

研究报告

淀粉酶高产菌株的筛选、紫外诱变及产酶条件优化

王传旭, 赵爱华, 于慧瑛, 王玲丽, 李云杰, 李新*

运城学院生命科学系, 山西 运城 044000

王传旭, 赵爱华, 于慧瑛, 王玲丽, 李云杰, 李新. 淀粉酶高产菌株的筛选、紫外诱变及产酶条件优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1759-1773

Wang Chuanxu, Zhao Aihua, Yu Huiying, Wang Lingli, Li Yunjie, Li Xin. Screening, UV mutagenesis, and production optimization of a strain with high yield of amylase[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1759-1773

摘要:【背景】提高淀粉酶的稳定性进而适应多变的工业生产条件, 是淀粉酶开发的重要方向。

【目的】淀粉酶在食品加工、布料退浆、酿酒制造、养殖等领域都有广泛的应用, 但目前生产用的淀粉酶来源单一, 在溶液中的稳定性较差, 需要扩大淀粉酶来源, 增强酶的稳定性, 使其进一步适应复杂多变的工业生产环境。【方法】利用选择培养基在三门峡黄河湿地表层土样中筛选得到 20 株具有淀粉酶活性的菌株, 采用杯碟法检测粗酶液的活性并对其中活性最高的 3 株菌进行鉴定, 对其中酶活性最高的菌株运用紫外照射的方式进行诱变并测定致死率, 选择突变后酶活最高的菌株, 优化培养条件, 并测定突变后淀粉酶的活性和作用条件范围。利用 3,5-二硝基水杨酸 (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法测定诱变前后酶活并进行活性对比。【结果】在三门峡黄河湿地表层土壤中筛选得到 3 株淀粉酶活性较高的菌株并编号 S03、S08 和 S17。根据 16S rRNA 基因序列比对、革兰氏染色形态观察结合生理生化分析显示, 菌株 S03、S08 和 S17 分别为 *Aeromonas*、*Exiguobacterium* 和 *Bacillus*, 其淀粉酶最适 NaCl 浓度是 10%–12%, 最适作用温度为 45 °C (S03、S17)和 25 °C (S08); 发酵 36 h 后, 菌株 S03 和 S17 的淀粉酶活性达到最大值, 菌株 S08 最佳的发酵时间为 42 h; 淀粉酶最适 pH 为 7.0–9.0。利用紫外诱变筛选到酶活性最高的菌株并编号 S17M。在 pH 为 8.0, 温度为 40 °C 时 S17M 生长情况较好; Mn^{2+} 、 Ti^{4+} 和 Mg^{2+} 对菌株的生长具有促进作用, Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Na^{+} 会抑制菌株的生长; 有机溶剂会抑制菌株生长, 其中甲醛和冰乙酸的抑制作用明显; 经紫外诱导筛选优化后, 菌株 S17M 淀粉酶在 NaCl 浓度为 8%–14%, pH 5.0–10.0, 15–55 °C 的温度范围内都具有较高的酶活性, 金属离子和有机溶剂的抑制作用减弱, 最大酶活性可以达到 195.62 U/mL, 是原始菌株的 3.19 倍。【结论】利用紫外诱变的方式可以显著提高酶活性

基金项目: 山西省教育厅科技创新项目(2019L0859); “特色农产品发展”学科群项目(XK-2019012); 山西省基础研究计划(自由探索类)(20210302123080)

Supported by: Science and Technology Innovation Project of Higher Education Institutions in Shanxi Province (2019L0859); Discipline Group Project of “Characteristic Agricultural Products Development” (XK-2019012); Basic Research Program in Shanxi Province (Free Exploration) (20210302123080)

*Corresponding author: E-mail: lixin-eva@163.com

Received: 2021-09-13; Accepted: 2021-10-29; Published online: 2022-01-18

和稳定性, 更适合环境条件变化剧烈的工业生产环境, 具有应用于不同工业生产条件的潜力。

关键词: 淀粉酶; 紫外诱变; 湿地; 稳定性

Screening, UV mutagenesis, and production optimization of a strain with high yield of amylase

WANG Chuanxu, ZHAO Aihua, YU Huiying, WANG Lingli, LI Yunjie, LI Xin*

Life Sciences Department, Yuncheng University, Yuncheng 044000, Shanxi, China

Abstract: [Background] It is an important goal for amylase development to improve the stability under variable industrial production conditions. [Objective] Amylase is widely used in food processing, desizing of cloth, brewing, and breeding industry. However, current amylase in industrial production features a few sources available and poor stability in solution. Thus, efforts should be made to expand the sources of amylase and enhance the stability of the enzyme so that it can adapt to the complex and changeable production environment. [Methods] A total of 20 strains with amylase activity were screened out from the surface soil of the Yellow River Wetland in Sanmenxia with a selective medium. The activity of the crude enzyme solution was detected with the cylinder plate method and 3 strains with high amylase activity were preliminarily identified. Among them, the strain with highest amylase activity was mutagenized by ultraviolet (UV) and the lethality rate was determined. The strain with the highest enzyme activity after mutagenesis was selected. Then the culture conditions were optimized, and the activity of amylase after mutation and the ranges of action conditions were determined. 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method was used to determine the enzyme activity before and after mutation for a comparison. [Results] The 3 strains with high amylase activity were numbered S03, S08, and S17. The 16S rRNA gene sequence alignment, Gram staining, and physiological and biochemical characterization revealed that strains S03, S08, and S17 are members of *Aeromonas*, *Exiguobacterium*, and *Bacillus*, respectively. The optimal NaCl concentration for the amylase was 10%–12%, and the optimal temperature was 45 °C (S03, S17) and 25 °C (S08). Moreover, the optimal pH was 7.0–9.0, and the optimal fermentation time was 36 h (S03 and S17) and 42 h (S08). After UV mutagenesis, the strain with the highest enzyme activity was screened out and marked as S17M. S17M grew well at pH of 8.0 and 40 °C. Mn^{2+} , Ti^{4+} , and Mg^{2+} promoted the growth of S17M, while Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Na^{+} , and organic solvents (particularly formaldehyde and glacial acetic acid) inhibited it. S17M demonstrated high amylase activity in the presence of NaCl at 8%–14%, at pH of 5.0–10.0, and at 15–55 °C, and the inhibitory effect of metal ions and organic solvents was decreased. The maximum enzyme activity was up to 195.62 U/mL, 3.19 folds that of the original strain. [Conclusion] UV mutagenesis can significantly improve enzyme activity and stability, so that the resultant enzyme can adapt to the variable industrial production environments. Thus, it has the potential to be applied to different industrial production conditions.

