

研究各种低分子烃的生物催化氧化的菌株。

参 考 文 献

- 1 Van derlinden A C. *Biochem Biophys Acta* 77. 157—159, 1963
- 2 Ferenci T *FEBS letters*, 41 94—98, 1974
- 3 Ferenci T et al *J General Microbiology*, 91 79—91, 1975
- 4 Chetham D S J *Enzyme and microbiol sechnology*, 9 (4), 492—494, 1987
- 5 Colby J and Dalton H *Biochemcul Journad*, 157 495—497, 1976
- 6 Tonge G M et al *Biochemical Journal*, 161 333—

- 344, 1977
- 7 Tonge G M et al. *FEBS letters*, 58 293—299, 1975.
- 8 De Bont J A M et al. *Enzyme microsol Technol.* 5 55—59, 1983
- 9 Furuhashi K et al *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.*, 12 39—49, 1981.
10. Patel R N et al *J App Biochem.* 5 121—131, 1983
11. Foster J W and Richard H Davis *J of Bacteriology*. 91(5) 1924—1932, 1966
12. R. E. 布坎南等编, 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译: 伯杰细菌鉴定手册, 第八版, 第 349—352 页, 1984.
13. 高桥稷二(日本): 发酵协会志, 26: 494, 1968。

地衣芽孢杆菌 A.4041 耐高温 α -淀粉酶的研究

杨俊豪 胡学智

(上海工业微生物研究所, 上海)

摘要 地衣芽孢杆菌 A 4041 是一株产生耐高温 α -淀粉酶的突变株。本文研究了 A 4041 发酵培养基的成份, 发现用天然碳源原料产酶优于葡萄糖、乳糖和淀粉。葡萄糖对发酵产酶有一定程度的抑制作用。此外还发现 A.4041 所产生的耐高温 α -淀粉酶的热稳定性与 Ca^{2+} 浓度有关, 高浓度氯化钠与淀粉能促进该酶的耐热性。

关键词 地衣芽孢杆菌, 耐高温 α -淀粉酶

耐高温 α -淀粉酶是一种用途广泛的酶, 由于其热稳定性好, 对 Ca^{2+} 的依赖性低, 适合于在高温下液化淀粉。

最初, 耐高温 α -淀粉酶是从嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 的培养物中提取到的^[1], 其最适反应温度可达 70—75°C, 活性 pH 范围偏向酸性。另外, 油脂酵母 (*Lipomyces starkeyi*)^[2] 和嗜热硫氢酸梭菌 (*Clostridium thermohydrosulfuricum*)^[3] 等也能产生耐高温 α -淀粉酶。但是, 最高反应温度的 α -淀粉酶是由地衣芽孢杆菌 (*B licheniformis*) 产生的, 其最适反应温度可达 90°C 以上, 而且酶的活性 pH 范围相当宽^[4]。目前, 工业上生产耐高温 α -淀粉酶的菌种大多为地衣芽孢杆菌的突变株。

地衣芽孢杆菌 A. 4041 是我所从地衣芽孢杆菌 ATCC 9789 突变选育出的一株耐高温 α -淀粉酶高产菌。本文着重研究了该菌的产酶发

酵培养基及该菌所产生的耐高温 α -淀粉酶的热稳定性。

材 料 与 方 法

1. 菌种: 地衣芽孢杆菌 A 4041 (Spo^{-} , Rif^{r} , Met^{-} , Arg^{-})。

2. 培养基: 肉汁培养基 (%) : 蛋白胨 1, 牛肉膏 1, 可溶性淀粉 1, NaCl 0.5, pH 7.0。

发酵培养基 (%) : 麦芽粉 8, 黄豆粉 3, 玉米浆 1.5, K_2HPO_4 0.1, $CaCl_2$ 0.4, pH 8.0。

3. 培养及发酵方法: 将斜面菌种接一环入肉汁培养基 (250ml 三角瓶装 20ml), 37°C 往复摇床 120r/min 培养 10 小时左右作种子, 接 0.5ml 入发酵培养基 (500ml 三角瓶装 30ml), 37°C 往复摇床 120r/min 培养 3 天, 发酵液 90°C 处理 15 分钟, 测定酶活力。

