

研究报告

一株产生淀粉酶杆菌 *Bacillus* sp. GEL-09 的筛选、 鉴定及发酵条件优化

段绪果* 周素雅 沈镇炎 蔡昕 陶峥 赵娅如 张钰

(南京林业大学轻工与食品学院 江苏 南京 210037)

摘要:【背景】生淀粉酶可以水解生淀粉颗粒,在酒精发酵、白酒、黄酒和食醋的生料酿造工业中具有广阔的应用前景。【目的】从自然环境中筛选产生淀粉酶的菌,对其发酵条件及酶性能进行考察,为淀粉生料发酵过程提供优良菌种和酶资源。【方法】取木薯田土壤,经过稀释、热处理、富集培养以及木薯淀粉平板筛选培养基初筛,摇瓶复筛得到产高效降解生淀粉酶的菌株;经过菌落形态、细胞染色观察以及 16S rRNA 基因序列比对进行鉴定;对筛选菌株的发酵培养基和发酵条件进行优化,并对酶蛋白进行分离纯化和酶学性质分析。【结果】分离到一株具有较高生淀粉酶水解活力的菌株 GEL-09,经鉴定为芽胞杆菌 *Bacillus* sp. GEL-09;该菌在最优发酵条件下培养 96 h,胞外酶活力达到 430.6 U/mL,是优化前的 2.8 倍;酶学性质分析发现该酶为中温、中性酶,最适温度和 pH 为 50 °C 和 7.0;生淀粉降解能力对比发现,该酶的生淀粉降解能力值为 62.3%,显著高于细菌 α -淀粉酶、生麦芽糖淀粉酶和甘薯 β -淀粉酶对生淀粉的降解能力。【结论】*Bacillus* sp. GEL-09 在生淀粉酶生产方面具有良好的开发应用前景。

关键词: 生淀粉酶, 筛选鉴定, 发酵条件优化, 酶学性质

Screening, identification and fermentation optimization of a newly isolated raw starch digesting amylase-producing strain *Bacillus* sp. GEL-09

DUAN Xu-Guo* ZHOU Su-Ya SHEN Zhen-Yan CAI Xin TAO Zheng
ZHAO Ya-Ru ZHANG Yu

(College of Light Industry and Food Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037, China)

Abstract: [Background] Raw starch digesting amylase can directly degrade raw starch granules below

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31271813); China Postdoctoral Science Foundation (2015M580390); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20140142); Undergraduate Training Program for Innovation and Entrepreneurship of Jiangsu College Students (SPITP) (201710198115X)

*Corresponding author: Tel: 86-25-85428192; E-mail: xgduan@njfu.edu.cn

Received: September 22, 2017; **Accepted:** December 11, 2017; **Published online** (www.cnki.net): December 25, 2017
基金项目: 国家自然科学基金(31271813); 中国博士后科学基金(2015M580390); 江苏省自然科学基金(BK20140142); 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划(SPITP) (201710198115X)

*通信作者: Tel: 86-25-85428192; E-mail: xgduan@njfu.edu.cn

收稿日期: 2017-09-22; **接受日期:** 2017-12-11; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2017-12-25

the gelatinization temperature. Hence, it has been widely used in the production of bioethanol, Chinese spirit, yellow rice wine and vinegar. **[Objective]** This study aims at isolation and identification new raw starch digesting amylase-producing strain, to provide enzyme resource that can be used in the process of fermentation with uncooked materials. **[Methods]** With tapioca starch as sole carbon source, raw starch digesting amylase-high producing strain was isolated from soil of cassava field. Then, it was identified by analysis of colony morphology, photomicrographs, and 16S rRNA gene sequence. Single factor experiment was used to optimize the medium component and fermentation conditions. The enzyme was purified and characterized. **[Results]** Strain GEL-09 was isolated and identified as a species of the genus *Bacillus*, designated as *Bacillus* sp. GEL-09. The raw starch digesting amylase production was optimized by varying culture conditions. On the optimal culture condition, the maximal enzyme production was 430.6 U/mL, which was 2.8 folds of that before optimization. The enzyme showed highest activity at 50 °C and pH 7.0. Its raw starch digestion ability value was 62.3%, which was higher than that of the α -amylase, maltogenic α -amylase or β -amylase. **[Conclusion]** *Bacillus* sp. GEL-09 has great development potential and application prospects in the production of raw starch digesting amylase.

Keywords: Raw starch digesting amylase, Screening and identification, Optimization of fermentation conditions, Enzymatic properties

淀粉是自然界储量最丰富的碳水化合物之一, 不仅是人和动物的主要营养来源, 也是重要的工业原料。工业生产中, 首先需要将淀粉进行酶解变成单糖或寡糖。根据用于酶解的淀粉底物是否经过糊化(蒸煮或高温喷射), 一般可将酶解过程分为常规酶解(对应常规发酵)和生料酶解(对应生料发酵)两类^[1]。

常规酶解过程中, 淀粉首先需要经过高温蒸煮(95–115 °C, 甚至更高温度)进行糊化和液化, 该过程需要消耗大量的能源^[2]。生料酶解(生料发酵)无需淀粉喷射液化工序, 因此可以降低能源消耗、节省投资和运行成本, 在酒精发酵、白酒、黄酒和食醋的生料酿造工业中具有广阔的应用前景^[3–5]。

生淀粉酶可以水解生淀粉颗粒, 是生料酶解(生料发酵)的关键酶制剂, 近年来备受国内外学者的关注。目前, 其主要来源有两类。第一类生淀粉酶来源于真菌, 如 *Aspergillus niger*、*Rhizopus oryzae*、*Aspergillus kawachi* 等^[3–6], 该类生淀粉酶是由真菌 α -淀粉酶和真菌糖化酶复配而成的复合酶, 最适 pH 一般为 4.5–5.0 左右^[7]。第二类生淀粉酶来源于细菌, 如 *Bacillus cirulans*、*Paenibacillus polymyxa*。研究发现, 上述细菌可以产生某些特殊

的淀粉酶, 这类淀粉酶在无其他酶协助的情况下可以水解生淀粉颗粒, 在淀粉颗粒上形成孔洞生成多孔淀粉和还原糖^[8–10]。

本论文从土壤样品中分离筛选到多株对生淀粉具有降解能力的微生物, 对其中产酶较高的菌株 GEL-09 进行了鉴定, 并命名为 *Bacillus* sp. GEL-09。此外, 对其培养基成分、发酵条件进行了优化, 并对该酶的酶学性质进行探究。目前尚无该菌株产生淀粉酶的相关报道, 本研究结果进一步拓宽了细菌生淀粉酶的菌株来源, 可为生淀粉酶的研究和应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

分离菌种的土样采自广西南宁市武鸣区、邕宁区木薯田 10 cm–20 cm 浅层土壤, 共 16 份土壤样品。

1.1.2 主要试剂和仪器

NaCl、KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O、NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄、NaNO₃、酵母粉、蛋白胨、玉米浆、牛肉膏、葡萄糖、麦芽糖、果糖、甘油、蔗糖、可溶性淀粉、琼脂粉等试剂购自国药集团化学试剂有限公司; 木薯淀粉、玉米淀粉、马铃薯淀粉等购自超市; 16S rRNA 基因扩增引物由上海捷瑞

生物技术有限公司合成; PrimeStar DNA 聚合酶、pMD18-T 载体等购自大连 TaKaRa 公司; 基因组抽提试剂盒、胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒等购自北京天根生化科技有限公司; 其他试剂为国产分析纯。

安捷伦 1200 HPLC 色谱仪、安捷伦 1200 系列示差检测器, 安捷伦科技(中国)有限公司; Thermo APS-2 HYPERSIL (4.6 mm×250 mm) 色谱柱, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 琼脂 15.0, pH 7.0, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

富集培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 胰蛋白胨 20.0, 可溶性淀粉 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

平板筛选培养基(g/L): 牛肉膏 0.5, 酵母粉 10.0, KH_2PO_4 20.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 琼脂 15.0, pH 7.0, 0.1 MPa 灭菌 30 min; 其中木薯淀粉需经过 160 °C 干热灭菌 2 h, 在灭菌后的其他组分冷却至 45 °C 时采用无菌操作加入灭菌的培养基中(终浓度 20.0 g/L), 快速振荡混匀倒平板, 冷却凝固后备用。

种子培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, pH 7.0, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

发酵培养基(g/L): 蛋白胨 20.0, K_2HPO_4 2.0, MgSO_4 0.5, 木薯生淀粉 10.0。其中木薯生淀粉先干热灭菌, 再在无菌条件下加入培养基中。发酵条件为 30 °C、200 r/min。

1.3 菌株的分离筛选

称取 2 g 土样放入 250 mL 锥形瓶, 加入 20 mL 无菌生理盐水。置于磁力搅拌器上搅拌约 30 min, 取悬浊液 80 °C 热处理 15 min 杀死营养体细胞, 然后在 37 °C、200 r/min 富集培养 24 h。取富集培养菌液进行梯度稀释(10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6), 取稀释液 50 μL 涂布在以木薯淀粉为唯一碳源的平板筛选培养基上, 30 °C 培养 2 d。观察菌落生长情况, 滴加 0.05% 稀碘液测定菌落周围的透明圈直径(D)和

菌落直径(d), 并计算其比值。选取比值大的菌落作为初筛菌株, 接种到发酵培养基中进行培养, 30 °C、200 r/min 振荡培养 3 d。培养液经过 12 000 r/min 离心 5 min 收集上清液, 测定发酵上清液中的生淀粉酶活力, 从中选取酶活高的菌株划线到斜面培养基中培养并保藏, 用于后续鉴定^[11]。

1.4 16S rRNA 基因序列分析

将酶活力最高的菌株重新接种 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养过夜, 提取该菌的总 DNA 作为 PCR 模板。采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TAGGGTTACCTTGTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 5×PS Buffer 10.0 μL , 基因组 DNA (50 ng/ μL) 1.0 μL , 27F 和 1429R (20.0 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , dNTPs 混合物 (2.5 mmol/L) 4.0 μL , PrimeSTAR[®] HS DNA 聚合酶 (2.5 U/ μL) 0.5 μL , ddH₂O 补足 50.0 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经过纯化、加 A、胶回收后, 连接 pMD18-T 载体并转化大肠杆菌 JM109。挑取转化子培养后提取质粒, 经琼脂糖凝胶电泳检测后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序结果提交 GenBank 数据库进行核苷酸序列同源比对。用 ClustalW 2.0 软件进行多重序列比对分析, 然后用 MEGA 7.0 软件(Neighbor-Joining 法)构建系统发育树^[12]。

1.5 生淀粉酶活力测定方法

准确吸取 2 mL 2% 木薯淀粉悬浮液置于 20 mL 比色管中; 加 2 mL 50 mmol/L pH 7.0 磷酸盐缓冲液摇匀, 于 50 °C 恒温水浴摇床中预热 5 min; 然后加入 1 mL 适当稀释的发酵上清液(稀释后酶活力约为 4–5 U/mL), 立即摇匀并计时; 于 50 °C、160 r/min 反应 1 h, 加入 0.5 mL 4% (质量体积比) NaOH 终止反应, 最后取 1.5 mL 反应液于 5 000 r/min 离心 5 min。取 1 mL 上清液, 立即加入 0.8 mL DNS 溶液摇匀。沸水浴中煮沸 5 min, 立即在冰水中冷却。同样条件下用缓冲液代替酶液作为空白。上

