

多重抗药性突变株中 α -淀粉酶 高产菌株选育

汪 钊* 金其荣

(发酵工程系)

摘要 以解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) A-4 为出发菌株,经诱变处理,选育多重抗药性突变株。研究表明,抗药性突变株 α -淀粉酶产量提高的正变率和正变幅度明显大于非抗药性突变株,负变率和负变幅度也较高。经 NTG 和 NTG-UV 诱变处理,获得一株林可霉素、D-环丝氨酸和万古霉素多重抗性突变株 LCV₅ (Lin^r, Cs^r, Vm^r),其 α -淀粉酶活力比出发菌株 A-4 提高 32.5%,发酵周期短,摇瓶为 40h,酶活力达 461u/ml。

关键词 α -淀粉酶高产菌体;亚硝基胍(NTG);D-环丝氨酸(Cs);万古霉素(Vm);林可霉素(Lin)

0 前 言

α -淀粉酶广泛应用用于酒精、酿造、味精、制药、制糖和纺织等工业领域,是国内外应用最广,产量最大的酶制剂之一。大量文献资料报道,芽孢杆菌抗突变体可以明显提高胞外酶的产量^[1~5],所用抗药性标记主要有衣霉素、D-环丝氨酸、万古霉素、瑞斯托霉素、氨苄表霉素、利福平等。这些抗生素在筛选芽孢杆菌胞外酶高产株方面应用广泛,可以大大提高筛选效率。本研究对解淀粉芽孢杆菌 A-4 菌株进行诱变处理,从中选育出的多重抗药性突变株 LCV₅,其 α -淀粉酶产量明显提高,发酵周期缩短。

1 材料和方法

1.1 菌株

D-环丝氨酸抗性生产菌株** ,解淀粉芽孢杆菌 A-4(*Bacillus amyloliquefaciens*)为出发

收稿日期:1993-09-16

* 现在浙江工业大学轻工系工作

** 由金其荣教授提供

菌株。

1.2 主要试剂

亚硝基胍(NTG)、D-环丝氨酸(Cs)和万古霉素(Vm)均为 Sigma 产品,林可霉素(Lin)为国产。

1.3 培养基和培养条件

1.3.1 斜面培养基 可溶性淀粉 2%,蛋白胨 1%,NaCl 0.5%,琼脂 2.0%,调 pH7.0~7.2,1atm 蒸汽灭菌 30min。

1.3.2 平板分离培养基 可溶性淀粉 6%,蛋白胨 1%,NaCl 0.5%,琼脂 1.2%,pH7.0~7.2,1atm 蒸汽灭菌 30min。

1.3.3 摇瓶发酵培养基 玉米粉 9%,豆饼粉 5%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.8%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4%, NH_4Cl 0.15%, CaCl_2 0.2%,自然 pH 值。500ml 三角瓶盖 8 层纱布,分装 25ml,1atm 灭菌 30min,每瓶接斜面种子一环。在 $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 往复式摇床(110 次/min,振幅 8cm)培养 40h。

1.4 菌种诱变处理和抗药性突变株筛选

1.4.1 第一次诱变处理 将出发菌株 A-4 在液体肉汤培养基中培养 10.5h,取 20ml 菌液于 4000r/min 离心 10min,弃上清液,用无菌生理盐水洗涤菌体二次。然后将菌体悬浮于 10ml pH6.0 磷酸缓冲液中,取 4.5ml 菌悬液加亚硝基胍(NTG)0.5ml(1mg/ml), 37°C 振荡 30min,然后用 pH6.0 磷酸缓冲液稀释终止反应。

1.4.2 第二次诱变处理 NTG 诱变处理:将第一次诱变处理选出的双重抗药性突变株 NTG₉,在液体肉汤中培养 10.5h,取 20ml 菌液于 4000r/min 离心 10min,把洗涤后得到的菌悬液 16ml 加 NTG4ml(0.2mg/ml), 37°C 振荡 30min,然后于 3500r/min 离心 10min,倾出上清液,用生理盐水洗涤一次,将菌体加入液体肉汤培养基中, 37°C 振荡培养 4h,离心浓缩 5 倍。亚硝基胍-紫外线(NTG-UV)复合诱变处理:将第二次 NTG 诱变处理后的浓缩菌液稀释 5 倍,吸 3ml 于 9cm 平板中,用 UV 距离 45cm 照射 4min。

1.4.3 多重抗药性突变株的筛选 林可霉素和 D-环丝氨酸双重抗性突变株的筛选:(1)将出发菌株 A-4 经 NTG 诱变后的菌体,先在含 $40\mu\text{g/ml}$ D-环丝氨酸肉汤培养基中 37°C 培养 24h,再涂布到林可霉素($100\mu\text{g/ml}$)梯度平板上, 37°C 培养 4d。把抗药性突变株($\text{Lin}^r, \text{Cs}^r$)挑接斜面;(2)将第一次诱变处理后得到的双重抗性突变株 NTG₉($\text{Lin}^r, \text{Cs}^r$),再经过 NTG 诱变处理,把离心浓缩后的菌涂布到 D-环丝氨酸($400\mu\text{g/ml}$)梯度平板上, 37°C 培养 4d,把抗药性突变株挑接斜面。另外再取离心浓缩后的菌液加到含 D-环丝氨酸的肉汤培养基中,逐步提高 D-环丝氨酸浓度,分别为 80、100、200、 $300\mu\text{g/ml}$,进行 4 次培养,培养温度为 37°C ,每次振荡培养 24h,富集 D-环丝氨酸抗性突变株,最后把第四次培养液进行平板分离,点种于 D-环丝氨酸($400\mu\text{g/ml}$)平板上, 37°C 培养 4d,挑接抗药性突变株于斜面上。林可霉素、D-环丝氨酸和万古霉素多重抗性突变株的筛选:将第一次 NTG 诱变处理得到的双重抗性突变株 NTG₉($\text{Lin}^r, \text{Cs}^r$),再经过 NTG-UV 复合诱变处理,把菌液涂布到万古霉素($1,6\mu\text{g/ml}$)梯度平板上, 37°C 培养 4d,挑接抗药性突变株($\text{Lin}^r, \text{Cs}^r, \text{Vm}^r$)于斜面上。

1.5 α -淀粉酶高产菌株的筛选和酶活力测定

把诱变后双重和多重抗药性突变株及不含抗生素的平板分离的突变株挑接斜面, 37°C 培养 2d,然后转接一环菌体入装有发酵培养基的三角瓶中, 37°C 培养 40h,纱布过滤后,按轻

工业部部颁标准测定 α -淀粉酶活力^[6]。

2 结果和讨论

2.1 第一次诱变后 D-环丝氨酸和林可霉素双重抗性突变株的筛选

用 NTG 诱变处理 A-4 菌株,细胞的致死率为 94.4%。把处理后的菌体在含 D-环丝氨酸 40 μ g/ml 的肉汤培养基中培养后,再涂布于含林可霉素 100 μ g/ml 的培养基制成的梯度平板上,进行抗药性突变株筛选。另取一部分诱变后的菌体在不含林可霉素的平板上分离,得到非抗药性突变株。然后摇瓶发酵,测定 α -淀粉酶活力,对比两者产酶情况,得到 α -淀粉酶产量分布如图 1。

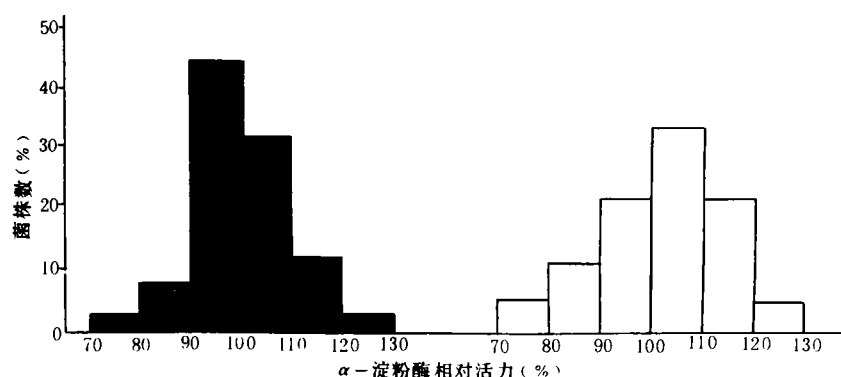


图 1 NTG 诱变处理 A-4 菌株 α -淀粉酶产量分布

非抗药性突变株 □ D-环丝氨酸和林可霉素抗性突变株

从图 1 中可以看出,D-环丝氨酸和林可霉素抗性突变株 α -淀粉酶产量正变率明显高于非抗药性突变体。抗药性突变体 α -淀粉酶产量提高 10% 以上的正变率达 26.2%,而非抗性突变体提高 10% 以上的正变率只有 13%。从 α -淀粉酶产量降低 10% 以上负变率来看,抗药性突变株也大于非抗药性突变株,它们分别为 17.7% 和 9.1%。从抗药性突变株中筛选到 α -淀粉酶活力比出发菌株 A-4 提高 8.5%~14.3% 的菌株 L₁₀,并将其进行了大量自然分离,得到稳定的 D-环丝氨酸和林可霉素双重抗性突变株 NTG₉, α -淀粉酶活力达 380u/ml,测定其 D-环丝氨酸和林可霉素最小抑制浓度均为 40 μ g/ml。

林可霉素是一种作用于细胞蛋白质而起到抑菌或杀菌作用的抗生素。关口顺一绘制的枯草杆菌基因图中^[7],林可霉素抗性基因位于 α -淀粉酶调节基因(amyR)和衣霉素抗性基因(tmy7)上游,一般认为与 α -淀粉酶的合成无关。用 NTG 诱变解淀粉芽孢杆菌,选育林可霉素抗性突变株,结果获得 α -淀粉酶产量提高的突变株比例高于非抗性突变株。这说明林可霉素抗性突变株与 α -淀粉酶产量也有相关性,但起到什么作用,目前还不清楚。

2.2 第二次诱变后 D-环丝氨酸和林可霉素双重抗性突变株的筛选

以 NTG₉(Lin^r,Cs^r)菌株为出发菌株,经 NTG 诱变处理,致死率为 77.8%,诱变后菌体在 D-环丝氨酸浓度为 400 μ g/ml 的梯度平板上分离,结果发现 D-环丝氨酸高浓度区很少抗性菌生长,在低浓度区有一部分抗性菌生长,把这部分菌接入斜面培养,然后摇瓶发酵,测定 α -淀粉酶活力,得到 α -淀粉酶产量分布如图 2。

将上述 NTG₉ 经诱变后的菌体,逐步提高 D-环丝氨酸浓度,在 80, 100, 200, 300 μ g/ml 的 D-环丝氨酸肉汤培养基中,连续培养 4 次,富集抗 D-环丝氨酸的突变株,将第 4 次培养液平板分离,点种于 400 μ g/ml D-环丝氨酸平板,把生长的菌株移入斜面培养基。摇瓶发酵,测定 α -淀粉酶活力,得到 α -淀粉酶产量分布如图 3。

比较图 2 和图 3,可以看到 NTG 诱变后菌体不经 D-环丝氨酸富集 α -

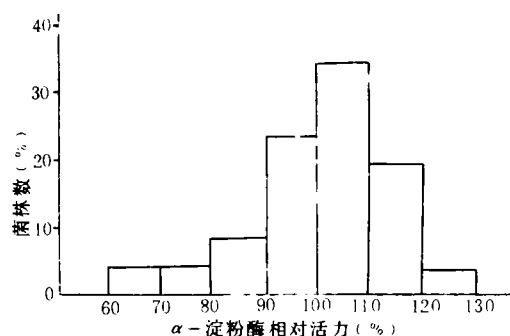


图 2 NTG 诱变处理 NTG₉ 菌株抗 D-环丝氨酸和林可霉素菌株 α -淀粉酶产量分布
(诱变后菌体不经 D-环丝氨酸富集培养)

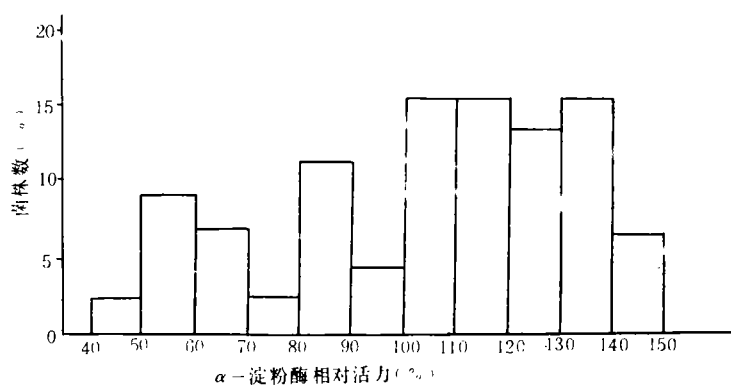


图 3 NTG 诱变处理 NTG₉ 菌株抗 D-环丝氨酸和林可霉素菌株 α -淀粉酶产量分布
(诱变后菌体经 D-环丝氨酸富集培养)

淀粉酶产量提高的正变率较低,酶活力提高幅度较小,酶活力提高 10% 以上的正变率为 24%,酶活力提高幅度最高为 23.8%,产量下降 10% 以下的负变率为 16%。而经过 D-环丝氨酸富集培养后,酶活力提高 10% 以上的正变率达 45.7%,最高正变幅度为 40%,产量下降 10% 以上的负变率为 30.5%,酶活力下降幅度也大。比较说明,NTG 诱变处理后的菌体经 D-环丝氨酸富集培养,得到抗药性突变株, α -淀粉酶产量正变率明显提高,而且正变幅度大,同时负变率和酶活力下降幅度也增加。经过筛选得到一株 α -淀粉酶活力为 434u/ml 的 D-环丝氨酸和林可霉素双重抗性变异株 D₂₄。

2.3 NTG-UV 复合诱变后林可霉素、D-环丝氨酸和万古霉素多重抗性突变株的筛选

以上述 NTG₉ (Lin^r, Cs^r) 菌株经 NTG 诱变后的菌体, 用 UV 照射处理, 致死率为 99.98%。然后在含万古霉素 1.6 μ g/ml 的梯度平板上分离抗药性突变株, 点种在 NTG₉ 最小抑制浓度 0.5 μ g/ml 万古霉素平板上培养, 把生长的菌移入斜面培养基, 摇瓶发酵, 测定 α -淀粉酶活力, 得到 α -淀粉酶产量分布如图 4。

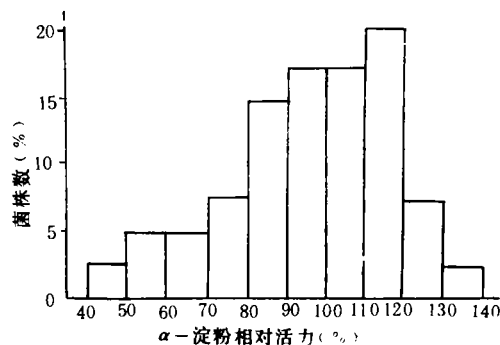


图 4 NTG-UV 诱变处理 NTG₉ 菌株抗万古霉素突变株 α -淀粉酶产量分布

结果表明, NTG-UV 复合处理 NTG₉ 菌株, 得到抗万古霉素最小抑制浓度突变株, α -淀粉酶产量提高 10% 以上正变率为 30%, 降低 10% 以下的负变率为 25%, 正变幅度最高为 34%。说明万古霉素抗性突变株可以有效提高淀粉芽孢杆菌产 α -淀粉酶的能力。经过以上几次筛选, 得到一株林可霉素、D-环丝氨酸和万古霉素多重抗性突变株 LCV₅ (Lin^r, Cs^r, V_m^r), 此菌株的诱变谱图如图 5, 其产 α -淀粉酶活力达 461u/ml, 比出发菌株 A-4 提高 32.5%, 而且摇瓶发酵周期缩短到 40h, 发酵终 pH 值较低, 约稳定在 7.2 左右。

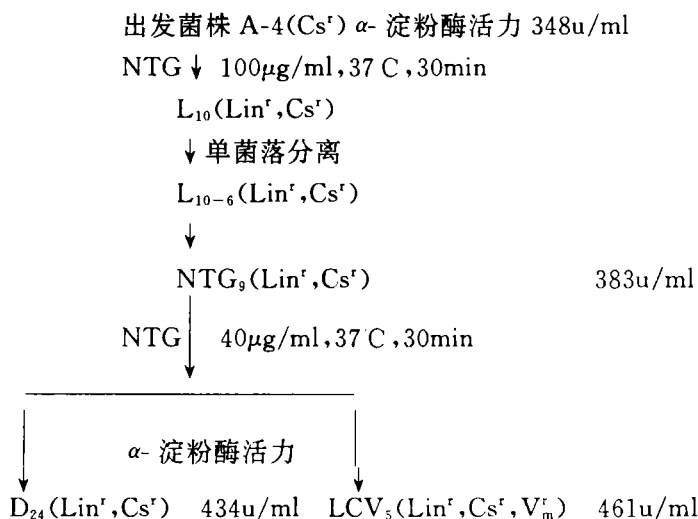


图 5 多重抗性突变株 LCV₅ 菌株的诱变谱图

大量资料报道 D-环丝氨酸抗性突变株可以大幅度提高 α -淀粉酶的产量^[1~3], 另外万古霉素抗性突变株也可以提高 α -淀粉酶的产量^[4]。经以上两种抗生素处理后获得的突变株可能是细胞壁发生了改变, 使细胞膜通透性得到改善。因此酶的增产可能与酶分泌到胞外有关, 细胞通透性改变突变型可以提高培养基中营养物质的吸收和增加酶的分泌。研究结果和

上述报道是一致的。但是我们发现抗药性突变株 α -淀粉酶产量提高的正变率和正变幅度提高的同时,负变率和负变幅度也比较高。因此,抗药性突变株酶活力提高除了与细胞壁结构发生改变外,还可能是抗生素对诱变后的酶产量改变突变株起着富集作用,大大提高了突变株的筛选机会。综上所述选育抗药性突变株对筛选高产细胞外酶菌株是一种有效的方法。

参 考 文 献

- 1 Kazumasa H. Agric Biol Chem,1979,11:2343
- 2 Maruo B,et al. J Gen Appl Microbiol,1985,31:323~328
- 3 Kanno M. Agric Biol Chem,1986,50(10):2633~2635
- 4 Susumu Ito,et al. Agric Biol Chem,1991,55(9):2387~2391
- 5 Sasaki T,et al. Bichem Biophys Res Com,1976,70(10):125~131
- 6 中华人民共和国轻工部颁标准. QB746—747—80,1981
- 7 关口顺一. 发酵工学会志,1978,56:227~237

Sslection and Breeding of a Higher Productivity Strains of α - amylase from the Multi-resistant Mutants

Wang Zhao Ji Qirong

(Dept. of Fermn. Eng.)

Abstract In this study,the mutagenesis of NTG and NTG-UV to the *Bacillus amyloliquefaciens* A-4 is studied. Lincimycin-resistant mutants (Lin'),D-cycloserine-resistant mutants (Cs'),Vancomycin-resistant (Vm') were isolated after treatment with NTG and NTG-UV. The production of α - amylase from the resistant mutants were obviously higher then that of no-resistant mutants. We have screened the high productivity strain of which the activity of α - amylase about was raised 32.5%. The α - amylase activity reached about 461 u/ml after 40 hr of shaking culture.

Key-words Higher productivity strains of α -amylase; NTG; D-cycloserine; Vancomycin; Lincomycin