

# 原生质体融合技术选育耐热性 $\beta$ -淀粉酶产生菌

王 萍 檀耀辉

(无锡轻工业学院, 无锡)

从土壤中分离到两株产 $\beta$ -淀粉酶芽孢杆菌菌株, 经紫外线、 $\gamma$ -射线、氯化锂、亚硝基胍等诱变和筛选, 得到 $\beta$ -淀粉酶高产菌和耐热性 $\beta$ -淀粉酶产生菌各一株。将两菌进行原生质体融合, 获得兼有两亲株遗传特性的融合子W96。从菌落形态和产酶特性等证实此融合子系两亲株融合所得的杂交子代。W96菌株产酶能力介于两亲株之间, 酶的热稳定性较高, 60℃处理15min, 酶活力仍达93.2%。此菌株还可产生少量霉菌多糖酶(一种支链淀粉酶), 与所产生的 $\beta$ -淀粉酶协同作用, 使淀粉水解率达到80.6%, 因而有较高的应用价值。

**关键词**  $\beta$ -淀粉酶; 耐热性; 原生质体融合

$\beta$ -淀粉酶(EC3.2.1.2)最初被发现于麦芽、大豆和甘薯等高等植物中。1946年, Kneen和Beckord测定出许多芽孢杆菌产生的 $\beta$ -淀粉酶具有类似大麦芽提取物的淀粉降解特性<sup>[1]</sup>。此后, 特别是近十几年来, 世界上对于微生物 $\beta$ -淀粉酶的研究愈来愈多<sup>[2,3]</sup>。1979年起, 我国也开始了这方面的研究<sup>[4,5]</sup>。

$\beta$ -淀粉酶主要用于从淀粉制取麦芽糖, 可用于啤酒生产、食品生产及其他方面, 目前国内外工业上所用的 $\beta$ -淀粉酶仍多从高等植物中提取。微生物 $\beta$ -淀粉酶尚不能投入大规模的工业化生产, 其原因主要是酶活力低及耐热性差, 不能适应啤酒、饴糖等生产工艺的要求, 因此迫切需要研究高产、具一定热稳定性的产酶菌株。

原生质体融合技术用于微生物菌种选育, 对于两个以上性状的结合具有较高的优越性。本实验应用原生质体融合技术, 使耐热性和产酶量两性状结合起来。以土壤中分离到的No.86和No.90两株产 $\beta$ -淀粉酶的芽孢杆菌为出发菌株, 进行了诱变育种和原生质体融合育种, 得到的杂交子

代W96菌株结合了两亲株的产酶及耐热性能。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌株及来源

多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*) No.90, 分离自日本大阪附近园田土壤,  $\beta$ -淀粉酶产量 27.1u/ml。经亚硝基胍诱变, 得到高产酶的菌株B928, 并经抗药性标记, Rif<sup>r</sup>(利福平抗性) 20 $\mu$ g/ml。

芽孢杆菌菌株(*Bacillus sp.*) No.86 (种名待定), 分离自无锡郊区土壤,  $\beta$ -淀粉酶产量 2.29u/ml。经紫外线、 $\gamma$ -射线+氯化锂、亚硝基胍三次诱变, 得到产耐热性 $\beta$ -淀粉酶菌株D811, 并经抗药性标记, NaI<sup>r</sup>(萘啶酮酸抗性) 50 $\mu$ g/ml

