

郭宏文,郭建华,邹东恢,等. 酸性 α -淀粉酶产生菌的筛选[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):360-362.

酸性 α -淀粉酶产生菌的筛选

郭宏文,郭建华,邹东恢

(齐齐哈尔大学食品与生物工程学院/黑龙江省普通高校齐齐哈尔大学农产品加工重点实验室,黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要:从北大仓酒厂白酒酒醅分离筛选到1株产酸性 α -淀粉酶的菌株C6,采用液体发酵,36℃、180 r/min振荡培养48 h后产酶活力达到388.5 U/mL。初步研究了酶性质:C6产生的 α -淀粉酶最适反应pH值为4.8,最适反应温度为60℃,是一种中温酸性 α -淀粉酶,该酶在pH值3.5~9.0、温度50℃以下能较稳定地存在。

关键词:酸性 α -淀粉酶;筛选;酶性质

中图分类号: Q93-331 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0360-02

α -淀粉酶作用淀粉时从分子内部切开 α -1,4糖苷键,最终产物为糊精、寡糖、麦芽糖和葡萄糖,是国内外最常用的一种酶制剂。我国工业生产中常用的中温和高温 α -淀粉酶,其适用pH值范围为6~7,在酸性条件下使用酶活性明显降低,不能满足一些酸性条件下淀粉原料的深加工工艺要求。耐酸性 α -淀粉酶是在酸性条件下能水解淀粉的酶类,可以在低pH值条件下液化淀粉,保持高活性。耐酸性 α -淀粉酶显著的耐酸性使其具有很大的应用潜力和开发前景,可以广泛应用于食品、发酵、纺织、饲料、医药等多种领域,可以明显地提高收得率,降低消耗,特别是能节约工业用粮,开发耐酸性 α -淀粉酶具有很大的经济、社会效益^[1]。自1963年日本学者Minoda等首次发现黑曲霉可以产耐酸性 α -淀粉酶^[2]以来,许多国家都相继对其展开了研究,在国外已有将酸性淀粉酶制剂应用于工业生产的报道。国内开展相关研究起步较晚,目前对耐酸性 α -淀粉酶的研究主要集中在菌种选育和构建基因工程菌等方面^[3-6]。本实验室从分离筛选菌种的工作入手,自白酒酒醅中筛选到1株产酸性 α -淀粉酶的菌株C6,研究了其酶性质,并对菌种特征进行了初步鉴定。

1 材料与与方法

1.1 菌种

自北大仓酒厂的白酒酒醅中分离筛选到的产酸性 α -淀粉酶的菌株C6。

1.2 培养基

(1)分离培养基:含可溶性淀粉1%、蛋白胨0.5%、 Na_2HPO_4 0.01%、 KH_2PO_4 0.015%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 NaCl 0.1%、琼脂1.8%,pH值4.0~4.5。(2)富集培养基:含可溶性淀粉1.2%、蛋白胨0.8%、酵母粉0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 KH_2PO_4 0.1%,pH值5.0。(3)斜面培养基:含可溶性淀粉1.2%、蛋白胨0.8%、酵母粉0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 KH_2PO_4 0.1%、琼脂1.8%,pH值7.0。(4)种

子培养基:含可溶性淀粉1.2%、蛋白胨0.8%、酵母粉0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 KH_2PO_4 0.1%,pH值7.0。(5)发酵培养基:含可溶性淀粉1.5%、蛋白胨1.0%、酵母粉0.5%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 KH_2PO_4 0.1%,pH值7.0。

1.3 主要试剂

试验用试剂均为分析纯。

1.4 方法

1.4.1 菌种分离初筛 将白酒酒醅10 g用150 mL无菌生理盐水浸泡1 h,摇匀后吸取1.0 mL于装有50 mL富集培养基的三角瓶中,36℃振荡培养18 h,取培养液涂布分离培养基平板,36℃培养48 h,用碘液显色,挑选菌落周围有透明圈且菌落直径比较大的菌株接到斜面上,对菌株进行纯化分离。

1.4.2 液态发酵 将纯化后的菌种接种到装有30 mL种子培养基的三角瓶中,36℃、180 r/min培养18 h,然后取2 mL接入装有30 mL发酵培养基的250 mL三角瓶中,36℃、180 r/min培养48 h。发酵液经4层纱布过滤并离心取上清液测定酶活性。

