

南极微球菌产低温淀粉酶条件优化及酶学性质初步研究

范红霞^{1,2}, 刘缨¹, 刘志培^{1*}

(1. 中国科学院微生物研究所, 北京 100101; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 采用单因素试验对南极微球菌(*Micrococcus antarcticus*)产低温淀粉酶的条件进行了初步优化, 其发酵培养基组成为(g/L): Na_2HPO_4 2.0, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, NaCl 5.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5, 麦芽糖 5.0, 微量元素溶液 5.0 mL, pH 8.0, 500 mL三角瓶装液 100 mL, 12℃, 160 r/min振荡培养 64 h, 在此条件下, 发酵液酶活由优化前的 0.24 U/mL提高到 2.6 U/mL, 是优化前的 10.8 倍. 发酵液经 Millipore 超滤膜包浓缩、Hitrap Q 阴离子交换层析、Superdex 200 凝胶过滤层析纯化获得纯淀粉酶. 该淀粉酶的最适作用温度为 30℃, 在 10~15℃下仍具有较高活性, 但对热敏感, 属典型的低温酶; 最适作用 pH 为 6.0, 在 pH 6.0~10.0 范围内较稳定(>70%); Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 对该酶有较为明显的激活作用, 而 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ag^+ 、 Cu^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Hg^{2+} 、螯合剂 EDTA、citrate 则对该酶有不同程度的抑制作用, 并且在 Tween 系列及 TrintonX-100 等非离子型表面活性剂中表现出较好的稳定性; 酶的动力学参数 K_m 为 0.90 mg/mL.

关键词: *Micrococcus antarcticus*; 低温淀粉酶; 产酶条件; 酶学性质

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)08-2473-06

Optimization of Fermentation Conditions for Cold-adapted Amylase Production by *Micrococcus antarcticus* and Its Enzymatic Properties

FAN Hong-xia^{1,2}, LIU Ying¹, LIU Zhi-pei¹

(1. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: By single factor experiments, the fermentation conditions for cold-adapted amylase production from *Micrococcus antarcticus* were determined as follows (medium g/L): Na_2HPO_4 2.0, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, NaCl 5.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5, maltose 5.0, trace element solution 5.0 mL, pH 8.0, 100 mL/Erlenmeyer flask (500 mL); cultivation was in a rotating shaker at 12℃ and 160 r/min for 64 h. Under those conditions, the highest total enzyme activity (2.6 U/mL) was obtained and increased by 10.8 fold compared with the original value of 0.24 U/mL before optimization. This amylase was purified by concentration with ultrafiltration membrane module, Hitrap Q anion exchange chromatography and Superdex 200 gel filtration chromatography. The optimal temperature and pH for the purified amylase were 30℃ and 6.0, respectively. It still showed high activity at low temperature 10-15℃. It was sensitive to high temperature but was stable at pH 6.0-10.0 with at least 70% activity remained. These results indicated that it was a typical cold-adapted enzyme. The enzyme activity was stimulated by Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} and Mg^{2+} ; but inhibited by Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Al^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , EDTA and citrate. This cold-adapted amylase showed resistance to inactivation of 0.1% nonionic surfactants such as Tween 80, TrintonX-100, etc. Its K_m was 0.90 mg/mL.

Key words: *Micrococcus antarcticus*; cold-adapted amylase; fermentation conditions; enzymatic properties

淀粉酶(Amylase)是一类催化淀粉水解为葡萄糖、麦芽糖及其它低聚糖酶的总称^[1]. 目前国内外市场中常用的淀粉酶为嗜温酶, 其最适温度通常在 50℃左右, 在 0~20℃下活力很低, 不适于食品、饲料、纺织和洗涤剂等工业的低温条件. 低温淀粉酶的最适温度比嗜温淀粉酶一般都要低 20~30℃, 因此在低温条件下, 它们即可对有机污染物进行降解和转化, 对全球生态环境起到了十分重要的作用^[2]; 在 0℃仍有 20%左右的酶活, 这在我国北方寒冷地区生活污水处理中将具有独特的应用优势^[3]. 在冬天应用低温淀粉酶不需进行加温, 可以节省大量的能源. 低温淀粉酶另一个显著特点是对热敏感, 一般在

40℃下保温 1h 酶活就丧失 75%, 不会因酶活残留而破坏食品的风味^[4]. 在干啤酿造中常规使用的耐高温淀粉酶, 经巴氏灭菌后仍有较高酶活残留, 影响干啤风味, 如使用低温淀粉酶可避免此问题. 此外低温淀粉酶同蛋白酶、脂酶、纤维素酶等作为洗涤添加剂在冷洗行业中具有广泛应用^[5].

