

N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍诱变黑曲霉 提高产葡萄糖淀粉酶能力的研究

中国科学院微生物研究所糖化酶组

(北京)

1. 初步实验证明,亚硝基胍诱变黑曲霉 *CoV* 提高产葡萄糖淀粉酶能力,其浓度以 200—300 微克/毫升, pH 6, 处理 30 分钟,和用 TM 缓冲液或生理盐水作分生孢子悬液较为适宜。
2. 黑曲霉 *CoV* 经亚硝基胍诱变处理后,以菌落较大,生孢子能力一般的菌株提高产葡萄糖淀粉酶能力的幅度较大。因此,在诱变处理时,可选择性地挑取菌落,以提高筛选效率。
3. 经亚硝基胍和 Co^{60} 交替处理获得变异株 *Asp. niger* NCN 24, 相当原来生产常用的诱变出发菌株 M 85 产葡萄糖淀粉酶能力的 208%。
4. 通过产葡萄糖淀粉酶能力高的菌株的选育,初步体会到,单因子诱变处理获得产酶能力较高的优良菌株可能性较少,几种诱变方法交替处理,逐步提高其产葡萄糖淀粉酶的能力,获得性状较好的变异菌株,这是可能的。

黑曲霉产生的葡萄糖淀粉酶(以下简称糖化酶),在我国早已应用于酿酒工业和酒精工业,现在已用于酶法生产葡萄糖。为了进一步节省粮食和降低成本,生产中提出了选育糖化酶活力高的菌株。

对提高产糖化酶能力的菌种选育,上海酒精二厂用 $Co^{60}\gamma$ -射线及乙烯亚胺和硫酸二乙酯处理黑曲霉(*Aspergillus niger*)沪轻二号,获得一株适于固体制曲的变异株,糖化力比原菌株提高 20%。我组曾以 Co^{60} 照射红曲霉(*Monascus* sp.), 得到糖化酶活力提高 60% 的变异株。最近林庆福(Lin Ching-Fwu)^[1] 报道了根霉经过紫外线和 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(简称亚硝基胍, MNNG)交替诱变,得到一株产糖化酶高活力菌株,在利用麸皮固体培养时,产酶活力为亲本菌株的 5.7 倍,深层培养时为 15 倍;表面培养时为 2.7 倍。美国 Miles-Takamine 研究室^[2] 利用紫外线照射

臭曲霉(*Asp. foetidus*), 变异株的糖化酶活力为原株的 1.6 倍。日本新井英夫^[3,4] 用 $Co^{60}\gamma$ -射线对宇佐美曲霉(*Asp. usamii*) 和泡盛酒曲霉(*Asp. awamori*) 照射后,其变异株的糖化酶活力分别为 2 倍和 1.5 倍。

我们在黑曲霉诱变工作中主要以亚硝基胍为诱变剂。已知亚硝基胍对细菌^[5]和酵母菌^[6,7] 是一种高效的诱变剂。但亚硝基胍应用于其他真菌的还较少。至于亚硝基胍对黑曲霉产生糖化酶能力的影响及诱变作用条件尚未见报道。本文介绍,用亚硝基胍诱变黑曲霉提高产糖化酶性状的变异条件,和亚硝基胍与 $Co^{60}\gamma$ -射线交替处理,获得产糖化酶活力高的菌株的选育。

●材料和方法

一、亚硝基胍诱变

菌株 菌种选育的出发菌株是用上海工业微

本文 1973 年 7 月 5 日收到。

生物所选育出的黑曲霉(*Asp. niger*) M 85。诱变条件研究用的出发菌株 CoV 是 M 85 经我组用 7.5 万伦琴 Co⁶⁰ 照射后获得的变异菌株。

亚硝基胍 我所杨寿钧、孟景前按照麦凯和赖特 (McKay 和 Wright)^[4] 的方法合成, 熔点为 118℃, 黄色结晶。

分生孢子悬液制备 取 30℃ 培养 7 天的蔡氏斜面培养物一支, 加生理盐水, 用接种针将分生孢子刮下, 倾入带有玻璃珠的三角瓶中振荡 5 分钟, 用四层灭菌纱布过滤, 离心, 用生理盐水洗涤一次, 再加生理盐水制成浓度为 10⁶/毫升的孢子悬液。

处理方法 用精密天平称取亚硝基胍 5 毫克, 溶于 0.05M、pH 6.0 的三羟甲基氨基甲烷-马来酸 (Tris-maleic acid 简称 TM) 缓冲液内, 诱变处理时, 将上述孢子悬液与亚硝基胍溶液混匀, 置 30℃ 水浴静止处理, 用离心法终止反应, 处理时间共 30 分钟。在各种诱变处理条件试验中, 分别按试验的要求变动其中的一个条件, 以观察对诱变效应的影响。

诱变处理后的孢子经洗涤、稀释后, 在蔡氏培养基平皿上进行涂布 (每皿约 50 个菌落), 置 30℃ 培养 3 天, 作菌落计数, 并随机挑取单个菌落移至蔡氏斜面, 30℃ 培养 7 天后, 供摇瓶筛选用。

二、摇瓶筛选

培养基 黄豆饼粉 1.5%, 玉米粉 3%, KH₂PO₄ · 2H₂O 0.03%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, 自然 pH 6, 200 毫升三角瓶装量为 50 毫升。

培养 每三角瓶接种一小团斜面培养物, 置旋转式摇床 (230 转/分), 30℃ 振荡培养 72 小时。

酶活力测定 发酵液经棉花过滤, 供酶活力测定用。酶反应系统为: 2% 可溶性淀粉 5 毫升, 0.1M 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 4.8) 5 毫升, 加入酶液 0.25 毫升。置 50℃ 水浴中, 反应 10 分钟, 立即移入沸水浴以终止酶反应。冷却后, 吸取 5 毫升酶反应液, 用次亚碘酸盐法^[5] 测定还原糖含量。在上述条件下每小时催化生成 1 毫克葡萄糖的酶量为一个酶活力单位。

结果和讨论

一、亚硝基胍处理对分生孢子存活率的影响

用浓度为 25—500 微克/毫升的亚硝基胍处理黑曲霉分生孢子, 结果 (图 1) 表明, 随亚硝基胍浓度增加, 孢子存活率不断降低, 其浓度为 100, 300, 500 微克/毫升, 存活率分别为 48.3%、34.2%、25.5%。

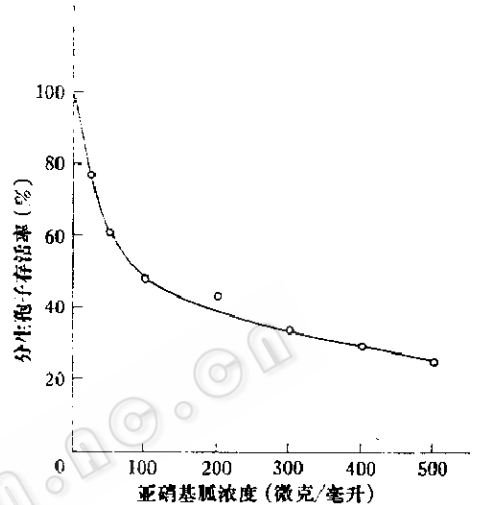


图 1 亚硝基胍处理黑曲霉 CoV 的存活曲线

以亚硝基胍浓度为 100 微克/毫升, 分别处理孢子悬液 15、30、60、90、120 和 150 分钟。结果为处理 15、90 和 150 分钟孢子存活率分别为 93.0%、36.0% 和 12.3%。可见, 随着处理时间的延长孢子存活率逐渐降低。

彭贝裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)^[6] 用亚硝基胍 (2000 微克/毫升) 处理 30 分钟, 存活率为 20%, 大肠杆菌 (*E. coli*)^[10] 用 300 微克/毫升 30 分钟, 存活率 61%, 比较起来黑曲霉 CoV 对亚硝基胍更为敏感。但是, 用亚硝基胍 (30 微克/毫升) 处理担子菌的绒鬼伞 (*Coprinus lagopus*)^[11], 存活率仅为 4%, 比黑曲霉 CoV 对亚硝基胍的敏感性更高。

当用不同 pH 的亚硝基胍-TM 缓冲液制备孢子悬液时, 在 pH 5—8 的范围内, 亚硝基胍对孢子的致死效应差异不大, 存活

率在 64.5—77.1%；在 pH9 时,亚硝基胍对孢子的杀伤作用很小,存活率高达 94.2%，且处理后菌株产生分生孢子的能力比亲株明显增强，与 pH5—8 比较，有显著的差异。

制备孢子悬液所用的不同溶液，对孢子存活率有一定影响。以生理盐水的存活率为最高达 77.3%，TM 缓冲液和察氏培养液分别为 67.2% 和 64.0%，加麦芽汁的察氏培养液最低 60.0%。

二、亚硝基胍的浓度对提高产糖化酶能力的影响

不同浓度亚硝基胍处理对提高产糖化酶能力的影响如表 1。300 微克/毫升处理菌株后产糖化酶能力的正变率最高，为 16.2%，而后随浓度增加正变率依次减少。从提高酶活力的幅度来看，200 和 300 微克/毫升的处理，酶活力可提高 50% 以上。试验证明，为获得糖化酶活力较高和较多的菌株，对黑曲霉 CoV 菌株诱变，亚硝基

表 1 亚硝基胍浓度对提高黑曲霉产糖化酶能力的影响

| 正变 异株 (%) 提高 酶活力幅度(%) | 浓度 (微克/毫升) | | | | | | | |
|---------------------------------------|---------------|------|------|------|------|------|-----|-----|
| | 0 | 25 | 50 | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| 20—30 | 5.9 | 7.9 | 12.2 | 9.4 | 10.4 | 10.8 | 7.1 | 3.8 |
| 30—40 | | 4.7 | | 1.6 | 1.6 | 3.6 | | |
| 40—50 | | | 0.7 | 0.8 | 0.8 | 0.9 | 0.9 | |
| 50以上 | | | | | 0.8 | 0.9 | | |
| 正 变 率 (%) | 5.9 | 12.6 | 12.9 | 11.8 | 13.6 | 16.2 | 8.0 | 3.8 |
| 测 定 菌 株 数 | 67 | 127 | 148 | 127 | 125 | 111 | 112 | 53 |

胍浓度在 200—300 微克/毫升范围内较好。

三、亚硝基胍处理时间对提高产糖化酶能力的影响

亚硝基胍处理时间对提高黑曲霉产糖化酶能力的影响如表 2 所示。经 30 和 60 分钟处理提高酶活力的正变率高达 11.0% 和 11.3%，其次为 15 和 90 分钟的处理，120 和 150 分钟处理其正变率最低。从提高酶活力的幅度来看，以处理 15、30 分钟左右效果较好。

四、亚硝基胍在不同 pH 的 TM 缓冲液中对提高产糖化酶能力的影响
亚硝基胍在酸性条件下会形成亚硝

表 2 亚硝基胍处理时间对提高黑曲霉产糖化酶能力的影响

| 正变 异株 (%) 提高 酶活力幅度 (%) | 时间 (分) | | | | | | |
|---|-----------|------|------|-----|-----|-----|--|
| | 15 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 | |
| 20—30 | 1.7 | 6.3 | 9.0 | 5.2 | 2.6 | 3.0 | |
| 30—40 | 2.5 | 3.2 | 2.3 | 1.3 | | 1.0 | |
| 40—50 | 0.9 | 1.5 | | | | | |
| 50以上 | 0.9 | | | | | | |
| 正 变 率 (%) | 6.0 | 11.0 | 11.3 | 6.5 | 2.6 | 4.0 | |
| 测 定 菌 株 数 | 118 | 64 | 89 | 76 | 76 | 100 | |

酸，而在碱性条件下会形成重氮甲烷^[5,13]，对诱变效果有较大差异。我们用不同 pH 的 TM 缓冲液组成诱变反应系统进行处理，对提高产糖化酶能力的结果列入表 3。pH6 的正变率高达 24.0%，其次为 pH5，而以 pH9 的酶活力为差。从提高酶活力的幅度和正变率来比较，亦是在 pH6 较好。

表 3 亚硝基胍在不同 pH 缓冲液中对提高黑曲霉产糖化酶能力的影响

| 提高酶活力幅度 (%) | 正变异株 (%) | pH 值 | | | | |
|-------------|----------|------|------|------|-----|----|
| | | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 20—30 | | 15.1 | 20.0 | 10.2 | 7.5 | |
| 30—40 | | 1.5 | 4.0 | | 1.2 | |
| 40—50 | | | | | 1.2 | |
| 正变率 (%) | | 16.6 | 24.0 | 10.2 | 9.9 | 0 |
| 测定菌株数 | | 66 | 75 | 68 | 80 | 45 |

亚硝基胍处理大肠杆菌 (*E. coli*) 适于产生营养突变体和抗缬氨酸突变体的 pH 为 6^[10]；处理啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)，对缺陷型的回复突变较适 pH 为 4^[12]，对天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 的诱发突变最适 pH 为 9^[13]。本试验结果与对大肠杆菌的试验结果相似。

五、亚硝基胍在各种孢子悬浮溶液中对提高产糖化酶能力的影响

据报道，亚硝基胍处理时，如菌体处于生长阶段，其存活率是低的，并且易发生变异；如果菌体处于静止状态下，则具有较高的恒定的存活率，而且突变率较高。

我们选用生理盐水、0.05M TM 缓冲液、察氏培养液和察氏培养液加麦芽汁等四种溶液作成孢子悬液，pH 均为 6。表 4 结果表明，无论从正变率或提高产酶能力幅度来看，都以 TM 缓冲液和生理盐水较

好，察氏培养液次之，加麦芽汁的察氏培养液为最差。

表 4 亚硝基胍在各种孢子悬浮溶液中对提高黑曲霉产糖化酶能力的影响

| 正变异株 (%) | 悬浮液组分 | 生理盐水 | TM 缓冲液 | 察氏培养液 | 察氏培养液 + 麦芽汁 |
|----------|-------|-------------|--------|-------|-------------|
| | | 提高酶活力幅度 (%) | | | |
| 20—30 | | 8.5 | 9.2 | 8.4 | 3.3 |
| 30—40 | | 4.2 | 5.1 | 3.1 | 2.2 |
| 40—50 | | 1.1 | | | |
| 正变率 (%) | | 13.8 | 14.3 | 11.5 | 5.5 |
| 测定菌株数 | | 94 | 98 | 95 | 91 |

六、菌落大小和产生分生孢子能力与产酶能力的关系

黑曲霉菌株 CoV 经亚硝基胍处理后，在察氏培养基平皿上培养 72 小时 (30℃)，除形成直径约 5—8 毫米的正常型大菌落外，还出现了直径约 1—2 毫米的小菌落。试验结果表明，小菌落形成的比例，是随亚硝基胍浓度提高而增加 (表 5)。

表 5 亚硝基胍浓度对黑曲霉 CoV 小菌落形成的关系

| 浓度 (微克/毫升) | 存活率 (%) | 观察的菌落数 | 小菌落数 | 小菌落 (%) |
|------------|---------|--------|------|---------|
| 0 | 100 | 369 | 0 | 0 |
| 25 | 77.0 | 288 | 1 | 0.35 |
| 50 | 61.0 | 228 | 4 | 1.75 |
| 100 | 48.3 | 334 | 16 | 4.78 |
| 200 | 43.6 | — | — | — |
| 300 | 34.3 | 195 | 14 | 7.18 |
| 400 | 29.8 | 223 | 24 | 10.7 |
| 500 | 25.5 | 191 | 31 | 15.2 |

此外，还观察到亚硝基胍处理黑曲霉 CoV 后，有些菌落产生分生孢子能力也发生了明显变化。变异株在察氏斜面上，30℃ 培养 7 天后，我们把产生分生孢子能力大致分为：在斜面上覆盖一层浓密的孢

子的为孢子多；长有一层较稀疏的孢子的为一般；仅长少量或无孢子的为孢子少(无)三类。

为了解菌落大小和产生分生孢子能力与酶活力提高之间是否存在相关性，我们

随机挑取了三种类型的菌株作产酶能力测定，结果如表 6 所示。从提高酶活力幅度来分析，大菌落的提高酶活力幅度较大；从产生孢子多少来看，不论菌落大小，都以产生分生孢子一般的为最好，其次为孢子多

