

局限青霉生淀粉水解酶的产生条件及酶一般性质的研究

谢舜珍 张树政

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

生淀粉水解酶产生菌局限青霉(*Penicillium restrictum*) 127-2 是由土壤中分解得到的,具有较强的降解生淀粉能力,水解 1g 生淀粉需 8.0 国际单位酶量^[1]。Sasaki^[2]等曾报道草酸青霉 1-9、变幻青霉的培养液能分解生淀粉,但未报道酶的形成条件;Takao^[3]等研究了罗尔伏革菌生淀粉酶的形成条件和酶的一般性质。本文介绍局限青霉 127-2 生淀粉水解酶的形成条件和酶的一般性质。

1 材料和方法

1.1 菌种培养

1.1.1 斜面培养:用查氏琼脂斜面培养基在 28—30℃ 培养 5—7 天。

1.1.2 三角瓶振荡培养:于 250ml 三角瓶中加 40ml 发酵培养基,经 1kg/cm² 30 分钟灭菌,冷却后接种,置于 28—30℃ 的摇床(200r/min)振荡培养 4—5 天。

1.2 酶活力测定

于 50ml 三角瓶中,加入 2.0ml 2.5%(w/v)生玉米淀粉悬液,2.0ml pH3.5 的 0.2mol/L 磷酸氢二钠-0.1mol/L 柠檬酸缓冲液,40℃ 预热 10 分钟,加 1.0ml 适当稀释的酶液,在 40℃ 下振荡(150r/min)反应 30 分钟,再加 0.5ml 4%NaOH 溶液终止反应。反应液于 3000r/min 离心 5 分钟,上层清液用 DNS 法测定还原糖量。

酶活力单位定义:在上述条件下,1 分钟释放 1μg 的还原糖(以葡萄糖计)的酶量,定义为一个活力单位。

1.3 硫酸铵盐析及其脱盐

发酵液于 3000 r/min 离心 15 分钟,上清液中加(NH₄)₂SO₄ 使至饱和度为 60%,10 000r/min 冷冻离心,沉淀溶于适量的蒸馏水中,用水透析至无 NH₄⁺。此硫酸铵脱盐酶液用于酶的一般性质试验。

2 结果和讨论

2.1 碳源和有机氮源对酶形成的影响

在成分(g/100ml)为:(NH₄)₂SO₄ 0.1, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, KH₂PO₄ 0.1, 黄豆饼粉 2 的基础培养液中,加入 3%(w/v)各种碳源,试验对酶形成的影响,以酶活力(u/ml)表示,结果为:葡萄糖 25,麦芽糖 19,糊精 133,可溶性淀粉 3,马铃薯淀粉 5,玉米粉 37,大米粉 44,糯米粉 44,高粱粉 66,不加碳源则为零。

在成分(g/100ml)为:(NH₄)₂SO₄ 0.1, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, KH₂PO₄ 0.1, 糊精 3 的基础培养液中,加入 2%(w/v)各种有机氮源,试验对酶形成的影响,以酶活力(u/ml)表示:黄豆饼粉 125,花生米粉 93,麸皮 47,蛋白胨 77,聚脲 31,酪素 29,不加有机氮源为零。

• 国家自然科学基金项目。

本文于 1992 年 10 月 12 日收到。

由以上结果可知,糊精和黄豆饼粉为生淀粉水解酶形成的适宜碳源和有机氮源。

2.2 无机氮源对酶形成的影响

以成分(g/100ml)为:黄豆饼粉 2,糊精 3,KH₂PO₄ 0.1,MgSO₄·7H₂O 0.05 的基础培养液中,加入相当于 0.2g/100ml NH₄NO₃ 的氮含量的不同无机氮源,其结果以酶活力(u/ml)表示:硝酸铵 117,磷酸二氢铵 106,柠檬酸铵 79.2,硫酸铵 30,氯化铵 16,不加为 26.7。则硝酸铵和磷酸二氢铵对酶形成有利。

2.3 培养基组成对比对酶形成的影响

采用 L₉(3⁴) 正交表试验培养液中有机氮源、碳源和无机氮源的对比对酶活力的影响,图 1 显示以成分(g/100ml)为黄豆饼粉 3,糊精 2,NH₄NO₃ 0.2 的培养液为适宜的配比。

2.4 无机盐对酶活力的影响

在成分(g/100ml)为黄豆饼粉 3,糊精 2,NH₄NO₃ 0.2 ,MgSO₄·7H₂O 0.05 的培养液中,加入表 1 中所列几种无机盐,使之各自钾含量均相当于 0.5g/100ml KH₂PO₄ 的钾含量,调节培养液的初始 pH 为 5.4 左右,结果见表 1。在培养液中,添加 0.83% 的 K₂HPO₄,发酵液酶活力可达 779(u/ml)。

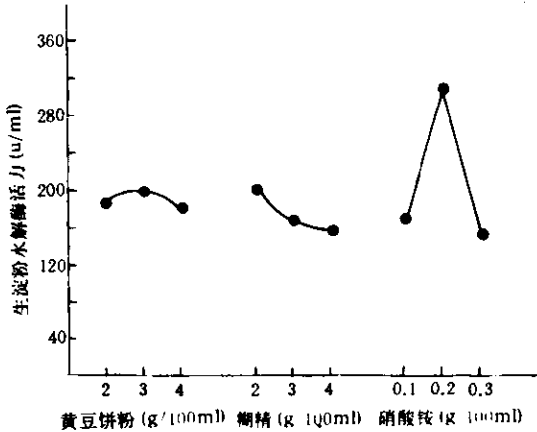


图 1 培养液组成对比对酶形成的影响

表 1 无机盐对酶形成的影响

无机盐(%)		酶活力(u/ml)
K ₂ HPO ₄	0.83	779
KNO ₃	0.37	288
KCl	0.27	286
KH ₂ PO ₄	0.5	240
K ₂ SO ₄	0.64	189
不加		116

2.5 酶一般性质

2.5.1 酶作用最适 pH:用 pH2.5—6.0 的 0.2mol/L 磷酸氢二钠—0.1mol/L 柠檬酸缓冲液测定酶活力,如图 2。酶作用最适 pH 为 4.0。

2.5.2 酶作用最适温度:按生淀粉酶活力测定方法,在不同温度下测定酶活力(图 3)。酶作用最适温度范围在 40—43℃ 为宜。温度继续升高时,底物则将糊化,已不适于生淀粉底物。

2.5.3 酶的 pH 稳定性:酶液与等体积的 pH 为 2.5—8.0 的 0.2mol/L 磷酸氢二钠—0.1mol/L 柠檬酸缓冲液混匀后,在 40℃ 水浴中放置 15 小时,用 pH4.0 的缓冲液稀释酶液,测定酶活力。在 40℃ 以下,pH 为 4.0—5.0 时存放 15 小时,酶活力可保留 90% 以上。

2.5.4 酶的热稳定性:酶液与 pH 4.0 的缓冲液在不同温度下放置 15 分钟,取出放入冰浴冷却后测定酶活力。在 40℃ 以下保持 15 分钟,酶活力不变,在 60℃ 下保持 15 分钟,残存活力为 20% 左右。

酶基本性质研究表明,粗酶液作用生淀粉的最适温度范围为 40—43℃,最适 pH 为 4.0。因此,该菌的生淀粉水解酶适用于降解生淀粉。

致谢 局限青霉(Penicillium restrictum)系齐祖同教授鉴定,严自正教授予以支持,一并致谢。

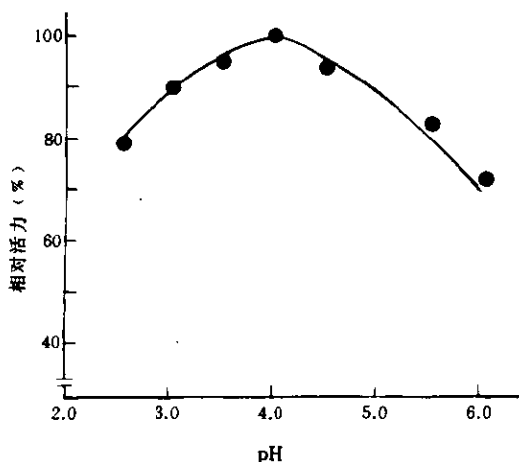


图2 pH对酶活力的影响

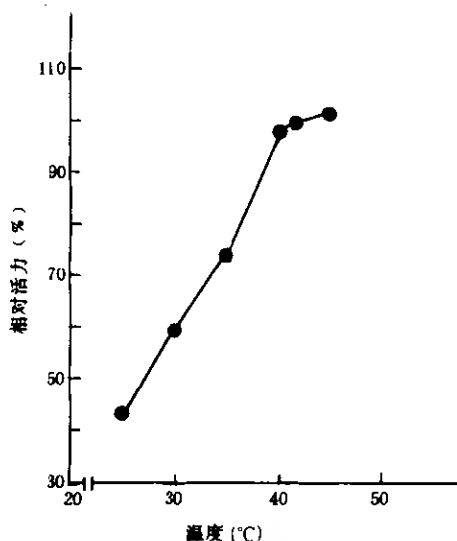


图3 温度对酶活力的影响

参 考 文 献

- [1] 谢舜珍,严自正,张树政. 微生物学通报, 1992, 19(5): 203—206.
- [2] Sasaki H, Kurosawa K, Yakao S. *Agric Biol Chem*, 1986, 50(6): 1661—1664.
- [3] Takao S, Sasaki H, Kurosawa K *et al.* *Agric Biol Chem*, 1986, 50(8): 1979—1987.

RAW STARCH DIGESTION ENZYME FROM *PENICILLIUM RESTRICTUM* 127-2 AND ITS PROPERTIES

Xie Shunzhen Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract A *Penicillium restrictum* 127-2 isolated from soil, was a promising producer of raw starch digesting enzyme. The effects of culture conditions and medium components on enzyme formation were investigated. The raw starch digesting enzyme was increased by addition of K_2HPO_4 0.83% into the medium containing (g/100ml) soybean cake meal 3, dextrin 2, NH_4NO_3 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, the enzyme activity of culture supernatant reached 779u/ml. The optimal pH and temperature range for the enzyme reaction were 4.0 and 40°C—43°C respectively. The enzyme was stable in the pH range of 4.0 to 5.0 at 40°C 15h.

Key words Raw starch digesting enzyme, *Penicillium restrictum*