

宇佐美曲霉酸性蛋白酶的研究

I. 酸性蛋白酶 537 菌株的选育及其发酵条件

周勤诚 关桂兰 丁志 陈菊英 董文彩

(中国科学院新疆生物土壤沙漠研究所, 乌鲁木齐)

孙世章 邱秀宝

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用紫外光、乙烯亚胺、 ^{60}Co 、甲基磺酸乙酯连续交替诱变处理宇佐美曲霉的白色变种 B_1 , 获得一株高产酸性蛋白酶的突变株 537, 在摇瓶培养条件下其产酶水平是出发菌株的 3.5 倍。试验结果表明, 对宇佐美曲霉的多因素连续诱变处理, 以及采用对萌动孢子处理的方法均有助于获得较理想的结果。此外, 简化了的培养基, 不仅使所得的突变株提高了产酶水平, 而且培养基中不需要添加豆粕水解液, 可直接采用豆饼粉和较高浓度的无机氮源。另外, 氯化钙、磷酸盐对产酶有促进作用。诱变菌株经多次传代和长期保存后, 产酶活力稳定不变。

目前国内用于生产酸性蛋白酶的菌种^[1]大多数产酶水平较低, 对培养基成份的要求也都较高。国外为得到较优良的产酸性蛋白酶的菌种, 松岛钦一等^[2]曾用紫外光诱变处理黑曲霉。Зуева 等和 Григорян 等^[3,4]也曾报道过米曲霉等菌的诱变处理试验。

我们以宇佐美曲霉的白色变种 B_1 为出发菌种, 诱变处理, 选育出一株高产酸性蛋白酶的突变株, 编号 537。并对 537 菌株的发酵条件进行了研究。

材料与方 法

(一) 菌种

宇佐美曲霉白色突变株 B_1 (*Aspergillus ussui* B_1) 由山东酒精厂提供。

(二) 培养基

斜面及平板分离培养基均采用麦芽汁 (10 Brix)。

(三) 分生孢子悬液制备

取 30℃ 培养 4 天的试管斜面菌种 1 支加生理盐水, 刮下孢子, 用玻璃珠打散, 要求单孢子程度达 95% 以上, 诱变处理时的孢子浓度稀释至 10^6 个/毫升。

(四) 处理步骤

1. 乙烯亚胺、紫外光复合处理^[3,4]。

2. ^{60}Co 照射处理。

3. 甲基磺酸乙酯处理^[5]。

4. 继续用 ^{60}Co 照射处理 2 次。

(五) 摇瓶筛选

1. 用于筛选突变株的简化培养基成份 (%): 黄豆饼粉 5, 玉米粉 1, NH_4Cl 1, CaCl_2 0.5, Na_2HPO_4 0.4, 自然 pH。

2. 生产用培养基 (豆粕水解液培养基, %): 黄豆饼粉 3.65, 玉米粉 0.625, 鱼粉 0.625, NH_4Cl , CaCl_2 0.5, Na_2HPO_4 0.2, 豆粕水解液 10, 调 pH 至 5.4^[1]。

3. 摇瓶培养: 250 毫升三角瓶装液 40 毫升,

本文于 1978 年 9 月 1 日收到。

接孢子 (30℃ 培养 4 天) 一环, 置 32℃ 旋转式摇床 (210 转/分) 上振荡培养 88 小时。

4. 酸性蛋白酶活性测定: ① 酪蛋白平板水解测定法: 用直径 6 毫米的定量滤纸片浸取摇瓶发酵滤液, 将滤纸片上多余的滤液用滤纸吸去, 然后贴在酪蛋白 (1%) 琼脂平板上, pH 2.5, 40℃ 下保温 36 小时, 测量水解透明圈直径的大小, 相对比较产酶水平, 突变株初筛即用此法。② 化学测定法 Folin 法: 见文献^[2], 变异株复筛用。

试验结果

(一) 宇佐美曲霉 B₁ 五阶段连续诱变选育结果

1. 乙烯亚胺、紫外光复合处理

试验结果表明, 乙烯亚胺使用浓度为 1:1000, 紫外光照射时间为 8 分钟 (15 瓦, 距离 30 厘米) 效果最好, 从中选出一株突变株 UV₁₃₂, 产酶水平较出发菌株 B₁ 提高了 53%。其它剂量处理的变异株中有 10 株产酶水平比 B₁ 高 20—30%, 但由于传代复筛后, 酶活力均下降至 B₁ 水平而被淘汰。

