

文章编号 :1009-038X(2003)05-0091-04

# 快速筛选耐酸性 $\alpha$ -淀粉酶生产菌株的平板透明圈法

徐良玉, 石贵阳, 陶 飞, 张 梁

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

**摘 要 :**以可溶性淀粉为底物配制固体培养基,然后低温处理(4℃)平板培养物,产淀粉酶的菌株其菌落周围的培养基由白色变成灰色且透明.该方法不具有破坏性,不需要预先接种菌落,能直接发现和分离分解利用淀粉的微生物.利用淀粉琼脂平板还能快速验证淀粉酶的耐酸性,根据在 pH 4.2 和 pH 6.0 的琼脂平板上透明圈的直径  $d$  与淀粉酶活力的对数  $\ln A$  的关系,求出淀粉酶在 pH 4.2 和 pH 6.0 时的淀粉酶活力. pH 4.2 时比 pH 6.0 时的比值大,说明该淀粉酶产生菌的耐酸性较强.

**关键词 :**透明圈 耐酸性  $\alpha$ -淀粉酶 平板培养 筛选

中图分类号 :TQ 920

文献标识码 :A

## A Rapid Plate Culture Method for Screening Micro-Organisms Producing Acid-Tolerant Amylase

XU Liang-yu, SHI Gui-yang, TAO Fei, ZHANG Liang

(Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract :** A simple and rapid method was proposed for the detection of amylase-producing micro-organisms on solid media using soluble starch as substrate. The soluble starch was incorporated into nutrient agar and amylase production could be detected when the color of the white media became grey around the colonies. The method was non-destructive, and allowed direct visualization and isolation of amylolytic micro-organisms from the environment without prior replication of colonies. From the relationship of  $d$  with  $\ln A$ , the amylase activity at pH 4.2 and pH 6.0 was determined. The acid-tolerance ability could be easily testified by comparing amylase activity at pH 4.2 and pH 6.0 at starch agar plate.

**Key words :** clear zones ; acid-tolerant amylase ; plate culture ; screening

耐酸性  $\alpha$ -淀粉酶在酿酒、淀粉原料加工以及味精生产中起到了重要的作用.味精厂对淀粉水解液的质量要求十分严格.从糖化效果、经济性及满足谷氨酸发酵产高酸的要求等方面考虑,一般选用淀

粉含量高、酸值低的淀粉原料,加工工艺 pH 值为 4.6~4.8,添加耐酸性  $\alpha$ -淀粉酶可使原料液化完全.应用耐酸性  $\alpha$ -淀粉酶,可以在酸性条件下进行淀粉的液化,避免了调酸阶段,不但节约了成本、降

收稿日期 2003-03-24 ; 修回日期 2003-06-02.

作者简介:徐良玉(1973-)男,江苏丰县人,发酵工程硕士研究生.

万方数据

低了劳动强度,而且提高了原材料的利用率、提高了生产效益.

大多数产淀粉酶菌株的筛选和检测方法是在可溶性淀粉固体培养基上接种培养,并在平板上倾倒稀碘液,来检测淀粉的分解情况.这种方法费时,且不适合快速分离不受污染的菌株.

I. Akpan 等人<sup>[1]</sup>以丽玛斯醇亮蓝 RBB( Remazol Brilliant Blue )与淀粉结合的方法,分离纯化产淀粉酶的生产菌株.该方法用在以 RBB-淀粉为底物的琼脂平板上,可快速有效的筛选分解淀粉的微生物.

作者研究了更为简单有效的大量分离纯化淀粉酶生产菌株的方法.以可溶性淀粉为底物,制作成琼脂平板,平板培养物经过 4℃ 的低温处理后,菌落周围的培养基颜色变深,透明,在淀粉琼脂培养基的白色背景中,能直接分离不受杂菌污染的菌株.

根据淀粉酶的活力和透明圈直径的关系测定不同菌株产生的淀粉酶的活力,这种活力测定方法,与文献 4 的淀粉酶活力的测定方法相比,操作简便、快速,节省劳动量.

在 pH 4.2 和 pH 6.0 的琼脂平板上测定淀粉酶的活力,即可初步估计  $\alpha$ -淀粉酶的耐酸性.这种测定淀粉酶耐酸性的方法,方便、快捷,劳动量小,仅需要测定透明圈的直径便能初步计算淀粉酶的活力,并比较了淀粉酶的耐酸性.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌种 从自然界取来的土样筛选分离得到<sup>[2,3]</sup>.

1.1.2 普通酶液 作者所在的生物资源实验室保存.

#### 1.1.3 培养基

1) 菌株筛选培养基 组分(g/L):可溶性淀粉 2,蛋白胨 0.5,琼脂 2,氯化钙 0.4,磷酸氢二钠 0.8, pH 4.2.

