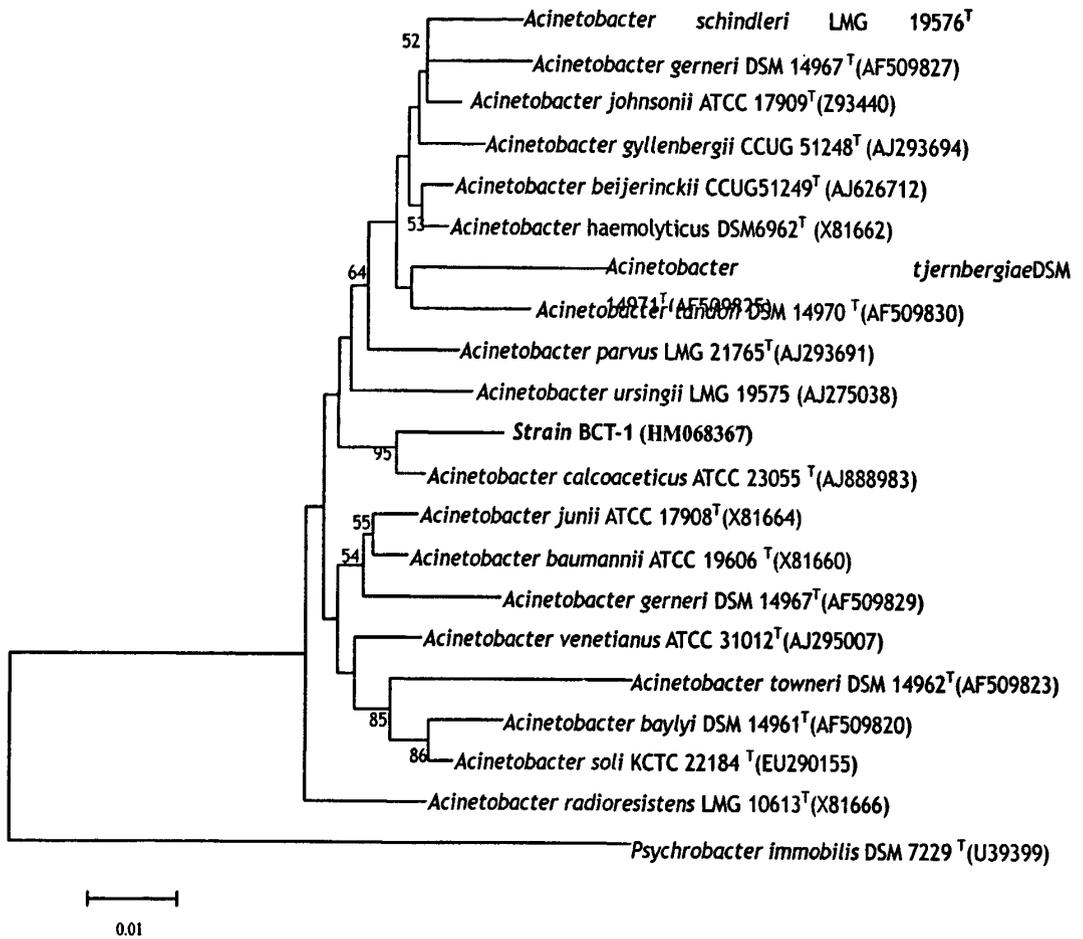


图 5.3 依据 16S rDNA 基因序列构建的菌株 BCT-1 和相关菌种的系统发育树

Fig.5.3 The phylogenetic tree of BCT-1 and related bacterial species, constructed according to 16S rDNA gene sequence with MEGA4.0 software

5.3 小结

在菌株的分类鉴定中, 我们通常以具体的形态观察, 生理生化特征再加以分子手段如 16S rDNA, DNA-DNA 杂交等方法作为鉴定指标。由于 16S rDNA 序列在生命的进化过程中, 具有一定的保守性且分子序列变化较为缓慢, 因此, 16S rDNA 序列分析在细

