

生淀粉糖化酶高产菌的选育

诸葛斌¹ 姚惠源¹ 诸葛健²

(无锡轻工大学 食品学院¹ 教育部工业生物技术重点实验室² 无锡 214036)

摘要: 从土壤及霉变淀粉质等样品中分离出对生淀粉具有降解作用的菌种约 60 株, 其中生淀粉糖化酶最高的一株根霉 OR-1, 其酶活为 90U/mL, 通过一次紫外和亚硝基胍诱变, 酶活分别达到 200U/mL、325U/mL, RDA 值分别为 70%、65%。诱变株是一株产生淀粉糖化酶较高的根霉。

关键词: 根霉, 生淀粉酶

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 06-0060-05

SCREENING AND MUTATING A RAW STARCH-DIGESTING GLUCOAMYLASE STRAIN

ZHU Ge-Bin YAO Hui-Yan ZHU Ge-Jian

(School of Food, Wuxi University of Light Industry, Key Laboratory of
Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Wuxi 214036)

Abstract: 60 strains that could produce raw starch-digesting glucoamylase were isolated from soil and mildewed rice. The highest raw starch-digesting glucoamylase activity strain named OR-1 was identified as *Rhizopus* sp. The raw starch-digesting glucoamylase activity of the strain is 90U/mL. Through UV and NTG mutagenesis, the raw starch-digesting glucoamylase activity raised to 200U/mL and 325U/mL respectively. The RDA were 70% and 65% respectively.

Key words: *Rhizopus*, Raw Starch-digesting Glucoamylase

淀粉质原料深加工是粮食与食品加工中的重要组成部分。淀粉的生产及深加工是一个庞大的工业, 在整个国民经济中占有很重要的地位。多孔淀粉是一种有机吸附剂, 具有广泛的应用前景, 一直受到国外研究人员的重视, 而生产多孔淀粉必须利用生淀粉酶。同时, 淀粉是发酵工业的主要原料, 通过发酵可以生产出众多产品, 如乙醇、甘油、有机酸、氨基酸、酶等, 也可以生产高附加值的生物制剂和药品。通过对淀粉的生化处理可以提高淀粉产品的附加值。这些都离不开淀粉酶。生淀粉酶具有良好的节能前景, 可将传统的淀粉糊化、液化、糖化合并为一步直接糖化的特点。正是由于生淀粉酶具有的经济价值和某些特殊用途, 因此一直受到国内外许多研究人员的关注。经多年的研究探索, 科研人员发现能够产生淀粉酶的菌比较多, 但报道最多的是曲霉 (*Aspergillus*)^[1-4]、杆菌 (*Bacillus*)^[5]、根霉 (*Rhizopus*)^[6-8]。本文介绍一株具有较高产生淀粉酶能力根霉的筛选与选育。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要药品与试剂: 3, 5-二硝基水杨酸、青霉素、丁卡 (注射用)。

1.1.2 采样样品: 不同来源的样品 60 余个。

1.1.3 部分仪器设备: 回转式恒温摇瓶柜 (上海新星自动化控制设备成套厂)、HZS-H 水浴振荡器、SBA 生物传感分析仪 (山东省科学院生物研究所)。

1.1.4 培养基及培养条件: 增殖培养基及培养条件: 培养基: 可溶性淀粉 20g, NaNO_3 3g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, KCl 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g、定容 1L 中、pH 5.5 ~ 6。培养条件: 500mL 三角瓶中, 恒温 30℃, 摇瓶 200r/min, 培养 3 ~ 4d。选择性平板培养基及培养条件: 培养基: 木薯淀粉 20g, NaNO_3 3g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, KCl 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, 青霉素 200U/mL, 丁卡 20 μg /mL, 琼脂 2%, 定容 1L 中, pH 5.5 ~ 6.0。培养条件: 30℃, 培养 3 ~ 4d。摇瓶筛选培养基及条件: 培养基: 玉米粉 40g, 豆粉 30g, 麸皮 10g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, KCl 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, 定容 1L 中, 灭菌 0.012MPa 25 ~ 30min。培养条件: 于 250mL 三角烧瓶, 恒温 30℃, 摇瓶柜 200r/min, 振荡培养 3 ~ 4d。

