

# BF 7658 $\alpha$ -淀粉酶稳定性的研究

王俊英 扈芝香

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

**摘要** 解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) BF 7658 即能产生丰富的  $\alpha$ -淀粉酶, 又能产生丰富的蛋白酶。在 0.2mol/L, pH7.2 磷酸缓冲液中, 不加任何底物, 样品中  $\alpha$ -淀粉酶与蛋白酶的比例是 13:1, 21:1, 27:1, 37°C 保温 24 小时,  $\alpha$ -淀粉酶活力损失 22.1—8.8%, 即  $\alpha$ -淀粉酶的稳定性随蛋白酶的增加而减少, 因而认为蛋白酶是影响  $\alpha$ -淀粉酶稳定性的重要因素。 $\alpha$ -淀粉酶的稳定性可以通过选育菌种, 选择合适的培养条件, 添加钙离子保护及热处理等方法予以提高。

**关键词** 稳定性;  $\alpha$ -淀粉酶; 蛋白酶

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) BF 7658 产生的  $\alpha$ -淀粉酶是我国目前广泛应用的酶制剂之一, 它与食品、酿造、医药和纺织等工业有密切的联系<sup>[1]</sup>。

据生产实践观察,  $\alpha$ -淀粉酶制剂有时贮存的稳定性差, 尤其表现在夏日的高温天气。有的 BF 7658 突变株发酵的酶活力单位虽然提高了, 经过后处理, 收率却较低, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,  $\alpha$ -淀粉酶区带不均一, 似被水解。进行酶活力测定, BF 7658 除产生高水平的  $\alpha$ -淀粉酶外亦产生丰富的蛋白酶。本文报道蛋白酶对  $\alpha$ -淀粉酶稳定性的影响以及减少这种影响的途径。

## 材料和方法

### (一) 菌种及培养

1. 菌种: 解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) BF 7658, 由天津酶制剂厂提供。

### 2. 培养基

菌种筛选培养基(%): 麦芽糖 3, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5, 柠檬酸钠 0.3, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3, CaCl<sub>2</sub> 0.05, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.02, ZnCl<sub>2</sub> 1ppm, FeSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub> 各 10ppm。

产酶培养基(%): 见表 1。

表 1 不同产酶培养基的组成

成分 编号	玉米粉	豆饼粉	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>
A	9.5	4.5	0.8	0.4	0.2
B	9.5	2.0	0.8	0.8	0.2
C	9.5	7.5*	0.8	0.4	0.2

\* 豆饼粉水解液。

3. 培养条件: 斜面菌种培养: 37°C 温箱培养 3 天, 取出置冰箱备用。

液体培养: 旋转式摇床 210r/min, 37°C 培养 48 小时。

### (二) 酶制剂样品

发酵液: 由天津酶制剂厂、房山酶制剂厂提供。

部分纯化样品: 由本组提纯制备。

### (三) 分析方法

1.  $\alpha$ -淀粉酶活力测定: 用改进的 Fuwa 测定法<sup>[2]</sup>。其定义为每分钟水解可溶性淀粉 0.1mg 所需酶量为一个酶活力单位。

2. 中性蛋白酶活力测定<sup>[3]</sup>: 用改良的 Folin 法。将 1.0 ml 酶液与 2.0 ml 0.5% 酪蛋白液混合, 40°C 反应 10 分钟, 测定产生的酪氨酸, 以每分钟释放 1mg 酪氨酸定义为一个酶活力单位。

3. 蛋白质测定:采用 Folin 法<sup>[4]</sup>。

4. 聚丙烯酰胺圆盘凝胶电泳<sup>[5]</sup>:胶浓度为 7%,用考马斯亮蓝 R<sub>250</sub>染色,7%乙酸脱色。

### (四) 主要化学药品

可溶性淀粉(浙江菱湖淀粉厂产品)、三氯乙酸、碘、酪蛋白、丙烯酰胺等均为分析纯市售商品。

## 结果和讨论

### (一) 蛋白酶对 α-淀粉酶稳定性的影响

1. α-淀粉酶在发酵液中的稳定性:将含不同浓度蛋白酶的 α-淀粉酶发酵液,37℃保温 24 小时,测定保温前后的酶活力变化。结果表明,α-淀粉酶的稳定性随蛋白酶含量的减少而增加(表 2)。

