

文章编号: 1000-5862(2019)05-0496-05

淀粉酶高产菌的筛选、鉴定、诱变及生产优化

胡 荣, 方琳琳, 付 朦, 黄玉珠, 刘凤先, 张佳丽, 赵喜华*

(江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022)

摘要: 从多种土壤中筛选高产淀粉酶菌, 进而进行诱变育种和产酶条件优化, 以便提高淀粉酶产量和丰富产淀粉酶菌株资源。经初筛和复筛, 用耦合碘比色法观察菌落直径和水解圈比值的大小, 获得了淀粉酶活为 $140 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 SG3 菌株。利用形态学观察、16S rDNA 序列和 BLAST 在线软件进行分析, 将 SG3 菌株鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。经紫外诱变, 获得酶活为 $234 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的正突变体 UV-5, 与 SG3 菌株相比, 酶活提高了 1.6 倍。通过单因素和正交设计实验, 获得 40°C 、pH 值为 6.48 h、2.5% 玉米粉、0.5% 酵母膏和转速 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的最优产酶条件, 发酵上清液酶活为 $264 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 与 SG3 菌株相比, 酶活提高了 1.9 倍。

关键词: 筛选; 高产淀粉酶菌; 鉴定; 紫外诱变; 最优产酶条件

中图分类号: TQ 925.1 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2019.05.10

0 引言

淀粉酶全称为 1,4- α -D-葡聚糖水解酶, 能催化淀粉及糖原的水解, 可以生成葡萄糖、麦芽糖及含有 α -1,6-糖苷键支链的糊精^[1]。淀粉酶种类繁多, 在食品加工、布料退浆、酿酒制造、养殖等领域得到了广泛的应用^[2-5]。近年来, 我国淀粉酶产业虽然有长足发展, 但是与国外相比, 我国淀粉酶产业仍然存在种类和产量相对偏少的尴尬, 在国际舞台上很难占有一席之地^[5-7]。因此, 为了适应各行业对淀粉酶的巨大需求, 需要扩大淀粉酶菌株资源并提高淀粉酶产量。本文从江西师范大学 12 个不同地点土壤中取样, 进行了高产淀粉酶菌株的筛选、鉴定、紫外诱变以及培养基优化的工作。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料来源与处理 采自江西师范大学 5 大食堂洗米点、米粉店、包子店等 12 处富含淀粉的土壤样品共 12 份, 固体样品每份称取 10 g, 装入含

100 mL 无菌水的摇瓶中作为原液, 当天处理完毕并进行相关实验。

1.1.2 试剂 可溶性淀粉购自西陇科学股份有限公司; 细菌总 DNA 提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; Lugol 碘液和 DNS 试剂(酒石酸钾钠、3,5-二硝基水杨酸)根据微生物学实验手册和生物化学实验手册进行自配。

LB 淀粉固体平板: 1% 蛋白胨, 0.5% 酵母粉, 0.2% 可溶性淀粉, 1.8% 琼脂粉, 调节 pH 值为 6.5 ~ 7.0^[8]。LB 淀粉液体培养基: 1% 蛋白胨, 0.5% 酵母粉, 0.2% 可溶性淀粉, 调节 pH 值为 6.5 ~ 7.0^[8]。

1.2 方法

1.2.1 平板初筛 称取每个土壤样品 10 g, 放进盛有 100 mL 无菌水的锥形瓶中, 以 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速振荡 20 min, 此时土壤样品记为 10^{-1} 稀释液。取 0.5 mL 的 10^{-1} 稀释液到 4.5 mL 的无菌水中制备 10^{-2} 稀释液, 按此操作依次制备 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 稀释液。每个样品选取 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 稀释液各 0.1 mL, 均匀涂布到 LB 淀粉固体平板, 于 40°C 培养数小时。待 LB 淀粉固体培养基长出菌落, 挑取不同菌落进行编号保存。然后将 Lugol 碘液加入到 LB 淀粉固体平板中并涂布均匀, 产淀粉酶的菌株周围会形成

收稿日期: 2019-04-28

基金项目: 国家自然科学基金(21666010, 31360217), 江西省教育厅自然科学基金(GJJ11071)和江西师范大学博士科研启动基金(5451)资助项目。

通信作者: 赵喜华(1977-), 男, 江西玉山人, 副教授, 博士, 主要从事纤维素酶蛋白质工程及再生资源开发与利用研究。

E-mail: xhzhaoh@jxnu.edu.cn

透明水解圈 选取菌圈较大的菌株多次进行平板筛选 将得到的菌株转接至斜面培养基上 40 ℃ 培养 48 h 后置于 4 ℃ 保温箱中保存^[9-10].

1.2.2 摇瓶复筛 将平板初筛出来的淀粉酶高产菌接到 LB 淀粉液体培养基中,于 40 ℃ 培养 6 d 后进行摇瓶发酵复筛.

1.2.3 标准曲线的制作 配制 1 mg · mL⁻¹的葡萄糖标准溶液 按表 1 配制成混合液.水浴加热 5 min,冷却至室温,每个试管加蒸馏水 7 mL,充分混匀后,用空白组进行调零,在波长为 540 nm 条件下测定其吸光度.

表 1 葡萄糖标准曲线的建立			mL
葡萄糖溶液	蒸馏水	DNS	
0.0	1.0	2.0	
0.2	0.8	2.0	
0.4	0.6	2.0	
0.6	0.4	2.0	
0.8	0.2	2.0	
1.0	0.0	2.0	

1.2.4 3,5-二硝基水杨酸显色法测酶活 采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 法)测定淀粉酶酶活^[11].1 个酶活力单位(U)是指在 50 ℃、15 min 的条件下降解可溶性淀粉释放 1 mg 葡萄糖糖所需要的酶量.计算酶活公式为:酶活 = CVN/t ,其中 C 为酶反应液中葡萄糖浓度,单位为 mg · mL⁻¹; V 为酶反应液总体积,单位为 mL; N 为酶液稀释倍数; t 为反应时间,单位为 min.测定不同菌株上清液在 540 nm 的吸光度,连续追踪 6 d,得出酶活随时间的变化曲线.

1.2.5 种属鉴定 (i) 基因组 DNA 提取.细菌基因组 DNA 试剂盒法:细菌基因组 DNA 试剂盒(型号 D1600),北京索莱宝科技有限公司产品,包括 RNase A、蛋白酶 K、溶液 A、溶液 B、漂洗液、洗脱液、吸附柱、收集管.按照 Solarbio LIFE SCIENCES 细菌基因组提取试剂盒说明书提取细菌 DNA;

(ii) 琼脂糖凝胶电泳.取 TAE 电泳工作缓冲液 100 mL,加入 0.8 g 琼脂糖在微波炉中加热直至沸腾,充分溶解.溶胶倒入胶槽,装上与胶槽配套的梳子,冷却后,轻轻拔出梳子将凝胶置于装满 TAE 电泳工作缓冲液的电泳槽中进行电泳.样品:5 μL DNA 样品 + 1 μL Bufferr 染料;对照:1 μL Maker + 0.5 μL 染料 + 4 μL 缓冲液.用移液枪将样品溶液与对照组溶液打入凝胶的点样孔中进行电泳,点样孔在负极一端.稳定电压 120 V,电流 50 mA 开始电泳 50 min.电泳完毕后取出凝胶,在凝胶成像系统中选择波长为 254 nm 的紫外灯下照射并观察^[12];

(iii) 16S rDNA 的 PCR 扩增. PCR 反应体系:上

游引物 5′GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG3′、下游引物 5′AGAAAGGAGGTGATCCAGCC3′各 2.5 μL (25 pmol),DNA 模板 1 μL (100 ng),2 × TaqPlus master mix 酶 25 μL,用去离子水补至 50 μL^[10].反应程序:预变性 94 ℃ 2 min,30 个循环(98 ℃ 10 s、53 ℃ 10 s、68 ℃ 90 s),最后 72 ℃ 延伸 5 min^[13];

(iv) 淀粉酶高产菌的形态学观察.菌的形态学观察可参见《伯杰氏细菌鉴定手册》.先通过肉眼观察菌落形态;经革兰氏染色后,在 100 倍油镜下进行染色观察.

1.2.6 紫外诱变选育 选取筛选出的酶活较高的菌株,经活化后,用生理盐水洗下并稀释 10 倍,置于含玻璃珠的三角瓶中,在摇床上 180 r · min⁻¹振荡 15 min,使菌体充分打散.紫外诱变时间分别为 3、4、5 和 6 min,40 ℃ 培养 48 h 后,测定诱变后试验菌酶活^[14].

1.2.7 产酶条件优化 (i) 单因素优化.选择 4 种不同的碳源和 6 种氮源代替初始培养基中碳源、氮源,在 40 ℃,160 r · min⁻¹培养 24 h,取上清液用 DNS 法测其酶活,选择最佳碳源、氮源进行下一步实验^[15];(ii) 正交设计.从单因素选择的实验结果中,选择 6 因素 2 水平进行正交试验^[16],运用数据处理相关方法,分析各因素对菌株产酶能力的影响,确定最佳反应组合条件^[15,17].

2 结果与分析

以葡萄糖质量浓度(mg · mL⁻¹)为横坐标,吸光度为纵坐标,得葡萄糖标准曲线为 $y = 0.6229x - 0.0021$, $R^2 = 0.999$ (见图 1),这表明所获得的回归方程是可行的.

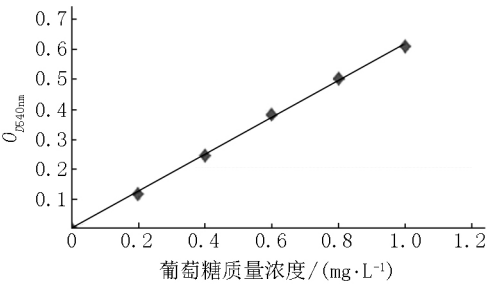


图 1 葡萄糖标准曲线

2.1 初筛结果

染色后多数菌落周围有透明水解圈,说明这些菌落具有表达淀粉酶的特性,测出菌落周围透明水解圈直径(D)和菌落直径(d),计算直径比 D/d ^[10,14].如图 2 和表 2 所示 D/d 最大的菌株为 SG3.

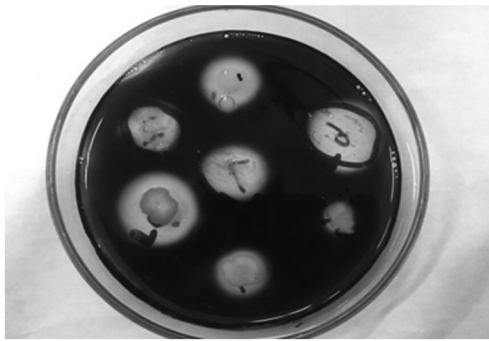


图2 碘液染色效果

表2 初筛 D/d

菌株	D/mm	d/mm	D/d
SG1	15	6	2.50
SG2	14	6	2.30
SG3	35	11	3.18
SG4	25	10	2.50
SG5	18	10	1.80
SG6	23	10	2.30
SG7	23	11	2.10
SG8	12	6	2.00
SG9	13	9	1.70

再将初筛到的菌进一步进行摇瓶复筛,证实 SG3 是最高产酶菌.连续 6 d 追踪其酶活,如图 3 所示,在第 3 天有最高酶活,其值为 $140\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$.

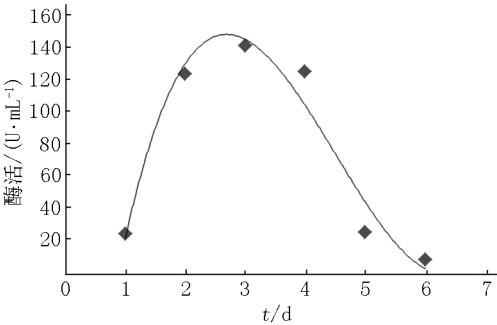


图3 SG3 摇瓶发酵复筛结果

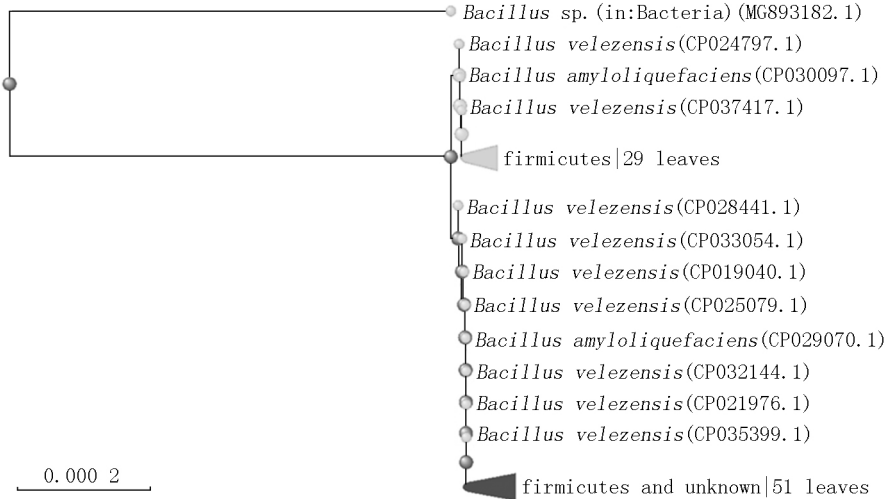


图5 SG3 菌株 16S rDNA 进化树

2.2 SG3 鉴定

2.2.1 形态学鉴定 经革兰氏染色后,在 100 倍油镜下观察,菌体呈蓝紫色、直杆状,以成对或链状排列,这表明是革兰氏阳性菌.菌落大,表面粗糙,扁平,不规则,边缘呈锯齿形的突起,菌落表面颜色呈乳白色较干燥有褶皱,内部半透明状态较难挑起,这些形态表明 SG3 属于芽孢杆菌属.

2.2.2 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 如图 4 所示,4 管总基因组中第 4 泳道的基因组较亮,电泳 50 min 后分子量也较大,这表明基因组提取的完整度较好^[9,18].

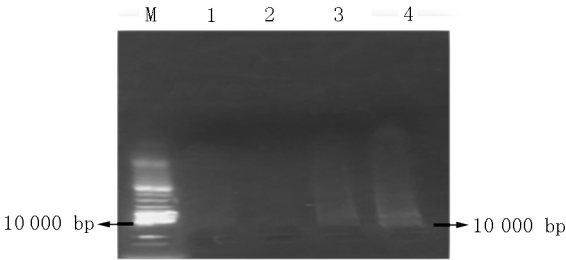


图4 SG3 基因组检测结果

2.2.3 PCR 产物序列鉴定 测序结果表明,16S rDNA 序列长度为 1 490 bp,与贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* (NCBI 登记号为 CP035399.1) 具有 99.66% 的一致性.因此,综合形态学观察以及分子生物学进化树分析(见图 5),SG3 菌株被鉴定为贝莱斯芽孢杆菌^[18].

2.3 紫外诱变结果

菌株 SG3 经紫外诱变后,挑取各诱变时间下的单菌落进行纯化培养,得各菌落透明圈直径 D 与菌落直径 d 的比值,其中 6 min 诱变有最大直径比(实验结果未列出).如表 3 和图 6 所示,经 6 min 突变后 UV-5 为正突变体,可产生 $234\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的酶活,其酶活提高到诱变前的 1.6 倍.

表 3 6 min 诱变的 D/d

菌株	D/mm	d/mm	D/d
UV-1	8	2	4.0
UV-2	6	1	6.0
UV-3	11	2	5.5
UV-4	18	10	1.8
UV-5	10	1	10.0
UV-6	6	1	6.0

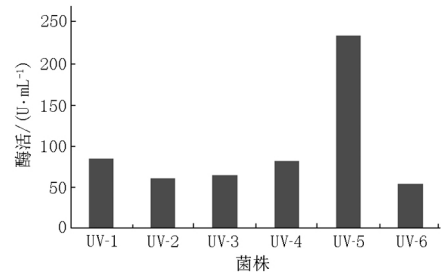


图 6 诱变后酶活

2.4 产酶条件优化

从图 7 可知 ,用玉米粉作碳源时酶活性最高 ,麸皮次之 淀粉和蔗糖较低 因此选择玉米粉作为碳源.

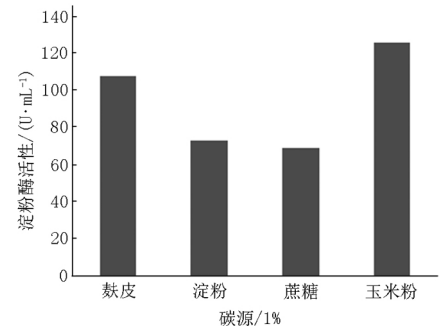


图 7 不同碳源对酶活性的影响

从图 8 可知 ,用酵母粉作氮源时酶活性最高 ,尿素次之 ,其他较低 因此选择酵母粉作为氮源.

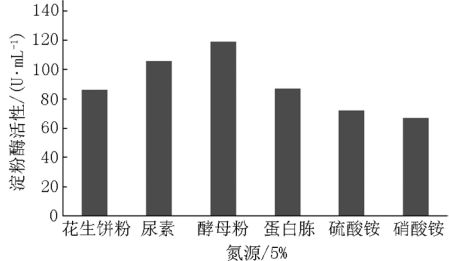


图 8 不同氮源对酶活性的影响

查阅相关文献可知 ,对产酶能力影响较显著的因素主要有培养时间、碳源、转速、氮源、pH 值和温度 因此选择 6 因素 2 水平进行正交试验. 如表 4 所示 温度对产酶影响巨大 ,氮源含量影响最小 ,获得的最优组合条件为: 培养温度 40 ℃、pH 值为 6、培养时间 48 h、2.5% 玉米粉、0.5% 酵母粉和转速 160 r·min⁻¹. 通过最优组合条件对该菌进行摇瓶发酵培养 ,酶活达 264 U·mL⁻¹ ,其酶活是原始菌 SG3 的 1.9 倍.

3 讨论

土壤中微生物种类繁多 ,通过稀释涂布可获得单菌落. 观察菌落直径与水解圈比值的大小 ,可分离出目的菌株 经过形态学观察和 DNA 测序鉴定为贝莱斯芽孢杆菌 SG3. 为提高淀粉酶产量 ,进行了单因素实验和正交实验 ,得出最优碳源为玉米粉 ,最优氮源为酵母粉 ,最佳培养组合条件为 40 ℃、pH 值为 6、培养 48 h、碳源 2.5%、氮源 0.5%、转速 160 r·min⁻¹.

表 4 正交设计结果

实验次数	温度/℃	pH 值	培养时间/h	碳源含量/%	氮源含量/%	转速/(r·min ⁻¹)	酶活/(U·mL ⁻¹)
1	40	6	24	2.5	0.5	160	238
2	40	6	24	5.0	1.0	180	166
3	40	7	48	2.5	0.5	180	229
4	40	7	48	5.0	1.0	160	215
5	45	6	48	2.5	1.0	160	222
6	45	6	48	5.0	0.5	180	175
7	45	7	24	2.5	1.0	180	136
8	45	7	24	5.0	0.5	160	149
k ₁	848	802	689	258	792	825	
k ₂	682	728	841	705	738	705	
极差 R	165	73	152	121	54	119	
因素主次	温度 > 培养时间 > 碳源含量 > 转速 > pH 值 > 氮源含量						
最优方案	40 ℃、pH 值为 6、培养 48 h、碳源 2.5%、氮源 0.5%、转速 160 r·min ⁻¹						

目前 ,淀粉酶在农业、工业、食品、医学、环境治理等方面具有广泛的应用^[19]. 枯草芽孢杆菌是淀粉酶的重要生产菌株 ,已有大量文献对其进行了报道 ,如 对高产酶菌株进行初筛、复筛、紫外诱变、产酶条件优化等 ,以便获得更高产酶菌株^[20]. 在紫外诱变

过程中 ,诱变时间及黑暗处理尤为重要 ,诱变时间过长会加大该菌致死率 ,时间过短则达不到良好的诱变效果^[19]. 本次实验将诱变时间梯度设置为 3 ~ 6 min. 通过对产酶活力的测定 ,确定最优诱变时间为 6 min. 诱变 6 min 时菌株有最大直径比 ,其中 1 株

为正突变体(UV-5),其余为负突变。与原始菌株相比,UV-5 酶活提高了 1.6 倍;通过最优组合条件对 UV-5 菌株进行培养,酶活提高为原始菌株的 1.9 倍,UV-5 产酶活力比赵淑琴等^[14]筛选的菌株产酶能力提高了 2.1 倍。因此,贝莱斯芽孢杆菌 UV-5 在工业生产实践中有着更为广阔的前景。

4 参考文献

- [1] 杨艳华. 高温 α -淀粉酶产生菌的遗传改良及发酵工艺优化 [D]. 无锡: 江南大学 2009.
- [2] 罗志刚, 杨景峰, 罗发兴. α -淀粉酶的性质及应用 [J]. 食品研究与开发 2007 28(8): 163-167.
- [3] 孙晓菲, 李爱江. α -淀粉酶的应用及研究现状 [J]. 畜牧兽医科技信息 2008(6): 13-14.
- [4] 晏爱芬, 余丽, 林连兵. 土壤中淀粉酶产生菌的筛选 [J]. 保山学院学报 2013 32(5): 36-38.
- [5] 蒋若天. 1 株耐高温 α -淀粉酶的地衣芽孢杆菌的筛选与分离及产酶条件与酶学性质的研究 [D]. 成都: 四川大学 2007.
- [6] 侯雨文, 韩春艳. 蜡样芽孢杆菌对大肠杆菌的体外抑制研究 [J]. 河南畜牧兽医: 综合版 2007(4): 10-11.
- [7] 刘杰雄, 陈号, 陆雯, 等. 淀粉酶高产菌株的筛选及其酶活的测定 [J]. 食品工程 2010(1): 45-47.
- [8] 张双民. 土壤中淀粉酶高产菌株的分离及产酶条件的优化 [J]. 土壤肥料 2006(2): 59-61.
- [9] 文狄, 褚丹维, 罗绍娇, 等. 土壤中产高活性淀粉酶细菌的分离与纯化 [J]. 安徽农业科学 2018 46(27): 6-9 41.
- [10] 陈相达, 戴慧慧, 刘燕, 等. 1 株高产淀粉酶枯草芽孢杆菌的筛选、鉴定及产酶条件的优化 [J]. 温州医科大学学报, 2011 41(1): 40-43.
- [11] 赵凯, 许鹏举, 谷广烨. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究 [J]. 食品科学 2008 29(8): 534-536.
- [12] 王国泽, 唐仁勇, 左福元, 等. 瘤胃细菌 DNA 提取方法的研究与优化 [J]. 黑龙江畜牧兽医 2016 16: 49.
- [13] 依妮皮姑丽·麦麦提依明, 艾麦尔江·麦提库班, 阿依安·布胡达西, 等. 1 株产 α -淀粉酶芽孢杆菌的分离及产酶条件的优化 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2017 56(4): 126-132.
- [14] 赵淑琴, 杨孝朴. 1 株产 α -淀粉酶菌株的分离筛选, 鉴定及酶学性质研究 [J]. 中国酿造 2018 37(2): 60-65.
- [15] 张志强, 李思思, 李辉, 等. 高产淀粉酶菌株的筛选及其培养条件的优化 [J]. 江苏农业科学 2017 45(10): 221-223.
- [16] 冯颖杰, 王鹏飞, 陈芝飞, 等. 烟叶中 1 株可高效降解淀粉的菌株筛选与作用效果研究 [J]. 河南农业科学, 2018 47(1): 150-154.
- [17] 吴文睿, 李兰, 汤有宏, 等. 枯草芽孢杆菌产 3-羟基-2-丁酮 2,3-丁二醇发酵条件优化 [J]. 酿酒 2016(2): 93-96.
- [18] 陈佩, 岳巧云, 刘德星, 等. 适用于二代测序技术的细菌 DNA 提取方法的比较研究 [J]. 检验检疫学刊 2018, 28(2): 55-60 29.
- [19] 张皎皎. 1 株高产淀粉酶菌株的筛选鉴定及其应用研究 [D]. 重庆: 西南大学 2018.
- [20] 高永生, 朱丽云, 朱贵州, 等. 枯草芽孢杆菌产酶规律及酶学性质研究 [J]. 安徽农业科学 2011 39(19): 11964-11965, 11968.

The Screening ,Identification ,Mutagenesis and Production Optimization of a Bacteria with a High-Level Production of Amylase

HU Rong ,FANG Linlin ,FU Meng ,HUANG Yuzhu ,LIU Fengxian ,ZHANG Jiali ,ZHAO Xihua *
(College of Life Science ,Jiangxi Normal University ,Nanchang Jiangxi 330022 ,China)

Abstract: Strains with a high-production level of amylase will be isolated from various soils ,be bemutated ,and be optimized for enzyme production in order to increase amylase production and enrich amylase-producing strain resources. The strain SG3 with an amylase activity of $140 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ is obtained after screening and re-screening coupled with a ratio of colony diameter and hydrolysis circle. The strain SG3 has identification as *Bacillus velezensis* according to morphological observation ,16S rDNA sequence and BLAST on-line software. After ultraviolet mutagenesis a positive mutant UV-5 with an amylase activity of $234 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ is screened ,and the enzyme activity is increased by 1.6 times compared with SG3. According to single factor and orthogonal experiments ,it is revealed that the optimization production condition is 40°C , $\text{pH} = 6$,48 h ,2.5% corn flour ,0.5% yeast extract and $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,and the enzyme activity of fermentation supernatant from UV-5 reaches $264 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ and increases by 1.9 times compared with SG3.

Key words: screening; bacteria with a high-production level of amylase; identification; ultraviolet mutagenesis; optimization production condition
(责任编辑: 刘显亮)