### (二) 培养基与缓冲液

1. 肉汁培养基(%) : 牛肉膏1, 蛋白胨1, 葡萄糖0.5, NaCl 0.5, pH7.0—7.2 (固体培养基加2%琼脂, 下同)。

本文于1987年5月16日收到。

本研究所用出发菌株No.90由本院张星元老师提供, 连云港市酶制剂厂的周云洁、吴继宝同志协助部分实验工作, 在此一并致谢。

2. 肉汁淀粉培养基:培养基1中的葡萄糖以2%可溶性淀粉替代。

3. 制备原生质体用培养基(%):牛肉膏1,酵母膏0.1,蛋白胨1,NaCl 0.5, pH7.0。

4. 高渗固体培养基:培养基1中加0.4mol/L蔗糖,0.02mol/L MgCl<sub>2</sub>

5. 高渗半固体培养基:培养基4中琼脂量改为0.8%。

6. 高渗缓冲液(SSM):0.4mol/L蔗糖,0.2mol/L琥珀酸钠,0.02mol/L MgCl<sub>2</sub>, pH6.7。

### (三) 分析方法

1.  $\beta$ -淀粉酶活力的测定<sup>[3,6]</sup>:1%可溶性淀粉溶液(0.02mol/L pH6.8磷酸缓冲液配制)0.9ml,待测酶液0.1ml 40℃水浴中反应10min,立即加DNS(二硝基水杨酸)试剂2ml,摇匀,于沸水浴中显色5min,流动冷水冷却,加水17ml,摇匀,530nm下比色测定还原糖,以水代替酶液作对照。在此条件下,每分钟产生1 $\mu$ mol/L麦芽糖的酶量为1个酶单位。

2. 纸层析:将可溶性淀粉的酶解产物5 $\mu$ l点样于新华1号滤纸上,用正丁醇:乙醇:水=5:3:2(体积比)的溶剂系统在室温下一次上行展开,碱性硝酸银显色。

### (四) 原生质体的制备

D811和B928菌株分别于培养基3中振荡培养过夜(B928培养液中加入青霉素钾1u/ml,继续培养2h),离心收集菌体,分别悬浮于含溶菌酶2mg/ml和3mg/ml的溶菌液(培养基3与2倍浓度的SSM液等量混合)中,34℃作用至大部分细胞呈圆形时,离心除酶,用SSM液悬浮原生质体。

### (五) 原生质体的再生与融合

1. 再生:原生质体悬浮液用SSM液

适当稀释后,取0.1ml与3ml培养基5混合,涂于培养基4平皿上培养,同时以水代替SSM液作为对照,2天后根据长出的菌落数,计算原生质体百分率与再生率。

2. 融合:混合等量两亲株原生质体悬浮液,离心去上清液,加入30%的PEG 6000溶液(用SSM液配制)2ml。在室温下作用2min,用SSM液洗涤、稀释,取0.1—0.2ml与3ml培养基5混合,涂于含Rif 20 $\mu$ g/ml和Nal 50 $\mu$ g/ml的培养基4平皿上培养3天,长出的菌落为具有两个抗性遗传标记的融合子。

### (六) 融合子的筛选

挑选三代后遗传标记仍稳定的融合子接种于培养基2中,32℃振荡培养24h,移至平皿内,55℃浅层培养36h,测定酶活力,挑选酶活力较亲株高,水解淀粉产物主要为麦芽糖而无葡萄糖者,同法进行复筛。

### (七) 亲株、杂交子代的性质测定及子代发酵条件的确定

1. 产酶曲线:两亲株与筛选得到的融合子W96接种于培养基2,分别于32℃和36℃振荡培养,不同时间测定酶活力,作酶活力-时间曲线。

2. 两亲株与融合子W96分别接种于培养基2中,35℃下振荡培养60h,取发酵液上清液分别做以下各项试验

(1) 酶对不同底物的作用:分别以1%的 $\beta$ -环状糊精、茁霉多糖、直链淀粉和可溶性淀粉为底物进行酶解反应,水解物作纸层析试验。

(2) 变旋光值测定:参照不破和二国的方法<sup>[7]</sup>,于20和40min分别测定酶反应液的旋光度,加0.1ml 4%的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液于10ml反应液中,10min后再测旋光度,比较加入Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>前后旋光度的变化值。

(3) 酶的热稳定性: 酶液置不同温度的水浴中处理 15min 后 (无底物), 取出测定酶活力。

(4) 酶对可溶性淀粉的水解率: 0.2% 可溶性淀粉溶液 45ml, 酶液 5ml 于具塞试管中, 40°C 反应, 不同时间取样测定释放的还原糖量。以盐酸水解淀粉为基准, 计算淀粉水解率。

3. 融合子发酵条件试验: 参考两亲株的发酵条件, 并根据一些探索性试验结果, 采用 L<sub>3(4)</sub> 表安排 W96 菌株发酵条件的正交试验。

## 结果与讨论

### (一) 原生质体百分率、再生率及融合频率

平皿计数法所得数据, 采用江行娟等

的方法<sup>[8]</sup>, 计算得 D811 平均原生质体百分率为 96.0—99.96%, B928 为 70—80%, 原生质体再生率 D811 为 31.7%; B928 为 24.9%; 融合频率为  $1.0 \times 10^{-6}$ — $2.6 \times 10^{-6}$ 。