表 2 发酵液中 α-淀粉酶的稳定性

项目 样品	蛋白酶与 α-淀粉酶 活力比例	α-淀粉酶活力(u/ml)		α-淀粉酶 残存率 (%)
		保温前	保温后	
I	1:13	919	668	72.6
II	1:21	2222	1732	77.9
III	1:27	5165	4712	91.2

2. 各步纯化样品中 α-淀粉酶的稳定性:BF 7658 α-淀粉酶发酵液经过硫酸铵沉淀,淀粉吸附,丙酮分段等方法纯化,得到纯度不同、蛋白酶含量不同的样品。在 0.2mol/L pH7.2 磷酸缓冲液中,37℃保温 48 小时,测定 α-淀粉酶活力。结果表明,随着样品的纯化,蛋白酶含量逐渐减少,α-淀粉酶稳定性增加(表 2)。

3. 部分纯化的蛋白酶对纯化的 α-淀粉酶的作用:纯化的 α-淀粉酶溶解在 0.2mol/L pH7.2 磷酸缓冲液中,加不同量纯化的蛋白酶,37℃保温 24 小时,测定 α-淀粉酶活力。结果表明,随着蛋白酶含量的增加,α-淀粉酶稳定性下降(表 3.4)。

### (二) α-淀粉酶和蛋白酶的某些特性

1. pH 对两种酶活力的影响:分别吸取 0.5ml 纯化的 α-淀粉酶和蛋白酶酶液,加到

1.0ml pH 不同的磷酸缓冲液中,补水 0.5ml,37℃保温 2 小时,取出立刻测定酶活力。图 1 结果指出,α-淀粉酶在 pH 6-8 的范围内,酶活力保留 90%以上,而蛋白酶在 pH8 时最稳定,低于 pH6.0,酶活力损失十分迅速,pH7.0 时,两种酶的活力都是稳定的。

表 3 部分提纯样品中 α-淀粉酶的稳定性

项目 样品	蛋白酶与 α-淀粉酶 比例	α-淀粉酶活力(u/ml)		α-淀粉酶 残存率 (%)
		保温前	保温后	
原发酵液	1:35	1859	1582	85.1
淀粉吸附	1:56	9352	8297	88.7
丙酮分段	1:316	21408	20329	94.9

表 4 蛋白酶对 α-淀粉酶活力的影响

项目 样品	α-淀粉酶 活力 (u/ml)	蛋白酶活力 (u/ml)	保温后 α-淀粉酶活力	
			剩余活力 (u/ml)	失活率 (%)
I	900	0	900	0.0
II	900	450	864	4.0
III	900	900	837	7.0
IV	900	1350	784	12.8
V	900	1800	747	17.0

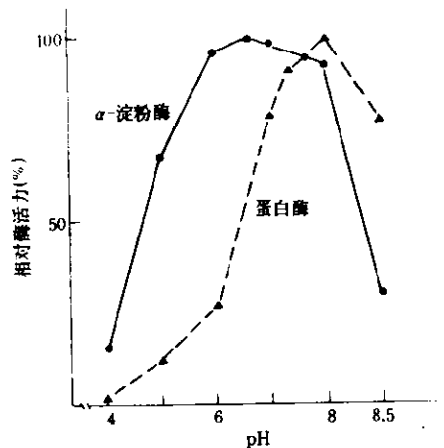


图 1 pH 对 α-淀粉酶和蛋白酶活力的影响

2. 温度对两种酶活力的影响:取纯化的 $\alpha$ -淀粉酶和蛋白酶液加到0.2mol/L pH7.2磷酸缓冲液中,在不同温度下处理10分钟,分别测定酶活力。图2表明, $\alpha$ -淀粉酶在30—60℃时,酶活力保留90%以上,70℃时酶活力约78%,蛋白酶几乎全部失活,表现了它的不耐热性。进一步用70℃、80℃处理两个酶液,每隔3分钟取样测定酶活力。图3表明, $\alpha$ -淀粉酶比蛋白酶耐热性好,70℃处理9分钟,可除去约90%的蛋白酶, $\alpha$ -淀粉酶活力仍存活70%。

