

多粘杆菌 β -淀粉酶的产生及其性质的初步研究

何秉旺 郭君著 姜兆元 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

多粘杆菌 (*Bacillus polymyxa*) AS1.546 产 β -淀粉酶的最适培养基成份(%)为: 玉米粉 4, 豆饼粉 2, 酵母膏 0.5, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 自然 pH (7 左右)。250 毫升三角瓶装 50 毫升培养基, 旋转式摇床 (220 转/分), 温度为 30℃, 培养时间为 60 小时, 每毫升发酵液酶活力可达 700 单位。酶反应的最适温度为 45℃, 最适 pH 为 6.5, 水解可溶性淀粉生成麦芽糖可达 96%。

β -淀粉酶最初发现在高等植物如大麦、小麦、甘薯和大豆中, 近些年来国外科学工作者发表了有关微生物产生 β -淀粉酶的报道^[1-3]。过去我们曾经做过葡萄糖淀粉酶和异淀粉酶的提纯和性质的研究。为了在生产上用微生物产生的 β -淀粉酶代替大麦芽, 为了进一步研究不同糖苷酶的作用机制, 我们进行了产生 β -淀粉酶的微生物的筛选, 筛到了几株产 β -淀粉酶的菌种。本文主要报道多粘杆菌产生 β -淀粉酶的发酵条件和酶性质的初步研究。

材料和方法

(一) 菌种

从我所保藏室和细菌分类室供给的 300 多株细菌中, 筛选得到多粘杆菌 *Bacillus polymyxa* AS 1.546 产 β -淀粉酶的菌种, 用普通牛肉汁斜面培养基, 于 30℃ 温箱中培养 24 小时备用。

(二) 培养方法

1. 液体种子的培养: 用牛肉汁液体培养基, 另加 0.3% 酵母膏和 0.5% 可溶性淀粉, 在 30℃ 旋转摇床 (220 转/分) 上振荡培养 24 小时后备用。

2. 发酵培养基: 培养基组成(%)为: 玉米粉 4, 豆饼粉 2, 酵母膏 0.5, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 自然

pH (7 左右)。在 250 毫升三角瓶中装 50 毫升培养基, 15 磅灭菌 30 分钟, 冷却后接种, 在上述培养条件下培养 60—72 小时, 发酵液过滤即为酶液。

3. β -淀粉酶活力的测定: 反应液总体积 10 毫升, 内含 2% 的可溶性淀粉溶液 5 毫升, 0.2M pH6.8 的磷酸缓冲液 0.5 毫升, 蒸馏水 4.3 毫升 (或 4.25 毫升), 于 40℃ 恒温水浴中预热 5 分钟, 加酶液 0.2 毫升 (或 0.25 毫升), 保温 30 分钟, 立即将试管置沸水浴中煮 10 分钟, 冷却后取样 5 毫升, 用次亚碘酸法^[4]测定还原糖 (按麦芽糖计算)。在上述条件下, 每小时产生 1 毫克麦芽糖的酶量为 1 个酶活力单位。

结果和讨论

(一) AS1.546 菌种培养条件的试验 (下述基本培养基即发酵培养基)

1. 不同碳源对产酶的影响: 在基本培养基中, 加不同碳源均为 2% (灭菌为 8 磅 15 分钟), 振荡培养后测定酶活力, 结果见表 1。从表 1 看出只有在以玉米粉为碳源的培养基产酶活力为最高, 在其它的碳源的培养基上该菌产酶活力均很低。

2. 不同氮源对产酶的影响: 按基本培养基成份, 将其氮源改为不同种氮源 (含氮

本文于 1979 年 8 月 18 日收到。

表 1 不同碳源对产酶的影响

碳 源	葡萄糖	麦芽糖	乳 糖	蔗 糖	糊 精	淀 粉	玉 米 粉
酶活力* (单位/毫升)	96	39	81	73	62	108	503
pH	7.0	7.0	7.0	7.5	7.0	6.5	5.5