述反应体系加蒸馏水补足体积至 13 mL, 混匀后用 1 cm 比色皿在 540 nm 波长下测吸光度(OD_{540})。

酶活力(U)定义为: 在上述分析测定条件下, 1 min 水解生淀粉产生 1 μ g 还原糖(以麦芽糖计)所需的酶量定义为一个酶活力单位^[13]。

1.6 糊化淀粉酶活力的测定方法

除反应底物替换为糊化的淀粉外, 其余与生淀粉酶活力的测定方法相同。

1.7 生淀粉降解能力(Raw starch digestion ability, RDA)计算

$$RDA=B/A\times 100\%$$

其中, B 为降解生淀粉酶活, A 为降解糊化淀粉酶活。

1.8 生淀粉酶的分离纯化及蛋白含量测定

发酵液于 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 20 min 收集发酵上清液。采用 70%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 进行盐析, 4 $^{\circ}$ C、50 r/min 缓慢搅拌过夜, 然后 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀。沉淀复溶后, 在 pH 7.0 0.02 mol/L Na_2HPO_4 和 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液中透析过夜。样品离心并用 0.4 μ m 膜过滤后用于色谱纯化。利用 AKTA prime 蛋白纯化系统, 以 DEAE 阴离子交换色谱柱为分离柱进行纯化, 280 nm 紫外在线监测收集目的组分, 分部收集含生淀粉酶活性的洗脱液。蛋白含量采用 Bradford 方法测定, 以牛血清蛋白为标样制作标准曲线。

1.9 发酵条件优化

如无特别说明, 以筛选液体发酵培养基作为初始发酵培养基, 250 mL 三角瓶装液量为 50 mL, 接种量为 2.5% (体积比), 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 48 h 后测定酶活力。

分别对碳源种类(木薯淀粉、玉米淀粉、马铃薯淀粉、葡萄糖、麦芽糖、果糖、甘油、蔗糖)及浓度(0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%和 5.0%)进行优化; 对氮源种类 $[\text{NH}_4\text{Cl}]$ 、 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 、 $[\text{NaNO}_3]$ 、酵母粉、蛋白胨、玉米浆、牛肉膏、豆饼粉]及浓度(1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0 %和 6.0%)进行

优化; 初始 pH (5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 和 8.5)^[14]和发酵温度(20、25、30、33、35、37 和 40 $^{\circ}$ C)等条件进行优化^[15]。前一个优化结果用于后续优化实验。所有实验均做 3 个平行。

在上述优化的基础上每隔 12 h 取样, 总发酵时间 120 h, 对所取样品分别测定菌体浓度(OD_{600})和发酵上清液中的生淀粉酶活力, 并绘制菌株生长曲线和产酶曲线。

1.10 生淀粉酶酶学性质分析

1.10.1 最适 pH 及 pH 稳定性

配制不同 pH 值(5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)的缓冲液代替 1.5 酶活力测定方法中的 pH 7.0 磷酸盐缓冲液, 分别在 50 $^{\circ}$ C 下测定酶活力, 考察酶的最适作用 pH。所用的缓冲体系分别为醋酸缓冲体系(pH 3.0–5.0)和磷酸盐缓冲体系(pH 5.0–8.0)。以最高酶活为 100%, 其余酶活为相对酶活^[16]。

1.10.2 最适温度及温度稳定性

以木薯生淀粉为底物, 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)在不同温度下(40、45、50、55 和 60 $^{\circ}$ C)测定生淀粉酶活力以确定最适反应温度。以最高酶活为 100%, 其余酶活为相对酶活^[17]。

1.10.3 不同来源淀粉酶对生淀粉水解能力对比

考察菌株 GEL-09 所产酶与其他来源淀粉水解酶对生淀粉水解能力的异同。其他几种淀粉水解酶为 α -淀粉酶(来源于地衣芽胞杆菌 *Bacillus licheniformis*)、生麦芽糖淀粉酶(来源于嗜热脂肪芽胞杆菌 *Bacillus stearothermophilus*)和 β -淀粉酶(来源于甘薯 *Dioscorea esculenta*)。根据 1.5 和 1.6 测定几种酶水解生淀粉和糊化淀粉底物的酶活力, 计算其生淀粉降解能力。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选及鉴定

2.1.1 菌株筛选

初筛得到水解圈较明显的 58 个菌落, 点种到筛选平板, 经碘液染色挑取其中 7 个透明圈明显的菌落。接种到液体发酵培养基中, 培养 3 d 后离心收集上清液, 测定生淀粉酶活力, 从中筛选出酶

活力最高(153.3 U/mL)的菌株,命名为 GEL-09。进一步测定其 RDA 值,结果显示粗酶的 RDA 值为 36.7%。

2.1.2 菌株鉴定

平板筛选培养基上的菌落边缘光滑,凸起,呈乳白色,表面湿润,呈白蜡状,易挑起,不起皱,培养时间长菌落会带有黄色。显微观察菌体为长杆状,可见椭圆形芽胞,革兰氏染色呈阳性(图 1)。

以该菌株基因组为模板,通过 PCR 获得其 16S

rRNA 基因片段,测序后提交 NCBI 数据库进行 BLAST 同源比对,分析发现该菌株与阿氏芽胞杆菌 *Bacillus aryabhattai* B8W22 的 16S rRNA 基因一致性为 99.8%。如图 2 所示,基于 16S rRNA 基因序列所构建的系统发育进化树也呈现出稳定的亲缘关系。结合菌株的形态特征、16S rRNA 基因序列比对及系统发育树分析,表明该菌株属于芽胞杆菌目(Bacillales)芽胞杆菌科(Bacillaceae)芽胞杆菌属(*Bacillus*)。将菌株 GEL-09 初步鉴定为芽胞杆菌 *Bacillus* sp. GEL-09 (GenBank 登录号为 MG654640)。