Keywords: amylase; ultraviolet mutagenesis; wetland; stability

淀粉是一种多糖, 主要储存在高等植物中。淀粉和淀粉酶在食品加工、布料退浆、酿酒制造、养殖等领域都有广泛的应用^[1-2]。同时, 淀粉作为一种可再生、可生物降解的天然原料, 其应用日益得到重视。淀粉酶可以水解淀粉分子内的 α -1,4-糖苷键或者 α -1,6-糖苷键得到葡萄糖、寡糖或者糊精等产物^[3]。根据淀粉酶的水解方式、水解产物或者不同来源, 淀粉酶可以进行不同的命名, 如内切型淀粉酶和外切型淀粉酶、糊精酶和低聚糖酶、细菌淀粉酶和动物淀粉酶等^[4]。微生物是淀粉酶的重要来源, 细菌、真菌和古菌均可以产生具有较高酶活性和特殊抗性的淀粉酶。如盐盒菌(*Haloarcu* sp.) S-1 所产淀粉酶在较高的 NaCl 浓度溶液中具有酶活性^[5], 而黏菌脱硫球菌(*Desulfurococcus mucosus*)可以在 100 °C 环境中产生具有酶活性的高温淀粉酶^[6], 这些特殊的酶性质在生产中具有极大的开发潜力。微生物淀粉酶以其易于大规模发酵和纯化等特点而被人们视为工业淀粉酶的重要来源, 相应的生物酶制剂产业发展迅速^[7]。

近年来, 我国酶制剂行业发展较快, 淀粉酶产业也有长足进步。然而与国外相比, 由于起步较晚, 我国的淀粉酶产业在种类和产量上相对偏少, 国际竞争力不强^[8-10]。为了适应不同行业对淀粉酶的巨大需求, 需要扩大淀粉酶菌株资源来源、提升淀粉酶产量及通过不同方法进一步提高酶活性。因此, 在不同的环境中筛选具有淀粉酶活性的资源菌株、通过优化产酶条件提升淀粉酶产量、利用物理方式如紫外、激光、超声波等方法和化学方式如各种碱基类似物、烷化剂等进行诱变筛选淀粉酶活性突变菌株, 是目前菌株资源开发的主要方式^[11]。

紫外线(ultraviolet, UV)可穿透细菌细胞直接作用于 DNA, 使得碱基无法正常配对,

造成基因突变, 提高筛选效率。紫外诱变具有成本低、操作简便、突变率高和安全性高等特点^[12], 是经常采用的菌株诱变育种方式。本实验中, 我们在前期已经初步筛选的具有淀粉酶活性的待选菌株中, 通过复选得到酶活性较高的菌株, 采用紫外诱变的方式进一步提高酶产量, 并利用优化菌株发酵条件和产酶条件的方式, 找到最佳培养方法, 使菌株的产酶能力得到显著提升, 为淀粉酶的工业化生产提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 菌株

实验中所使用的菌株分离自三门峡湿地表层泥土, 取 5.0 g 土样至 150 mL 已灭菌牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 经 37 °C、180 r/min 富集培养过夜, 富集后菌液经划线接种至添加 1%可溶性淀粉的牛肉膏蛋白胨固体选择培养基(培养基见本文 1.2 部分)上, 37 °C 恒温静置培养 48 h, 挑选分离清晰且加卢戈氏碘液后周边出现明显透明圈的单菌落分别转移至牛肉膏蛋白胨液体培养基中 37 °C、180 r/min 培养 48 h, 其粗酶液用于后续淀粉酶活性的初步测定。本次共利用选择培养基初步筛选得到 20 株具有淀粉酶活性的菌株, 分别编号 S01-S20。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

吐温-20、明胶、 α -萘酚、乙醇、H₂O₂、葡萄糖、甲醛、三氯甲烷, 洛阳昊华化学试剂有限公司; 冰乙酸(99%)、三(羟甲基)氨基甲烷, 天津市大茂化学试剂厂; 异丙醇、Ti(SO₄)₂、Fe₂(SO₄)₃、Na₂SO₄、FeSO₄、CuSO₄、MgSO₄、NaCl, 天津市瑞金特化学品有限公司; 对氨基苯胺、Tris-HCl 缓冲溶液(pH 6.8), 北京索莱宝科技有限公司; DNA Marker、DNA 聚合

酶、PCR 引物等, TaKaRa 公司; 卢戈氏碘液(5% I₂, 10% KI)和 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)试剂根据微生物学实验手册自配; 牛肉膏、蛋白胨, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 可溶性淀粉, 天津市致远化学试剂有限公司; 细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

PCR 扩增仪, Bio-Rad 公司; 高速台式冷冻离心机, 湖南湘仪离心机仪器有限公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 电热恒温培养箱, 金坛市华城恒磊实验仪器厂; 恒温干燥箱, 上海佑柯仪器设备有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; 分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; 恒温水浴锅、自动双重纯水蒸馏器, 上海亚荣生化仪器厂。

牛肉膏蛋白胨液体培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, NaCl 5.0, 蛋白胨 10.0, pH 7.0–7.2。

牛肉膏蛋白胨固体培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, NaCl 5.0, 蛋白胨 10.0, pH 7.0–7.2, 琼脂 22.0。

选择培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, NaCl 5.0, 蛋白胨 10.0, pH 7.0–7.2, 琼脂 22.0, 可溶性淀粉 10.0。

以上培养基经 0.1 MPa 灭菌 20 min 后使用。

1.3 方法

1.3.1 粗酶液的制备及酶活性的杯碟法测定

经初筛后所选择的菌株在牛肉膏蛋白胨液体培养基中 37 °C、180 r/min 培养 48 h, 将发酵液 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液, 保存于 4 °C 或立即用于实验分析。

采用杯碟法初步测定淀粉酶活性。杯碟法参考文献[13]并进行简单改进: 含 1%可溶性淀粉的选择培养基倒入培养平板中待其凝固, 用镊子将牛津杯摆放在培养基上, 将制备好的粗

酶液 200 μL 注入牛津杯中, 28 °C 培养 2 d, 观察有无透明圈并测量其直径。

1.3.2 产淀粉酶菌株的初步筛选及鉴定

(1) 产淀粉酶菌株初步筛选

利用杯碟法检测菌株 S01–S20 的产酶能力, 选取酶活性最高的 3 株菌作为出发菌株进行革兰氏染色形态观察、16S rRNA 基因比对分析、酶特性研究和紫外诱变处理。

(2) 革兰氏染色形态观察

革兰氏染色观察参考《微生物学实验(第 5 版)》^[14]进行, 取菌种涂片后干燥、固定; 滴加草酸铵结晶紫染液初染 1–2 min 后倾去染液, 水洗至流出水无色; 用卢戈氏碘液洗去清水后媒染 1 min, 倾去染液, 水洗至流出水无色; 用滴管流加 95%乙醇 20–30 s 至流出乙醇无色; 用番红染液复染 2 min, 水洗后加盖玻片镜检观察。

(3) 菌株 16S rRNA 基因序列比对分析

利用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒, 按照说明书要求提取菌株总 DNA。利用提取的菌株总 DNA 作为模板, 选用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增。PCR 反应体系: 基因组总 DNA (约 30 mg/L) 1.0 μL, 10×PCR Buffer 2.0 μL, dNTPs (0.02 mol/L) 1.6 μL, 正、反向引物(10 μmol/L)各 1.0 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.125 μL, 加灭菌 ddH₂O 至 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 6 min; 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物送至北京三博远志生物技术有限责任公司完成测序。测序结果提交至 GenBank 获得基因登录号并进行 BLAST 比对分析, 在分析结果中选取同源性较高的相关序列进行多重序列比对并利用 MEGA 7.0 软件制

作系统发育树, 对菌株进行系统发育分析。

(4) 菌株生理生化鉴定

明胶水解试验: 用接种针粘少量已活化的菌体用穿刺法自培养基中心垂直刺入培养基(加1%明胶)中, 穿刺到试管底部按接种线将针拔出。然后将实验管和2支未接种的空白对照管一起放入37℃培养箱培养2d并观察结果。

酯酶试验: 牛肉膏蛋白胨固体培养基中加入1%的吐温-20, 菌株划线接种后37℃培养2d, 待形成明显的菌落后, 观察有无晕圈出现。

氧化酶试验: 菌株接种后置于37℃培养, 待形成明显的菌落后, 将0.2 mL 1% α -萘酚乙醇溶液与0.2 mL 对氨基苯胺盐酸溶液(1%)混匀, 滴加到菌落上, 待溶液浸没菌落后, 观察是否出现深蓝色。

