微生物学报 26 (3): 232—237, 1986
Acta Microbiologica Sinica

抗噬菌体产α-淀粉酶菌株的选育

余茂効　　那淑敏
（中国科学院微生物研究所，北京）
董扣洪　李新明　邹锡良
（无锡酶制剂厂，无锡）

利用亚硝基胍诱变与自然选育相结合的方法，经过多次反复分离和用不同方法测定对噬菌体的抗性，并检查在发酵中同时加入三种噬菌体对产酶水平的影响。从 2500 株诱变菌中，获得两株具有抗全部分离到的噬菌体能力，其产酶水平接近或超过出发菌株，经过 15 次传代后，基本上仍保持原有所需性状。通过三吨罐中型试验，产酶平均分别为 320 和 381 单位/ml，最高分别达到 342 和 411 单位/ml，对照组的水平为 354 单位/ml。说明这两株菌可应用于生产中作为综合防治噬菌体的一个环节。

关键词　产α-淀粉酶；噬菌体；枯草芽孢杆菌

长期以来，利用枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）BF 7658 生产α-淀粉酶，经常遭到噬菌体的侵染，有的工厂出现季节性的噬菌体流行，造成严重减产，一般减产达 20—40%。国外在利用枯草芽孢杆菌生产淀粉酶中，不仅在实验室[1,2]，而且在工厂中都曾发现噬菌体污染[3,4]。因此，在发展酶工程和提高酶产量中，克服噬菌体的危害是一项迫切需待解决的任务。

根据国内现行的工艺流程和设备条件，目前解决噬菌体问题，应采取综合措施，其中合理使用抗噬菌体菌株，是比较经济和有效的。Kitahara 等[3]也曾选育抗噬菌体菌株用于生产来克服噬菌体的危害，因此，我们采取选育抗噬菌体菌株作为解决噬菌体危害的手段之一。

材料和方法

（一）菌株和噬菌体

以无锡酶制剂厂生产中所用的产α-淀粉酶的枯草芽孢杆菌 BF7658 为出发菌株。

从无锡酶制剂厂和天津酶制剂厂分离获得的三株噬菌体 BS5、BS10 和 BS12 供试验用。

（二）培养基和培养条件

1.土豆斜面培养基：每升以去皮土豆 250g 小火煮沸 2—3 小时，经纱布过滤取清液，加入 5mg 硫酸镁，1.8g 琼脂，用 NaOH调 pH 至6.7—7.0。灭菌后制成斜面，供产孢子和保存细菌用，培养温度为 30℃。

2.BPYS 培养基（%）：牛肉膏 0.5，蛋白胨（上海东海制药厂）1，酵母浸出汁 0.1，可溶性淀粉 2，葡萄糖 1，氯化钠 0.5，pH 7.0。用于培养细菌和增殖噬菌体。如需检查细菌和用作双层琼脂法的底层时，加入琼脂 1.8；用作上层时则加琼脂 1.

3.发酵培养基（%）：豆饼粉 5.5，玉米粉 8.5，Na_2HPO_4 0.8，$(NH_4)_2SO_4$ 0.4，$CaCl_2$ 0.2，自然 pH。每 500ml 的三角瓶中装量为 50ml。在往复式摇床上，160r/min，振幅 5cm，37℃ 培养 44 小时左右。

（三）噬菌体效价测定和原液的制备

本文于 1985 年 7 月 24 日收到。
本课题获得国家科学技术委员会的资助，作者谨致谢忱。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

效价测定系按双层琼脂法[1]。采用常规平板法增殖噬菌体，刮取噬菌斑相互融连的上层，放在灭菌烧杯中的布袋中，挤出液体，以 4000r/min 离心 30 分钟，将上清液通过 HAWP 0.45μm 孔径的微孔滤膜除去菌体及其碎片，制成原液，其效价一般可达 10^9pfu/ml 以上。

（四）选育方法

1.自然选育：取 20 × 2cm 试管，内装 10ml 的 BPYS 培养基，接入细菌，振荡培养过夜作为接种物。取 0.5ml 接种物接入装有新鲜 BPYS 的试管中，按感染系数（M.O.I.）0.01 加入一种噬菌体液。振荡培养 24—72 小时后，可望有细菌再度生长。经适当稀释，涂布于平板，待细菌生长，挑取孤立分离的单菌落，用牙签挑取后划在另一平板上，并在划线的两端分别点上微量的噬菌体 BS5 和 BS10（10^9pfu/ml）液。培养过夜，观察结果结合革兰氏染色、镜检，保留形态上与出发菌株一致和呈现抗性的细菌作进一步试验。