1.4.3 酶活测定 参见Yoo改良法^[7-8]。

1.4.4 菌株特征鉴定 通过显微镜观察和生理生化试验进行鉴定^[9]。

1.4.5 粗酶液的制备 将发酵液8 000 r/min离心,取上清液先用30%饱和度硫酸铵盐析,离心后取上清液再用60%饱和度硫酸铵进行二次盐析,离心收集沉淀,用少量的pH值7.0(0.1 mol/L)的磷酸缓冲液溶解,经透析后得到粗酶液,进行酶性质研究。

2 结果与分析

2.1 菌种筛选

进行分离初筛,从大量菌株中选出了100株透明圈与菌落直径比大的菌株进行摇瓶发酵(图1),得到了1株产酸性 α -淀粉酶活性相对较高且稳定的菌株C6,酶活性为388.5 U/mL。表1列出了透明圈与菌落直径比值排在前10位的菌株的酶活性情况。

2.2 菌株特征鉴定

菌株C6特征鉴定详见表2。依据《伯杰细菌鉴定手册》,初步鉴定菌株C6属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

收稿日期:2013-05-14

基金项目:齐齐哈尔大学青年教师科学技术类科研启动支持计划(编号:2011K-M35)。

作者简介:郭宏文(1973—),男,河北深县人,硕士,讲师,研究方向为微生物遗传。E-mail:ghw666@126.com。



图1 菌株C6水解淀粉的透明圈

表1 部分初筛菌株的酶活性比较

菌株代号	菌落直径 <i>D</i> (mm)	透明圈直径 <i>d</i> (mm)	<i>D/d</i> 值	酶活性 (U/mL)
A19	3.68	10.65	2.89	341.6
B1	3.12	8.63	2.77	322.4
C6	2.31	6.02	2.61	388.5
A9	2.01	5.15	2.56	318.3
A32	2.66	6.58	2.47	287.5
A20	4.14	9.91	2.39	249.2
D12	2.62	5.71	2.18	235.6
A6	4.08	8.44	2.07	269.3
A3	3.82	7.62	1.99	236.8
A1	3.94	7.52	1.91	241.7

表2 菌株 C6 特征鉴定情况

考察项目	特征
菌体细胞形态	棒杆状
大小	(1.5~2.0) μm \times (0.3~0.7) μm
运动性	有
芽孢	有,在中央
生长	需氧
菌落形态	近圆形,表面褶皱,生长蔓延
菌落颜色	乳白色,不透明
革兰氏染色	阳性(+)
吡啶试验	阴性(-)
糖发酵试验	产酸不产气
V-P 试验	阳性(+)
H ₂ O ₂ 酶试验	阳性(+)
明胶液化试验	阳性(+)
甲基红试验	阴性(-)
尿素酶试验	阳性(+)
硝酸盐还原试验	阳性(+)
酪素水解试验	阳性(+)
柠檬酸盐试验	阴性(+)

2.3 C6 酶性质初步研究

2.3.1 酶反应的最适 pH 值 在温度 60 $^{\circ}\text{C}$, pH 值 3.5 ~ 10.0 的不同缓冲液条件下进行酶反应,测定相对酶活性,制作酶反应最适 pH 值曲线(图 2)。规定 pH 值为 4.8 时酶活性为 1。由图 2 可知,C6 所产的淀粉酶受 pH 值影响较大,偏酸的环境下酶反应活性较高,pH 值 4.8 时活性最高,酶反应的最适 pH 值为 4.8。当 pH 值小于 4.5 或大于 8.0 时相对酶活性下降到 50% 以下。

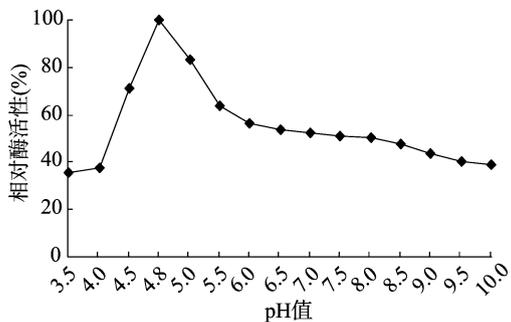


图2 酶反应的最适pH值

2.3.2 酶反应的最适温度 在 pH 值 4.8 条件下,使酶在 35 ~ 100 $^{\circ}\text{C}$ 间不同温度下进行反应,测定相对酶活性,制作酶反应最适温度曲线(图 3)。规定温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 时酶活性为 1。由图 3 可知,该酶反应在 35 ~ 100 $^{\circ}\text{C}$ 均有活性,在 50 ~ 70 $^{\circ}\text{C}$ 范围内酶活性较高,60 $^{\circ}\text{C}$ 时酶活性最高,酶反应的最适温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 。当温度大于 70 $^{\circ}\text{C}$ 后酶活性迅速下降。该酶在高温条件下反应仍具有一定的活性,90 $^{\circ}\text{C}$ 条件下相对酶活性为 31%,100 $^{\circ}\text{C}$ 时为 8.27%。

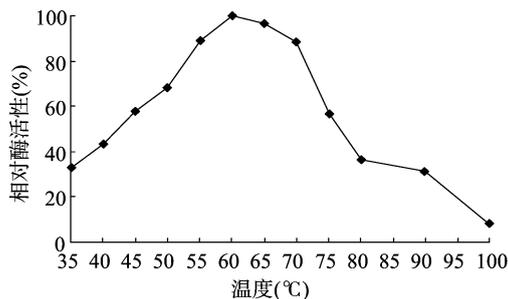


图3 酶反应的最适温度

2.3.3 酶反应的 pH 值稳定性 酶液在 pH 值 3.5 ~ 10.0 的环境下保温 1 h 后,立即回调至 pH 值 4.8,然后测定相对酶活性,制作酶反应的 pH 值稳定性曲线(图 4)。规定 pH 值为 5.0 时酶活性为 1。由图 4 可知,该 α -淀粉酶在 pH 值 5.0 的条件下最为稳定,在 pH 值 3.5 ~ 9.0 的条件下相对稳定。

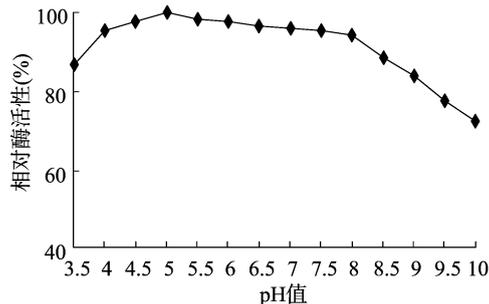


图4 酶反应的pH值稳定性

2.3.4 酶反应的热稳定性 使酶液在 35 ~ 90 $^{\circ}\text{C}$ 不同温度下保温 30 min,然后在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下进行酶反应,测定其相对酶活性,制作酶反应的热稳定性曲线(图 5)。规定 35 $^{\circ}\text{C}$ 时酶活性为 1。由图 5 可知,酶在低于 60 $^{\circ}\text{C}$ 以下较稳定存在,高于 60 $^{\circ}\text{C}$ 时迅速失活,80 $^{\circ}\text{C}$ 时完全失活。

3 讨论

我国是农业大国,淀粉资源十分丰富,酸性淀粉酶的应用

杨杰,谷陈建,吴豪杰,等. 有机肥和紫花苜蓿对长期抛荒贫瘠土壤的改良效果[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):362-365.

有机肥和紫花苜蓿对长期抛荒贫瘠土壤的改良效果

杨杰,谷陈建,吴豪杰,李欣达,陆长梅

(南京师范大学生命科学学院,江苏南京 210023)

摘要:在长期抛荒贫瘠土壤上进行施用有机肥,种植紫花苜蓿并压青和施用有机肥+种植紫花苜蓿并压青等处理,分析不同处理下土壤电导率、pH值、营养元素含量、土壤酶活性以及土壤微生物含量变化情况,确定其改良效果。结果显示,仅种植紫花苜蓿可以提高土壤C素含量,降低N素含量,而电导率等无明显变化;紫花苜蓿压青后,电导率上升、N素含量恢复到对照水平,脲酶活性和微生物数量等变化不明显;仅施加有机肥可以迅速提高电导率、有机质和矿质营养元素含量、细菌数量以及脲酶活性,但短时间内离子态矿质营养元素含量达不到作物正常需求水平;在施用有机肥情形下种植紫花苜蓿并压青后,土壤电导率、各营养元素含量、微生物数量的上升幅度以及土壤酶活性均显著高于施用有机肥处理,其中以每1 m²施用250 g有机肥并种植1.5 g紫花苜蓿种子并压青的改良效果最好。