过氧化氢酶试验: 将3%的 H_2O_2 滴入到含有菌液的试管中, 观察是否有气泡产生。

1.3.3 淀粉酶粗酶特性研究

最适 NaCl 浓度: 在不同 NaCl 浓度下(8%、10%、12%和14%)利用杯碟法检测透明圈直径并统计作图。**最适作用温度:** 在不同温度下(15、25、35、45和55℃)利用杯碟法检测透明圈直径并统计作图。**发酵时间:** 菌种培养不同时间(24、30、36、42和48 h)后提取粗酶液, 利用杯碟法检测透明圈直径并统计作图。**最适作用 pH:** 不同 pH 值(6.0、7.0、8.0、9.0、10.0)下利用杯碟法检测透明圈直径并统计作图。

1.3.4 紫外诱变选育

初筛所选的菌株经活化培养后制成菌悬液, 均匀加入到已经灭菌的平板中(不加盖), 在超净工作台中经30 W紫外灯照射(照射时间分别为0、30、60、120和240 s)。完成后, 将平板内的菌液抽取移入已经灭菌的离心管内,

并立即放入冰水混合物中^[15]。在黑暗条件下, 将培养后的菌液涂布于牛肉膏蛋白胨固体培养基, 37℃恒温静置培养72 h。培养完成后对每一个培养基表面的紫外诱变后菌株进行计数并计算诱变的致死率。诱变后菌株挑取至牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 37℃、180 r/min 振荡培养72 h, 提取粗酶液利用杯碟法测定酶活性, 选取酶活性最高的菌株进行培养条件优化, 并检测不同条件对酶活性的影响。

1.3.5 目标菌株的培养条件测定

培养基初始 pH 对菌株生长的影响: 调节牛肉膏蛋白胨液体培养基的初始 pH 值为3.0–11.0, 取活化的菌液, 分别接种100 μ L到20 mL不同 pH 值的培养基中, 37℃、180 r/min 培养3 d, 测定菌液在波长600 nm处的 OD 值, 以考察培养基的初始 pH 值对菌株生长的影响。**温度对菌株生长的影响:** 取活化的菌液, 接种100 μ L到20 mL牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 分别置于20–50℃、180 r/min 下培养3 d, 测定菌液在波长600 nm处的 OD 值, 以考察不同温度对菌株生长的影响。**不同金属离子对菌株生长的影响:** 取活化的菌液, 接种100 μ L到20 mL牛肉膏蛋白胨液体培养基, 液体培养基中分别添加10 mmol/L 金属离子(Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ti^{4+} 、 Na^+ 和 Mg^{2+})并置于最适温度180 r/min 下培养3 d, 测定菌液在波长600 nm处的 OD 值, 以考察不同金属离子对菌株生长的影响。**有机溶剂对菌株生长的影响:** 取活化的菌液, 接种100 μ L到20 mL牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 液体培养基中分别添加10 mmol/L 有机溶剂(三氯甲烷、甲醛、冰乙酸、异丙醇和三氨基甲烷), 分别置于最适温度180 r/min 下培养3 d, 测定菌液在波长600 nm处的 OD 值, 以考察不同有机溶剂对菌株生长的影响。

1.3.6 诱变后酶活性测定

将诱变后的菌株在最适条件下培养 3 d, 提取粗酶液进行酶活性测定。NaCl 浓度对淀粉酶活性的影响: 在不同 NaCl 浓度条件下(8%、10%、12%和 14%)利用杯碟法检测透明圈直径并统计作图。pH 对淀粉酶活性的影响: 在不同 pH 条件下(3.0–11.0)利用杯碟法检测透明圈直径并统计作图。温度对淀粉酶活性的影响: 在不同温度下(15–55 °C)利用杯碟法检测透明圈直径并统计作图。金属离子对淀粉酶活性的影响: 在不同金属离子条件下(Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ti^{4+} 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 各 10 mmol/L)利用杯碟法检测透明圈直径并统计作图。有机溶剂对淀粉酶活性的影响: 在不同有机溶剂条件下(三氯甲烷、甲醛、冰乙酸、异丙醇、三氨基甲烷各 10 mmol/L)利用杯碟法检测透明圈直径并统计作图。

1.3.7 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^[16]。1 个酶活力单位(U)是指在最适反应温度时反应 15 min 降解可溶性淀粉释放 1 mg 葡萄糖所需要的酶量。计算酶活公式: 酶活= CVN/t , 其中 C 为酶反应液中葡萄糖浓度, 单位为 mg/mL; 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。

2 结果与分析

2.1 产淀粉酶菌株的初步筛选与鉴定

2.1.1 产淀粉酶菌株的初步筛选

在三门峡黄河湿地表层土层中利用牛肉膏蛋白胨选择培养基筛选出 20 株具有不同产淀粉酶能力的菌株, 分别命名 S01–S20。利用杯碟法检测该 20 株产酶菌发酵液中的酶活性, 可以看到不同菌株产酶能力差别较大, 其透明

圈直径分布在 0.4–2.7 cm 之间。酶活性最强的 3 株菌分别是 S17、S03 和 S08, 透明圈直径分别为 2.7、2.4 和 2.0 cm (表 1)。

2.1.2 形态观察及菌株初步鉴定

镜检结果分析显示菌株 S03 和 S08 均为革兰氏阴性菌株, 形态为短杆状, 菌株 S17 为革兰氏阳性菌株, 短杆状(图 1)。经 PCR 扩增菌株 S03、S08 和 S17 的 16S rRNA 基因, 获得大小分别为 995、1 453 和 856 bp 的基因片段并提交测序结果至 GenBank (登录号: OK135350–OK135352)。将比对结果利用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树, 结果表

表 1 产淀粉酶菌株初步筛选

Table 1 Preliminary screening of strains producing amylase

菌株编号 Strain No.	透明圈直径 Transparent circle diameter (cm)
S01	1.8
S02	1.6
S03*	2.4
S04	0.4
S05	0.8
S06	1.3
S07	1.9
S08*	2.0
S09	1.6
S10	1.7
S11	1.4
S12	0.6
S13	0.5
S14	1.2
S15	0.7
S16	0.5
S17*	2.7
S18	1.3
S19	1.5
S20	1.1

注: *: 筛选的菌株淀粉酶活性较强

Note: *: The selected strains with high amylase activity.

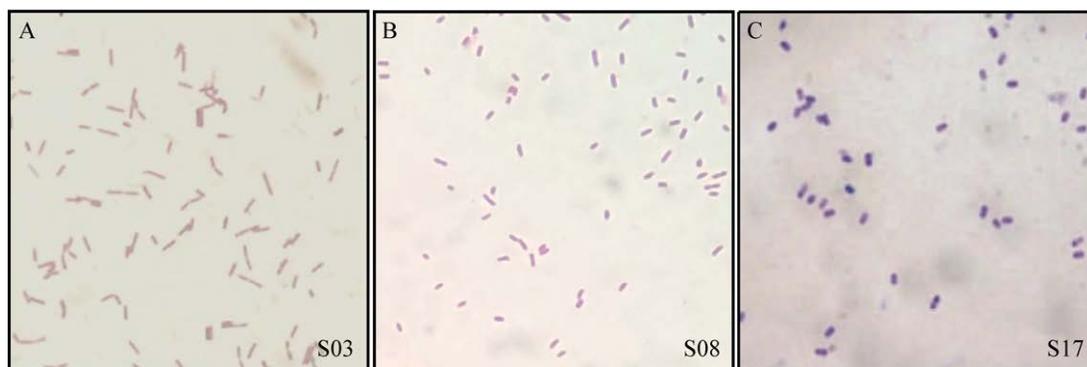


图 1 菌株 S03 (A)、S08 (B)和 S17 (C)革兰氏染色结果

Figure 1 Gram staining for strains S03 (A), S08 (B) and S17 (C).

