

高温 α -淀粉酶生产菌种选育的研究*

胡学智 凌晨 侯琴芳 雷肇祖

(上海市工业微生物研究所, 上海)

以地衣芽孢杆菌 B. 198 为出发株, 经不同诱变剂反复诱变和自然选育, 得到突变株 A.4041。其产高温 α -淀粉酶为出发株的 100 倍。在摇瓶培养条件下, 酶活力达 200u/ml, 是一株无孢子并带有 Rif^r、Met^r、Arg^r 标记的抗分解代谢阻遏突变株。

初步纯化的 A.4041 α -淀粉酶最适反应 pH 为 5—7, 最适反应温度 90—95℃, 于 90℃、60 分钟处理不失活, 表明突变株 A.4041 所产 α -淀粉酶是高温淀粉酶, 具有工业生产价值。

关键词 地衣芽孢杆菌; 耐高温 α -淀粉酶

高温淀粉酶是指反应最适温度在 90℃ 左右的 α -淀粉酶, 主要用于液化淀粉, 比一般细菌 α -淀粉酶液化反应快、省能、不需添加 Ca²⁺ 等稳定剂、糖化液精制省力、液化彻底。自 70 年代商品化成功以来, 双酶糖化法才真正得到应用。目前这种酶已广泛用在淀粉加工、酒精和啤酒以及工业发酵、造纸、纺织等工业, 是重要工业酶制剂之一。

自 1955 年 Campbell 报道从嗜热菌凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) 纯化耐高温 α -淀粉酶以来^[1], 已报道不少嗜热菌和芽孢杆菌^[2-5]可以产生高温淀粉酶, Tamuri^[6]就数百种嗜热真菌和近千种嗜热细菌的筛选结果指出, 只有地衣芽孢杆菌的酶活力最高, 耐热性也最强, 可达 90℃ 以上。但是野生型菌株高温 α -淀粉酶的生产能力极微, 故迄今所有工业化生产的高温淀粉酶主要是地衣芽孢杆菌的突变株^[7-9, 24, 25]。

地衣芽孢杆菌生产 α -淀粉酶是否需要诱导迄今尚无定论, 但一般认为它受到分解代谢阻遏调控和生长速率的影响^[7-11]

菌种人工诱变有可能得到抗分解代谢阻遏的突变株^[12], 关于高温淀粉酶的菌种筛选和基因重组构建高温淀粉酶生产菌已有过一些研究报道^[12-17], 但涉及高产菌和有工业生产价值的报道极少。

为获得高温淀粉酶生产菌种, 我们对各处收集的地衣芽孢杆菌进行了筛选和诱变, 并摸索适合工业生产高温淀粉酶的发酶条件。

材料和方法

(一) 培养基与培养方法

1. 斜面培养基(%): 蛋白胨 1, 牛肉膏 1, 可溶性淀粉 1, NaCl 0.5, 琼脂 2, pH 7.0。

2. 发酵培养基: 玉米、豆粉、麸皮、米糠等按比例混合, 玉米浆 1%, CaCl₂ 0.4%, Na₂HPO₄ 0.3%, 柠檬酸钠 0.3% pH 7.0,

本文于 1989 年 10 月 26 日收到。

本文所用缩写符号: Spo⁻ 不产芽孢, Rif^r 抗利福平, Met^r 甲硫氨酸缺陷型, Arg^r 精氨酸缺陷型, Cyc^r 抗环丝氨酸, Tm^r 抗衣霉素, Amp^r 抗氨基青霉素。

* 徐明华、杨俊豪等参加部分工作。

121℃ 灭菌 30 分钟备用。

3. 培养方法: 将斜面菌种 37℃ 培养 24 小时后挑一环接入 250 ml 三角瓶, 40℃ 振荡培养 (旋转摇床, 300 r/min) 72—96 小时, 取出后 90℃ 处理 15 分钟, 再测定酶活力。

(二) α -淀粉酶活力测定方法

菌种筛选用兰值法, 发酵试验时主要用部颁法测定。

1. 兰值法: 按 Fuwa^[21]法, 以 0.2 mol/L pH 6.6 磷酸缓冲液配制的 1.2% 的可溶性淀粉作底物, 40℃ 反应 30 分钟, 加 0.5 mol/L 冰醋酸 10 ml 以终止反应, 吸取反应液 1 ml, 加入 10 ml 0.015% I_2 -0.15% KI 溶液中, 用 721 型分光光度计测定 OD_{660nm} 。另取蒸馏水代替酶液同样处理作为空白对照。

酶活力 (BV) 是在上述条件下, 使淀粉与碘呈色反应 (兰色深度) 下降 10% 时所相当的被液化可溶性淀粉量 (mg) 来表示的。

$$BV = \frac{OD_0 - OD_1}{OD_0} \times S \times N \times \frac{100}{10}$$

式中 S = 反应系统中的淀粉量 (mg)

N = 酶液稀释倍数

OD_0 = 空白对照读数

OD_1 = 样品管的光密度读数

2. 部颁法: 除反应温度改为 75℃ 之外, 其余均按中华人民共和国国家标准 GB-85, “食品添加剂 α -淀粉酶制剂及其试验法”测定。

酶活力以 pH 6.0 时, 75℃ 1 小时内所液化的淀粉量 (g) 来表示。

(三) 诱变方法及各类突变株的检出

诱变方法采用紫外线 (WV)、亚硝基胍 (NTG)、硫酸二乙酯 (DES)、 Co^{60} 线及 NTG、UV 复合处理等常规方法。

各类突变株的检出法如下:

1. 无孢子突变株: 将诱变后长出之菌落点植在肉汁平板上, 一式二份, 一份用氯仿薰蒸, 凡经氯仿薰蒸后不生长而未薰蒸的平板上生长的菌落即是寡孢子或无孢子突变株。

2. 利福平抗性株: 将待试菌株细胞涂在含 5—10 r/ml 利福平肉汁平板上, 凡长出之菌落均为抗性变株。

3. 抗分解代谢阻遏突变株: 将细胞涂在含 5—10% 葡萄糖、1% 淀粉肉汁平板上, 凡菌落周围有水解圈者为抗性株。

结果和讨论

(一) 出发菌株的筛选

将 150 余株芽孢杆菌先在淀粉肉汁平板上 37℃ 培养 24 小时, 挑选产生水解圈的菌落移植在斜面后, 再用发酵培养基作摇瓶试验, 结果表明地衣芽孢杆菌在本研究所使用条件下, 或多或少可以产生高温淀粉酶, 即使解淀粉芽孢杆菌 (国内细菌淀粉酶生产菌) BF7658 在此情况下也显示有高温淀粉酶的产生能力, 但碱性蛋白酶生产株 *B. licheniformis* 2709 高温淀粉酶活力极低。

在供试菌株中有 10 株菌产酶活力较高, 用兰值法测定有 15000 BV 左右, 但若用部颁法测定只有 1—2 单位, 故要提高产酶活力必须进行菌种改良。经过进一步反复摇瓶试验, 选定 B. 144、B. 198、C₁ 作为人工诱变的出发菌株。

(二) 菌种诱变选育及高产株 A.4041 的选育

通常认为选择蛋白酶活性低的突变株有利于淀粉酶的生产, 而蛋白酶的生物合成常与芽孢形成能力有关^[22], 丧失芽孢形成能力的突变株, 大多数蛋白酶活性不高。Outtrup 等报道的高温淀粉酶高产株是一株无孢子突变株^[7], 而芽孢的形成同利福

平抗性有关, 从利福平抗性株中易筛选到无孢子突变株^[20,22], 从蜡状芽孢杆菌利福平抗性株中筛到 β -淀粉酶高产株已有成功例子^[19,23]。因此我们设想从利福平抗性株中选育无孢子高温淀粉酶的高产株。

将上述 B. 144、B. 198 和 C₁ 三菌株在肉汁中培养到对数后期 (6—9 小时), 离心分离细胞, 用生理盐水洗涤后再相继用 NTG (40—200r/ml) 与紫外线进行诱变处理, 然后经适当稀释后涂布在含利福平的肉汁平板上 37℃ 培养, 随机挑选长出的菌落作摇瓶试验。经数次诱变处理和分纯后, 所产高温淀粉酶活力都有不同程度的提高。其中 B.144 与 B.198 变异后酶活力提高最为显著, 均由 10×10^3 BV 左右提高到 100×10^3 BV 以上, 但 C₁ 的活力提高甚少。B.198 经过三次 NTG 诱变后筛到了酶活提高十倍的无孢子突变株 A.915, 其它二株还未筛到无孢子突变株, 因而我