目前在低温微生物研究领域, 欧美及日本等国家主要研究低温淀粉酶的分子冷适应机制、酶序列

收稿日期: 2008-10-17; 修订日期: 2008-12-16

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA06Z316)

作者简介: 范红霞(1982~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物学, E-mail: fanhongxia2006@126.com

* 通讯联系人, E-mail: liuzhp@sun.im.ac.cn

分析、酶分子定向诱变、酶基因克隆表达以及应用开发等^[6-7].而目前国内报道与投入生产的淀粉酶大多是高温与中温的,低温淀粉酶的相关报道并不多,尤其是细菌产低温淀粉酶的报道更少.国内研究主要集中于菌株系统分类及酶学性质方面等一些基础工作^[8-11].本研究报道了1株革兰氏阳性耐冷菌南极微球菌产低温淀粉酶条件的优化、酶分离纯化和酶学性质的初步分析,以期为进一步的基因克隆和实际应用奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基

南极微球菌(*Micrococcus antarcticus*)分离自南极土壤,生长温度范围7~30℃,最适生长温度16℃,可以降解多种有机污染物^[12],在低温污水的处理中具有明显的应用前景.

种子培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0, NaCl 5.0,可溶性淀粉 10.0,自然 pH.

发酵基础培养基(g/L): Na₂HPO₄ 2.0, KH₂PO₄ 1.0, MgSO₄ 0.1, NaCl 10.0, (NH₄)₂SO₄ 0.5, 可溶性淀粉 5.0, 微量元素 5.0 mL, pH7.0; 微量元素配方参见文献^[13], 进行条件优化时, 接种量1%(体积分数), 12℃, 52 h.

1.1.2 主要试剂和仪器

所用化学试剂为国产分析纯(北京江晨宏伟生物科技有限公司), 紫外分光光度计 UV2802H(上海尤尼柯仪器有限公司), Amicon Ultra-15 离心超滤管(美国 Millipore 公司), Superdex 200(自装柱)、Hitrap Q(预装柱, 美国 Pharmacia 公司).

1.2 低温淀粉酶的分离纯化

菌株 *Micrococcus antarcticus* 液体发酵培养 68 h 后, 4℃, 10 000 r/min 离心 15 min 即得粗酶液, 粗酶液

在4℃下经截流相对分子质量为 10 × 10³ 的超滤膜包浓缩和脱盐后, 依次上样于 Hitrap Q 离子交换层析和 Superdex 200 凝胶过滤层析柱, 对低温淀粉酶进行分级分离纯化, 收集液经 Amicon Ultra-15 离心超滤管浓缩脱盐后用于酶学性质的研究.

1.3 低温淀粉酶活力测定

采用 3,5-二硝基水杨酸比色法^[14].酶活力单位(U)定义为30℃、pH 6.0 条件下每 min 从可溶性淀粉中释放 1 μmol 还原糖所需的酶量.

1.4 蛋白含量测定

采用 Bradford 法^[15], 以牛血清白蛋白为标准.

1.5 电泳

SDS-PAGE 方法参照文献^[16], 分离胶 12%、浓缩胶 5%, 考马斯亮蓝 G-250 染色 1 h, 乙醇-冰醋酸脱色 1~3 h.

1.6 低温淀粉酶的动力学参数 K_m 测定

测定不同底物浓度下的反应初速度(重复3次, 结果取平均值), 绘制 Lineweaver-Burk 图, 计算 K_m 值^[17].

