

文章编号:1005-1538(2019)06-0006-06

# 温敏型淀粉酶产生菌的分离、分子生物学 鉴定及特性研究

闫 丽

(首都博物馆文物保护修复中心生物实验室,北京 100045)

董 振,刘伟杰

(江苏师范大学生命科学学院,江苏徐州 221116)

**摘要:**我国博物馆里有许多珍贵的书画文物,然而这些书画文物由于材质易损,年代久远,在修复过程中,揭裱是一个难题。揭裱过程中,书画与背纸之间的浆糊是导致书画文物揭裱困难的主要障碍。利用淀粉酶可以有效分解浆糊淀粉,提高揭裱效率,但揭裱后残留在文物上的淀粉酶会影响后续的重新装裱,因此开发温度敏感型淀粉酶有助于揭裱后的重新装裱。本研究取样于东北寒地土壤,并通过分离、筛选得到了一株产温敏型淀粉酶菌株,且命名为BWL1025。通过分子生物学方法,确定了该菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。并且通过DNS法测定目标菌株所产淀粉酶的最适pH及其稳定性、最适酶活温度、最低失活温度和最短失活时间。实验结果表明,在40℃时,酶活达到最高值,为0.839 IU/mL;在60℃时,处理25 min后,酶活基本消失。此外,本研究对该菌株的发酵条件进行优化,发现以木糖和酵母粉为最佳碳源和氮源时,酶活最高达到1.63 IU/mL。本研究结果为书画文物的修复提供了新型的温敏型淀粉酶来源。

**关键词:**温敏型淀粉酶;枯草芽孢杆菌;文物修复;书画揭裱

**中图分类号:** Q935, K876.91 **文献标识码:** A

## 0 引言

淀粉酶是一种生物催化剂,可以用于人造棉、高质丝绸、化学纤维退浆等纺织品工业<sup>[1]</sup>;在洗涤剂工业中,用于制成多酶洗衣粉等,具有非常广泛的用途。此外,作为一种生物酶,淀粉酶具有催化效率高,活性好和底物专一性的优点。

我国有大量珍贵的书画文物,在修复过程中选择的保护方法一定要尽量减少对书画文物的损伤,延长书画文物的寿命<sup>[2-3]</sup>。近年来,淀粉酶开始应用于古代文物书画的修复中。揭展是书画重新装裱过程中最重要的一环。在装裱过程中所用的浆糊往往与画心、命纸很难分离,导致揭展过程复杂,且容易造成古书画的损毁。传统的揭取方法是用水长时间闷润书画以降低浆糊的黏性,然后用手指轻轻地捻搓命纸,使旧命纸和浆糊从画心背面剥离,此方法

对于难揭展的纸质画心极易揭晃。而利用淀粉酶制备生物揭展剂,作用于模拟材料(两张宣纸用浆糊粘结起来,然后老化)<sup>[4-6]</sup>,利用酶的高效催化功能,将浆糊等胶黏剂的大分子分解,而且由于酶的催化选择作用<sup>[7]</sup>,不产生对文物的破坏作用。前期研究工作利用淀粉酶已可以高效地揭展古书画,并取得了良好的揭展效果<sup>[5]</sup>。然而该技术还存在技术难点,揭展后残留的淀粉酶会影响二次装裱,因此迫切需要开发一种温度敏感性淀粉酶,在揭展完成后,利用微热温度使残留的淀粉酶失活,避免淀粉酶对再次装裱的影响。

本研究从土壤中分离获得一株产温度敏感型淀粉酶的菌株,对菌株进行了分子生物学鉴定,确定了其种属分类地位,并分析了所产生淀粉酶的酶活特性,为古代字画文物的低损伤修复提供了良好的温度敏感型淀粉酶资源。

收稿日期:2018-11-21;修回日期:2019-07-11

基金项目:北京市科学技术委员会项目资助(Z161100001116067, Z161100002416020)