2) 耐酸性的淀粉琼脂培养基 组分(g/L):可溶性淀粉 5,琼脂 2,氯化钙 0.4, pH 值分别为 6.0 和 4.2.

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 普通透明圈平板的制作

1) 取两块分离培养基平板,标上记号 1 和 2.  
2) 将分离平板上的单个菌落挑起,接入平板 1 和平板 2 的对应位置,每板接种 16 个不同的菌株,

放入 30℃ 培养箱培养 24 h,长出菌落.

3) 取 2 号平板用倾倒稀碘液法做透明圈试验,确定 2 号平板上透明圈的位置,从 1 号平板上挑出对应的菌落接入斜面保存或摇瓶培养.

1.2.2 冷冻透明圈平板制作 将长有菌落或用普通淀粉酶制作的可溶性淀粉培养基平板放入 4℃ 冰箱,放置 24~72 h 或更长时间.在淀粉琼脂培养基的白色背景中,透明圈区域颜色变深,透明,容易发现.

1.2.3 测定淀粉酶活力的对数  $\ln A$  和透明圈直径  $d$  的关系

1) 将普通淀粉酶液稀释成为不同稀释度的酶液<sup>[4]</sup>.

2) 按 1.2.2 制作透明圈.

3) 用量角规测定透明圈的直径.

4) 以透明圈直径  $d$  为纵坐标,酶活力对数  $\ln A$  为横坐标,作曲线图,求出  $d$  与  $\ln A$  的函数关系.

1.2.4 淀粉酶活力的测定方法 在不同 pH 淀粉琼脂平板上,测量出透明圈的直径  $d$ ,根据  $\ln A$  和  $d$  的关系,求出淀粉酶在不同 pH 时的活力<sup>[4]</sup>.

1.2.5 耐酸性的测定 比较 pH 4.2 和 pH 6.0 时的活力,  $A(\text{pH } 4.2)/A(\text{pH } 6.0)$  的比值大,说明淀粉酶的耐酸性较好.

## 2 结果与讨论

### 2.1 测定普通酶液的活力

用普通淀粉酶作为对照,筛选耐酸性更强的淀粉酶生产菌株.普通酶液在 pH 4.2 时的活力是 pH 6.0 时淀粉酶活力的一半,为了筛选到耐酸性  $\alpha$ -淀粉酶生产菌株,要求菌株生产的淀粉酶在 pH 4.2 时的活力与 pH 6.0 时的活力的比值大于 0.5,见表 1.

表 1 普通酶液在 pH 6.0 和 pH 4.2 的淀粉酶活力

Tab.1 The activity of the general amylase at pH 6.0 and pH 4.2

| pH 值 | 普通淀粉酶活力/U |
|------|-----------|
| 6.0  | 2 000     |
| 4.2  | 1 000     |

### 2.2 透明圈法快速初筛耐酸性 $\alpha$ -淀粉酶生产菌株

2.2.1 菌种筛选培养基的 pH 由于要筛选分离耐酸性  $\alpha$ -淀粉酶生产菌种,筛选分离用的培养基应尽可能是酸性环境,以便筛选到产耐酸性  $\alpha$ -淀粉酶的菌株,而且淀粉酶在 pH 4.0 以下易失活<sup>[5]</sup>,且琼脂在 pH 4.0 时,灭菌时易分解,平板培养基很难凝固,所以培养基的 pH 值选择为 4.2.

由于平板培养基的 pH 为 4.2 ,菌株产生的  $\alpha$ -淀粉酶的耐酸性能从透明圈的直径间接地表现出来 ,不耐酸的淀粉酶 ,形成的透明圈直径很小 ,甚至不能形成透明圈 .因此 ,在酸性平板上 ,即可达到初步筛选耐酸性  $\alpha$ -淀粉酶生产菌种的目的 .

2.2.2 菌种筛选培养基上  $d$  与  $\ln A$  的关系 在 pH 4.2 时将 1 000 U 的普通酶液稀释成 2.5~25 U 的稀释酶液 ,并换算成对数 .

将 3  $\mu$ L 的稀释酶液点在菌种筛选平板上 ,于 4  $^{\circ}$ C 冰箱处理 24 h ,观察透明圈的形成情况 ,并测定透明圈的直径 .所用培养基为菌种分离培养基 ,作  $d$  和  $\ln A$  的曲线图 ,求出  $d$  与  $\ln A$  的关系 ,见图 1 .