4. α -淀粉酶活力测定方法: 按轻工业部部

颁标准方法测定^[5]。本文中酶单位以相对活力表示(100 相对酶活力相当于部颁法测定 80 单位)。

5. 还原糖测定方法: 按费林法测定^[6]。

6. 粗酶制剂的制备: A.4041 的发酵液加凝聚剂,离心除去菌体和杂质,上清液加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 40% 饱和度,10°C 过夜,4000r/min 离心除去杂蛋白沉淀,上清液再加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 90% 饱和度,4000r/min 离心收集蛋白质沉淀,将沉淀溶解于 pH 7.5 的 10m mol/L Tris-醋酸缓冲液,即得粗酶制剂。

结 果

(一) 地衣芽孢杆菌 A.4041 发酵培养基

1. 发酵培养基配方的优选

(1) 碳、氮原料浓度的正交分析试验: 采用 $L_9(3^4)$ 进行正交统计分析。发酵培养基中麦芽粉为 6%, 8% 和 10%, 黄豆粉为 2%, 3% 和 4%, 玉米浆为 0.5%, 1.0% 和 1.5%。另外,在培养基中加 K_2HPO_4 0.1%, CaCl_2 0.4%。

正交分析结果说明,麦芽粉、黄豆粉和玉米浆的浓度分别取 8.0%, 3.0% 和 1.5% 较为合适。根据极差分析,培养基中对发酵产酶影响最大的是麦芽粉浓度,其次为黄豆粉浓度。

(2) K_2HPO_4 和 CaCl_2 的浓度分析试验: 在发酵培养基中改变 K_2HPO_4 和 CaCl_2 的浓度,发酵后测定发酵液的酶活力。

表 1 K_2HPO_4 和 CaCl_2 的浓度分析实验

相对酶活力 K_2HPO_4 浓度(%)	CaCl_2 浓度(%)		
	0.2	0.4	0.6
0.1	70.1	97.3	93.4
0.3	30.4	93.4	100.0
0.5	82.5	100.0	63.7

Ca^{+2} 和 HPO_4^{-2} 易形成沉淀,考虑到酶制剂生产不宜投入大量原料,所以发酵培养基中

K_2HPO_4 添加量为 0.1%, CaCl_2 为 0.4%。

2. 碳源对发酵产酶的影响: 在发酵培养基中以各种碳源替代麦芽粉,并相应改变黄豆粉含量以维持一定的碳氮比,玉米浆、 K_2HPO_4 和 CaCl_2 的含量不变,发酵后测定酶活力,结果见表 2。

在这几种原料中,饴糖、山芋粉和玉米粉有希望替代麦芽粉而成为发酵培养基中的主要碳源。

3. 各种氮源对发酵产酶的影响: 在发酵培养基中,麦芽粉、玉米浆、 K_2HPO_4 和 CaCl_2 的含量保持不变,用各种氮源替代黄豆粉作主要氮源,发酵后测定酶活力,结果见表 3。

在这几种原料中,蛋白胨和棉籽饼粉有希望替代黄豆粉而成为发酵培养基的主要氮源。

4. 葡萄糖流加对发酵产酶的影响: 首先,在发酵过程中定时取出发酵液,观察菌体形态,测定发酵液 pH 值,酶活力和还原糖含量(图 1)。

表 2 各种碳源对发酵产酶的影响

编号	碳源及含量(%)	黄豆粉含量(%)	相对酶活力(%)
对照	麦芽粉 8	3	100.0
1	葡萄糖 4	6	59.5
2	乳糖 4	6	27.1
3	蔗糖 4	6	63.0
4	饴糖 4	6	95.8
5	马铃薯淀粉 4	6	46.8
6	山芋粉 5	6	100.0
7	玉米粉 5.5	6	100.0
8	麸皮 10	1	28.4
9	米糠 10	1	67.2

表 3 各种氮源对发酵产酶的影响

编号	氮源名称及含量(%)	相对酶活力
对照	黄豆粉 3.0	100.0
1	牛肉膏 2.0	83.3
2	蛋白胨 2.0	92.3
3	棉籽饼粉 3.0	100.0
4	花生粉 3.0	85.6
5	酵母粉 2.0	33.3