作者简介:并列第一作者,闫 丽(1978—),女,硕士,研究方向为文物修复,E-mail: yanli19800702@163.com

并列第一作者,董 振(1993—),男,硕士研究生,江苏师范大学微生物学专业,研究方向为环境微生物,E-mail: rockdong2015@126.com

通讯作者:刘伟杰,E-mail: leoliu2013@126.com

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

为了筛选产温度敏感型淀粉酶的菌株,从东北寒地土壤中采集样品,用于菌株分离。实验过程中所用的酸水解酪蛋白购自上海蓝季科技发展有限公司,碘化钾购自连云港贝尔化学试剂有限公司,柠檬酸三钠购自无锡市亚盛化工有限公司,其他所用药品购自国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 培养基

筛选确定培养基:1)可溶性淀粉 6 g/L,胰蛋白胨 2 g/L,酸水解酪蛋白 2 g/L,  $K_2HPO_4$  1.2 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g/L,酵母粉 2 g/L,琼脂粉 20 g/L。2)LB培养基:NaCl 10 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,酵母粉 5 g/L,琼脂粉 20 g/L(制备固体平板时加入)。以上培养基均 115 °C 灭菌 30 min。

### 1.3 菌株筛选<sup>[8-9]</sup>

将少许取自东北寒地的土壤样品放入 EP 管中,加入灭过菌的生理盐水,然后混匀并进行梯度稀释,稀释成浓度分别为  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  的稀释液;将浓度为  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  的稀释液用涂布棒涂布在固体分离培养基上;倒置于恒温培养箱(苏州培英实验设备有限公司),28 °C 培养 24 h;将初筛选菌种,通过四区划线的方法进行多次分离纯化,吸取 3 mL 碘液于分离培养基平板中,染色 10 min。倒去染料后,用细流水进行冲洗,直至冲洗下的水透明,观察平板中形成的透明圈,最终得到纯种菌种,用 20% 的甘油管保种备用。

### 1.4 菌株鉴定<sup>[10]</sup>

分析菌株的 16S rRNA 确定其种属地位。用移液枪(北京大龙兴创实验仪器有限公司)吸取 50  $\mu$ L 的菌液置于 EP 管中,以 10 000 r/min 的条件,离心 5 min,去上清,将 50  $\mu$ L 无菌水加入 EP 管中,将菌悬液在沸水浴煮沸 3 min;然后冰水浴 2 min,沸水浴和冰浴重复两次;然后 10 000 r/min 离心,取 1  $\mu$ L 上清液作为扩增模板。采用 16S rRNA 基因的通用引物配成 50  $\mu$ L 体系进行 PCR 反应,PCR 仪购于卡优迪生物科技有限公司。上游引物(1492R): 5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3',下游引物(27F): 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'。PCR 扩增条件为 95 °C 1 min;95 °C 10 s,56 °C 30 s,72 °C 1 min,32 个循环;72 °C 10 min。然后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,电泳仪购于北京六一生物科技有限公司。PCR 产物送北京博迈德科技发展

有限公司测序,结果提交至 NCBI 数据库进行 BLAST 比对,并利用 MEGA 5 软件计算出序列的系统进化距离,采用邻接法(Neighbor - Joining)构建系统发育树,确定菌株 BWL1025 的种属发育地位。

### 1.5 菌株 BWL1025 产酶及酶学特性分析

**1.5.1 淀粉酶活性的测定** 采用 DNS 显色法<sup>[11]</sup>分析淀粉酶酶活。取 1 mL 菌液于 EP 管中,以 8 000 r/min 的条件,离心 5 min,取上清用作粗酶液;在 150  $\mu$ L 的 1% 淀粉溶液中加入 50  $\mu$ L 的上清菌液作为实验组;在加入 150  $\mu$ L 的 1% 淀粉溶液中加入 50  $\mu$ L 沸水浴 30 min 后的上清菌液作为对照组;将实验组和对照组放入水浴中保温 30 min;加入 150  $\mu$ L 的 DNS 和 100  $\mu$ L 的 NaOH 溶液,沸水浴 5 min;定容至 1 mL,用空白组调零后,测 OD540 的值,并取平均值。以 50  $\mu$ L 的去离子水替代反应体系中的酶液的体系作为空白对照组用于 OD540 调零。淀粉酶酶活的表示:在特定条件下,1 min 内将淀粉底物转化为 1 微摩尔葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位。