们就以 A.915 作为进一步研究的对象。

无孢子突变株 A.915 用以下三种方法来确证: (1) 将平板菌落用氯仿蒸蒸后再培养而不生长。(2) 菌体经 85℃ 加热 10 分钟后划线培养不生长。(3) 在大豆肉汁平板上生长的菌落至少培养 48 小时镜检无芽孢。

将 A.915 相继用 UV、NTG 处理和纯化, 随着选育次数的增加, 产酶活力继续不断地提高, 又得到带有 Spo⁻、Rif^r、Met⁻ 标记的突变株 A. 2200, 其酶活力是野生型 B.198 的 25 倍。再将 A.2200 分二组继续诱变, 其中一组经 NTG 处理酶活只提高 37%, 以后不再提高。另一组用 NTG、NTG + UV、DES 处理, 酶活再次提高, 其中一突变株 A.3617 的活力比 A.2200 提高 80%, 再经 Co⁶⁰r 线诱变得得到 A.4041, 酶活力增加到 450×10^3 BV (表 1), 是 B.198 的 40—50 倍。A. 4041

表 1 由菌株 B. 198 得到 A. 4041 的诱变谱系

Table 1 The mutagenesis pedigree from strain B. 198 to mutant A. 4041

菌株 Strains	诱变剂(终浓度) Mutagen (final concentration)	存活率(%) Survival rate	酶活力 (BV $\times 10^3$ /ml) α -amylase activities	标记 Markers
B.198	NTG 200r/ml, s	0.535	10—20	—, AP 196 u/ml
88-8	NTG 200r/ml, s	0.156	40—50	Spo ⁻
76-14-18	NTG 40r/ml + + s rif 5r/ml,	1.4	80—90	Spo ⁻
A.915-7	UV 20'', s	3.3	130	Spo ⁻ , Rif ^r
A.1372	NTG 4r/ml, s	18	130	Spo ⁻ , Rif ^r
A.1788	NTG 100r/ml, s	0.15	150	Spo ⁻ , Rif ^r
A.2200-11	NTG 100r/ml, s	4.8	250	Spo ⁻ , Rif ^r , Met ⁻ , Ap1840u/ml*
A.2661-9	NTG 100r/ml + s UV 9'',	0.45×10^{-2}	264	Spo ⁻ , Rif ^r , Met ⁻
A.3052-7	NTG 200r/ml, s	0.18	275	Spo ⁻ , Rif ^r , Met ⁻
A.3351-6-5	DES 1%, s	2.7×10^{-2}	320—370	Spo ⁻ , Rif ^r , Met ⁻
A.3617-2-6	Co ⁶⁰ r 线 10 万 rad		350—380	Spo ⁻ , Rif ^r , Met ⁻
A.4041	Co ⁶⁰ r 线, 6 万 rad	0.1	450	Spo ⁻ , Rif ^r , Met ⁻ , Arg ⁻ , AP 1616u/ml
A.4808	s		300	Spo ⁻ , Rif ^r , Met ⁻ , Arg ⁻ , Cyc ^r
A.4808-3	—	—	330—360	Spo ⁻ , Rif ^r , Met ⁻ , Arg ⁻ , Cyc ^r

* AP 为碱性蛋白酶活力。Alkali protease activity.

与 B.198 的产酶过程曲线见图 1。从中看到突变株在高温 α -淀粉酶活力大大提高的同时,碱性蛋白酶活力也有了大幅度的增加,但还看不出碱性蛋白酶对淀粉酶的影响。

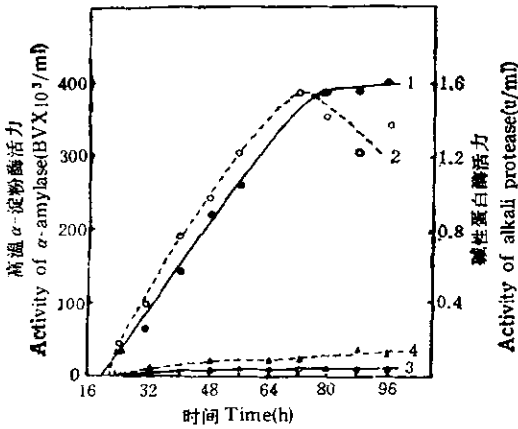


图 1 突变株 A.4041 及其亲株的产酶过程曲线

- 1. A.4041 高温 α -淀粉酶; 2. A.4041 碱性蛋白酶;
- 3. B.198 高温 α -淀粉酶; 4. B.198 碱性蛋白酶

Fig. 1 Time curves of α -amylase production by mutant strain A.4041 and its parental strain B. 198