2.紫外线诱变：取上述接种物 3ml，经 4000 r/min 离心去除上清液，用生理盐水洗涤细菌细胞 2 次，重悬在生理盐水中，配制成 10^8 细胞/ml。取 2ml 菌悬液放入直径为 6cm 的小皿中，在相距为 30cm 的 15W 紫外灯、波长 253.7nm，磁力搅拌下进行照射。吸取菌悬液，经离心弃去上清液，将细胞重悬于 10ml 新鲜 BPYS 培养基中，同时加入噬菌体 BS5 和 BS10，按照射前细胞数的等量加入，振荡培养，待细菌生长后涂布平板。按上法挑取单个菌落，划线后点滴噬菌体 BS5 和 BS10 于两端以检查抗性。镜检染色细胞再作进一步测定。

3.亚硝基胍诱变：取在 BPYS 培养基中生长过夜的细菌，用磷酸缓冲液（pH 6.5）洗涤 2 次，重悬在磷酸缓冲液中，配制成 10^8细胞/ml。加入亚硝基胍使终浓度为 180μg/ml，在 37℃ 水浴中处理 40 分钟，测定致死率达到 99.85%。离心去除上清液，用培养基洗涤 1 次后，将细胞重悬在原体积（8ml）的新鲜培养基中，加入 0.5ml 效价为 10^9pfu/ml 的 BS10 噬菌体液，振荡培养约 22 小时后，菌液的光密度开始上升。涂布平板，挑取单菌落，按自然选育法划线后点滴噬菌体 BS5 和 BS10 以检查抗性。镜检细菌，保留初具抗性的细菌作进一步试验。

（五）α-淀粉酶活性的测定

按照无锡酶制剂厂 BF7658 α-液化型淀粉酶测定方法进行。以 1ml 酶液样品在 1 小时内于 60℃和 pH 6.0 时液化可溶性淀粉(分析纯，浙江菱湖淀粉厂)的克数表示酶活力。

结果和讨论

按自然选育法获得 1000 株细菌，由紫外线诱变得到 500 株，利用亚硝基胍结合自然选育得到 1000 余株。这些细菌分别具有对 BS5 和 BS10 噬菌体的抗性，产酶水平绝大多数都在 300U/ml 以下，低于正常水平。表1列出所得产酶较高的菌株。

表 1 中产酶水平达到 300U/ml 以上的菌株均被选择作为进一步产酶能力和对噬菌体抗性的试验菌。在摇瓶中加入三种混合噬菌体，其感染系数保持在 0.1—1.0 之间。从自然选育所得的菌一般产量都偏低；经紫外线诱变的菌株 U41 平均产量虽超过 300 U/ml，但在双层琼脂平板上，延迟出现噬菌斑，对混合噬菌体感染的结果不太合乎设想要求。最后，从亚硝基胍诱变的菌株中，选择了 SN42 和 SN451 两株分别进行自然选育，共挑取了 1000 株，经过镜检，对无锡和天津两厂后来分离的未鉴定噬菌体进行点滴法测定，从中选择了 16 株进行摇瓶试验，结果见表 2。从中可见，除 53、148、392 和 561 四株外，产酶基本上都保持在 300U/ml 左右。同时在双层琼脂平板上测定，对 8 株未鉴定的噬菌体都未发生感染。此外，尚需在摇瓶试验中加入噬菌体以检查对噬菌体的抗性和产酶水平。为此，我们先检查了 BF7658 在发酵过程中不同时间遭受噬菌体侵染对产酶的影响和噬菌体数量的变化，结果见表 3。随后，选用 9 株菌进行摇瓶发酵试验，结果见表 4。

对比表 3 和表 4 可以看出：在加入噬

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 1 利用不同方法获得较高产酶水平菌株产量的比较

Table 1 The comparison of the productivity of α-amylase from the higher producing strains obtained by different methods

方法 Method	菌株 Strain	产酶水平 Productivity of α-amylase (U/ml)			
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	平均 Average
亚硝基胍+自然选育 NTG + selection	SN40	291	351	295	312
	SN42	292	288	265.5	281
	SN45	290	288	260	280
	SN48	325.5	349	317	330
	SN421	301	274.5	300	291
	SN451	322	337	309	322
	SN461	335.5	340	349	341.5
紫外线诱变 UV-induction	U4	285.5	264	311	286
	U41	—	331	317	324
自然选育 Selection	S14	206	186	185.5	192.5
	S29	291	281	265	279
	S36	243	257	239	246
	S18	261	191.5	241	231
对照 Control	BF7658	323.5	345	327	331

表 2 复选菌株的产酶水平(44 小时)

Table 2 The productivity of α-amylase of selected strains by NTG treatment

菌株 Strain	pH	U/ml
160	7.8	308
148	7.0	267
561	7.8	281
151	7.0	297
392	6.8	286
471	>8.0	308
982	>8.0	316
147	7.6	303
68	7.3	306
981	>8.0	315
53	6.8	277
145	7.0	299
120	7.4	303
472	6.7	302
143	6.8	294
71	7.6	326
BF7658	6.4	277

菌体后的 24 小时和 44 小时，这些菌株的效价与 BF7658 的情况相接近。但产酶水平(除 472 外)都比 BF7658 在相同情况下为高。表明它们在不同程度上抗噬菌体或部分细胞抗噬菌体，可供进一步作分离选择。其中菌株 981 的表现更为突出，它不仅在噬菌体效价方面远远低于 BF7658，而且产酶量保持在较高水平。

我们将 981 菌株通过分离，选择其中 15 株典型细菌，再次对无锡和天津两厂所采集的土样、污水、空气和发酵废液进行噬菌体分离，结果均未分到，而只有用 BF 7658 作宿主菌时才能分到。这说明它们能抗目前存在的各种噬菌体。从 15 株中选择产酶水平较高的 K1 和 K5 菌株作进一步产酶水平和抗噬菌体能力的比较试验，发现它们的产酶水平接近出发菌株，均保持在 300U/ml 以上，43 小时后噬菌体效价基本上维持在原初水平或稍有下降（表 5）。这两株菌经培养后能形成大量孢子，在 100℃ 水浴中处理 5 分钟杀灭可能携带的噬菌体，经过连续 15 次转接传代，抗噬

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 3　BF7658 菌株在不同时间感染噬菌体 BS5 后对产酶的影响

Table 3　The infleunce of phage BS5 contamination at different time after inoculation of *Bacillus subtilis* BF7658

时　间 Time (h)	效　价 Titer (pfu/ml)		pH	酶活力 (U/ml)* Activity of α-amylase
	24h	44h		
对照 Control	—	—	>8.0	315
0	9.4×10^{9}	5.7×10^{9}	6.8	73
3	3.2×10^{9}	5.0×10^{9}	7.0	0
9	9.8×10^{10}	9.7×10^{9}	7.2	0
17.5	3.1×10^{8}	3.9×10^{8}	6.7	135

* 发酵时间为 44 小时。Fermentation process completed after 44h.
加入的噬菌体 BS5 的效价为 3×10^{3}pfu。Phage BS5 of 3×10^{3} pfu was added at different time。

表 4　某些抗性菌株的抗噬菌体污染和产酶水平的比较

Table 4　The comparison of α-amylase production and resistance to phages of several resistant strains in fermentation

菌　株 Strain	噬菌体 Phage	效价 Titer (pfu/ml)		pH	酶活力(U/ml) Activity of α-amylase
		24h	44h		
151	BS5	1.8×10^{9}	1.3×10^{9}	6.7	245
982	BS12	2.0×10^{9}	6.7×10^{9}	7.2	288
145	BS5	1.3×10^{9}	5.1×10^{9}	7.0	270
472	BS5	7.9×10^{8}	N	6.4	103
71	BS12	9.5×10^{8}	2.8×10^{9}	7.7	295
160	BS5	N	7.0×10^{6}	7.7	275
471	BS5	N	1.8×10^{8}	7.5	265
120	BS5	N	2.8×10^{8}	7.3	270
981	BS12	1.1×10^{5}	9.4×10^{6}	7.6	285
981	BS12+BS5	1.4×10^{6}	3.6×10^{6}	>8.0	300
BF7658		0	0	>8.0	315

同表 3 注解；N 表示未测定。The same footnote as that of Table 3; N denotes undetermined.

菌体能力均保持在原有水平，产酶活力基本上仍接近原有水平，未发现回复现象。植村等人[6]认为枯草芽孢杆菌对噬菌体的敏感性会发生回复变异。无论如何，对抗噬菌体菌株的使用和保管，仍需予以充分重视。

K1 和 K5 两株菌分别经过连续 4 次和 3 次中型试验，结果列入表 6。K5 在发酵后期产酶较 K1 快，看来改动培养基配方中的碳氮比，使 pH 保持在 6.5—6.7 可能有利于产酶水平的提高。如使用适当幼龄的种子可能更有利于产酶量的提高。

总之，我们认为菌株 K1 和 K5 是两株能抗现存噬菌体和产 α-淀粉酶水平不低于出发菌株的菌，经过连续 15 次传代，仍保持原有的性状，因而可以供生产用。

此外，我们在生产中分离到一株杂菌 Y5，能自发释放 10^{6} pfu/ml 数量的噬菌体，并能感染生产菌 BF7658，经过鉴定*属于 *Bacillus subtilis*。由于淀粉酶生产中时常

* 承蔡妙英同志鉴定，谨致谢意。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

表5 两株抗噬菌体菌株的发酵

Table 5 The fermentation of two resistant strains

菌 株 Strain	噬菌体 Phage	效价 Titer(pfu/ml) 0h	43h	pH	酶活力 (U/ml) Activity of α-amylase
K1		0	0	7.7	304
K1	BS5	3.1×10^3	0	8.0	294
K1	BS10	2.3×10^4	0.8 1.0×10^3	7.7	316
K1	BS12	1.8×10^3	$2.6-5.9\times10^3$	7.9	310
K1	BS5+BS10 +BS12	2.8×10^4	8×10^3	N	294
K5		0	0	7.8	294
K5	BS5	3.1×10^3	$1.5-5.8\times10^3$	7.9	304
K5	BS10	2.3×10^4	1.5×10^3	7.7	323
K5	BS12	1.8×10^3	0	7.7	295
K5	BS5+BS10 +BS12	2.8×10^4	$1.1-1.5\times10^3$	8.0	324

表6 K1和K5菌株的中型试验结果

Table 6 The fermentation of strains K1 and K5 in pilot-fermentator of 3 tons

菌 株 Strain	pH	产酶水平 Activity of α-amylase (U/ml) 平均 Average	最大 Maximum
K1	6.9—7.2	320	342
K5	6.8—7.0	381	411
BF7658		354	

注：培养基按生产使用配方(%)：豆饼粉 6.75，玉米粉 9.75，Na_2HPO_4 0.8，$(NH_4)_2SO_4$ 0.4，$CaCl_2$ 0.2，装量体积 1700L，其中补料 500L，在发酵 9—10 小时内添加；通气量 1:0.5(V/V)；菌龄 14—15 小时。Medium containing soy (a) bean cake meal 6.75%, maize flour 9.75%, Na_2HPO_4 0.8%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.4%, $CaCl_2$ 0.2% was used in 1700L in fermentator of 3 tons and 500L of the same medium were added after inoculation from 9—10h.

易发生杂菌污染，除了外源噬菌体污染外，应该注意到由于污染这类杂菌所引起的噬菌体问题。这种现象据我们所知，过去尚未报道，值得引起注意。

参 考 文 献

[1] Fukuda, S.: *J. Agr. Chem. Soc.*, Japan, **29**: 743, 1955.

[2] Kaneko, T. and K. Kitahara: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **3**: 221, 1957.

[3] Kitahara, K. and T. Kaneko: *J. Agr. Chem. Soc.*, Japan, **32**: 405, 1958.

[4] Fukuda, S.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **6**: 90, 1960.

[5] Adams, M. H.: Bacteriophages, Interscience Publishers, Inc., New York, p. 29, 1959.

[6] 植村定治郎，相田浩(天津市工业微生物研究所《发酵与微生物》翻译组译)：发酵与微生物 II，科学出版社，北京，p. 50—52，1980。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

SELECTION OF PHAGE-RESISTANT STRAINS OF *BACILLUS SUBTILIS* FOR α-AMYLASE PRODUCTION

Yu Maoxiao　Na Shumin
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Dong Kouhong　Li Xinmin　Zou Xiliang
(Wuxi Enzyme Factory, Wuxi)

Using N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine as mutagen and phage-treatment with 3 different phages in combination, two resistant strains were obtained from 2500 isolates. Resistant strains K1 and K5 in the shaking flask fermentation gave α-amylase yield as high as that of the parent strain BF7658. After 15 passages of the culture on agar slant, the bacteria still maintain the obtained features (resistant to phages and high yied of α-amylase). The average yields of α-amylase of K1 and K5 strains were 320 and 381 units/ml, respectively. The maximum production of the enzyme of K1 and K5 is 341 and 411 units/ml in 3 tons tank, respectively. And the parental strain BF7658 gave average yield of 354 units/ml under the same conditions. This indicated that strains K1 and K5 are desirable to be applied in fermentation production . In addition, we have found that one of the contaminated bacteria from the fermentation broth was lysogenic and was able spontaneously to release phage at high titer which can infect the producer strain BF7658. This phenomenon is worthy to be considered in the fermentation process.

Key words

α-amylase producer; Bacteriophage; *Bacillus subtilis*

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn