

文章编号:1009-038X(2001)05-0493-04

霉菌酸性蛋白酶高产突变菌株 9169 的选育

李乃强, 潘军华, 张星元

(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 对一株宇佐美曲霉进行紫外光、微波和⁶⁰Co的逐级诱变育种,使酸性蛋白酶产量从2 800 U/mL提高到7 200 U/mL。突变株传代多次,产酶性能保持稳定;对突变株与出发株的发酵过程进行了比较研究,发现突变株最大产酶时间提前10 h以上,而培养基pH值对产酶有一定影响。

关键词: 宇佐美曲霉;酸性蛋白酶;微波诱变

中图分类号: Q 556

文献标识码: A

Selection of Mould Mutant Strain 9169 Producing Acid Protease

LI Nai-qiang, PAN Jun-hua, ZHANG Xing-yuan

(School of biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China)

Abstract: The original strain *Aspergillus usamii* WX-ZL10 was mutated by ultraviolet radiation, microwave radiation and γ -ray. A mutant *Aspergillus usamii* 9169 was obtained. The yield of acid protease was improved from 2 800 U/mL to 7 200 U/mL. The mutant strain maintains perfect genetic stability after several generations of reproduction. The time profiles of both the mutant and its parental strain were plotted in which some of their physiological properties were compared. By contrast of its parent's, the optimal duration for obtaining maximal enzyme activity of the mutant was 10 hrs decreased. The pH value of the medium had great impact on the biosyntheses and secretion of the acid protease.

Key words: *Aspergillus usamii*; acid protease; microwave mutagenesis

酸性蛋白酶在酸性环境下能催化蛋白质的水解,在催化过程中,一般不会因细菌繁殖而腐败变质。酸性蛋白酶在食品、酿造、皮革、胶原纤维等^[1-3]工业上用途很广,在医学方面可以作为消炎、退肿的药物以及助消化剂^[4]。此外,作为食品添加剂也逐步得到应用,1990年,利用重组技术生产的酶食品添加剂,最先在美国得到承认。近几年来,酸性蛋白酶应用范围进一步扩大,尤其是作为一种新型的生物饲料添加剂,在饲料工业中表现出的潜

在功能,再次引起人们的研究兴趣^[5]。作者以本实验室保藏的一株宇佐美曲霉为出发菌株,对其进行紫外光、微波和⁶⁰Co复合诱变处理,选育出了一株酸性蛋白酶的高产突变菌株。

1 材料与方法

1.1 出发菌株

A. usamii WX-ZL10是由本实验室保藏的一

收稿日期:2001-01-29; 修订日期:2001-09-17。

作者简介:李乃强(1973-),男,山东临沂人,工学硕士。

株宇佐美曲霉 (*A. usamii*), 经分离、纯化、复壮而得。

1.2 培养基

1.2.1 斜面孢子培养基 蔗糖 30 g, NaNO_3 2 g, K_2HPO_4 1 g, KCl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 琼脂 20 g, 加水至 1 L, 自然 pH, 于 0.1 MPa 压力下灭菌 20 min。

1.2.2 分离培养基 蔗糖 30 g, NaNO_3 2 g, K_2HPO_4 1 g, KCl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 琼脂 15~30 g, 酪蛋白 10 g, 加水至 1 L, 自然 pH, 于 0.1 MPa 压力下灭菌 20 min。

1.2.3 发酵培养基 玉米粉 10 g, 黄豆粉 50 g, 磷酸氢二钠 4 g, 氯化钙 5 g, 氯化铵 10 g, 加水至 1 L, 自然 pH, 于 0.1 MPa 压力下灭菌 20 min。

1.3 诱变方法

1.3.1 孢子悬浮液制备 取恒温箱内 30 °C 下培养 4 d 的 WX-ZL10 菌种斜面, 用 0.85% 的生理盐水洗下孢子, 置于无菌并盛有玻璃珠的三角瓶中, 在 210 r/min 的旋转式摇床上震荡 5 h, 使孢子活化和分散, 要求孢子分散率在 90% 以上, 然后用生理盐水将孢子悬浮液稀释到 106 个/mL, 得孢子悬浮液备用。

1.3.2 诱变方法

1) 紫外光诱变

吸取出发菌株 WX-ZL10 的孢子悬浮液, 注入 8 个直径 9 cm 的底部平整的平面皿中, 每个平面皿的悬浮液量为 10 mL。将盛有悬浮液的平面皿置于诱变箱内紫外灯管下的磁力搅拌器上, 平面皿距紫外灯管的垂直距离为 30 cm。打开紫外灯, 预热 30 min, 使光波稳定。调节搅拌子的转速, 转速稳定后, 打开平面皿盖子照射, 并开始计时, 8 个平面皿的照射时间分别为 0、2、4、6、8、10、12、14 min。从每个平面皿中取出 0.1 mL 的菌悬液, 做适当稀释, 得不同稀释度的菌悬液。吸取稀释后的菌悬液 0.3 mL, 涂布分离培养基平板, 然后置于 30 °C 恒温箱培养 (为避免光复活, 平面皿需用黑纸或牛皮纸包裹)。整个诱变操作过程均在红光下进行, 4 d 后长成菌落, 统计菌落数, 然后计算致死率。

2) 微波诱变

吸取由菌株 UV9 制得的孢子悬浮液, 注入 6 个直径 9 cm 的底部平整的平面皿中, 每个平面皿的悬浮液量为 10 mL。调微波炉功率为 700 W、脉冲频率为 2 450 MHz, 按不同的处理时间, 对孢子悬浮液进行辐照处理, 处理时间分别为 0、15、30、60、

120、180 s。分别从每个平面皿中取出 0.1 mL 的菌悬液, 进行适当稀释, 得不同稀释度的菌悬液。吸取稀释后的菌悬液 0.3 mL, 涂布分离培养基平板, 然后置于 30 °C 恒温箱培养。菌落长好后计数, 并计算致死率。

3) ^{60}Co 诱变

吸取由菌株 W16 制得的孢子悬浮液, 分别注入 6 个直径 1.5 cm、长 15 cm 的无菌试管中, 每个试管的装液量为 5 mL。用 ^{60}Co 发出的 γ 射线处理。分别以 400、600、800、1 000、1 200、1 400 Gy 的剂量处理这些样品。分别从每个试管样品取出 0.1 mL 的菌悬液, 做适当稀释。吸取稀释后的菌悬液 0.3 mL, 涂布分离培养基平板, 倒置于 30 °C 恒温箱培养。菌落长好后计数, 并计算致死率。

1.3.3 酸性蛋白酶酶活的测定 1 个酸性蛋白酶单位定义为: 在 pH 值 2.5、温度 40 °C 的条件下水解酪蛋白每分钟产生 1 μg 酪氨酸的酶量。水解产物用 Folin 法^[1]测定。

2 结果与分析

2.1 紫外光诱变

2.1.1 紫外光诱变致死率的测定

106 个/mL 的单孢子悬浮液经紫外光照射处理后, 测定致死率结果见表 1。

表 1 紫外线诱变 *A. usamii* 的致死率

Tab.1 The death rates of *A. usamii* after mutagenesis of ultraviolet irradiation

照射时间/min	活菌数	致死率/%	照射时间/min	活菌数	致死率/%
0	2.8×10^5	0	8	5.8×10^4	79.3
2	2.0×10^5	28.6	10	3.5×10^4	87.5
4	1.6×10^5	42.9	12	2.5×10^4	91.1
6	1.1×10^5	60.7	14	1.4×10^4	95.0

据报道^[7], 经紫外光诱变死亡率达到 95%~99% 时的剂量, 往往是回复突变株出现率最高的剂量, 经验表明, 紫外光剂量控制在死亡率 75%~80% 时, 高产菌株诱变效果好。由上表确定紫外光诱变作用时间为 8 min。

2.1.2 紫外光诱变结果

用 15 W 的紫外灯, 与培养皿垂直距离 30 cm, 照射 8 min, 涂布分离平板进行初筛, 共挑取 70 株; 经发酵培养基摇瓶复筛得到 10 株。它们的酶活力单位如表 2 所示。

表 2 紫外诱变结果

Tab.2 The production of mutagenesis by ultraviolet irradiation

菌株	酶活/(U/mL)	菌株	酶活/(U/mL)
UV ₀	2 800	UV ₆	2 900
UV ₁	3 100	UV ₇	3 200
UV ₂	3 300	UV ₈	3 050
UV ₃	3 400	UV ₉	3 500
UV ₄	3 200	UV ₁₀	3 510
UV ₅	3 100		

从上述菌株中挑出酶活最高者 UV₉ 菌株,其酸性蛋白酶酶活 3 500U/mL,超过出发菌株酶活 25%,将 UV₉ 菌株涂布分离平板,进行分离纯化.挑出菌落透明圈直径与菌落直径比值大者,移至斜面孢子培养基培养,待孢子成熟后置冰箱冷藏待用.

2.2 微波诱变

由于紫外诱变所得到的菌株产酶量仍不很高,因此有必要采取新的诱变方法,以得到高产菌株.本实验选用最大功率 700 W、脉冲频率为 2 450 MHz 的微波炉对含量为 10⁶ 个/mL 的 UV₉ 的单孢子悬液,按不同的辐照时间进行辐照处理,致死率测定的结果如图 1、表 3 所示.

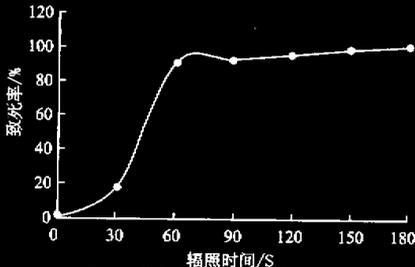


图 1 微波诱变的致死率曲线

Fig.1 The death rates under the mutagenesis by microwave

表 3 微波对字佐美曲霉的诱变效果

Tab.3 The effects of mutagenesis by microwave on *A. usamii*

辐照处理 时间/s	致死率/ %	突变率/ %	最高酶活/ (U/mL)	最大提高率/ %
120	95.5	35.3	5 800	65.7
60	90.5	28.5	4 600	31.4
30	18.0	10.5	4 000	14.3
15	8.8	5.0	3 800	8.57

由诱变结果可知,120 s 辐照处理,正突变频率最高,酶活提高率最大达 65.7%.诱变育种过程中发现低剂量辐照会促使孢子萌发时间提前,而高剂量则更易造成正变.

从以上正变的菌株中选出 5 株突变株:W₂₀(酶活 5 800 U/mL),W₁₆(酶活 5 750 U/mL),W₇(酶活 5 600 U/mL),W₈(酶活 5 500 U/mL),W₃₅(酶活 5 400 U/mL).经 3 代传代 W₂₀和 W₈ 出现了较大的回复突变,只好弃置. W₁₆(酶活 5 750 U/mL),W₇(酶活 5 600 U/mL)冷藏,以作为下一步诱变的出发菌株.

2.3 ⁶⁰Co 诱变结果

用⁶⁰Co 发出的 γ 射线照射处理 10⁶ 个/mL 的 W₁₆ 单孢子悬液,剂量为 400,600,800,1 000,1 200,1 400 Gy,从分离平板上利用透明圈大小进行初筛出 60 株突变株,然后用发酵培养基摇瓶发酵复筛,从 1 000 Gy 照射的菌株中选出 4 株产酶水平高于出发株 W₁₆ 的突变株,其中 C₉ 产酸性蛋白酶的水平最高为 7 000 U/mL,进一步分离纯化,选出一株编号为 9 169 产酶水平为 7 200 U/mL 的突变株,比 W₁₆ 的产酶能力提高了 25.2%.

2.4 菌种选育系谱

本研究的菌种选育系谱如图 2 所示.

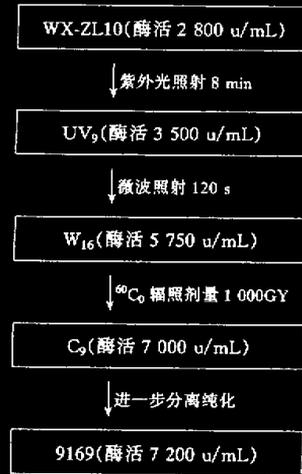


图 2 菌种选育系谱

Fig.2 Mutagenesis chart of *A. usamii*

2.5 突变株传代实验

用斜面孢子培养基将突变株 9 169 多次传代(30 °C 下培养 4 d),得不同代次的斜面.将不同代次的斜面孢子接种发酵培养基(500 mL 三角瓶装 50 mL),在 220 r/min 旋转式摇床 30 °C 培养 90 h.测得突变株发酵能力如表 4 所示.传接 7 代后,突变株

产酶仍维持在原来的水平,这表明,突变株 9169 的产酶性能稳定.

表 4 菌株 9169 的传代稳定性

Tab. 4 Genetic stability of strain 9169

代数	酶活/(U/mL)	代数	酶活/(U/mL)
第一代	7 200	第五代	7 200
第二代	7 350	第六代	7 300
第三代	7 300	第七代	7 250
第四代	7 250		

2.6 诱变菌株和原菌株发酵过程曲线的对照

用发酵培养基,500 mL 三角瓶装液 50 mL,孢子接种,30 °C 下,在 220 r/min 旋转式摇床培养.在此条件下,突变株和原菌株的发酵过程曲线如图 3.

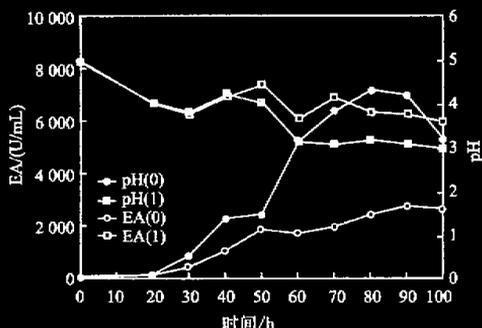


图 3 诱变菌株和出发菌株发酵过程曲线的对照

Fig. 3 The time profile of the mutants and the initial strain

参考文献:

- [1] 伊藤保人. プロテアゼによる不溶性コラーゲンの可溶化方法[P]. 日本特许公报:昭 44-1175, 1969.
- [2] ARAI S, NOGUCHI M, YAMASHITA M, *et al.* Applying Protolytic Enzymes on Soybean Part II Properties of Soy Protein Treated with Microbial Acid Protease (Molsin)[J]. *Agr Biol Chem*, 1970, 9:1338~1942.
- [3] 横冢保. 蛋白质水解物の制造法[P]. 日本特许公报:昭 49-13976, 1974.
- [4] 小崎吉久. 丝状菌による耐酸性プロテアゼの制造法[P]. 日本特许公报:昭 43-4436, 1968.
- [5] 刘翠然, 张淑芬. 动物蛋白酶化技术[J]. 饲料研究, 1991, 6:7~8.
- [6] 松岛钦一, 嶋山协. *Aspergillus niger* の UV 照射変異株のプロテアゼ系につらて[J]. 日本农芸化学杂志, 1976, 41: 671~674.
- [7] 章名春编著. 工业微生物诱变育种[M]. 北京:科学出版社, 1984.
- [8] 李乃强, 潘中明, 潘军华等. 碳源、氮源和 pH 对酸性蛋白酶表达的调控[J]. 粮食与饲料工业, 2000, 10:34~36.
- [9] 梁海曼, 周菊华. 热击在植物组织培养的应用前景[J]. 广西植物, 1992, 12(1):64~75.
- [10] 李水泉, 翁醒华, 贺筱蓉. 微波诱变结合化学诱变选育酸性蛋白酶高产菌[J]. 微生物学报, 1999, 39:181~183.

由图 3 可知,突变株酸性蛋白酶酶活在培养 80 h 时达到 7 200 U/mL 左右,而出发株需培养 90 h 才达到最大酶活;突变株和出发菌株在合成酸性蛋白酶的过程中, pH 的整个变化趋势是不断下降,培养基的 pH 值和酸性蛋白酶的合成有一定的关系^[8];特别是在大量产酶阶段(培养 40 h 以后),突变株发酵液的 pH 值明显低于出发株的发酵液.

3 小结

经过紫外光、微波和⁶⁰Co 逐级诱变筛选,突变菌株的酸性蛋白酶酶活力提高到 7 200 U/mL 左右.为了提高诱变率,实验中一般要采用两种或多种诱变剂作复合处理.复合处理可显著提高突变率.文献表明,并不是任何诱变剂复合处理都能提高诱变率^[7].即使两种诱变剂有复合效用,其诱变处理顺序对诱变效应也有很大影响:顺向处理有协同作用;而逆向处理反而有抵消作用,实验过程的诱变强度一般为先弱后强.本实验诱变为复合诱变,对于诱变剂的使用,遵循先弱后强的原则.虽然对于复合诱变中各诱变剂处理是否是协同作用或抵消作用尚未有理论上的证明和阐述,但是已获高产突变株,其酸性蛋白酶酶活力有了显著提高.

微波在生物学上主要用于杀菌、刺激植物生长^[9],近几年来用于工业微生物遗传育种^[10],实验证明微波处理也是一种行之有效的诱变方法.