

# 链霉菌耐温型种间融合重组子淀粉酶热稳定性的比较研究

齐海燕 郑幼霞

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

**摘要** 通过庆丰链霉菌 M15S 与吸水链霉菌井冈变种 #75 菌株的原生质体种间融合, 得到稳定的耐温型重组子 F1-38 和 F6-6 等, 其生长的上限温度分别为 53℃ 和 63℃, 而亲株 M15S 和 #75 则分别为 39℃ 和 50℃。将这两个重组子产生的淀粉酶的耐温性与双亲株的淀粉酶相比较表明, 这两个耐温型重组子淀粉酶的热稳定性均高于亲株; 随着菌体培养温度的提高, 淀粉酶的热稳定性增加, 一些重组子的淀粉酶活力大大提高。

**关键词** 热稳定性; 淀粉酶; 原生质体融合

用庆丰链霉菌 M15S (39℃ 停止生长, SM') 和吸水链霉菌井冈变种 #75 (50℃ 停止生长, SM') 为双亲株进行原生质体种间融合, 并在融合子中筛选到一批稳定耐温型种间融合重组子, 即能在 42℃ 良好生长、SM' 的重组子。本文比较了重组子耐温性的差别, 研究了亲株和重组子生长上限温度及其产生的淀粉酶耐热性的变化。

## 材料与方 法

### (一) 菌株

庆丰链霉菌 (*Streptomyces qingfengmyceticus*) M15S, 由本实验室保存。

吸水链霉菌井冈变种 (*Streptomyces hygroscopicus* var. *jinggangensis*) #75, 由上海市农药研究所赠送。

吸水链霉菌井-庆融合变种 (*Streptomyces hygroscopicus* var. *qing-qingfusedensis*) F1-38, 为庆丰链霉菌 M15S 和吸水链霉菌井冈变种 #75 的种间融合重组子。

庆丰链霉菌庆-井融合变种 (*Streptomyces qingfengmyceticus* var. *qing-jingfusedensis*) F6-6 和 F4-6, 也是庆丰链霉菌 M15S 和吸水链霉菌 #75 的种间融合重组子。

### (二) 培养基

斜面培养基和庆丰霉素发酵培养基 (QM)

参考文献[1], 淀粉酶发酵培养基 (SBY) 参考文献[2]。

### (三) 方法

1. 菌株生长上限温度的测定: 用划线法或影印法将菌接种于斜面或平板上, 置于不同温度中培养, 菌株停止生长的温度即为此菌株生长上限温度。

2. 淀粉酶活力的测定: 参考文献[2], 菌株经培养后离心除去菌体, 上清液作适当稀释后与淀粉溶液保温, 进行酶解反应, 利用在稀酸溶液中碘与淀粉的蓝色反应, 测定酶解后剩余淀粉量, 在 620nm 波长处测 OD 值, 酶的活力单位按下列公式计算:

$$\text{酶活力单位} = \frac{\text{对照 OD 值} - \text{样品 OD 值}}{\text{对照 OD 值}} \times \frac{100}{20} \times \frac{1}{10} \times \text{稀释倍数}$$

## 结果与讨论

### (一) 菌株生长的上限温度

我们曾利用庆丰链霉菌 M15S 菌株对链霉素抗性, 39℃ 停止生长和吸水链霉菌井冈变种 #75 菌株对链霉素敏感、42℃ 仍能生长良好的特点, 进行原生质体种间融合, 从含链霉素 100μg/ml 并置于 42℃ 培养 14 天左右的再生平板上, 直接挑出了种间融合子(两亲株原生质

表1 亲株和一些重组子的最高生长温度

菌株	75#	M15S	F1-16	F1-38	F4-6	F5-24	F6-6	FM2-4	FM3-32
最高生长温度(°C)	50	39	50	53	47	50	63	50	50

体分别培养的再生平板上均无菌落出现),经分离传代后,得到了稳定的耐高温型重组子,这些重组子皆可在42°C旺盛生长。测定了一些重组子的生长上限温度,从表1的结果看,大部分重组子的上限温度与亲株#75菌株相似,而F1-38为53°C, F6-6为63°C,分别比#75菌株高3°C和13°C。由于F1-38菌株主要继承了#75亲株的一些培养特征,属于吸水链霉菌,因此F1-38上限温度的提高可能是重组子生长优势的表现;而F6-6上限温度的提高,猜测可能是因融合中双亲DNA间发生多方式、多位点的交换,而触动了某个或某些细菌生长温度的关键机制。

(二) 重组子的淀粉酶活力

在菌株发酵产抗生素的实验中发现,重组子在37°C或更高温度发酵时,往往比亲株长得更快更好。由于发酵培养基QM中含大量淀粉,这意味着在较高发酵温度时,重组子淀粉酶可能有较强的活力。对它们的淀粉酶活力进行了测定,表2的结果表明,当在QM中发酵时,重组子F4-6的淀粉酶活力显著提高,分别比双亲株(M15S及#75)提高6.57和12.18倍;在SBY中发酵时,重组子F1-38的淀粉酶活力也提高了,比M15S和#75分别提高3.81和1.39倍。推测淀粉酶活力的提高可能是通过DNA重组促进了酶蛋白基因的表达,或者使蛋白分泌系统得到改善。

