

文章编号:1673-1689(2009)02-0243-07

嗜热古菌 *Thermococcus* sp. HJ21 产高温 普鲁兰酶条件和酶学性质

徐金利^{1,2}, 吕明生², 王淑军^{2,3}, 李华钟^{*1,4}, 孙玉英², 房耀维²

(1. 江南大学 教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005; 3. 南京农业大学 食品科技学院, 江苏 南京 210095; 4. 江南大学 医药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 对一株分离自热液口的超嗜热古菌(*Thermococcus* sp. HJ21)菌株产普鲁兰酶的条件及酶学性质进行了研究。结果发现:该菌株在18 h产酶量达到最高。在发酵温度为88 ℃、培养基初始pH 6.5,以及NaCl质量浓度为2.5 g/dL时,产酶较高。麦芽糖、酵母粉和蛋白胨有利于普鲁兰酶的产生。该酶的最适作用温度为95 ℃,在80~100 ℃之间仍可保持较高的酶活性;该酶具有较好的热稳定性,100 ℃保温2 h,仍有50%以上的残余酶活。该酶的最适作用pH为6.0,并且在pH 5.0~7.0之间可以保持较高酶活性;在pH 5.0~7.0之间较稳定,在pH 6.5时稳定性最好。Ca²⁺和Na⁺对普鲁兰酶具有较强的激活作用,而Al³⁺、Ni²⁺、Hg²⁺、Cu²⁺等则强烈抑制酶的活性。
关键词: 超嗜热古菌 HJ21; 普鲁兰酶; 酶学性质

中图分类号:TQ 920.1

文献标识码:A

Production and Characterization of Pullulanase from Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus* sp. HJ21

XU Jing-li^{1,2}, LU Ming-sheng², WANG Shu-jun^{2,3},
LI Hua-zhong^{*1,4}, SUN Yu-ying², FANG Yao-wei²

(1. Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiangsu key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 3. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 4. School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The paper deals with the production conditions and characterization of pullulanase from *Thermococcus* sp. HJ21. It was found that the addition of maltose, yeast extract and peptone can enhance more enzyme production and the optimum environmental conditions for pullulanase were 88 ℃, pH 6.5 and 2.5% NaCl. The pullulanase production from *Thermococcus* sp. HJ21

收稿日期:2008-01-15

基金项目:国家自然科学基金项目(40746030),江苏省“六大人才高峰”第三批资助项目(06-A-017);江苏省教育厅自然科学基金项目(06KJB550004)。

* 通讯作者:李华钟(1958-),男,山东烟台人,工学博士,教授,博士生导师,主要从事微生物遗传育种和生物制药研究。Email:hzhli@jiangnan.edu.cn

exhibits a high relative activity at 80–100 °C, pH 5.0–7.0, and the highest activity was achieved at 95 °C and pH 6.5. the enzyme could stimulated by Ca^{2+} and Na^+ but inhibited by Hg^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} .

Key words: *Thermococcus* sp. HJ21, Pullulanase, characterization

普鲁兰酶(Pullulanase, EC. 3. 2. 1. 41)是一种能够专一性水解普鲁兰多糖和其他多糖如淀粉、糖原和极限糊精中的 α -1, 6糖苷键,从而剪下整个侧枝,形成直链淀粉的脱支酶。普鲁兰酶可以将最小单位的支链分解,最大限度地利用淀粉原料。因此,它在淀粉加工工业中有着重要的用途。在淀粉加工过程中,普鲁兰酶和糖化酶协同作用时,可以加速糖化过程,提高糖化率;和 β -淀粉酶联合作用时,则可以大大提高麦芽糖得率^[1-3]。因而普鲁兰酶作为独特的降解 α -1, 6糖苷键的酶类,在食品、洗涤剂、纺织等行业中被广泛应用^[4]。