明, 菌株 S03、S08 和 S17 分别与 *Aeromonas*、*Exiguobacterium* 和 *Bacillus* 内各种的一致性较高, 可以达到 98.0%–99.0%, 系统进化分析归于同一分支(图 2), 由此初步确定菌株 S03、S08 和 S17 分别为 *Aeromonas*、*Exiguobacterium* 和 *Bacillus* 成员。生理生化鉴定结果显示, S03 和 S08 可以分解明胶, S03 具有脂酶活性, S03 和 S17 具有过氧化氢酶活性, 3 种菌均具有氧化酶活性(表 2)。

2.2 菌株 S03、S08 和 S17 所产淀粉酶特性

2.2.1 最适 NaCl 浓度

随着环境中 NaCl 浓度的梯度增加, 各菌株所产淀粉酶活性均有明显变化, 说明该淀粉酶受 NaCl 浓度影响较大。各淀粉酶具有不同的活性表现, 菌株 S03 和 S17 的淀粉酶在 NaCl 浓度为 12% 时具有最高酶活性, 之后随盐浓度升高酶活开始下降, 尤其菌株 S17 的酶活性下降比较明显。菌株 S08 的淀粉酶在 NaCl 浓度为 10% 时活性最高, 之后随 NaCl 浓度升高活性不断下降。由统计数据可以看出, 菌株 S03 和 S17 的淀粉酶最适 NaCl 浓度是 12%, 菌株 S08 的淀粉酶最适 NaCl 浓度是 10% (图 3)。

2.2.2 最适反应温度

温度对淀粉酶活性影响较大。由统计数据可以看出, 3 种淀粉酶在 15–55 °C 的温度环境中均有一定的活性, 说明 3 种酶都具有宽泛的作用温度范围, 在较高温度(55 °C)下, 3 种酶都可以达到甚至超过筛选阶段的最高酶活。在 15–45 °C 阶段, 菌株 S03 和 S17 的淀粉酶活性迅速提高, 在 45 °C 时达到最高值且活性远远超过筛选阶段(28 °C)。随着温度进一步上升, 酶活性开始下降, 说明菌株 S03 和 S17 的淀粉酶最适作用温度为 45 °C。菌株 S08 的淀粉酶最适作用温度为 25 °C, 为一种低温淀粉酶(最适作用温度 <30 °C)并随温度升高酶活性迅速下降(图 4)。

2.2.3 最适发酵时间

通过测定不同发酵时间的淀粉酶活性发现, 随着发酵时间的增加, 淀粉酶活性在不断提高, 发酵 36 h 后, 菌株 S03 和 S17 的淀粉酶活性达到最大值, 之后菌株 S03 的酶活性保持较稳定, 而菌株 S17 的酶活性开始下降。对于菌株 S08, 最佳的发酵时间为 42 h, 随着发酵的继续, 酶活性迅速下降(图 5)。

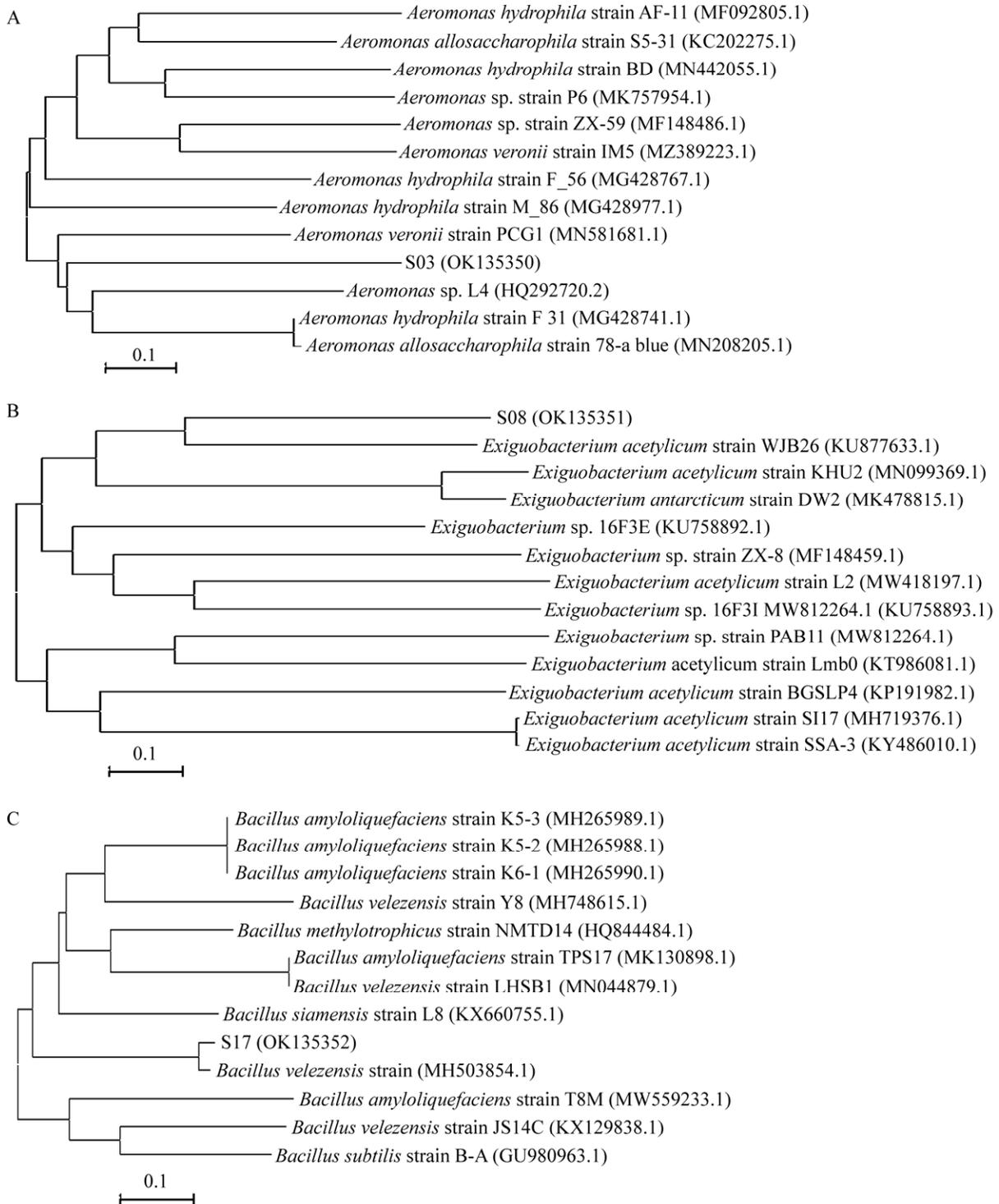


图 2 菌株 S03 (A)、S08 (B)和 S17 (C)基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 菌株后面的序号代表该菌株 16S rRNA 基因的 GenBank 登录号; 标尺刻度代表 10%的序列差异

Figure 2 Phylogenetic tree of strains S03 (A), S08 (B) and S17 (C) based on 16S rRNA gene sequences. The sequence number in the bracket means the GenBank accession No. of the strain; The scale bar on the tree represents the branch length equivalent to 10% nucleotide changes per residue.

表 2 菌株的生理生化鉴定

Table 2 Physiology and biochemistry characterization of the strains

Item	S03	S08	S17
明胶Gelatin	+	+	-
脂酶Lipase	+	-	-
氧化酶Oxidase	+	+	+
过氧化氢酶Catalase	+	-	+

注: +: 菌株具有相应的酶活性; -: 菌株不具备相应的酶活性

Note: +: The strain has corresponding enzymes activity; -: The strain has no corresponding enzymes activity.

