

产淀粉酶菌种的分离纯化及培养条件研究

纪韦韦, 张小华, 高静 (江苏农林职业技术学院, 江苏句容 212400)

摘要 [目的]探究产淀粉酶菌种的分离纯化及培养条件。[方法]从土壤中分离到1株产淀粉酶能力较强的细菌A并分离纯化培养。[结果]细菌A在以淀粉为碳源的培养基上产淀粉酶能力最强,水解圈平均直径/菌种平均直径(R_2/R_1)为2.69;在以硝酸钠为氮源的培养基上产淀粉酶能力最强, R_2/R_1 为2.69;pH在7.5时产淀粉酶能力最强, R_2/R_1 为2.95。[结论]以淀粉为碳源、以硝酸钠为氮源、pH在7.5的培养基有利于细菌A产淀粉酶能力的提高。

关键词 淀粉酶;培养基;培养条件

中图分类号 Q556⁺.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)28-0003-04

Study on Separation, Purification and Culture Conditions of an Amylase Producing Strain

JI Wei-wei, ZHANG Xiao-hua, GAO Jing (Jiangsu Vocational College of Agriculture and Forestry, Jurong, Jiangsu 212400)

Abstract [Objective] To explore the separation, purification and culture conditions of an amylase producing strain. [Method] Bacterium A, which had a strong ability to produce amylase, was isolated from the soil and then purified and cultured. [Result] Bacterium A had the strongest ability to produce amylase in the medium using starch as the carbon source, and the ratio of the average diameter of hydrolyzation circles R_2 to the average diameter of the strain R_1 (called R_2/R_1 for short) was 2.69; when being cultured in the medium using sodium nitrate as the nitrogen source, bacterium A had the strongest ability to produce amylase, and R_2/R_1 was 2.69; as the pH of the medium was 7.5, the ability to produce amylase was the strongest, and R_2/R_1 was 2.95. [Conclusion] Bacterium A should be cultured in the medium where starch and sodium nitrate are as the carbon source and the nitrogen source and pH is 7.5 to improve the ability to produce amylase.

Key words Amylase; Medium; Culture conditions

最初,淀粉酶(amylase)一词用来指可以水解直链淀粉、支链淀粉、肝糖及其降解产品中 α -1,4-糖苷键的酶,它们水解相邻葡萄糖单体之间的键,产生葡萄糖^[1]。淀粉酶一般作用于可溶性淀粉、直链淀粉、糖元等 α -1,4-葡聚糖,水解 α -1,4-糖苷键的酶^[1]。

淀粉酶是淀粉降解酶,广泛存在于微生物、植物和动物体中,是人们经常研究的一种酶。从纺织工业到废水处理,淀粉酶都有着不同规模应用,尤其是碱性淀粉酶在各种洗涤剂产品中有广泛应用。在某种程度上,淀粉酶也被用作消化助剂,补充面粉的糖化活性,改善一些动物饲料的可消化性^[2-3]。由于淀粉酶应用广泛,大部分由微生物产生,笔者拟通过淀粉水解来分离筛选可产淀粉酶的菌体,并对其进行研究,为今后的淀粉酶提取奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基。含淀粉的细菌培养基:氯化钠0.5 g,硝酸铵1.0 g,硫酸铵0.5 g,磷酸氢二钾1.5 g,磷酸二氢钾0.5 g,七水合硫酸镁0.2 g,淀粉1.0 g,蒸馏水定容至1 000 mL,pH自然,琼脂18.0 g^[4-5]。

察氏培养基:淀粉30.0 g,硝酸钠2.0 g,磷酸氢二钾1.0 g,七水合硫酸镁0.5 g,氯化钾0.5 g,七水合硫酸亚铁0.1 g,蒸馏水定容至1 000 mL,pH 7.0~7.2,琼脂20.0 g^[6]。

1.1.2 仪器。玻璃棒,250 mL大烧杯,50 mL小烧杯称量纸,天平,100 mL量筒,搪瓷缸,微波炉,pH试纸,150 mL三角瓶,培养皿,移液枪,20、100 μ L枪头,1 mL无菌注射器,过滤器,吸管,报纸,包扎绳,YXQ-LS-50立式压力蒸气灭菌

器(上海博田实业有限公司医疗设备厂),超净工作台SW-CJ-2FD(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司),SPX-250B-Z型生化培养箱(上海博田实业有限公司医疗设备厂),LRH-250生化培养箱(上海其欣科学仪器有限公司),高低温摇床培养箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.1.3 样品。土壤(用直径为3.5 cm的土钻采集5钻0~20 cm深度土壤,混合为1个土样,过2 mm筛后放在4℃冰箱保存),发霉的马铃薯。