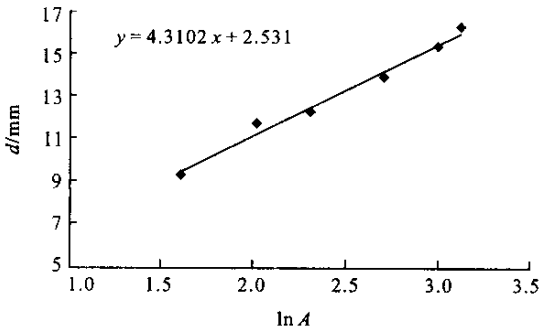


图 1 菌种分离时 pH 4.2 的平板上  $d$  与  $\ln A$  的关系  
Fig.1 The relationship of  $d$  with  $\ln A$  on screening plate at pH 4.2

根据  $d$  与  $\ln A$  的关系 ,可以估计淀粉酶的活力 .菌落在菌种筛选培养基上长出菌落 ,在周围形成透明圈 ,测量透明圈的直径 ,根据  $d$  与  $\ln A$  的关系 ,计算出该菌落产生的淀粉酶活力 ,估计出在 pH 4.2 的酸性条件下菌落产耐酸性  $\alpha$ -淀粉酶的能力 .

用冷冻透明圈法筛选产淀粉酶的菌种 ,方便、快捷、不易染菌 ,而且容易发现透明圈 .菌种的筛选过程中 ,不需要频繁的接种和分离 ,节省了大量的劳动 ,能在较短的时间内筛选到大量的菌株 .

### 2.3 $\alpha$ -淀粉酶的耐酸性

分别作出 pH 4.2 和 pH 6.0 时  $\ln A$  和  $d$  的曲线 ,根据透明圈的直径估计菌株产淀粉酶的活力 .与 pH 6.0 时的淀粉酶活力相比 ,pH 4.2 时淀粉酶的活力下降的幅度小 ,表明该淀粉酶具有耐酸性 .

2.3.1 pH 6.0 时平板透明圈直径  $d$  与  $\ln A$  的关系 制作透明圈 ,将普通酶液稀释成 5~50 U 的稀释酶液 ,取稀释酶液 3  $\mu$ L ,滴加到淀粉平板上 ,冷冻 4 h 后 ,测量透明圈的直径  $d$  ,作出  $d$  与  $\ln A$  的散点图 ,求出  $d$  与  $\ln A$  的函数关系 ,见图 2 .

将分离筛选到的菌株发酵培养后的发酵液 ,制作透明圈 ,根据透明圈的直径计算出菌株发酵液淀

粉酶的活力 ,测定 pH 6.0 时菌株 ZH1 发酵液的淀粉酶活力 ,作为 pH 4.2 时淀粉酶活力的比较基础 .

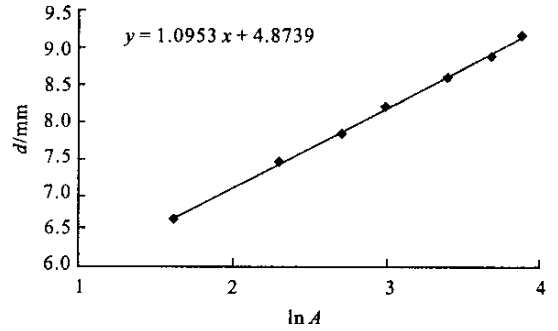


图 2 pH 6.0 时透明圈直径  $d$  与  $\ln A$  的关系  
Fig.2 The relation of  $d$  with  $\ln A$  at pH 6.0

2.3.2 pH 4.2 时 ,平板透明圈直径  $d$  与  $\ln U$  的关系 将 pH 4.2 时 1 000 U 的普通酶液稀释成 2.5~25 U 的稀释酶液 ,在制作透明圈时 ,由于在 pH 4.2 的酸性条件下 ,普通酶液的活力较低 ,所以用于制作透明圈的酶液为 6  $\mu$ L ,以便使平板培养基的淀粉分解完全 ,在淀粉平板上呈现出透明区域 ,见图 3 .

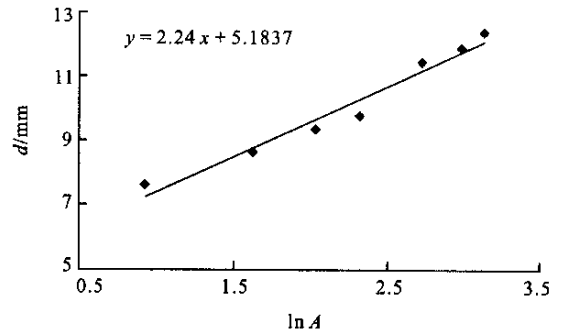


图 3 pH 4.2 时透明圈直径  $d$  与  $\ln A$  的关系  
Fig.3 The relationship of  $d$  with  $\ln A$  at pH 4.2

用筛选分离得到的菌株的发酵液制作透明圈 (制作透明圈时 ,滴加的酶液量为 6  $\mu$ L) ,测量透明圈的直径 ,根据 pH 4.2 时  $d$  与  $\ln A$  的关系 ,计算出菌株发酵液淀粉酶在 pH 4.2 时的淀粉酶活力 ,与 pH 6.0 时的淀粉酶活力相比 ,若比值大于 0.5 ,即表明该菌株生产的淀粉酶与普通酶液相比 ,有一定的耐酸性 .

2.3.3 菌株 ZH1 的耐酸性试验 将菌株 ZH1 的发酵液制作透明圈 ,取 3  $\mu$ L 的发酵液滴加到 pH 6.0 的淀粉琼脂平板上 ,放置在冰箱中 ,冷冻处理 4 h ,测量透明圈的直径为 9.3 mm .从公式  $d = 1.0953 \ln A + 4.8739$  计算淀粉酶液的活力为 6.3 U .

取 6  $\mu$ L 的发酵酶液滴加到 pH 4.2 的淀粉琼脂平板上 ,冷冻处理 24 h 后 ,测量透明圈的直径为 7.1 mm ,通过公式  $d = 2.24 \ln A + 5.1837$  计算出

淀粉酶的活力为 10.5 U.

pH 4.2 与 pH 6.0 时淀粉酶活力的比值为0.6 ,超过了 0.5 ,初步判断该菌株生产的淀粉酶具有一定的耐酸性.

用透明圈法估计淀粉酶的耐酸性方便快捷 ,仅在淀粉琼脂上即可在短时间内对耐酸性进行测定 ,还可以避免因温度反应而导致的淀粉酶的失活.

文献[ 4 ]描述的  $\alpha$ -淀粉酶的活力测定方法 ,需要配制可溶性淀粉溶液、稀碘液 ,而且需要水浴加热 ,计时 ,计算酶活力等步骤 ,费时费力. 由于在低 pH 条件下 ,淀粉酶的活力受到抑制 ,反应时间延长 ,在 60 ℃ 的条件下 ,淀粉酶会因为受热而失去部

分活力 ,所测定的淀粉酶的活力并不能完全反映出淀粉酶活力与 pH 的关系. 用这种方法测定的淀粉酶的耐酸性往往偏低 ,容易漏选耐酸性  $\alpha$ -淀粉酶生产菌株.

### 3 结 论

在 pH 4.2 的筛选培养基上 ,利用平板冷冻透明圈法可以快速、方便的大量筛选  $\alpha$ -淀粉酶生产菌株 ,不需频繁的接种 ,菌体不被其它微生物污染 ,节省劳动力. 而且在淀粉琼脂平板上可快速检验  $\alpha$ -淀粉酶的耐酸性. 菌株 ZH1 发酵生产的淀粉酶与普通相比 ,有一定的耐酸性.

### 参考文献：

[ 1 ] Akpan I , Bankole M O , Adesemowo A M. A rapid plate culture method for secreening amylase producing micro-organisms[ J ]. *Biotechnology Technics* , 1999 , 13 : 411 - 413.

[ 2 ] 诸葛健 ,王正祥. 工业微生物实验技术手册[ M ]. 北京 :中国轻工业出版社 ,1994.

[ 3 ] 无锡轻工业学院. 微生物学[ M ]. 北京 :中国轻工业出版社 ,2001.

[ 4 ] 无锡轻工大学 ,天津轻工业学院. 工业发酵分析[ M ]. 北京 :中国轻工业出版社 ,1999.

[ 5 ] 张树正. 酶制剂工业(下册)[ M ]. 北京 :轻工业出版社 ,1984.

( 责任编辑 :李春丽 )

( 上接第 82 页 )

### 参考文献：

[ 1 ] 张燕萍 . 变性淀粉制造与应用[ M ]. 北京 :化学工业出版社 ,2001.

[ 2 ] 卢声宇 ,温其标 ,胡飞. 食品乳化剂的最新发展[ J ]. *食品科技* ,1998 ( 5 ) :6 - 7.

[ 3 ] Saiyavit Varavinit , Narisa Chaokasem , Sujin Shobsngob. Studied of flavor encapsulation by agents produced from modified sago and tapioca starches[ J ]. *Starch* 2001 , 53 : 281 - 287.

[ 4 ] 程发 ,张小红 ,李桂凤 ,等. 淀粉硬脂酸酯的制备[ J ]. *天津大学学报* 2001 , 28 ( 6 ) : 814 - 819.

[ 5 ] 钱建亚 ,顾林. 三种常用淀粉糊化测定方法的比较[ J ]. *西部粮油科技* ,1999 , 24 ( 4 ) : 42 - 46.

[ 6 ] 孙明日 ,赵军 ,赵山林 ,等. 酸性乳饮料稳定性的研究[ J ]. *中国乳品工业* ,1999 , 27 ( 1 ) : 18 - 23.

( 责任编辑 :杨 萌 )