3. 磷酸盐的影响:为了考察 $\alpha$ -淀粉酶及蛋白酶在水和pH7.0磷酸缓冲液中酶的行为,将两种酶同时加入,37℃保温24小时。结果表明,蛋白酶活力保持原有水平。而 $\alpha$ -淀粉酶则有加速失活现象(表5)。

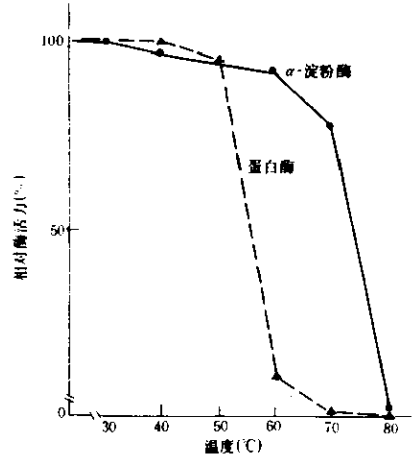


图2 温度对 $\alpha$ -淀粉酶和蛋白酶活力的影响

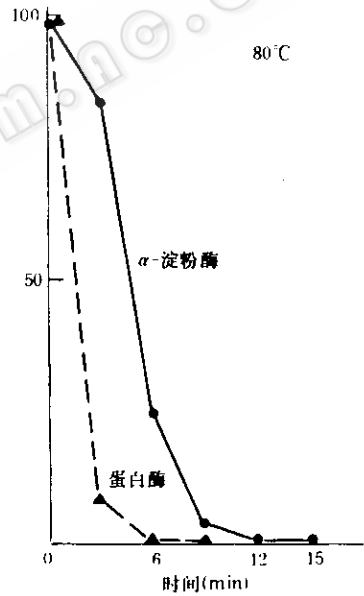
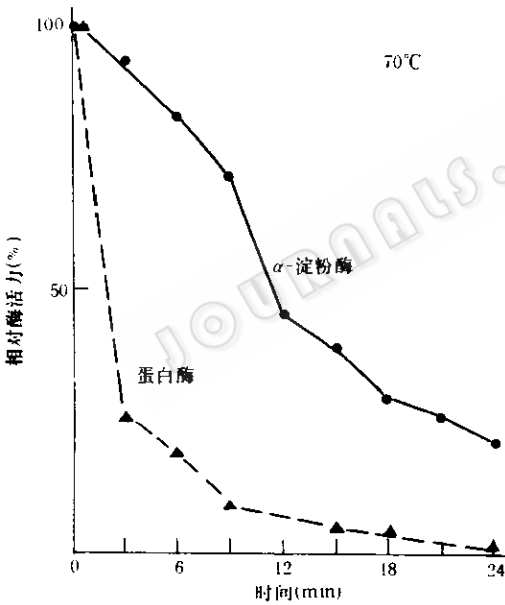


图3 两种酶的耐热性

表5 磷酸盐对 $\alpha$ -淀粉酶活力的影响

样品	反应系统		水		磷酸缓冲液	
	反应时间及结果		酶活力		酶活力	
			0h	24h 残存率 (%)	0h	24h 残存率 (%)
I			825	830 100	762	719 94.4
II			878	860 98	632	576 91.7

(三) 改善 $\alpha$ -淀粉酶稳定性的途径

1. 选育蛋白酶产量低的突变株:以BF 7658为出发菌株,进行诱变分离,得到菌落形态各异的单菌落。将它们分别接入培养基A,37℃振荡48小时,测定 $\alpha$ -淀粉酶及蛋白酶活力,结果表明,各株之间分泌的两种酶差异很大(表6)。以 $\alpha$ -淀粉酶活力以及这两种酶活力的比值数作参考,选育出BF 7658-20,26,34等3

株  $\alpha$ -淀粉酶高产菌株,并且蛋白酶含量较低,在 37℃ 保温 48 小时再测酶活力。3 株菌株酶活力均表现了较好的稳定性(表 6)。

表 6 突变株产两种酶活力及稳定性的比较

菌株	$\alpha$ -淀粉酶活力 (u/ml)	蛋白酶活力 (u/ml)	$\alpha$ -淀粉酶与蛋白酶比值	保温后 $\alpha$ -淀粉酶活力损失(%)
BF 7658	1600	226	7 : 1	20.8
5	3266	303	11 : 1	18.0
13	3400	306	11 : 1	—
15	266	315	0.8 : 1	25.0
18	307	292	1 : 1	—
20	3786	256	15 : 1	13.8
23	1566	198	8 : 1	—
26	3133	195	16 : 1	13.6
28	353	263	1.3 : 1	—
30	581	237	2.5 : 1	22.4
34	3387	221	15 : 1	14.2

铵适当增加,有利于  $\alpha$ -淀粉酶的产生,提高了  $\alpha$ -淀粉酶的比值。培养基 C 中使用豆饼粉水解液促进了蛋白酶的分泌。此外,培养基组份不同,菌株分泌的蛋白质组份各异。从圆盘电泳的结果可以看出,BF 7658-20 菌株接入培养基 A 中的发酵液,电泳呈现五条区带。而用培养基 B 则得到三条区带, $\alpha$ -淀粉酶的区带明显增强(图 4)。

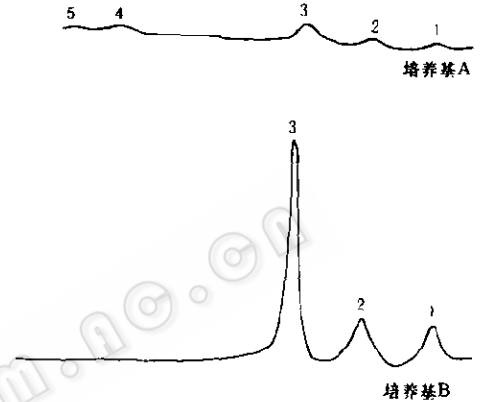


图 4 BF 7658-20 在不同培养基中发酵液电泳扫描图谱

2. 选择蛋白酶产量低的培养基:将 BF 7658 及突变株 20,26 分别接入 A、B、C 三种培养基中,37℃ 培养 48 小时,获发酵液并测定酶活力。结果表明,B 组中豆饼粉适当减少,硫酸

表 7 不同培养基对产酶的影响

菌株	A			B			C		
	$\alpha$ -淀粉酶 (u/ml)	蛋白酶 (u/ml)	比例	$\alpha$ -淀粉酶 (u/ml)	蛋白酶 (u/ml)	比例	$\alpha$ -淀粉酶 (u/ml)	蛋白酶 (u/ml)	比例
BF 7658	1325	206	6 : 1	1749	150	12 : 1	1800	279	6 : 1
20	2153	248	9 : 1	3412	328	10 : 1	1560	276	6 : 1
26	1547	240	6 : 1	3536	305	12 : 1	1114	227	5 : 1

3. 添加钙离子可提高  $\alpha$ -淀粉酶的稳定性:在 6 个不同温度下,经过 30 分钟处理  $\alpha$ -淀粉酶及蛋白酶发酵液两组,每组又有添加 0.1mol/L  $Ca^{2+}$  与不加  $Ca^{2+}$  两个样品。结果表明,70-80℃ 可使蛋白酶失活, $\alpha$ -淀粉酶也有损失。添加  $Ca^{2+}$  明显地提高了  $\alpha$ -淀粉酶的稳定性, $Ca^{2+}$  对蛋白酶虽然也有一定的保护作用。但到 70℃,酶活力也已损失了约 90%(图 5)。在发酵液中添加钙离子,70℃ 处理 30 分钟, $\alpha$ -淀粉酶几乎没有失活,蛋白酶活力仅残留 12%。因此,利用此方法减少或除去酶制剂中的蛋白酶,可以提