**1.5.2 pH 对酶活性的影响** 将淀粉底物分别溶解在 pH 为 4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0 的缓冲液中,与粗酶液混合后,37 °C 水浴中反应 30 min,测定淀粉酶活性,确定最佳反应 pH。将粗酶液置于 pH 4.0 ~ 11.0 的缓冲液中处理 30 min,然后在最佳 pH 和 37 °C 的条件下反应 30 min,确定淀粉酶酶活的稳定性。

**1.5.3 温度对酶活性的影响** 将粗酶液、淀粉底物混合后,分别置于 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80 °C 水浴中反应 30 min,测定淀粉酶活性,确定最低失活温度。

**1.5.4 淀粉酶最短失活时间的测定** 根据 1.5.3 的实验结果,将粗酶液、淀粉底物混合后,在最低失活温度下,在不同的处理时间(0、5、10、15、20、25、30 min)测量酶活性,确定淀粉酶的最短失活时间。

**1.5.5 氮源对酶活性的影响** 以葡萄糖为碳源,分别以酵母粉、胰蛋白胨、蛋白胨、牛肉膏、酸水解酪蛋白、尿素、硝酸铵、硝酸钾作为发酵培养基的氮源,然后按照 1% 的接种量,以 28 °C、180 rpm 的条件培养 24 h,通过测淀粉酶的酶活确定最佳氮源。

**1.5.6 碳源对酶活性的影响** 以酵母粉为氮源,分别以羧甲基纤维素钠、木糖、蔗糖、乳糖、淀粉、麦芽糖、果糖、葡萄糖、鼠李糖作为发酵培养基的碳源,按照 1% 的比例接种菌液,以 28 °C、180 rpm 的条件培养 24 h,通过测淀粉酶的酶活确定最佳碳源。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产淀粉酶菌的筛选及形态学分析

如图 1 所示,菌落呈圆形,湿润,不透明,呈乳白色。如图 2 所示,经革兰氏染色后,发现菌株 BWL1025 为革兰氏阳性菌,杆状。如图 3 所示,将分离培养基平板利用碘液染色后,可以很清楚的看出透明水解圈,说明菌株 BWL1025 具有较强的淀粉酶酶活。

### 2.2 菌株鉴定

对菌株 BWL1025 的 16S rRNA 序列进行扩增后,测序获得长 1 328 bp 的目标序列,将目标序列提交至 NCBI 数据库并进行 BLAST 比对,并利用 MEGA5 软件构建系统发育树。结果如图 4 所示,发现菌株 BWL1025 与 *Bacillus subtilis* 的同源性最高,综合形态学和系统发育分析确定菌株 BWL1025 属于枯草芽孢杆菌。

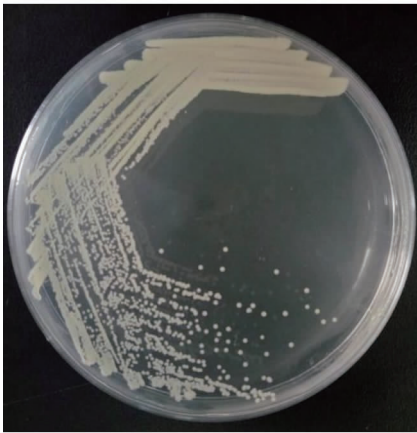


图 1 菌株 BWL1025 的形态与纯化结果  
Fig.1 Colony morphology and purification results of BWL2015