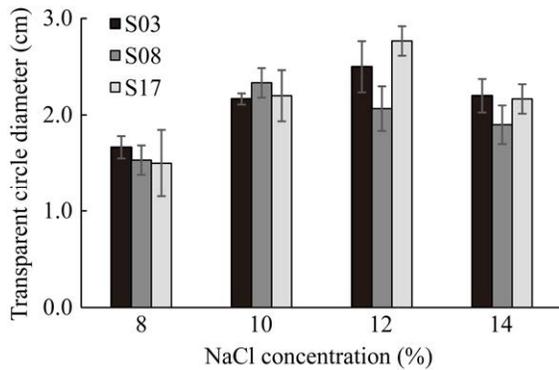


图 3 NaCl 浓度对淀粉酶活性的影响

Figure 3 Effects of NaCl concentration on amylase activity.

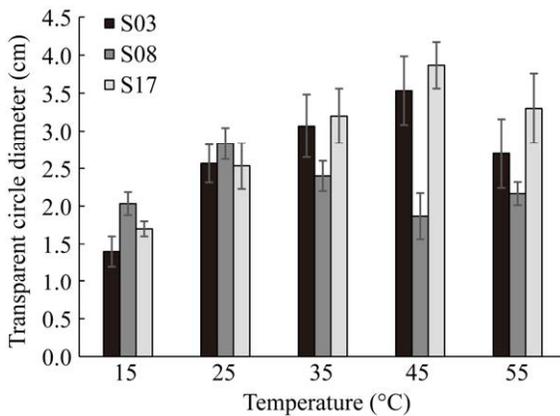


图 4 温度对淀粉酶活性的影响

Figure 4 Effects of temperature on amylase activity.

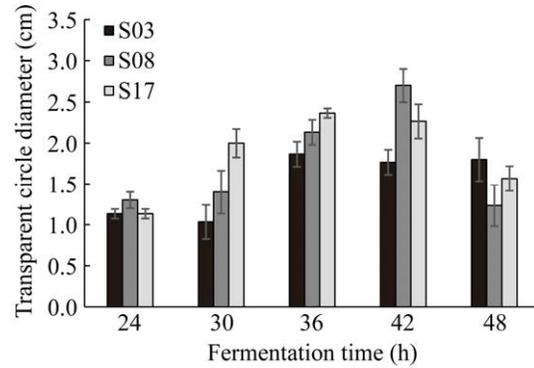


图 5 发酵时间对淀粉酶活性的影响

Figure 5 Effects of fermentation time on amylase activity.

2.2.4 最适 pH

3 种淀粉酶的最适 pH 均有差别。菌株 S03 的淀粉酶最适 pH 值为 9.0, 菌株 S08 的淀粉酶最适 pH 值为 8.0, 菌株 S17 的淀粉酶最适 pH 值为 7.0。在最适 pH 条件下, 3 种酶的活性均远大于其他 pH 范围内酶活性, 说明该淀粉酶对 pH 变化比较敏感(图 6)。

2.3 紫外诱变

前期结果表明菌株 S17 的淀粉酶活性较菌株 S03 和 S08 更高, 因此以 S17 为出发菌株进行紫外诱变选育。统计结果显示, 菌株在紫外照射 60 s 后致死率超过一半(75.0%), 在紫外照

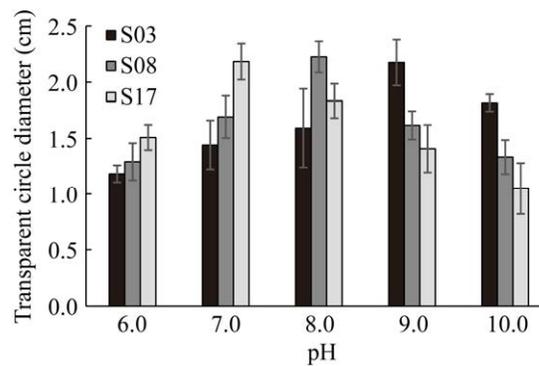


图 6 pH 对淀粉酶活性的影响

Figure 6 Effects of pH on amylase activity.

射 240 s 后致死率达到 96.1% (表 3)。选择诱变时间大于 60 s 的菌株分别培养, 杯碟法测定培养 3 d 后发酵液中淀粉酶活性。挑选酶活性最高的菌株(编号 S17M)进行培养条件和酶最适反应条件测定。

2.4 培养条件测定

不同的 pH 条件对菌株 S17M 的影响很大, S17M 更适合在偏中性的环境中生长。在 pH 值为 6.0–9.0 范围内, S17M 生长情况较好, 较强的酸性和碱性条件不利于菌株的生长, 菌株最适宜的生长 pH 为 8.0 (图 7)。温度对菌株 S17M 的影响也很明显, 菌株最适的生长温度为 40 °C, 过高或过低的培养温度均对 S17M 的生长不利(图 8)。金属离子对菌株 S17M 的影响不一, Mn^{2+} 、 Ti^{4+} 和 Mg^{2+} 对菌株的生长具有促进

表 3 诱变致死率

Table 3 Lethality rate of mutation

Item	紫外诱变时间 UV mutagenesis time (s)				
	0	30	60	120	240
S17 1	52	20	12	6	2
2	50	18	13	9	1
3	54	22	14	6	3
平均值	52	20	13	7	2
Average quantity					
死亡率	0.0	57.7	75.0	86.5	96.1
Mortality (%)					

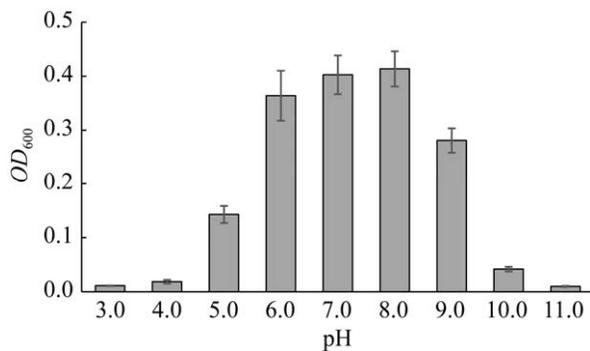


图 7 pH 对菌株 S17M 生长的影响

Figure 7 Effects of pH on strain S17M growth.

作用, Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Na^{+} 则会抑制菌株的生长, 其中 Cu^{2+} 的抑制作用较为显著(图 9)。有机溶剂会抑制菌株生长, 其中甲醛和冰乙酸的抑制作用明显, 三氯甲烷、异丙醇和三氨基甲烷小幅抑制菌株的生长(图 10)。

2.5 淀粉酶最适反应条件测定

经紫外照射突变后, 菌株 S17M 淀粉酶在不同 NaCl 浓度条件下均有较高的酶活性, 相比较诱导前, 在 NaCl 浓度 8%–14% 之间的活性均有提高, NaCl 浓度为 10% 时酶活性达到最大(图 11)。菌株 S17M 淀粉酶在 pH 5.0–9.0 之间均有较高的酶活性, 透明圈直径较突变前最大值均有明显增加。在 pH 为 8.0 时淀粉酶表现出

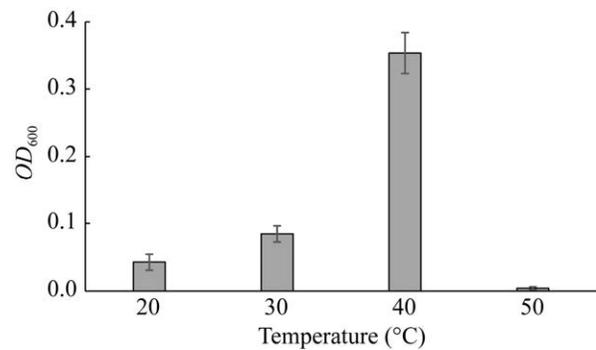


图 8 温度对菌株 S17M 生长的影响

Figure 8 Effects of temperature on strain S17M growth.