在上述发酵过程的不同时间,向摇瓶中流加一定量(0.25%, 0.5% 和 1.0%)的葡萄糖,并

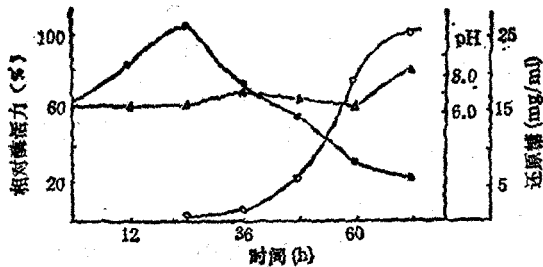


图1 发酵过程曲线
—Δ—pH 值, —●—还原糖浓度, —□—酶活力

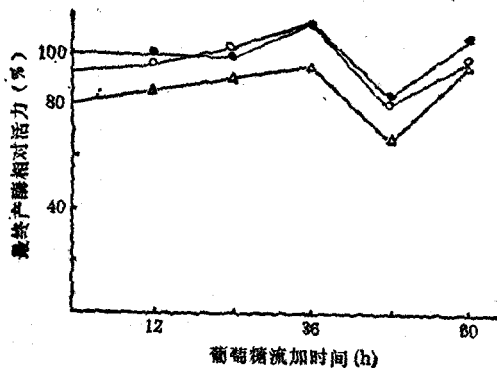


图2 葡萄糖流加对产酶的影响
葡萄糖浓度: —●—0.25%, —□—0.5%, —Δ—1.0%

测定它们的最终产酶活力(以不流加葡萄糖的发酵活力为100)。发酵培养基中麦芽粉含量改为7.0%。结果见图2。

从试验结果看,在发酵36小时左右流加0.25%和0.5%的葡萄糖对最终产酶有利,此时细胞处于大量合成 α -淀粉酶的前期,一定量的能源补充能促进产酶。但是,地衣芽孢杆菌A.4041虽然部分解除了分解代谢阻遏^[7],仍在一定程度上受到葡萄糖代谢对 α -淀粉酶合成的抑制,因为流加1%的葡萄糖使A.4041的产酶下降,尤其是在发酵48小时(细菌产酶进入高峰之前),葡萄糖的流加对产酶抑制最大。当发酵至60小时,培养物中空胞大量出现,细菌代谢很弱,流加葡萄糖对产酶无甚影响。

(二) A.4041 产生的高温 α -淀粉酶的耐热性

1. A.4041 耐高温 α -淀粉酶的最适反应温度:在pH6.0的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液中,用粗酶制剂于不同温度的水浴中反应测定酶活

力,以60℃时测得的酶活力为100,从图3可见,A.4041 α -淀粉酶的最适反应温度在95℃以上。

2. A.4041 α -淀粉酶的热稳定性

(1) Ca^{2+} 对A.4041 α -淀粉酶热稳定性的影响:将A.4041耐高温 α -淀粉酶制剂对pH7.5的10mmol/L Tris-醋酸缓冲液充分透析,然后在其中加入不同浓度的 Ca^{2+} (CaAc_2 溶液),90℃恒温水浴中处理15分钟,测定其残留酶活力,以未热处理的酶液活力为100单位,结果见表4。

从表4可见,从A.4041耐高温 α -淀粉酶液中除去 Ca^{2+} ,酶就丧失其耐热性,重新加入极少量的 Ca^{2+} 即可使其恢复对热稳定性,但过高浓度的 Ca^{2+} 也会降低酶液的热稳定性。

(2) 高浓度 NaCl ,淀粉对A.4041 α -淀

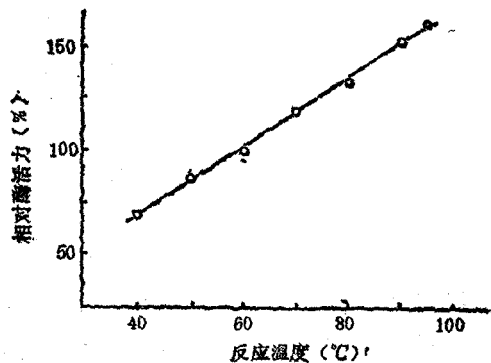


图3 A.4041 α -淀粉酶的温度-酶活力曲线

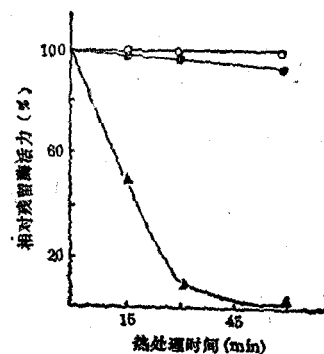


图4 A.4041 α -淀粉酶的热稳定性
—□—A.4041 粗酶制剂
—●—A.4041 发酵酶液
—▲—A.4041 粗酶制剂(含 Ca^{2+})