1.2 方法

1.2.1 淀粉酶产生菌的分离。称取1.0 g土壤,加99 mL水搅拌均匀,静置5 min,取上清液0.5 mL加入到装有4.5 mL无菌水的试管中稀释并混匀,重复稀释1、2、3次,分别制得 $1:10^4$ 、 $1:10^5$ 、 $1:10^6$ 提取液^[6-7]。

取上述提取液各0.2 mL加入到含淀粉的细菌培养基和察氏培养基中,涂布,37℃培养3 d;同时,将马铃薯上的霉菌接种到含淀粉的细菌培养基和察氏培养基中,28℃培养3 d;将培养好的平皿放入4℃冰箱中冷藏24 h,观察水解圈的大小^[8-10]。

1.2.2 淀粉酶产生菌的纯化。观察冷藏过的平皿上是否产生透明水解圈,将具有明显水解圈的细菌在察氏培养基中划线分离,37℃培养3 d;重复上述操作,直至产生单菌落。

1.2.3 不同培养条件产淀粉酶能力的研究。吸取3 mL 0.9%的无菌生理盐水,将其转移到已纯化好的细菌A平皿中,制成菌悬液^[10]。

1.2.3.1 不同碳源的影响。在察氏培养基中加入相同碳浓度的不同碳源(葡萄糖、蔗糖和淀粉),用移液枪移取100 μ L上述菌悬液,将其转移到装有50 mL不同碳源的液体察氏培养基的150 mL三角瓶中,在设定28℃、80 r/min摇床培养。培养3 d后取样,用细菌过滤器过滤培养液,再用移液枪移取

20 μL 无菌滤液,将其放在察氏培养基上,培养条件同1.2.1。

1.2.3.2 不同氮源的影响。在察氏培养基中加入相同氮浓度的不同氮源(硫酸铵、硝酸钠),用移液枪移取 100 μL 上述菌悬液,将其转移到装有 50 mL 不同氮源的液体察氏培养基的 150 mL 三角瓶中,在设定 28 $^{\circ}\text{C}$ 、80 r/min 摇床培养。培养 3 d后取样,用细菌过滤器过滤培养液,再用移液枪移取 20 μL 无菌滤液,将其放在察氏培养基上,培养条件同“1.2.1”。

1.2.3.3 不同 pH 的影响。将察氏培养基 pH 调为 6.4、7.0、7.5,用移液枪移取 100 μL 上述菌悬液,将其转移到装有 50 mL 不同 pH 的液体察氏培养基的 150 mL 三角瓶中,在设定 28 $^{\circ}\text{C}$ 、80 r/min 摇床培养。培养 3 d后取样,用细菌过滤器过滤培养液,然后用移液枪移取 20 μL 无菌滤液,将其放在察氏培养基上,培养条件同 1.2.1。

2 结果与分析

2.1 淀粉酶产生菌的分离 在细菌培养基上,无论是土壤或者发霉马铃薯中生长的菌体均没有水解圈产生。而在察氏培养基上则出现了大小不一、清晰可见的水解圈。对图 1 中产淀粉酶的细菌菌落进行观察发现,产淀粉酶细菌 A 菌落为黄色,质地较硬,无黏稠感;产淀粉酶细菌 B 菌落为深黄色,质地偏软,有黏稠感。

2.2 淀粉酶产生菌的纯化 纯化后的细菌 A 产生明显的水解圈,如图 2 所示。

经过菌种的 3 次纯化,从表 1 可以看出,第 1、2、3 次纯化后的 R_2/R_1 分别为 1.75、1.95、4.40,表明菌种越纯,产生的淀粉酶越多,水解圈越大,酶活性越大。

