

# 热稳定 $\beta$ -淀粉酶 高产菌株选育及发酵条件研究

周蓓芸 王 峥 孔德育 郑幼霞

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

**摘 要** 从土壤中分离得到一株高温放线菌  $V_4$  菌株 (*Thermoactinomyces* sp.  $V_4$ ), 经测定能产生热稳定  $\beta$ -淀粉酶。 $V_4$  菌株经过热诱变获得一株具高活力  $\beta$ -淀粉酶的变异株  $A_{61}$ , 产酶活力从 400u/ml 提高到 1000u/ml。 $A_{61}$  菌株产生的  $\beta$ -淀粉酶最适反应温度为 60℃, 酶的热稳定性良好, 50℃保温 4 小时不失活, 55℃保温 2 小时仍具有最初活力的 96%。

**关键词**  $\beta$ -淀粉酶, 诱变, 发酵

目前工业用  $\beta$ -淀粉酶主要来自植物资源如麦芽、高粱、大豆、甘薯等。随着人民生活水平的不断提高, 高麦芽糖浆、纯麦芽糖浆的需求量越来越大, 相应的粮食消耗也越来越多。70 年代以来, 国外陆续报道了一些由微生物产生的  $\beta$ -淀粉酶<sup>[1-4]</sup>。但它们都不具耐热性, 没有工业应用的价值。前些年, 我们对产生  $\beta$ -淀粉酶的微生物进行了筛选, 得到一株产生热稳定  $\beta$ -淀粉酶的菌株, 并对酶的各种性质进行了研究<sup>[5,6]</sup>。本文主要报道产高活力  $\beta$ -淀粉酶菌种的选育及其发酵条件的研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

高温放线菌  $V_4$  菌株 (*Thermoactinomyces* sp.  $V_4$ ) 从采自云南的土样中分离得到。

### 1.2 培养基

1.2.1 SP 斜面培养基 (%):  $\text{KNO}_3$  0.1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05;  $\text{NaCl}$  0.05;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001; 蛋白胨 1; 可溶性淀粉 2, pH7—7.2。

1.2.2 ST 发酵培养基 (%): Tryptone 0.5;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.05;  $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1; 可溶性淀粉 3; 酵母膏 0.5。

1.2.3 工业培养基: 将 ST 培养基中的 Tryptone 及可溶性淀粉分别换成黄豆饼粉及玉米粉。

### 1.3 方 法

1.3.1  $\beta$ -淀粉酶活力测定: 参考文献 [5] 的方法。

1.3.2 孢子悬液制备: 将培养在一只茄子瓶内的菌体孢子刮入无菌水中, 用消毒纱布过滤制成均匀的悬液, 定容至 40ml。

1.3.3 干重测定: 隔时取一定体积培养液, 抽滤烘干至恒重。

1.3.4 菌体培养: 250ml 三角烧瓶中装入 50ml 发酵培养基, 接入 2ml 孢子液, 45℃, 150r/min ( $V_4$  菌株发酵条件研究) 或 250r/min ( $A_{61}$  菌株发酵条件研究) 培养 48 小时。

## 2 结果

### 2.1 高温放线菌 $V_4$ 菌株发酵条件的研究

2.1.1  $V_4$  菌株生长曲线及产酶周期的测定: 菌体培养后经干重测定显示,  $V_4$  菌株的生长速度很快, 在 15 小时内完成对数生长, 转入稳定期, 这有利于工业发酵, 可缩短生产周期 (图 1)。进一步的实验表明,  $\beta$ -淀粉酶在菌体生长稳定期后大量分泌合成, 在 48 小时达到稳定 (图 2)。

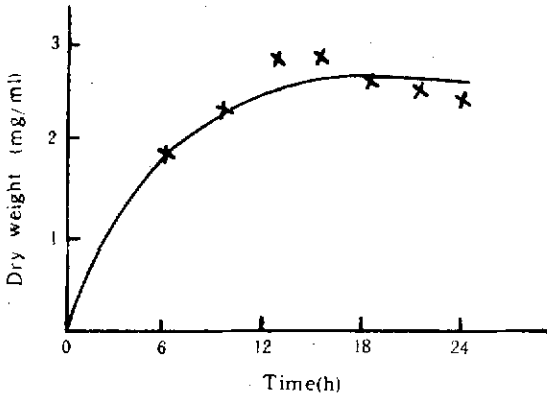


图 1  $V_4$  菌株生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Thermoactinomyces* sp.  $V_4$

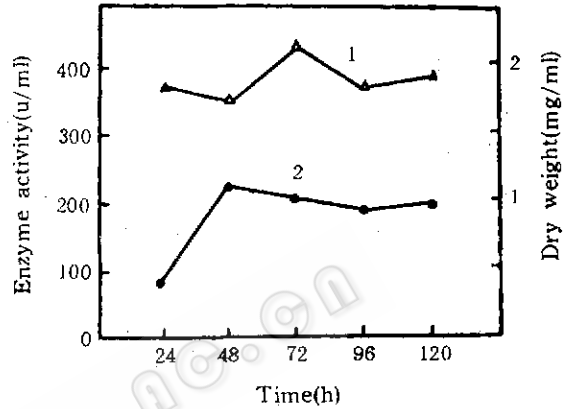


图 2  $V_4$  菌株产酶曲线

Fig. 2 Enzyme production curve of *Thermoactinomyces* sp.  $V_4$

1. Dry weight, 2. Enzyme activity

2.1.2 发酵温度的确定: 将接种  $V_4$  菌株孢子后的 ST 发酵培养基分别在 28、37、45 $^{\circ}$ C 摇床培养, 测定酶活力, 结果表明, 在 28 $^{\circ}$ C 菌体不生长, 无酶产生; 37 $^{\circ}$ C 菌体生长缓慢, 产酶极少; 45 $^{\circ}$ C 产酶显著提高。由于实验条件的限制, 没有在更高温度下发酵。

2.1.3 碳源试验: 将 ST 发酵培养基中的淀粉换成别的碳源, 浓度为 2%, 培养后测酶活力。表 1 结果表明: 脱胚玉米粉完全可以替代可溶性淀粉。进一步的实验表明, 2—3% 浓度的脱胚玉米粉作碳源产酶最为理想。

表 1 不同碳源对  $V_4$  菌株产  $\beta$ -淀粉酶的影响

Table 1 Effect of various carbohydrates on  $\beta$ -amylase production

Carbohydrates	Glucose	Fructose	Arabinose	Xylose	Sucrose	Maltose	Dextrin	Soluble starch	Cornmeal (Deembryoed)	Corn meal	Factose
Enzyme activity (u/ml)	0	0	0	0	0	140	120	150	168	96	0

2.1.4 氮源试验: ST 发酵培养基中的胰蛋白胨换成不同种有机及无机氮源 (含氮量一致), 发酵培养后测酶活力, 结果 (表 2) 表明: 黄豆饼粉、胰蛋白胨牛肉膏作氮源较好, 但从工业生产考虑, 用黄豆饼粉作为工业发酵用氮源, 试验显示 2% 左右的黄豆饼粉含量最为合适。

2.1.5 不同通气量对产酶的影响: 不同体积的 ST 发酵培养基分别装入 250ml 三角烧瓶

表2 氮源对V<sub>4</sub>菌株产β-淀粉酶的影响

Table 2 Effect of various nitrogen compounds on β-amylase production

Nitrogen sources	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Casein hydrolyzate	Soy meal	Peptone (fish)	Polypeptone	Tryptone	Beef extract
Enzyme activity (u/ml)	118	94	120	92	104	142	46	104	132	146

中,接入V<sub>4</sub>菌株孢子液,培养后测酶活力。结果(表3)显示随着培养基体积的减小,菌体产酶能力增加,说明V<sub>4</sub>菌株产β-淀粉酶时需较高的通气量。

表3 培养基体积对V<sub>4</sub>菌株产酶的影响

Table 3 Effect of medium volume on β-amylase production

Volume (ml)	30	40	50	60	70
Enzyme activity (u/ml)	348	238	176	160	116

表4 不同pH对V<sub>4</sub>菌株产酶的影响

Table 4 Effect of pH on β-amylase production

pH	4	5	6	7	8	9
Enzyme activity (u/ml)	0	40	104	244	280	264

2.1.6 不同pH对产酶的影响:ST发酵培养基分别用HCl,NaOH调至不同的pH,接种V<sub>4</sub>菌株孢子液后培养,测酶活力。表4结果显示:培养基pH为8时,产酶最高。

2.1.7 不同碳氮比对产酶的影响:配制不同碳氮比的发酵培养基,分别在pH7和pH8的条件下发酵。酶活力测定的结果表明:当碳氮比为2/0.5,2/1.5时,产酶情况较好。

在pH7时,以2/0.5更好,pH8时,则以2/1.5更好。这样通过发酵条件的研究,与原始ST培养基相比,菌株产酶能力提高了近一倍(表5)。

表5 碳源/氮源对V<sub>4</sub>菌株产酶的影响

Table 5 Effect of corn meal/soy meal on β-amylase production

Initial pH	Corn meal (%)	Soy meal (%)	Enzyme activity (u/ml)	Final pH
7	2	0.5	369	7.2
		1	140	7.2
		1.5	320	7.3
8	2	0.5	312	7.5
		1	64	6.4
		1.5	356	7.5

菌A<sub>6</sub>菌株(*Thermoactinomyces* sp. A<sub>6</sub>)。在同样的实验条件下可见A<sub>6</sub>菌株的酶活力比V<sub>4</sub>菌株提高了一倍。

2.2.2 自然分离:将A<sub>6</sub>菌株进行单菌分离,再进行发酵试验,选出一株酶活在700u/ml左右的A<sub>61</sub>菌株。

以上高产菌株选育谱系如下:野生型V<sub>4</sub>菌株(*Thermoactinomyces* sp. V<sub>4</sub>, 179u/ml)→加热(100℃,30min)→A<sub>6</sub>菌株(*Thermoactinomyces* sp. A<sub>6</sub>, 389u/ml)→自然分离→A<sub>61</sub>菌株(*Thermoactinomyces* sp. A<sub>61</sub>, 729u/ml)

从以上的结果可知:用热处理对高温放线菌进行诱变是十分有效的方法,不仅提高了菌体产酶能力,且十分稳定。同时也说明这一菌株对热有一定的抵抗力,在100℃(30分钟)的环境下仍能存活。另外自然分离也是十分有效的方法,选出的菌株产酶活力高且稳定。

2.2 高酶活力和热稳定β-淀粉酶菌株的筛选

2.2.1 热诱变:将V<sub>4</sub>菌株的孢子液在100℃(沸水浴)加热30分钟,稀释后在SP培养基上涂平板,50℃培养一天,用碘液染色。选出淀粉水解透明圈较大的菌落,用ST培养基pH7进行发酵。结果表明,热诱变的致死率为99.993%并选出了一株产酶较高的菌株(表6)。命名为高温放线

表 6  $V_1$  菌株与  $A_{61}$  菌株产  $\beta$ -淀粉酶试验Table 6 Comparative test of  $\beta$ -amylase production between  $V_1$  and  $A_{61}$ 

Batch	$\beta$ -amylase activity (u/ml)	
	$A_{61}$	$V_1$
1	416	292
2	594	190
3	408	252
Average	389	179

由此说明: 热处理诱变得到的  $A_{61}$  菌株产生的酶和原始出发菌株  $V_1$  所产生的  $\beta$ -淀粉酶一样, 其热稳定性是一致的。

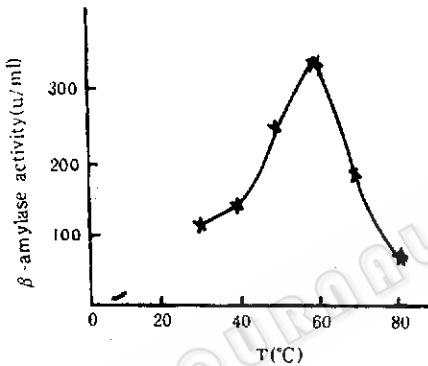


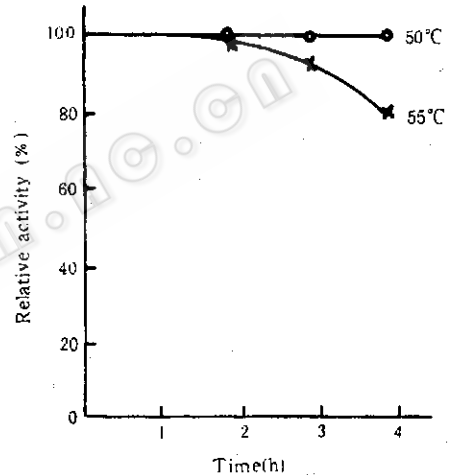
图 3 酶的最适反应温度

Fig. 3 Optimal temperature of  $\beta$ -amylase

### 2.3 $A_{61}$ 菌株产生的 $\beta$ -淀粉酶的性质

2.3.1 酶的最适反应温度: 分别在 30、40、50、60、70、80°C 测定  $A_{61}$  菌株产生的  $\beta$ -淀粉酶活力, 结果 (图 3) 表明其最适温度为 60°C。

2.3.2 酶的热稳定性: 将  $\beta$ -淀粉酶分别在 50、55°C 保温, 不同时间取样测定酶活力。结果 (图 4) 显示: 酶在 50°C 保温 4 小时后不失活, 55°C 保温 2 小时后仍有最初活

图 4  $A_{61}$  菌株  $\beta$ -淀粉酶的热稳定性Fig. 4 Heat stability of  $\beta$ -amylase of strain  $A_{61}$ 

#### 2.3.2 酶对可溶性淀粉水解产物的纸层析:

$A_{61}$  菌株的  $\beta$ -淀粉酶经丙酮沉淀及 DEAE-Cellulose 离子交换树脂层析<sup>[5]</sup>得到纯化, 用纯化酶 (410u/ml) 2ml 与 2% 可溶性淀粉 2ml 在 55°C 反应水解, 取样进行层析<sup>[5]</sup>。结果显示最终水解产物为麦芽糖 (图 5)。

### 2.4 $A_{61}$ 菌株发酵条件的研究

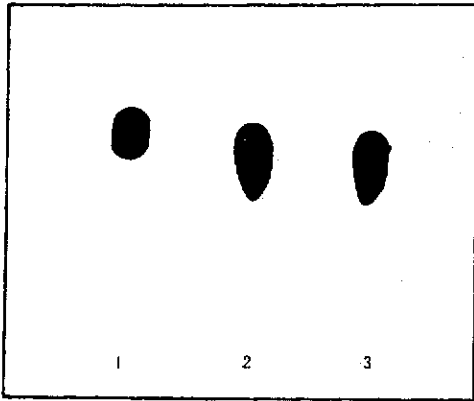
从  $A_{61}$  菌株产生的  $\beta$ -淀粉酶的性质可知: 热诱变只是提高了  $A_{61}$  菌株的产酶能力, 而对酶的性质无本质改变。 $A_{61}$  菌株产生的仍是热稳定的  $\beta$ -淀粉酶。因此, 为进一步提高  $A_{61}$  菌株的发酵能力, 我们研究了  $A_{61}$  菌株的最适发酵条件。

2.4.1 不同 pH 的工业发酵培养基对  $A_{61}$  菌株产酶的影响: 分别配制 pH4, 5, 6, 7, 8 的工业发酵培养基 (黄豆饼粉 1.5%, 玉米粉 3%), 发酵培养 (45°C, 250r/min, 48 小时) 后测酶活力, 结果显示 pH6 产酶良好, 而在 ST 培养基中, 与  $V_1$  菌株相同在 pH8 时产酶最好。

2.4.2 不同碳氮比的工业培养基对  $A_{61}$  菌株产酶的影响: 分别取碳氮比为 1, 2, 3 的 3

表7 不同碳氮比对  $A_{61}$  菌株产酶的影响Table 7 Effect of C/N on  $\beta$ -amylase production of strain  $A_{61}$ 

Soy meal (%)	3	1.5	1
Corn meal (%)	3	3	3
Enzyme activity (u/ml)	210	1078	945

图5  $A_{61}$  菌株  $\beta$ -淀粉酶对可溶性淀粉水解产物纸层析图Fig. 5 Paper chromatogram of starch hydrolytic product by  $A_{61}$   $\beta$ -amylase

1. Standard glucose
2. Standard maltose
3. Starch hydrolysate

Solvent system: Pyridine-n-butanol-water (4:6:3 V/V) visualized by aniline hydrogen phthalate reagent (105°C)

种工业培养基, pH 为 6, 接入  $A_{61}$  菌株的孢子, 在 45°C, 250r/min 发酵培养 48 小时, 测酶活力。结果 (表 7) 显示碳氮比为 2—3 时, 产酶能力最高。由此可见, 通过热诱变, 自然分离及发酵条件的研究, 菌株产  $\beta$ -淀粉酶的能力从  $V_4$  菌株在 ST 发酵培养基中的 179u/ml 提高到  $A_{61}$  菌株在工业发酵培养基中的 1078u/ml, 说明此酶活力的提高是大有潜力的。

## 参 考 文 献

- [1] Badal C S and Zeikus J G. *Biotechnology and Bioengineering*, 1989, 34: 299.
- [2] Shinke R *et al.* *J Ferment Technol*, 1975, 53(10): 698.
- [3] Murao S *et al.* *Agri Biol Chem*, 1979, 43(4): 719.
- [4] Higashihara M *et al.* *Agri Biol Chem*, 1974, 38(5): 1023.
- [5] 周蓓芸, 郑幼霞. *生物化学与生物物理学报*, 1990, 22(1): 95.
- [6] 周蓓芸, 郑幼霞. *生物工程学报*, 1991, 7(2): 148.

## Selection of High $\beta$ -amylase Producing Strain and Its Fermentation Conditions

Zhou Beiyun Wang Zheng Kong Deyu Zheng Youxia  
(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)

**Abstract** *Thermoactinomyces* sp.  $V_4$ , isolated from soil, can produce thermostable  $\beta$ -amylase. After heat treatment (100°C, 30 min), a mutant  $A_{61}$  producing 1000u/ml was obtained from *Thermoactinomyces* sp.  $V_4$ , which only produces 400u/ml  $\beta$ -amylase. Optimal temperature of  $\beta$ -amylase is at 60°C and is quite stable at 50°C. Ninety six percent of original activity was remained after treatment at 55°C.

**Key words**  $\beta$ -amylase, mutation, fermentation