### (二) 亲株与融合子的性质比较

1. 菌落形态: 两亲株与融合子于培养基 1 平皿上穿刺接种培养后, 菌落形态见图 1。W96 菌株的菌落形态介于两亲株之间。D811 菌株菌落为黄色, 边缘整齐。B928 菌株菌落为白色半透明, 边缘不整齐。而 W96 菌株的菌落为黄白色不透明, 边缘不整齐。这些为证明 W96 菌株确是两亲株融合所得的杂交子代提供了一定证据。

2. 55°C 下的产酶情况: 亲株与筛选过程中所得融合子在 55°C 下的产酶情况数据见表 1。

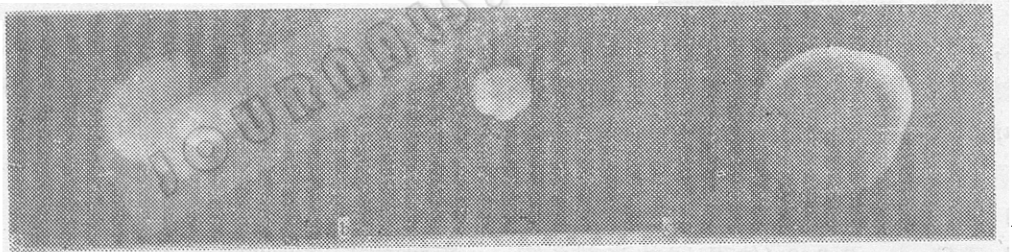


图 1 亲株及融合子的菌落形态  
Fig. 1 Colony morphology of fusant and parental strains  
a. D811      b. B928      c. W96

表 1 55°C 下亲株与融合子的产酶量于不同温度下的测定值

Table 1 Activity of enzyme produced by parents and fusants at 55°C, measured at different temperature

菌 株 Strains		酶活力 Enzyme activity (u/ml)	
		40°C 测定 Measured at 40°C	55°C 测定 Measured at 55°C
亲 株 Parents	D811	6.95	7.12
	B928	6.23	6.00
融 合 子 Fusants	W73	8.60	8.58
	W77	8.39	8.37
	W96	8.61	8.64

3. 产酶曲线：实验结果见图 2。融合子 W96 和两亲株 B928、D811 的产酶量分别在 60、68 和 28h 达到高峰。

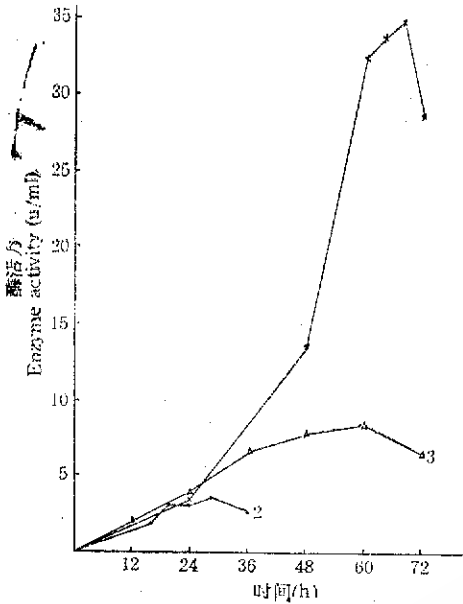


图 2 B928、D811 和 W96 的产酶曲线  
Fig.2 Enzyme activity during fermentation of B928, D811 and W96  
1. B928 2. D811 3. W96

由表 1 和图 2 可知，在 55℃ 下，融合子产 β-淀粉酶的能力高于两亲株，而在中温下，融合子的产酶能力也高于亲株之一 D811，因此在生产性能方面，融合子是兼具了两亲株的高产和耐热的遗传特性，这是融合的又一个证据。

4. 酶性质的比较：酶对不同底物作用的纸层析试验结果见图 3。

变旋光度测定结果见图 4。W96 菌株和两亲株所产生的酶与淀粉作用，在反应混合物中加 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>，都引起旋光度的增加，证明酶反应产物均为 β 型糖。