(三) 淀粉酶的热稳定性

重组子F1-38和F6-6的生长上限温度均比双亲株有所提高,尤其是F6-6在57°C时仍能旺盛生长,这表明其淀粉酶耐热性可能也很好,甚至比亲株#75的淀粉酶更为耐热,为了了解这一点,做了酶的热稳定性和热变性残留活性二个实验。

图1表示酶的热变性残留活性,菌株在

表2 重组子和亲株的淀粉酶活力

菌株	淀粉酶活力(u/ml)	
	QM	SBY
M15S	3.76	5.24
75#	2.03	14.41
F1-16	1.95	14.41
F1-38	3.52	20.08
F4-6	24.72	12.24
F6-6	4.44	NT

NT: 未试验

SBY培养基中分别于37°C和42°C摇瓶发酵,培养液在不同温度下保温10分钟进行热变性,然后到45°C测定酶的残留活性,从图1可见,37°C培养产生的酶,经55°C变性处理活性明显下降,65°C处理后,亲株M15S、#75和重组子F1-38, F6-6的酶残留活性分别为17%、2%、13%和30%,其中重组子F6-6的残留活性最高,对热最稳定;45°C培养产生的酶,重组子F1-38和亲株#75的残留活性曲线很类似,经65°C处理保留了26%的活性。重组子F6-6却保留了63%,经95°C处理后仍有38%,此时#75亲株只有12%(亲株M15S在45°C不能生长),可见F6-6产生的酶对热更稳定。此外,比较图1的A和B看出,随着培养温度的提高,经过同样温度的热处理,酶的残留活性提高,即酶更加耐热。

图2为酶的热稳定性曲线,菌株接种于SBY培养基中,分别于37°C和45°C摇瓶发酵,培养液置于55°C保温,隔一定时间取样测定酶活力,计算相对活力,图2A表明,37°C培养时,重组子淀粉酶的热稳定性较亲株好,55°C保温120分钟后,F1-38和F6-6还有起始活性的35%和68%,而#75和M15S只剩下25%和33%。图2B表明,45°C培养时,重组子产

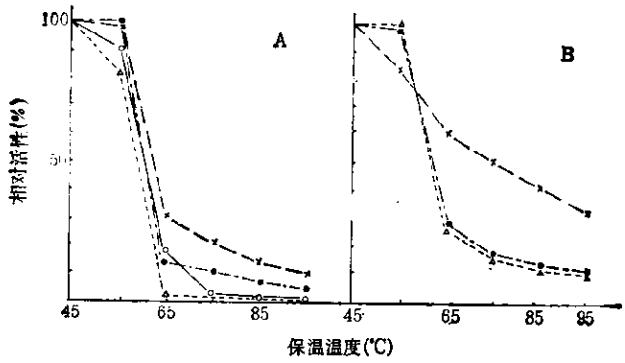


图1 酶的残留活力

A. 37°C 的样品 B. 45°C 的样品

△---△ #75, ○---○ M15S, ●---● F1-38, ×---× F6-6

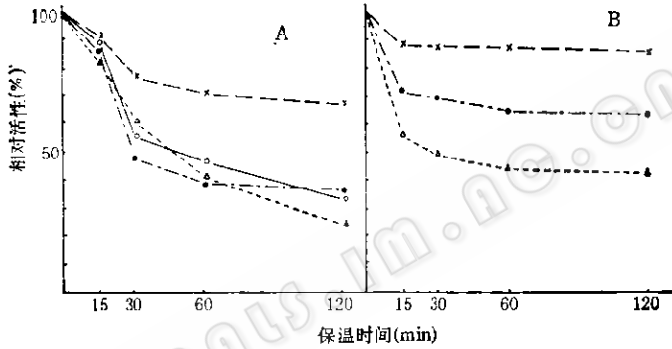


图2 淀粉酶的热稳定性(55°C)

A. 37°C 的样品 B. 45°C 的样品

△---△, #75, ○---○ M15S, ●---● F1-38, ×---× F6-6

生的酶的耐热性比亲株好,55°C保温120分钟后,重组子 F1-38 和 F6-6 还有活力 65% 和 87%,亲株 #75 只剩 45% (亲株 M15S 在 45°C 不生长),可见重组子产生的酶的热稳定性比亲株的更好。此外,比较图 2A 和 B,可见随着菌株培养温度的提高,酶的热稳定性也提高了。

从以上的实验可以得出这样的结论,种间原生质体融合重组子 F1-38 和 F6-6 的生长上限温度比亲株高,产生的淀粉酶也比亲株的淀粉酶更为耐热,长时间暴露在高温中比较不易变化;另外,随着菌株培养温度的提高,产生的淀粉酶的耐热性也随着提高。由此推测,如

有条件将重组子 F6-6 培养于更高温度如 57°C,可能会产生高度耐热的淀粉酶。重组子淀粉酶与亲株淀粉酶在耐热性上的差别,可能提示了酶结构上细微差别的存在<sup>[3,4,5]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] 上海植物生理所微生物室农抗组: 微生物学报, 15(2): 101, 1975。
- [2] Shimizu, M. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 42(9): 1681, 1978。
- [3] Yutani, K. et al.: *Biochemistry of Thermophily* edited by Friedman, SM., pp. 233—250, 1978。
- [4] Yutani, K., et al.: *Nature*, 287: 274—275, 1977。
- [5] Matsumura, M. et al.: *J. Bact.*, 160: 413—420, 1984。