2 结果与讨论

2.1 产酶条件优化

2.1.1 不同碳源、氮源及其浓度对生物量和产酶的影响

在发酵基础培养基上改变碳源和氮源种类和浓度, 进行单因素试验.表1的结果表明, 南极微球菌以麦芽糖为碳源时生长和产酶效果最好.许多微生物来源的淀粉酶都是诱导型的^[18,19], 麦芽糖是该菌株产淀粉酶最好的诱导剂, 与嗜冷菌盐生交替单胞菌相同^[20], 其最适浓度为0.5%左右[图1(a)].表1还表明, (NH₄)₂SO₄ 是该菌株生长和产酶的最适氮源, 以0.25%左右为宜[图1(b)].

2.1.2 NaCl 浓度对生物量和产酶的影响

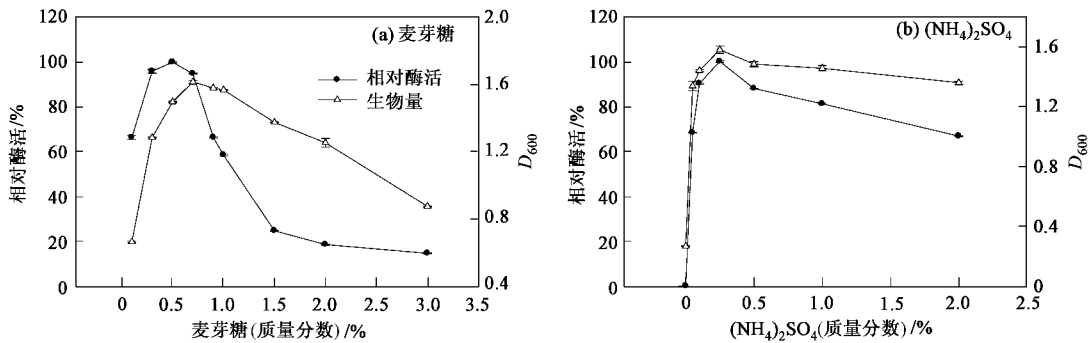


图1 麦芽糖和硫酸铵浓度对生物量和产酶的影响

Fig.1 Effect of maltose and (NH₄)₂SO₄ concentration on cell growth and amylase production

表 1 不同碳源和氮源对生物量和产酶的影响¹⁾

Table 1 Effect of different carbon and nitrogen sources
on cell growth and amylase production

添加物	生长量(D_{600})	淀粉酶酶活/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$
碳源(质量分数 1%)		
无	0.109	0
麦芽糖	1.464	1.56
可溶性淀粉	1.166	0.24
葡萄糖	1.045	0.22
蔗糖	0.484	0.19
纤维二糖	1.900	0
糊精	1.777	0
甘油	1.853	0
乳糖	0.267	0
甘露醇	0.126	0
氮源(质量分数 0.05%)		
无	0	0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.464	1.56
NH_4Cl	1.292	1.50
NH_4NO_3	1.382	1.37
KNO_3	0.538	0.27
尿素	0.616	0

1) 结果为 3 次实验的平均值

在 2.1.1 结果基础上, 改变培养基中 NaCl 的浓度(0、0.5%、1%、1.5%、2%、3%、5%)进行产酶试验. 图 2 的结果表明, NaCl 含量为 0.5% 时产酶较高, NaCl 含量低时对产酶有利.

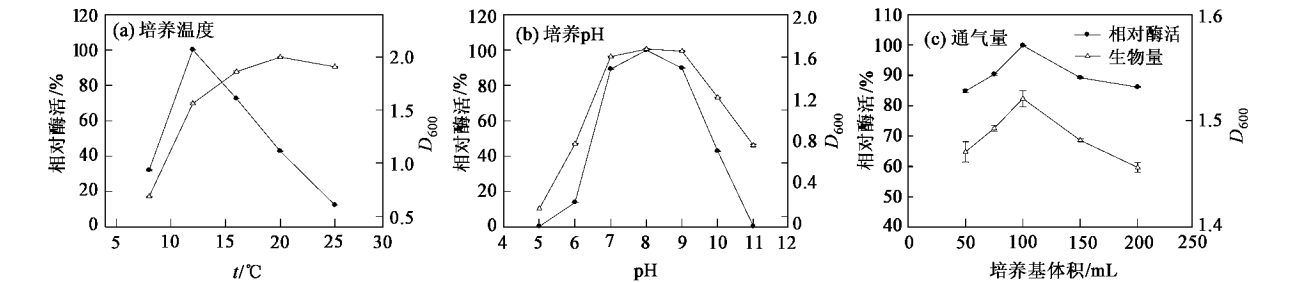


图 3 培养温度、培养基起始 pH 及通气量对生物量和产酶的影响

Fig. 3 Effect of temperature, pH and aerate volume on cell growth and amylase production

