



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103667095 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 13

(21) 申请号 201310076922. 6

(22) 申请日 2013. 03. 12

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO: M2013013 2013. 01. 11

(73) 专利权人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号

(72) 发明人 吴敬 李祝 吴丹 陈晟 陈坚

(74) 专利代理机构 北京爱普纳杰专利代理事务
所(特殊普通合伙) 11419

代理人 何自刚 王玉松

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

C12N 9/28(2006. 01)

C12R 1/01(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1142852 A, 1997. 02. 12,

CN 1222938 A, 1999. 07. 14,

US 2007281344 A1, 2007. 12. 06,

CN 101157912 A, 2008. 04. 09,

审查员 朱镜羲

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

一种 α -淀粉酶高产菌株及其发酵生产淀粉酶的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种 α -淀粉酶高产菌及其筛选方法和应用,属于生物工程技术领域。本发明菌种为一株嗜热脂肪芽孢杆菌 WSH13-17(*Geobacillus stearothermophilus*) WSH13-17,于2013年1月11日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为 CCTCC NO:M2013013,是从淀粉厂土壤中经平板菌落特征初筛,采用一级发酵逐一摇瓶培养,经酶活测定,比较 α -淀粉酶活性大小而得到。经液体深层发酵可得 α -淀粉酶,酶活 600U/mL。该 α -淀粉酶可用于味精、啤酒、酒精等食品发酵行业。

1. 一种 α -淀粉酶高产菌株, 分类命名为嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) WSH13-17, 于 2013 年 1 月 11 日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为 CCTCC NO:M2013013。

2. 应用权利要求 1 所述 α -淀粉酶高产菌株生产 α -淀粉酶的方法, 其特征是采用嗜热脂肪芽孢杆菌 (*G. stearothermophilus*) WSH13-17 为出发菌株, 经种子培养和液体深层发酵制得 α -淀粉酶。

3. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征是所述种子培养中采用的种子培养基成分为每 1L 中含有: 蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, 氯化钠 10g, pH 7.0; 培养条件为: 培养时间为 20-24 小时, 温度 55°C。

4. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征是所述液体深层发酵中, 发酵培养基成分为每 1L 中含有: 可溶性淀粉 10g, 蛋白胨 2g, 酵母粉 2g, 硫酸铵 2.5g, 七水硫酸镁 0.3g, 无水氯化钙 0.2g, 1mL 微量元素液, 发酵条件为: pH 7.0, 55°C, 摇瓶转速 200 转 / 分, 发酵时间 48 小时; 所述微量元素液成分为每 1L 中含有: ZnCl_2 2g, FeSO_4 2g, H_3BO_3 0.065g, MoNa_2O_4 0.135g。

5. 根据权利要求 2-4 任一所述的方法, 其特征在于所述 α -淀粉酶在味精、啤酒、酒精生产加工领域中的应用。

一种 α -淀粉酶高产菌株及其发酵生产淀粉酶的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种 α -淀粉酶菌株及其应用,特别是一株高产 α -淀粉酶的嗜热脂肪芽孢杆菌及其应用。

背景技术

[0002] α -淀粉酶又称为液化型淀粉酶。它能从淀粉分子内部任意切开 α -1,4 键,产生分子量较小的糊精。 α -淀粉酶具有相当大的工业应用价值,广泛用于酒精、有机酸、氨基酸及纺织等行业。目前工业生产中, α -淀粉酶一般采用微生物发酵法进行大规模生产,其中以地衣芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌和嗜热脂肪芽孢杆菌为主。

发明内容

[0003] 本发明要解决的技术问题是提供一种 α -淀粉酶高产菌株,于 2013 年 1 月 11 日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为 CCTCCNO:M2013013,系从淀粉厂土壤中分离得到的一株嗜热脂肪芽孢杆菌 WSH13-17(*Geobacillus stearothermophilus*)WSH13-17。

[0004] 嗜热脂肪芽孢杆菌的筛选方法是从淀粉厂土壤中经平板菌落特征初筛,采用一级发酵逐一摇瓶培养,经酶活测定,比较 α -淀粉酶活性大小而得到。

[0005] 一个 α -淀粉酶酶活单位 (1U) 定义 (U/mL):1mL 酶液在 pH6.0,温度 70℃,1min 液化可溶性淀粉 1mg 所需的酶量称为一个酶活力单位。

[0006] 测定方法:准确吸取 2mL2% 可溶性淀粉溶液,置于 10mL 比色管中,加 0.5mLpH6.0 磷酸缓冲溶液,摇匀,于 70℃水浴预热 5min,准确加入 100 μ L 稀释酶液(酶活力为每毫升 60~65 单位为宜),立即计时,摇匀,于 70℃水浴准确保温酶解反应 5min,立即取出 1mL 反应液,置于含有 0.5mL0.1mol/L 盐酸溶液中终止酶解反应,加入 5mL 稀碘液,摇匀。以稀碘液为空白,1cm 比色皿,660nm 波长下测吸光度(A)。根据吸光度查表(表格详见 GB8275-2009),求得测试酶液的浓度。

[0007] α -淀粉酶酶活计算公式: $X=c \times n \times 16.67$

[0008] 式中:

[0009] X—样品的酶活力, U/mL;

[0010] c—测试酶样的浓度, U/mL;