菌种属鉴定和分类研究中具有重要的作用。16S rDNA 序列分析能够快速, 可靠的鉴定菌种的类型。

在本研究中面对普鲁兰酶产生菌 BCT-1 进行了形态学特征、生理生化指标和 16S rDNA 序列的同源性比对, 该菌的形态特征和理化指标均符合不动杆菌属的特性, 且 16S rDNA 序列的同源性 with 模式菌株 *Acinetobacter calcoaceticus* 的同源性有 97.8%, 因此将该菌初步鉴定为不动杆菌属(*Acinetobacter*), 暂命名为 *Acinetobacter.sp.*BCT-1。在已知的普鲁兰酶产生菌中, 还没有关于不动杆菌产生普鲁兰酶的报道, 该菌株的发现具有一定的理论和实践意义。

第六章 结 论

普鲁兰酶是脱支酶类的一种淀粉水解酶,与其他淀粉酶配合使用时能够提高淀粉的利用率。且在洗涤剂制造工业中,是一种常用的添加剂。本次实验从海南儋州,三亚,海口等地的温泉,海洋以及农田中分离筛选得到 62 株具有普鲁兰酶活性的菌株,采用 DNS 法测定了这些菌株的普鲁兰酶活力,得到一株初始酶活力为 0.357U/ml 的普鲁兰酶出发菌株 BCT-1。通过菌株形态观察,生理生化实验以及 16S rDNA 序列分析,初步鉴定该菌株为不动杆菌。这是首次报道了不动杆菌菌属产普鲁兰酶,提供了新的可开发的酶资源。

通过对菌株 BCT-1 发酵条件单因素分析结果,确定了玉米淀粉、酵母膏和 pH 值三个因素对产酶具有较大的影响,并根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理以上面 3 个因素为自变量,以普鲁兰酶活力为响应值,进行了三因素三水平的 RSA 试验。并根据 RSA 试验实验结果确立了相应的模型:

$$Y_1 = 2.3743 + 0.05995X_1 + 0.4859X_2 - 0.5768X_3 - 0.6632X_1^2 - 0.9442X_1X_2 - 0.6914X_1X_3 + 0.5075X_2^2 + 0.5347X_2X_3 + 0.5798X_3^2$$

对方程进行求解,得到了最佳的培养基配方为:玉米淀粉质量浓度为 19.97g/L,酵母膏质量浓度为 10.45g/L, pH 值 5.4,其他成分不变。优化后的培养基使该酶的酶活力迅速提高,从初始的 0.357U/ml 提高到了 2.68 U/ml,提高了 7.15 倍。

为了得到较纯的普鲁兰酶,我们运用硫酸铵沉淀、Sephadax G-75 凝胶柱层析以及 DEAE sepharose Fast Flow 强阴离子柱层析等方法对菌株 BCT-1 的发酵液进行酶的分离和纯化,将得到的样品经 SDS-PAGE 电泳检测后,得到单一条带,分子量大约为 58 KDa,电泳回收即可获得纯酶蛋白。纯化后的酶的比活力由最初的 1.57U/mg 增加到 9.97U/mg,纯化倍数为 6.35,回收率为 6.2%。

通过对该普鲁兰酶的酶学性质研究,菌株 BCT-1 所产普鲁兰酶的最适作用温度为 50℃,酶在 55℃ 下保温 20min 后仍保存有较高的原酶活性,60℃ 和 65℃ 下的半衰期分别为 10min, 8min; 该酶最适 pH 值为 8.2,说明该酶是碱性普鲁兰酶。该酶的 K_m 值为 0.00775mg/ml。Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ 对酶有较强的激活作用, Ba²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Zn²⁺ 和 Hg²⁺ 对酶有一定的抑制作用,其中, Ba²⁺, Co²⁺, Hg²⁺ 对酶的抑制作用较强。在底物特异性实验中,各淀粉原料作为底物的酶活力值大小依次为:普鲁兰糖 > 可溶性淀粉 > 糯米淀粉 > 玉米淀粉 > 支链淀粉 > 马铃薯淀粉,以上实验说明 BCT-1 所产普鲁兰酶为耐热碱性酶,在工业方面可以有很大的应用前景。

参考文献

- [1] 张田力.碳水化合物化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1988.
- [2] 惠斯特勒等编, 王维文等译.淀粉的化学与工艺学[M]. 北京: 中国食品出版社, 1988.
- [3] 张树政.酶制剂工业[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [4] Sindhu GS, Sharma P, Chakrabarti T, Gupta. JK. Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase[J]. *Enzyme and Microbial Technology*.1997, 24:584-589.
- [5] Chi Z, Liu J, Zhang W. Trehalose accumulation from soluble starch by *Saccharomyces fibuligera* sdu[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, 28:240-245.
- [6] Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, et al. Advances in microbial amylases[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*.2000, 31:135-152.
- [7] 金羽中.普鲁兰酶的研究开发[D].江苏: 无锡轻工业大学, 1998
- [8] 冼雪芬, 陈穗, 何松.酶制剂在淀粉加工中的应用[J]. *广州食品工业科技*, 1999, 15(3): 56-59.
- [9] Bent Frode Jensen, Barriec Nomran. *Process Biochemistry* [J].1984, 8: 129-134
- [10] Bai FW, Anderson WA, Moo-Young M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feed stocks[J]. *Biotechnology advances*.2008, 26: 89-105.
- [11] Nakamura Y, Yuki K, Park S Y, et al. Carbohydrate metabolism in the developing endosperm of rice grains[J]. *Plant and Cell Physiology*.1989, 30: 833-839.
- [12] Suzuki T, Hatagaki K, Oda H. Hyperthermostable pullulanase produced by an extreme thermophile, *Bacillus flavocaldarius* KP1228 and evidence for the proline theory of increasing protein thermostability [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*.1991, 34: 707-14.
- [13] Bender H, Wallenfels K. Untersuchungen an pullulan[J]. *J. Biochem. Z.*, 1961: 79-95.
- [14] Bertoldo C, Armbrachi M, Becker F, et al. Cloning, Sequencing and characterization of a heat-and alkali-stable type I pullulanase from *Anaerobranca gottschalkii*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004: 3407-16.
- [15] Deweer, Amory. A Pullulanase producing microorganism [P]. US Patent, 5817498 (1998)
- [16] Harada T. Debranching enzyme and its industrial significance in the production of sugars from starch[J]. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1984, 1: 29-63.
- [17] Gunjia SZ, Marshall JJ, Smith EE, et al. A glycogen-debranching enzyme from *Cytophaga* [J]. *Febs Lett*, 1970: 96-100.
- [18] 周瑞芳, 彭风鏞.脱支酶的性质及在食品中的应用[J].*郑州粮食学院学报*.1993, 4: 26-32.
- [19] Martins S. Extracellular isoamylase produced by the yeast *Lipomyces kononenkoae* [J] *Applied and Environmental Microbiology* .1982: 1253-1257.
- [20] Taniguehirl, Sakano, YOhnishiM OkadaG .Pullulanase[J]. *TanPakushitsu KakusanKoso*.Jul: 1985,

30(8): 989-92.

[21] Jespersen.H.M, MaeGregor EA, Henrissat B, Sierks MR, Svensson B. Starch and Glycogen debranching and branching enzymes: Prediction of structural features of the Catalytic (bet/alpha) 8-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzyme [J]. Journal of Protein Chemistry.1993, 126: 791-805.

[22] 马海蓉, 李艳, 高文慧等.普鲁兰多糖生产菌种及其在农产品保鲜中的应用[J].河北省科学院学报.200.02

[23] French D et al. Biochemistry [J].1965, 4: 486.

[24]Suzuki Y, Chishirom M. Production of Extracellular Thermophilic Pullulanase by anyolytic obligatory Thermophilic soil Bacterium Bacillus Stearo thermophilus KP1064. Applied Microbiology and Biotechnology. 1983, 34: 707-714.

[25] Renneberg R, Kaiser G, Scheller F, et al. Enzyme Sensor For Pullulan And Pullulanase Activity. Biotechnology Letters.1985, 11, 809-812.

[25] Abdullah M, Substrate specificity of pullulanase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1970, 137: 483-493.

[26]Nomran BE. A novel debranching enzyme for application in the glucose syrup industry [J]. Starch, 1982, 34: 340-346.

[27] Lee EYC, Whelan WJ. Glycogen and starch debranching enzyme[J].Academic Press .New Yoek.1971, 191-234.

[28] 周瑞芳, 荚恒龙.稻米中普鲁兰酶的纯化与性质的研究[J].中国粮油学报.1994, 22: 11-15.