1.1.5 试管斜面: 察氏琼脂培养基。

1.2 方法

1.2.1 菌种筛选诱变的总体步骤: 采样→增殖培养 (以可溶性淀粉为唯一碳源)→平板分离 (初筛) (以生淀粉为唯一碳源)→原种斜面→摇瓶筛选→复筛→菌株获得→纯化→斜面→孢子悬浮液 (计数、计算孢子浓度)→诱变 (计算致死率)→涂布选择性平板→接入斜面→筛选→复筛→诱变菌株获得→进一步诱变

1.2.2 淀粉酶活测定方法: 生淀粉酶活测定方法: 1% 的淀粉悬浮液 2.0mL 加入到 50mL 三角烧瓶, 添加 pH4.0 磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲溶液 2mL, 40℃ 预热 10min, 加入 1.0mL 培养液 (酶液), 在 40℃ 恒温振荡 (180 r/min) 反应 30min 后, 加入 4% 的氢氧化钠溶液 0.5mL 终止反应, 反应液用 3000r/min 离心 10min, 上清液测定葡萄糖量。

酶活力定义: 在以上分析条件下, 1min 释放 1 μg 葡萄糖的酶量定义为一个酶活力单位。

葡萄糖量的测定: 方法 1 3, 5-二硝基水杨酸比色法 (DNS 法)。方法 2 SBA 生物传感分析仪测定。作用于糊化淀粉的酶活力测定: 用糊化淀粉作为酶作用底物, 测定方法与生淀粉酶活测定方法相同。

2 RDA (Raw starch digesting-ability) 计算

根据资料介绍的方法: $\text{RDA}\% = \text{B}/\text{A} \times 100\%$

式中: B-降解生淀粉的活力 A-降解糊化淀粉的活力

3 结果与讨论

3.1 筛选结果

3.1.1 选择性平板筛选结果: 通过对所采样样品的增殖培养, 共筛选出对生淀粉作用的菌种约 60 余株, 其中细菌 10 株, 霉菌 50 株。在选择性平板上对生淀粉起作用最明显的 5 株菌株形态记录见表 1。

通过生长形态及显微镜观察判断认为: 3 号为细菌, 5 号为曲霉, 其它是根霉。

表 1 对生淀粉起作用最明显的 5 株菌株形态记录

序号	编号	时间 (h)	现象
1	Or-1	64	透明圈模糊, 菌丝丛半径约 3.5~4cm, 菌丛与透明圈直径重叠
2	Or-2	64	菌丛外围透明圈、清晰直径 2cm, 菌丛直径 1cm
3	Or-3	64	菌丛外围透明圈清晰, 直径 1.5cm, 菌落直径 0.5cm、中心为淡黄色, 边缘为乳黄色
4	Or-4	64	菌丝体松散连成片
5	L-3	64	透明圈清晰, 直径和菌丛直径约 1.8cm, 中心为深绿色

3.1.2 摇瓶筛选结果: 通过对 60 株菌株的摇瓶筛选, 获得有明显酶活的菌株 10 株, 酶活比较高的菌株有 4 株, 最高的 2 株酶活约为 90U/mL。4 株摇瓶培养结果见表 2。根据测定的酶活的大小, OR-1 和 L-3 暂定为以下研究的出发菌株。

表 2 明显酶活的菌株 4 株摇瓶培养结果

序号	编号	酶活 U/mL	摇瓶培养物外观现象	菌体量
1	Or-1	90	淡黄, 液体浑浊	+++
2	L-3	90	灰绿, 液体浑浊	+++
3	Or-2	30	乳白, 液体浑浊	+++
4	Or-3	26	淡黄, 液体浑浊	+

3.1.3 生淀粉糖化酶判定试验平板培养基的使用根据及结果: 生淀粉糖化酶是否能与生淀粉颗粒表面结合是水解生淀粉的关键。生淀粉糖化酶 GA I 是通过 Cp 区域与生淀粉颗粒结合形成复合体来水解生淀粉的, 而 Cp 区域同样可以与环糊精结合形成复合体^[9], 这是由于 α 、 β 、 γ -环糊精的结构与构成生淀粉的螺旋状直链淀粉的结构相似, 因此, 环糊精的存在会抑制生淀粉糖化酶 GA I 对生淀粉的作用^[10]。试验结果: OR-1 能在不含 β -环糊精培养基上生长, 但在含 β -环糊精培养基上不能生长。L-3 在两种培养基上都能生长。从试验中可以推测: OR-1 对生淀粉作用的酶主要是生淀粉糖化酶 GA I, 并且不具备对环糊精的分解能力, OR-1 的酶系比 L-3 要简单一些。因此, 以下研究主要对象选定为: OR-1 菌株。