- 1. α -amylase of A.4041; 2. Alkali protease of A. 4041;
- 3. α -amylase of B. 198; 4. Alkali protease of B.198

(三) 突变株 A.4041 的形态、生理特性与产酶稳定性

突变株 A.4041 在肉汁平板上菌落生长较亲株 B.198 缓慢, 37°C 培养需 2 天

生长才完全。菌落呈乳白色放射状, 有时呈暗红色。镜检呈纤细杆状, 连成线状, 无芽孢(图版 I-A 及 B)。通过生长谱测定表明 A.4041 为甲硫氨酸、精氨酸缺陷型。

在肉汁平板上划线作抗药性检查, 表明 A.4041 为利福平抗性、衣霉素抗性、氨基青霉素抗性, 其标记为 Met⁻, Arg⁻, Rif^r, Tm^r Amp^r (表 2)。虽然丸尾报道环丝氨酸抗性与地衣芽孢杆菌突变株高温淀粉酶活性有关, 且从高剂量抗性株中筛到高产菌株^[5], 但从 A.4041 诱变得到的 A.7025 虽带上 3 Cyc^r 标记, 其高温淀粉酶活性并不比 A.4041 高。

A.4041 等突变株在加有 10% 葡萄糖的肉汁淀粉平板上生长可形成水解圈, 而 B.198 则无(图版 I-C 及 D), 这表明突变株至少在一定程度上解除了葡萄糖分解代谢阻遏, 所以可利用含高浓度葡萄糖的淀粉平板, 根据淀粉水解圈大小来筛选解阻遏的高产突变株。在摇瓶试验下也证明 A.4041 可以利用葡萄糖为碳源, 不需要 α -1, 4 键的淀粉诱导合成高温 α -淀粉酶 (表 3)。

另一方面, 葡萄糖的结构类似物 2-脱氧葡萄糖 (2-DG) 通常被认为是不能为正常细胞所利用的, 并且在代谢途径中可与葡萄糖起竞争性抑制, 所以常用它来筛

表 2 A. 4041 及其他菌株的抗性标记

Table 2 The drug resistance markers of mutant strain A.4041 and the other strains

菌株 Strain	B.198	A.2200	A.4041	A.7025	BF7658
抗药性平板 Plates containing drugs					
Rif (10r/ml)	-	+	+	+	-
Cyc (50r/ml)	-	-	-	+	+
Tm (20r/ml)	+	+	+		+
Amp (100r/ml)	+	+	+		+
酶活力 (BV $\times 10^3$ /ml) Activity of α -amylase	10-15	200	450	450	

表 3 碳源对 A.4041 产酶的影响*

Table 3 Effect of carbon sources on α -amylase production by mutant strain A.4041*

碳源(%) Carbon sources	相对酶活力(%) Relative activity
玉米粉 Cora flour	5.5 100
可溶性淀粉 Soluble starch	4.0 50
饴糖 Malt syrup	4.0 95.8
蔗糖 Sucrose	4.0 63
乳糖 Lactose	4.0 27
葡萄糖 Glucose	4.0 59.5

* 基本培养基(%)为豆粉 6, 玉米浆 1, CaCl_2 0.3, K_2HPO_4 0.1 pH 7.0,

* The other components of medium include (%) Soya meal 6, C. S. L. (Corn steep liquor) 1, CaCl_2 0.3, K_2HPO_4 0.1, pH 7.0.

