

高活力 β -淀粉酶菌种的选育和发酵条件的研究

何秉旺 郭君蓓 姜兆元 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

产 β -淀粉酶的腊状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) AS1.447, 通过紫外线、亚硝基胍和利福平的反反复复处理诱变, 获得一株具有高活力 β -淀粉酶的变异菌株 M-3, 产酶活力从 74u/ml 提高到 5000—7000u/ml。牛肉汁液体培养基成分为: 每 100ml 牛肉汁中加入蛋白胨 1g, 可溶性淀粉 1g, 酵母膏 0.5g, NaCl 0.5g pH6.0。该变异菌的最适培养条件是: pH6—6.5 30℃48 小时。酶的最适反应条件是: 温度 40℃, pH7.0, pH 稳定范围是 6—9, 酶的抗热性较差, 对可溶性淀粉水解率达 85% 以上。

β -淀粉酶最初发现在高等植物中^[1], 特别在大麦、小麦、甘薯和大豆中含量较高。大麦芽中的 β -淀粉酶主要用于酿酒和饴糖生产。近年来从微生物中寻找产 β -淀粉酶的菌种报道较多^[2-4], 并进一步用物理、化学方法诱变以求提高菌种的产酶活力^[5-8]。前些年我们对产生 β -淀粉酶的微生物进行了筛选和研究, 得到了几种产 β -淀粉酶的菌种^[9], 并对产 β -淀粉酶的多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*) AS1.546 的产酶条件和酶的性质作了初步的研究^[10]。近来又将产 β -淀粉酶的腊状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) AS1.447 用紫外线、亚硝基胍和利福平进行了诱变, 获得一株变异菌株 M-3; 其产酶活力比原菌株提高 70—90 倍。本文主要报道高活力菌种的选育及其特性的研究。

材料和方法

(一) 菌种: 腊状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) AS1.447^[9]。

(二) 培养基

1. 牛肉汁斜面: 牛肉汁补加蛋白胨 1%、NaCl 0.5%、琼脂 1.5%、pH7.0。
2. 平皿固体牛肉汁培养基成分 (%): 牛肉汁补加蛋白胨 1%、可溶性淀粉 0.5%、酵母膏

0.5%、NaCl 0.5%、琼脂 1.5%、pH7.0。灭菌后的培养基每个平皿倒 15—20ml, 冷却后备用。

3. 牛肉汁液体培养基成份 (%): 牛肉汁补加蛋白胨 1%、可溶性淀粉 1%、酵母膏 0.5%、NaCl 0.5%、pH6—6.5。250ml 三角瓶装 50 ml, 灭菌后备用。

(三) 诱变菌种用的紫外光灯和化学试剂

紫外光灯: 上海东方红灯具厂产品, 功率 30 瓦, 波长 2537 Å。

N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (MNNG): 西安市化学试剂厂产品(以下简称亚硝基胍)。

利福平: Iepetit, Sep Milan (Italy)。

甲醇、甲酰胺: 分析纯, 北京化工厂产品。

(四) β -淀粉酶活力的测定: 反应总体积 10ml, 2% 的可溶性淀粉 5 ml, 0.2M pH7.0 的磷酸缓冲液 1ml, 蒸馏水 3.9ml 置于 10ml 的磨口试管中, 于 40℃ 恒温水浴中预热 5 分钟, 加酶液 0.1ml, 保温 30 分钟, 立即取出试管置沸水浴中煮 10 分钟, 冷却后取样 1 ml, 用 DNS 法^[11]测定还原糖(按麦芽糖 mg 数计算)。在上述条件下, 每小时产生 1mg 麦芽糖的酶量为 1 个酶活力单位。

(五) 用纸层析法确定产 β -淀粉酶菌株: 上述经酶水解后的淀粉液样品, 点在层析纸上, 以葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖为标准样品, 晾干后进行层析。扩展剂为正丁醇: 吡啶: 水 = 6: 4: 3 (V/V)。上行两次, 晾干后显色。显色剂为苯胺-二

本文于 1982 年 6 月 29 日收到。

苯胺(4%的苯胺丙酮溶液和4%的二苯胺丙酮溶液,以等体积混合后,加入10%体积的85%的浓磷酸)显色后层析纸在80℃烘箱中加热10分钟,待糖斑点看清楚后取出。

结果和讨论

(一) 高活力 β -淀粉酶菌种的选育

1. 紫外线诱变: 初发菌株 AS1.447 接在牛肉汁斜面上, 30℃ 培养 24 小时, 然后转接在含 10ml 牛肉汁液体培养基的大试管中, 放在 30℃ 旋转式摇床上振荡培养 8 小时, 菌液用无菌生理盐水稀释到 10^{-6} — 10^{-7} , 取 0.1ml 放在平皿中涂均匀放在紫外光灯下不同距离(约 30cm 左右为宜)照射不同时间(以 10 分钟左右为宜), 处理后盖好平皿盖, 于 30℃ 温箱中培养 16—24 小时, 视其菌落大小和菌落疏密而定。从中找出淀粉水解透明圈大的菌落转接到牛肉汁斜面上, 30℃ 培养 24 小时。

变异菌株斜面转接到装有液体牛肉汁培养基的三角瓶中。在旋转式(220 转/分, 幅度 2cm)摇床上, 于 30℃ 振荡培养 24 小时, 测定酶活力, 经过反复多次照射, 得到一株 M-1 变异株, 变异株比原菌产酶活力提高 7 倍, 可达 500u/ml。

2. 用亚硝基胍处理诱变菌株 M-1: 将培养好的 M-1 菌液在无菌条件下倒入装有一定量的亚硝基胍的试管中(亚硝基胍预先用甲酰胺溶解好), 摇均匀后, 在 30℃, 摇床振荡处理一定时间(20—60 分钟), 亚硝基胍的用量范围在 0.05—3.5mg/ml 之间, 把处理后的菌悬液用无菌生理盐水稀释成 10^{-4} — 10^{-6} , 取 0.1ml 加到平皿固体培养基上, 涂匀后在 30℃ 培养 16—24 小时, 经挑选菌落转移到牛肉汁斜面上, 培养 24 小时后用液体发酵比较产酶活力的高低。经亚硝基胍多次反复处理诱变从中选育到 M-2 变异菌株, 其产酶活力比原菌株

AS1.447 高 50 倍, 可达 3600u/ml。

3. 抗利福平菌种的分离: 培养好的 M-2 菌悬液经亚硝基胍处理后, 稀释至一定浓度, 取 0.1ml 置于含有利福平(1—2 μ g/ml)的平皿培养基上(利福平先用少量的甲醇溶解后与牛肉汁固体培养基混合均匀倒入平皿中), 涂均匀后在温箱中培养 24 小时, 能在含利福平的培养基上生长的菌落称之为抗利福平菌株, 在上述利福平浓度下, 抑菌率高达 99.99%, 一般正变率也很低, 经多次分离, 获得一株抗利福平菌株 M-3, 产酶活力比原菌株 AS1.447 高 70—90 倍, 酶活力可达 5000—6000u/ml, M-3 变异菌株经二年多的保藏和使用, 其产酶性能比较稳定。

(二) 变异菌株 M-3 的一些特性

1. 形态及生理特性: 变异菌株 M-3 菌体生长慢, 液体培养与 AS1.447 比较, 产酶高峰时间推迟, AS1.447 为 24 小时, 而 M-3 为 48 小时。菌体细胞 M-3 比 AS1.447 长 5—7 倍; M-3 菌体呈丝状, 细胞之间分隔, 菌体链不十分长; 而原菌 AS1.447 菌体细胞较短, 但其菌体链较长, 细胞间分隔更明

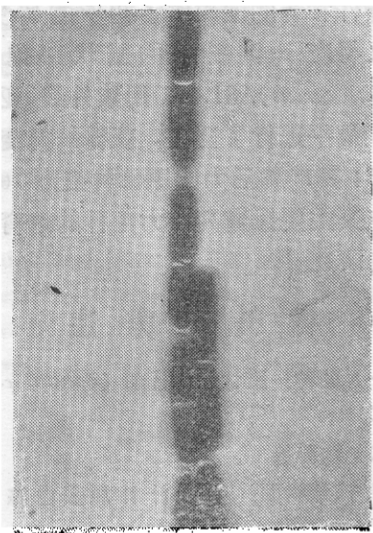


图1 AS1.447

Fig.1 AS1.447(2400 \times)

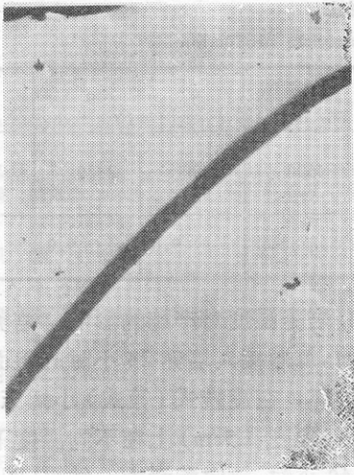


图2 M-3

Fig.2 M-3 (2400 \times)

显些。菌体电镜照片如下图1和图2。

2. 菌落形态: 将两株菌分别接种在平皿牛肉汁固体培养基上, 在 30 $^{\circ}$ C 培养 24 小时, 菌落形态见图3。AS1.447 菌落大直径为 10—12mm, 表面粗糙, 淀粉水解圈几乎看不出。M-3 菌落生长慢, 直径仅为 4—5mm, 淀粉水解圈大(用稀碘液显色)直径为 14—17mm; 菌落表面光滑发亮。

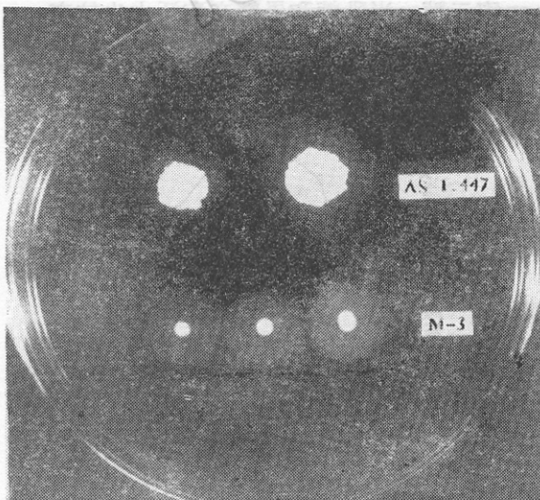


图3 变异菌 M-3 与原菌 AS1.447 菌落比较。

Fig.3 Colony of AS1.447 and M-3.

(三) 变异菌 M-3 的发酵条件试验

1. 不同 pH 对产酶的影响: 牛肉汁液体培养基用 HCl 和 NaOH 溶液调成不同 pH, 灭菌后接液体种子, 接种量为 2% (体积), 种令为 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 8 小时。接种后在 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 48 小时, 测定发酵液的酶活力。试验结果(表 1)说明, 变异菌 M-3 在 pH6 产酶活力最高; 可达 5200u/ml, 产酶较适 pH 范围是 6—7 之间。

2. 产酶的时间过程: 牛肉汁液体培养基同前述, 每瓶接液体种子 1ml, 于 30 $^{\circ}$ C 振荡培养不同时间, 取样测定酶活力, 结果(图4)培养 48 小时产酶活力最高, 超过 48 小时酶活力显著下降。

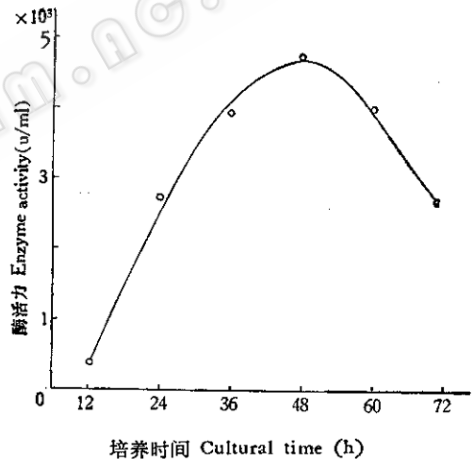


图4 产酶时间过程

Fig.4 The time course of β -amylase production

3. 不同通气量对产酶的影响: 不同体积的牛肉汁液体培养基分别装入 250ml 三角瓶中, 接入 2% 体积的液体种子, 于 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 24 小时, 测定酶活力(此次培养时间短, 酶液未经稀释, 测出的酶活力偏低)。试验结果(图5)可以看出, M-3 产酶活力在 250ml 三角瓶中装 50ml 培养基时最高。

表 1 pH 对产酶的影响

Table 1 Effect of initial pH on β -amylase production

起始 pH Initial pH	4	5	6	7	8	9	10
酶活力 Enzyme activity (u/ml)	320	360	5200	4600	3200	2320	520
最终 pH Final pH	4.0	5.0	9.0	9.0	9.0	9.0	6.8

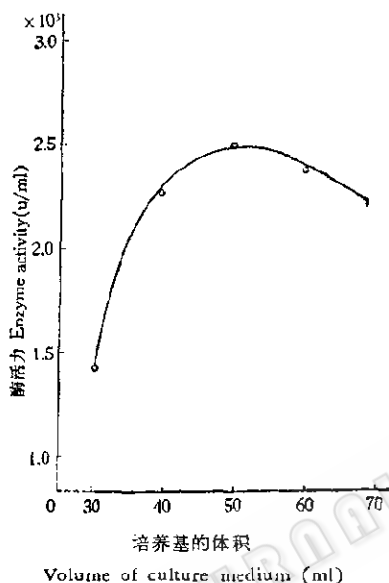


图 5 通气量对产酶的影响

Fig.5 Effect of aeration rate on enzyme production

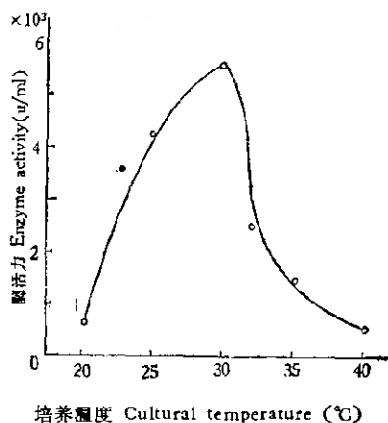
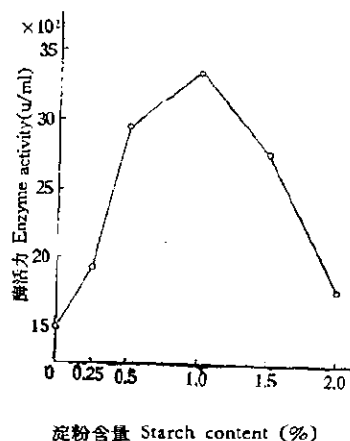


图 6 培养温度对产酶的影响

Fig.6 Effect of Temperature on β -amylase production

淀粉含量 Starch content (%)

图 7 淀粉含量对产酶的影响

Fig. 7 Effect of starch content on β -amylase production

4. 培养温度对产酶的影响: 培养基成份同前, 每瓶接入培养 24 小时的斜面种子一接种环, 在旋转式(箱式)小摇床(200 转/分, 幅度 1.5cm)上在不同温度下振荡培养 48 小时, 测定酶活力; 结果(图 6)可以看出, 在 30℃ 下培养产酶活力最高, 可达 5520u/ml。超过 32℃ 产酶能力急剧下降。

5. 碳源试验: 牛肉汁液体培养基成份中不加可溶性淀粉, 分别加 1% 的不同碳源, 调 pH 为 6.0, 灭菌(8 磅 15 分钟)后, 接液体种子 2% (V/V), 30℃ 振荡培养 48 小时, 测定酶活力, 试验结果见表 2。以可溶性淀粉为碳源者产酶活力最高, 可达 5680u/ml, 糊精次之, 其它碳源如棉子糖、密二糖、半乳糖和果糖产酶活力也较高。

表 2 碳源对产酶的影响

Table 2 Effect of various carbohydrates on β -amylase production

碳 源 Carbohydrates (1%)	起始 pH Initial pH	最终 pH Final pH	菌体生长* (A660nm)	酶活力 Enzyme activity (u/ml)
葡 萄 糖 Glucose	6.0	5.0	0.75	160
果 糖 Fructose	6.0	8.5	8.9	4400
半 乳 糖 Galactose	6.0	8.2	8.0	4480
木 糖 Xylose	6.0	5.2	4.5	2200
山 梨 糖 Sorbose	6.0	8.5—8.8	3.2	1080
蔗 糖 Sucrose	6.0	5.4	2.2	640
麦 芽 糖 Maltose	6.0	8.2	8.0	3880
纤 维 二 糖 Cellobiose	6.0	8.5	6.3	3400
密 二 糖 Melibiose	6.0	8.0	8.1	4500
棉 子 糖 Raffinose	6.0	8.0	8.3	4560
糊 精 Dextrin	6.0	8.0	8.0	5440
可溶性淀粉 Soluble Starch	6.0	8.5	8.6	5680
直 链 淀 粉 Amylose	6.0	8.8—9.0	6.9	2080
支 链 淀 粉 Amylopectin	6.0	5.5—6.0	0.23	200
纤 维 素 Cellulose	6.0	8.8—9.0	4.9	2200
玉 米 粉 Corn meal(2%)	6.0	7.5	7.5	2360

* 菌体生长: 发酵液稀释 10 倍后用 72 型分光光度计在 660nm 处测定。

Cell growth measured at 660nm on spectrophotometer Type 72 after 10-fold dilution

表 3 氮源对产酶的影响

Table 3 Effect of various nitrogen compounds on β -amylase production

氮源名称 Nitrogen sources	起 始 Initial pH	最 终 Final pH	菌体生长 (A660nm)	酶活力 Enzyme activity (u/ml)
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.5	6.0	4.85	320
(NH ₄) ₂ HPO ₄	6.5	6.0	2.5	40
NH ₄ Cl	6.5	6.0	4.9	20
NaNO ₃	6.5	8.5	3.55	1000
NH ₄ HCO ₃	6.5	9.0	3.90	440
(NH ₂) ₂ CO	6.5	9.0	5.35	560
NH ₄ NO ₃	6.5	6.0	0.93	320
酵母膏 yeast extract	6.5	9.0	5.68	2360
全血肽 peptone (Blood)	6.5	9.0	5.5	3680
精解蛋白肽(鸡蛋) Peptone (eggwhite)	6.5	9.0	4.9	2120
进口蛋白肽(日本) Polypeptone (Japan)	6.5	9.0	5.4	2680
牛肉膏 beef extract	6.5	9.0	5.35	2760
酪素 Casein	6.5	9.0	5.73	1400
象皮鱼肽 Peptone (fish)	6.5	9.0	5.1	2880
豆饼粉 Soy bean cake meal	6.5	8.0	8.0	3560

6. 不同淀粉量对产酶的影响: 在牛肉汁培养基中加不同量的淀粉, 经培养测定酶活力, 结果表明(图 7)培养基中含淀粉 1% 的产酶活力最高, 超过 1% 产酶活力下降。

7. 氮源试验: 牛肉汁液体培养基中不加蛋白胨, 分别加入含纯氮计为 0.2% 的不同氮源, pH 6.5, 其它条件同前, 培养好后测定酶活力, M-3 菌株以全血胨为氮源时, 产酶活力最高, 其次是豆饼粉, 各种无机氮源产酶活力均很低(表 3)。

8. 不同蛋白胨含量对产酶的影响: 牛肉汁液体培养基成分除蛋白胨(全血胨)含量变动外, 其他成分不变。试验结果(图 8)表明, 蛋白胨含量为 1% 时产酶活力最高, 可达 5200 u/ml, 其次是 0.5%, 蛋白胨含量增加到 1.5% 以上产酶活力随之下降, 说明氮源不能过高。

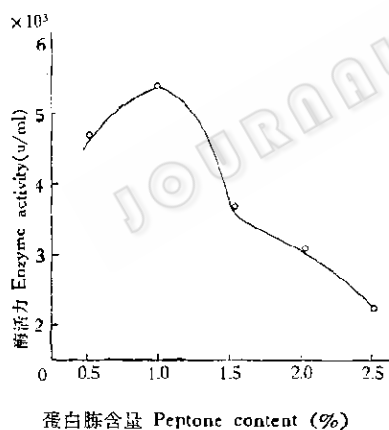


图 8 蛋白胨含量对产酶的影响

Fig.8 Effect of peptone content on enzyme production

(四) 酶的性质

1. 酶反应的最适温度: 在 20℃—70℃ 之间的不同温度下测定酶活力结果如图 9, 在 40℃ 时酶活力最高达 6600 u/ml, 在 30℃—55℃ 范围内酶活力均较高。

2. 酶的最适 pH: 在反应体系中, 各白

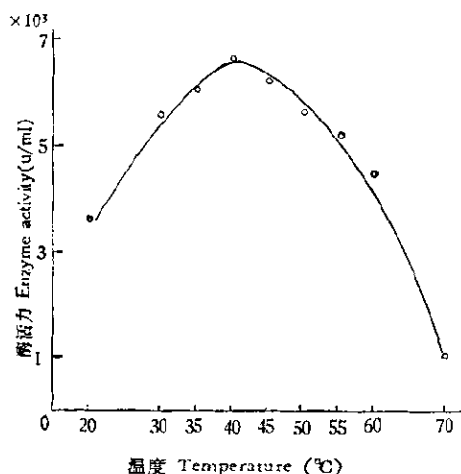


图 9 温度对酶活力的影响

Fig. 9 Effect of temperature on enzyme activity

加不同 pH 的缓冲液, pH 5—8 的缓冲液是用 0.2M Na_2HPO_4 -0.1M 柠檬酸溶液配成; pH 9—10 的缓冲液是用 0.2M Na_2CO_3 -0.2M NaHCO_3 配成。40℃ 反应 30 分钟取样测定酶活力, M-3 产生的酶液最适 pH 为 7.0, 最高酶活力为 6040 u/ml, 在 pH 6—8 之间酶活力也比较高。

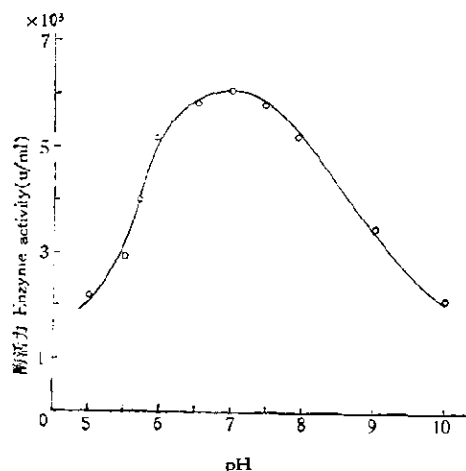


图 10 pH 对酶活力的影响

Fig.10 Effect of pH on enzyme activity

3. 酶的 pH 稳定性: 取酶液 2ml 加入装有 2ml 前述不同 pH 缓冲液的带塞试管

表 4 酶的 pH 稳定性

Table 4 Stability of enzyme at different pH values

pH	4.0	5.0	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	9.0	10
酶活力 Enzyme activity (u/ml)	2253	3222	5168	6506	7235	6688	6200	5472	4500
剩余酶活力 Residual activity (%)	35.3	44.5	71.4	89.9	100	92.4	85.7	75.6	62.2

中, 在 30℃ 恒温水浴中保温 3 小时, 稀释 10 倍后测定剩余酶活力, 结果见表 4。在 pH6—9 之间酶液比较稳定, 剩余酶活力均在 70% 以上, 以 pH7 酶表现活力最高, 可达 7235u/ml, 在 pH5 或 pH10 时酶活力只剩下 60% 左右。

4. 酶的热稳定性: 将稀释 10 倍的酶液各 5 ml, 分别装入带塞的试管中, 分别放入不同温度(35、40、45、50 和 60℃)的恒温水浴中处理不同时间测定剩余酶活力(用未被热处理的酶液作对照)。试验结果(图 11) 表明, M-3 产生的 β -淀粉酶耐热性较差, 50℃ 处理 1 小时, 酶活力只剩下 16.6%。

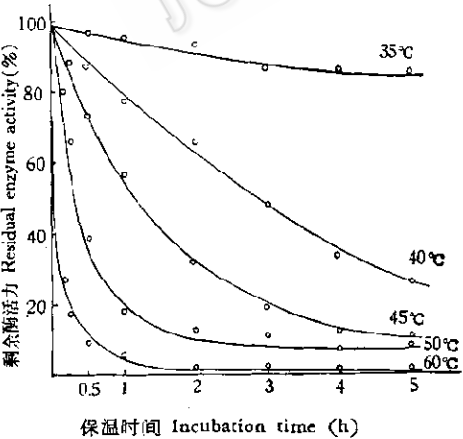


图 11 无底物条件下酶的热稳定性

Fig. 11 Thermal stability of cozyme in the absence of substrate

(含淀粉 1g)装入带塞的大试管中, 放入 40℃ 恒温水浴中预热 5 分钟, 加 β -淀粉酶液 1 ml, 反应不同时间取样用次亚碘酸法^[12]测定还原糖计算淀粉水解率。以同一浓度的可溶性淀粉溶液, 用 25% 的 HCl 在沸水浴中水解 2.5 小时, 中和稀释后测得的还原糖量(以葡萄糖计算)作为 100%, 酶水解样品测得的还原糖(以一水麦芽糖计算)求得淀粉水解率, 结果见图 12。同时用不同时间糖化样品进行纸层析, 结果见图 13。从图 12 可以看出, 酶水解淀粉 5 小时样品水解率可达 85% 左右而 β -淀粉水解可溶性淀粉一般报道为 50—60%。同时从图 13 可看出, 酶水解 30 分钟以前的样品层析斑点含有糊精和寡糖较多随时间的延长其

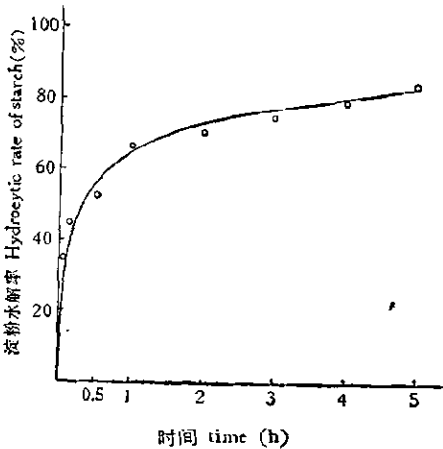


图 12 β -淀粉酶对淀粉的水解率

Fig. 12 Percent of starch hydrolyzed by β -amylase

5. 淀粉水解率: 可溶性淀粉液 49ml

表 5 几种酶的含量

Table 5 Activity of various enzymes

批号 batch	酶的种类 Enzymes 酶活力 Enzyme activity	β -淀粉酶 活力 β -amylase (u/ml)	α -淀粉酶 活力 α -amylase (u/ml)	异淀粉酶 活力 isoamylase (u/ml)	中性蛋白酶 活力 neutral proteinase (u/ml)	碱性蛋白酶 活力 alkaline proteinase (u/ml)
1		5793	6	4.5	37	49
2		6070	6	9	37	64
3		5913	4.4	—	5	38

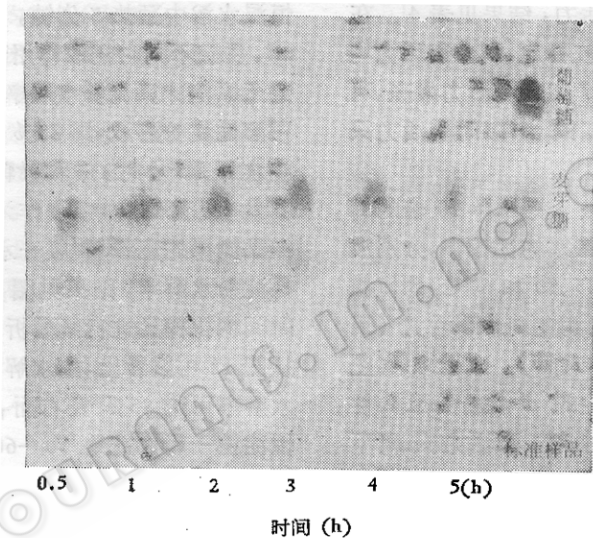


图 13 淀粉水解液的纸层析谱

Fig. 13 Paper chromatogram of starch hydrolyzate

层析斑点只有麦芽糖和少量的麦芽三糖。从以上结果可以推测该菌株产生的酶液中不仅含有 β -淀粉酶, 可能也有 α -淀粉酶和异淀粉酶的协同作用为证实以上的推测, 我们对酶液进行其它酶类含量的测定, 结果见表 5。从表 5 证明酶液确实还有少量的 α -淀粉酶、异淀粉酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶, 该酶液含以上酶类对工业上的应用是有利的, 也可以说变异菌 M-3 是一株生产应用上有希望的菌种。

参 考 文 献

- [1] Balls, A. K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 163: 571, 1946.
- [2] Shinke, R. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 38(3): 665—666, 1974.
- [3] Higashihara, M. and S. Okada: *Agr. Biol. Chem.*, 38(5): 1023—1029, 1974.
- [4] Takasaki, Y. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 40(8): 1511—1522, 1976.
- [5] Shinke, R. et al.: *Fermentation Technology*, 55(2): 103—109, 1977.
- [6] Shinke, R. et al.: *Fermentation Technology*, 55(2): 110—113, 1977.
- [7] Shinke, R. et al.: *Fermentation Technology*, 57(1): 53—55, 1979.
- [8] 大山邦夫、村尾沢夫: 醸酵工学会誌, 57(1): 1—5, 1979。
- [9] 郭君菴等: 微生物学报, 7(2): 59—61, 1980。
- [10] 何秉旺等: 微生物学报, 20(4): 421—426, 1980。

[11] Miller, G. L.: *Analytical Chemistry*, 31 (3): 426, 1959.

[12] Willstätter and Schudel: In *Physical and*

Chemical Methods of Sugar Analysis ed by Browne and Zerban 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc. p. 896, 1941.

SELECTION OF HIGH β -AMYLASE PRODUCING STRAIN AND ITS FERMENTATION CONDITIONS

He Bingwang Guo Junjun Jiang Zhaoyuan Zhang Shuzheng

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

After repeated treatment with ultraviolet light, N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and rifampicin a mutant M-3 producing 5000 units of β -amylase per milliliter of culture broth was obtained from *Bacillus cereus* AS 1.447. The medium consisted of beef infusion 100 ml., peptone 1g, soluble starch 1g, yeast extract 0.5g and NaCl 0.5g (pH 6.0). The culture exhibited ma-

ximum enzyme activity after growth at 30°C for 48h. The optimal temperature and optimal pH for crude enzyme action was 40°C and 7.0 respectively. The crude enzyme was stable in the range of pH 6—9 but less thermostable. The conversion on rate of soluble starch to maltose was over 85% under the catalysis of crude enzyme.