

地衣芽孢杆菌 JS-5 α -淀粉酶的研究

李佑红* 吴衍庸

(中国科学院成都生物研究所, 成都)

1973年, Madson 等人首次从地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 提取到热稳定的 α -淀粉酶以来^[1], 国外已将高温 α -淀粉酶投入了工业生产。丹麦 Novo 公司、美国 Miles 公司皆相继采用地衣芽孢杆菌生产高温 α -淀粉酶。然而在国内该酶仍有待开发。

现已发现能产生高温 α -淀粉酶的好热细菌主要包括: 芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的好热性种^[2], 高温单胞菌 (*Thermomonaspora*)^[2,3] 和耐热假单胞菌 (*Pseudomonas thermoamylolyticus*)^[4] 等。但研究较多、应用前景较大的则以好热芽孢杆菌 (*Thermophilic bacilli*) 为主。

最近, 我们从酿酒曲药中分离到一株兼性好热芽孢菌。本文报道该菌 α -淀粉酶的产酶条件和酶学特性。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) JS-5 为该研究分离鉴定; 枯草杆菌 (*B. subtilis*) BF7658 由本所菌种组提供。

(二) 培养基和培养条件

1. 斜面种子培养基 (g/L): 牛肉膏 10, 蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂 15, pH 7.0。

2. 发酵种子培养基 (g/L): 蛋白胨 5, 牛肉膏 1, NH_4NO_3 2, K_2HPO_4 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KCl 0.5, FeSO_4 0.005, 可溶性淀粉 1, pH 7.0。

3. 发酵培养基 (g/L)^[5]: 蛋白胨 5, 牛肉膏 1, NH_4NO_3 2, K_2HPO_4 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KCl 0.5, FeSO_4 0.005, 可溶性淀粉 1, 每升另加玉米浸汁 100 ml, pH 7.2。培养枯草杆菌 BF 7658 需加入 CaCl_2 0.2g。

4. 氮源试验培养基 (g/L): K_2HPO_4 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KCl 0.5, FeSO_4 0.005, 可溶性淀粉 2, 供试氮源 2, pH 7.1。供试氮源包括: KNO_3 , NH_4Cl , NH_4NO_3 , 尿素, 蛋白胨,

牛肉膏和酵母膏等。

5. C/N 比试验培养基 (g/L): K_2HPO_4 5, NH_4NO_3 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KCl 0.5, FeSO_4 0.005; 每升加入可溶性淀粉 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 10, 40 g, 以使 C/N 比依次为 0, 1:20, 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 5:1, 20:1 的培养液; pH 7.0。

6. 培养条件: 本实验采用好氧静止培养^[5], 在 250 ml 三角瓶内装 25 ml 培养液 (或 1000 ml 三角瓶盛 100 ml 培养液), 灭菌后接种 12h 种子培养物, 接种量 4% (V/V)。除温度试验外, JS-5 在 53℃ 培养, BF7658 在 36℃ 培养。菌体通常培养 36h。菌体生长量以 OD_{600} 表示。

(三) 淀粉酶活力测定

1. 粗酶液的制备: 将培养后发酵液离心 (5000r/min, 10min) 上清液即为粗酶液^[1,6,7]。

2. 酶活力测定: 按文献 [8] 进行。JS-5 和 BF7658 的 α -淀粉酶分别在 90℃ 和 60℃ 测定。在本实验条件下 (2% 可溶性淀粉, pH 6.0), α -淀粉酶活力单位定义为 30 min 内水解 1 mg 可溶性淀粉所需的酶量 (u)。

结 果 和 讨 论

(一) 培养时间与菌体生长和产酶的关系

于 53℃ 培养菌体, 大约每隔 10h 取样一次, 测定菌体生长 (OD_{600})、发酵液 pH 值和 α -淀粉酶活力 (图 1)。结果表明, 培养 70h 产酶量最高, 超过 70h 活力开始下降。此外, 产酶与培养液 pH 值之增大同步。