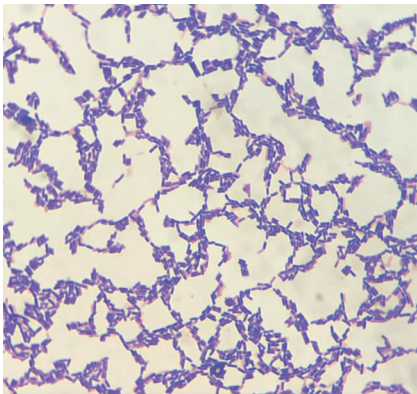


图 2 菌株 BWL1025 的革兰氏染色形态  
Fig.2 Morphology of strain BWL2015 after Gram - staining

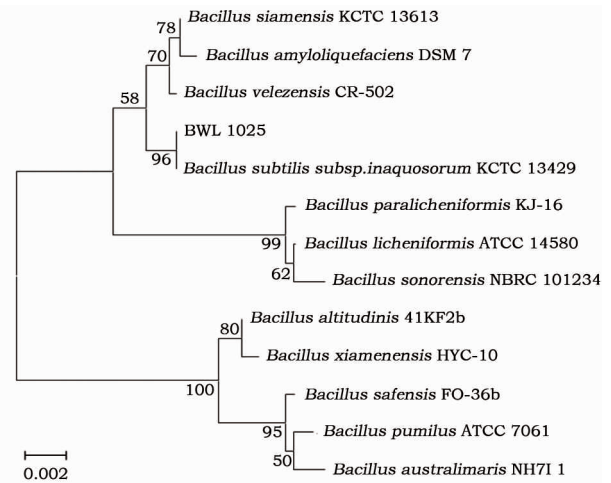


图 3 碘液染色法鉴定淀粉酶产生菌  
Fig.3 Identification of amylase - producing strains using iodine staining method

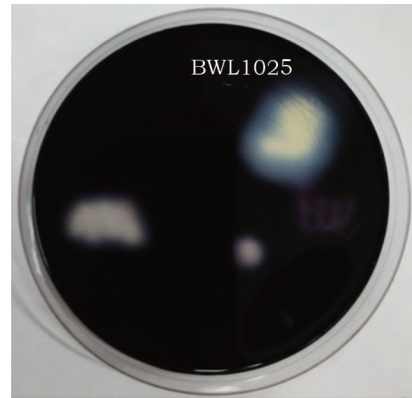


图 4 菌株 BWL1025 的 16S rRNA 系统发育树  
Fig.4 Phylogenetic tree of strain BWL1025 based on 16S rRNA sequence

### 2.3 淀粉酶的酶学性质研究

**2.3.1 pH 对酶活性的影响** 由于古代文物字画会出现酸化现象,为了更好地指导该淀粉酶在文物修复中的应用,本研究分析了 pH 对菌株 BWL1025 产生淀粉酶的活性及稳定性的影响。如图 5 所示,酶活随着 pH 值的升高呈先上升后下降的趋势,菌株 BWL1025 所产生的淀粉酶的最适 pH 值为 6.0,此时酶活最高。在 pH 4.5~5.0 时,有所下降,但酶活依然能达到最高酶活的 60% 以上。此外该淀粉酶的酶活稳定性也是随着 pH 值的升高呈先上升后下降的趋势,在 pH6 时酶活最稳定,而在 pH 4.5~5 时,酶活能达到最高酶活的 70% 以上。

**2.3.2 温度对酶活性的影响** 温度对菌株 BWL1025 产生的淀粉酶酶活的影响如图 6 所示,温度对该淀粉酶的酶活影响很大,从 25 °C 开始,随着温度的

升高酶活升高,在 40 ℃ 时,淀粉酶酶活达到最高 0.839 IU/mL,表明该温度为菌株 BWL1025 产淀粉酶的最适温度;而在 60 ℃ 及以上时,酶活基本消失,表明 60 ℃ 为该淀粉酶的最低失活温度。相比较其他淀粉酶的失活温度来说,60 ℃ 为较低的失活温度,表明菌株 BWL1025 可以产生温度敏感型淀粉酶。