* 酶活力单位值一般为 4—6 次实验平均数值。

表 2 不同氮源对产酶的影响

氮 源	(NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ HPO ₄	NH ₄ Cl	NH ₄ NO ₃	(NH ₄) ₂ CO ₃	(NH ₄) ₂ CO	NH ₄ HCO ₃	酵母膏	鱼 肝 油	豆饼粉
含量(%)	0.52	0.52	0.43	0.32	0.38	0.37	0.64	2	2	2
酶活力 (单位/毫升)	178	390	178	144	264	123	109	486	472	541
pH	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	6.0	5.1	7.0

量一致),调 pH7.0, 培养 60 小时后测定酶活力,实验结果见表 2。在有机氮源的培养基上产酶活力均较高,其中以豆饼粉最好,酵母膏次之,无机氮源除 (NH₄)₂HPO₄ 外均对该菌产酶不利。

3. 豆饼粉不同用量对产酶的影响: 按基本培养基成份,只改变豆饼粉的用量,自然 pH, 培养 60 小时,测定酶活力,试验结果见表 3。由表 3 看出产酶活力随豆饼粉用量的增加而提高,因豆饼粉浓度的增加会增大酶液粘度,所以确定豆饼粉的用量为 2%。

表 3 豆饼粉的不同用量对产酶的影响

豆饼粉用量(%)	1	2	3	4
酶活力 (单位/毫升)	548	579	599	722

4. 玉米粉不同用量对产酶的影响: 培养基成份只改变碳源玉米粉的用量,自然 pH6.5, 在最适条件下, 培养 60 小时后测定其酶活力,试验结果见表 4。该菌种随培养基玉米粉用量的增加产酶能力也随之

提高。考虑到培养的总浓度不要太高,初步确定以 4% 的玉米粉为宜。

表 4 玉米粉不同用量对产酶的影响

玉米粉用量(%)	1	2	3	4	5
酶活力 (单位/毫升)	308	448	579	586	613
酶液 pH	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0

5. 不同量的玉米浆对产酶的影响: 在基本培养基成份中补加不同量的玉米浆(以湿重计), 自然 pH, 培养 60 小时后测定酶活力实验结果见表 5。AS1.546 菌随玉米浆用量的增加产酶能力随之下降,说明玉米浆对该菌产 β -淀粉酶有抑制作用,这个结果与高崎^[5]报道的一致。

表 5 不同量的玉米浆对产酶的影响

玉米浆(%)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
酶活力 (单位/毫升)	684	606	618	582	465	246
pH	7.0	7.0	6.5	5.4	6.5	5.1

6. 不同量的磷酸盐对产酶的影响: 培养基只改变 Na_2HPO_4 的用量, 培养后测其酶活力, 实验结果见表 6。加 0.2% 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 已足够。

表 6 不同量的磷酸盐对产酶的影响

磷酸盐(%)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
酶活力 (单位/毫升)	0.178	484	527	500	490	506
pH	6.0	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5

7. 补加不同量的柠檬酸或酒石酸对产酶的影响: 在基本培养基中补加不同量的柠檬酸或酒石酸, 自然 pH 7.0, 培养 72 小时后测定其酶活力, 实验结果见表 7。在培养基中补加柠檬酸或酒石酸对 β -淀粉酶的产生均有较强的抑制作用, 该菌的产酶能力随此二酸用量的增加而降低。这个结果与高崎报道^[7] *Bacillus cereus* var. 菌的情况正相反。

表 7 补加柠檬酸或酒石酸对产酶的影响

柠檬酸(%)	0	0.1	0.3	0.5	1.0
酶活力 (单位/毫升)	719	667	205	86	86
酒石酸(%)	0	0.1	0.3	0.5	
酶活力 (单位/毫升)	719	205	120	103	