选抗分解代谢阻遏型突变株, 但我们实验结果表明, 野生型和有些突变株的生长与产酶均不受 2-DG 的抑制, 可在平板上产生淀粉水解圈, 所以能否利用 2-DG 来筛选抗分解代谢突变株值得推敲。

突变株 A.4041 生产高温淀粉酶的能力极不稳定, 需不断作单细胞分离筛选才能维持其产酶能力, 经数十次的反复自然选择后, 产酶活力(按部颁法 75℃ 测定)终于达到稳定(180—200 u/ml), 为亲株 B.198 的 100 倍以上。

(四) 地衣芽孢杆菌突变株 A.4041 α -淀粉酶的一般性质

将发酵液滤液加硫酸铵到 40% 饱和度, 离心除去上清液, 沉淀用 pH 7.5 含 2 mmol/L CaAc_2 的 10 mmol/L Tris-HAc 缓冲液溶解后, 对同一缓冲液透析一夜, 以透析液作为样品对酶的一般性质作了测定。

1. 最适 pH 与最适温度: 在 60℃ 下测定酶反应最适 pH 范围为 5.0—7.0, 在 pH 6.0 时酶的最适反应温度为 90—95℃。

2. 金属离子对酶活力的影响: 向反应系统中加入浓度为 0.5×10^{-3} mol/L 的 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 等各种金属离子, 测定结果表明, 除 Fe^{2+} 和 Al^{3+} 稍有抑制外, 其他金属离子在 5×10^{-4} 以下对酶活无多大的影响。虽然培养基中含同一浓度的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 对产酶有极大妨碍, 但对于酶反应却无抑制。

3. 酶的热稳定性: 将 A.4041 发酵液及部份纯化酶于 90℃ 加热 60 分钟, 冷却后再测其酶活, 并同解淀粉芽孢杆菌 BF7658 的发酵液与纯化酶作比较, 结果看出经 90℃ 60 分钟加热, A.4041 发酵液 α -淀粉酶几乎无损失, 而纯化酶则几乎完全失活, 可见发酵液中含有某种稳定酶的因子, 而 BF7658 的 α -淀粉酶不论是发酵液或纯化酶经 90℃ 加热酶活损失殆尽, 可见 A.4041 与 BF7658 α -淀粉酶其热稳定性是有区别的。又分别向两种初步纯化的酶液(经透析去除 Ca^{2+} 后)加入各自的稳定剂后, 90℃ 处理不同时间, 再测其残余酶活力, 结果(表 4, 图 2) 看出即使

表 4 两种酶在稳定剂存在下的热稳定性* (90℃ 处理)

Table 4 Thermostability of two kinds of α -amylase in the presence of stabilizers* (90℃)

菌种 Strains	处理时间 Heating (min)			
	0	15	30	60
A. 4041	100	100	98	93
BF7658	100	0	0	0

* 稳定剂

* Stabilizers: A.4041: 5mmol/L CaAc_2 , 10% NaCl, 3% Soluble starch. BF 7658: 100 mmol/L CaAc_2 , 2% NaCl, 2% Soluble starch.

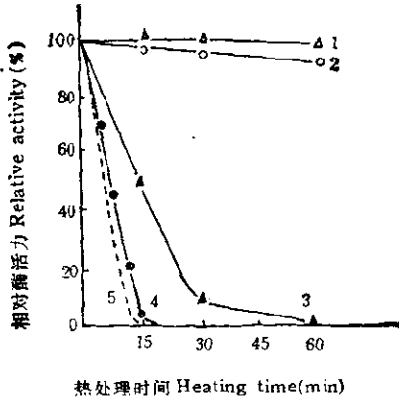


图2 耐高温 α -淀粉酶及BF7658 α -淀粉酶热处理残留活力曲线

Fig. 2 Residue enzyme activities curve of thermostable α -amylase and heat unstable α -amylase produced by BF7658 after heat treatment

1. A. 4041 发酵液 A. 4041 fermented broth;
2. A. 4041 部分纯化酶+稳定剂 A. 4041 partial purified enzyme + stabilizer;
3. A. 4041 部分纯化酶 A. 4041 partial purified enzyme;
4. BF7658 部分纯化酶+稳定剂 BF7658 partial purified enzyme + stabilizer;
5. BF7658 发酵液 BF7658 fermented broth

在 200mmol/L Ca^{2+} 的保护下, BF7658 的酶在 90 $^{\circ}C$ 顷刻失活,而 A. 4041 部分纯化的酶即使在 Ca^{2+} 少得多的情况下, 90 $^{\circ}C$ 加热 1 小时仍与发酵液一样, 酶活几乎无损失,说明 A. 4041 α -淀粉酶是耐热性 α -淀粉酶。