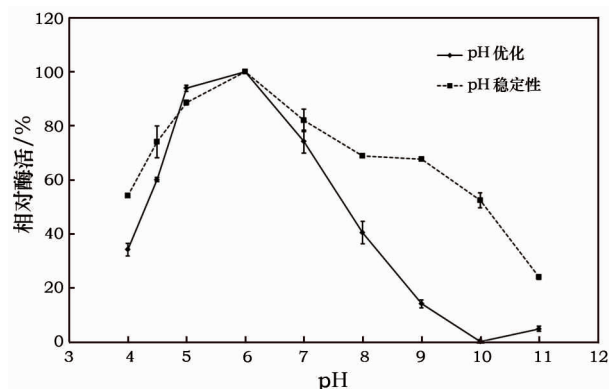


图5 pH 值对菌株 BWL1025 淀粉酶酶活的影响

Fig. 5 Effects of pH on the activity of amylase produced from strain BWL1025

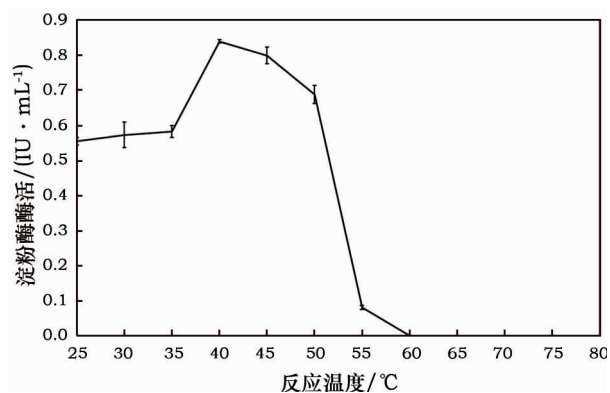


图6 温度对 BWL1025 淀粉酶酶活的影响

Fig. 6 Effects of temperature on the activity of amylase produced from strain BWL1025

**2.3.3 淀粉酶最短失活时间的测定** 由图6所示,60 ℃ 为菌株 BWL1025 所产淀粉酶的最低失活温度,因此在温度 60 ℃ 时,分析菌株 BWL1025 所产淀粉酶的最短失活时间。如图7所示,随着处理时间的延长,淀粉酶酶活力快速降低,并且在处理 25 min 后,酶活基本消失。由此可知,25 min 为该淀粉酶在 60 ℃ 的条件下最短失活时间。在已有报道中,能够产生淀粉酶的芽孢杆菌属菌株较多,但已报道淀粉酶的最适温度多为 60 ℃ 左右,热稳定性较好<sup>[12-13]</sup>,因此在书画文物的修复中应用受到很大的

限制。本研究从我国东北寒地土壤中取样,从中分离温度敏感性的淀粉酶,最适温度为 40 ℃,60 ℃ 加热即可以实现对淀粉酶的失活,有利于解决淀粉酶揭展书画文物后的酶残留问题。