高  $\alpha$ -淀粉酶的稳定性。

1955 年,山本<sup>[6]</sup>曾首次观察到  $\alpha$ -淀粉酶的稳定性与发酵液中的另一种酶有关。福本寿一郎后来证明此酶为蛋白酶<sup>[7]</sup>。后来有人将这两种酶分别提取,用于医药<sup>[8,9]</sup>,但未见报道蛋白酶对  $\alpha$ -淀粉酶稳定性影响的系统观察,更未提出解决办法。本研究确认了 BF 7658 菌株能够同时产生  $\alpha$ -淀粉酶和蛋白酶,而此蛋白酶又作用水解  $\alpha$ -淀粉酶,使其失活,成为影响  $\alpha$ -淀粉酶稳定性的重要因子。通过选用优良菌种、合适的培养条件、添加  $Ca^{2+}$  保护及热处理等方法,

可以提高 $\alpha$ -淀粉酶稳定性,减少损失,对生产实践有重要的指导意义。

有关蛋白酶对 $\alpha$ -淀粉酶修饰作用的机制,酶特性的变化以及酶分子结构的变化,有待进一步研究。

### 参 考 文 献

1. 上海工业微生物所酶组:工业微生物,2:5,1977.
2. Fuwa H; *J. Biochem.*, **41**:583-603,1954.
3. Matsubara H; *J. Biochem.*, **45**(1):251,1958.
4. 潘家秀,任梅轩,徐俊杰等:蛋白质化学研究技术,科学出版社,北京,1962.
5. 张树政等:化学通报,1:30-38,1973.
6. Yamamoto T; *Bull. Agricul. Chem. Soc.*, **9**:22,1955.
7. Hawashida S; *J. Agricul. Chem. Soc. Japan*, **21**,386,1957.
8. Keay L et al.; *Biotech. Bioeng.*, **12**:199-212,1970.

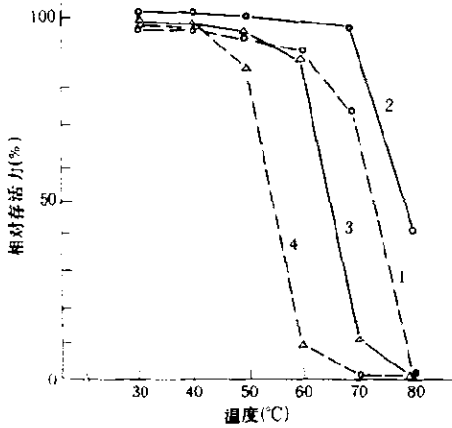


图5 添加钙离子对 $\alpha$ -淀粉酶和蛋白酶稳定性的影响

1.  $\alpha$ -淀粉酶, 2.  $\alpha$ -淀粉酶加钙,
3. 蛋白酶, 4. 蛋白酶不加钙

(1992-09-17 收稿)

## STUDIES ON STABILITY OF $\alpha$ -AMYLASE FROM *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* BF 7658

Wang zunying Hu zhixiang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The strain, *Bacillus amyloliquefaciens* BF 7658 possesses the ability to produce protease and some other enzyme as well as  $\alpha$ -amylase. In the experiment, we have observed interference of protease with  $\alpha$ -amylase. If the relative ratio of activity of  $\alpha$ -amylase to protease was 13 : 1, 21 : 1, 27 : 1, the  $\alpha$ -amylase activity of culture incubated at 37 C for 24h decreased 27.42% and 8.8% respectively. Purified  $\alpha$ -amylase lost the activity about 13-17% by incubation with the protease in 0.2mol/L phosphate buffer pH7.2 at 37 C for 24h. It is confirmed that protease is one of factors of unstability of  $\alpha$ -amylase.

The pH and temperature affected the stability of both enzymes when cultures were heated in a 60 C bath for 30 min. Protease activity lost about 90% and  $\alpha$ -amylase activity almost remained unchange.

The stability of  $\alpha$ -amylase can be increased by adding 0.01mol/L calcium ion at pH7.0 and treating at high temperature (70 C), but protease activity is inactivated completely. Different strains and culture conditions also affected the production ratio of  $\alpha$ -amylase and protease. Some strains produced high level of  $\alpha$ -amylase but low level of protease have been obtained.

**Key words** stability;  $\alpha$ -amylase; protease