酶的热稳定性试验结果见图 5。该结果表明，亲株之一 B928 的酶不耐热，另一亲株 D811 和融合子 W96 产生的酶则具

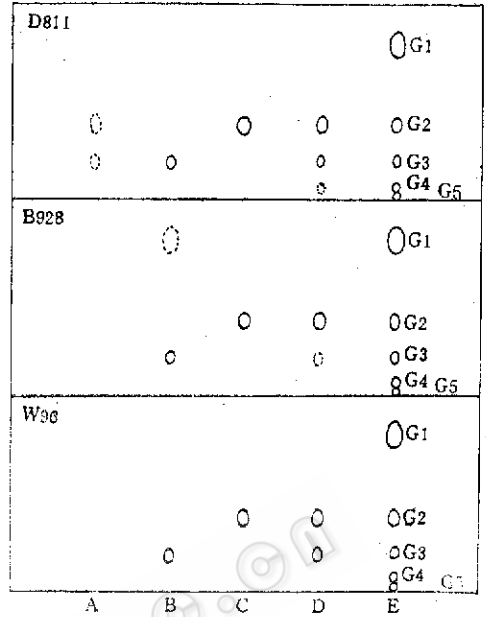


图 3 酶对不同底物的作用  
Fig.3 Results of enzyme reactions with different substrates

A. β-环状糊精 β-cyclodextrin B. 苗霉多糖 Pullulan C. 直链淀粉 Amylose D. 可溶性淀粉 Soluble starch E. 低聚糖标准样 Standard sample of oligosaccharide  
G<sub>1</sub>: 葡萄糖 Glucose G<sub>2</sub>: 麦芽糖 Maltose  
G<sub>3</sub>—G<sub>5</sub>: 麦芽三糖—麦芽五糖 Maltotriose Maltopentose

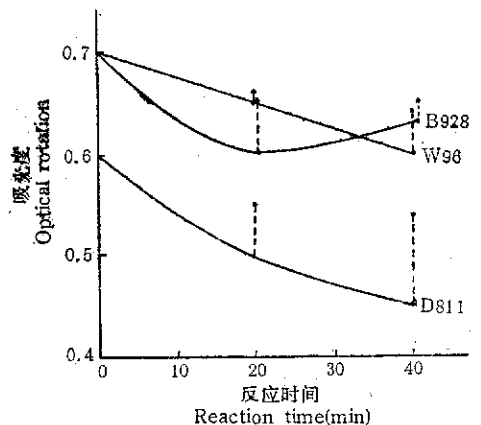


图 4 酶解产物中加入 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 后旋光度的变化  
Fig.4 Change of optical rotation after the addition of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> to enzymatic hydrolysate

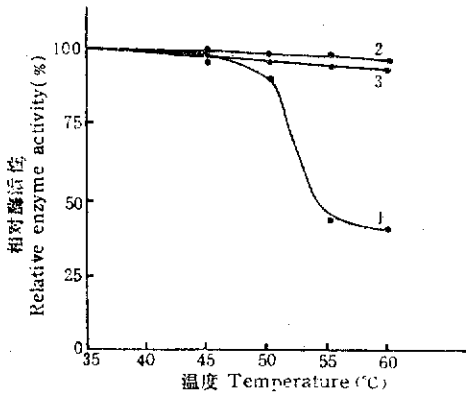


图 5 酶的热稳定性  
Fig.5 Heat stability of enzymes  
1. B928 2. D811 3. W96

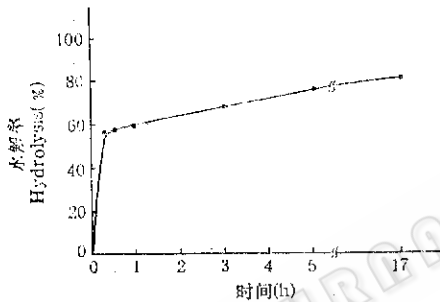


图 6 酶对可溶性淀粉的水解率  
Fig.6 Percentage of enzymolysis on soluble starch

有一定的热稳定性。经60℃处理 15min, 剩余酶活力分别为40%、96.4%和93.2%。

图6显示W96所产生的酶对可溶性淀粉的水解率的试验结果。反应 17h, 淀粉水解率可达80.6% (亲株的酶对淀粉的水解率分别为B928 62.8%, D811 59.9%)。W96菌株产生少量茁霉多糖酶(由图3可知), 这一点对于从淀粉中制取麦芽糖意义很大, 与单纯使用β-淀粉酶相比, 它可以大大提高淀粉原料的利用率, 高产率地生产麦芽糖。由一菌株同时生产β-淀粉酶和茁霉多糖酶, 日本的高崎<sup>[9]</sup>曾报道过,