关键词:贫瘠土壤,紫花苜蓿,有机肥,生物改良

中图分类号: S156 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0362-04

人口数量的剧增急需更多的耕地,而近年来,由于人类对环境的不合理使用,生态平衡遭到严重破坏,土壤质量衰退日趋严重,可耕地面积逐年下降。如何改良贫瘠土壤,保持并增加耕地面积和质量,是摆在世界各国政府尤其是中国政府

面前的头等大事。

所谓土壤改良就是针对土壤的不良性状和障碍因素,采取相应的物理、化学或生物措施,改善土壤性状,提高土壤肥力,增加作物产量,以及改善人类生存相关土壤环境的过程。对贫瘠土壤的改良方法一般采用适宜耕作方法的物理改良法、施用化学肥料的化学改良法,以及利用植物、微生物或者生物的残骸排泄物等的生物改良法。而从根本上改善土壤性状和环境友好角度考虑,生物改良方法目前无疑是最佳的选择。

现阶段常用的生物改良方法主要有通过豆科植物根瘤菌固氮作用增加土壤中有机质含量并改善土壤结构,通过生长

收稿日期:2013-04-17

基金项目:国家基础科学人才培养基金项目(编号:J1103507、J1210025),国家级大学生创新创业训练计划。

作者简介:杨杰(1992—),男,江苏海安人,本科生,主要从事植物生物技术研究。E-mail:datouerzi1992@163.com。

通信作者:陆长梅。E-mail:luchangmei@njnu.edu.cn。

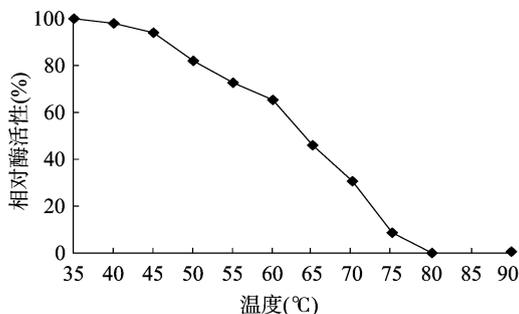


图5 酶反应的热稳定性

日益广泛,有必要对新型的酸性淀粉酶进行不断地研究及开发。本试验自白酒酒醅中分离筛选到1株产酸性淀粉酶的菌株C6,采用液体发酵方法,在36℃、180 r/min培养48 h,菌株的产酶活性达到388.5 U/mL。筛选菌种是一项十分繁杂的工作,为此我们采取了快捷有效的初筛方法,以透明圈与菌落直径比作为初步判定菌株酶活性高低的依据,一般认为直径比与酶活呈现正相关性,我们的试验结果也证明了这一点。对菌株C6的产酶性质进行了研究,其产生的α-淀粉酶最适反应pH值为4.8,最适反应温度为60℃,属于一种中温酸性α-淀粉酶。可以将菌株C6作为酸性淀粉酶菌种育种研究的良好出发菌株。

参考文献:

- [1] 杨培华,李忠海,刘永乐,等. 耐酸性α-淀粉酶的开发与应用[J]. 食品与机械,2006,22(5):132-136.
- [2] Minoda Y, Arai M, Torigoe Y. Acid-stable α-amylase of black *Aspergilli*: Part II. Some general properties [J]. Agr Biol Chem, 1968,32(1):104-109.
- [3] 郭建强,李运敏,岳丽丽,等. 超耐热酸性α-淀粉酶基因的克隆及其在酵母细胞中的表达[J]. 生物工程学报,2006,22(2):237-242.
- [4] 胡元森,蒋炳伸,潘涛,等. 芽胞杆菌XM-1酸性α-淀粉酶基因的克隆及原核表达[J]. 中国食品学报,2012,12(2):41-45.
- [5] 谢建华,师永生,杜丽琴,等. 一株产酸性α-淀粉酶菌株的筛选,纯化及酶学性质[J]. 应用与环境生物学报,2011,17(1):95-99.
- [6] 张丽靖,沈江锋,金庆超,等. 一株酸性淀粉酶产生菌的分离、鉴定及酶学特性初步研究[J]. 生物技术通报,2011,5(5):142-145.
- [7] Yoo Y J, Hong J, Hatch R T. Comparison of alpha-amylase activities from different assay methods [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1987,30(1):147-151.
- [8] 史永昶,姜涌明,樊飏,等. 蛋白酶对解粉芽孢杆菌α-淀粉酶活力的影响[J]. 微生物学通报,1995,22(1):23-25.
- [9] 诸葛健,王正祥. 工业微生物试验技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994:24-93.