



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102827770 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 19

(21) 申请号 201210296241. 6

(22) 申请日 2012. 08. 20

(71) 申请人 三峡大学

地址 443002 湖北省宜昌市大学路 8 号

(72) 发明人 陈芳清 陈国华 江玲

(74) 专利代理机构 宜昌市三峡专利事务所

42103

代理人 彭娅

(51) Int. Cl.

C12N 1/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

一种筛选淀粉酶产生菌的显色方法

(57) 摘要

一种筛选淀粉酶产生菌的显色方法, 该方法包括以下步骤: 1) 从自然环境中采集样本; 2) 培养: 样本接种于含有淀粉酶产生菌筛选培养基的培养皿里, 培养 3 — 4 天; 3) 显色: 揭开培养皿上盖, 将络合碘快速而均匀地喷雾到长出菌落的淀粉酶产生菌筛选培养基上, 静置 2 — 4 分钟, 观察透明圈的形成; 4) 转接: 将步骤 3) 产生透明圈的菌落立即转接至新的淀粉酶产生菌筛选培养基上; 5) 筛选: 筛选产酶活性高的菌落, 得到淀粉酶产生菌。本发明提供一种筛选淀粉酶产生菌的显色方法, 采用络合碘喷雾的方式初步筛选产酶微生物, 能方便、快捷地初步筛选产胞外淀粉酶菌株, 替代碘液显色法和碘熏蒸法推广使用。

1. 一种筛选淀粉酶产生菌的显色方法,其特征在于该方法包括以下步骤:

1) 从自然环境中采集样本;

2) 培养:将步骤 1) 采集的样本接种于含有淀粉酶产生菌筛选培养基的培养皿里,培养 3—4 天;

3) 显色:揭开培养皿上盖,将络合碘快速而均匀地喷雾到长出菌落的淀粉酶产生菌筛选培养基上,静置 2—4 分钟,观察透明圈的形成;

4) 转接:将步骤 3) 产生透明圈的菌落立即转接至新的淀粉酶产生菌筛选培养基上,培养 3-4 天,重复步骤 3),用透明圈直径/菌落直径的比值,计算产酶活性;

5) 筛选:将产酶活性高的菌落划线培养 3—4 天,重复步骤 3) 检测淀粉酶产生情况,筛选产酶活性高的菌落,得到淀粉酶产生菌。

2. 根据权利要求 1 所述的一种筛选淀粉酶产生菌的显色方法,其特征在于:步骤 1) 中,从自然环境的土壤和水中采集样品。

3. 根据权利要求 1 所述的一种筛选淀粉酶产生菌的显色方法,其特征在于:步骤 3) 中,喷雾到淀粉酶产生菌筛选培养基的络合碘体积为 1—2 毫升。

4. 根据权利要求 1 所述的一种筛选淀粉酶产生菌的显色方法,其特征在于:步骤 5) 中,透明圈直径/菌落直径的比值大于 1.7 的菌落,为产酶活性高的菌落。

一种筛选淀粉酶产生菌的显色方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种微生物显色方法,尤其是一种筛选淀粉酶产生菌的显色方法。

背景技术

[0002] 淀粉酶已经成为工业应用中最为重要的酶之一,并且大量的微生物可以产生高活性的淀粉酶,但是酶的大规模商业化生产仍然局限于几种特定的真菌和细菌,从自然界中筛选新型的高活性目的淀粉酶产生微生物显得尤为重要。利用淀粉平板透明圈法从自然环境中分离筛选淀粉酶产生菌,以淀粉指示剂进行初步判断,可以快速发现淀粉酶产生微生物,目前采用的淀粉显色指示剂是碘液或者固体碘。碘液,组成成分是碘、碘化钾和蒸馏水。碘液显色剂需要自己配制并且保存时间短暂;使用时往往采用滴加到培养基上的方式,导致碘液分布不均匀,影响显色的一致性,从而延长了部分区域的显色时间,对菌落杀伤力增强。

[0003] 固体碘利用碘升华法显色,省去了碘液显色法配制溶液的过程,然而不同产酶菌株,对于升华碘的用量、耐受时间及显色时间具有差异[唐嘉,陈朝银,赵声兰,夏静,张涛.一种初筛产胞外淀粉酶菌株的简化方法.生物加工过程,2008,6(1):37-40],并且不同的培养皿的密封程度差异,也会影响熏蒸过程显色效果。

[0004] 虽然淀粉酶产生菌筛选研究意义重大,但是淀粉酶活性初筛过程中的显色剂有效期短暂、配制复杂、用量及显色时间等问题制约了该领域的研究工作广泛开展。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种采用络合碘筛选淀粉酶产生菌的显色方法,初步筛选产酶微生物,能方便、快捷地初步筛选产胞外淀粉酶菌株,可替代碘液显色法和碘熏蒸法推广使用。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明所采用的技术方案是:一种筛选淀粉酶产生菌的显色方法,该方法包括以下步骤:

- 1) 从自然环境(土壤和水体)中采集样本;
- 2) 培养:将步骤1)采集的样本采用稀释或快速划线的方法,接种于含有淀粉酶产生菌筛选培养基的培养皿里,培养3—4天;
- 3) 显色:将络合碘装入30—50毫升塑料喷瓶中,揭开培养皿上盖,将络合碘快速而均匀地喷雾到长出菌落的淀粉酶产生菌筛选培养基上,静置2—4分钟,观察透明圈的形成,显色时间不能太长(不超过4分钟),以免碘挥发影响观察;
- 4) 转接:将步骤3)产生透明圈的菌落立即转接至新的淀粉酶产生菌筛选培养基上,培养3-4天,重复步骤3)显色,用透明圈直径/菌落直径的比值,计算产酶活性;
- 5) 筛选:将产酶活性高的的菌落划线培养3—4天,重复步骤3)检测淀粉酶产生情况,筛选产酶活性高的菌落,得到淀粉酶产生菌。

[0007] 将步骤5)筛选得到的产酶活性高的淀粉酶产生菌,采用4℃试管斜面 and -20℃甘

油保存。

[0008] 步骤3)中,喷雾到淀粉酶产生菌筛选培养基的络合碘体积为1—2毫升。

[0009] 步骤5)中,透明圈直径/菌落直径的比值大于1.7的菌落,为产酶活性高的菌落。

[0010] 本发明提供的一种筛选淀粉酶产生菌的显色方法,由于采用将络合碘均匀喷雾的方式,初步筛选产酶微生物,具有显色时间短、试剂保存期长、操作方便方便、显色效果稳定的优势,能方便、快捷地初步筛选产胞外淀粉酶菌株,可替代碘液显色法和碘熏蒸法推广使用。

具体实施方式

[0011] 实施例一

一种筛选淀粉酶产生菌的显色方法,该方法包括以下步骤:

1) 采集样本:从三峡大学南苑学生食堂附近采集土壤样本(5克),立即将样本带回实验室;

2) 培养:

培养基组成(w/v):2% 可溶性淀粉,0.5% 蛋白胨,0.5% NaCl,0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.05% KH_2PO_4 ,1.5% 琼脂,pH 7.0-7.2;

将步骤1)采集的样本混合均匀后,取约0.5克快速划线接种于淀粉酶产生菌筛选培养基上,于28℃培养4天;

3) 显色:将1-2毫升络合碘快速而均匀地喷雾于培养基上,静置2分钟后可见明显的淀粉水解透明圈;

4) 转接:将产生透明圈的菌落转接到新的筛选培养基上,培养4天,重复步骤3)检测淀粉酶产生情况,用透明圈直径/菌落直径的比值评价产酶活性;

5) 筛选:将透明圈直径/菌落直径的比值大于1.7的菌落再次划线培养4天,重复步骤3)检测淀粉酶产生情况,获得透明圈直径/菌落直径的比值达2.2的产淀粉酶的细菌。

[0012] 实施例二

一种筛选淀粉酶产生菌的显色方法,该方法包括以下步骤:

1) 采集样本:从三峡大学欣苑学生食堂附近采集土壤样本(4克),立即将样本带回实验室;

2) 培养:

培养基组成(w/v):1.5% 可溶性淀粉,0.5% 蛋白胨,0.5% NaCl,0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.05% KH_2PO_4 ,1.5% 琼脂,pH 7.0-7.2;

将步骤1)采集的样本梯度稀释后,涂布于淀粉酶产生菌筛选培养基上,于38℃培养3天;

3) 显色:将1-2毫升络合碘快速而均匀地喷雾于培养基上,静置3分钟后可见明显的淀粉水解透明圈;

4) 转接:将产生透明圈的菌落转接到新的筛选培养基上,培养3天,重复步骤3)检测淀粉酶产生情况,用透明圈直径/菌落直径的比值评价产酶活性;

5) 筛选:将透明圈直径/菌落直径的比值大于1.7的菌落再次划线培养3天,重复步骤3)检测淀粉酶产生情况,获得透明圈直径/菌落直径的比值达1.9的产淀粉酶的细菌。

[0013] 实施例三

一种筛选淀粉酶产生菌的显色方法,该方法包括以下步骤:

1) 采集样本:从三峡大学东苑学生食堂附近采集水样(5 毫升),立即将样本带回实验室;

2) 培养:

培养基组成(w/v):可溶性淀粉 2.5%,蛋白胨 0.5%, NaCl 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, KH_2PO_4 0.05%,琼脂 1.5%, pH 6.0-7.0;

将步骤 1) 采集的样本划线接种于淀粉酶产生菌筛选培养基上,于 30℃ 培养 4 天;

3) 显色:将 1-2 毫升络合碘快速而均匀地喷雾于培养基上,静置 4 分钟后可见明显的淀粉水解透明圈;

4) 转接:将产生透明圈的菌落转接到新的筛选培养基上,培养 4 天,重复步骤 3) 检测淀粉酶产生情况,用透明圈直径 / 菌落直径的比值评价产酶活性;

5) 筛选:将透明圈直径 / 菌落直径的比值大于 1.7 的菌落再次划线培养 4 天,重复步骤 3) 检测淀粉酶产生情况,获得透明圈直径 / 菌落直径的比值达 2.3 的产淀粉酶的细菌。