表 6 菌落大小和产生分生孢子能力与产酶能力的关系

| 变异株 (%) 提高酶活力幅度 (%) | 菌落形态 | 大 菌 落 | | | 小 菌 落 | | |
|------------------------------|------|-------|------|------------|-------|------|------------|
| | | 孢子多 | 孢子一般 | 孢子少 (无) | 孢子多 | 孢子一般 | 孢子少 (无) |
| 1—10 | | 19.5 | 29.5 | 2.9 | 11.1 | 18.6 | 5.3 |
| 10—20 | | 12.6 | 22.8 | 11.8 | 16.7 | 15.3 | 5.3 |
| 20—30 | | 6.9 | 10.3 | | | 8.5 | |
| 30—40 | | 1.2 | 1.4 | | | 6.8 | |
| 40—50 | | 1.2 | 0.6 | | | | |
| 50以上 | | | 0.2 | | | | |

的，而孢子少(无)的酶活力最差。

因此，为了更有效地得到产酶能力较高的菌株，在挑取菌时以菌落较大，产生分生孢子一般的菌落为宜。

七、产糖化酶能力高的黑曲霉菌株的选育

按着上述亚硝基胍处理的最适条件，以生产菌株 M85 为出发菌株，进行了产糖化酶活力高的菌株的选育。经亚硝基胍、Co⁶⁰-射线、亚硝基胍交替处理，选育出 NCN24 变异株，10 多次重复测定表明，其产酶能力相当 M85 菌株的 208% (表 7)。

表 7 产糖化酶能力高的黑曲霉菌株的选育

| 菌 株 | 处 理 方 法 | 酶 活 力 (单位/毫升) | 相当 M85 菌株酶活力 的百分率(%) |
|-----------------------|---------------------------------------|------------------|-------------------------|
| <i>Asp. niger</i> M85 | (出发菌株) | 613.5 | 100 |
| ” NGIV | 亚硝基胍, 300 微克/毫升, pH6, 30 分钟 | 712.8 | 116 |
| ” Co7336 | Co ⁶⁰ , 250 万伦琴/秒, 照射 3 分钟 | 967.7 | 158 |
| ” NCN24 | 亚硝基胍, 200 微克/毫升, pH6, 30 分钟 | 1274.4 | 208 |

参 考 资 料

[1] Lin Ching-Fwu: 酶酵工学雜誌, 50(6): 371—380, 1972.
[2] Underkofler, L. A.: Advances in Chemistry Series 95, p. 343—357, 1969.
[3] 新井英夫等: 日本農芸化学会誌, 35 (12): 1218—1223, 1961.
[4] 新井英夫等: 日本醸造協會雜誌, 66(4): 416—

419, 1971.
[5] Mandell, J. D. et al.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 3(6): 575—577, 1960.
[6] Megnet, R.: Mutation Res., 2(4): 328—331, 1965.
[7] Nordström, K.: J. Gen. Microbiol., 48: 277—281, 1967.
[8] McKay, A. F. and Wright, G. F.: J. Amer. Chem. Soc., 69(3): 3028—3030, 1947.

- [9] Browne, C. A. and Zerban F. W.: Physical and Chemical Methods of Sugar Analysis, Third Edition p. 895—896, 1948.
- [10] Adelberg, E. A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 18(5—6):788—795, 1965.
- [11] Moore, D.: *J. Gen. Microbiol.*, 55:121—125, 1969.
- [12] Zimmermann, F. K. et al.: *Z. Vererbungsl.*, 97:68—71, 1965.
- [13] Delić, V. et al.: *Mutation Res.*, 9(2): 167—182, 1970.

STUDIES ON THE N-METHYL-N'-NITRO-N-NITROSOGUANIDINE (MNNG) INDUCED MUTATION FOR THE ENHANCEMENT OF GLUCOAMYLASE PRODUCTION IN *ASPERGILLUS NIGER*

RESEARCH GROUP OF GLUCOAMYLASE

(*Institute of Microbiology, Academic Sinica, Peking*)

Experimental results have shown that optimal conditions for mutagenic action of MNNG for the enhancement of glucoamylase production in *Asp. niger* Cov are: 200—300 $\mu\text{g/ml}$, 30 minutes, pH 6 and spores being suspended in 0.05M Tris-maleic acid buffer or saline.

After MNNG treatment, larger colonies with moderate sporeforming ability were selected since such colonies had been proved to produce much higher amount

of glucoamylase, and thus enhance the efficiency of screening.

By alternative treatment with MNNG and Co^{60} irradiation a desirable strain, *Asp. niger* NCN24, was isolated. The glucoamylase producing capability of this strain in shake flask culture was found to be 208% as higher as that of the improved strain, M85, which is currently used in industrial production.