

曲霉糖化酶高产菌株平板分离培养基的筛选

冯立才, 黄未, 郭润就

(上海应用技术学院食品系, 上海 200433)

摘要: 以“苏-16”黄曲霉为出发菌株, 筛选出曲霉糖化酶高产菌株, 该菌株淀粉液化酶活力较原菌株提高85.2%, 糖化酶活力提高24.4%。筛选培养基配比为: 可溶性淀粉1.3%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, 琼脂粉1.8%。(孙悟)

关键词: 微生物; 曲霉; 糖化力; 培养基; 分离

中图分类号: TS261.1; Q93-33; Q814

文献标识码: B

文章编号: 1001-9286(2003)03-0037-02

Selection of Flat Separation Culture Medium for High-yield Strains of Saccharifying Enzymes from *Aspergillus*

FENG Li-cai, HUANG Wei and GUO Run-jiu

(Food Department of Shanghai Applied Technology School, Shanghai 200433, China)

Abstract: High-yield strains of saccharifying enzymes from *aspergillus* were obtained with “Su-16” *aspergillus flavus* as primary bacteria strains. In contrast with former strains, the activity of liquefying enzyme and saccharifying enzyme of newly produced strains had improved 85.2% and 24.4% respectively. The proportioning of the culture medium were as follows: 1.3% soluble starch, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001% and 1.8% gelose powder. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; *aspergillus*; saccharifying power; culture medium; separation

黄酒生产大多使用黄曲霉或米曲霉作大米或糯米糖化用的种曲。淀粉经曲的液化和糖化作用, 逐渐降解为小分子的糖被酵母菌转化为酒精。曲霉淀粉酶和糖化酶活力高低对原料的利用率有很大影响。为了保持生产菌种的活力或得到活力更高的菌株, 就要对菌种进行分离或诱变^[1]。

我们曾以上海枫泾酒厂提供的黄曲霉“苏-16”为出发菌株进行多次自然分离和紫外线诱变, 得到一新菌株, 其淀粉液化酶活力较原菌株提高了85.2%, 但糖化酶活力仅提高24.4%。分析原因, 除了与菌种属性有关外, 还与所用的酵母膏-可溶性淀粉培养基及平板碘液水琼脂检出法有关。这种培养基和检出法对液化力检出效果好, 而对糖化力检出效果差。为了解决这一问题, 我们在液化酶试验基础上重点对糖化酶高产菌株平板分离培养基及检出方法进行了试验, 并取得较好结果^[2]。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

黄曲霉AF11-6-7-7; 白地霉AS.2.361。

1.2 主要仪器

培养箱, 灭菌锅, 净化台, 水浴锅, 显微镜等。

1.3 黄曲霉孢子悬浮液

取斜面菌种1支, 倒入无菌水刮下孢子, 脱脂棉过滤, 玻璃珠打散, 血球计数板计数后稀释至孢子数150~200个/ml。

1.4 白地霉悬浮液

取斜面菌种1支, 倒入无菌水刮下菌苔, 用玻璃珠打匀。

1.5 指示菌生长圈试验

1.5.1 管碟法葡萄糖浓度试验 在100 ml灭菌后温热的硫酸铵-

可溶性淀粉琼脂培养基中加入1 ml白地霉悬浮液, 摇匀, 4块培养皿中各注入15 ml, 放冷。平板上等距离放入6个不锈钢小管, 注入不同浓度的葡萄糖溶液, 平板置30℃培养2 d。比较各管周围白地霉生长圈的直径。

1.5.2 单、双层培养基比较试验 单层法: 同上培养基及白地霉, 吸取15 ml注入培养皿, 放冷。在培养基上滴入0.1 ml黄曲霉孢子悬浮液, 涂匀, 平板倒置, 30℃培养2 d和3 d。设4个重复(以下同)。双层法: 下层培养基加有白地霉, 上层不加, 均为10 ml。其他相同。

培养后测量所有黄曲霉单菌落的直径(D), 白地霉生长圈的直径(d), 计算平均值。并根据白地霉生长旺盛与否记录清晰度(以++++表示最清晰)。

1.6 培养基试验^[3]

1.6.1 常用天然培养基 3种培养基分别为波美6度麦芽汁、波美6度米曲汁和20%土豆汁, 各加入1.3%可溶性淀粉和1.8%琼脂粉。灭菌后温热时每100 ml中加入1 ml白地霉悬浮液摇匀, 吸取15 ml注入培养皿放冷。每块平板滴入0.1 ml黄曲霉孢子悬浮液, 涂匀, 平板倒置, 30℃培养。

1.6.2 有机氮源培养基 以1.3%可溶性淀粉, 1.8%琼脂粉为基础, 加入0.1%~1.0%的酵母膏、牛肉膏、蛋白胨和干酪素配成系列试验培养基。当以尿素为氮源时, 另外再加入 KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%。试验方法同天然培养基。

1.6.3 无机氮源培养基 以不同比例的硫酸铵、氯化铵和硝酸铵为氮源, 其他配比与尿素培养基相同, 试验方法同上。

1.7 自然分离试验

采用培养基试验中找到的最适配比, 下层加白地霉进行自然

收稿日期: 2002-11-11

作者简介: 冯立才(1948-), 男, 上海人, 大学, 工程师, 发表论文20余篇。

分离。黄曲霉孢子悬浮液的制备及平板分离、培养方法均同前。培养后测量d/D比值,挑出比值较大的若干单菌落接入斜面,培养2d后做麸曲酶活力测定。

1.8 麸曲酶活力测定

1.8.1 麸曲浸出液制法 5g麸皮加5.5ml水拌匀,121℃灭菌45min。接入待测菌株斜面孢子,30℃培养2d。加入100ml pH4.6缓冲液,搅匀,30℃水浴浸提1h,过滤得麸曲浸出液(酶液)。

1.8.2 淀粉糖化酶活力测定 25.00ml 2%可溶性淀粉溶液中加入1ml酶液,30℃水浴反应1h,加碱中止酶反应,测定生成的还原糖量(减去对照)。1g新鲜麸曲,30℃1h水解可溶淀粉为葡萄糖的毫克数即淀粉糖化酶的活力单位。

2 结果与讨论

2.1 指示菌试验结果

2.1.1 管碟法试验效果(见图1)

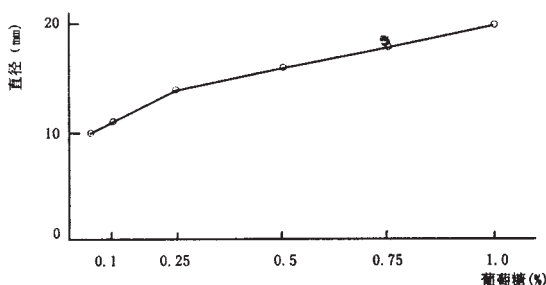


图1 白地霉生长圈直径与糖浓度关系

从图1中可见,随着葡萄糖浓度的增加,白地霉生长圈的直径也增加,有较好的对应关系。由于白地霉不能分解淀粉,如没有葡萄糖的供应,在这种缺少可用碳源的无机氮源培养基中是不会生长的,所以仅在不锈钢小管周围形成生长圈。根据这一点可以设想,当黄曲霉或其他曲霉在添加白地霉的平板上生长时,糖化酶活力高的单菌落因分解淀粉产糖多,其周围白地霉的生长圈也应大些,因此把白地霉作为指示菌来使用,应是可行的。

2.1.2 单、双层培养基使用效果比较(表1)

层数	天数(d)	\bar{d} (mm)	\bar{D} (mm)	\bar{d}/\bar{D}	清晰度
双	2	15	8.2	1.83	++++
双	3	16	8.9	1.80	++++
单	2	10	6.4	1.56	+++
单	3	13.9	7.8	1.78	++++

从表1可见,双层法的黄曲霉单菌落和白地霉生长圈直径均大于单层法,说明双层法的效果优于单层法,这可能与培养基总量有关。培养3d的清晰度也以双层法为优,因此实际应用时以双层法培养3d的效果较好。此外,使用双层法时,因白地霉在下层,挑单菌落时只要操作小心就可避免被同时带出,省去纯化的麻烦。

2.2 培养基试验结果

2.2.1 常用天然培养基试验效果 仅培养24h,培养基表面和内部的白地霉已经旺盛生长,此时黄曲霉的菌落尚难观察,因此无法显示菌落的酶活力。原因是这几种培养基中淀粉以外的成分已充分满足了白地霉的碳、氮等营养需求,而白地霉的生长又快于黄曲霉,所以这3种培养基无法应用。

2.2.2 不同有机氮源培养基试验效果 蛋白胨、牛肉膏、酵母膏的情况与常用天然培养基相似,白地霉的生长甚至更快更旺盛。其原因也应相似。在干酪素培养基上白地霉生长较差,但也先于黄曲

霉,因此这几种培养基均不能应用。尿素作氮源虽可见白地霉在黄曲霉菌落周围形成生长圈,但十分稀疏,清晰度很差,因此也不理想。

2.2.3 不同无机氮源培养基试验效果(表2)

氮源	浓度(%)	\bar{d} (mm)	\bar{D} (mm)	\bar{d}/\bar{D}	清晰度
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1	16.4	8.9	1.84	+++
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2	17.5	9.9	1.77	++++
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3	19.6	10.5	1.87	++++
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.4	14.4	8.3	1.73	++++
NH ₄ Cl	0.1	15.4	8.7	1.77	+++
NH ₄ Cl	0.2	16.2	9.0	1.80	++++
NH ₄ Cl	0.3	16.7	9.1	1.84	++++
NH ₄ Cl	0.4	18.4	10.0	1.84	++++
NH ₄ NO ₃	0.2	21.3	13.2	1.61	++

从表2可见,0.3% (NH₄)₂SO₄作氮源时不仅黄曲霉生长较快,而且白地霉生长圈较大,清晰度也好,用于分离最为理想。0.3% NH₄Cl的效果也不错。NH₄NO₃作氮源时两种菌生长都比较稀疏,清晰度较差,因此效果不如前两种。原因可能是前两种铵盐是生理酸性的,更适于菌的生长。

2.3 自然分离结果

自然分离采用的是硫酸铵-可溶淀粉双层培养基,从10多块平板200多个黄曲霉单菌落中挑出d/D>2.0的7个单菌落。其酶活力测定结果见表3。

菌株	糖化酶活力 (u/g 麸曲)	活力提高比率 (%)
AF11-6-7-7(出发)	4000	0
分离株:6#	4240	6
23#	4080	2
25#	4240	6
26#	4440	11
28#	4400	10
29#	4320	8
30#	4240	6

从表3可见,7个菌株糖化酶活力均较出发菌株高,增幅2%~11%,平均7%。检出效果较好。因是自然分离,大幅度提高是不太可能的。该方法用于诱变,效果会更好。我们对增幅前二位的26#和28#进行液化力测定,其活力均比出发菌株提高27.6%,说明糖化力强的菌株其液化力也往往较强。这是因为液化是糖化的基础。由此也可推断,本实验的方法不仅对糖化酶活力高的菌株检出有效,对液化酶活力高的菌株检出也同样有效。

3 结论

3.1 经过筛选得到适合曲霉糖化酶高产菌株平板分离用的培养基,其配比为:可溶性淀粉1.3%,(NH₄)₂SO₄0.3%,KH₂PO₄0.1%,MgSO₄·7H₂O 0.05%,FeSO₄·7H₂O 0.001%,琼脂粉1.8%。

3.2 以下层加有白地霉的双层培养基作分离时,曲霉单菌落糖化酶活力高的周围白地霉生长圈直径较大,以此作初筛参考,可以有效地减少盲目性,提高成功率。

参考文献:

[1] 章名春.工业微生物诱变育种[M].北京:科学出版社,1984.
 [2] 冯清平,葛瑞昌.微生物应用技术[M].兰州:甘肃人民出版社,1988.
 [3] 诸葛健,王正祥.工业微生物实验技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,1994.