

生淀粉酶产生菌的分离和筛选

谢舜珍 严自正 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 从土壤及腐烂的淀粉质样品中分离到 190 株霉菌, 由其中筛选到降解生淀粉能力 (RDA) 较强的 *Rhizopus* sp. 33, *Aspergillus* sp. 6, *Penicillium* sp. 127 等三株菌。测定表明, 其降解生玉米淀粉的 RDA 分别为 14.4%, 11.1%, 20.1%。经纸层析鉴定, 三株菌降解生淀粉的产物均为葡萄糖。

关键词 生淀粉酶; RDA; 根霉; 曲霉; 青霉

生淀粉酶是指对不经过蒸煮糊化的生淀粉颗粒能够表现出强水解活性的酶类。70年代由于两次石油危机,引起各国学者从节能和有效利用天然资源出发,重视对生淀粉酶的研究。研究大致分两个方面:一是探讨对生淀粉不经蒸煮,直接用于酒精发酵的可能性^[1];另一则是从自然界中分离筛选能产生生淀粉酶的微生物,并进而研究生淀粉酶的酶学特性及其产生菌的微生物学特性^[2,3]。能产生生淀粉酶的微生物较多。Ueda^[4,5], Mizokami^[6], Tamiguchi^[7], Kainuma^[8]先后报道了 *Aspergillus awamori*, *Rhizopus* sp., *Streptococcus boris*, *Bacillus circulans*, *Chalara paradoxa* 等都是有降解生淀粉能力的菌种。我们从土壤和腐烂的淀粉质样品中,分离筛选到产生生淀粉酶的根霉、曲霉、青霉各一株。本文报道该三株菌的筛选及分解生淀粉的一些特性。

材料和方法

(一) 试剂

低聚糖(无锡轻工业学院、宜兴米厂提供), 玉米淀粉, 小麦淀粉 (Sigma)。

(二) α -RS (α -amylase-resistant starch) 制备

参照 Bermann^[9] 的方法, 在 200g 小麦淀粉中加入 1000ml 2mmol/L 的 CaCl_2 、1000 IU 的细菌 α -淀粉酶, 在 80℃ 水浴中液化糊化; 冷却后, 再加入 1000 IU 的细菌 α -淀粉酶, 于 55℃ 水浴中保温 3h; 冷却后, 用 3000r/min 离心 15min, 收集沉淀物; 用蒸馏水洗三次, 冷冻干燥后备用。

(三) 培养基

1. 平皿分离培养基(%): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.14, KH_2PO_4 0.2, CaCl_2 0.03, 尿素 0.03, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, α -RS 0.5, 琼脂 1.5, 微量元素溶液 0.1ml, 自然 pH。1kg/cm² 30min 灭菌。微量元素溶液的组成 (g/100ml): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CoCl_2 0.2, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.16, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.14。

2. 三角瓶振荡发酵培养基(%): 黄豆饼粉

3.0, 麸皮 1.0, 大米粉 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 自然 pH。1kg/cm² 30min 灭菌。

3. 试管斜面培养基: 马铃薯琼脂或察氏琼脂斜面。

(四) 菌株分离与培养方法

待分离的样品按常规法涂皿分离, 培养温度为 28—29℃。试管斜面一般培养 7 天, 三角瓶振荡培养 5 天。

(五) 酶活力测定

1. 降解生淀粉 (raw starch) 的活力测定: 于 50ml 三角瓶中加入 2.0ml 2.5% (W/V) 生玉米淀粉悬液, 2.0ml pH 3.5 的 0.2 mol/L Na_2HPO_4 -0.1mol/L 柠檬酸缓冲液, 40℃ 反应器中预热 10min。加 1.0ml 适当稀释的酶液, 在 40℃ 下振荡 (150r/min) 反应 30min, 再加 0.5ml 4% 的 NaOH 溶液终止反应。反应液用 3000r/min 离心 5min, 上层清液用 DNS (3', 5'-二硝基水杨酸) 法测定还原糖量。

2. 降解糊化淀粉 (gelitized starch) 的活力测定: 用糊化淀粉作为酶的作用底物, 测定方法与降解生淀粉活力的测定相同。

酶活力单位定义: 在分析条件下, 1min 释放 1 μ g 的还原糖(以葡萄糖计)的酶量定义为一个活力单位。

(六) RDA (Raw starch digesting-ability) 计算

根据文献^[2]介绍的方法:

$$\text{RDA} \% = \frac{B}{A} \times 100$$

式中: B: 降解生淀粉的活力;

A: 降解糊化淀粉的活力。

(七) 生淀粉酶在生淀粉上的吸附率 AR (Adsorption rate) 的测定

参照 Hayashida^[10] 的方法略加改变。称 1g 生玉米淀粉, 加 2.5ml pH 4 的 0.2 mol/L Na_2HPO_4 -0.1mol/L 柠檬酸缓冲液, 放于 4℃ 下平衡, 加适当稀释的酶液 2.5ml, 于 4℃ 下静置吸附 15min, 立即离心后测定上清液中残留的生淀粉酶活力, 并用下式计算:

$$AR\% = \frac{B-A}{B} \times 100$$

式中: B : 吸附前生淀粉酶活力;

A : 吸附后残留生淀粉酶活力。

(八) 生淀粉酶降解生淀粉的产物鉴定

用纸层析方法鉴定酶解后的产物。展开剂为正丁醇:吡啶:水 (6:4:3); 显色剂为 100ml 4% (W/V) 二苯胺丙酮液、100 ml 4% (W/V) 苯胺的丙酮液与 20 ml 85% 磷酸液的混合液, 80℃ 显色 10min。

结果与讨论

(一) 菌种分离与筛选

从土壤及腐烂的淀粉质样品中, 用 α -RS 为唯一碳源的培养基进行分离, 得到能同化 α -RS 的霉菌 190 株。经三角瓶振荡培养, 测定发酵液降解生淀粉的活力, 结果有 76 株能降解生淀

粉, 占同化菌株的 40%。说明分离方法简便适用。

从有生淀粉酶活力的 76 株菌株中, 选出了降解生淀粉活力较高的根霉、曲霉、青霉各一株, 进行降解生淀粉能力的测定。

(二) 对三株霉菌的 RDA 测定

用三角瓶振荡培养得到的发酵液, 经 3000

表 1 几株霉菌的 RDA

菌株	降解生玉米淀粉的活力单位	降解糊化玉米淀粉的活力单位	RDA (%)
根霉 33	100.8	700.2	14.4
曲霉 6	100.8	909	11.1
青霉 127	93.6	464.4	20.1
德氏根霉 ^[2]	—	—	14
黑曲霉 ^[2]	—	—	4
草酸青霉 ^[2]	—	—	6
黑曲霉 T-21*	—	—	4.8

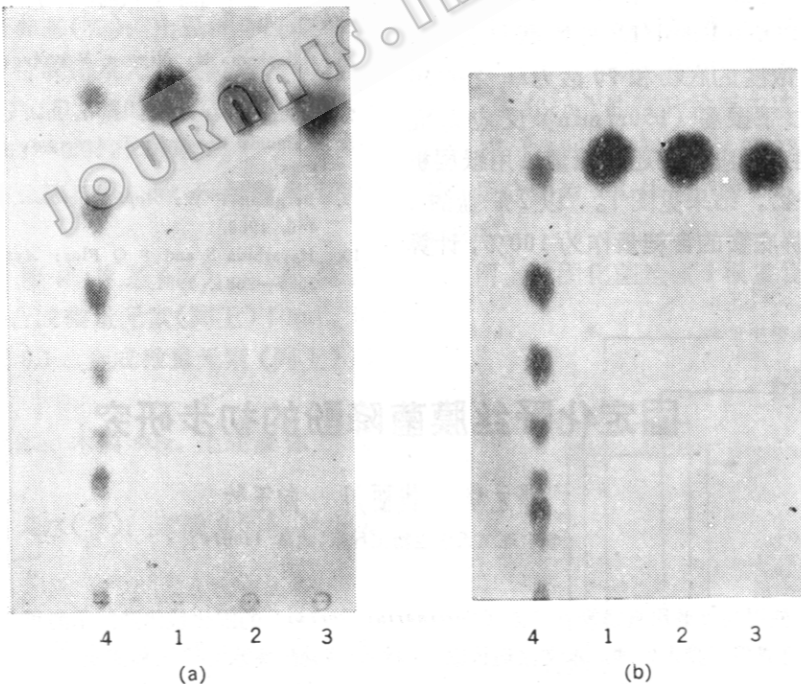


图 1 三株霉菌的粗酶液分解生淀粉的层析图谱

(a) 生玉米淀粉为底物 (b) 生小麦淀粉为底物

1. *Rhizopus*. sp. 33 菌株; 2. *Aspergillus*. sp. 6 菌株; 3. *Penicillium*. sp. 127 菌株; 4. 低聚糖
(自上而下依次为: 葡萄糖, 麦芽糖, 麦芽三糖, 麦芽四糖, 麦芽五糖, 麦芽六糖)

r/min 离心 15min, 上层清液为粗酶液, 以玉米淀粉为底物。由表 1 的结果看, 筛选到的三株霉菌的 RDA 分别为: 根霉 14.4%, 曲霉 11.1%, 青霉 20.1%, 均高于 Sasaki^[2] 和管汉成*等报道的结果。较高的 RDA 对于进一步纯化酶和研究酶学特性是有利的。

(三) 三株霉菌的生淀粉酶在生淀粉上的吸附率

按方法七中的计算公式, 计算吸附率。表 2 的结果说明, 三株霉菌的生淀粉酶均表现有在生淀粉上吸附的特性。

表 2 三株霉菌的粗酶液在生淀粉上的吸附率

菌株	吸附前生淀粉酶活力单位	吸附后生淀粉酶活力单位	AR (%)
根霉 33	63	50	21
曲霉 6	53	40	24
青霉 127	57	42	26

(四) 三株菌的粗酶液对生淀粉的降解

用 5 ml 反应液, 其中含 2 ml pH3.5 的 0.2 mol/L Na_2HPO_4 -0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液、1.0% (W/V) 浓度的底物和 70 活力单位的粗酶液, 在 40℃ 下振荡 (150r/min) 反应 22h。用 DNS 法测定反应液的还原糖量, 用纸层析法鉴定水解产物, 结果见图 1。以 2% 盐酸 1 kg/cm² 1h 水解底物的含糖量作为 100%, 计算水解率。

表 3 三株霉菌的粗酶液对生淀粉的水解

水解率 (%)	底物	菌株	生玉米淀粉	生小麦淀粉
			100	98.9
根霉 33			100	98.9
曲霉 6			100	93.5
青霉 127			100	95.3

由表 3 及图 1 的结果表明, 筛选到的三株霉菌都能水解生玉米淀粉和生小麦淀粉, 层析鉴定产物均为葡萄糖。

我们将进一步研究酶的形成条件和酶的性质。

参 考 文 献

1. 松元信也: 発酵と工業, 43: 832—839, 1985.
2. Sasaki H et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 50: 1661—1664, 1986.
3. Hayashida S et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 53: 143—149, 1989.
4. Ueda S: *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, 21: 284, 1957.
5. Saha B C and S Ueda: *J. Ferment. Technol.*, 61: 67, 1983.
6. Mizokami K: *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 51: 299, 1977.
7. Taniguchi H et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 46: 2107, 1982.
8. Kainuma K et al.: *J. Jpn. Soc. Starch. Sci.*, 32: 136, 1985.
9. Bergman F W: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 443—446, 1988.
10. Hayashida S and P Q Flor: *Agric. Biol. Chem.*, 45: 2675—2681, 1981.