3.2 诱变

3.2.1 致死曲线和致死率的确定: 不同种微生物对紫外光的敏感度不同。不同菌株在不同诱变剂剂量下, 其正突变率具有参考价值。试验结果见图 1。从致死率-正突变率图可以看出, OR-1 的最佳正突变率 (50%) 所对应的致死率 64%, 即照射时间为 130s。许多学者推荐采用的致死率 70%~80% 时的正突变率只有 40% 左右。本研究采用的紫外线诱变的致死率为 64%。

3.2.2 紫外线诱变结果: 经过紫外诱变, 共获得 94 株变异株。正突变率为 50%, 其中生淀粉酶活最高的 15 株见图 2。

由于 UV4-3-7 传代过程中酶活有所降低, 故选用传代过程中酶活无变化的 UV2 作为下一步诱变的菌株。经过优化培养基 UV2 的生淀粉酶活可达 200U/mL, RDA% 值为 70%, 酶活力比出发菌株提高 122%。

3.2.3 亚硝基胍诱变结果: 以 UV2 为出发菌株进行亚硝基胍诱变, 分别以致死率 96% 和

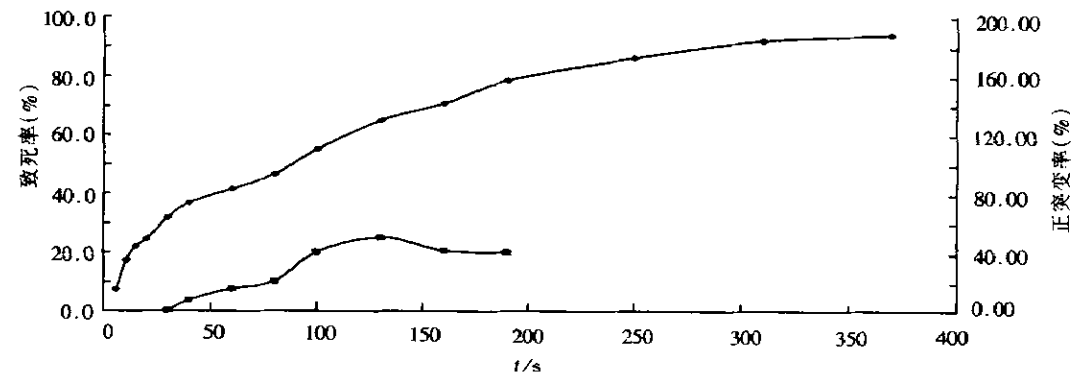


图 1 致死率 - 正突变率曲线

■ 致死率, — 正突变率

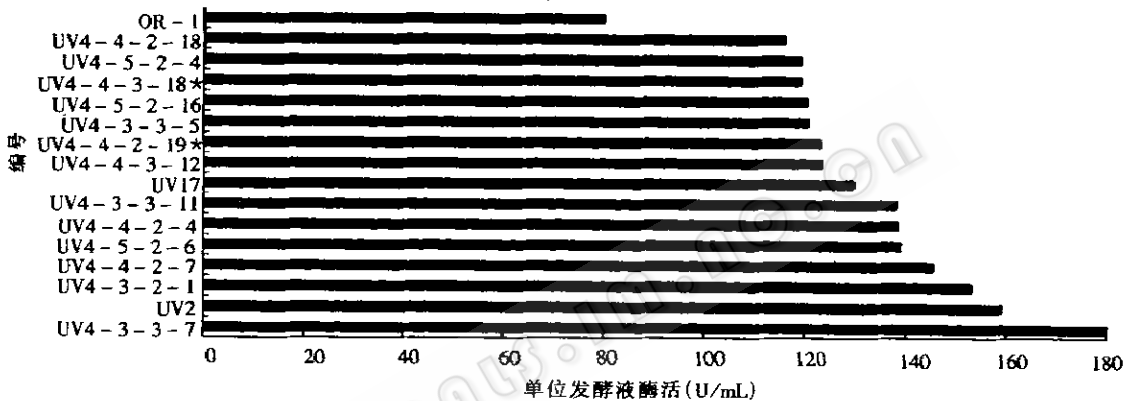


图 2 紫外诱变后生淀粉糖化酶酶活

99.5%进行诱变, 共获得 16 株生淀粉酶活较高的突变菌株 (图 3)。

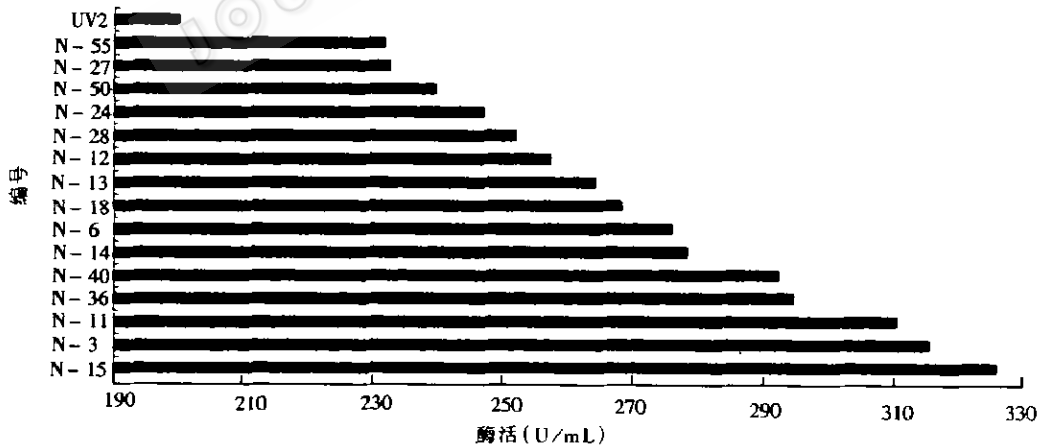


图 3 亚硝基胍诱变后生淀粉糖化酶酶活

试验结果可以看出: UV2 经过亚硝基胍诱变生淀粉糖化酶达到 325U/mL, RDA% 值为 65%, 酶活力比原始出发菌株提高了 266%。比 1999 年报道所应用的根霉 *Rhizopus* sp. MKU40 酶活 120U/mL⁶⁾ 要高得多。

参考文献

- [1] Masatoshi GOTO, Eiji KUWANO, Werasit KANLAYAKRIT, Shinsaku HAYASHIDA, *Biosci Biotech Biochem*, 1995, **59**: 16 ~ 20.
- [2] MASTOSH GOTO, TSUYOSHI SEMIMARU, KENSUKE FURUKAWA, SHINSAKU HAYASHIDA, *APPL ENVIRON MICROBIOL*, 1994, **60**: 3926 ~ 3930.
- [3] Keiji KAINUMA, Hiroshi ISHIGAMI, Shoichi KOBAYASHI, *J Jpn Soc. Starch sci*, 1985, **31**: 136 ~ 141.
- [4] Shinsaku HAYASHIDA, and Perfecto Q. FLOR, *Agric Biol Chem*, 1981, **45**: 2675 ~ 2681.
- [5] Cheorl-Ho Kim, Suk-Tae Kwon, Hajime Taniguchi, Dae-Sil Lee, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, **1122**: 243 ~ 250.
- [6] Hiroshi Morita, Kouhei Mizuno, Mayumi Matsunage, Yusaki Fujio, *J Appl Glycoci*, 1999, **46**: 15 ~ 21.
- [7] Jun-ichi ABE, Susumu HIZUKURI, *J Jpn Soc Starch Sci*, 1988, **35**: p. 43 ~ 47.
- [8] Tomoko TAKAHASHI, Keiko KATO, Yoshio IKEGAMI, Masachika IRIE, *J Biochem*, 1985, **98**: 663-671.
- [9] Kohsai Fukuda, Yuji Teramoto, M. Goto, J. Sakamoto, S. Mitsui, Hayashida, *Biosci Biotech Biochem*, 1992, **56**: 556 ~ 559.
- [10] Mittsuru MONMA, et al, *Agric Biol Chem*, 1989, **53**: 1503 ~ 1508.