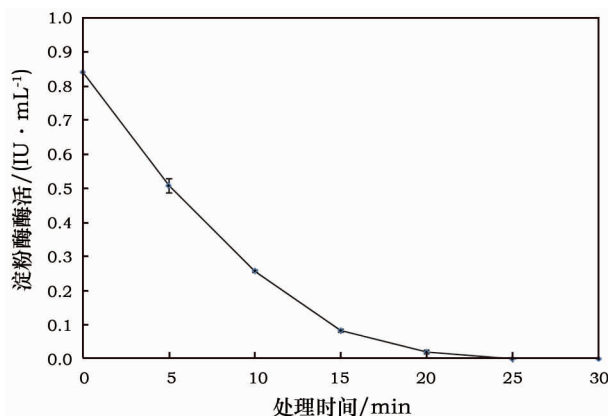


图7 菌株 BWL1025 所产淀粉酶的失活时间

Fig. 7 Inactivation time of amylase produced from strain BWL1025

**2.3.4 氮源对酶活性的影响** 氮源能够提供给微生物氮素营养,其作用是供给微生物合成蛋白质和含氮物质的原料。对菌株 BWL1025 进行了发酵氮源优化,选取了酵母粉、胰蛋白胨、蛋白胨、牛肉膏、酸水解酪蛋白、尿素、硝酸铵、硝酸钾八种氮源。如图8所示,当以尿素、硝酸铵、硝酸钾为氮源时,菌株 BWL1025 所产淀粉酶的酶活基本为零;当以蛋白胨和牛肉膏为氮源时,酶活较低;而以酵母粉、胰蛋白胨、酸水解酪蛋白为氮源时,酶活力较高;其中以酵母粉为氮源时,酶活力最高,达到 1.306 IU/mL。因此选择酵母粉为菌株 BWL1025 发酵的最佳氮源。

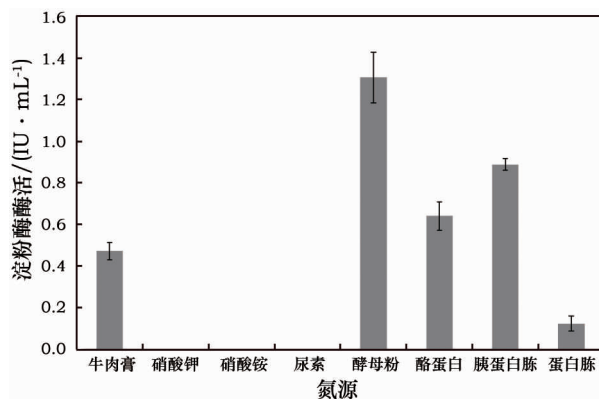


图8 氮源对菌株 BWL1025 所产淀粉酶酶活的影响

Fig. 8 Effects of nitrogen sources on the activity of amylase produced from strain BWL1025

**2.3.5 碳源对酶活性的影响** 碳源常通过影响微生物的糖代谢、呼吸、能量、生长及相关代谢而影响微生物的次生代谢产物的合成和分泌<sup>[14]</sup>。因此对菌株 BWL1025 发酵培养基的碳源进行优化,选择了羧甲基纤维素钠(CMC)、木糖、蔗糖、乳糖、淀粉、麦芽糖、果糖、葡萄糖、鼠李糖九种碳源。如图 9 所示,当以羧甲基纤维素钠、乳糖、果糖、鼠李糖为碳源时,酶活力较低,不适合作为发酵碳源。而以木糖、蔗糖、淀粉、麦芽糖、葡萄糖为碳源时,酶活力较高;其中以木糖为碳源时,酶活力最高达到 1.63 IU/mL。因此本研究选择木糖作为菌株 BWL1025 的最佳发酵碳源。

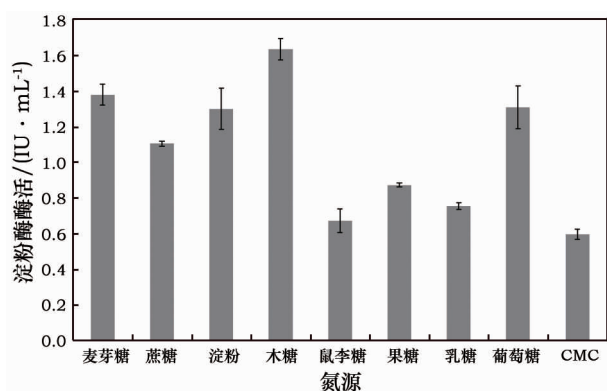


图 9 碳源对菌株 BWL1025 所产淀粉酶酶活的影响

Fig. 9 Effects of carbon sources on the activity of amylase produced from strain BWL1025

### 3 结 论

我国的博物馆里有许多珍贵的书画文物,在修复过程中,揭裱是一个难题。淀粉酶可以降解淀粉浆糊,提高揭裱效率,但揭裱后残留的淀粉酶会影响后续的再次装裱,因此揭裱后淀粉酶的失活问题亟待解决。本研究针对这个问题,利用碘液染色分离培养基平板的方法,从东北寒地土壤样品中分离获得一株产生温度敏感型淀粉酶的功能菌株 BWL1025。经过形态学和分子生物学鉴定发现菌株 BWL1025 为枯草芽孢杆菌。该菌株在 40 °C 时,酶活达到最高值 0.839 IU/mL;在 60 °C 处理 25 min 后,酶活基本消失。在对菌株 BWL1025 的发酵碳氮源进行优化时,发现木糖和酵母粉分别为最佳碳源和氮源,淀粉酶酶活最高达到 1.63 IU/mL。本研究发现的菌株 BWL1025 产生的淀粉酶为温度敏感型淀粉酶,在较低温度下可失活,有效解决残留淀粉酶对书画文物再次装裱的影响,在古代书画文物的修复中具有很好的应用前景。

### 参考文献:

- [1] 杨海泉,刘龙,李江华,等. 碱性淀粉酶的发酵生产及其应用研究进展[J]. 生物工程学报,2012,28(4):432-439.  
YANG Haiquan, LIU Long, LI Jianghua, *et al.* Advances of alkaline amylase production and applications[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2012, 28(4):432-439.
- [2] 陈潇俐,朱庆贵,张诺,等. 书画文物清洗及修复技术选择——最小干预原则在书画文物修复中的应用[J]. 文物保护与考古科学,2017,29(6):56-64.  
CHEN Xiaoli, ZHU Qinggui, Zhang Nuo, *et al.* Technology for cleaning and restoration of painting and calligraphy relics—the application of minimum intervention principle in paper conservation [J]. Sciences of Conservation and Archaeology, 2017, 29(6):56-64.
- [3] 闫丽,高雅,贾汀. 古代书画文物上污染霉菌的分离与鉴定研究[J]. 中国文物科学研究,2011(1):78-82.  
YAN Li, Gao Ya, JIA Ting. Isolation and identification of molds from ancient calligraphy and painting relics [J]. China Cultural Heritage Scientific Research, 2011(1):78-82.
- [4] 闫丽,阮晓东. 书画文物揭裱过程中生物酶的可应用性分析[J]. 中国文物科学研究,2011(4):54-61.  
YAN Li, RUAN Xiaodong. Analysis on the applicability of biological enzyme in the process of uncovering of calligraphy and painting relics [J]. China Cultural Heritage Scientific Research, 2011(4):54-61.
- [5] 闫丽,楼朋竹,武望婷,等. 生物揭展剂在古书画文物揭展中的应用[J]. 文物保护与考古科学,2017,29(3):1-5.  
YAN Li, LOU Pengzhu, WU Wangting, *et al.* Development of a biological method for removing ancient paintings and calligraphy from backings [J]. Sciences of Conservation and Archaeology, 2017, 29(3):1-5.
- [6] 周萍. 酶在揭裱技术中的应用[J]. 中国档案,1994(11):27-27.  
ZHOU Ping. Application of enzymes in uncovering technique [J]. China Archives, 1994(11):27-27.
- [7] 冯健飞.  $\alpha$ -淀粉酶的应用及研究进展[J]. 现代农业科技,2010(17):354-355.  
FENG Jianfei. The research advance and application of  $\alpha$ -amylase [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2010(17):354-355.
- [8] 张丽苹,徐岩. 酸性  $\alpha$ -淀粉酶生产菌株的选育的初步研究[J]. 工业微生物,2002,32(4):11-14.  
ZHANG Liping, XU Yan. Selection and breeding of the strain for production of acid  $\alpha$ -amylase [J]. Industrial Microbiology, 2002, 32(4):11-14.
- [9] 卢涛,舒丹,张杰,等. 高温  $\alpha$ -淀粉酶产生菌株的选育[J]. 四川大学学报(自然科学版),2002,39(6):1131-1133.  
LU Tao, SHU Dan, ZHANG Jie, *et al.* The screening of a thermostable  $\alpha$ -amylase-producing strain [J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2002, 39(6):1131-1133.
- [10] 杨金水,刘伟杰,吴佳莲,等. 曝气生物滤池处理生物质废水及降解菌分析[J]. 环境科学,2008(11):3133-3137.

- YANG Jinshui, LIU Weijie, WU Jialian, *et al.* Application of biological aerated filter in treating biomass wastewater and its microbial population characteristics [J]. *Environmental Science*, 2008(11):3133-3137.
- [11] 张应玖,朱学军,关键,等.一种新型淀粉酶的鉴定及其产酶菌株的筛选[J].*微生物学通报*,2002,**29**(5):38-41.
- ZHANG Yingjiu, ZHU Xuejun, GUAN Jian, *et al.* Identification of a new type of amylase and mutagenesis of strain zx99 secreting the enzyme for production of isomaltoligosaccharide [J]. *Microbiology China*, 2002, **29**(5):38-41.
- [12] 李秀凉,周东坡.枯草芽孢杆菌 HD132 产生的  $\alpha$ -淀粉酶性质的初步研究[J].*中国调味品*,2008(10):45-47.
- LI Xiuliang, ZHOU Dongpo. Preliminary analysis of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* HD132 [J]. *China Condiment*, 2008(10):45-47.
- [13] 权淑静,马焕,刘德海,等.青藏高原土壤产淀粉酶菌株的分离、鉴定及产酶特性研究[J].*河南科学*,2015,**33**(3):384-388.
- QUAN Shujing, MA Huang, LIU Dehai, *et al.* The isolation and identification of amylase-producing strains from Qinghai-Tibetan Plateau and its amylase characteristics [J]. *Henan Science*, 2015, **33**(3):384-388.
- [14] 黄凯,李小明,曾光明,等.培养基对菌产微生物絮凝剂的影响研究[J].*环境污染治理技术与设备*,2004,**5**(12):31-34.
- HUANG Kai, LI Xiaoming, ZENG Guangming, *et al.* Study on effect of culture medium on microbial flocculant production [J]. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2004, **5**(12):31-34.

## Isolation, molecular biological identification and characterization of a thermosensitive amylase – producing strain

YAN Li

(Biological Laboratory of Cultural Relics Conservation and Restoration Center, Capital Museum, Beijing 100045, China)

DONG Zhen, LIU Weijie

(School of Life Science, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, China)

**Abstract:** There are many precious cultural relics of paintings and calligraphy in museums of China, but effective restoration of them is difficult due to their material characteristics. Paste between paintings or calligraphy and backing papers is the main obstacle in the process of taking off old backings. Amylase has been used to effectively decompose starch paste, which improves the efficiency of taking off old backings; however, residues of amylase on cultural relics could influence subsequent remounting. Therefore, development of a thermosensitive amylase could contribute to the process of remounting after taking off old backings. In our study, a bacterial strain named BWL1025 that can secrete thermosensitive amylase, was isolated from soil sampled in the cold northeast area. Using methods of molecular biology, the strain BWL1025 was identified as *Bacillus subtilis*. The optimum conditions for enzyme activity, the pH stability, the lowest inactivation temperature and the minimum inactivation time of the amylase produced from BWL1025 were determined by the DNS method. The results show that the enzyme activity reached its highest activity of 0.839 IU/mL at 40 °C, but almost disappeared after 25 minutes at 60 °C. In addition, we optimized the fermentation conditions of the strain BWL1025, and found that the highest activity of 1.63 IU/mL was observed when yeast extract was used as nitrogen source and xylose as carbon source. This study provides a good enzyme source for taking off old backings from cultural relics of paintings and calligraphy.

**Key words:** Thermosensitive amylase; *Bacillus subtilis*; Restoration of cultural relic; Taking off old backings from cultural relics of paintings and calligraphy

(责任编辑 潘小伦)