

淡紫拟青霉右旋糖酐酶的形成条件*

程秀兰 孙晋武 杨敬 陈竞** 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

比较了各种碳水化合物对淡紫拟青霉 (*Paecilomyces lilacinus*) 右旋糖酐酶形成的影响, 右旋糖酐是最好的碳源, 也是最佳诱导物。不同分子量 (17.2—1000kD) 的右旋糖酐对酶形成的诱导作用不同, 酶的产生随右旋糖酐分子量的增大而增加。用分子量为 1000kD 的右旋糖酐作碳源时比用 17.2kD 的右旋糖酐作碳源时的产酶量高 40% 以上。用右旋糖酐和其它糖的混合物作碳源时, 酶的形成受到不同程度的抑制。

右旋糖酐酶形成的其它适宜条件: 氮源为牛肉蛋白胨, 培养基初始 pH6.0—7.0, 种龄为 48 小时, 在 250ml 三角瓶中装 50ml 培养基, 于 28℃ 在 200r/min 摇床上培养 6 天。

关键词 淡紫拟青霉; 右旋糖酐酶

右旋糖酐酶 (Dextranase, EC 3.2.1.11) 是诱导酶, 必须在诱导物存在下才能形成^[1-3]。常用的诱导物除底物右旋糖酐外, 改良的底物酮基右旋糖酐 (Ketodextran) 和改良的产物异麦芽糖棕榈酸单酯或二酯 (Isomaltose monopalmitate 或 dipalmitate)^[4] 均能诱导酶的大量形成。Brown 曾报道酮基右旋糖酐对淡紫拟青霉 (*Paecilomyces lilacinus*) 和绳状青霉 (*Penicillium funiculosum*)^[5] 右旋糖酐酶形成的诱导作用。Tsuru 等人报道了不同分子量、不同分枝程度的右旋糖酐对肉色曲霉 (*Aspergillus carneus*)^[6] 右旋糖酐酶诱导形成的影响。

我们报道过右旋糖酐酶产生菌的筛选及其酶学性质的比较^[7], 其中淡紫拟青霉是一株产右旋糖酐酶的优良菌株, 还报道了该酶对牙菌斑物质的降解作用^[8]。本文报道淡紫拟青霉右旋糖酐酶的形成条件。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

淡紫拟青霉 (*Paecilomyces lilacinus*) 是本组从土壤中分离筛选得到的^[9]。

(二) 培养基

1. 菌种斜面培养基: 使用普通的察氏琼脂培养基。

2. 液体发酵基础培养基 (%): 右旋糖酐 1.5, 牛肉蛋白胨 0.5、K₂HPO₄ 0.4, MgSO₄ 0.02, KCl 0.02, FeSO₄ 0.001, pH6.0—7.0, 1.05kg/cm² 灭菌 30 分钟。

(三) 培养方法

将菌种接入察氏斜面培养基中, 置 28℃ 温箱培养 6—8 天。

本文于 1990 年 11 月 17 日收到。

* 淡紫拟青霉菌种由本所齐祖同, 孙增美同志鉴定, 一并致谢。

** 北京大学生物系应用生化专业 1987 年毕业生。

液体发酵是在 28℃ 旋转摇床 (200r/min) 上振荡培养 6 天。

(四) 酶活力测定

同文献[7]。酶活力以在 580nm 的吸光度 (A) 表示。

(五) 总糖量的测定

采用蒽酮法^[9]。1ml 发酵液加 2ml 蒽酮试剂, 沸水浴中煮沸 15 分钟, 用 721 型分光光度计在 625nm 测定吸光度 (A) 值, 根据标准曲线计算总糖量。