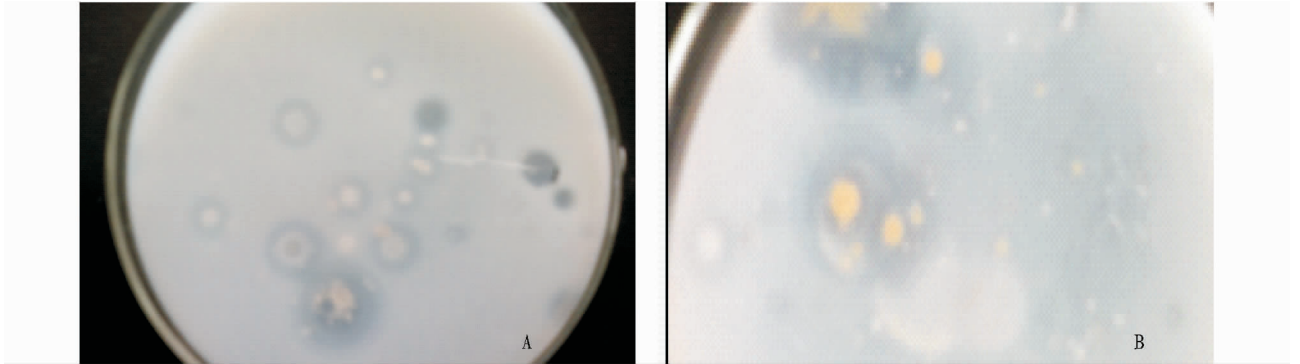
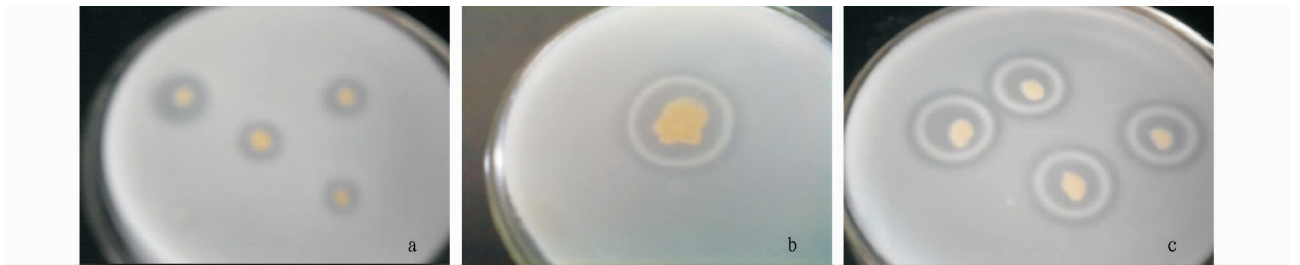


图 1 土壤微生物产生的水解圈

Fig. 1 Hydrolyzation circles produced by soil microorganisms



注:a. 第 1 次纯化;b. 第 2 次纯化;c. 第 3 次纯化。

Note:a. The first purification;b. The second purification;c. The third purification.

图 2 纯化后的细菌 A

Fig. 2 Purified bacterium A

表 1 细菌 A 3 次纯化效果

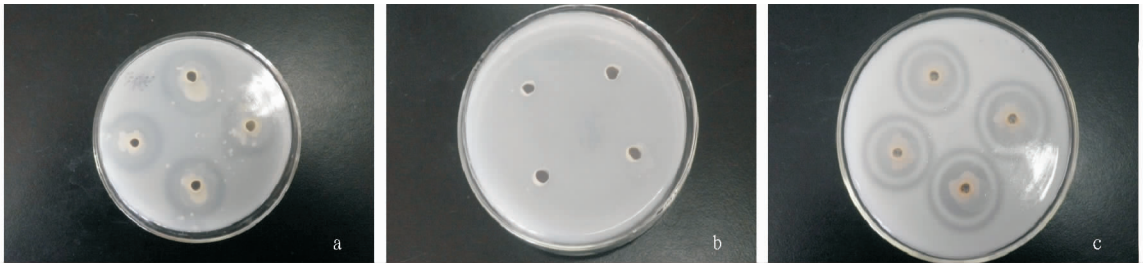
Table 1 Purification effects of bacterium A

纯化次数 Purification	菌种直径 Diameter of the strain//cm	菌种平均直径(R_1) Average diameter of the strain//cm	水解圈直径 Diameter of a hydrolyzation circle//cm	水解圈平均直径(R_2) Average diameter of hydrolyzation circles//cm	R_2/R_1
第 1 次 The first time	0.40	0.40	1.00	0.70	1.75
	0.50		0.70		
	0.40		0.60		
	0.30		0.50		
第 2 次 The second time	1.10	1.05	2.00	2.05	1.95
	1.00		2.10		
第 3 次 The third time	0.40	0.45	1.80	1.98	4.40
	0.50		2.10		
	0.50		2.10		
	0.40		1.90		

2.3 不同培养条件对产淀粉酶能力的影响

2.3.1 不同碳源的影响。不同碳源的培养效果见图 3。从表 2 可知,经过不同碳源的培养,以葡萄糖、蔗糖和淀粉为碳

源的培养基 R_2/R_1 分别为 0、2.42 和 2.69,表明细菌 A 不能在以葡萄糖为碳源的培养基上生长,能在以蔗糖为碳源的培养基上生长,但效果没有以淀粉为碳源的培养基上更明显。



注:a.以蔗糖为碳源,b.以葡萄糖为碳源,c.以淀粉为碳源。

Note:a. Sucrose;b. Glucose;c. Starch.

图 3 不同碳源的培养效果

Fig. 3 Effects of various carbon sources on the ability to produce amylase

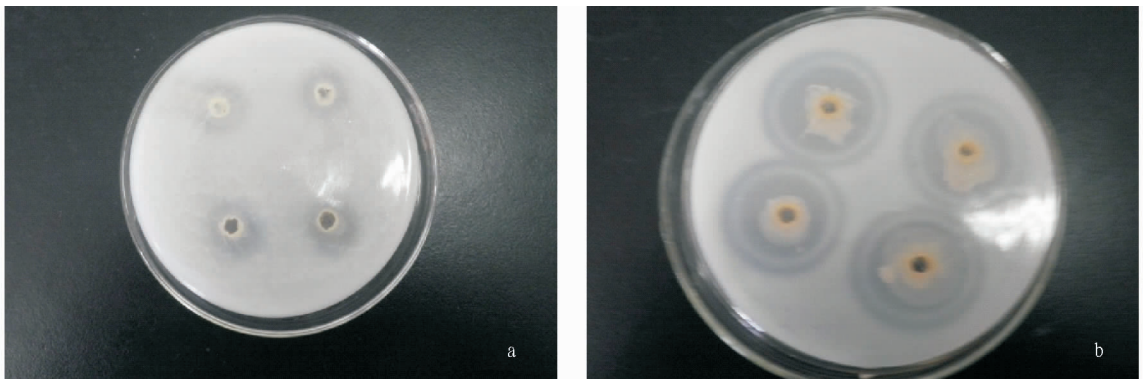
表 2 不同碳源条件下产酶效果

Table 2 Effects of various carbon sources on amylase production

碳源 Carbon source	菌种直径 Diameter of the strain//cm	菌种平均直径(R_1) Average diameter of the strain//cm	水解圈直径 Diameter of a hydrolyzation circle//cm	水解圈平均直径(R_2) Average diameter of hydrolyzation circles//cm	R_2/R_1
葡萄糖 Glucose	0.50	0.50	0	0	0
葡萄糖 Glucose	0.50		0		
葡萄糖 Glucose	0.50		0		
葡萄糖 Glucose	0.50		0		
蔗糖 Sucrose	1.00	1.12	2.20	2.72	2.42
蔗糖 Sucrose	1.50		3.20		
蔗糖 Sucrose	1.00		2.80		
蔗糖 Sucrose	1.00		2.70		
淀粉 Starch	1.00	1.05	3.00	2.82	2.69
淀粉 Starch	1.10		2.80		
淀粉 Starch	1.10		2.80		
淀粉 Starch	1.00		2.70		

2.3.2 不同氮源的影响。不同氮源的培养效果见图 4。从表 3 可知,经过不同氮源的培养,以硫酸铵、硝酸钠为氮源的培养基 R_2/R_1 分别为 2.54、2.69,表明细菌 A 能在以硫酸铵

为氮源的培养基上生长并能产生水解圈,以硝酸钠为氮源的培养基产生的水解圈更大更明显。



注:a.以硫酸铵为氮源,b.以硝酸钠为氮源。

Note:a. Ammonium sulfate;b. Sodium nitrate.

图 4 不同氮源的培养效果

Fig. 4 Effects of various nitrogen sources on the ability to produce amylase

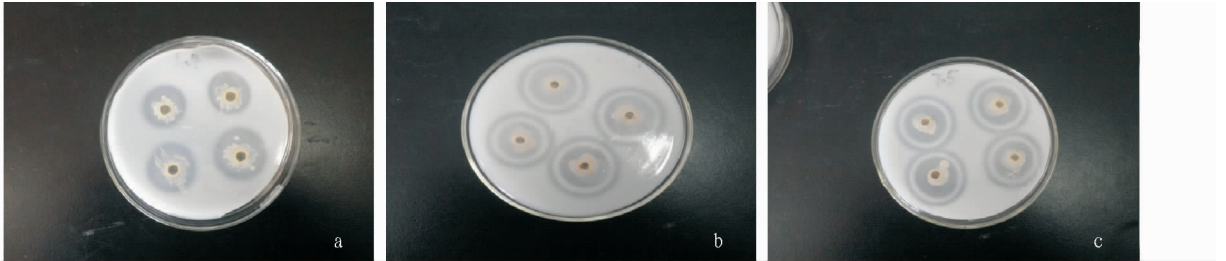
2.3.3 不同 pH 的影响。不同 pH 的培养效果见图 5。从表 4 可知,经过不同 pH 的培养,pH 为 6.4、7.0 和 7.5 的培养基 R_2/R_1 分别为 1.82、2.69 和 2.95,由此可知细菌 A 在 pH 为