[0011] n—样品的稀释倍数;

[0012] 16.67—根据酶活力定义计算的换算系数。

[0013] 原碘液:称取 11.0g 碘和 22.0g 碘化钾,用少量水使碘完全溶解,定容至 500mL,贮存于棕色瓶中。

[0014] 稀碘液:吸取原碘液 2.00mL,加 20.0g 碘化钾用水溶解并定容至 500mL,贮存于棕色瓶中。

[0015] 可溶性淀粉溶液 (20g/L):称取 2.000g 可溶性淀粉(以绝干计)于烧杯中,用少量水调成浆状物,边搅拌边缓慢加入 70mL 沸水中,然后用水分次冲洗装淀粉的烧杯,洗液

倒入其中,搅拌并加热至完全透明,冷却定容至 100mL。溶液现配现用。

[0016] 磷酸缓冲液 (pH=6.0):称取 45.23g 十二水和磷酸氢二钠和 8.07g 一水柠檬酸,用水溶解并定容至 1000mL。用 pH 计校准后使用。

[0017] 本发明解决的另一个技术问题是提供一种采用嗜热脂肪芽孢杆菌 WSH13-17(*Geobacillus stearothermophilus*) WSH13-17 为出发菌株,经种子培养和液体深层发酵制得 α -淀粉酶。

[0018] 平板分离培养基 (g/L):

[0019] 蛋白胨 10,可溶性淀粉 10,酵母粉 5,氯化钠 10,琼脂粉 20,曲利本蓝 0.1, pH7.0。55℃培养箱中培养 2-3d,测量 D/d(水解圈直径/菌落直径)值,挑选值较大的进行初筛。

[0020] 种子培养基 (g/L) 及培养条件:

[0021] 蛋白胨 10,酵母粉 5,氯化钠 10, pH7.0, 55℃,摇瓶转速 200 转/分,培养时间为 20-24 小时。

[0022] 发酵培养基 (g/L) 及发酵条件:

[0023] 可溶性淀粉 10,蛋白胨 2,酵母粉 2,硫酸铵 2.5,七水硫酸镁 0.3,无水氯化钙 0.2, 1mL(v/v) 微量元素液, pH7.0, 55℃,摇瓶转速 200 转/分,发酵时间 44-48 小时。

[0024] 微量元素液 (g/L):

[0025] ZnCl_2 2, FeSO_4 2, H_3BO_3 0.065, MoNa_2O_4 0.135。

[0026] 本发明的有益效果:提出了一种 α -淀粉酶高产菌,用该菌株经液体深层发酵可制备 α -淀粉酶,酶活达到 600U/mL。

具体实施方式

[0027] 实施案例 1

[0028] 从淀粉厂附近土壤,按“五点取样法”采取土样 10 份,从中分离菌株。将少量样品,放入烘箱 80℃热处理 20min,后称取样品 5g 加入装有 45mL 无菌水的小三角瓶中,静置 10min,上清液取 0.1mL 梯度稀释 (10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3}) 涂布于分离筛选平板上,55℃培养箱中培养 2-3 天,测量 D/d(水解圈直径/菌落直径)值,挑选值较大的进行初筛。挑取单菌落进行 3-4 次平板划线。之后将筛选得到的几株菌纯化后在 55℃进行液体培养。培养 44-48h,取培养液离心后收集上清进行酶活测定,选取酶活高的菌株进行划线传代培养,最终得到一株产酶稳定且有较高酶活的 α -淀粉酶产生菌株。纯化的菌株接种于牛肉膏蛋白胨斜面培养基上,4℃保藏,保藏编号为 CCTCCN0:M2013013,保藏机构为中国典型培养物保藏中心,保藏地址为中国武汉武汉大学。

[0029] 平板分离培养基 (g/L):

[0030] 蛋白胨 10,可溶性淀粉 10,酵母粉 5,氯化钠 10,琼脂粉 20,曲利本蓝 0.1, pH7.0。

[0031] 发酵培养基 (g/L):

[0032] 可溶性淀粉 10,蛋白胨 2,酵母粉 2,硫酸铵 2.5,七水硫酸镁 0.3,无水氯化钙 0.2, 1mL(v/v) 微量元素液, pH7.0, 55℃,摇瓶转速 200 转/分,发酵时间 44-48 小时。

[0033] 微量元素液 (g/L):

[0034] ZnCl_2 2, FeSO_4 2, H_3BO_3 0.065, MoNa_2O_4 0.135。

[0035] 实施案例 2

[0036] 从斜面上刮取一环菌种,置于装有 100mL 种子培养基的 500mL 三角瓶中进行种子培养。条件为培养时间 20-24h,温度 55℃,摇床转速 200rpm。再以 5%接种量接入装有 50mL 发酵培养基的 100mL 三角瓶中进行发酵培养。条件为培养时间 44-48h,温度 55℃,摇床转速 200rpm。即可得到酶活 600U/mL 的发酵液。

[0037] 种子培养基 (g/L) :蛋白胨 10,酵母粉 5,氯化钠 10, pH7.0。

[0038] 发酵培养基 (g/L) :可溶性淀粉 10,蛋白胨 2,酵母粉 2,硫酸铵 2.5,七水硫酸镁 0.3,无水氯化钙 0.2,1mL (v/v) 微量元素液, pH7.0。