第7卷 无锡轻工业学院学报 Vol.7
第4期 JOURNAL OF THE WUXI INSTITUTE OF LIGHT INDUSTRY 1988 No.4

枯草杆菌BF-7658α-淀粉酶生产菌株所产蛋白酶热稳定性研究

高益芝 陈秉跃

(食工系)

摘 要

我国α—淀粉酶(EC3.2.1.1)生产是用枯草杆菌BF—7658菌株，它产生的酶是个复杂酶系。其中混杂的蛋白酶未见酸性蛋白酶。发酵液经热处理后，测蛋白酶活力。结果，碱性蛋白酶耐热性比中性蛋白酶强。发酵液经55℃，30分钟热处理后，碱性蛋白蛋残存活力与室温(20～25℃)下碱性蛋白酶活力相差不显著($P>0.05$)，而中性蛋白酶则相差显著($P<0.05$)。用电泳法观察发酵液蛋白酶电泳谱型，显示两条蛋白酶区带。

主题词：枯草杆菌，淀粉酶，蛋白酶

前 言

自Boidim和Effront等先后发现枯草杆菌可以分泌α—淀粉酶后，枯草杆菌淀粉酶生产从菌种选育，酶生产工艺探讨，以及用途[1,2,3,4]等方面都取得了很大的进展。我国目前是用枯草杆菌BF—7658生产α-淀粉酶，但在发酵过程中会伴生相当数量的蛋白酶，由于这些蛋白酶的存在，会引起α-淀粉酶在贮藏过程中失活，另外也将妨碍淀粉酶的使用效果，如在葡萄糖与果葡糖浆生产中使糖液颜色加深[5]。关于除混杂蛋白酶的方法报道不少，如在实验室中有用羟基磷灰石吸附法[6,7]、柱层析法[8]培养基成分调控方法。但在工业生产上，较为实用的是用50°～65℃，30分钟的热处理方法[9]。生产实践证明，加热方法对蛋白酶也只能达到部分去除。因此，我们考虑到发酵液中可能有耐热与不耐热的两种蛋白酶存在。实验证实了上述的看法，这为讨论工业化生产α—淀粉酶的菌种选育等问题提供了依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

Bacillus Subt+ilis BF—7658菌株(选取产蛋白酶较高的菌株以便于研究)

1.2 培养基及培养条件

豆饼粉5.6%，玉米粉7.2%，磷酸氢钠 0.8%，硫酸铵0.4%，氯化钙0.13%，氯化铵0.13%

本文1988年4月5日收到。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

旋转式摇床，250ml的三角瓶装量50ml，230转/分，pH6.3～6.8，37℃发酵40～48小时。

1.3 α—淀粉酶活力测定方法，采用部颁标准[10]

1.4 蛋白酶活力测定方法，采用部颁标准[10]

1.5 醋酸纤维薄膜电泳法[11,12]

将发酵液于冰浴离心得上清酶液用于点样。醋酸纤维薄膜经0.075mol、pH7.5的Tris柠檬酸电泳缓冲液充分浸透，用滤纸吸干，于无光泽面距膜端2.5cm处点样约10μl，置于电泳槽中，静置平衡10分钟，电流0.5～1.0mA/cm宽，电压150V左右，通电30～60分钟。

1.6 蛋白酶谱染色[13]

取分析滤纸按2×7cm剪成长条，在2%酪素液中浸透，略干，置于玻片上，取F电泳毕的醋酸纤维薄膜，点样面向滤纸叠合(严防移动或起泡)，置于有盖小盒中，密闭，防止干燥。在40℃保温20分钟，揭去薄膜，滤纸用氨基黑10B染色5分钟，用漂洗液漂洗，即出现白色的蛋白酶谱区带。

2 结 果

2.1 混杂蛋白酶的测定

发酵液经离心(以碎冰为浴)4000转/分15分钟离心后，吸取酶上清液，然后分别以pH3.02%酪素0.05mol乳酸乳酸钠缓冲液配成)，pH7.52%酪素(0.02mol磷酸缓冲液配成) pH11.02%酪素(硼砂氢氧化钠缓冲液配成底物，按部颁方法测定其活力。结果表明：混杂的蛋白酶为中性蛋白酶与碱性蛋白酶。无酸性蛋白酶。其中，中性蛋白酶活力平均值为：1484 ± 16^{3} μ/ml，碱性蛋白酶活力平均值为241±6μ/ml。