(二) 培养温度对菌体生长和产酶的影响

在不同温度下 (5—65℃) 培养 JS-5, 36h 后测定菌体生长和 α -淀粉酶活力。结果示于图 2。由图 2 可见, 菌体生长和产酶的最适温度均在 53℃。温度高于 53℃ 菌体生长和酶活力迅速下降。

本文于 1986 年 5 月 19 日收到。

* 目前地址: 中国科学院微生物研究所, 北京。

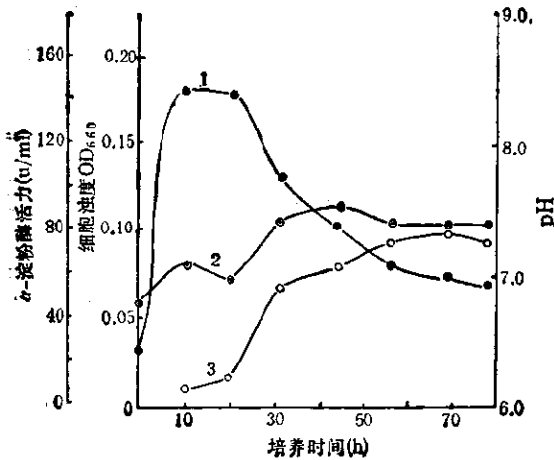


图1 培养时间与菌体生长和产酶的关系

1. 菌体生长; 2. 培养液 pH 值; 3. α -淀粉酶活力

(三) 起始 pH 值对菌体生长和产酶的影响

用不同 pH 值 (2.5—11.0) 的发酵培养液于 33℃ 培养 JS-5, 经 36h 后测定菌体生长和 α -淀粉酶活力 (图 3)。JS-5 能在广 pH 范围内 (2.5—11.0) 内良好生长, 最适生长 pH 值为 9.0; 而产生 α -淀粉酶的 pH 范围较狭窄, 最适 pH 7.0。

(四) 氮源对菌体生长和产酶的影响

试验了八种氮源, 酵母膏是菌体生长和产酶的最适氮源, 其次为牛肉膏。在无氮源条件下, 菌体不生长, 也测不出酶活。

(五) C/N 比对菌体生长和产酶的影响

当 C/N 比为 2:1 时, 产酶最高。菌体生长随 C/N 的上升而增加。

(六) 反应温度对 JS-5 α -淀粉酶活性的影响

在 20—100℃ 内测定 JS-5 α -淀粉酶的活性变化, 同时与中温菌 BF7658 α -淀粉酶相比较 (图 4)。由图 4 可知 JS-5 α -淀粉酶的最适作用温度高达 90℃, 而 BF7658 α -淀粉酶的最适温度仅为 60℃。

(七) pH 值对 JS-5 α -淀粉酶活性的影响

在最适温度 90℃ 下测定不同 pH 值 (3.0—10.5) 下 α -淀粉酶活力。JS-5 α -淀粉酶在 pH 4.5—10.5 都具较高活性, 最适 pH 值约为 10。

(八) JS-5 α -淀粉酶的热稳定性

在 90℃ 将酶液保温不同时间, 冷却后测定剩余活力 (图 5)。90℃ 保温 5 min, 保留原酶活力

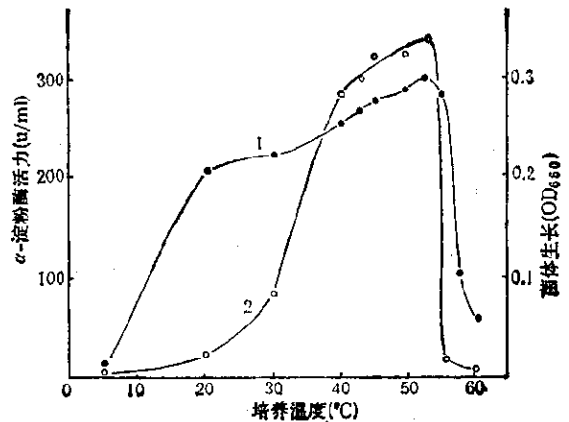


图2 培养温度对菌体生长和产酶的影响

1. 菌体生长; 2. α -淀粉酶活力

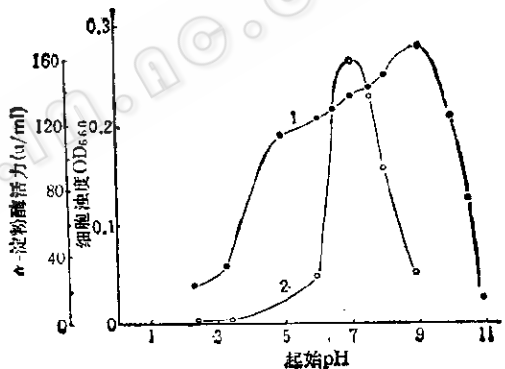
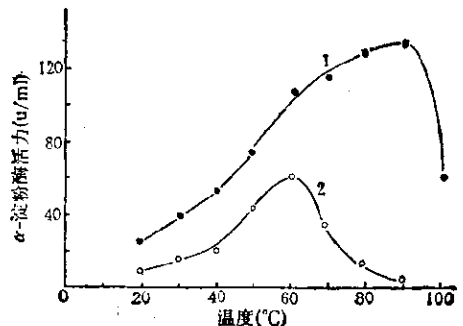


图3 起始 pH 值对菌体生长和产酶的影响

1. 菌体生长; 2. α -淀粉酶活力

图4 JS-5 和 BF7658 α -淀粉酶最适作用温度比较

1. 地衣芽孢杆菌 JS-5 2. 枯草杆菌 BF7658

的 60%。

通过人工诱变可大幅度提高地衣芽孢杆菌

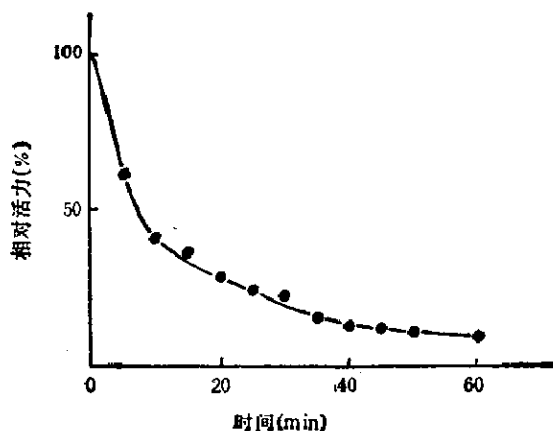


图5 JS-5 α -淀粉酶的热稳定性

α -淀粉酶活力,因而在深入研究以后可望将 JS-5

选育成为工业生产菌种。

参考文献

- [1] Madson, G. B. et al.: *Die Starke*, 25: 304—308, 1973.
- [2] Aylmoph, J. L. et al.: *Appl. Environ. Microbiology*, 34: 391—397, 1977.
- [3] Upton, M. E. et al.: *ibid.*, 33: 59—64, 1977.
- [4] 三轮直人: 公开特许公报, 106: 786, 1976。
- [5] Meddas, S., et al.: *J. Appl. Bacteriol.*, 48: 47—58, 1980.
- [6] Saito, N.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 155: 290—298, 1973.
- [7] Meers, J. L.: *Antonie van Leeuwenhoek J. Microb. Serol.*, 38: 585—590, 1972.
- [8] 胡学智等: 酶制剂工业 (张洲政编), 科学出版社, 北京, p. 456—489, 1984。

STUDY ON PRODUCTION CONDITIONS AND ENZYMATIC PROPERTIES OF α -AMYLASE FROM *BACILLUS LICHENIFORMIS* JS-5

Li Youhong* Wu Yianyang

(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu)

A new strain of *Bacillus* producing a thermostable α -amylase was isolated from the Traditional Chinese Liquor Ferment-pits and has been identified and designated as *Bacillus licheniformis* JS-5. The α -amylase released by strain JS-5 showed a wide temperature-range of activity with the optimum being 90°C. This enzyme could dextrinize starch at a temperature of as high as 100°C. It also has an extensive pH-range of activity of about 4.5—10.5. The production conditions

of the α -amylase by JS-5 were investigated and the possible industrial application is evaluated in the paper as well.

Key words

α -amylase; *Bacillus licheniformis*

* Present address: Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing