研究报告

耐热性 α -淀粉酶产生菌的选育和原生质体融合育种

张乐弦*

诸葛健

(朝鲜、平壤轻工业大学)

(无锡轻工业学院发酵工程系)

前 言

在发酵工业中,耐热性 α -淀粉酶因其良好的热稳定性,在生产和应用上具有很多优点。特别是在酸性条件下具有良好的热稳定性的 α -淀粉酶,在生产玉米高果糖浆中淀粉液化后,不必调节pH,使之操作简便,减少糖液精制要求。因此目前不少研究者^[1,2]进行这方面的研究工作。

Tamuri等^[1]报道的嗜热性脂肪芽孢杆菌(*Bac. Stearothermophilus*) α -淀粉酶在低CaCl₂浓度下,显示良好热稳定性。

Kanno等^[2]所报道的嗜热芽孢杆菌(*Bac. acidocaldarius*) α -淀粉酶,在pH2(70℃)和pH4.5(90℃)的条件下,保持30分钟,残活力分别为原活力的70%和90%。

本文报告对从土壤中分离耐热性 α -淀粉酶产生菌种,采用诱变原生质体融合技术进行的育种。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 培养基

1.1.1.1 完全培养基(CM)组成(%):牛肉膏1.4,蛋白胨0.4,酵母膏0.5,可溶性淀粉2.0,pH5.0或7.0,1kg/cm²灭菌20min。从土壤中菌种分离时采用pH5.0和7.0,其它都用pH7.0的CM培养基。配制固体培养基时加琼脂2.0%;

1.1.1.2 基本培养基(MM)组成(%):MgSO₄·7H₂O 0.02,柠檬酸0.2,NH₄H₂PO₄0.35,K₂HPO₄1.0,葡萄糖0.5,pH7.0。配制固体培养基时加琼脂粉1.5%,0.7kg/cm²灭菌20min;

1.1.1.3 高渗培养基:在固体CM和MM培养基中加0.5mol/l蔗糖和20mmol/lMgCl₂·6H₂O;

1.1.1.4 制备原生质体的SMM液:0.5mol/l蔗糖,20mmol/lMgCl₂·6H₂O,0.2mol/l顺丁烯二酸;

1.1.1.5 摇瓶筛选培养基(%):牛肉膏1.4,蛋白胨0.5,可溶性淀粉3.0,pH7.0,分装100ml三角瓶,每瓶10ml,1kg/cm²灭菌20min。

本文1987年6月30日收到。

*发酵工程系进修生。

1.1.2 试剂

1.1.2.1 溶酶酶: 上海市禽类产品公司禽蛋厂, 1980年产, 10000u/mg;

1.1.2.2 聚乙二醇(PEG) $M = 6000$, 日本产;

1.1.2.3 亚硝基胍(NTG): 瑞典产。

} 无锡轻工业
学院微生物
教研室提供

1.2 方法

1.2.1 产 α -淀粉酶的分选方法

1.2.1.1 样品: 从无锡、南京、连云港等地区的土壤中采样;

1.2.1.2 分离方法: 取土样5g、放在盛有20ml无菌水的100ml三角瓶中, 振荡、使它充分分散制成悬液, 然后静置30s, 用无菌吸管吸取0.5~1ml涂布于pH5.0和7.0的CM培养基平板上, 50℃和70℃、20~24h培养, 将平板上长出来的菌落洗下, 再进行稀释平板或划线培养后, 挑取形成透明圈的菌落, 然后进行摇瓶筛选。

1.2.2 分离菌株的诱变育种

1.2.2.1 诱变方法: 取对数生长期菌液、用生理盐水离心洗涤两次, 用0.1mol/l, pH7.0磷酸缓冲液制成菌体浓度约为 2×10^8 个/ml的单细胞悬液, 采用 $C_0^{60}\gamma$ -射线诱变, 照射剂量为3万~20万R。

1.2.2.2 变异株的分离筛选: γ -射线处理液1ml加入含有10ml摇瓶筛选培养基的100ml三角瓶中, 在45℃培养12h, 一定程度稀释后涂布于CM平板上。在65℃温度下20~24h培养后, 挑取菌落传代斜面上, 进行摇瓶筛选。

1.2.3 原生质体融合育种

1.2.3.1 出发菌株: 从土壤中筛选的嗜热性芽孢杆菌 Bac、SP.38—5 和中温性芽孢杆菌 Bac、SP.14;

1.2.3.2 亲本标记菌株的获得: 采用 γ -射线为诱变剂进行38—5的诱变, 照射剂量为7万R。采用亚硝基胍进行14菌株的诱变, 处理浓度为500 μ g/ml, 用pH6.0磷酸缓冲液配制单细胞悬浮液, 在40℃、30min处理。采用点种法筛选营养缺陷型, 并经过传代验证, 稳定的菌株作为融合的亲本;