国内尚未见正式报道。由上述各种性质的比较可以看出, 融合子产生的酶的特性也与两亲株相似。

### (三) 融合子的发酵条件及产酶水平

由三组正交试验的结果得出融合子W96的适宜发酵条件为, 培养基(%): 可溶性淀粉3, 蛋白胨2, 牛肉膏0.5, 酵母膏1, KCl 0.02, NaCl 0.3, MnSO<sub>4</sub> 0.02, MgSO<sub>4</sub> 0.04, pH8.0。种龄11h, 接种量3%, 500ml锥形瓶中装液40ml, 36℃摇瓶发酵62h。按此条件, 作W96菌株的产酶曲线, 结果见图7。融合子W96

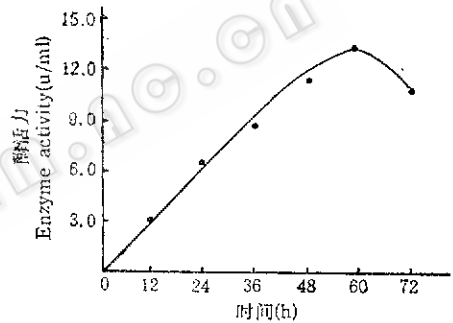


图 7 融合子W96的产酶曲线  
Fig.7 Enzyme activity during fermentation of W96

的最高产酶水平可达13.2u/ml, 与出发菌株 No.86和 No.90相比, 约为No.86的近6倍和No.90的约1/2。

我们通过原生质体融合的方法, 获得了高产、耐高温β-淀粉酶的菌株, 融合子W96成功地表现了两亲株的优良特性。原生质体融合育种法操作简便, 见效快, 在一般实验室条件下都可以进行, 特别在对于产酶基因及其他性状的控制因子了解不多的情况下, 原生质体融合技术更有其独特的优越性。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Kneen, E. et al.: *Arch. Biochem.*, 10:41, 1946.  
[ 2 ] 东原昌孝等：アミラーゼシンポジウム, 6:36, 1971.  
[ 3 ] Murao, Sawao et al.: *Agri. Biol. Chem.*, 43(4):719, 1979.  
[ 4 ] 郭君君等：微生物学通报, 7(2):59, 1980.  
[ 5 ] 何秉旺等：微生物学报, 23(1):75, 1983.  
[ 6 ] Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, 31:426, 1959.  
[ 7 ] 不破英次等：农芸化学会誌, 26:154, 1952.  
[ 8 ] 江行娟等：遗传学报, 8:1, 1981.  
[ 9 ] Takasaki, Yoshiyuki: *Agri. Biol. Chem.*, 40(8):1515, 1976.

## BREEDING OF *BACILLUS* STRAIN PRODUCING HEAT-RESISTANT $\beta$ -AMYLASE THROUGH PROTOPLAST FUSION TECHNIQUES

Wang Ping      Tan Yaohui

(Wuxi Institute of Light Industry, Wuxi)

A high-yield  $\beta$ -amylase producing strain and a heatresistant  $\beta$ -amylase producing strain were obtained respectively from two strains isolated from soil, through ultra violet,  $\gamma$ -ray and lithium chloride, and N-methyl-N-nitroso-N'-nitroguanidine treatment along with necessary screening steps. And further the fusant W96 was produced by means of protoplast fusion of the two strains. It is characterized genetically with colony morphology and enzyme producing properties of both parents. Its enzyme stays stable under high temperature, and 93.2% of original enzyme activity is still maintained after heat treatment at 60°C for 15min. It also produces small amount of pullulanase, together with which, the  $\beta$ -amylase hydrolyzes up to 80.6% of soluble starch.

### Key words

$\beta$ -amylase; heat-resistant; protoplast fusion