7.0、7.5 的环境下 R_2/R_1 偏大,说明细菌 A 在中性或偏碱性的环境中生长旺盛。

表3 不同氮源条件下产酶效果

Table 3 Effects of various nitrogen sources on amylase production

氮源 Nitrogen source	菌种直径 Diameter of the strain//cm	菌种平均直径(R_1) Average diameter of the strain//cm	水解圈直径 Diameter of a hydrolyzation circle//cm	水解圈平均直径(R_2) Average diameter of hydrolyzation circles//cm	R_2/R_1
硫酸铵 Ammonium sulfate	0.50	0.52	1.5	1.32	2.54
硫酸铵 Ammonium sulfate	0.50		1.3		
硫酸铵 Ammonium sulfate	0.60		1.3		
硫酸铵 Ammonium sulfate	0.50		1.2		
硝酸钠 Sodium nitrate	1.00	1.05	3.0	2.82	2.69
硝酸钠 Sodium nitrate	1.10		2.8		
硝酸钠 Sodium nitrate	1.10		2.8		
硝酸钠 Sodium nitrate	1.00		2.7		



注:a. pH 为 6.4 ,b. pH 为 7.0,c. pH 为 7.5。

Note:a. pH. 6.4 ,b. pH. 7.0,c. pH. 7.5。

图5 不同 pH 的培养效果

Fig. 5 Influences of different pH values on the ability to produce amylase

表4 不同 pH 条件下产酶效果

Table 4 Effects of different pH values on amylase production

pH	菌种直径 Diameter of the strain//cm	菌种平均直径(R_1) Average diameter of the strain//cm	水解圈直径 Diameter of a hydrolyzation circle//cm	水解圈平均直径(R_2) Average diameter of hydrolyzation circles//cm	R_2/R_1
6.4	1.10	1.22	2.10	2.22	1.82
6.4	1.00		2.00		
6.4	1.40		2.30		
6.4	1.40		2.50		
7.0	1.00	1.05	3.00	2.82	2.69
7.0	1.10		2.80		
7.0	1.10		2.80		
7.0	1.00		2.70		
7.5	1.00	1.05	3.00	3.10	2.95
7.5	0.90		3.20		
7.5	1.10		2.90		
7.5	1.20		3.30		

3 结论与讨论

(1) 产淀粉酶细菌 A 在以葡萄糖为碳源的培养基上不能生长,在以蔗糖和淀粉为碳源的培养基上 R_2/R_1 分别为 2.42 和 2.69,由此可知细菌 A 在以淀粉为碳源的培养基上产生的水解圈最大,说明细菌 A 在淀粉培养基上生长最好。

(2) 细菌 A 在以硫酸铵、硝酸钠为氮源的培养基上 R_2/R_1 分别为 2.54、2.69,说明细菌 A 在这 2 种氮源上都能生长,以硝酸钠为氮源的培养基更适合细菌 A 的生长。

(3) 细菌 A 在 pH 为 6.4、7.0 和 7.5 的培养基上 R_2/R_1 分别为 1.82、2.69 和 2.95,说明 pH 在 6.4~7.5,随着 pH 的增大, R_2/R_1 不断增大,细菌 A 的活性也越来越大。

综上所述,细菌 A 在以淀粉为碳源、硝酸钠为氮源、pH 在 7.5 时 R_2/R_1 偏大,在此培养基上细菌 A 的生长旺盛。

参考文献

- [1] 李树本. 酶化学[M]. 北京:化学工业出版社,2008.
- [2] 梅牙合,岑沛磷. 现代酶工程[M]. 北京:化学工业出版社,2006.
- [3] 孙军社,江正强,刘萍. 酶与酶工程及其应用[M]. 北京:化学工业出版社,2006.
- [4] 陈金春,陈国强. 微生物实验指导[M]. 北京:清华大学出版社,2005.
- [5] 杨革,陈营,王淑芳. 微生物实验教程[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2003.
- [6] 张玲,韩珍琼,任飞,等. 微生物实验指导[M]. 北京:北京交通大学出版社,2007.
- [7] 陈炜,董秀芳. 微生物学及实验实训技术[M]. 北京:化学工业出版社,2007.
- [8] 赵斌,何绍江. 微生物学实验[M]. 5 版. 北京:科学出版社,2005.
- [9] 唐丽杰,马波. 微生物学实验[M]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2005.
- [10] 刘国生,李学梅,王振宇. 微生物学实验技术[M]. 北京:科学出版社,2007.