1.2.3.3 原生质体制备: 将两亲株分别接种在盛有20mlCM培养基的300ml三角瓶中, 分别在55℃和35℃18h振荡培养。培养液3000r/min离心10min洗涤两次, 将菌体悬浮于4ml SMM缓冲液中, 加入SMM液配制的溶菌酶液(最佳浓度为200~500 μ g/ml), 置于40℃水浴中溶解细胞壁、定时取样镜检, 杆菌基本上都变成原生质体后, 4000r/min离心10min弃上清液悬浮于SMM中离心洗涤两次。将此液一定量悬浮于无菌蒸馏水中, 使原生质体裂解死亡, 以无菌水适当稀释涂布于CM平板上, 在35℃和65℃温度下24~48h培养计数, 即得经酶处理剩余的菌数;

1.2.3.4 原生质体的再生: 取一定量的原生质体, 用SMM溶液适当稀释涂布于高渗CM平板上, 35℃和45℃(高温菌)培养48h, 即得原生质体再生菌落和细胞壁溶解而形成的菌落数;

1.2.3.5 原生质体融合和融合子的检出: 两亲本原生质体各1ml混合, 4000r/min离心10min弃上清液, 沉淀中加入0.2mlSMM溶液混匀, 再加入SMM溶液配制的40%聚乙二醇($M = 6000$)1.8ml, 在40℃中保温1~2min, 加SMM稀释10~100倍, 吸取0.1ml涂布于高渗基本培养基上, 37℃培养48h, 将在高渗基本培养基上长出来的菌落点种于MM平板上, 48h培养, 此时MM上长出来的菌落作为营养互补的融合子。另各取单一亲株及混和后不加PEG的原

生质体分别作对照试验;

1.2.3.6 原生质体和原生质体再生率计算: 按江行娟等^[8]方法进行。

1.2.4 分析方法

1.2.4.1 α -淀粉酶的活力测定: 参照比色法^[4](进行了改良)。于两支试管中分别加入pH6.0磷酸缓冲液配制的1%可溶性淀粉2ml, 在 $40\pm 2^\circ\text{C}$ 恒温水槽中预热4~5min, 于一支试管中加入酶液1ml, 另一支试管中加入蒸馏水1ml摇匀, 正确反应10min, 吸取此反应液0.1ml加入0.005%碘液(用0.1mol/lHCl制备)中, 停止酶反应和显色。在 $\lambda = 650\text{nm}$, 杯厚10mm下比色, 求得OD。酶活力按文献^[4]计算。上述条件下1个糊精化单位是将1g可溶性淀粉水解至DE30%的酶量;

1.2.4.2 耐热性的测定: $1/15\text{M}$ pH5.0磷酸缓冲液1ml和摇瓶培养离心液1ml放在试管中, 在 70°C 和 90°C 分别准确保持15min, 立即置冷水中冷却, 测定酶活力。

2 结果与讨论

2.1 耐热性 α -淀粉酶产生株的获得

从30个土样中共分离85株细菌, 其中具有耐热性的菌只有3株, 见表1。

表1 从土壤中分离 α -淀粉酶产生菌分离情况

温度 ($^\circ\text{C}$)	分离条件		产 α -淀粉酶的总分离菌数(个)	产耐热性 α -淀粉酶的菌数(个)
		pH		
50	5		28	—
	7		45	—
70	5		4	1
	7		8	2

表2 几种分离菌株的 α -淀粉酶活性和耐热性

菌号	分离条件		α -淀粉酶活力(u/ml)	耐热性*(PnS)	
	温度($^\circ\text{C}$)	pH		70°C	90°C
14			54.8	12	
23			46.5	10	
24	50	7.0	32.6	11	
31			25.7	9	
34	70	5.0	1.5	45	
37			1.4	35	
38			1.4	100	90
25	70	7.0	0.5	95	78
26			1.4	90	55
29			1.4	50	—

* 指保持原活力的百分数

从摇瓶筛选结果(表2)可以看出,在50℃条件下分离到的几种菌株的 α -淀粉酶的产量较高,在25~50单位范围内,但没有耐热性,在70℃温度下维持15min后大部分失活。虽然在70℃高温下分离的嗜热性菌株 α -淀粉酶活力甚低,但具有良好的热稳定性。其中38号菌株所产生的 α -淀粉酶在pH5.0、90℃温度下维持15min,能保持原活力的90%。

菌株38和14作为出发菌株进行了此后诱变育种和原生质体融合育种。两株都是革兰氏阳性芽孢杆菌。

2.2 $C_0^{60}\gamma$ -射线育种

2.2.1 照射剂量与正变率: $C_0^{60}\gamma$ -射线照射剂量与正变率系列于表3。

表3 $C_0^{60}\gamma$ -射线照射效应

剂 量(R)	死 亡 率(%)	正 变 率(%)
3×10^4	65.0	2.5
5×10^4	87.0	17.5
7×10^4	92.7	12.5
10×10^4	98.4	2.5
15×10^4	98.6	—
20×10^4	99.8	—

当照射剂量 $5 \times 10^4 \sim 7 \times 10^4 R$ 时死亡率 87~92.7%, 正变率 12.5~17.5%。

2.2.2 突变株的 α -淀粉酶活力和热稳定性。

表4 变异株的酶活力和热稳定性

菌 号	α -淀粉酶活力		热稳定性(%)
	(u/ml)	提 高 (%)	
38	1.50	100	90
38—3	2.25	150	91
38—5	2.30	152	90
38—7	2.17	145	92

45℃、30h 培养后测定

从表4可见, γ -射线诱变处理后酶活力提高幅度45~52%,其热稳定性没变。

2.3 嗜热性芽孢杆菌38—5和中温性芽孢杆菌14的原生质体融合

2.3.1 亲珠标记的获得:用 $C_0^{60}\gamma$ -射线和亚硝基胍诱变,筛选了营养缺陷型。诱变处理后营养缺陷型出现率如表5。

表 5 两种菌株的营养缺陷型出现率

菌株	诱变剂	剂 量	死亡率(%)	营养缺陷型出现频率
38—5	$C_{60}\gamma$ -射线	$7 \times 10^4 R$	97.7	5×10^{-2}
14	亚硝基胍	500 $\mu g/ml$ 40 $^{\circ}C$ 、30min	50.2	3×10^{-3}

如表 5 所示, 在上述条件下营养缺陷型出现频率分别为 5×10^{-2} 和 3×10^{-3} , 比已报道的数据小得多。筛选到的直接亲本 38—5—71 和 14—5 的生长因子列于表 6。

表 6 直接亲本在鉴别培养基上生长情况

菌株	培养基					
	MM	MM + Val	MM $\pm$ Ile	MM + Val + Ile	MM + Cyt	CM
38—5—71	—	—	—	+	—	+
14—5	—	—	—	—	+	+

38—5—71 为 38—5 的突变株; 14—5 为 14 的突变株、+ 生长, - 不长

2.3.2 原生质体的制备和再生

原生质体的制备和再生结果列于表 7 和表 8。试验过程中发现对两亲本的溶菌酶作用不同, 溶解后其性状也不一样。

表 7 加溶菌酶量和溶菌时间

菌株	加酶量($\mu g/ml$)	所要时间(min)
38—5—71	200	120
	500	60
14—5	200	30
	500	10

当加酶量 200 $\mu g/ml$ 时菌株 14~530 分以内都转变为原生质体, 但 37—5—71 加酶量 500 $\mu g/ml$ 、1 h 后才全部变成原生质体。溶菌酶作用后 14—5 的原生质体的粘度特别高, 当加酶量 200 $\mu g/ml$ 时, 酶作用时间超过 40min 以上, 细胞壁消化液就变成象卵白一样的胶态, 不能离心洗涤, 这是原生质出泄的结果。

表 8 原生质体形成率和再生率

菌株	加酶量($\mu g/ml$)	加酶前总菌数(个/ml)	未溶解菌数(个/ml)	原生质体(%)	再生培养基上总菌数(个/ml)	再生率(%)
38—5—71	500	2.3×10^8	4.6×10^5	99.80	6.3×10^6	2.54
14—5	200	3.2×10^8	1.3×10^5	99.96	4.7×10^6	1.46

原生质体形成率跟文献^[7-9]数据一致, 但再生率两株都比较低。

2.3.3 原生质体融合: 通过原生质体融合获得了营养互补的融合子。

2.3.3.1 亲株和融合子的生长温度比较, 结果见表 9。

表 9 亲株和融合子的生长温度比较

菌株	温度(°C)	35	55	65
亲本14—5		++	—	—
38—5—71		—	+	++
融合子	1	++	+	±
	2	++	+	±
	3	++	+	±
	4	++	+	±
	5	++	+	±
	6	++	+	±
	7	++	+	±

在CM24h培养后观察, —不长, +长得好, ±长得微小

表10所示融合子的生长温度范围比亲株明显扩大了, 亲株14—5在 55°C 温度下不长, 但融合子都生长, 在65°C下也微小生长;

2.3.3.2 融合子的 α -淀粉酶产量和其热稳定性, 从表 10 可以看出, 大部分融合子酶产量提高了, 其中融合子 4 提高33.1%, 耐热性没有显著变化, 偏近亲株14—5。

致 谢

本研究得到了微生物教研室老师们的热情帮助和指教, 谨此表示感谢

参 考 文 献

- [1] K L Kindle. Appl. Biochem. Biotechn. Vol. 8: 157~170, 1983
- [2] Kanno Mutsuo. Agric, Biol Chem. Vol. 50: 23~31, 1986
- [3] 诸葛健. 发酵微生物实验技术
- [4] Метод определения активности Z-дроллмпъеских ферментов p.120, 1981
- [5] 章名春. 工业微生物诱变育种. 1984
- [6] 诸葛健. 无锡轻工业学院学报. 4(3): 11, 1985
- [7] 诸葛健. 微生物学报. 24(1): 74~79, 1984
- [8] 江行娟等. 遗传学报. 8(1): 1~7, 1981
- [9] 李明凤等. 遗传学报. 8(2): 109~115, 1981