8. 不同起始 pH 对产酶的影响: 培养基成份不变, 每瓶装培养基 50 毫升, 用 2N 的盐酸调至不同 pH, 灭菌后接液体种子 1 毫升, 培养 72 小时后测定酶活力, 结果见表 8。起始 pH 5.0 产酶活力最高, 但总的说来在实验的 pH 范围内起始 pH 的不同对该菌的产酶能力影响不明显。

9. 通气量对产酶的影响: 250 毫升的三角瓶装不同量的液体培养基, 在相同条件下振荡培养 60 小时后测定酶活力, 实验

表 8 不同起始 pH 对产酶的影响

起始 pH	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
发酵液 pH	6.0	6.6	7.0	7.0	7.0	7.0
酶活力 (单位/毫升)	684	753	666	650	633	667

结果见表 9。装 50 毫升培养基的酶活力最高, 但装不同体积培养基之间产酶量区别不明显, 说明该菌对通气量的要求不严格。

表 9 通气量对产酶的影响

培养基体积 (毫升)	30	40	50	60	70
酶活力 (单位/毫升)	548	599	633	616	599

10. 培养温度对产酶的影响: 培养基同前, 于不同温度下培养 72 小时后测定酶活力, 结果见图 1。在 30℃ 产酶能力最高; 在 20℃ 或 40℃ 产酶能力显著下降。

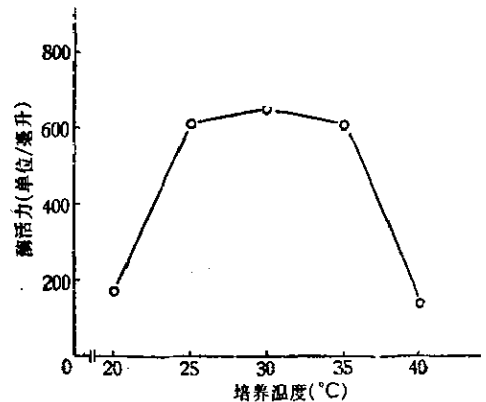


图 1 培养温度对产酶的影响

11. 培养时间对产酶的影响: 培养基同前, 250 毫升三角瓶装培养基 50 毫升, 每瓶装液体种子 1 毫升, 于 30℃ 振荡培养不同时间, 测定酶活力, 实验结果见表 10。在 48—72 小时期间产酶活力最高, 为 736 个单位。

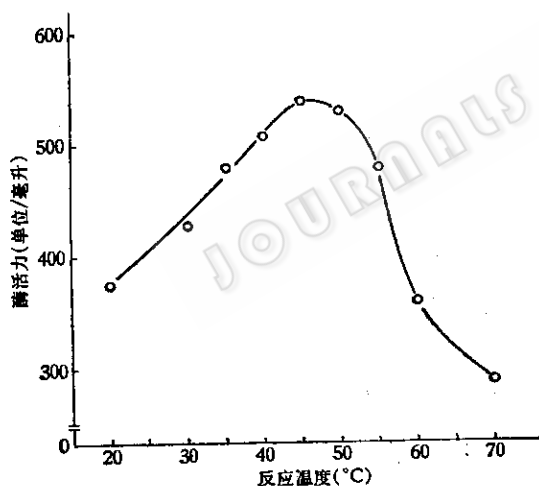
表 10 培养时间对产酶的影响

培养时间(小时)	24	48	72	96	120
酶活力 (单位/毫升)	633	736	736	655	616

综合上述试验结果,确定 AS1.546 菌较好的培养基成份为(%):玉米粉 4, 豆饼粉 2, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 酵母膏 0.5。培养最适条件为:在 30°C 旋转摇床(220 转/分)上,培养 48—72 小时,每毫升发酵液酶活力均可达 700 单位以上。

(二) β -淀粉酶性质的初步研究

1. 酶反应的最适温度:在不同温度下反应 30 分钟,测定酶活力,结果见图 2。 β -淀粉酶水解淀粉的最适温度为 45°C 。

图 2 β -淀粉酶反应的最适温度

2. 酶反应的最适 pH: 用 0.2M 的 Na_2HPO_4 -0.1M 的柠檬酸配制 pH5—8 的缓冲液,试验结果见图 3。 β -淀粉酶水解淀粉的最适 pH 在 6.0—7.0 之间,以 pH6.5 时酶活力最高。

3. 酶的热稳定性: 将酶液装入带塞的试管中,分别放入 40° 、 50° 和 60°C 的恒温水浴中保温,在不同时间取样,测定剩余

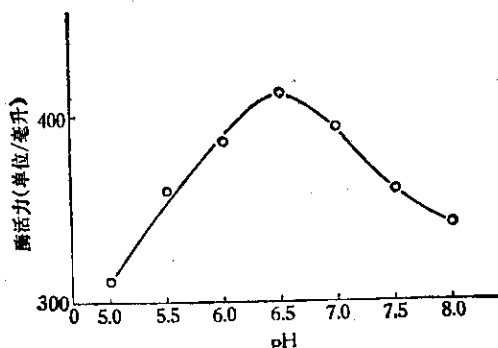


图 3 酶反应的最适 pH

酶活力,结果见图 4。 50°C 处理 3 小时,酶活力剩下 40%, 60°C 处理 2 小时酶活力只剩下 24%。

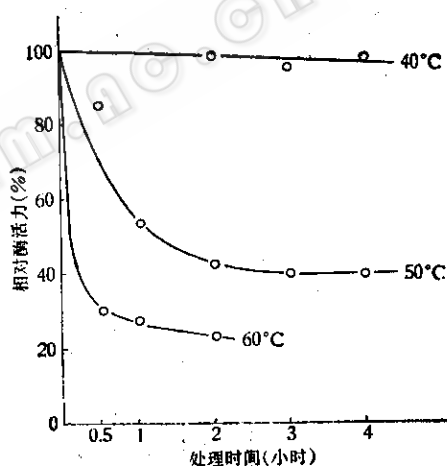


图 4 酶的热稳定性

4. 酶的 pH 稳定性: 取酶液 2 毫升加入不同 pH 的缓冲液 (pH3—8 的是 0.2M Na_2HPO_4 -0.1M 柠檬酸缓冲液; pH9—10 是 0.2M Na_2CO_3 -0.2M NaHCO_3 缓冲液) 2 毫升装入带塞试管中,在 30°C 恒温水浴中处理 5 小时后,测定其剩余酶活力,试验结果见图 5。在 pH6—8 之间酶活力比较稳定,尚能保留 92% 以上酶活力。而在 pH3 或 pH10 时酶活力只剩下 55% 左右。