参 考 文 献

- [1] Campbell, L. L. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 54: 154, 1955.
- [2] Campbell, L. L. et al.: *J. Biol. Chem.*, 236: 2952, 2962, 2966, 1961.
- [3] Morgan, F. J. et al.: *J. Appl. Bact.*, 50: 107, 1981.
- [4] Medda, S. et al.: *J. Appl. Bact.*, 48: 47, 1980.
- [5] Emanuilova, E. I. et al.: *Appl. Microb. Biotech.*, 19: 301, 1984.
- [6] Tamuri, M. et al.: US Patent, 4284722, 1982.
- [7] Outtrup, H. et al.: Proceeding of the First Intersectional Congress of IAMS, 5: 204-209, (ed. Hasegawa, T.) Science Council of Japan, 1975.
- [8] 丸尾文治: 文部省特定研究“生物化学反应の活用による有用物质生質の基盤解析研究成果報告书”, (朝倉書店) p. 343, 1985.
- [9] Marro, B. et al.: *J. Gen. Appl. Microb.*, 81: 323, 1985.
- [10] Meers, J. L.: *Antonie van Leeuwenhoek*, 38: 585, 1972.
- [11] Chandra, A. K.: *J. Fer. Tech.*, 58(1): 1, 1980.
- [12] Saito, N. et al.: *J. Bacteriol.*, 121: 848, 1975.
- [13] 谭建安等: 中华微生物学和免疫学杂志, 18: 44, 1985.
- [14] 李佑红等: 微生物学报, 29(4): 314, 1989.
- [15] Ward, O. P. et al.: *Biotech. Adv.*, 6: 39, 1988.
- [16] 蒋如璋等: 遗传学报, 14(5): 323, 1987.
- [17] 任大明等: 生物工程学报, 3(3): 197, 1987.
- [18] Levisohn, S. et al.: *J. Bacteriol.*, 93: 1023, 1967.
- [19] 何秉旺等: 微生物学报, 23(1): 75, 1983.
- [20] 郭显章等: 生物工程学报, 4(2): 119, 1988.
- [21] Fuwa, H.: *J. Biochem. (Japan)*, 41: 5, 1954.
- [22] 金振华等: 遗传学报, 9(4): 254, 1982.
- [23] Shinke, R. et al.: *J. Fer. Technol.*, 57: 53, 1979.
- [24] Outtrup, H.: B. P. 1296839, 1972.
- [25] Robert, O.: US Patent, 4473645, 1984.

STUDIES ON THE SCREENING OF THERMOSTABLE α -AMYLASE-PRODUCING STRAINS

Hu Xuezhi Ling Chen Hou Qinfang Lei Zhaozu

(Shanghai Institute of Industrial Microbiology, Shanghai)

In screening high producer of thermostable α -amylase, *Bacillus licheniformis* B198 was chosen as an original strain, which was treated repeatedly with various mutagens. The mutant A. 4041 was selected after repeated natural selection. The thermostable α -amylase activity of this mutant was in 100 fold of the original one, reaching 200u/ml in the shake flask. The mutant was resistant to catabolite repression by glucose and have marked with Spo⁻, Met⁻, Arg⁻ and Rif^r.

The general properties of the partly pu-

rified enzyme was investigated. The optimum pH was 5—7, and the optimum reaction temperature was 90—95°C. It was stable by heating at 90°C for 60 min. The result indicated that the thermostable α -amylase from mutant A. 4041 had a commercial production value.

Key words

Bacillus licheniformis; Thermostable α -amylase

图版说明

Explanation of plate

- A. 出发菌株 B.198 斜面镜检形态。
 B. 突变株 A.4041 斜面镜检形态。
 C. 葡萄糖对二菌株生产高温 α -淀粉酶的影响, 肉汁平板含 1% 可溶性淀粉。
 D. 葡萄糖对二菌株生产高温 α -淀粉酶的影响, 肉汁平板含 1% 可溶性淀粉和 10% 葡萄糖。
 A. Photomicrograph of cell formis of parantal strain B.198 grown on broth agar slant.
 B. Photomicrograph of cell formis of mutant

- A.4041 grown on broth agar slant.
 C. Influence of glucose on thermostable α -amylase production by mutant strain A. 4041 and its parental strain B. 198. Broth plate containing 1% soluble starch.
 D. Influence of glucose on thermostable α -amylase production by mutant strain A. 4041 and its parental strain B. 198. Broth plate containing 1% soluble starch and 10% glucose.