目前应用得最广、产量最大的普鲁兰酶源自丹麦NovoNordisk公司获得的嗜酸性分解普鲁兰多糖芽孢杆菌(*Bacillus acidopullulyticus*),其最适温度和pH分别为60 °C和5.0^[5]。由于其最适作用温度较低,因此不适用于淀粉的液化过程。从20世纪90年代起,普鲁兰酶的研究主要集中在耐热性普鲁兰酶菌株的筛选及基因的克隆与表达。随着该酶的应用发展,对极端微生物普鲁兰酶的研究日益增多。目前已经在*Pyrococcus woesei*、*P. furiosus*、*T. hydrothermalis*、*T. aggregans*、*Thermoanaerobacter ethanolicus*、*Thermotoga maritima*、*Desulfurococcus mucosus*等菌株中,成功克隆并表达了该酶的基因^[6-10]。

作者对实验室保藏的一株来自深海热液口处的菌株HJ21进行了生理生化特征和16S rDNA的分析,初步鉴定为属于热球菌属*Thermococcus*(另文报道),且发现该菌能产生高温普鲁兰酶,同时还可以产生耐高温的高温 α -淀粉酶^[11]和 α -葡萄糖糖苷酶。文中主要报道*Thermococcus* sp. HJ21产普鲁兰酶的条件和酶学性质研究,为进一步进行酶基因的克隆表达奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株

嗜嗜热古菌(*Thermococcus* sp. HJ21),由淮海工学院江苏省海洋生物技术重点实验室保藏。

1.2 培养基

改良的YPS培养基:1×base salt solution

1 000 mL,100×trace minerals solution 10 mL,质量分数1% $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5 mL,100×N-P mixture 10 mL,500×Fe EDTA solution 2 mL,Resazurin solution 5 mL,PIPE 3.35 g,酵母粉 3 g,蛋白胨 3 g,麦芽糖 5 g,硫 5 g;pH 6.5。

1.3 培养基的制备和菌株培养方法

培养基高压灭菌后,进行除氧处理。菌株用注射器以体积分数5%接种量接入改良的YPS培养基,88 °C培养9 h^[12]。

1.4 产酶条件

1.4.1 时间对产酶的影响 将菌株接入到YPS培养基中,在88 °C下静置培养36 h,每3~6 h取出测酶活力。

1.4.2 温度对产酶的影响 将菌株接入到YPS培养基中,分别在不同温度(50、60、70、80、85、88、95、100 °C)下进行产酶发酵试验,培养9 h后取出测定酶活。

1.4.3 培养基初始pH值对产酶的影响 用1 mol/L的NaOH或HCl将YPS培养基的初始pH值分别调整为3.0、4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0,在88 °C培养9 h,测定酶活。

1.4.4 培养基NaCl质量浓度对产酶的影响 在培养基中加入NaCl,使之终质量浓度分别为0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、5 g/dL,在88 °C培养9 h,测定酶活。

1.4.5 接种量对产酶的影响 菌株接种量(体积分数)分别为0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、7%和10%,进行发酵试验。

1.4.6 不同碳氮源对产酶的影响 去除培养基中的麦芽糖,分别在培养基中加入0.5 g/dL的各种碳源(葡萄糖、麦芽糖、可溶性淀粉、纤维素、果糖、木糖、乳糖、蔗糖、马铃薯淀粉),进行碳源对产酶的影响的发酵试验。去除培养基中的蛋白胨、酵母膏,分别加入0.3 g/dL的各类氮源(蛋白胨、酵母膏、酵母粉、硫酸铵、胰蛋白胨、鱼粉、酪蛋白、尿素)进行氮源对产酶影响的发酵试验。

1.4.7 正交试验设计 以蛋白胨、酵母粉、麦芽糖、时间和NaCl质量浓度为因素,设计正交试验 $L_{16}(4^5)$,进行正交试验。

1.5 酶学性质研究

1.5.1 酶的作用温度 将酶分别在 50、60、70、80、85、95、100 °C (水浴) 和 110 °C (高压灭菌锅) 温度下, 分别用 pH 6.0 的 50 mmol/L 乙酸钠溶液配制的体积分数 1.0% 普鲁兰多糖溶液作为底物, 进行酶活测定。

1.5.2 酶的热稳定性 取适量酶液(添加或不添加 Ca^{2+} , 终浓度 5 mmol/L) 分别在不同温度 (80、90、95、100 °C) 下保温 5 h, 每隔 0.5 到 1 h 取出一组样品, 迅速置于 4 °C 冰箱内, 待保温结束后统一在标准条件下测定残余酶活, 将未处理酶液的酶活设为 100%。

1.5.3 酶的作用 pH 将酶液与不同 pH 的普鲁兰多糖溶液(体积分数 1.0%) 在 95 °C 下进行酶活力测定, 不同 pH 值的缓冲液为: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH 3.0~6.0); 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 6.0~8.0); 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0~9.0); 50 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 9.0~10.0)。

1.5.4 酶的 pH 稳定性 将 50 μL 酶液与 150 μL 不同 pH 的缓冲液混合, 缓冲液为伯瑞坦-罗宾森(Britton-Robinson) 缓冲溶液^[13], pH 分别为 3.0、4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0, 在 95 °C 水浴锅中保温 4 h, 取出测定残余酶活, 将未处理酶液的酶活设为 100%。

1.5.5 金属离子和化学试剂对酶的作用 将各种金属离子与酶液混合, 使其最终浓度分别达到 1.0 mmol/L、5.0 mmol/L, 然后在 95 °C 下测酶活。将各种化学试剂与酶液混合, 使其达到预定浓度, 测定酶活。

1.6 粗酶液的制备

将发酵液用 3 层滤纸抽滤除去残余硫颗粒及杂质后, 以 10 000 r/min 离心 15 min, 除去菌体, 取上清液盐析过夜, 每 100 mL 上清液加 39.6 g 硫酸铵, 然后再以 11 000 r/min 离心 30 min, 取沉淀透析, 透析结束后以 12 000 r/min 离心 10 min, 除去杂质, 所得上清液即为粗酶液, 可置于 -40 °C 冰箱保存。

1.7 普鲁兰酶酶活测定方法

将 50 μL 酶液加入到 150 μL 1 g/dL 的普鲁兰乙酸钠缓冲液(200 mmol/L, pH 6.0) 中, 在 95 °C 水浴中反应 15 min, 用 DNS 测定还原糖量^[14]。

酶活力单位定义: 在上述条件下, 每分钟催化产 1 μmol 麦芽糖的酶量作为一个酶活力单位。

1.8 菌体生物量的测定

采用显微镜直接计数法进行菌体生物量的

测定。

2 结果与分析

2.1 产酶条件

2.1.1 时间对产酶的影响 菌株 *Thermococcus* sp. HJ21 随发酵时间的延长, 产酶量逐渐升高, 但酶的产生总是滞后于菌体的生长, 当菌体生长达稳定期后, 产酶量迅速增加, 且在培养时间为 21 h 时酶活达到高峰; 而胞内普鲁兰酶在 9 h 时产酶量最高, 随后酶活力开始下降, 到 30 h 后基本稳定。菌株的生物量在 9 h 达到最高, 与胞内酶活最高点相一致且最高值为 2.01×10^8 个/mL, 结果见图 1。

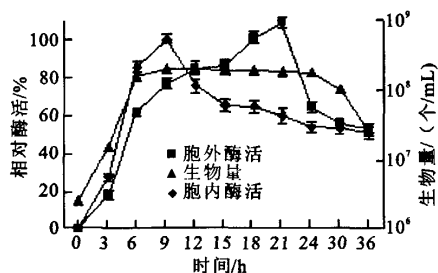


图 1 发酵时间对产酶和菌株生长的影响

Fig. 1 Effect of the time on producing pullulanase and growth of HJ21

2.1.2 温度对产酶的影响 在 88 °C 时菌株产普鲁兰酶活力最大, 说明该菌株的最适产酶温度为 88 °C, 高于或低于 88 °C 对菌株产酶能力均有一定的影响, 结果见图 2(a)。温度较低时, 由于菌株生长缓慢, 发酵周期延长, 产酶较慢。温度过高时, 菌体代谢过快, 较早进入衰亡期, 同时酶系失活较快, 导致酶活较低。

2.1.3 培养基初始 pH 值对产酶的影响 不同微生物生长的最适 pH 值是不同的, 选取 pH 值的基本原则是, 既要有利于菌体的生长, 又要有利于普鲁兰酶的产生, 在酸性条件下(pH < 5), 菌种产酶不高, 在微酸性条件下菌种产酶量相对较多, 说明发酵培养基在微酸性的初始条件下有利于产酶, 最佳产酶 pH 为 6.5 左右, 结果见图 2(b)。

2.1.4 培养基 NaCl 质量浓度对产酶的影响 HJ21 的产酶受 NaCl 质量浓度的影响较大, 其产酶最适质量浓度为 2.5 g/dL。低 NaCl 质量浓度或 NaCl 质量浓度超过 5 g/dL 时, 明显抑制普鲁兰酶的形成, 结果见图 2(c)。

2.1.5 接种量对产酶的影响 接种量对菌株产酶的影响, 集中表现在菌体生长繁殖与发酵产酶的矛盾中。接种量为体积分数 5% 时, 菌体发酵产酶最

高,结果见图2(d)。接种量过小,发酵前期菌体生长缓慢,发酵周期延长,发酵产酶高峰期滞后;接种量过大,发酵初期菌体生长繁殖迅速,营养物质多被用于菌体细胞合成,使发酵效果不明显,酶合成下降。

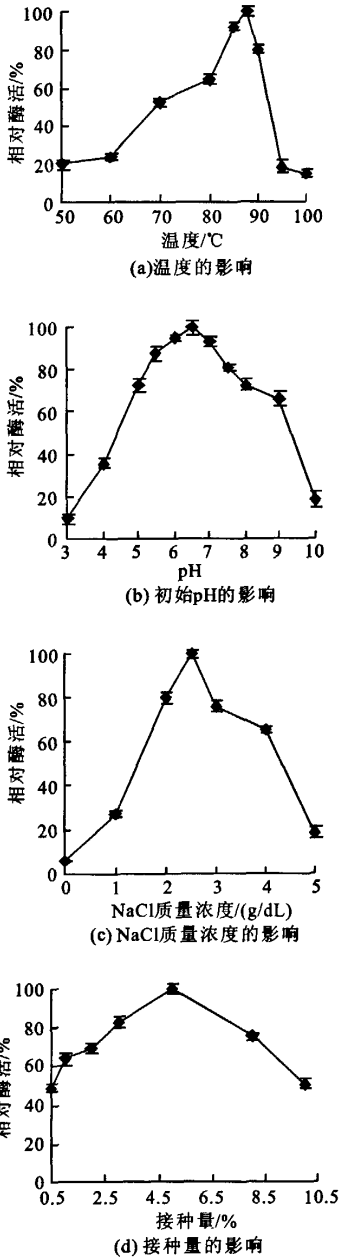


图2 产酶温度、培养基的初始pH、NaCl质量浓度和接种量对产酶的影响

Fig. 2 Effect of temperature, inoculation amount, NaCl concentration, initial pH on production of pullulanase

2.1.6 培养基碳氮源对产酶的影响

微生物对不同碳源的利用能力有所不同,不同的碳源直接影响菌株的生长,从而影响产酶量:以麦芽糖为碳源产酶效果最好,马铃薯淀粉和可溶性淀粉次之,其它碳源都可以作为有效碳源促进普鲁兰酶的合成,结果见表1。通过改变麦芽糖的添加量,结果发现麦芽糖添加量为0.5 g/dL时,产酶效果最好。

该菌几乎不能利用无机氮源,或在无机氮源上不产酶,有机氮源中酵母粉、蛋白胨是最佳氮源,为了考察混合氮源的影响,将蛋白胨与酵母粉按不同比例混合在发酵培养基中,结果发现培养基中同时添加蛋白胨和酵母粉后,更有利于酶的合成,其中以0.3 g/dL蛋白胨和0.3 g/dL酵母粉组合产酶最高,结果见表1。

表1 不同碳、氮源对 *Thermococcus sp.* HJ21 产酶的影响
Tab. 1 Effect of different carbon and nitrogen sources on the production of pullulanase

碳源	相对酶活/%	氮源	相对酶活/%
纤维素	47.46±0.57	蛋白胨	95.40±0.58
葡萄糖	41.45±0.90	酵母膏	36.41±0.62
木糖	52.77±0.27	酵母粉	100.00±0.65
淀粉	95.91±0.22	硫酸铵	27.13±0.12
蔗糖	64.84±0.51	尿素	37.73±0.56
乳糖	71.42±0.34	酪蛋白	57.95±0.22
麦芽糖	100.00±0.43	胰蛋白胨	64.60±0.71
果糖	69.64±0.51	鱼粉	35.41±0.63
马铃薯淀粉	97.42±0.88		

2.1.7. 产酶条件的正交试验 根据单因素优化结果,以蛋白胨、酵母粉、麦芽糖质量浓度,以及时间和NaCl质量浓度为因素,每个因素选取4个水平,进行正交试验^[21],选出适宜的培养条件,正交分析结果见表2。从R值分析结果可知,影响菌株发酵单位的主次顺序为:NaCl、蛋白胨、酵母粉质量浓度,时间,麦芽糖质量浓度。经过对正交试验结果的验证,确定了最佳培养基配比为:0.7 g/dL蛋白胨、0.5 g/dL酵母粉、0.5 g/dL麦芽糖、2.5 g/dL NaCl;发酵时间为18 h,最适发酵条件下可得到的最大产酶水平为14.8 U/L。

2.2 酶学性质

2.2.1 酶作用的最适温度和酶的热稳定性 在pH为6.0时,普鲁兰酶反应的最适温度为95℃,在温度为90~100℃范围内,相对酶活在90%以

上,结果见图 3(a)。该酶在不加 Ca^{2+} 的情况下, 80 °C 保温 0.5 h, 残余酶活为 98% 以上; 在 90 °C 保温 0.5 h 时, 残余酶活约为 91%; 在 95 °C 保温 0.5 h 时, 残余酶活约为 81%; 在 100 °C 保温 0.5 h, 残余酶活约为 72%。当 Ca^{2+} 存在的情况下, 其稳定性要比同样条件下稳定性高, 因此 Ca^{2+} 能够提高普鲁兰酶的热稳定性, 见图 3(b)。

表 2 正交试验结果

Tab. 2 Result of orthogonal tests

实验号	蛋白胨 质量 浓度/ (g/dL)	酵母粉 质量 浓度/ (g/dL)	麦芽糖 质量 浓度/ (g/dL)	时间/ h	NaCl 质量 浓度/ (g/dL)	酶活/ (U/L)
1	0.1	0.1	0.1	18	1.5	5.4
2	0.1	0.3	0.3	21	2	7.5
3	0.1	0.5	0.5	24	2.5	11.0
4	0.1	0.7	0.7	27	3	11.0
5	0.3	0.1	0.3	24	3	5.4
6	0.3	0.3	0.1	27	2.5	5.9
7	0.3	0.5	0.7	18	2	8.9
8	0.3	0.7	0.5	21	1.5	6.8
9	0.5	0.1	0.5	27	2	9.2
10	0.5	0.3	0.7	24	1.5	2.7
11	0.5	0.5	0.1	21	3	11.8
12	0.5	0.7	0.3	18	2.5	14.0
13	0.7	0.1	0.7	21	2.5	12.5
14	0.7	0.3	0.5	18	3	11.5
15	0.7	0.5	0.3	27	2	7.4
16	0.7	0.7	0.1	24	1.5	8.7
K_1	34.9	32.5	31.8	39.8	22.3	
K_2	27.0	27.6	34.3	38.6	34.3	
K_3	37.7	39.1	38.5	27.8	43.4	
K_4	40.1	40.5	35.1	33.5	39.7	
R	3.275	3.225	1.675	3.000	5.275	

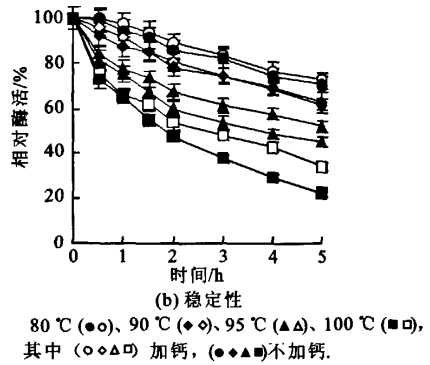
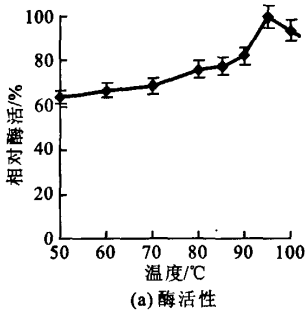


图 3 酶作用温度对普鲁兰酶活性及稳定性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on activity and stability of pullulanase

2.2.2 普鲁兰酶的最适作用 pH 和酶的 pH 稳定性 酶反应的最适 pH 受缓冲系统的影响, 该普鲁兰酶反应的最适 pH 为 6.0, 且在 pH 为 5.0~7.0 范围内, 该酶都具有较高的活性, 相对酶活力超过 80%, 结果见图 4(a)。在 95 °C 保温 4 h 后, 普鲁兰酶在 pH 5.0~7.5 范围内较稳定, 残余酶活力保持在 70% 以上, 在 pH 6.5 时, 普鲁兰酶的稳定性最好, 能达到 98% 以上, 结果见图 4(b)。

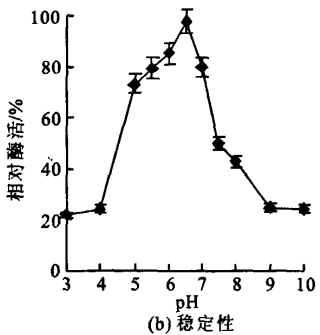
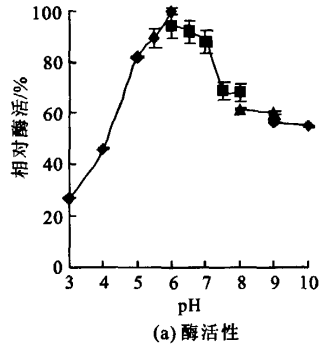


图 4 酶作用 pH 对酶活性及稳定性的影响

Fig. 4 Effect of pH on activity and stability of pullulanase

2.2.3 金属离子和化学试剂对酶作用的影响

Al^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶活有较为显著的抑制作用,为该酶的抑制剂。 Ca^{2+} 对普鲁兰酶具有强烈的激活作用, Na^{+} 对酶活有一定的激活作用,其它离子对酶的活性影响不大。EDTA 对酶活有较强的抑制作用,估计该酶的活性部位与金属离子有关,结果见表3。