2.1.4 生长曲线和产酶曲线

在上述确定的条件下进行生长曲线和产酶曲线的测定, 图 4 的结果表明, 菌体的大致生长情况为: 0 ~ 12 h 为生长延滞期, 13 ~ 68 h 为指数期, 68 ~ 96 h 为稳定期, 96 h 后为衰亡期. 随着培养的进行, 产酶量逐渐升高, 68 h 酶活达到了高峰, 随后酶活力迅速下降. Zhang 等^[10] 从南极分离的产低温淀粉酶耐冷菌 *Nocardiopsis* sp. 7326 在 20℃ 下需培养 120 h 产酶才达到最高, 所以该菌株生产周期短并且产酶温度低, 在工业应用中具有很大的优势.

2.2 低温淀粉酶的性质

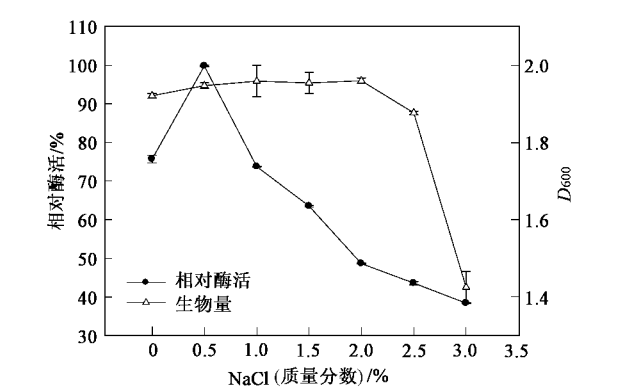


图 2 NaCl 浓度对生物量和产酶的影响

Fig. 2 Effect of NaCl concentration on cell growth and amylase production

2.1.3 培养温度、培养基起始 pH 及通气量对生物量和产酶的影响

在上述确定的条件下, 依次改变培养温度、培养基起始 pH 及通气量测定它们对产酶的影响. 结果表明, 该菌株的最适产酶温度为 12℃ 左右[图 3(a)], 比几株产低温淀粉酶的耐冷菌最适产酶温度要低得多^[10, 11, 20-23]; 最适产酶起始 pH 在 8.0 附近[图 3(b)]; 最适培养基装液量为 100 mL/三角瓶(500 mL)[图 3(c)], 装液量较大时, 通气不足而影响酶的合成; 但装液量较小时, 菌体生长过快容易在中后期出现泡沫而影响通气.

2.2.1 淀粉酶的分离纯化

Micrococcus antarcticus 发酵液经超滤膜包浓缩、Hitrap Q 阴离子交换层析、Superdex 200 凝胶过滤层析等步骤纯化后, 酶的比活力从 183.0 U/mg 提高到 456.3 U/mg, 纯化倍数为 2.49 (表 2). 经 Superdex 200 柱层析, 共收集到 2 个蛋白吸收峰, 并且酶活检测都有淀粉酶活性, 分别浓缩后进行 SDS-PAGE 检测, 结果如图 5 所示, 第 1 峰得到的是单一的谱带, 达到了电泳纯, 此部分用于以下的酶学性质研究; 经过几次改变洗脱条件, 第 2 峰中始终是 2 种蛋白共存, 有待于进一步研究.

