

用原生质体融合技术提高 α -淀粉酶稳定性

王俊英 孔显良 姜丽萍 何之平*

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

工业生产上一般都采用物理和化学诱变的方法选育优良菌株, Foder^[1]和 Schaeffer^[2]将种内细菌原生质体融合成功之后, 用原生质融合方法育种的报道较多^[3-6], 所得融合子也逐渐应用于工业生产^[7]。本研究用产 α -淀粉酶活力高的解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 生产菌株和活力低、耐热性好的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 进行原生质融合, 选育出耐热高产的 α -淀粉酶产生菌。

1 材料和方法

1.1 菌种

Bacillus amyloliquefaciens BF 7658, 北京房山交道酶制剂厂生产菌株; *Bacillus licheniformis* ATCC 9789, 中国科学院微生物所保藏。

1.2 培养基

1.2.1 完全培养基 CM(%): 蛋白胨 1, 牛肉膏 1, NaCl 0.5, 琼脂粉 2, pH7.0。

1.2.2 基本培养基 MM(%): K_2HPO_4 1.4, KH_2PO_4 0.6, 柠檬酸 0.1, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02, 葡萄糖 0.5, 琼脂粉 2, pH7.0。

1.2.3 再生培养基: 在 CM 和 MM 培养基中加 0.5mol/L 蔗糖, 20m mol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 。

1.2.4 产酶培养基(%): 玉米粉 4, 豆饼粉 2, $CaCl_2$ 0.2, K_2HPO_4 0.2, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2, 柠檬酸钠 2。

1.3 缓冲液

1.3.1 高渗缓冲液 (SMM): 20m mol/L 顺丁烯二酸, 20 m mol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.5 mol/L 蔗糖, pH6.7。

1.3.2 高渗缓冲液 (NSM): 0.5 mol/L NaCl, 0.2 mol/L 琥珀酸钠, 20m mol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, pH6.7。

1.3.3 pH 6.0 0.2 mol/磷酸缓冲液。

1.4 主要试剂

可溶性淀粉(浙江菱湖淀粉厂), 溶菌酶(上海禽蛋二厂), 聚乙二醇(PEG6000)(日本进口分装)糖标准样品(SIGMA)等。

1.5 原生质体制备

将供试菌预先在 CM 培养基的试管斜面上 37℃ 培养 72 小时, 接入装有 4ml 牛肉汁培养基的试管中, 37℃ 振荡培养 12 小时, 吸 1ml 接入 CM 液体培养, 于对数期在 660nm 测 OD 值, 调整菌液浓度使其大致相同, 离心, 菌体用 SMM 洗涤后, 加入用 SMM 配制的溶菌酶液, 摇匀, 37℃ 保温 1 小时, 破壁后备用。而 AT-5 原生质体置于 100℃, 经 30 分钟热灭活后, 分别离心除去溶菌酶, 制成悬液备用。

1.6 原生质融合

取等量的亲株原生质体, 离心去上清液, 加入 30% PEG6000 液, 37℃ 处理 1 小时, 离心去 PEG,

* 湖北钟祥酶制剂厂。

本文于 1993 年 3 月 23 日收到。

SMM 洗涤后制成悬浮液,稀释至 10^{-3} — 10^{-4} ,吸 0.1 ml 涂布于含 7—10u/ml 利福霉素 CM 培养基上,37℃ 培养 48 小时,观察菌落生长情况并计数。

1.7 原生质体的形成率,再生率以及融合率

用常规方法计算。

1.8 α -淀粉酶活力测定

按轻工部部颁标准(QB747-80)。

1.9 薄板层析

用硅胶板常规方法进行糖组份分析。

2 结果与讨论

2.1 亲株的选育

2.1.1 抗菌素突变株的选出:为了考察抗菌素对 α -淀粉酶生产菌株(*Bacillus amyloliquefaciens*)BF 7658 和研究菌株(*Bacillus licheniformis*)ATCC 9789 两亲株产酶活力的影响,筛选了对新生霉素、洁霉素、利福霉素和强力霉素等抗菌素突变株 1163 株,从 BF7658 菌中得到了利福霉素敏感株 BF-59(rif^r),从 ATCC9789 中获得利福霉素抗株 AT-5(rif^r),这两个突变株被选作融合的输出菌株。

2.1.2 两亲株的产酶特点:AT-5(rif^r)菌株产生的 α -淀粉酶在 90℃ 处理 15 分钟,酶活力仍保存 90% 以上,而 BF-59(rif^r)产生的 α -淀粉酶则失活。用 0.5% 可溶性淀粉作底物,在不同温度下两亲株酶活力也有明显的差异,BF-59(rif^r)在 50—60℃ 时表现出高活力水平,而 AT-5(rif^r)在 70—95℃ 时相对活力均在 90% 以上。

2.2 融合条件的选择

2.2.1 菌体培养时间:实验中观察到对数期细胞大小均匀,所以本实验均采用对数期的菌体制备原生质体。

2.2.2 溶菌酶浓度对原生质体形成的影响:实验结果表明,AT-5 用 150 μ g/ml 溶菌酶作用 1 小时,细胞 99% 以上形成原生质体,而 BF-59 要用 800 μ g/ml 才能达到同样水平。

2.2.3 缓冲液对原生质体形成的影响:采用 SMM 和 NSM 两种高渗缓冲液作为配制溶菌酶和原生质体的稀释液,在 SMM 缓冲液中,AT-5、BF-59 原生质体形成率均为 99.9%,而在 NSM 缓冲液中,两菌的原生质体形成率则分别为 99.9% 和 69.3%,SMM 比 NSM 缓冲液效果好。

2.2.4 原生质体再生:试验中将 AT-5 和 BF-59 的原生质体涂布于高渗 CM 培养基平板上,37℃ 培养 48 小时,AT-5 原生质体再生率为 4.48%,BF-59 为 7.64%,如果将它们涂在含利福霉素的高渗培养基平板上,BF-59 再生菌落为零,AT-5 原生质体的再生受到利福霉素浓度的影响,浓度高时,原生质体的再生较少,在实验中添加利福霉素 10u/ml,其菌落呈微红色。

两亲株原生质体再生时,亲株在 37℃ 培养过夜后,即可见清晰的菌落形态,而原生质体的再生菌落要在 48 小时之后才能观察到类似油珠的菌落形态。

2.2.5 AT-5 原生质体的热灭活温度:为了便于检测确实是由两个亲株的原生质体的融合效果,采用 AT-5 原生质体热灭活的方法,在不同温度下处理四个不同时间,100℃ 30 分钟热灭活合适。

2.3 融合结果

2.3.1 融合子的检出及融合率:取等体积的 AT-5 热灭活的原生质体与 BF-59 原生质体混匀,在 5 μ l/ml DNAase,30% PEG6000 存在下,37℃ 保温融合 1 小时,在含 5—10 μ g/ml 利福霉素的平板上分离融合子,100℃ 30 分钟热灭活的 AT-5 原生质体存活率为零,而 BF-59 因不抗利福霉素其存活率也为零,只有融合子能生长在含利福霉素的培养基上而被检出。结果指出,融合率在 2.2×10^{-4} — 4.3×10^{-4} 之间。

2.3.2 融合子与亲株菌落形态、菌体形态的观察:经 10 次连续传代后,融合子的抗利福霉素特性(10 μ g/ml)和产酶热稳定性都很好,与原始融合子无差异。以 F-178 菌株为代表与亲株菌体、菌落形态的