5. 淀粉水解率的试验: 可溶性淀粉溶液 47 毫升(含淀粉 1 克),装入带塞的大试

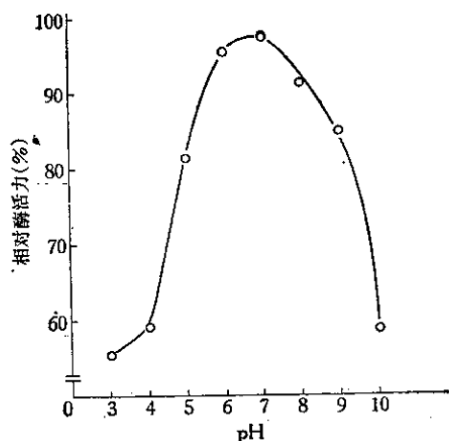


图5 酶的 pH 稳定性

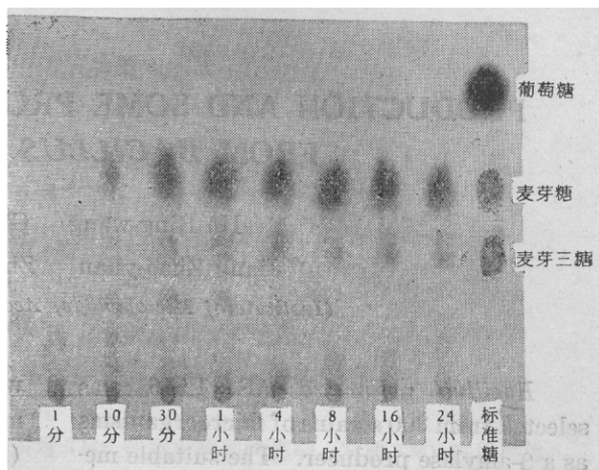


图7 AS1.546 菌的酶水解淀粉液层析图谱

管中, 于 40℃ 恒温水浴中预热 5 分钟, 加入酶液 3 毫升, 反应不同时间, 取样测定淀粉水解率 [以同样浓度的可溶性淀粉溶液, 用盐酸水解后测得的还原糖量 (以葡萄糖计算) 作为 100, 酶水解测得的还原糖量 (以一水麦芽糖计算), 求得淀粉水解率。] 试验结果见图 6。酶水解 4 小时, 淀粉水解率可达 96%。 β -淀粉酶水解可溶性淀粉

率一般报道为 50—60%^[3], 而 AS1.546 菌产生的酶水解可溶性淀粉率可高达 96%, 说明该菌株不仅产生 β -淀粉酶, 可能也产生一些 α -淀粉酶 (图 7 可以清楚地看到, 1 小时以前水解样品中含有一些糊精和寡聚糖色斑) 和异淀粉酶或苕霉多糖酶 (Pullulanase)。

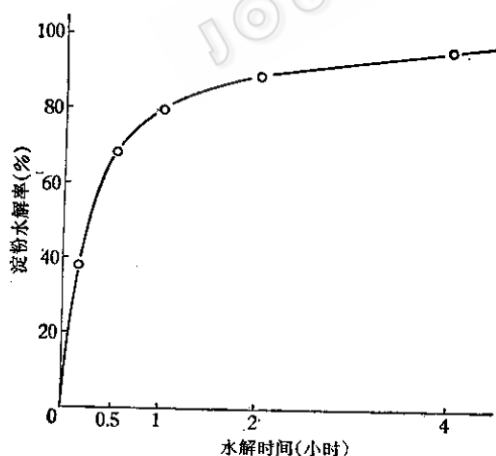


图6 酶对淀粉的水解率

参 考 文 献

- [1] Higashihara, M. and S. Okada: *Agr. Biol. Chem.*, 38: 1023, 1974.
- [2] Robyt, J., and D. French: *Arch. Biochem. Biophys.*, 104: 338, 1964.
- [3] Fogarty, W. M. and P. J. Griffin: *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 25: 229—238, 1975.
- [4] Shinke, R. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 38(3): 665—666, 1974.
- [5] Takasaki, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, 40(8): 1515—1522, 1976.
- [6] Willstätter and Schudel: In Browne and Zerban ed *Physical and Chemical Methods of Sugar Analysis*, 3rd. John Wiley & Sons, Inc. 1941, p. 896.
- [7] 高崎义幸: 公开特许公报, 7183, 1976。
- [8] Takasaki, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, 40(8): 1523—1530, 1976.

PRODUCTION AND SOME PROPERTIES OF β -AMYLASE FROM *BACILLUS POLYMYXA*

Ho Bing-wang Guo Jun-jun

Jiang Zhao-yuan Zhang Shu-zheng

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Bacillus polymyxa AS 1.546 was selected from 300 strains of microorganisms as a β -amylase producer. The suitable medium composition (%) was: corn meal 4, soybean cake meal 2, yeast extract 0.5, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.2, NaH_2PO_4 0.03; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05. When the organism

was grown in 250 ml flasks containing 50 ml of the above medium on a rotaty shaker (220 rpm) at 30°C for 60 hours, 700 units of β -amylase per ml of culture broth was obtained. Under optimal conditions (pH 6.5, 45°C), The enzyme converted starch to maltose with a yield of 96%.