表3 金属离子对普鲁兰酶的影响

Tab.3 Effect of metal ion on the pullulanase activity

金属离子	不同浓度下的相对酶活/%	
	1 mmol/L	5 mmol/L
对照	100	
NaCl	127.2±3.1	115.2±2.1
MnCl ₂	90.2±2.4	34.4±3.2
MgSO ₄	99.1±2.6	97.2±2.4
CoCl ₂	98.1±1.8	78.4±2.9
CaCl ₂	230.0±1.6	216.0±2.5
NiCl ₂	53.4±2.5	26.5±2.3
Fe ₂ (SO ₄) ₃	55.3±2.9	41.2±2.7
ZnSO ₄	65.1±2.3	54.8±2.6
AlCl ₃	39.2±2.1	27.3±2.3
HgCl ₂	20.5±1.9	9.3±2.5
CuSO ₄	32.4±2.1	9.0±3.0

5 mmol/L 的尿素和 1 mmol/L 的 SDS 对普鲁兰酶没有明显的作用,而 10 mmol/L 的尿素和 SDS 则对其有较明显的抑制作用,可能是由于该普鲁兰酶分子中缺乏二硫桥结构的缘故。 α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精均对该酶具有显著的抑制作用,结果见表4。

表4 化学试剂对普鲁兰酶的影响

Tab.4 Effect of chemical reagent on the pullulanase activity

化学试剂	浓度或质量分数	相对酶活/%
对照		100
尿素	5 mmol/L	100.2±2.1
	10 mmol/L	38.0±2.3
SDS	1 mmol/L	90.2±3.1
	10 mmol/L	23.4±2.6
EDTA	1 mmol/L	63.0±2.9
α -环糊精	0.1%	13.4±2.4
	0.5%	6.5±2.2
β -环糊精	0.1%	37.6±2.5
	0.5%	15.2±2.9
γ -环糊精	0.1%	63.9±2.6
	0.5%	23.4±2.5

3 结 语

来源于 *Thermococcus sp.* HJ21 的普鲁兰酶,由于其具有嗜热活性和高热稳定性而受到关注。但由于深海极端微生物生长环境的特殊性(高压、厌氧以及低营养),利用传统的生物发酵技术难以实现深海极端微生物的工业生产。因此,可以通过基因工程的手段把优良的酶基因在适宜的宿主系统中进行高效表达,从而实现海洋酶的工业应用。通过对 *Thermococcus sp.* HJ21 产酶进行发酵优化,从而获得更多的普鲁兰酶,用作酶学性质的研究,为该酶的进一步克隆表达和工业应用奠定了理论基础。

Thermococcus sp. HJ21 所产的普鲁兰酶为胞外酶,这与报道的 *T. Hydrothermailis* 的相似。发酵时间与 *T. Hydrothermalis* 的相近。发酵温度比 *P. furiosus* 的低(100 °C),比 *T. hydrothermalis* 的发酵温度高(80 °C)^[10]。最适发酵碳源为麦芽糖,以酵母粉和蛋白胨为氮源较好,这与已报道的古菌相关文献相同。经研究发现,嗜热古菌 *Thermococcus sp.* HJ21 为厌氧、硫依赖性菌株,但接种量和硫添加量对产酶影响不大。经过正交设计优化培养条件,酶活产量达 14.8 U/L。

该酶具有良好的高热稳定性和嗜热活性,最适作用温度达 95 °C,与 *T. hydrothermailis* 所产的普鲁兰酶具有相同的最适作用温度,比 *T. celer* 的(90 °C)高^[10];在温度为 90~100 °C 范围内,相对酶活在 90% 以上,在 95 °C 的半衰期为 2 h,能更好地促进淀粉的液化,提高淀粉的利用率。该酶的最适作用 pH 为 6.5,与 *P. furiosus* 以及 *P. woesei* 所产的普鲁兰酶的最适作用 pH 相同^[10];该酶在 pH 5.0~7.5 范围内较稳定,残余酶活力保持在 70% 以上,可以满足淀粉液化过程中对低 pH 的要求。不会对金属离子和变性剂有较强的耐受性,5 mmol/L 的尿素和 1 mmol/L 的 SDS 对该酶没有明显的作用,因此在工业应用时具有极大的商业价值。

Thermococcus sp. HJ21 所产的普鲁兰酶的研究在国内尚未见相关报道。作者已通过 PCR 技术克隆了 *Thermococcus sp.* HJ21 的普鲁兰酶基因序列,通过该序列的同源性比较分析,发现它的氨基酸序列与 *T. hydrothermalis* 的普鲁兰酶有 88% 的同源性。作者将对其进行表达以进一步研究 *Thermococcus sp.* HJ21 的普鲁兰酶特性,为今后的工业应用研究奠定一定的基础。

参考文献(References):

- [1] Domaon-Pytka M. Pullulan degrading enzymes of bacterial origin[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2004, 30:107-121.
- [2] 金翀, 顾国贤, 陆健. 培养基及培养条件对普鲁兰酶的影响[J]. 无锡轻工大学学报, 1999, 18(2):33-38.
JIN Chong, GU Guo-xian, LU Jian. Pullulanase from a new isolated strain[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 1999, 18(2):33-38. (in Chinese)
- [3] 杨华第, 沈微, 王正祥. 普鲁兰酶产生菌的分离与鉴定[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(9):4-7.
YANG Hua-di, SHEN Wei, WANG Zheng-xiang. Bacterial isolation and pullulanase characterization[J]. *Food Research and Development*, 2007, 28(9):4-7. (in Chinese)
- [4] 张晓宇, 艾志录, 李梦琴, 等. 极限糊精酶的研究进展及展望[J]. 中国食品添加剂, 2004(3):32-35.
ZHANG Xiao-yu, AI Zhi-lu, LI Meng-qin, et al. The research progress and prospect of limit dextrinase[J]. *China Food Additives*, 2004(3):32-35. (in Chinese)
- [5] 李红, 孙红军. 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.
- [6] Dong G, Vieille C, Zeikus J G. Cloning, sequencing and expression of the gene amylopullulanase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterisation of the recombinant enzyme[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63:3577-3584.
- [7] Rudiger A, Jorgensen P L, Antranikian G. Isolation and characterization of a heat stable pullulanase from the hyperthermophilic archeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61:567-575.
- [8] Erra-Pujada M, Debeire P, Duchiron F, et al. The type II pullulanase of *Thermococcus hydrothermalis*: molecular characterization of the gene and expression of the catalytic domain[J]. *J Bacteriol*, 1999, 181:3284-3287.
- [9] 夏子芳, 王正祥. *Thermotoga maritima* 普鲁兰酶的基因克隆与酶学性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(4):19-22.
XIA Zi-fang, WANG Zheng-xiang. The *Thermotoga maritima* MSB8 Pullulanase: gene cloning, heterologous over-expression and biochemical properties[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2007, 33(4):19-22. (in Chinese)
- [10] Bertoldo C, Antranikian G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2002(6):151-160.
- [11] 王淑军, 邓祥元. 耐高温酸性 α -淀粉酶基因部分序列的克隆与分析[J]. 海洋科学, 2007, 31(12):69-75.
WANG Shu-jun, DENG Xiang-yuan. Cloning and sequence analysis of partial thermostable acid α -amylase gene[J]. *Marine Sciences*, 2007, 31(12):69-75. (in Chinese)
- [12] Jolivet E, Corre E, L'Haridon S, et al. *Thermococcus marinus* sp. nov. and *Thermococcus radiotolerans* sp. nov. two hyperthermophilic archaea from deep-sea hydrothermal vents that resist ionizing radiation [J]. *Extremophiles*, 2004(8):219-227.
- [13] Britton H T S, Robinson R A. Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal[J]. *Chem Soc*, 1931:1456-1462.
- [14] Kidby D K, Davidson D J. A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range[J]. *Anal Biochem*, 1973, 55:321-325.

(责任编辑:秦和平,李春丽)