特征进行了比较(表1)。肉眼观察,F-178与BF-59相似。

表1 融合子F-178细胞和菌落的观察

菌株	细胞形态	菌落形态
亲株:AT-5(rif ^r)	培养48小时,油镜观察,短杆状,单个,较细	37℃培养24小时,呈白色大菌落(D=6-7mm)扁平,有光泽,边缘不整齐,雪花状,48小时菌落均匀,扁平
BF-59(rif ^r)	7-8个短杆菌连成长链状	37℃培养24小时,呈白色圆型小菌落(D=1-2mm),有光泽,边缘整齐,48小时菌落中心有凸起
融合子F-178	7-8个短杆菌连成长链状	37℃培养24小时,呈白色圆型小菌落(D=1-2mm),有光泽,边缘整齐,48小时菌落中心有凸起

2.3.3 融合子与亲株产 α -淀粉酶的分析:检出融合子1536株,测定 α -淀粉酶活力,与AT-5比较,活力提高35-90%,经进一步筛选,F-178,F-212活力比AT-5分别提高84.5%和68.1%,传代10次以上,产酶水平稳定,且具有耐热性,比活力比AF-5高,比BF-59低,见表2。

表2 融合子和亲株的酶活力及比活力

菌株	酶活力(u/ml)	相对酶活力(%)		蛋白质(mg/ml)	比活力(u/mg)	相对活力(%)	
		AT-5	BF-59			AT-5	BF-59
亲株 AT-5	33.8	100	/	1.4	24.1	100	/
BF-59	134.3	/	100	0.96	139.9	/	100
融合子 F-69	48.1	142.3	35.8	1.25	28.5	118.3	20.4
F-169	64.5	190.8	48.0	1.10	58.6	243.1	41.4
F-178	62.4	184.5	46.5	1.50	41.6	172.1	29.7
F-212	56.8	168.1	42.3	1.40	40.6	168.5	29.0
F-304	45.8	135.2	34.0	1.20	38.1	158.1	27.0

2.3.4 酶的耐热性:取5株融合子的发酵液,在不加任何保护剂的情况下,90℃处理15分钟(表3),多数融合子产生的酶具有良好的耐热性,F-178,F-212酶活力残留率分别为95和98.0%,但也有个别菌株酶活力虽高,却不耐热(表3)。

表3 酶的耐热性(90℃,15分钟)

菌株	酶活力(μ)		残存活力(%)
	处理前	处理后	
亲株 AT-5	33.8	35.2	104
BF-59	174.7	5.7	3.2
融合子 F-69	48.1	49.5	102
F-169	63.8	3.3	5.1
F-178	65.7	62.9	95.0
F-212	56.0	53.9	98.0
F-304	45.4	45.7	100
F-347	40.9	35.4	86.1

2.3.5 酶水解淀粉的产物分析: 10ml 1% 淀粉液, 加入酶液 1000u/g, 60°C 水解, 每隔半小时取样加入到 1/6000 mol 碘液中, 于 700nm 波长测 OD 值。同时进行薄板层析, 结果(图 1)指出。在相同条件下, 酶液水解淀粉的速度却不同, BF-59 最快, 融合子 F-178 和 F-212 居中, AT-5 较慢。它们的水解产物主要是 G_3 — G_{10} 低聚糖, F-178 酶解产物的组份见图 2。酶解产物分析见表 4。

表 4 酶水解淀粉的产物分析

菌株	酶解淀粉的糖组份(%)		
	G_1 - G_2	G_3 - G_5	G_6 - G_{10}
亲株			
AT-5	1.1	42.4	56.5
BF-59	7.4	35.0	57.6
融合子			
F-178	2.9	50.1	47.0

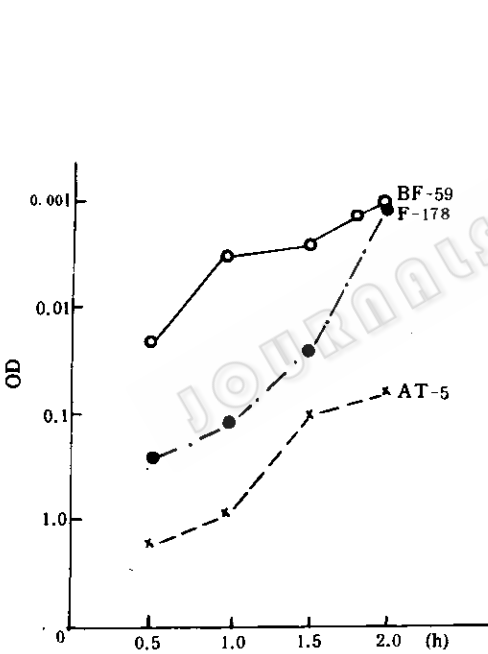


图 1 融合子与亲株水解淀粉的碘色消失曲线

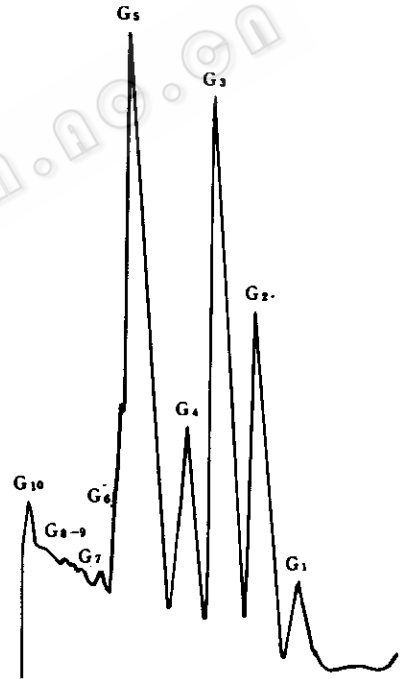


图 2 融合子 F-178 酶解淀粉的产物组份扫描图

我们利用原生质体融合技术, 选出了一株融合子 F-178, 它既提高了产酶水平, 又提高了酶的耐热性, 为选育生产 α -淀粉酶优良菌种打下了良好基础。

参考文献

- [1] Fodor K, Alföldi L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1970, 73(6): 2147—2150.
 [2] Schaeffer P et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1970, 73(6): 2151—2155.

- [3] Hopwood D A. *Am. Rev Microbiol.*, 1981, **35**:237—272.
[4] 江行娟, 等. 遗传学报, 1981, **8**(1):1—7.
[5] 乔保义, 徐浩. 微生物学报, 1983, **23**(1):33—43.
[6] 诸葛健, 周立平, 王萍, 等. 微生物学报, 1984, **24**(1):74—79.
[7] 周东坡, 贾文祥, 贾树彪, 等. 微生物学报, 1991, **31**(4):287—292.

INCREASING OF YIELD AND THERMOSTABILITY OF α -AMYLASE BY PROTOPLAST FUSION

Wang Junying Kong Xianliang Jiang Liping He Zhiping

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Abstract Fusants F-178 and F-212 were obtained by protoplast fusion of *Bacillus licheniformis* AT-5 and *B. amyloliquefaciens* BF-59. Under suitable conditions for protoplast formation with lysozyme treatment, the rates of protoplast formation of the two parent strains were 99.9—100%, while the rates of protoplast regeneration were 4.48—7.60%. Before fusion, the protoplast of the parent AT-5, resistant to rifomycin, was killed by heating, but BF-59 was not. The frequency of fusion is 2.2×10^{-4} — 4.3×10^{-4} . The yield of α -amylase of fusants was intermediate between those of the two parents. The activities of enzyme from F-178 and F-212 were 84.5% and 68.1% higher than the parent strain AT-5, respectively. The enzyme activity retained more than 90% after heating at 90°C for 15 min without any protective agents. The enzyme yield and thermostability were stable after 10 generations on selective medium. The starch digest of the enzyme of fusant contained mainly oligosaccharides of G_3 — G_{10} .

Key words *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, protoplast fusion, Thermostable α -amylase