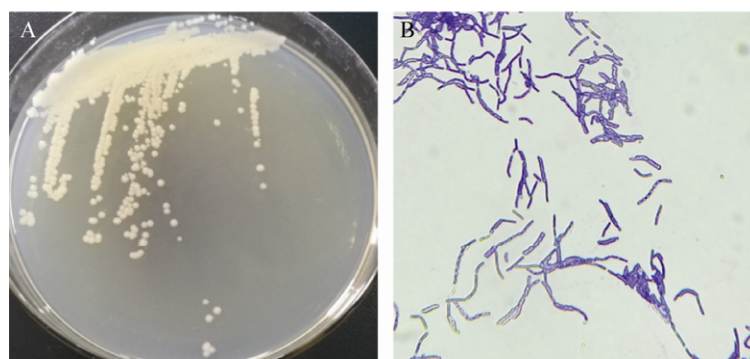


图 1 菌株 GEL-09 菌落形态(A)和细胞显微镜检(B)图片

Figure 1 Colony morphology (A) and photomicrograph (B) of strain GEL-09

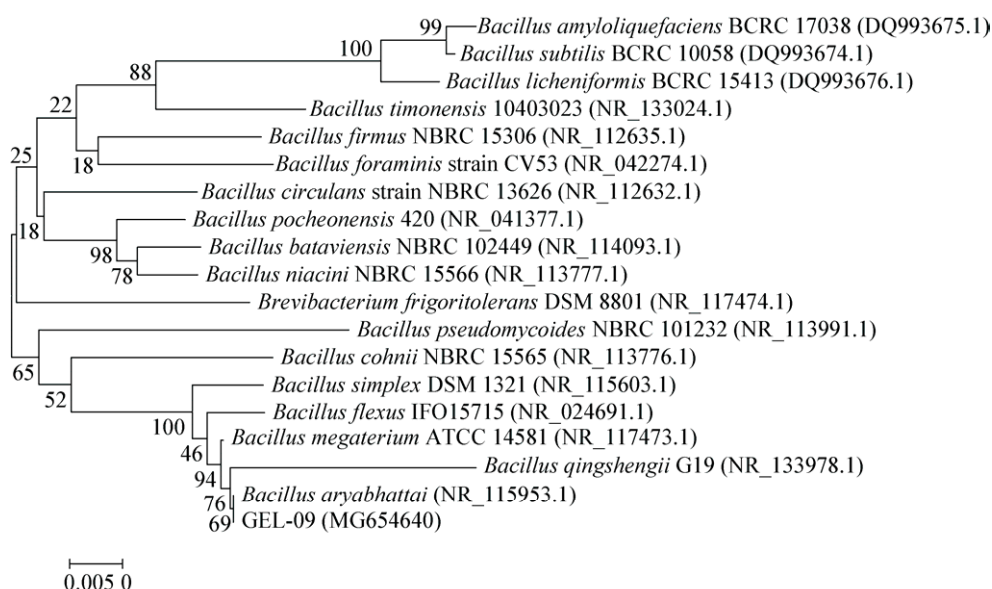


图 2 菌株 GEL-09 与其他相近菌株的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育进化树

Figure 2 Phylogenetic tree based on a comparison of the 16S rRNA gene sequences of strain GEL-09 and related strains

注: 步长值通过 1 000 次重复运算在各分支点显示出来; 标尺=0.005 K_{nuc} 。

Note: Bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications) are shown at branch points; Bar, 0.005 nucleotide substitution rate (K_{nuc}) units.

2.2 发酵条件优化

2.2.1 碳源对菌体生长及产酶的影响

碳源优化结果如图 3A 所示, 不同种类淀粉为碳源时菌体浓度较低, 但是产酶活力较高; 单糖、二糖、甘油为碳源时, 虽然产酶效果较差, 但是菌体生长好于多糖(淀粉)为碳源时的生长情况。以葡萄糖为碳源时菌体浓度最高, 但是产酶水平最低。麦芽糖为碳源时酶活力高于单糖(葡萄糖、果糖); 玉米淀粉为碳源时产酶水平最高, 是葡萄糖为碳源时酶活力的 3.3 倍。不同碳源对菌株 GEL-09 的生淀粉酶产量影响规律为: 多糖>寡糖>单糖。可见, 聚合度较高的糖更有利于诱导生淀粉酶的生成。

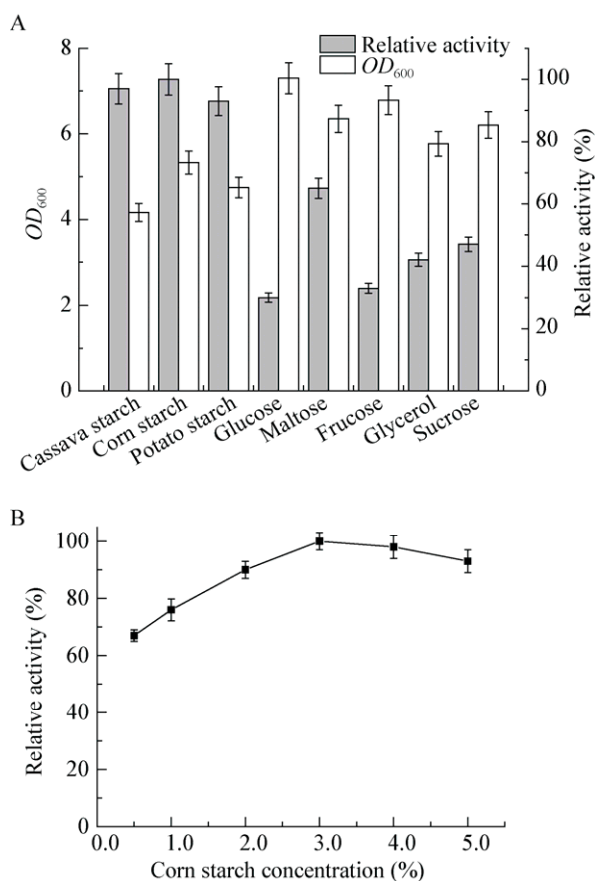


图 3 不同碳源对 GEL-09 生长、产酶的影响(A)及玉米淀粉浓度对产酶的影响(B)

Figure 3 Comparison of strain GEL-09 growth and enzyme production using different carbon sources (A); effects of corn starch concentration on enzyme production (B)

在不同碳源优化的基础上, 进一步研究了不同浓度玉米淀粉对菌株 GEL-09 产酶的影响。如图 3B 所示, 在低浓度时(0.5%–3.0%), 随着玉米淀粉浓度的增加生淀粉酶活力逐步增加; 当浓度达到 3.0%时, 生淀粉酶活力达到最高。进一步增加玉米淀粉浓度菌株的产酶量缓慢降低, 这可能是因为过高浓度的玉米淀粉导致培养基黏度增大, 传质效率降低, 尤其是氧气的传递, 因而不利于生淀粉酶生成。因此, 玉米淀粉的最佳浓度为 3.0%。