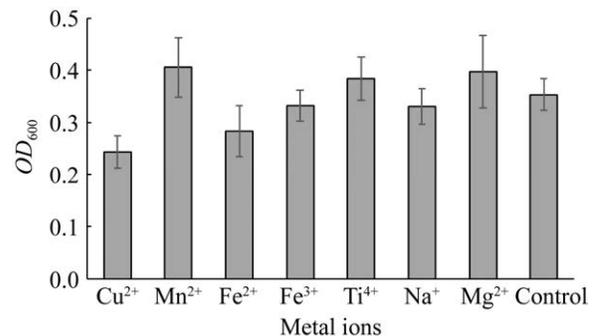


图 9 金属离子对菌株 S17M 生长的影响

Figure 9 Effects of metal ions on strain S17M growth.

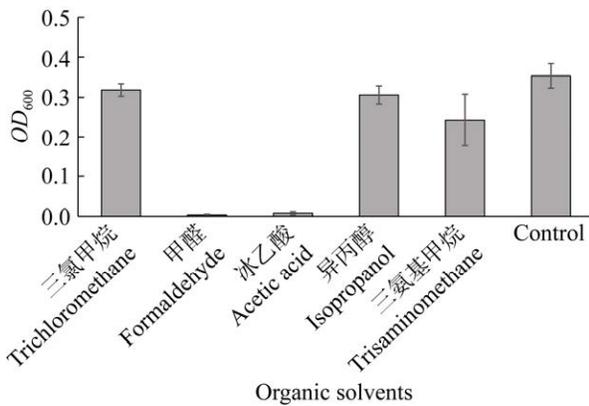


图 10 有机溶剂对菌株 S17M 生长的影响
Figure 10 Effects of organic solvents on strain S17M growth.

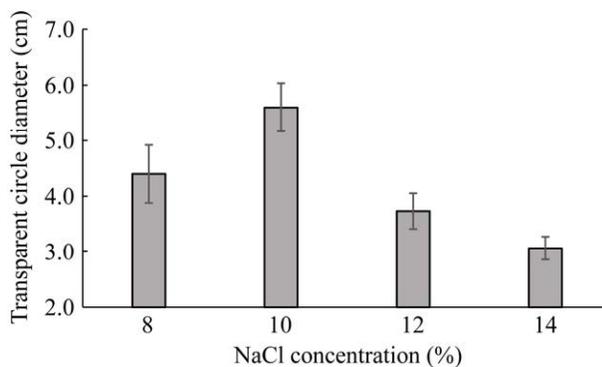


图 11 NaCl 浓度对菌株 S17M 淀粉酶活性的影响
Figure 11 Effects of NaCl concentration on S17M amylase activity.

最大活性, 透明圈直径最高值为 7.1 cm, 相较突变前的最大值(3.8 cm)提高了 1.86 倍(图 12), 说明突变后的淀粉酶可以适应较宽的 pH 范围, 而且酶活性显著提高。突变后的 S17M 淀粉酶在 15–55 °C 的温度范围内都具有较高的酶活性, 并且在 35 °C 时酶活性最高(图 13), 统计数据说明紫外突变不仅提高了酶的活性, 而且提升了酶的稳定性, 使酶在较广的温度范围内保持活性。金属离子对酶活性的影响较弱, Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Ti^{4+} 虽然会抑制淀粉

酶的活性, 但抑制效果并不强烈, Na^+ 和 Mg^{2+} 可以小幅增加酶的活性, 提升效果并不明显(图 14)。由图 15 可以看出, 突变后的淀粉酶在有机溶剂作用下具有一定的稳定性, 三氯甲烷对酶活性基本没有影响, 甲醛、冰乙酸、异丙醇和三氨基甲烷可以降低酶的活性, 但不能完全抑制酶的活性(图 15)。以上数据说明突变后的菌株 S17M 淀粉酶的活性得到显著提高, 且酶的稳定性增强, 对 NaCl 浓度、pH、温度、金属离子和有机溶剂的变化具有更强的适应性, 具有应用于不同工业生产条件的潜力。

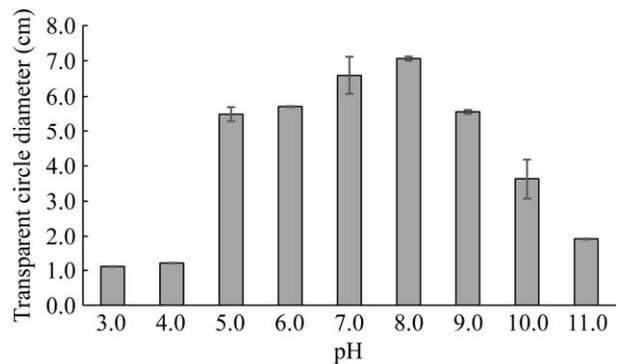


图 12 pH 对菌株 S17M 淀粉酶活性的影响
Figure 12 Effects of pH on S17M amylase activity.

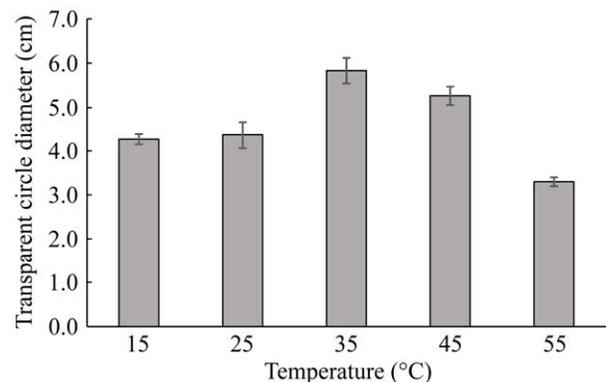


图 13 温度对菌株 S17M 淀粉酶活性的影响
Figure 13 Effects of temperature on S17M amylase activity.

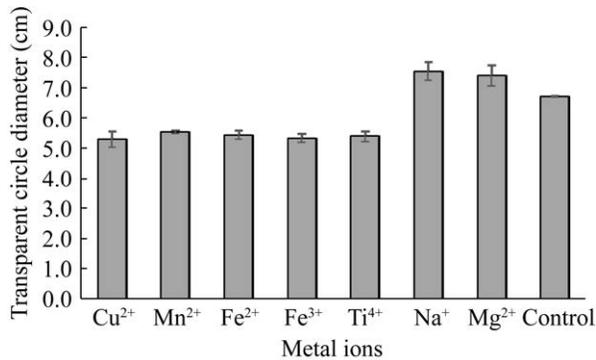


图 14 金属离子对菌株 S17M 淀粉酶活性的影响
Figure 14 Effects of metal ions on S17M amylase activity.

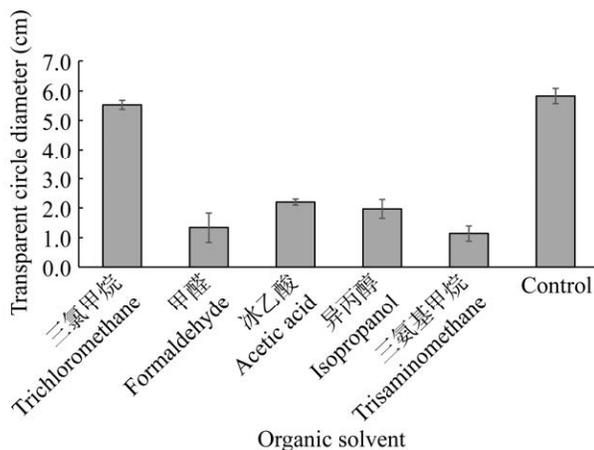


图 15 有机溶剂对菌株 S17M 淀粉酶活性的影响
Figure 15 Effects of organic solvent on S17M amylase activity.

2.6 突变前后淀粉酶活性测定

在确定了突变前后淀粉酶的最适反应 pH 和温度后, 分别在最适条件下利用 DNS 法测定菌株 S17 和 S17M 淀粉酶的活性。以葡萄糖质量浓度(mg/mL)为横坐标, 吸光度为纵坐标, 得葡萄糖标准曲线为 $y=0.0059x-0.0105$, $R^2=0.9978$ (图 16), 这表明所获得的回归方程是可行的。进一步计算可知紫外诱导前菌株 S17 的最大酶活性为 61.29 U/mL, 经紫外诱导筛选优化后, 菌株 S17M 的最大酶活性可以达到 195.62 U/mL, 是原始菌株的 3.19 倍(图 17)。

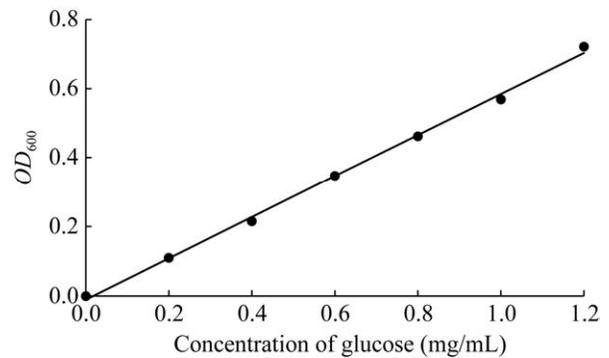


图 16 葡萄糖标准曲线
Figure 16 Standard curve of glucose.

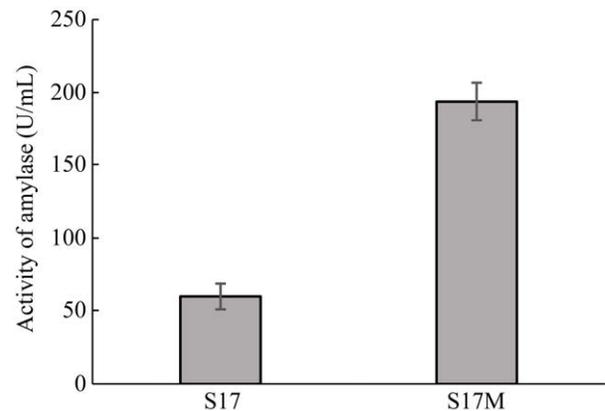


图 17 诱变前后淀粉酶活性比较
Figure 17 Comparison of amylase activity before and after mutagenesis.

3 讨论与结论

湿地因适合微生物生长, 是各种工业微生物的重要来源。利用不同的筛选和培育方法可以获得适用于不同生产环境的微生物资源。我们从三门峡黄河湿地表层土样中筛选得到一株具有较高淀粉酶活性的菌株 S17, 形态观察结合 16S rRNA 基因比对分析初步鉴定为 *Bacillus*。利用紫外诱变的方式得到酶活性显著提高的后代菌株 S17M。相比较原始菌株, S17M 的淀粉酶最大活性可以达到 195.62 U/mL, 是原始菌株的 3.19 倍, 而且 S17M 淀粉酶的稳定性显著

增强: 菌株 S17M 淀粉酶在 pH 5.0–9.0 之间均有较高的酶活性; 可以在 15–55 °C 的温度范围内保持较高的酶活性, 且在 35 °C 时酶活性最高; 金属离子(Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Ti^{4+})对 S17M 淀粉酶的抑制作用减弱, 部分离子(Na^+ 和 Mg^{2+})可以小幅提升酶活性; 有机溶剂不能完全抑制淀粉酶的作用, 在有机溶剂存在的条件下, S17M 淀粉酶仍然可以保持一定的催化活性。

3.1 紫外诱变是一种经济安全高效的诱变育种方式

在本实验中, 我们采用紫外照射的方式进行诱导突变筛选表现优异的菌株。紫外诱变(UV mutagenesis)是一种传统且高效的诱变育种方式, 也是一种经典微生物诱变方法, 许多菌株对紫外诱变因素极具敏感性, 且正向突变率高, 能有效提高生产菌株的产量^[17]。如田磊等^[18]利用紫外诱变的方式培育了高产 1,4,5,6-四氢-2-甲基-4-嘧啶羧酸(ectoine)的菌株 *Halomonas* sp. XH26, ectoine 是一种氨基酸衍生物, 可以帮助微生物抵抗外界高盐环境的有机相容性溶质, 具有增强酶活性、稳定 DNA 结构及保护蛋白质的功能^[19]。通过紫外诱变, ectoine 的产量显著提高, 由原初(456.82±15.72) mg/L 升至(1 351.09±17.69) mg/L, 产量提高 2 倍以上且可以稳定传代生产。梁景乐等^[20]通过对活跃链霉菌(*Streptomyces actuosus*) SL201905010 进行紫外诱变和链霉素抗性筛选复合育种, 成功选育出一株稳定性较好的高产菌株 US19-57, 该菌株摇瓶发酵那西肽产量较出发菌株提高 33.5%。而早在 20 世纪 90 年代初, 钱海伦等^[21]发现对于紫外线并不敏感的赤霉菌可以利用紫外、⁶⁰Co 和 DES 连续处理的方法, 提高诱变效率, 得到高产赤霉素的诱导菌株后代。由此可见, 紫外诱变可以作为一种高

效的诱导方式, 紫外诱变功能还可以进行更深入的探索。

3.2 紫外诱变不仅可以提高酶活性, 还可以增强酶的稳定性

已经报道的大部分的紫外诱变都以提高产量或活性为目的, 少有关注产物稳定性的变化。我们的报道发现在诱变前, 菌株 S17 仅在 NaCl 浓度为 12%, 温度在 35–55 °C, pH 值为 7.0 时具有较高的活性(透明圈直径可以达到 2.5 cm 以上), 经过紫外诱变, 菌株 S17M 所产淀粉酶的活性在 NaCl 浓度为 8%–10%, pH 值为 5.0–10.0, 温度在 0–60 °C 时, 透明圈直径均在 4 cm 以上, 显示诱变后淀粉酶不仅活性增强, 在不同的环境变化中稳定性也有所增加。诱变后的淀粉酶可以耐受一定的金属离子和有机溶剂, 能够适应更加苛刻的反应环境。陈立功等^[22]对海洋来源产低温几丁质酶菌株 *Photobacterium* sp. LG-1 进行紫外诱变、化学诱变和复合诱变, 使产酶活性提高了 139.78%, 而且酶在低温(0 °C)和碱性环境中仍可以保持较高活性。黄玉等^[23]采用紫外辐射诱变结合常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)处理金龟子绿僵菌, 成功得到一株产孢量高、毒力强、遗传稳定的优良菌株, 且该菌株的紫外线耐受力进一步增强。李西波等^[24]利用紫外诱变的方式, 筛选出一株高产稳定的酸性蛋白酶菌株 SKY-520, 产酶能力提高了 2.5 倍以上, 该酶在 80 °C 下保温 10 min 仍保留 74.2% 的相对酶活, 说明该酶的耐干热处理能力通过诱变得到了提高。然总起来说, 通过诱变的方式提高产物稳定性的报道并不多见。