2.2 热处理对α—淀粉酶活力的影响

发酵液经同一处理后得酶上清液，在室温以及40℃、50℃、55℃、60℃、70℃恒温水浴中加热30分钟，然后测定其α—淀粉酶活力，结果如表1所示。由表1及图1看出，α—淀粉酶的热稳定性能较好，在55℃仅有3%失活，在60℃有11%失活，这较强的热稳定性为采用加热法去除混杂蛋白酶提供了可能性。

表1 热处理对α—淀粉酶活力影响

样品 \ 活力(μ/ml)	温度				
	室温*	40℃	55℃	60℃	70℃
NO.1	330	328	320	288	240
NO.2	351	345	338	312	257
NO.3	360	356	346	327	258
平均	347	343	335	309	251
残留率(%)	100	99	97	89	72

室温栏，指酶液在20～25℃放置30分钟后测得α-淀粉酶活力

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

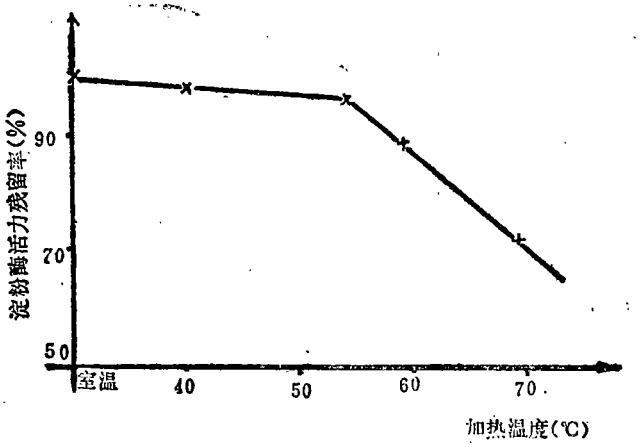


图 1　热处理对淀粉酶活力影响

2.3 热处理对中性蛋白酶活力的影响

酶液同上所述之处理，测得其中性蛋白酶活力如表 2 所示。

表 2　热处理对中心蛋白酶活力的影响

样品 \ 活力(μ/ml)	温度 (℃)					
	室温	40	50	55	60	70
NO.1	870	790	670	580	280	0
NO.2	1680	1590	1480	1110	300	0
NO.3	1800	1720	1595	1115	560	10
NO.4	1610	1500	1380	1110	515	0
NO.5	1460	1430	1310	1115	450	0
平均值	1484	1406	1287	1006	421	2
残留率(%)	100	95	87	68	28	10

取经55℃，30分钟热处理后所测中性蛋白酶活力与室温下中性蛋白酶活力相比较，采用数理统计 7 值检验法[14]，得其(t)=2.45，查表则 $P<0.05$，即两者酶活力相比较：相差显著。

2.4 热处理对碱性蛋白酶活力的影响

酶液如上所述的处理，测得其碱性蛋白酶如表 3 所示。

同样取55℃，30分钟热处理后所测的碱性蛋白酶活力与室温下碱性蛋白酶的活力相比较，采用数理统计 7 值检验法，得其(t)=2.17，故 $P>0.05$，即两者酶活力相差不显著。

由上述知，中性蛋白酶经热处理(155℃,30分钟)后酶活力与室温下相差显著，而碱性蛋白酶经热处理酶活力与室温下相差不显著，可见，碱性蛋白酶耐热性比中性蛋白酶强。如图 2 所示。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表3 热处理对碱性蛋白酶活力的影响

样品 \ 活力(μ/ml)	温度(℃) 室温	40	55	60	70
NO.1	220	210	190	140	0
NO.2	250	245	235	210	10
NO.3	240	230	200	170	10
NO.4	240	235	225	180	5
NO.5	255	245	235	205	10
平均值	241	233	217	181	7
残留率(%)	100	97	90	75	3

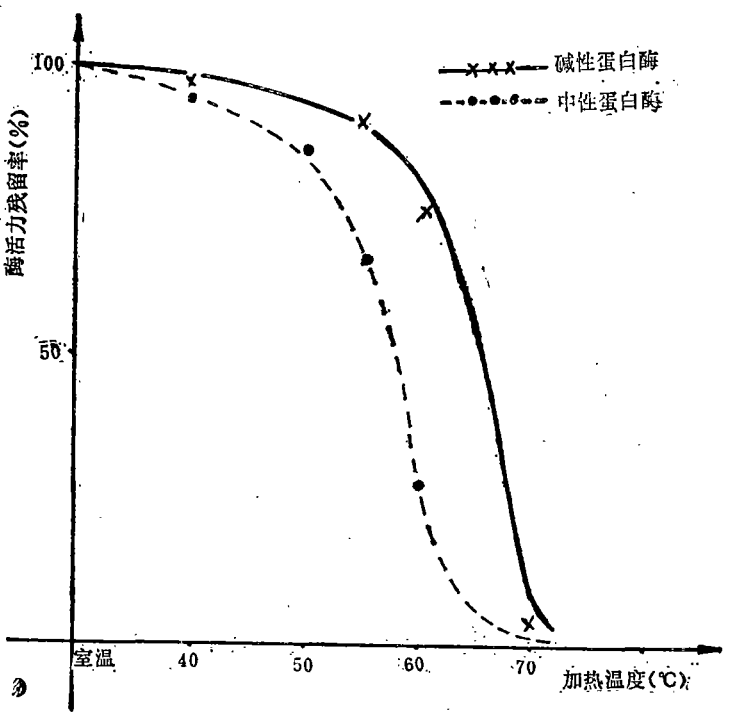


图 2 加热对混杂蛋白的酶活力的影响

2.5 醋酸纤维薄膜电泳的蛋白酶谱型

将滤纸浸于2%酪素后与电泳毕之醋酸纤维薄膜叠合，放于玻片上，置于湿润有盖小盒中，于40℃保温20分钟，染色，漂洗即显示出如图所示的两条蛋白酶区带，由此也证实了在发酵液中有两种蛋白酶即中性蛋白酶与碱性蛋白酶的存在。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

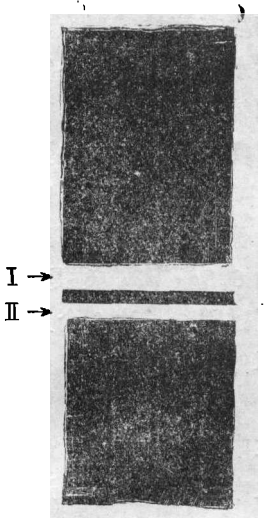


图 3　发酵液的蛋白酶谱型
I　中性蛋白酶；　II　碱性蛋白酶

3 讨　论

枯草杆菌由于它可以分泌多种可溶性胞外酶，其中约有40种酶已被检定[15]。所以它是微生物发酵工业制取胞外酶的重要来源，在这些酶中以淀粉酶和蛋白酶具有工业化生产重要性。经过严格选育菌种及精密设计相应的发酵培养条件，可以定向生产其中某一种酶。如淀粉酶或蛋白酶。但从细菌生理学角度讲，要定向生产单一种酶是困难的。尤其在我国采用粗料发酵，如玉米粉，豆饼粉，菌体为自身代谢，必然要分泌相当数量的水解酶，其中包括淀粉酶和蛋白酶，才可能消化所供的发酵粗料，才能提供给自身的碳源和氮源，以满足菌体生长发育。由此可知胞外酶系的复杂性是细菌生理学上的要求。目前工业生产淀粉酶，从产品质量上要求蛋白酶含量尽可能低些，但是在发酵产酶时，由于要保证足够的氮源供给，必须有相当数量的蛋白酶存在，才能使淀粉酶发酵单位增加到最大。在使用枯草杆菌发酵作为胞外酶来源时，上述问题已使众多研究者陷入细菌生理学上的要求与产品质量上要求的矛盾之中。

为此，多年来在寻求淀粉酶发酵单位较高，而蛋白酶活力又适当的工艺条件，或者寻求在下游工艺中使蛋白酶活力下降的各种工艺——如加热，加抑制剂，或分别提取淀粉酶和蛋白酶等进行了多方面的研究。实际上只有加热处理这一方法才具有生产实践意义。生产实践证明，加热方法只有使部分蛋白酶失活。因此，我们考虑在混杂的蛋白酶中，可能有热不敏感蛋白酶存在。实验证实了上述看法，枯草杆菌 BF—7658 发酵液有两种蛋白酶存在，即中性蛋白酶活力较高，且不耐热。碱性蛋白酶活力较低，仅为中性蛋白酶的1/6左右，但耐热性强，不易加热破坏。为此，我们建议在菌种选育及工艺控制上，应该把与α—淀粉酶相伴生的蛋白酶的质与量作为一个重要的观察指标。蛋白酶活力要保持适当，因为低蛋白酶菌株α—淀粉酶发酵产酶水平相应要低，影响经济效益。而高蛋白酶菌株，虽然α—淀粉酶的产酶活力可以增加到最大值，但最终产品因含蛋白酶太高，影响质量。据本研究所得结果，提示

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

可以选育伴生中性蛋白酶的α—淀粉酶生产菌株，其优点是，枯草杆菌发酵淀粉酶的pH为6.5～7.2，正是中性蛋白酶的最适pH，对水解豆饼粉提供氮源而起到很好的作用，而伴生碱性蛋白酶的菌株，在中性pH范围内作用较小。所以被选育的产α—淀粉酶菌株，在理想上应伴生中性蛋白酶，而不是碱性蛋白酶；实验提示，中性蛋白酶为热敏感蛋白酶，而碱性蛋白酶为不热敏感蛋白酶，即使发酵过程中中性蛋白酶高些，以利于α—淀粉酶发酵活力提高，又可在下游工艺中容易加热失活蛋白酶，保证α—淀粉酶的产品质量。若选育菌种时，碱性蛋白酶不加限制，则在发酵过程中pH为6.5～7.2，对提供发酵氮源帮助较小。而且在下游工艺处理时，难以失活，使产品在使用过程和长达6个月保存期中达不到应有的质量要求。

以前人们设想在粗料发酵时，选取伴生低蛋白酶的α—淀粉酶菌株以保证淀粉酶制品的质量，这种设想实际上是很难达到的。

生产蛋白酶的枯草杆菌菌株有产生中性蛋白酶的，也有产生碱性蛋白酶的，因此在产生α—淀粉酶的枯草杆菌菌株中选育伴生中性蛋白酶活力适当而碱性蛋白酶活力低下的菌株是有可能的。这样就可以解决发酵过程中细菌生理学的需要，以及在下游工艺通过加热方法降低蛋白酶活力，提高产品质量。

枯草杆菌是基因表达中三个重要的表达系统之一。但因伴生蛋白酶常常使表达的蛋白质被蛋白酶水解，这也是当前在基因工程领域中一个待解决的问题，所以在发酵工程中研究枯草杆菌蛋白酶的伴生问题也是引人注目的。

参 考 文 献

[1] 张洪泉等.酶法在食品加工中的应用.中国食品出版社.1987

[2] 张树政等.酶制剂工业.科学出版社，1984

[3] 胡学智.工业微生物，1983；5,43

[4] 胡学智.工业微生物,1984；6.4

[5] 张力田.淀粉糖.轻工业出版社,1981

[6] Atkinson A et al J. *Appl Chem Biotech* 1973；**23**：517

[7] Martha H Moseley et al.Biotech Bioeng 1970；12：251

[8] Leonand Keay, et al.*Biotech? Bioeng* 1970；12:179

[9] 张树政等.酶制剂工业，1984，468

[10] 中华人民共和国轻工业部部颁标准(QB 747—80)关于工业用淀粉酶活力测定法

[11] Rattazzi Mc et al. *Nature* 1967；213，79

[12] Meeva kham P, *Aneh Bio Chem, Bio Phys* 1971；145～470

[13] 蒋承浚等.杭州大学学报，1980；**2**：62

[14] 于志恒等.医速科学研究的基本方法河北医学院1980

[15] Priest F G. *Bacterial Revi*, 1977；**41**：711

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Research on Heat Stability of Protease Produced by B. Subtilis BF 7658 Strain of Producing α-amylase

Gao Yizhi　　*Chen Bingyul*

Abstract

Tests show that the strain of B. Subtilis BF-7658, ₩hich produces α-amylas, produces two kinds of protease, neutral and alkaline protease; but acid protease is not observed. The fermentation medium was heated in water bath, determination of protease activity indicated that the alkaline protease had more remarkable heat stability than the neutral protease. The effect of tests of the alkaline protease activity was not significant($p>0.05$), but the activity of neutral protease was markedly lost and the effect of tests was significant($p<0.05$), The protease pattern was observed by cellu lose acetate electrophoresis. The present suggests a new idea for selection of α-amylase-producing strain and down-stream processing in the industrial produce.

Subjectwords: Bacillus Subtilis; Amylase; Protease

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net