2.2.2 氮源对菌体生长及产酶的影响

分别选择不同种类的无机氮源 [NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_3] 和有机氮源(酵母粉、蛋白胨、玉米浆、牛肉膏、豆粕粉)用于菌株 GEL-09 的发酵产酶。如图 4A 所示, 无机氮源为唯一氮源时, 菌体生长及产酶水平明显低于用有机氮源时的结果。以牛肉膏为氮源时, 菌体浓度和酶活力分别是以 NaNO_3 为氮源时的 8.2 倍和 7.1 倍。其原因可能是有机氮源营养更加丰富, 更加有利于菌株 GEL-09 的生长和产酶。

此外, 当分别以酵母粉和牛肉膏为唯一氮源时最有利于菌体生长和产酶。因此, 将二者以 1:1 的比例混合成为复合氮源, 用于后续氮源浓度优化实验。如图 4B 所示, 与碳源浓度优化时的规律类似, 在低浓度时(1.0%–4.0%)随着复合氮源浓度的增加产酶水平逐渐增加; 当浓度超过 4.0%时, 生淀粉酶活力逐渐下降。因此, 复合氮源的最佳浓度为 4.0%。

2.2.3 初始 pH 对菌体生长及产酶的影响

以成分优化后培养基为发酵培养基, 培养基初始 pH 分别调整为 5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 和 8.5, 在 30 °C、200 r/min 振荡培养 48 h, 取样测定菌体浓度和酶活力。如图 5 所示, 菌体浓度和产酶水平与培养基初始 pH 之间的关系基本一致。在 pH 低于 7.0 时, 随着 pH 的升高菌体浓度和酶活力逐渐增加; 当 pH 高于 7.0 时, 随着 pH 的增大菌体浓度和酶活力都呈下降趋势, 其中酶活力下降幅度

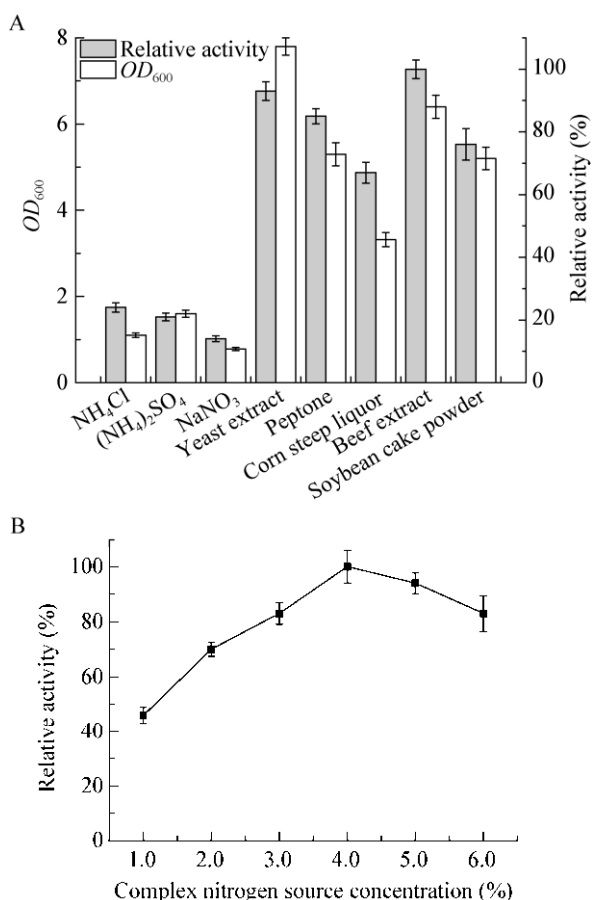


图4 氮源种类(A)及复合氮源浓度(B)对 GEL-09 生长及产酶的影响

Figure 4 Comparison of strain GEL-09 growth and enzyme production using different nitrogen sources (A); effects of complex nitrogen source concentration on enzyme production (B)

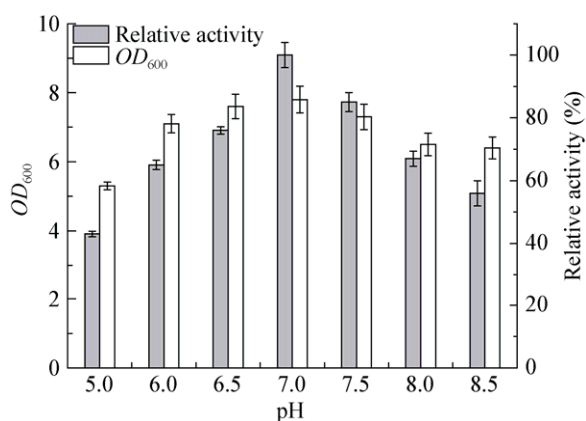


图5 培养基初始 pH 对 GEL-09 生长及产酶的影响

Figure 5 Effect of initial pH on strain GEL-09 growth and enzyme production

更大。培养基初始 pH 为 7.0 时酶活力达到最高值, 因此菌株 GEL-09 的发酵培养基的最适初始 pH 值为 7.0。

2.2.4 发酵温度对菌体生长及产酶的影响

将菌株 GEL-09 接种于优化后的发酵培养基中, 分别置于不同的发酵温度(20、25、30、33、35、37 和 40 °C)条件下振荡培养 48 h, 取样测定菌体浓度和酶活力。如图 6 所示, 在温度低于 30 °C 时随着发酵温度的升高菌体浓度逐渐增加; 当发酵温度在 30–37 °C 时菌体浓度变化不大; 当发酵温度提高到 40 °C 时菌体浓度迅速下降。发酵温度对生淀粉酶产量的影响规律与对菌体生长的影响不同, 在发酵温度低于 35 °C 时随着温度的升高酶活力逐步增大; 当发酵温度达到 37 °C 时酶活力有所降低; 当发酵温度达到 40 °C 时酶活力迅速降低到最高酶活力的 26%。因此, 菌株 GEL-09 的最佳发酵温度为 35 °C。

2.2.5 菌株 GEL-09 的生长及产酶曲线

在最佳培养基和培养条件下, 延长发酵时间到 120 h, 中间每隔 12 h 取样测定菌株 GEL-09 的生长及产酶情况, 并绘制相应发酵曲线。如图 7 所示, 0–12 h 为菌株 GEL-09 的生长延滞期, 此后进入对数生长期; 在发酵时间为 72 h 以后进入稳定期; 96 h 以后进入衰亡期。酶活力增长趋势与菌

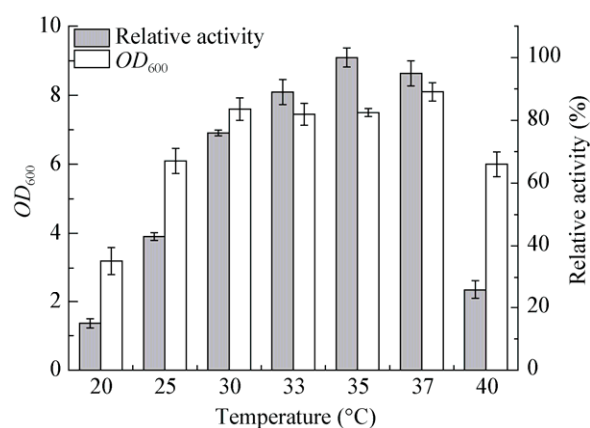


图6 发酵温度对 GEL-09 生长及产酶的影响

Figure 6 Effect of fermentation temperature on strain GEL-09 growth and enzyme production

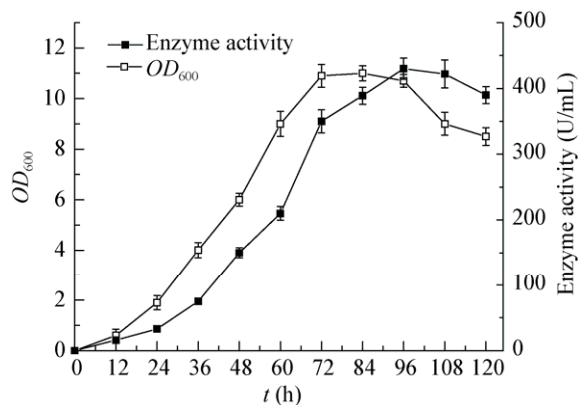


图7 菌株 GEL-09 生长及产酶曲线

Figure 7 Growth and raw starch-digesting amylase-producing curve of GEL-09

体生长总体一致并略有滞后, 酶活力在 96 h 达到最高, 为 430.6 U/mL。依据酶发酵动力学曲线判断菌株 GEL-09 所产的生淀粉酶属于生长半耦联型。

2.3 生淀粉酶酶学性质分析

2.3.1 生淀粉酶最适 pH

最适 pH 测定结果如图 8 所示, 生淀粉酶的最适 pH 为 7.0; 在 pH 7.0–7.5 酶活力保留 90.7% 以上; 在 pH 6.5–8.0 酶活力保留 65.2% 以上; 在 pH 6.0 相对酶活力为 55.1%。当 pH 低于 5.5 时相对酶活力仅有不到 42.4%。由此可见, 菌株 GEL-09 所产生淀粉酶为 pH 中性酶。

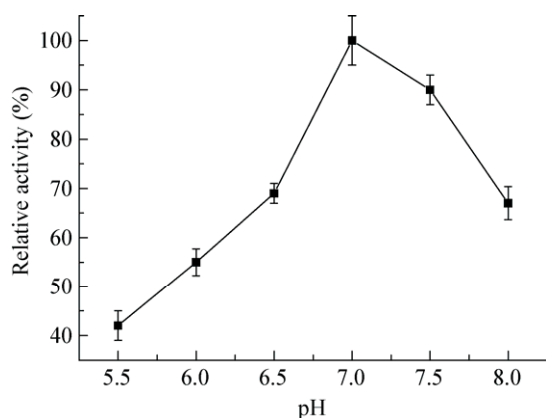


图8 生淀粉酶的最适 pH

Figure 8 Optimal pH of raw starch digesting amylase

2.3.2 生淀粉酶最适反应温度

为了测定该酶的最适反应温度, 以生淀粉为底物在不同温度条件下(40–60 °C)测定该酶的相对酶活力。如图 9 所示, 生淀粉酶的最适温度为 50 °C, 当温度低于或高于 50 °C 时活力下降明显; 在 40、55 和 60 °C 分别保留 38.4%、59.6% 和 52.0% 的酶活力。因此, 该生淀粉酶为中温酶。

2.3.3 不同来源淀粉酶利用生淀粉能力对比

以 4 mL 1% 木薯淀粉悬浮液或糊化木薯淀粉溶液为底物, 在 pH 7.0、50 °C 条件下分别与 1 mL 稀释的 GEL-09 生淀粉酶(稀释后酶活力约为 4–5 U/mL)、 α -淀粉酶、生麦芽糖淀粉酶和 β -淀粉酶混合, 在恒温水浴摇床中振荡反应, 分别测定不同酶的 RDA 值。如表 1 所示, 其他 3 种淀粉水解酶中的甘薯 β -淀粉酶对生淀粉水解能力最低, 地衣芽胞杆菌 α -淀粉酶次之, 嗜热脂肪芽胞杆菌

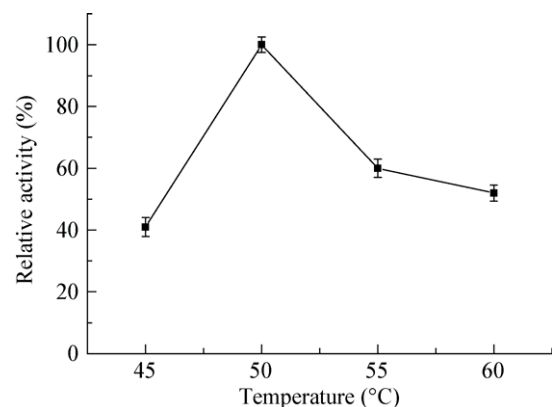


图9 生淀粉酶的最适温度

Figure 9 Optimal temperature of raw starch digesting amylase

表1 不同来源淀粉酶对生淀粉降解能力对比

Table 1 Raw starch digestion ability of various starch hydrolyzing amylase

淀粉水解酶 Starch hydrolyzing amylase	生淀粉降解能力 Raw starch digestion ability (%)
Raw starch hydrolyzing amylase (GEL-09)	62.30
β -Amylase (<i>Dioscorea esculenta</i>)	0.58
α -Amylase (<i>Bacillus licheniformis</i>)	1.28
Maltogenic α -amylase (<i>Bacillus stearothermophilus</i>)	6.76

生麦芽糖淀粉酶的 RDA 值为 6.76%，具有一定的生淀粉水解能力。GEL-09 生淀粉酶 RDA 值为 62.3%，分别是其他 3 种淀粉水解酶 RDA 值的 107.4、48.7 和 9.2 倍。可见，本研究中的植物来源 β -淀粉酶基本没有水解能力；微生物来源淀粉水解酶对生淀粉具有一定的水解能力，但是不同来源微生物淀粉水解酶之间的生淀粉水解能力具有明显差别。

3 讨论

常见的工业发酵细菌菌株有乳酸菌、芽胞杆菌、谷氨酸棒杆菌、大肠杆菌等，它们的最适发酵 pH 一般为中性，在 pH 7.0 左右^[4]。然而，已有的生淀粉酶主要是来自真菌的酸性酶，最适 pH 一般为 4.5–5.0 左右^[6–7]，与细菌最适发酵 pH 相差较大。如将细菌与来自真菌的酸性生淀粉酶同步糖化发酵，需要在 pH 控制上做出调整，控制在 pH 5.5–6.0。该 pH 不是任何一方的最佳条件，因此会造成酶活力损失或者菌种活力不够，导致酶解或发酵效果不佳。筛选高活性中性生淀粉酶可能是克服现有技术不足的有效途径之一。

本研究筛选到一株产中温、中性生淀粉酶的芽胞杆菌 GEL-09，该菌株与阿氏芽胞杆菌 *Bacillus aryabhattai* B8W22 的 16S rRNA 基因一致性为 99.8%。据报道阿氏芽胞杆菌在不同自然环境中都有分布，如海水、污泥、土壤、植物根系等，被广泛用于植物生长促进剂和有机磷降解^[18]。虽然有少量关于该菌产植酸酶和天门冬酰胺酶的报道^[19]，但至今尚未有关于阿氏芽胞杆菌产生淀粉酶的报道，因此，我们对分离到的产生淀粉酶阿氏芽胞杆菌发酵条件以及所产酶的性质进行了初步的研究。

培养基摇瓶优化结果显示，虽然单糖更有利于菌株 GEL-09 的生长，但是对产酶却不利，当选用 3.0% 的玉米淀粉作为碳源时产酶水平最高。由氮源优化结果可知，有机氮源更有利于菌体生长及产酶，其中酵母粉有利于菌体生长，牛肉膏为唯一氮源时产酶水平最好。将上述两种有机氮源

进行复配得到混合氮源，优化了复合氮源的最佳浓度。罗军侠等发现 2.0% 的玉米粉和 1.5% 的蛋白胨更有利于曲霉产生酸性生淀粉酶^[7]。夏媛媛等筛选到的一株 *Paenibacillus*，菌株的最佳碳源为玉米粉，最佳复合氮源为酵母粉:玉米浆(2:1)，氮源最佳浓度为 1%^[11]。周新尚等对筛选到的一株假单胞菌产酶条件进行了优化，采用的碳源为玉米淀粉，氮源为蛋白胨和牛肉膏^[14]。可见，不同种类生淀粉酶产生菌株虽然种类差别较大(有真菌也有细菌)，但是最佳碳源比较接近，以玉米粉或玉米淀粉为主；而氮源种类相对较多，有酵母粉、牛肉膏、玉米浆、蛋白胨等，但也都为有机氮源。此外，对比不同报道的培养条件发现，初始 pH 一般为 7.0，培养温度以 30–37 °C 为主^[11,13,16]。然而，周新尚等研究发现分离自海洋淤泥的假单胞菌 ZXS-1 最适发酵温度为 25 °C^[14]，明显区别于其他菌株。

虽然产生淀粉酶细菌最适发酵温度和 pH 分别为 30–37 °C 和 pH 7.0 左右为佳，但是不同微生物产酶的最适温度和最适 pH 差别较大。本研究中获得生淀粉酶为中温、中性酶，最适温度为 50 °C，最适 pH 为 7.0。夏媛媛等^[11]报道的 *Paenibacillus* 菌株所产酶最适温度和 pH 分别为 40 °C 和 4.2；曾丽娟等^[13]筛选得到的 *Paenibacillus* sp. 菌株的最佳温度为 50 °C，最适 pH 为 5.6。虽然 2 株菌都属于 *Paenibacillus* 属，但是二者的酶学性质在最适温度和 pH 都有明显差异，可见即使分类比较接近的菌株所产的生淀粉酶也存在明显差异。此外，生淀粉降解能力测试发现，本研究中生淀粉酶的 RDA 值略高于曾丽娟等^[13]报道 *Paenibacillus* 菌株所产酶的 RDA 值。

4 结论

本研究从木薯田浅层土壤样品中筛选出一株生淀粉酶活力较高的菌株 GEL-09。通过形态观察、16S rRNA 基因序列比对分析，该菌被鉴定为芽胞杆菌 *Bacillus* sp. GEL-09。对其培养基和发酵条件

进行了优化, 优化后其生淀粉酶活力在 96 h 达到最高(430.6 U/mL), 是优化前的 2.8 倍; 根据酶发酵动力学曲线判断该菌株生淀粉酶发酵属于生长半耦联型。该酶的最适温度为 50 °C, 最适 pH 为 7.0, 说明该酶为中温、中性酶。生淀粉降解能力测试发现, 该酶的 RDA 值明显高于甘薯 β -淀粉酶、地衣芽胞杆菌 α -淀粉酶和嗜热脂肪芽胞杆菌生麦芽糖淀粉酶的 RDA 值, 进一步证明该酶具有较好的生淀粉水解能力。

REFERENCES

- [1] Shivlata L, Satyanarayana T. Characteristics of raw starch-digesting α -amylase of *Streptomyces badius* DB-1 with transglycosylation activity and its applications[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017, 181(4): 1283-1303
- [2] Wang CX, Du FG, Li GD. The summarization on alcohol fermentation production of raw starch[J]. Cereals & Oils, 2008(6): 11-13 (in Chinese)
王晨霞, 杜风光, 李根德. 淀粉原料生料发酵法生产酒精概述[J]. 粮食与油脂, 2008(6): 11-13
- [3] Nwagu TN, Okolo BN, Aoyagi H. Stabilization of a raw starch digesting amylase from *Aspergillus carbonarius* via immobilization on activated and non-activated agarose gel[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(1): 335-345
- [4] Okano K, Zhang Q, Shinkawa S, et al. Efficient production of optically pure D-lactic acid from raw corn starch by using a genetically modified L-lactate dehydrogenase gene-deficient and α -amylase-secreting *Lactobacillus plantarum* strain[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(2): 462-467
- [5] Tateno T, Fukuda H, Kondo A. Direct production of L-lysine from raw corn starch by *Corynebacterium glutamicum* secreting *Streptococcus bovis* α -amylase using *cspB* promoter and signal sequence[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 77(3): 533-541
- [6] Tawil G, Viksø-Nielsen A, Rolland-Sabaté A, et al. In depth study of a new highly efficient raw starch hydrolyzing α -amylase from *Rhizomucor* sp.[J]. Biomacromolecules, 2011, 12(1): 34-42
- [7] Luo JX, Li JH, Lu J, et al. Production of acidproof raw starch-digesting glucoamylase from a newly isolated strain of *Aspergillus fumigatus* MS-09[J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(5): 151-154 (in Chinese)
罗军侠, 李江华, 陆健, 等. 耐酸生淀粉糖化酶的菌种筛选、酶的性质及发酵条件[J]. 食品工业科技, 2008, 29(5): 151-154
- [8] Božić N, Slavić MŠ, Gavrilović A, et al. Production of raw-starch-digesting α -amylase isoform from *Bacillus* sp. under solid-state fermentation and biochemical characterization[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2014, 37(7): 1353-1360
- [9] Gangadharan D, Nampoothiri KM, Sivaramakrishnan S, et al. Biochemical characterization of raw-starch-digesting alpha amylase purified from *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 158(3): 653-662
- [10] Kalpana BJ, Pandian SK. Halotolerant, acid-alkali stable, chelator resistant and raw starch digesting α -amylase from a marine bacterium *Bacillus subtilis* S8-18[J]. Journal of Basic Microbiology, 2014, 54(8): 802-811
- [11] Xia YY, Zhao H, Dong XY, et al. Isolation of amylase-producing strain and its enzymatic properties[J]. China Brewing, 2012, 31(1): 154-158 (in Chinese)
夏媛媛, 赵华, 董晓宇, 等. 生淀粉酶产生菌的筛选和研究[J]. 中国酿造, 2012, 31(1): 154-158
- [12] Song XC, Zhang ZY, Liu Y, et al. Isolation and identification of microorganisms causing mildew of fiberboard in Nanning, Guangxi[J]. Journal of Forestry Engineering, 2016, 1(1): 78-82 (in Chinese)
宋贤冲, 张照远, 刘媛, 等. 广西南宁纤维板霉变微生物的分离及鉴定[J]. 林业工程学报, 2016, 1(1): 78-82
- [13] Zeng LJ, Yang J, Chen Y, et al. Isolation of raw starch-digesting amylase producing strain *Paenibacillus* sp. and its purification and characterization[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2010, 8(4): 62-66 (in Chinese)
曾丽娟, 杨健, 陈英, 等. 生淀粉酶生产菌株 *Paenibacillus* sp. 的筛选和酶的纯化及酶学性质[J]. 生物加工过程, 2010, 8(4): 62-66
- [14] Zhou XS, Pang F, Dou SH, et al. Optimization of fermentation conditions of marine raw starch amylase strains by response surface method[J]. China Brewing, 2017, 36(7): 80-84 (in Chinese)
周新尚, 逢飞, 窦少华, 等. 海洋生淀粉酶菌株发酵条件响应面优化[J]. 中国酿造, 2017, 36(7): 80-84
- [15] Lan P, Ma ZY, Ye LQ, et al. Microbial degradation of grape pomace tannins[J]. Journal of Forestry Engineering, 2017, 2(5): 58-63 (in Chinese)
兰平, 马泽宇, 叶柳青, 等. 微生物降解葡萄皮单宁研究[J]. 林业工程学报, 2017, 2(5): 58-63
- [16] Tan HG, Li J. Study on isolation of bacterial strains of raw starch glucoamylase and its enzymatic properties[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2012, 20(5): 56-58 (in Chinese)
谭海刚, 李静. 生淀粉酶细菌菌株的筛选及其酶学性质研究[J]. 粮油食品科技, 2012, 20(5): 56-58
- [17] Zhang HY, Zhang YY, Jiang KK, et al. Production of feruloyl esterase by solid-state fermentation of *Aspergillus niger* and preparation of ferulic acid from wheat bran by enzymatic hydrolysis[J]. Journal of Forestry Engineering, 2016, 1(5): 52-57 (in Chinese)
赵浩源, 张迎亚, 蒋侃侃, 等. 黑曲霉固态发酵产阿魏酸酯酶及酶解麸皮制备阿魏酸[J]. 林业工程学报, 2016, 1(5): 52-57
- [18] Park YG, Mun BG, Kang SM, et al. *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173203
- [19] Singh Y, Gundampati RK, Jagannadham MV, et al. Extracellular L-Asparaginase from a protease-deficient *Bacillus aryabhattai* ITBH02: purification, biochemical characterization, and evaluation of antineoplastic activity *in vitro*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 171(7): 1759-1774