REFERENCES

- [1] 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
Luo ZG, Yang JF, Luo FX. Properties and applications

- of α -amylase[J]. Food Research and Development, 2007, 28(8): 163-167 (in Chinese)
- [2] 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
Sun XF, Li AJ. Application and research status of α -amylase[J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2008(6): 13-14 (in Chinese)
- [3] 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: 江南大学硕士学位论文, 2009
Yang YH. Genetic improvement and fermentation process optimization of α -amylase producer[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2009 (in Chinese)
- [4] Wang SJ, Copeland L. Effect of acid hydrolysis on starch structure and functionality: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015, 55(8): 1081-1097
- [5] Fukushima T, Mizuki T, Echigo A, Inoue A, Usami R. Organic solvent tolerance of halophilic α -amylase from a haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1[J]. Extremophiles, 2005, 9(1): 85-89
- [6] Duffner F, Bertoldo C, Andersen JT, Wagner K, Antranikian G. A new thermoactive pullulanase from *Desulfurococcus mucosus*: cloning, sequencing, purification, and characterization of the recombinant enzyme after expression in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(22): 6331-6338
- [7] 张伟, 吴晓卫, 姚彦红, 张芬芬, 周晓伦. 一株耐盐性 α -淀粉酶高产菌的分离、鉴定及诱变选育[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(16): 130-133, 141
Zhang W, Wu XW, Yao YH, Zhang FF, Zhou XL. Identification and mutation breeding of a halophilic strain with high α -amylase-producing activity[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2020, 59(16): 130-133, 141 (in Chinese)
- [8] 蒋若天. 一株产耐高温 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: 四川大学硕士学位论文, 2007
Jiang RT. The isolation and screening of a thermostable α -amylase-producing strain and the studies on its fermentation condition and enzyme characteristics[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan University, 2007 (in Chinese)
- [9] Zuridah H, Fairuz ARM, Zakri AHZ, Rahim MNA. *In vitro* antibacterial activity of *Nigella sativa* against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*[J]. Asian Journal of Plant Sciences, 2008, 7(3): 331-333
- [10] 刘雅琴, 陈海魁, 李瑞雪. α -淀粉酶产生菌的分离筛选及酶学性质研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(34): 19263-19265
Liu YQ, Chen HK, Li RX. Studies on the isolation and screening of α -amylase producing strain and their enzymatic properties[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(34): 19263-19265 (in Chinese)
- [11] Galante M, De Flaviis R, Boeris V, Spelzini D. Effects of the enzymatic hydrolysis treatment on functional and antioxidant properties of quinoa protein acid-induced gels[J]. LWT, 2020, 118: 108845
- [12] Lima PSS, Lucchese AM, Araújo-Filho HG, Menezes PP, Araújo AAS, Quintans-Júnior LJ, Quintans JSS. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: preparation, characterization and pharmacological approaches[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 151: 965-987
- [13] 葛菁萍, 陈方博, 王海曼, 柴洋洋, 平文祥. He-Ne激光和亚硝基胍复合诱变米曲霉提高其蛋白酶和淀粉酶活力[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 243-247
Ge JP, Chen FB, Wang HM, Chai YY, Ping WX. Enhancing effect of mutagenesis with He-Ne laser followed by NTG on protease and amylase activities in *Aspergillus oryzae*[J]. Food Science, 2011, 32(11): 243-247 (in Chinese)
- [14] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 5版. 北京: 高等教育出版社, 2018: 44-47
Shen P, Chen XD. Microbiology Experiment[M]. 5th ed. Beijing: Higher Education Press, 2018: 44-47 (in Chinese)
- [15] 谢凤行, 赵玉洁, 周可, 张峰峰, 李亚玲. 产胞外淀粉酶枯草芽孢杆菌的分离筛选及其紫外诱变育种[J]. 华北农学报, 2009, 24(3): 78-82
Xie FX, Zhao YJ, Zhou K, Zhang FF, Li YL. The isolation, screening and ultraviolet mutation breeding of *Bacillus subtilis* strains producing extracellular amylase[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2009, 24(3): 78-82 (in Chinese)
- [16] 高文军, 李卫红, 王喜明, 乔丽芳. 3,5-二硝基水杨酸法测定蔓菁中还原糖和总糖含量[J]. 中国药业, 2020, 29(9): 113-116
Gao WJ, Li WH, Wang XM, Qiao LF. Determination of reducing sugar and total sugar in turnip by 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetry[J]. China Pharmaceuticals, 2020, 29(9): 113-116 (in Chinese)
- [17] Ning YK, Wu XJ, Zhang CL, Xu QY, Chen N, Xie XX. Pathway construction and metabolic engineering for fermentative production of ectoine in *Escherichia*

- coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 36: 10-18
- [18] 田磊, 张芳, 沈国平, 高翔, 龙启福, 朱德锐. Ectoine 高产菌株 *Halomonas* sp. XH26 的鉴定及紫外诱变选育[J]. *生物学杂志*, 2020, 37(4): 31-35
Tian L, Zhang F, Shen GP, Gao X, Long QF, Zhu DR. Identification of high-yielding strain *Halomonas* sp. XH26 for producing ectoine and UV mutagenesis breeding[J]. *Journal of Biology*, 2020, 37(4): 31-35 (in Chinese)
- [19] Meyer S, Schröter MA, Hahn MB, Solomun T, Sturm H, Kunte HJ. Ectoine can enhance structural changes in DNA *in vitro*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1-10
- [20] 梁景乐, 张善飞, 李子勇, 李云飞, 陈宁. 紫外诱变和抗性筛选选育那西肽高产菌株[J]. *中国医药生物技术*, 2021, 16(2): 155-157
Liang JL, Zhang SF, Li ZY, Li YF, Chen N. Breeding high-yielding strains of nosiheptide by UV mutagenesis and resistance screening[J]. *Chinese Medicinal Biotechnology*, 2021, 16(2): 155-157 (in Chinese)
- [21] 钱海伦, 肖灿鹏, 张瑞坤. 赤霉素产生菌的诱变育种[J]. *中国药科大学学报*, 1991, 22(4): 218-220
Qian HL, Xiao CP, Zhang RK. Induced mutation of gibberellin-producing strains[J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 1991, 22(4): 218-220 (in Chinese)
- [22] 陈立功, 吴家葳, 张金平, 张庆芳, 迟乃玉, 王晓辉, 王梦雨. 海洋来源产低温几丁质酶菌株的诱变选育及酶学性质研究[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(10): 105-111
Chen LG, Wu JW, Zhang JP, Zhang QF, Chi NY, Wang XH, Wang MY. Mutation breeding and enzymatic properties of cold-adapted chitinolytic strain *Photobacterium* sp. from marine[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(10): 105-111 (in Chinese)
- [23] 黄玉, 尼玛扎西, 薛正莲, 张国强. ARTP 与紫外线复合诱变选育高性能绿僵菌菌株[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(4): 60-64, 70
Huang Y, Nimazhaxi, Xue ZL, Zhang GQ. Breeding of high performance *Metarhizium anisopliae* strain by ARTP/UV mutagenesis[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(4): 60-64, 70 (in Chinese)
- [24] 李西波, 张旭, 杨柳, 张惠惠, 张继. 高产酸性蛋白酶菌株的选育及酶学性质研究[J]. *中国调味品*, 2018, 43(3): 28-33, 40
Li XB, Zhang X, Yang L, Zhang HH, Zhang J. Study on breeding of strain for producing high-yield acid proteinase and enzymatic properties[J]. *China Condiment*, 2018, 43(3): 28-33, 40 (in Chinese)