结果和讨论

(一) 各种碳源对右旋糖酐酶形成的影响

1. 不同碳源对酶形成的影响: 在基础培养基中分别添加不同的碳源, 接入种子液, 在 28℃ 振荡培养 6 天, 过滤除菌体, 测定发酵液的酶活力。右旋糖酐能诱导酶的大量形成 (A_{580} 为 0.62), 异麦芽糖也能诱导酶的形成, 但产量很低 (A_{580} 为 0.08), 其它碳源(果糖、葡萄糖、蔗糖、半乳糖、棉籽糖、麦芽糖、木糖、阿拉伯糖、纤维二糖和玉米淀粉)都没有诱导作用。右旋糖酐是酶形成的最佳碳源和诱导物。

2. 不同分子量的右旋糖酐对酶形成的诱导作用: 在基础培养基中分别加入 1.5% 的不同分子量的右旋糖酐, 接种培养后测定酶活力, 结果如表 1。在所试验的范围内, 右旋糖酐酶的形成随右旋糖酐分子量的增大而增加。用分子量为 1000kD 的右旋糖酐比用 17.2kD 分子量的右旋糖酐作碳源的产酶量高 40% 以上。

用分子量 100—1000kD 的右旋糖酐作碳源时, 最适浓度为 1.5%。

上述结果表明, 底物右旋糖酐是该酶形成的最佳诱导物, 其分子量越大诱导效果越好。因为在菌的生长过程中, 必须以低量的连续不断地供应诱导物, 才能诱导酶的形成。用大分子的右旋糖酐作碳源, 可使微生物在较长的时间内对其进行缓慢地分解, 逐步释放具有诱导作用的双糖化合物。这与 Tsuru 等人对肉色曲霉右旋糖酐酶形成的研究结果一致。因此, 采用分枝程度高的大分子右旋糖酐酶或异麦芽糖酯作诱导物, 可大幅度提高酶的产量。

表 1 不同分子量的右旋糖酐对酶形成的影响

Table 1 Effect of different molecular weight dextran on dextranase formation

右旋糖酐的分子量 Molecular weight of dextran (kD)	酶活力 Enzyme activity (A_{580})
17.2	0.325
45.8	0.330
100.0	0.360
130.0	0.370
1000.0	0.472

3. 在基础培养基中加入其它碳源对酶形成的影响: 在含有 0.75% 的右旋糖酐的基础培养基中再分别添加 0.75% 的各种糖, 以用 0.75% 和 1.5% 的右旋糖酐作对照, 在相同条件下培养, 测定酶活力。从表 2 可以看出, 单用右旋糖酐作碳源, 酶活力很高, 加入其它碳

源后,酶活力有不同程度的下降,说明这些糖对右旋糖酐酶的形成有抑制作用。

表 2 培养基中补加其它碳源对酶形成的影响

Table 2 Effect of additional carbon source on dextranase formation

附加碳源 Additional carbon source	酶活力 Enzyme activity (A_{550})
右旋糖酐 (1.5%) Dextran	0.45
右旋糖酐 (0.75%) Dextran	0.34
葡萄糖 Glucose	0.26
果糖 Fructose	0.22
蔗糖 Sucrose	0.14
乳糖 Lactose	0.24
山梨糖 Sorbose	0.28
鼠李糖 Rhamnose	0.23
棉籽糖 Raffinose	0.14
蜜二糖 Maltibiose	0.25
糊精 Dextrin	0.23
甘油 Glycerin	0.16

