

耐酸性 α -淀粉酶产生菌的选育

胡欣洁, 李 凇, 王忠彦, 胡 承*

四川大学生命科学学院, 四川 成都 610064)

摘 要: 从醋醅中筛选得到一株产耐酸性 α -淀粉酶的野生菌 ASA-1, 经初步鉴定为假丝酵母属的水生假丝酵母 (*Candida aquatica*), 以 ASA-1 为出发菌株, 通过紫外诱变 (UV) 和硫酸二乙酯 (DES) 复合诱变, 获得产酶较高的 ASA-UD86 菌株, 酶活达到 146 u/g。

关键词: 微生物; 耐酸性 α -淀粉酶; 水生假丝酵母; 固态发酵

中图分类号: TS261.1 ; TQ920 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286 (2005)05-0039-03

Breeding of Acid-resistance α -amylase Producing Strains

HU Xin-jie, LI Lin, WANG Zhong-yan and HU Cheng

Life Science College of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

Abstract: A acid-resistance α -amylase producing strain-ASA-1 was screened from vinegar grains, which was identified as *candida aquatica* belonging to *candida* genus. ASA-1 was used as startup strain to produce ASA-UD86 strain of higher amylase producing capability by UV mutation and DES complex mutation, the survival rate of amylase reached to 146 u/g. (tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; acid-resistant α -amylase; *candida aquatica*; solid fermentation

淀粉酶是水解淀粉和糖原酶类的统称, 是最早实现工业化生产, 迄今为止用途最广, 产量最大的酶制剂品种。随着工业的不断发展, 淀粉酶的应用领域也在不断拓宽, 因此特殊条件生产就需要特殊的淀粉酶种类。

耐酸性淀粉酶因其能在极端酸性环境中保持较高活性而受到研究者的注意, 日本以其传统烧酒和清酒工艺为研究重点, 是研究耐酸性淀粉酶较早的国家。1962 年, 山田指出黑曲霉产生的耐酸性 α -淀粉酶的最适 pH 值是 4.0。随后不断从白曲霉发酵产物中分离纯化出在酸性条件下能保持高活力的耐酸性 α -淀粉酶^[1,2]。

淀粉深加工工业是农副产品升值的重要途径, 其进行的基础是淀粉质原料的水解, 在传统工业中一般分为液化和糖化两个阶段进行, 由于工业所采用的 α -淀粉酶和糖化酶作用 pH 值有差异, 生产过程中不但增加了生产成本, 而且影响液化糖化效果, 直接影响下游产品质量, 研究和开发在酸性条件下能保持高活性的耐酸性 α -淀粉酶, 简化液化、糖化过程, 降低淀粉深加工生产成本具有现实意义。

我们从醋醅中分离得到一株产耐酸性 α -淀粉酶的菌株, 经鉴定为假丝酵母属的水生假丝酵母 (*Candida aquatica*)。通过紫外和硫酸二乙酯复合诱变使其产酶能

力提高了 4 倍。

1 材料和方法

1.1 样品来源

淀粉厂附近酸性土壤, 酒糟, 醋醅, 实验室配置酸性富集培养基。

1.2 培养基

1.2.1 筛选培养基

玉米淀粉 1 % ; 蛋白胨 0.5 % ; pH 2.5~4.5。

1.2.2 种子培养基

可溶性淀粉 1 % ; 蛋白胨 1 % ; 酵母膏 0.5 % ; pH 4.0。

1.2.3 斜面培养基

可溶性淀粉 1 % ; 蛋白胨 0.5 % ; KH_2PO_4 0.3 % ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 % ; pH 4.0。

1.2.4 产酶固体培养基

麦麸: 水为 1:1.2, 121 °C 灭菌 20 min, 250 mL 三角瓶装量 25 g。

1.3 耐酸性 α -淀粉酶产生菌株的筛选

称取样品 5 g 加入装有 50 mL 无菌水的小三角瓶中, 振荡均匀后, 做浓度梯度稀释, 得到不同稀释度的样

收稿日期: 2004-11-10

作者简介: 胡欣洁 (1975), 女, 四川仁寿人, 在读硕士研究生, 研究方向: 工业微生物。

* 胡承为本文通讯作者。

品溶液,将菌液涂布于 pH 范围为 2.5~4.5 的筛选培养基上进行培养。待菌体生长后,挑取有明显透明圈的菌株,进一步纯化分离。

1.4 诱变^[3]

1.4.1 菌液制备

利用接种环挑取斜面培养基上处于生长对数期的菌体转入 10 mL 无菌生理盐水中,充分振荡后,稀释菌液菌体浓度约为 10^8 个/mL,作为待处理的菌悬液。

1.4.2 紫外光诱变

取上述菌液 5 mL,倾入直径为 9 cm 底部平整的平皿中,在磁力搅拌器缓慢搅拌条件下,紫外光垂直距离 30 cm 照射 0 s,30 s,60 s,90 s,120 s,150 s,180 s 再做梯度稀释,取 0.1 mL 涂于筛选平板,30 °C 避光培养,统计诱变致死率,选择致死率为 80 % 左右的剂量处理样品。

1.4.3 DES-UV 诱变

经紫外诱变后的正变株磷酸缓冲液制备菌悬液,取 5 mL 与浓度为 2 % 的 DES 溶液混合,在 30 °C 振荡 0,2 min,4 min,6 min,8 min,10 min,加入 2 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 终止反应,然后在紫外灯下照射 150 s。做梯度稀释,取 0.1 mL 涂筛选平板,梯度稀释后涂平板 30 °C 避光培养 5 d,选择致死率为 80 % 左右的剂量处理样品,根据多菌株出发的原则,在经紫外诱变的正变菌株中选取酶活高的菌株进行 DES-UV 复合。

1.5 酶活测定方法

1.5.1 所用试剂^[4]

底物溶液 0.5 % 可溶性淀粉溶液。

原碘液 称取 0.5 g 碘和 5.0 g 碘化钾研磨溶于少量蒸馏水中,然后定容到 100 mL。

稀碘液 取 1 mL 原碘液稀释 100 倍。

1.5.2 酶液浸出

称取固体培养基 5 g,加入 0.1 mol/L pH 为 4.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液 (0.5 % NaCl) 20 mL 浸泡 3 h,过滤取上清液。

1.5.3 实验方法^[5]

底物 5 mL 在 40 °C 水浴预热 10 min,加入酶液 0.5 mL,准确保温 5 min。用 0.1 mol/L 的 HCl 终止反应。取 0.5 mL 反应液与 5 mL 稀碘液显色,在 620 nm 处测光密度。以 0.5 mL 水代替 0.5 mL 反应液为空白,以不加酶液加同体积的缓冲液)为对照。

酶活力根据下式计算:

$$\text{酶活力 (U/g)} = (R_0 - R) / R_0 \times 50 \times D \times 4$$

式中 R_0, R 分别表示对照和反应液的光密度, D 为酶液的稀释倍数。调整 D 使 $(R_0 - R) / R_0$ 在 0.2~0.7。

酶活定义 在 40 °C, pH 为 4.0 的条件下 5 min 内水解 1 mg 淀粉的酶量为一个活力单位。

2 实验结果

2.1 实验菌株

2.1.1 耐酸性 α -淀粉酶产生菌株的筛选

从酸性土壤、酒糟、醋醅、酸性富集培养基中分离得到了能在筛选培养基上产生明显透明圈的菌株 1 株 (如图 1),经三角瓶固体发酵该菌株具有耐酸性淀粉酶活性,测其耐酸性淀粉酶活性为 30.6 u/g。将该菌株命名为 ASA-1。

2.1.2 ASA-1 的鉴定

2.1.2.1 培养和形态特征

菌落特征 (见图 1):菌落为圆形,边缘整齐,乳黄色,质地光滑湿润,较厚。培养基上产生透明圈(3500×0.7)。

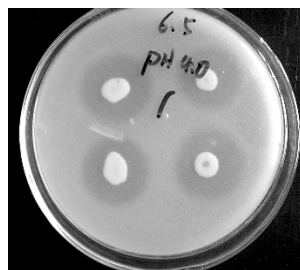


图 1 ASA-1 菌株在筛选培养基上

细胞特征 通过美蓝水浸片观察,细胞单个个体较大,呈长圆形,平板培养条件下能见单极出芽和两极出芽现象 (图 2),在液体培养条件下可看到多极出芽。



图 2 ASA-1 细胞电镜扫描照片

假菌丝形成实验:马铃薯培养基培养 3 d 后,假菌丝清晰可见。

子囊孢子形成实验:Gorodkova 培养基, Kleyn 培养基,马铃薯块培养基,石膏块培养基培养均未见子囊孢子形成。

2.1.2.2 生理生化特性(表 1)

根据 Lodder 分类系统,初步确定 ASA-1 属于假丝酵母属水生假丝酵母^[6]。

2.2 菌株诱变

2.2.1 紫外诱变

以野生菌株 ASA-1 为出发菌株,进行紫外诱变,照射不同时间及致死率结果如表 2 所示。

选择致死率 80 % 左右的剂量处理样品即用紫外灯照射样品 150 s 后,梯度稀释后涂布筛选平板 30 °C 避光

表 1 生理生化特性

糖发酵	碳源同化	氮源同化
葡萄糖 —	葡萄糖 +	硝酸盐 +
麦芽糖 —	麦芽糖 +	
半乳糖 —	半乳糖 +	
乳糖 —	乳糖 +	
蔗糖 —	蔗糖 +	
	蜜二糖 +	

注: + 生长, — 不生长

表 2 紫外诱变致死率统计

照射时间(s)	0	30	60	90	120	150	180
致死率(%)	0	22	42	50	67	79	96

培养 70 h,以透明圈直径与菌落直径比值为标准进行初筛,选取比值大的菌株进行固体发酵,培养 70 h 后,测酶活,结果如表 3。

表 3 UV 诱变效果

菌株编号	酶活(u/g)	菌株编号	酶活(u/g)
ASA-127	112.4	ASA-152	113.7
ASA-133	104.8	ASA-157	108.7
ASA-145	106.3	ASA-163	90.3

2.2.2 DES-UV 复合诱变

以野生菌株 ASA-1 为出发菌株,先利用浓度为 2 %的 DES 30 ℃振荡不同时间,然后在紫外灯下照射 150 s,统计致死率,如表 4 所示。选择致死率 80 %左右剂量处理样品,即 2 % DES 溶液 30 ℃振荡 6 min 后,再用紫外灯照射 150 s。

表 4 DES-UV 复合诱变致死率统计

剂量	DES(min)	2	4	6	8	10
	UV(s)	150	150	150	150	150
致死率(%)		36.2	53.8	82.4	96.7	100

根据多菌株出发的原则,在经紫外诱变的菌株中选取酶活高的株菌进行 DES-UV 复合诱变,通过初筛和复筛,结果如表 5(酶活单位为 u/g),经 DES-UV 复合诱变后,通过初筛和复筛得到高产菌株 ASA-UV86。

表 5 DES 诱变效果

菌株编号	酶活(u/g)	菌株编号	酶活(u/g)
ASA-UV6	133	ASA-UV86	146
ASA-UV28	127.5	ASA-UV93	126.7
ASA-UV59	130.4	ASA-UV96	120.6

2.3 诱变菌株稳定性考察

将 ASA-UD86 菌株在斜面培养基上连续传种 10 次,每次接种发酵测定酶活,结果如表 6。

从表 6 可以看出 ASA-UD86 的产酶能力具有较好的稳定性。

表 6 诱变菌株 ASA-UD86 稳定性

传种代数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
酶活(u/g)	146	142	150	146	138	143	140	135	140	142

3 讨论

3.1 菌种筛选

从 1962 年山田指出黑曲霉产生的耐酸性 α -淀粉酶的最适 pH 是 4.0 开始,不少国家学者逐步开始了对这一能在极端条件下保持高活性的 α -淀粉酶的研究。所得到的能产生耐酸性 α -淀粉酶的微生物主要是曲霉和芽孢杆菌,如黑曲霉,白曲霉 *Aspergillus kawachii*, *B. acidocaldarius* A-2, *B. acidocaldarius* ATCC2709, *B.licheniformis*, *B. acidoldarius* 101^[6]等等。ASA-1 经鉴定为假丝酵母属水生假丝酵母,其在生长条件方面跟酿造工业上广泛应用的酵母具有共通性,所以该菌种在工业应用方面,特别是在酿酒工业中具有开发价值。

3.2 诱变

复合诱变是获得高产菌种的通用方法。通过紫外诱变和 DES 复合诱变,菌株的产酶能力提高了近 5 倍,获得了产酶能力较高的 ASA-UD86 菌株,酶活从出发菌株的 30.6 u/g 提高到了 146 u/g。在诱变过程中,第一轮紫外诱变的效果明显,通过紫外诱变,菌株产酶能力跟出发菌株相比提高了将近 4 倍,效果较好。DES-UV 复合诱变效果稍差,产酶能力仅在第一轮紫外诱变基础上提高了 27 %左右。所获得诱变菌株具有较好的稳定性。

参考文献:

- [1] Mikamt S,Iwano K,Shlinnki S,Shimada T: Purification and Some Properties of Acid-Stable α -amylase from *Shochukoji* (*Aspergillus kawachii*) □.Agric.boil.Chem,1987,51(9):2495-2501.
- [2] Yasuhiro K, Naoki T, Hidesi O, Toshiro O, Masahilo S, Hisatugu W: Production of Acid-Stable α -amylase by *Aspergillus kawachii* during Barely Shochu-Koji Production[J]. J.Ferment. Bioeng,1997,84(3):224-227.
- [3] 章名春.工业微生物诱变育种[M].北京:科学出版社,1984. 190-210.
- [4] Young J.Yoo, Juan Hong,Randolph T.Hatch: Comparison of α -Amylase Activitise from Different Assay Methods □. Biotechnology and Bioengineering,1987,30:147-151.
- [5] 史永昶,姜涌明.五种 α -淀粉酶测定方法的比较研究[J].微生物学通报,1996,20 (6) 371-373.
- [6] 张纪忠.微生物分类学[M].上海:复旦大学出版社,1990. 377-412.
- [7] 张丽苹,徐岩.酸性 α -淀粉酶产生菌株的选育的初步研究[J].工业微生物,2002,32 (4) :11-14.

酿酒科技》荣获第三届全国国家期刊奖百种重点期刊