

枯草杆菌 α -淀粉酶高产菌株选育

1. α -淀粉酶高产菌株选育及发酵条件试验

何继春 王凤云 赫春华

(黑龙江省应用微生物研究所, 哈尔滨)

细菌 α -淀粉酶是枯草芽孢杆菌产生的一种酶制剂, 广泛用于纺织、印染及食品等工业部门, 是世界各国酶制剂生产中的一个重要品种, 也是我国目前产量和用量最大的一种酶制剂。

我国 α -淀粉酶生产菌 BF-7658 自 1958 年以来经过多次诱变育种, 有了较大幅度的提高^[3]。我们以目前生产所使用的 209 菌株为出发菌株进行了化学和物理因子的连续处理, 获得一稳定的高产菌株, 本文报道该菌株的诱变谱系及其发酵条件。

材料与方 法

(一) 出发菌株

Bacillus subtilis 209 系 BF-7658 衍生菌株, 由肇东酶制剂厂提供。

(二) 培养基及培养条件

1. 肉汤培养基(%): 牛肉膏 1、蛋白胨 1、NaCl 0.5, pH: 7.0, 1kg/cm² 蒸汽灭菌 30 分钟。

2. 斜面种子培养基: 一般采用肉汤琼脂培养基, 在 37℃ 恒温培养 36—42 小时, 然后放冰箱中 4℃ 保存。

3. 平板分离培养基: 采用淀粉肉汤琼脂培养基(%): 可溶性淀粉 1、牛肉膏 1、NaCl 0.5、蛋白胨 1、琼脂 2、pH: 7.0。

4. 摇瓶种子培养基(%): 玉米粉 3、豆饼粉 4、NH₄Cl 0.15、Na₂HPO₄ · 12 H₂O 0.8、(NH₄)₂SO₄ 0.4、自然 pH。500ml 三角瓶分装 50ml, 在 37℃ 旋转式摇床 (180r/min) 培养 12 小时。

5. 摇瓶发酵培养基(%): 玉米粉 9、豆饼粉 5、Na₂HPO₄ · 12 H₂O 0.8、(NH₄)₂SO₄ 0.4、CaCl₂ 0.2、NH₄Cl 0.15、自然 pH。500ml 三角瓶

分装 25ml, 1kg/cm² 蒸汽灭菌 30 分钟, 接种量 4%, 转旋式摇床 37℃ 培养 48 小时。

(三) 诱变方法

1. 亚硝基胍处理: 将 4mg 亚硝基胍 (MN-NG) 直接加入 40ml 209 菌悬液中 (稀释液为 pH6.0、0.2M 的醋酸缓冲液), 置 37℃ 旋转式摇床振荡处理 30 分钟, 离心 (3000r/min) 30 分钟倾去上清液, 加入 40ml 无菌肉汤, 37℃ 旋转摇床继续培养 4 小时。

2. 紫外线处理: 取 15 ml 孢子悬液放入培养皿 (直径 9cm) 中, 距紫外灯 (15W) 33cm, 照射 8min。

(四) 筛选方法及 α -淀粉酶活力测定法

1. 初筛: α -淀粉酶活力测定主要采用淀粉肉汤琼脂平板碘显色法, 按其培养方式的不同, 可分为点种法^[4]和管碟法两种。管碟法是将发酵液注入在淀粉肉汤琼脂平板上的钢圈内。37℃ 恒温培养 24 小时, 用稀碘液测定透明圈的大小。

2. 复筛: 将初筛得到的正变菌株, 以与初筛相同的方法反复筛选, 选育出稳定高产菌株。

3. 发酵液测定: 以轻工业部部颁方法测定发酵液淀粉酶活性^[5]。

(五) 理化性质测定

1. 氨态氮: 使用 pHs-2 型酸度计, 采用甲醛法测定^[6]。

2. 总糖和还原糖: 采用斐林法测定^[7]。

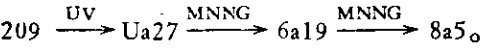
结果和讨论

(一) 诱变处理效果比较

采用对数生长期的菌体细胞, 紫外线和亚硝基胍对细菌的致死率分别为 99.99% 和

98.0%。用紫外线处理后采用点种法和管碟法测定正变率均为50%，而亚硝基胍处理后以管碟法测定正变率为21.1%，点种法则为70%。

(二) 8a5 菌株的诱变谱系



(三) 摇瓶发酵酶活力测定

经诱变得到的 8a5 菌株与出发菌株,经摇瓶发酵初步试验,结果列于表 1。

表 1 8a5 与出发菌株 209 发酵活力的初步比较

菌 株	第一次	第二次	第三次
209	353u/ml	347u/ml	348u/ml
8a5	413u/ml	443u/ml	470u/ml
提高酶活力(%)	17	28	35

从表 1 看出, 8a5 三次发酵活力均比出发菌株活力明显提高, 一般在 17—35%。

(四) 发酵培养基碳氮源配比试验

为了获得 8a5 菌株生长和产酶最适的碳氮比,做了玉米粉和豆饼粉的不同配比试验,结果见表 2。

表 2 不同碳氮源配比试验

玉米粉 (%)	豆饼粉 (%)	发酵终了 pH	酶活性 (u/ml)	平均酶活性 (u/ml)
9	4.5	8.0	496	492
		8.0	500	
		8.0	480	
9	5	8.2	480	448.7
		8.2	430	
		8.2	446	
9	6	8.3	346	347.3
		8.3	356	
		8.2	338	

结果说明在上述条件下 (发酵培养基其它成分不变),以玉米粉 9%和豆饼粉 4.5%组成的发酵培养基产酶活力最高。

众所周知,最适碳氮比往往受其它条件,特别是通气条件的影响。为此,我们进一步以 500ml 三角瓶分装 50ml 发酵培养基。在上述条件下,考查了通气状况对最适碳氮比的影响。其结果列于表 3。

表 3 在相对较低通气量下碳氮源配比试验

玉米粉 (%)	豆饼粉 (%)	发酵终了 pH	酶活 (u/ml)	平均酶活 (u/ml)
9	4	7.5	382	384
		7.5	386	
9	4.5	7.6	386	368
		7.6	350	
9	5	7.5	350	349
		7.5	348	
9	6	7.6	204	207
		7.6	210	

结果表明在相对较低通气量下,仍以碳氮源比值大的发酵培养基 α-淀粉酶活性高。

(五) 无机盐对发酵活力的影响

无机盐对发酵活力的影响 (以下试验除特殊说明者外均采用玉米粉 9%和豆饼粉 4%的配方)。结果表明,氯化铵采用 4 种浓度 (0、0.1、0.15、0.2%),其中最适浓度为 0.1—0.15%;氯化钙最适浓度为 0.2—0.4%;硫酸铵浓度以 0.2—0.4%,磷酸氢二钠浓度以 0.8—1.0% 为宜。

此外,在添加玉米浆对酶活力影响的试验中,未发现促进作用。

(六) pH 对发酵酶活力的影响

用 3N HCl 和 3N NaOH 调节成不同 pH 的发酵培养基 (灭菌后测定),试验结果表明,该菌株的发酵培养基原始 pH 以 6.0 为宜 (表 4)。

表 4 发酵培养基 pH 对发酵酶活力的影响

起始 pH	6.0	6.5
发酵酶活力	504	479
(u/ml)	492	446

(七) 通气量试验

8a5 菌是好气性细菌,其生长发育和产酶量与氧气的供应状况关系密切。在不同生长发育阶段对氧气的的需求也不相同。因此,在不同发酵阶段,调节供应不同的通气量是控制发酵的重要措施。为此,我们将摇瓶发酵分为前期 (0—12 小时);中期 (12—36 小时)和后期 (36—48 小时),改变不同时期的发酵培养基装量来考查通气量的改变对发酵活力的影响,其结果列于表 5。

表 5 通气量试验

试验号	前期/中期/后期 (装量 ml)	发酵终了 pH	酶活 (u/ml)	平均酶活 (u/ml)
1	50/50/50	7.4 7.5	354 378	366
2	50/50/25	7.8 7.8	388 392	390
3	25/50/50	8.0 8.0	454 456	455
4	25/25/50	8.1 8.0	488 456	472
5	25/25/25	8.0 7.7	492 496	492
6	50/25/25	8.3 8.3	368 382	375

试验结果说明: 1. 在良好的通气条件下, 酶活显著提高。2. 在相对较低通气量下, 提高前期或者后期风量, 明显地提高了发酵活力。3. 在良好的通气条件下, 降低后期, 特别是前期通气量对产酶都不利。4. 发酵中期也要求充足的通气条件。

(八) 种龄和接种量试验

考查了四个种龄对发酵活力的影响。

所选择的四个种龄条件下, 以种龄 12 小时为宜, 种龄长, 发酵活力反而有所下降(表 6)。

采用种龄 12 小时, 接种量分别为 4%、8% 和 12% 三种。结果表明随着接种量的加大, 发酵活力也提高。

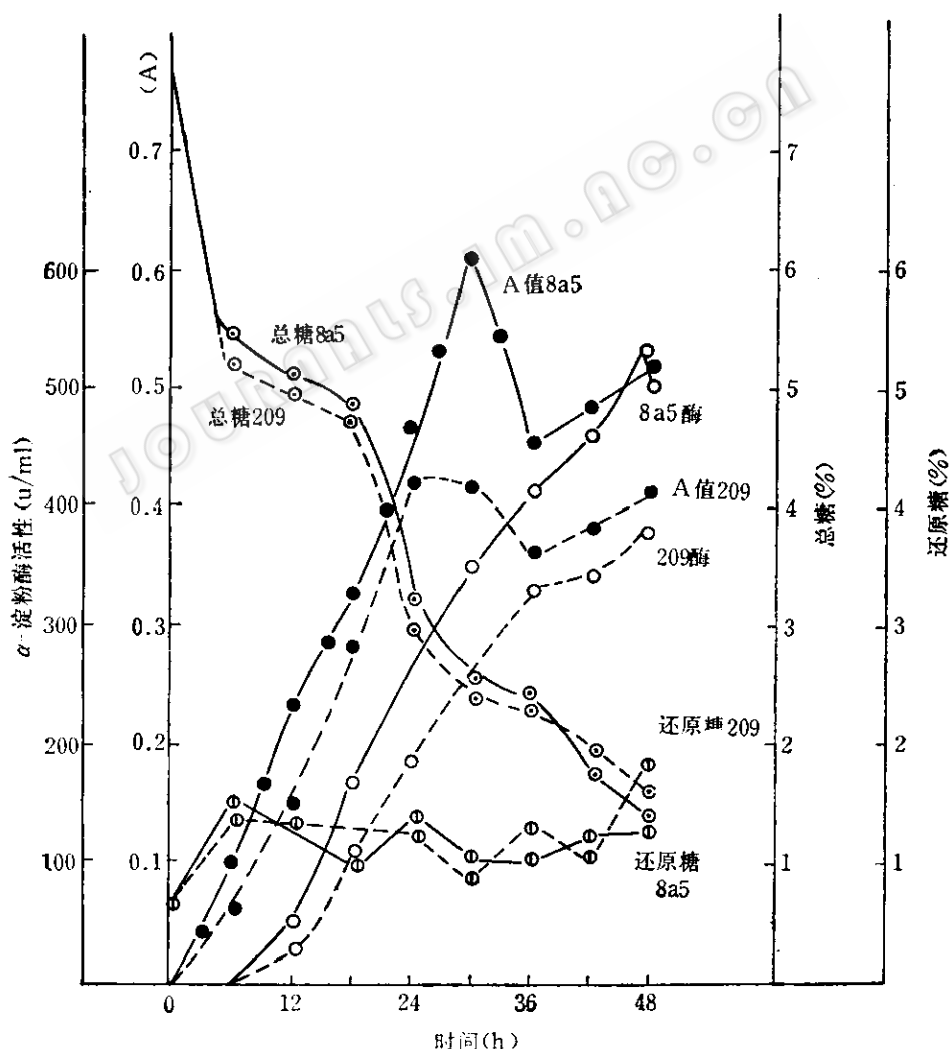


图 1 变异株 8a5 与原始株发酵比较试验

表 6 不同种龄对发酵活力的影响

种龄 (h)	测定时间 (h) 酶活 pH		42		48	
	pH	酶活 (u/ml)	pH	酶活 (u/ml)	pH	酶活 (u/ml)
10	6.5	394	7.6	440	7.9	468
	6.5	396	7.5	434	7.9	456
12	6.8	387	7.7	420	7.7	488
	6.8	392	7.7	462	7.7	462
14	6.6	385	7.8	454	7.9	458
	6.6	377	7.8	454	7.9	458
16	7.6	428	7.6	416	8.1	434
	7.2	442	7.7	426	8.1	462

(九) 发酵周期试验

我们以种龄 12 小时, 接种量 4%、玉米粉 9% 和豆粕粉 4% 的发酵培养基, 观察了诱变菌 8a5 和出发菌株 209 的发酵周期变化, 从图 1 中可看出:

1. 诱变株 8a5 较出发菌株生长快。
2. 诱变株较出发菌株产 α -淀粉酶早、速度快、活性高。

参 考 文 献

- [1] Sekiguchi, J. et al.: *J. Ferment. Technol.* **50**(12), 801, 1972.
- [2] Sasaki, T. et al.: *Biochemical and Biophysical Research communications* **70** (1), 125—131, 1976.
- [3] 无锡酶制剂厂等: 遗传学报, **3**(3), 216—223, 1976.
- [4] 北京大学微生物教学小组: 微生物实验指导, 人民教育出版社, p. 32—33, 1964.
- [5] 中华人民共和国轻工业部颁标准: 工业用液化型糖化型淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶质量标准测定标准 (试行标准), QB746-747-80, 1981.
- [6] 天津轻工业学院等: 工业发酵分析, 轻工业出版社, 31-33, 1979.
- [7] 天津轻工业学院等: 工业发酵分析, 轻工业出版社, 15-17, 1979.