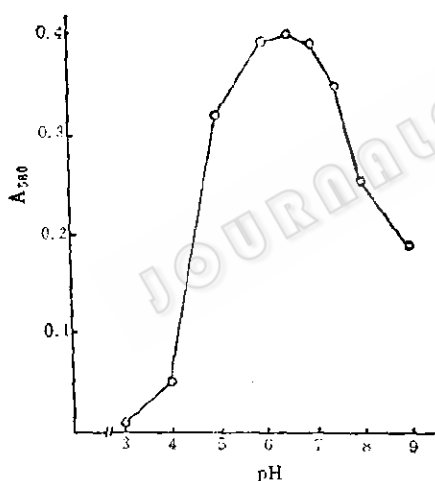


图 1 培养基起始 pH 对酶形成的影响

Fig. 1 Effect of initial pH of medium on dextranase formation

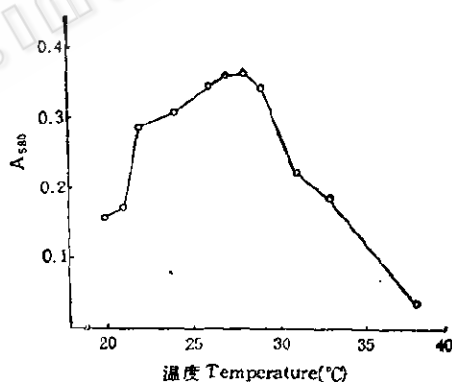


图 2 培养温度对酶形成的影响

Fig. 2 Effect of temperature on dextranase formation

(二) 培养基起始 pH 对酶形成的影响

用 2mol/L NaOH 和 HCl 将基础培养基调至不同 pH, 灭菌后接入种子液, 28℃ 培养 6 天, 测定发酵液的酶活力(图 1)。pH6.5 酶活力最高, pH5.5 以下和 pH 7.5 以上酶活力下降。培养基起始 pH 以 6.0—7.0 为适宜。

(三) 培养温度对酶形成的影响

在装有 5ml 基础培养基的大试管中, 按 5% 的接种量接入种子液, 在 20—40℃ 的梯度摇床上分别培养 6 天, 测定酶活力, 结果如图 2 所示。在 26—29℃ 酶活力都比较高, 在

27—28℃ 酶活力最高。培养温度以 28℃ 左右为宜。

(四) 氮源对酶形成的影响

在含有 1.5% 的右旋糖酐的基础培养基中, 分别添加不同的氮源, 用 NaOH 和 HCl 调到 pH6.5, 接种后摇瓶培养 6 天, 测定酶活力。由表 3 看出, 多数有机氮源都能促进酶的形成, 其中牛肉蛋白胨的效果最好。

改变培养基中牛肉蛋白胨的含量, 进行产酶试验。牛肉蛋白胨的最适量为 0.5%。

表 3 各种氮源对酶形成的影响

Table 3 Effect of various nitrogen source on dextranase formation

氮 源 Nitrogen source	浓度 Concn. (%w/v)	酶活力 Enzyme activity (A_{540})	氮 源 Nitrogen source	浓度 Concn. (%w/v)	酶活力 Enzyme activity (A_{540})
牛肉蛋白胨 Beef peptone	0.5	0.63	玉米浆 Corn steep liquor	5.0	0.08
鱼粉蛋白胨 Fish peptone	0.5	0.60	玉米浆 Corn steep liquor	10.0	0.06
工业鱼胨 Industrial fish peptone	0.5	0.51	尿 素 Urea	1.0	0.03
全血胨 Blood peptone	0.5	0.51	NH_4NO_3	1.0	0.17
胰蛋白胨 Tryptone	0.5	0.50	$(NH_4)_2SO_4$	1.0	0.09
聚胨 Polypeptone	0.5	0.49	NH_4Cl	1.0	0.07
大豆蛋白胨 Soy bean peptone	1.0	0.09	NH_4HCO_3	1.0	0.08
豆饼粉 Soy bean cake meal	1.0	0.04			

(五) 种龄对酶形成的影响

在基础培养基中, 分别接入在斜面培养基上培养不同时间的孢子悬液和在摇床上培养不同时间的液体种子, 培养后测定酶活力。培养 6—11 天的斜面种子产酶能力都比较高。以 7—8 天的为最高。液体种子的菌龄以 48 小时为适。

(六) 通气量和接种量对酶形成的影响

在 250ml 三角瓶中装入不同量的基础培养基, 按 10% 的接种量接入种子液, 培养后测定酶活力(测定前补加在培养过程中失去的水量)。装 30—100ml, 酶活力变化不大, 装 40—60ml 的酶活力比较高, 装 20ml 酶活力最低。看来, 该菌在产酶过程中不需要很大的通气量, 以在 250ml 三角瓶中装 50ml 培养基为适宜。