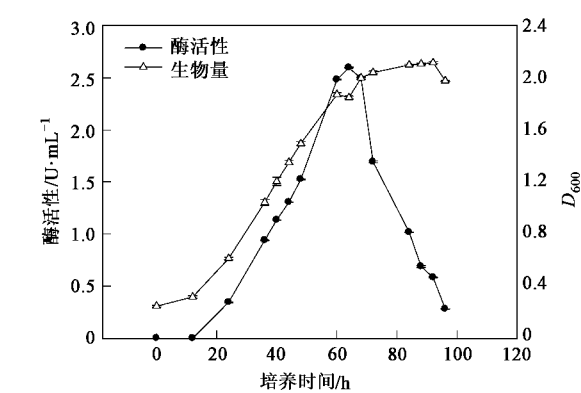
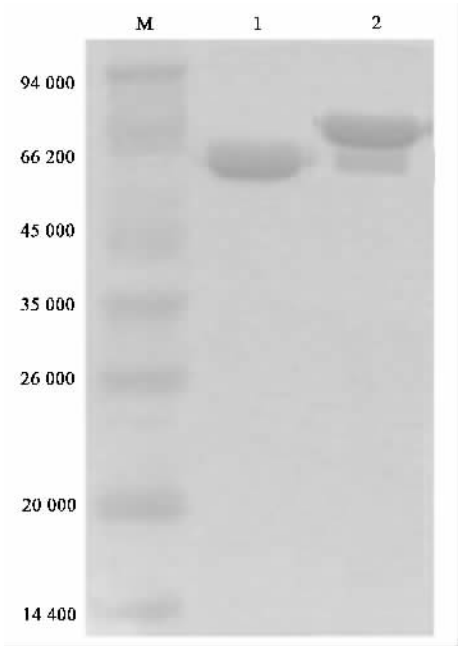


图 4 生长曲线和产酶曲线

Fig.4 Time course of cell growth and amylase production

2.2.2 酶的最适作用温度及 pH

分别在不同温度及 pH 下测定酶活力,以酶活最高者计为 100%,其余酶活力与之相比计算出相对酶活力.所用的缓冲体系分别为:pH 5.0~6.0 为 50 mmol/L 柠檬酸缓冲液, pH 6.0~8.0 为 50 mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液, pH 8.0~9.0 为 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 9.0~10.0 为 50 mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液.结果表明,酶的最适作用温度为 30℃



泳道 1:Superdex 200 第 1 峰;泳道 2: Superdex 200 第 2 峰
图 5 经 Superdex 200 纯化后的低温淀粉酶的 SDS-PAGE 图
Fig.5 Analysis of protein pattern after Superdex 200 by SDS-PAGE

[图6(a)],在 10~40℃ 范围内酶活力较高,表现出明显的低温淀粉酶的特性;最适作用 pH 为 6.0 [图6(b)].

表 2 低温淀粉酶的纯化

Table 2 Purification of the cold-adapted amylase						
纯化步骤	总体积/mL	总蛋白含量/mg	总酶活/U	比活/U·mg ⁻¹	产量/%	纯化倍数
粗酶液	200	1.2	220	183	100	1
超滤膜浓缩	2	0.83	174.3	210	79.2	1.15
Hitrap Q	1	0.27	116.4	431	52.4	2.36
Superdex 200	0.3	0.22	100.4	456.3	45.6	2.49

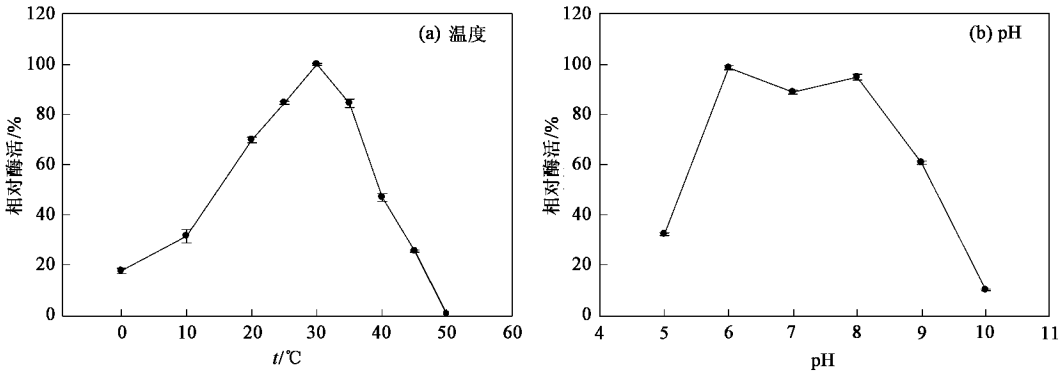


图 6 温度和 pH 对酶活性的影响

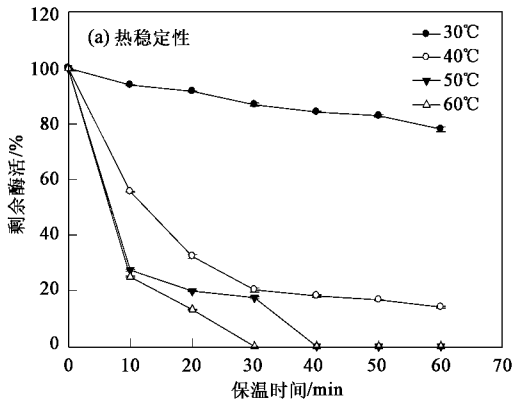
Fig.6 Effect of temperature and pH on amylase activity

2.2.3 酶的热稳定性及 pH 稳定性

取适量酶液在不同温度下保温不同时间后测定残存酶活力,同样取适量酶液在不同 pH 的缓冲液

中 4℃ 放置 24 h 后测定残存酶活力.结果表明,该酶在 30℃ 温浴 60 min 后仍有 80% 的酶活,但在 40℃ 温浴 30 min 后仅有 20% 的酶活力,在 60℃ 温浴 20 min

后酶活已完全丧失[图 7(a)],此结果说明该酶对热极为敏感,这与低温酶特点中的热不稳定性一致^[24].在 pH 6.0~10.0 范围内较稳定,在4℃保存 24



h 后仍有 70% 以上的酶活力[图 7(b)].说明该酶的酸碱稳定性较好.

2.2.4 金属离子及螯合剂对酶活力的影响

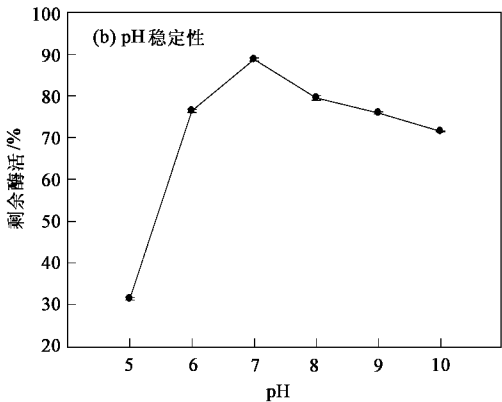


图 7 温度和 pH 对稳定性的影响

Fig.7 Effect of temperature and pH on the amylase stability

在酶液中各添加不同的金属离子(终浓度为 5 mmol/L),在30℃下保温 30 min 后,测定酶活,以无添加物的空白作为对照.表 3 的结果表明,Ca²⁺、Mn²⁺、Co²⁺、Mg²⁺ 对该淀粉酶有较明显的激活作用,而 Zn²⁺、Ba²⁺、Ag⁺、Cu²⁺、Al³⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Hg²⁺、螯合剂 EDTA、citrate 则对该酶有不同程度的抑制作用,其它离子对酶活力没有明显影响.该酶对 EDTA、citrate 等金属离子螯合剂敏感,推测该酶的活性中心含有金属离子;而 Hg²⁺ 可以完全抑制其活性表明含咪唑类基团的氨基酸残基在酶功能中发挥重要的作用,这与其它微生物来源的淀粉酶特性一致^[25].

表 3 不同金属离子及螯合剂对酶活力的影响¹⁾

Table 3 Effect of metal ions and chelators on enzyme activity			
金属离子 及螯合剂	相对酶 活/%	金属离子 及螯合剂	相对酶 活/%
空白	100	Ba ²⁺	71.4
Ca ²⁺	132	EDTA	66.0
Mn ²⁺ /Co ²⁺	123	Ag ⁺	38.24
Mg ²⁺	121	Cu ²⁺	18.3
K ⁺	100	Al ³⁺	13.2
Li ²⁺	95.69	Fe ²⁺	7.3
Zn ²⁺	86.1	Fe ³⁺ /Hg ²⁺	0
柠檬酸钠	76.30		

1) 结果为 3 次实验的平均值

2.2.5 常见表面活性剂对酶活力的影响

在酶液中各添加不同的表面活性剂,在30℃下保温 30 min 后测定酶活力,以无添加物的空白作为对照.表 4 的结果表明,该酶在 Tween 系列及 TrintonX-100 等非离子型表面活性剂中较为稳定,说明该酶与这些非离子型表面活性剂相容性较好.在

洗涤剂工业应用中,对酶制剂的要求主要包括:在碱性范围内有活性且较稳定,对表面活性剂的失活作用具有较好的抗性等,因此在洗涤剂工业中具有很好的应用前景^[1].而在 SDS、CTAB 等离子型表面活性剂中很容易失活,在30℃下温育 30 min 后,酶活丧失了一半以上.

表 4 常见表面活性剂对酶活力的影响¹⁾

Table 4 Effect of surfactants on enzyme activity			
表面活性剂 (0.1%)	相对酶 活/%	表面活性剂 (0.1%)	相对酶 活/%
空白	100	TrintonX-100	66.22
Tween 20/Tween 40	94.17	CTAB	41.31
Tween 60	91.26	SDS	26.86
Tween 80	81.06		

1) 结果为 3 次实验的平均值

2.2.6 酶的动力学常数

测定不同底物浓度下酶的反应初速度 v_0 , 结果见表 5, 依其中数据绘制 $1/[v_0]$ - $1/[S]$ 图, 即得到该酶的动力学曲线(图 8), 经线性拟合求出 $K_m = 0.90$ mg/mL, 白玉等^[9] 在中间气单胞菌中分离的低温淀

表 5 不同底物浓度下低温淀粉酶的 v_0 和 $1/v_0$

Table 5 The v_0 and $1/v_0$ of cold-adapted amylase under different soluble starch concentrations		
底物浓度/mg•mL ⁻¹	v_0 /mg•(mL•min) ⁻¹	$1/v_0$ /mL•min•mg ⁻¹
1	0.027	37.037
2.5	0.035	28.571
5	0.042	23.810
7.5	0.046	21.739
10	0.049	20.408

粉酶的 K_m 为 1.27 mg/mL, 相比嗜温淀粉酶来说都相对较低^[26], 说明酶与底物具有较高的亲和力, 酶的催化效率较高, 从而可以弥补低温导致化学反应速率降低而带来的影响, 为生物提供足够的代谢活力并维持足够的代谢通量^[27].

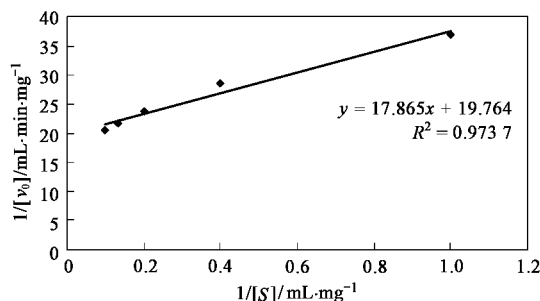


图8 低温淀粉酶 Lineweaver-Burk 图

Fig.8 Lineweaver-Burk plot of cold-adapted amylase

3 结论

(1) 对菌株 *Micrococcus antarcticus* 进行产酶条件优化研究, 发现碳源、氮源的种类和浓度以及培养温度等对产酶影响都很大, 在初步优化后的条件下, 发酵液酶活由优化前的 0.24 U/mL 提高到 2.6 U/mL, 是优化前的 10.8 倍。

(2) 发酵液依次经超滤膜包浓缩、Hitrap Q 阴离子交换层析、Superdex 200 凝胶过滤层析纯化后, 比活力从 183.0 U/mg 提高到 456.3 U/mg, 纯化倍数为 2.49, 产量为 45.6%, 对其进行酶学性质研究表明, 该酶的最适作用温度为 30℃, 热稳定性较差, 属于典型的低温酶, Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 对其有较明显的激活作用, 在 Tween 系列等非离子型表面活性剂中具有很高的稳定性; 因此在食品、洗涤、制药、低温环境修复等行业上有着良好的应用前景。

参考文献:

- [1] 张树政. 酶制剂工业(下册)[M]. 北京: 轻工业出版社, 1998. 458-489.
- [2] Margesin R, Schinner F. Biodegradation of organic pollutants at low temperatures[A]. In: Biotechnological Applications of Cold-adapted Organisms[M]. Berlin; New York: Springer, 1999. 271-289.
- [3] 李亚选, 负英伟, 焦瑞虎, 等. 低温耐冷菌在寒冷地区生活污水中的应用[J]. 应用科技, 2007, 34(4): 63-66.
- [4] Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, et al. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology[J]. Trends in Biotechnology, 2000, 18(3): 103-107.
- [5] Adrienne L, Huston. Biotechnological Aspects of Cold-Adapted Enzymes[A]. In: Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology[M]. Berlin; New York: Springer, 2008. 347-360.
- [6] Aghajari N, Feller G, Gerday C, et al. Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplantics* α -amylase give sight into cold adaptation at a molecular level[J]. Structure, 1998, 6(12): 1503-1516.
- [7] Feller G, Payan F, Theys F, et al. Stability and structural analysis of α -amylase from the Antarctic psychrophile *Alteromonas haloplantics* A23[J]. Eur J Biochem, 1994, 222(2): 441-447.
- [8] 张刚, 汪天虹, 张臻峰, 等. 产低温淀粉酶的海洋真菌筛选及研究[J]. 海洋科学, 2002, 26(2): 3-5.
- [9] 白玉, 杨大群, 王建辉, 等. 天山冻土耐冷菌的分离与产低温酶菌株的筛选[J]. 冰川冻土, 2005, 27(4): 615-618.
- [10] Zhang J W, Zeng R Y. Purification and Characterization of a Cold-Adapted α -Amylase Produced by *Nocardiopsis* sp. 7326 isolated from Prydz Bay, Antarctic[J]. Mar biotechnol(NY), 2008, 10(1): 75-82.
- [11] 王晓红. 产低温淀粉酶菌株的筛选及其酶学性质的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2006. 14-32.
- [12] Liu H C, Xu Y, Ma Y H, et al. Characterization of *Micrococcus antarcticus* sp. nov., a psychrophilic bacterium from Antarctica[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50: 715-719.
- [13] Kaminski U, Janke D, Prauser H, et al. Degradation of aniline and monochloroanilines by *Rhodococcus* sp. An117 and a pseudomonad: a comparative study[J]. Z Allg Mikrobiol, 1983, 23(4): 235-246.
- [14] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars[J]. Anal Chem, 1959, 31(3): 426-428.
- [15] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 332.
- [16] 何忠效. 生物化学实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004. 356-360.
- [17] Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants[J]. J Amer Chem Soc, 1934, 56(3): 658-666.
- [18] Onishi H. Halophilic amylase from a moderately *Micrococcus*[J]. J Bacteriol, 1972, 109(2): 570-572.
- [19] Khire J M, Pant A. Thermostable, salt-tolerant amylase from *Bacillus* sp. 64[J]. World J Microbiol, 1992, 8(2): 167-170.
- [20] Feller G, Lonhienne T, Deroanne C, et al. Purification, characterization and nucleotide sequence of the thermolabile α -amylase from the Antarctic psychrotroph *Alteromonas haloplantics* A23[J]. J Biol Chem, 1992, 267(8): 5217-5221.
- [21] 韩萍. 低温淀粉酶的分离纯化及酶学性质研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2007. 23-30.
- [22] 张金伟, 连明珠, 曾润颖. 产冷适应复合酶菌株 *Pseudomonas* sp. NJ197 的选育、发酵条件及酶学性质[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(5): 683-687.
- [23] 戴世鲲, 郑天凌, 王晓颖, 等. 深海产低温碱性淀粉酶菌 *Halomonas* sp. W7 的筛选及发酵条件研究[J]. 海洋科学, 2007, 31(1): 27-32.
- [24] Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topic in cold adaptation[J]. Nat Rev Microbiol, 2003, 1(3): 200-208.
- [25] Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, et al. Microbial α -amylase: a biotechnological perspective[J]. Process Biochem, 2003, 38(11): 1599-1616.
- [26] 柳辉, 杨江科, 闫云君. 产 α -淀粉酶菌株的分离、鉴定及酶学性质研究[J]. 生物技术, 2007, 17(2): 34-37.
- [27] Hoyoux A, Blaise V, Collins T, et al. Extreme Catalysts from Low-Temperature Environments [J]. Journal of bioscience and Bioengineering, 2004, 98(5): 317-330.