

嗜碱性短小芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究*

III. 酶的性质及应用

邱秀宝 戴宏 袁影 于颖

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文对嗜碱性短小芽孢杆菌 (*Alkaliphilic Bacillus pumilus*) B45 菌株产生的碱性蛋白酶性质进行了研究。该酶对酪蛋白水解的最适 pH 为 10.0—10.5, 在 pH7—10 之间稳定, 最适反应温度为 45℃, 稳定性较好。最适底物浓度为 1%。四硼酸钠、氯化钙对酶有激活作用, 三聚磷酸钠及碳酸钠在常温下对酶活力无影响, 而在 40℃ 时对活力略有抑制, 加入 0.2g/L CaCl_2 可以保护酶的活性。B45 蛋白酶对血、奶污布的去污效果明显, 其去污力比一般洗衣粉高 10—13 倍。

关键词 嗜碱性短小芽孢杆菌; 碱性蛋白酶

从嗜碱性芽孢杆菌培养液中获得碱性蛋白酶的研究国外已有报导^[1-6], 我国对碱性蛋白酶的研究已有十多年的历史, 但对嗜碱性菌的研究则刚刚开始^[7-9], 继前报的研究结果, 本文对该种碱性蛋白酶的基本性质及其应用作进一步的探讨, 以求更好地应用于生产实践。

材料和方法

(一) 材料

1. 化学试剂: 均为国产 AR 级。
2. 酶样品: 有二种, 一种为 B45 菌株经 30℃ 摇床培养 52 小时后, 冷冻离心 (13000r/min, 15'), 得到清亮酶液做酶性质测定用, 另一种为; B45 发酵液经去渣, 喷雾干燥, 干粉的酶活力达 9.6 万 u/g (40℃ 测); B45 颗粒酶 1 万 u/g (40℃ 测)。2709 发酵液喷雾干燥酶粉 9.2 万 u/g (40℃); 2709KL 颗粒酶 2 万 u/g (40℃ 测)。做去污率测定用。

3. 血、奶、墨污布, 山西运城合成洗涤剂厂按轻工业部日用化学研究所规定制

备。

硬水: 按部颁标准制备, 硬度为 250ppm。

去污机: QW-2 型 (轻工业部日用化学研究所制造)。

白度计: QBDJ-1 型 (浙江省象山)。

(二) 试验方法

1. 酶活力测定: Folin 显色法^[10]。

规定 1ml 酶液在测定条件下每分钟释放 1μg 酪氨酸为一个活力单位。

2. 去污力测定, 洗涤试验是在 QW-2 型瓶式去污机中进行, 有 24 只 400ml 的玻璃瓶, (每只放 Dφ4mm 橡皮弹子 20 粒), 试验时每瓶装 300ml 配好的洗涤液 (用 250ppm 硬水配制, 内含碱性蛋白酶, 按所需浓度加入), 在预热槽中预热到 43℃, 即放入污布, 每瓶放 1 块, 在 45℃ 下转动洗涤 60min, 取出用自来水冲洗干净, 晾干进行白度测定。

本文于 1989 年 1 月 12 日收到。

* 国家“七五”攻关项目。

结 果

(一) 碱性蛋白质的性质

1. 酶反应的最适 pH: B45 经摇瓶培养后冷冻高速离心 (13000r/min, 15min) 获得清亮酶液, 用不同 pH 缓冲液稀释适当倍数, 28℃ 预热 3min, 加入 1ml 28℃ 预热好的 2% 酪蛋白(用不同 pH 值缓冲液配制), 在 28℃ 反应 10min, 加 2ml 三氯乙酸终止反应, 用 Folin 显色法测 OD 值, 结果见图 1。

图 1 结果表明, 在 28℃ 下酶反应最适 pH 为 10.5, 在 45℃ 时酶反应最适 pH 为 10.0。

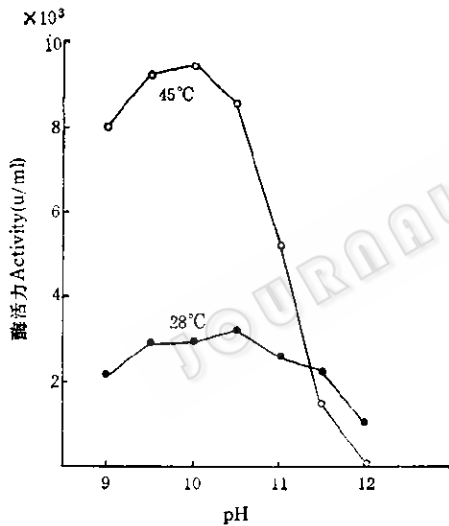


图 1 pH 对酶活力的影响

Fig. 1 Effect of pH on enzyme activity
Note: Boric acid borax buffer

2. 酶反应的最适温度: 方法同上, 将反应混合液放在不同温度的水浴中, 准确反应 10min, 用 Folin 试剂显色, 在 680nm 测 OD 值, 比较不同温度对酶反应的影响 (图 2)。

从图 2 结果表明, 酶反应速度随温度升高而加快, 但与反应系统的 pH 有密切关系, 当 pH12 时, 最适温度为 28℃, 当 pH

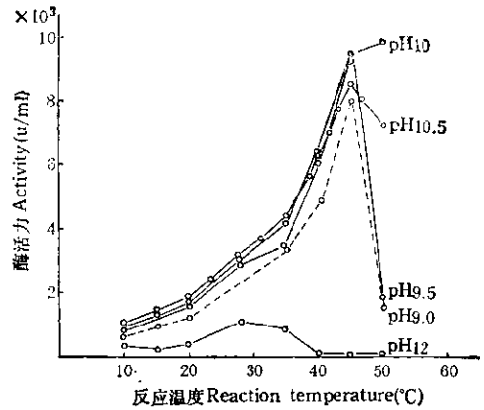


图 2 温度对酶活力的影响

注: 硼砂-NaOH 缓冲液

Fig. 2 Effect of temperature on enzyme activity
Note: Boric acid borax buffer

在 9.0—10.5 时, 最适反应温度为 45℃。

3. pH 对酶稳定性的影响: B45 发酵液经冷冻离心 (15000r/min, 15'), 然后分别用不同 pH 缓冲液稀释, 使达到要求的 pH 值, 分别在 28℃ 和 40℃ 处理 30min 和 60min, 然后用 pH10.5 硼砂-NaOH 缓冲液稀释 20 倍, 再用常规法测定剩余酶活

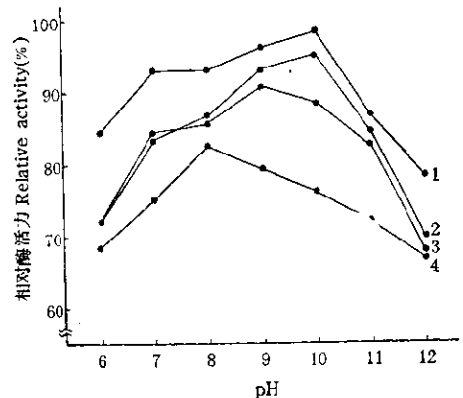


图 3 pH 对酶稳定性的影响

注: pH5—7 用磷酸缓冲液 (0.02mol/L)

pH8—13 用硼砂-NaOH 缓冲液 (0.025mol/L)

Fig. 3 Effect of pH on enzyme stability

Note: Buffer: pH5—7 0.02mol/L Phosphate buffer pH8—13 0.025mol/L Boric acid borax buffer

1. 28°C, 30min; 2. 28°C, 60min;

3. 40°C, 30min; 4. 40°C, 60min

力,结果见图 3。

4. 温度对酶稳定性的影响: 将酶液放在不同温度的水浴中处理不同时间, 然后取出立即用冰水冷却, 在 28°C 测剩余酶活力, 以不经热处理的酶为对照, 试验结果表明, B45 碱性蛋白酶的稳定性很好, 55°C 以下 60min 之内稳定; 69°C 15min 后酶活力还能保留 80% 以上, 处理 60min 保留酶

活力 20%。

5. 化学试剂对酶活力的影响: 将所试盐溶液分别加入到经适当稀释的酶液中, 使盐的终浓度分别为 1、2 和 3mg/ml, 分别于 40°C 水浴保温 10min 或 28°C 处理 30min, 然后冷却, 按 Folin 法于 28°C 测剩余酶活力, 以不加盐溶液的为对照, 结果见图 4—5。

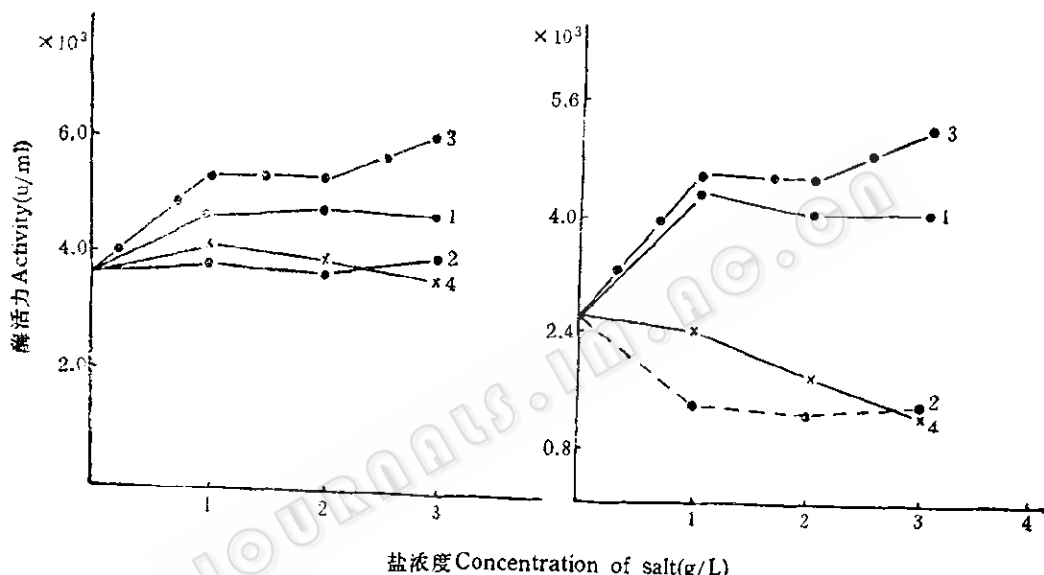


图 4 四种盐在 28°C (30min, 左) 和 40°C (10min, 右) 对酶活力的影响
Fig. 4 Effect of salts on enzyme activity at 28°C for 30 min (Left) and at 40°C for 10 min (Right)

1. 四硼酸钠 Sodium tetraborate; 2. 三聚磷酸钠 Sodium tripolyphosphate;
3. 氯化钙 Calcium chloride; 4. 碳酸钠 Sodium carbonate

图 4 表明, 在 28°C 条件下, 四硼酸钠及氯化钙对酶有激活作用, 其余两种盐对酶活力无影响, 这一性质十分有利于加酶洗涤剂的应用。在 40°C 条件下, 四硼酸钠和氯化钙也有激活作用, 三聚磷酸钠和碳酸钠有一定的钝化作用。

6. 钙离子对酶活力的保护作用: 将酶与不同浓度的三聚磷酸钠混合, 然后加入 CaCl_2 , 使其浓度达 0.2g/L , 以不加 CaCl_2 的为对照, 40°C 处理 30min 后于 28°C 测

活力, 比较加入 Ca^{2+} 后对酶的保护作用。图 5 表明, 在 40°C 加入 0.2g/L 的 CaCl_2 可使酶稳定, 较明显地解除了三聚磷酸钠的钝化作用。

7. 底物浓度对酶活力的影响: 酪蛋白用 0.025mol/L , $\text{pH}10.5$ 的硼砂- NaOH 缓冲液配制成不同浓度, 测定不同浓度的底物对酶活力的影响。试验表明, 底物浓度以 1% 为最好(图 6)。

(二) 应用

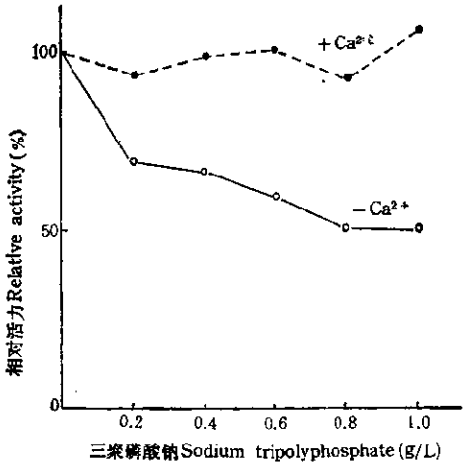


图 5 Ca^{2+} 对酶活力的保护作用
Fig. 5 Protection effect of calcium on enzyme activity

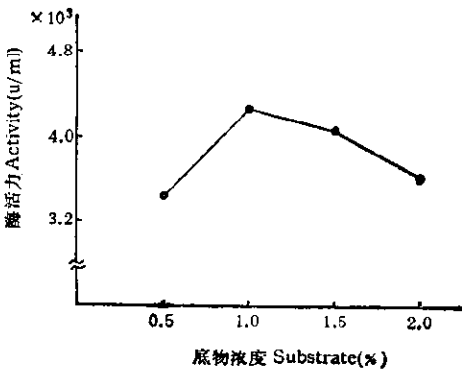


图 6 底物浓度对酶活力的影响
Fig. 6 Effect of concentration of substrate on enzyme activity

表 1 加酶与不加酶洗衣粉去污效果的比较
Table 1 Comparison of detergent effect under ordinary temperature
(Washing condition: 28℃, 60min)

项 目 Item	酶 量 Enzyme (u/g)	白布读数 Plain white cloth reading (A)	污布读数 Blotchy clothes reading (B)	洗后读数 Reading after washing (C)	去污率* Blot out rate (R)	去污指数 Blot out index (E)
B45 Proteinase	1000	68.5	8.56	36.28	46.25	6.42
	2000		9.01	38.28	49.20	6.83
	3000		9.25	42.53	56.70	7.88
	4000		9.19	46.32	62.60	8.69
2709 Proteinase	1000	68.5	8.55	26.85	30.53	4.24
	2000		9.68	36.05	44.83	6.23
	3000		9.88	40.70	52.58	7.30
	4000		9.43	41.28	53.90	7.49
对 照 Control	0	68.5	8.00	12.36	7.20	1

* $R\% = \frac{C - B}{A - B} \times 100$

碱性蛋白酶主要用于加酶洗涤剂，它对血、奶、蛋白类污渍具有较强的水解能力。我们采用 B45、2709 碱性蛋白酶与单纯洗衣粉进行去污力的比较，按试验方法 2 配成不同酶量的加酶洗衣粉液，每瓶装 300ml，加血、奶污布一块 ($D = 6\text{cm}$)，每种酶重复做 4 瓶，以不加酶的为对照，表

1 表明，B45 菌的蛋白酶对血、奶污渍具有较强的水解作用。

参 考 文 献

[1] 堀越弘毅：日本农芸化学会编集 V，朝倉書店，p.32，昭和 60 年。
[2] 止山英夫等：糖漿工学，64(4)：303，1986。
[3] Nakanishi, T., et al.: Agr. Biol. Chem.,

- 38(1):37,1974.
- [4] C.A. 78:82948, 1973.
- [5] 堀越弘毅等：特许公报, 2794, 1973.
- [6] 堀越弘毅等：特许公报, 16435, 1975.
- [7] 邱秀宝等：微生物学通报, 15(3): 101—104, 1988.
- [8] 邱秀宝等：微生物学报, 30(2): 129—133, 1990.
- [9] 邱秀宝等：微生物学报, 24(1): 66—73, 1984.

STUDIES ON ALKALINE PROTEINASE FROM ALKALIPHILIC *BACILLUS PUMILUS*

III. SOME PROPERTIES AND APPLICATION

Qiu Xiubao Dai Hong Yuan Ying Yu Ying

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

This paper has examined some properties of alkaline proteinase from alkaliphilic *Bacillus pumilus* B45 strain. The optimum pH and temperature for the casein hydrolysis were 10.0—10.5, and 45°C, respectively. The enzyme was stable at pH ranged from 7—10, and at temperature under 45°C for 2 h. About 80% of its activity was remained at 50—55°C for 30 min. and 40% at 60°C for 30 min. The concentration of 1% casein was the best on the proteolytic effect. The sodium tetraborate, calcium chloride enhanced activity of the enzyme, but sodium tripolyphos-

phate and sodium carbonate inactivated enzyme at 40°C, Ca^{2+} of 0.2 g/L protected enzyme against inactivation. Apparently, addition of enzyme into detergent was good for washing dirt of blood and milk. The efficiency of detergent was 10—13 times higher than the detergent without enzyme.

Key words

Alkaliphilic *Bacillus pumilus*; Alkaline proteinase