表4 Ca²⁺浓度对 A.4041 α-淀粉酶耐热性的影响

Ca ²⁺ 浓度 (mmol/L)	0	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0	20.0	50.0	100.0
热处理后相对残留酶活力	<1	17.7	38.6	60.0	60.0	64.1	52.1	32.2	17.2

粉酶热稳定性的影响:在透析除去Ca²⁺的粗酶制剂中加入10%的NaCl,3%的可溶性淀粉和5mmol/L的Ca²⁺作保护剂。将A.4041发酵酶液,A.4041 α-淀粉酶粗酶制剂(含Ca²⁺)和加上上述加保护剂的粗酶制剂,在90℃恒温水浴处理15、30和60分钟,测定其残留酶活力,结果见图4。

从试验结果看,发酵酶液中因含有各种有机、无机成份,对酶的热稳定性有保护作用。在酶制剂中加入淀粉和高浓度NaCl也能大幅度提高A.4041 α-淀粉酶的热稳定性。

讨 论

研究表明,地衣芽孢杆菌A.4041,以天然原料为主的发酵培养基明显优于合成培养基。首先,可能是因为天然原料中营养成分比较全,能够满足细菌生长和产酶的需要。其次,细菌利用天然原料时,生长速度比较慢,这样就能控制细菌生长速率,代谢水平和最终菌体密度,对产酶有利。A.4041的α-淀粉酶的形成是在对数生长期结束以后才开始的,培养基中的还原糖浓度降低到一定水平,产酶才渐渐进入高峰,这一现象与Meers的报道^[9]相似。发酵过程中流加1%的葡萄糖,产酶就会受到较为明显的抑制,尤其是在产酶进入高峰时,流加葡萄糖对产酶的抑制更为明显。但是,在产酶进入高峰之前,少量流加葡萄糖却能促进产酶,这说

明A.4041形成耐高温α-淀粉酶需要一定的能源补充,但葡萄糖对A.4041 α-淀粉酶的产生又有代谢阻遏作用。

Ca²⁺与α-淀粉酶结合,能起到稳定酶分子构象的作用,A.4041 α-淀粉酶的热稳定性对Ca²⁺的依赖性低,这说明该酶与Ca²⁺具有较强的亲合力。Ca²⁺除了能稳定α-淀粉酶外,还有一种破坏蛋白质稳定性的效应^[9],所以过高浓度的Ca²⁺反而对α-淀粉酶的热稳定性不利。另外,高浓度NaCl能降低水的活度^[10],α-淀粉酶与其底物淀粉的结合又能降低酶的自由能^[9],所以,高浓度NaCl和淀粉能够提高α-淀粉酶的热稳定性。

参 考 文 献

1. Pfueller S L and Elliott W H: *J. Biol. Chem.*, **244**: 48—54, 1969.
2. Kelly C T et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**: 352—358, 1985.
3. Melasniemi H: *J. Gen. Micr. biol.*, **133**: 883—890, 1987.
4. Kindle K L: *Appl. Biochem. Biotech.*, **8**: 157—170, 1983.
5. 张树政主编:《酶制剂工业》下册,科学出版社,北京,485—486页,1984.
6. 朱俭等编著:《生物化学实验》,上海科技出版社,4—8页,1981.
7. 胡学智等:《中国食品科技学报》,创刊号:1,1988.
8. Meers J L: *Antonie Van Leeuwenhoek*, **38**: 585—590, 1972.
9. Alan Wiseman: *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, **6**, p.71, 1982.
10. Chandra A K: *J. Ferment. Technol.*, **58**: 1—10, 1980.

低温型碱性蛋白酶通过技术鉴定

低温型碱性蛋白酶的研究是国家重点攻关项目之一,该课题由中国科学院微生物研究所和江苏无锡酶制剂厂共同承担。1990年8月23日,在北京通过了由中科院组织的全国性技术鉴定。

低温型碱性蛋白酶是由嗜碱性短小芽孢杆菌产生的一种新型蛋白酶,国内外未见报道。该菌嗜碱性强,产酶活力高,抗污染和适应性强,性状稳定,在20—28℃条件下,对血、奶等蛋白质污垢具有较强的水解作用。用于加酶洗涤剂,具有节约能源、利于常温下洗涤、防止化纤织物变形等优点,经济和社会效益明显。鉴定委员会认为:鉴定资料齐全,数据可靠,中试项目成熟,已全面完成“七五”下达的各项技术指标,发酵和应用达到目前国内最高水平。为尽快推出此新产品,建议列入“八五”开发项目,进一步完善提取工艺。(本刊讯)