[29] Dominggus M, Takafumi I, Wataru. H et al.Over expression, purification and preliminary X-ray analysis of pullulanase from Bacillus subtilis strain168[J]. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications. 2006, 62: 381-384

[30] Kurt W, Peter F, Hartmut N, Hans B, Dietmar L. The enzymic synthesis, by transglucosylation of a homologous series of glycosidically substituted malto-oligosaccharides, and their use as amylase substrates[J]. Carbohydrate Research. 1978,61(1): 359-368.

[31] Brock TD, Freeze H. Thermus aquaticus gen.n.and sp.n. a nonsporulating extreme thermophile[J]. Journal of Bacteriology.1969, 98 (1): 289-297.

[32]Takasaki.Y. Productions and utilizations of β -amylase and pullulanase from Bacillus cereusvar.mycoides [J]. Agricultural Biology and Chemistry. 1976, 40(8): 1515-1522.

[33] 程池.普鲁兰酶 Promozyme200L 及其生产菌种[J].食品与发酵工业.1992(6): 72-76.

[34] 李红, 孙红军等.国内外普鲁兰酶市场分析及预测报告(2003/2004 年度)[R].北京: 理德斯普企业管理咨询有限公司, 2004

[35] Yohei A, Dong-Yeol L, Yu-You L, Tatsuya N. Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heat-pretreated natural microflora[J]. International

Journal of Hydrogen Energy.2009, 34(13): 5365-5372.

[36] Adrian RP, Hugh WM, Roy MD. A highly stable pullulanase from *Thermus aquaticus* YT-1[J]. Enzyme and Microbial Technology. 1986, 8(11):668- 672.

[37]Kim CH, Nashiru O, Ko JH. Purification and biochemical characterization of Pullulanase type1 from *Thermus caldophilus* GK-24[J]. FEMS Microbiology Letters. 1996, 138(2-3): 147-152.

[38] Gantranikian.C.herzberg, G.gottschack. Covalent modification of citrate lyase ligase from *Clostridium sphenoides* by phosphorylation/dephosphorylation[J]. Applied and Enviromental Microbiology, 1987, 53: 1668-1673.

[39]Kuriki.T, Okada.S, Imanaka.T. New type of pullulanase from *Bacillus stearothermophilus* and molecular cloning and expression of the gene in *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Bacteriology. 1998, 23: 123-126.

[40]Saha.BC, Lamed.R, Lee.CY, et al.Characterization of an endo-acting amylo pullulanase from *Thermoanaerobacter* strain B6A[J]. Applied and Environmental Microbiology.1990, 54(4): 881-886.

[41] Suzukl Y, Hatagaki K, Oda H.Hyperthermostable pullulanase produced by an extreme thermophile, *Bacillus flavocaldarius* KP1228, and evidence for the proline theory of increasing, protein thermostability [J].Appl Microbiol Biotechnol, 1991, 34 (6): 707-714.

[42] Brown.SH, Kelly RM. Characterization of amylolytic enzymes, having both α -1, 4 and α -1, 6 hydrolytic activity from the thermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *Themococcus litoralis*[J]. Applied and Environmental Microbiology.1993 59(8): 2614-2621.

[43] Rudiger A, Jorgensen PL. An tranikian G Isolation and characterization of a heat-stablePullulanase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *EScheriehia coli* [J]. Applied and Environmental Microbiology.1995, 61 (2): 567-575.

[44] Kim CH, Kim YS. Substrate specificity and detailed charactertion of a bifunctional Amylase Pullulanase enzyme from *Bacillus circulans* F-2 having two different active sites on one Polypeptide [J].European Journal of Biochemistry.1995, 227(3): 6876-6893.

[45]Dufner, Fiona. Cloning, sequence and expression of thermostable amylopullulan of *Desulfurococcus mucosus* and its use in the production of sweeteners and ethanol from starch[J].U.S.US6043074(2000), CAI32: 233594f (2000).

[46] 唐宝英, 朱晓慧, 刘佳.耐酸耐热普鲁兰酶菌株的筛选及发酵条件的研究[J].微生物学通报, 2001, 28(1): 39-43.

[47]Yubihara, Nobuhiro, Nakamura, Nouyuki, Horikoshi, Koki. Molecular cloning of gene for Pullulanase of *Theumus*[J]. Jpn. KokPi Tokkyo Koho JP 0723, 783 (1995), CA 123: 4590y (1995).

[48]LeeSP, Morikawa M, Takagi M, et al.Cloning of the aapT gene and characterization of its Product, ox-amyase-Pullulanas (AapT), from Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus.sp.* Strain XAL601[J] Applied

and Environmental Microbiology. 1994, 60 (10): 3764-73.

[49] 马晓军, 张晓君, 王锐等.碱性普鲁兰酶产生菌选育和发酵条件的研究[J], 西北植物学报.2002, 22(4): 883-8.

[50] Bertoldo C, Ambrecht M, Beeker F, et al. Cloning, Sequencing and characterization of a heat-andalkali-stable typeI Pullulanase from Anaerobranca gottsehalkii [J]. Applied and Environmental Microbiology. 2004, 70 (6): 3407

-16.

[51] Eijiro.Tomimura.Thermoduric and aciduric pullulanase enzyme and method for its production[J]. United States Patent, 1991: 5055403.

[52] Deweer, Philippe, Amory, Antoine. Pullulanase producing microorganisms[J]. United States Patent, 1998: 5817498.

[53]Kim.TJ, Kim.JW, park KH. Molecular cloning and characterization of thermostable maltogenic amylase and Pullulanase from Thermus strain IM65OI [J].F.Sci.Biotech, 1998, 9(3): 188-194.

[54]Yato K, Megumi Y, et al.Cloning and nucleotide sequence of the pullulanase gene of Thermus thermophilus HB8 and Production of the enzyme in Escherichia coli [J].Bioscience Biotechnology Biochemistry. 2001, 65(9): 2090-2094.

[55] Dufner, Fiona.Cloning, sequence and expression of thermostable amylopullulanase of Desulfurococcus smucosus and its use in the production of sweeteners and ethanol from starch[J].U.S.US6, 043, 074(2000); CA132: 233594f(2000).

[56]Bigard-Frantzen H, Svendsen A.Genetic engineering of starch-debranching enzymes for improved thermostability and specificity. PCTInt.Appl.WO00001, 796(2000); CA132: 90065w (2000).

[57]Okada, Shigitaka.etal.Thennostable pullulanase gene sequencing.Jpn.Kokai Tokyo Koho JP 0499, 489(1992); CA117: 144764j (1992).

[58] Muroka , Y. Pullulanase gene of Klebsiella and its cloning and sequencing.Jpn.Kokai TokkyoKohoJP63, 245, 676(1988); CA: 111: 51701x(1989).

[59]Yubihara N et al.Heat-stable pullulanase of thermophilic Theumus and itsGene cloning and expression.Jpn.KokaiTokkyoKohoJP0174, 991(1989); CA111: 210110x(1989).

[60] Melasniemi, Hannes, Paloheimo, Maria Tuulikki.Thermostable alpha-amylase pullulanase gene cloning and expression.Eur.Pat.Apply.EP402, 092(1990);CA115: 107746t(1991).

[61]Yubihara N et al.Thermostable pullulanase gene of Bacillus Stearother/minphilus and its recombinant preparation.Jpn.Kokai Tokkyo Koho JP0223, 872(1990); CA113: 130734e(1990).

[62]Coleman, RD, McAlister, MP. Plasmids containing a gene coding for a thermostable pullulanase, Escherichia coli and Bacillus subtilis transformed with the plasmids and process for preparing thermostable pullulanase.U.S.US4, 612, 287(1986); CA105: 224626h (1986).

- [63] Ara K et al. Cloning of gene for Bacillus alkaline pullulanase and manufacture of the enzyme with recombinant microorganism. PCT Int. Appl. WO9419, 468(1994); CA121: 223664n (1994).
- [64] 普鲁兰酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的高效表达. 云南师范大学硕士毕业论文, 2005.
- [65] 陈陶声, 胡学智. 酶制剂生产技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 1994.
- [66] 张泽生, 曹力心, 张建昌. 酶法制备马铃薯抗性淀粉的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(5): 57-59.
- [67] 李光磊, 李新华. 小麦抗性淀粉的制备研究[J]. 粮油食品, 2006, 14(3): 31-33.
- [68] 王威, 贾树彪, 终晓芳. 燃料乙醇的液化糖化连续发酵工艺[J]. 酿酒, 2006, 33(1): 55-57.
- [69] 韩德权, 章佳佳. DNS 法在普鲁兰多糖发酵液中糖测定的研究[J], 食品工业科技, 2008, (2): 285-290.
- [70] 葛宇, 许时婴, 王璋. 响应面优化冰淇淋复配稳定剂配方研究[J]. 食品科学, 1995, 16(11): 5-9.
- [71] Thompson DR. Response surface experimentation [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 1982, (6):155.
- [72] 白秀峰. 发酵工艺学[M]. 中国医药科技出版社, 2003.
- [73] Audet P, Paquih C, Laeroix C. Sugar utilization and acid production by free and entrapped cells of streptococcus salivarius spp. Thermophilus lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus and lactococcus lactis. spp. lactis in a whey permeate medium [J]. Applied and Environmental Microbiology. 1989, (55): 185-189.
- [74] Paul DG, Hill C. Surviving the Acid Test: Responses of gram-positive bacteria to low pH[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2003, 67(3): 429-453.
- [75] 高年发, 苏敬红, 张建. L-嗜热乳酸杆菌 T-1 的 5L 发酵罐的发酵条件研究[J]. 中国酿造, 2006, (3): 11-13.
- [76] 许庆龙, 许晓鹏, 刘立明等. 环境条件对丙酮酸分批发酵的影响[J]. 生物加工过程, 2009, 7(1): 13-18.
- [77] 吴有炜. 实验设计与数据处理[M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2002.
- [78] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [79] Chunyuan W, Christophe C et al. Enzymatic properties and regulation of ZP1, the maize pullulanase-type starch debranching enzyme[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2002, 406:21-32.
- [80] Spreinat A, Antranikian G. Purification and properties of a thermostable pullulanase from Clostridium thermosulfurogenes EM1 which hydrolyses both α -1, 6 and α -1, 4-glycosidic linkages[J]. Applied Microbiology and Biotechnology. 1990, 33: 511-518.
- [81] Obi SKC, Odibo FJC. Some properties of a highly thermostable alpha-amylase from *Thermoactinomyces* sp [J]. Canadian Journal of Microbiology. 1984, 30: 780-785.
- [82] Reddy PRM, Swamy MV, Seenayya G. Purification and characterization of thermostable β -amylase

and pullulanase from high-yielding *Clostridium thermosulfurogene* SV2[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.1998:14, 89-94.

[83] 唐嘉. 云南热泉亚栖热菌产耐热普鲁兰酶, 云南大学硕士毕业论文, 2007.

[84] Mercier C, Franta BM, Whelan WJ. An improved purification of cell-bound pululanase from *Aerobacter aerogenes*[J]. *European Journal of Biochemistry*. 1972, 26, 1-9.

[85] RE 布坎南, NE 吉本斯.伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M].北京: 科学出版社, 1984.

[86] 东秀珠, 蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京: 科学出版社, 2001.

[87] Wisotzkey JD, Jurtschu P Jr, Fox GE, Deihnar G, Poralla K. Comparative sequence analyses on the 16SrRNA(rDNA) of *Bacillus acidocaldarius* *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal of recreation of a new genus *Alieyelo* bacillusgen.nov[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*.1992, 42(2):263-269.

[88]Kumar S, Tamura.K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*. 2004, 5(2): 150-163.

致 谢

研究生生活即将结束，谨向所有悉心指导、帮助和关怀过我的老师、亲人、同学和朋友致以最诚挚的谢意！

感谢我的导师热带农业生物技术研究所以彭明研究员近3年来对我的关心和培养，彭老师为我的成长付出了大量的汗水和心血。在指导硕士论文期间，导师渊博的知识，严谨的治学态度和忘我的工作精神使我深受感染，这将成为我获益终身的宝贵财富，并将在未来的工作学习生活中继续激励我走好人生的每一步，再一次感谢彭老师对我的眷顾与照料！

感谢孙海彦老师在实验中给予的指导和帮助，从实验设计，操作过程及论文写作、甚至生活琐事，孙老师的关怀无微不至。

感谢生物技术研究所以C401全体老师的栽培、关心和帮助。

在此还要感谢实验室的温玮师姐，感谢黄通谋、尹一伊、隋金蕾、王成、黄珍、陈博、黄超、胡兵、王甲水、王园、黄振等同级学友和江林、漆雪琳、王茜等师妹在工作、生活及学习中提供的无私帮助！

最后，特别感谢我的亲人和朋友在这三年中给予我的理解、鼓励和支持！