试验了接种量对酶形成的影响, 250ml 三角瓶装 50ml 培养基, 接入不同量的孢子悬液和菌丝体, 培养后测其酶活力。在所试的用量范围内, 用孢子悬液和用菌丝体接种, 接种量对酶形成的影响都不大, 以 10% 左右为好。

(七) 淡紫拟青霉的生长过程与酶形成的关系

在 250ml 三角瓶中装 50ml 培养基 (pH6.5), 按 10% 的接种量接入种子液, 在 28℃

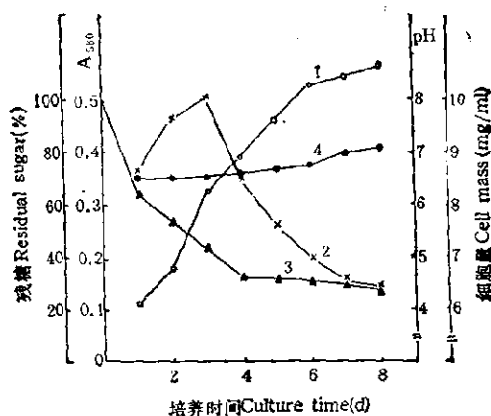


图 3 菌的生长过程与酶形成的关系

Fig.3 Relation between growth and dextranase formation

1.酶活力 Enzyme activity; 2.细胞量 Cell mass; 3.残糖 Residual sugar; 4. pH

摇床上培养,不同时间取样,测定酶活力,菌体量(干重)、残糖和 pH。由图 3 可以看出,在发酵前期主要是生长菌体,总糖量下降很快,培养到第 3 天,菌体增殖到最大密度,碳源将耗尽时,酶开始大量形成和分泌,培养到第 6 天,酶活力达到最高峰,继续培养到第 8 天,酶活力几乎不再增加,但也没有失活。在整个发酵过程中, pH 值的变化很小。

参 考 文 献

- [1] 梁天锡: 酶制剂工业(下册)(张树政主编),第 795—803 页,科学出版社,北京,1984 年。
- [2] 俞大维、李季伦编: 微生物学(第二版),第 653 页,科学出版社,北京,1985 年。
- [3] M. 狄克松、E.C. 威勃著(袁正武等译): 酶,第 469 页,上海科学出版社,上海,1964 年。
- [4] Reese, E.T. et al.: *J. Bacteriol.*, 100(3): 1151—1154, 1969.
- [5] Brown, R.G.: *Can. J. Microbiol.*, 16:841—844, 1970.
- [6] Tsuru, D. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 35(1):1727—1732, 1971.
- [7] 孙晋武等: 微生物学报,28(1): 45—55,1988。
- [8] 孙晋武等: 微生物学报,28(3): 242—248,1988。
- [9] Leslie, H.: *Methods of Biochemical Analysis*, 1: 228, 1954.

CONDITIONS FOR DEXTRANASE FORMATION BY *PAECILOMYCES LILACINUS*

Cheng Xiulan Sun Jinwu Yang Jing Chen Jing Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Induced formation conditions of dextranase by *Paecilomyces lilacinus* were investigated. Effect of various carbohydrates on dextranase formation was examined, dextran was the best C-source and as an inducer. The effect of dextran with different molecular weight (from 17.2 to 1000 kD) on dextranase formation was compared, productivity of dextranase increased with increase of dextran molecular weight. When dextran of 1000 kD was used as C-source, The enzyme formation was 40% higher than that 17.2 kD dextran. When other sugars were separately added to the medium with dextran, the enzyme formation was repressed.

Besides C-source, the other optimum conditions of dextranase formation were as follows: N-source, beef peptone; medium initial pH, 6.0—7.0; culture temperature, 28°C; inoculum amount about 10%, and the organism was cultivated for 6 days on 200 r/min shaker in 250 ml flasker with 50 ml medium.

Key words *Paecilomyces lilacinus*; Dextranase