

α -淀粉酶高产菌株选育方法的研究

门大鹏 贾士芳 郭兴华

(中国科学院微生物研究所, 北京)

摘要 在含有氨苄青霉素 1—10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 LB 液体培养基中, 接入枯草芽孢杆菌 BF 7658 菌悬液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡培养 3—5 天, 经平板分离单菌落以及摇瓶发酵试验, 初筛获得 2213、2104 和 2120 等 α -淀粉酶高产菌株。将 2213 菌株的菌悬液涂布于含有 4—6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素的 2% 淀粉培养基上, 复筛得到 4213、4218、4237 等 α -淀粉酶高产菌株。4213 菌株再经 4 次亚硝基胍诱变, 未能得到蛋白酶活性低、 α -淀粉酶活性高的突变株。

关键词 α -淀粉酶; 氨苄青霉素; 亚硝基胍

α -淀粉酶是工业酶制剂的重要产品之一。基因对 α -淀粉酶产生和分泌的调节有两个系统。一是酶产生及其调控系统, 二是酶分泌的调控系统。Hitotsuganagi^[1] 和 Yoneda^[2] 等分别报道了调节基因对提高 α -淀粉酶产量的协同作用。Hitotsuganagi^[1] 还报道了氨苄青霉素处理 α -淀粉酶产生菌可提高 α -淀粉酶产量, 而蛋白酶的活力则与亲株相似。用亚硝基胍诱变, 不仅可提高 α -淀粉酶产量, 同时还可筛选出蛋白酶活力下降的突变株。Maruo^[3] 报道了连续使用环丝氨酸处理 α -淀粉酶产生菌, 可逐步提高 α -淀粉酶的产量。本文报道连续使用氨苄青霉素和亚硝基胍处理 α -淀粉酶产生菌的结果。

材 料 和 方 法

1. 菌株: 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) BF 7658 为本室贾盘兴同志赠送。

2. 试剂: 氨苄青霉素为卫生部药品生物制品检定所制备的标准品, 亚硝基胍为进口分装。

3. 氨苄青霉素处理: 按 Oh 等^[4] 的方法用 LB 液体培养基培养菌液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至对数后期。用 LB 液体培养基将菌液稀释至 $1-2 \times 10^5/\text{ml}$, 加入灭菌盛有等体积 LB 液体培养基的大试管中, 共 10 管。分别加入过滤无菌的氨苄青霉素, 其终浓度依次为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。斜放在试管架上,

37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 3—5 天。待某一浓度试管中菌液变为混浊后, 取出后稀释, 涂在加有 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素的 1% 可溶性淀粉培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3—5 天。加入稀碘液, 挑出淀粉水解圈大于亲株、生长丰满的菌落, 进行摇瓶发酵测定酶活力。第二次和第三次处理时, 选用 α -淀粉酶活力高的突变株作为出发菌株, 用生理盐水稀释后涂在分别含 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素的淀粉培养基上, 再次筛选淀粉水解圈大, 生长丰满的菌落, 摇瓶发酵后测定酶活力。

4. 亚硝基胍诱变: 收集生长对数后期的菌液, 离心后用 pH 6.0 磷酸盐缓冲液洗涤一次。重新悬浮后加入亚硝基胍 (终浓度为 900 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴处理 40—45 分钟。稀释处理后的菌液, 涂在淀粉培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养两天, 加稀碘液, 挑出淀粉水解圈大于出发菌的菌落, 进一步测定酶活力。

5. 发酵与酶活力测定: 摇瓶发酵培养基按无锡酶制剂厂等^[5] 的成分配制。500 ml 三角瓶装料 50 ml。37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 48 小时。 α -淀粉酶活按 Fuwa^[6] 法, 72 型分光光度计 700 nm 测量光密度 (OD), 然后换算为酶活力 (u/ml)。蛋白酶活力测定: 挑选淀粉水解圈大的菌落, 在干酪素培养基上测定水解圈, 挑选水解圈小的菌落, 进行摇瓶发酵测定, 按无锡酶制剂

本课题为国家科委资助项目。

厂的方法进行。

结果与讨论

(一) 氨基青霉素处理

采用前述方法从 232 个菌株中选到 9 个酶活力高的突变株,结果列于表 1。2213、2104 和 2120 株分别比亲株酶活力提高 70.5%, 51.3% 和 50.7%。

表 1 α -淀粉酶活力测定

菌株	α -淀粉酶活力 (u/ml)	菌株	α -淀粉酶活力 (u/ml)
BF7658	19999	2119	25882
2102	25588	2120	30174
2104	30258	2121	26620
2105	28529	2204	28382
2106	24852	2213	34117

对 2213、2104 和 2120 继续用含有氨基青霉素的淀粉培养基分离具有抗性、淀粉水解圈大的单菌落。酶活力测定表明产酶水平提高的菌株是少数,大部分酶活力都有所下降,或接近出发菌株。部分酶活力较高的菌株(表 2)其产酶能力提高的幅度不大。

表 2 经连续三次氨基青霉素处理部分菌株酶活力的测定

菌株	α -淀粉酶活力 (u/ml)	菌株	α -淀粉酶活力 (u/ml)
BF7658	24596	4219	38187
426	29878	4224	35258
4213	43797	4237	41817
4216	35217	5338	36196
4217	41202	5347	31375
4218	42462	5354	39899

氨基青霉素抑制包括枯草芽孢杆菌在内的革兰氏阳性菌细胞壁组分粘肽合成最后一步转肽作用。用氨基青霉素处理后,有可能得到具有抗性而细胞壁结构也有所改变的菌株,有利于 α -淀粉酶的分泌,从而提高了 α -淀粉酶的活力。实验结果出现三种类型的菌株。一是酶活力下降的菌株,这一类型占多数;二是与出发菌株酶活力相似的菌株占一定比例;三是酶活力比出发菌株提高的菌株,这类菌株占少数。这一结果与表 1、表 2 的数据表明, α -淀粉酶活

力的提高与抗氨基青霉素之间没有什么相关性,两个性状是各自独立发生变化的。因之推测对氨基青霉素抗性的产生,可能是转肽作用使得抑制作用不敏感,或者是产生能分解氨基青霉素的 β -内酰胺酶。而这些改变与 α -淀粉酶的分泌无关,或者不利于酶的分泌、导致酶活力的下降或与出发菌相似。另一种解释是抗性和有利于酶分泌(细胞壁结构发生了改变)的性状同时在一个细胞中发生,从而表现出具有抗性和高的酶活力。综上所述,用氨基青霉素连续处理枯草芽孢杆菌,可以选出酶活力高的菌株。

(二) 亚硝基胍处理

通常诱变 α -淀粉酶枯草芽孢杆菌时, α -淀粉酶活力高的突变株,其蛋白酶活力也随着提高。而生产上的要求是 α -淀粉酶活力提高,蛋白酶活力下降,至少是与出发菌株相似。用亚硝基胍处理 4213 菌株,其后对 α -淀粉酶活力高,蛋白酶与出发菌株相似的菌株连续处理四次,结果列入表 3。从表 3 可以看出,经亚硝基胍连续处理,第四代突变株 α -淀粉酶活力几乎与出发菌株相似,蛋白酶稍有下降。因之连续用亚硝基胍处理的效果并不理想,以处理一次为宜。结果并不理想的第二个原因是,每次筛选的菌株数为 200—300 株,筛选的数量偏低。若能筛选 2000—3000 个菌株,从实验结果推测和报道的资料来看,有可能比连续多次处理,筛选

表 3 亚硝基胍连续处理的效果

菌株	α -淀粉酶活力 (u/ml)	蛋白酶活力 (u/ml)
BF7658	24596	870
4213	43799	939
13226	52419	899
26411	50454	—
411135	48420	807
3573	52288	701

菌株量少的方案要好些。

衣霉素 (tunicamycin) 处理 α -淀粉酶产生菌,也具有提高 α -淀粉酶的产酶能力,而不提高蛋白酶的效应,其实验结果将另文报道。

参 考 文 献

- [1] Hitotsuganagi, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **43**: 2343—2349, 1979.
- [2] Yoneda, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**: 274—276, 1980.
- [3] Maruo, B. et al.: *J. Gene. Appl. Microbiol.*, **31**: 323—328, 1985.
- [4] Oh, Y. K. et al.: *Development in Industrial. Microbiol.*, **23**: 325—329, 1982.
- [5] 无锡酶制剂厂等: 遗传学报, **2**: 202—206, 1975。
- [6] Fuwa, H.: *J. Biochem.*, **41**: 583—603, 1954.