2. ⁶⁰钴第一次照射处理

UV₁₃₂ 菌株用 ⁶⁰钴照射处理, 剂量为 5、7、9、11 万拉德, 共挑出 400 个变异株, 初筛选出 6 株较 UV₁₃₂ 产酶水平高的突变株, 复筛后仅存 9 万拉德照射的一株 C₂₃₀ 仍保持高产酶性状, 其产酶水平较 UV₁₃₂ 高 52%。

3. 甲基磺酸乙酯处理

用各种不同剂量的甲基磺酸乙酯处理 C₂₃₀ 后, 选出 260 个变异株, 有 12 株产酶水平较 C₂₃₀ 高 15%, 但复筛后均不稳定, 未见有明显高过 C₂₃₀ 产酶能力者, 选其中编号为 E₆₂ 的突变株为下阶段诱变处理的出发菌株。

4. ⁶⁰钴第二次照射处理

照射剂量为 13、15 万拉德, 共挑出 10 株产酶水平超过 E₆₂ 的突变株, 复筛后以 C₃₅₀ 最稳定, 产酶水平较 E₆₂ 提高了 10%,

选为下阶段处理的出发菌株。

5. ⁶⁰钴第三次照射处理

照射处理前, 孢子先经过 5 小时 (30℃) 的萌动活化。照射剂量为 6、9、12 万拉德的照射剂量。从 9 万拉德照射的菌株中挑出 4 株产酶水平高于 C₃₅₀ 的突变株, 复筛后选出 1 株编号 537 的菌株, 进一步分离纯化, 其产酶水平可达 5000 单位/毫升, 比 C₃₅₀ 提高了 35%。

宇佐美曲霉白色变种 B₁ 经过以上五个阶段连续诱变处理后, 从 2000 多株变异株中挑选出一株较为理想的菌株 537。537 菌种诱变选育系谱如图 1。

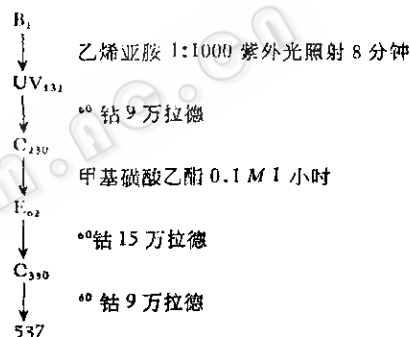


图 1 537 诱变选育系谱

6. 诱变各阶段菌种产酶水平对比: 见表 1。

表 1 诱变各阶段菌种产酶水平比较

菌种	产酶活力 (单位/毫升)		相对活力 (%) (以简化培养基计)
	简化培养基	豆饼水解液培养基	
B ₁	1450	2550	100
UV ₁₃₂	2300	3180	153
C ₂₃₀	3690	4230	240
E ₆₂	3900	4070	260
C ₃₅₀	4230	5110	280
537	5260	5950	350

试验结果表明, 通过五个阶段的连续诱变处理所得到的突变株 537 在简化培养基上的产酶水平是出发菌种 B₁ 的 3.5 倍。在培养基中加入豆饼水解液和鱼粉对 B₁ 产

酶影响十分明显，可使 B₁ 产酶活力提高 60% 左右。而对 537 却无显著作用，仅可提高酶活力 3%。说明突变株 537 对培养基成份的要求较 B₁ 大为降低了。

7. 537 菌株的传代稳定性：见表 2。

表 2 537 菌株传代稳定性

传代次数	第二代	第三代	第四代	第五代
酶活力 (单位/毫升)	5350	5190	5270	5190

(二) 537 菌株的形态特征

537 菌株经物理、化学因素连续多次处理后，形态与 B₁ 有所区别：537 在察氏培养基平板上生长缓慢，呈局限性菌落，30℃ 培养 7 天菌落直径为 2.5 厘米，菌落背面呈浅黄色，有放射状沟纹。分生孢子梗长为 600—1000 微米，梗光滑。分生孢子头幼时球形，渐变为放射状，直径 50—170 微米，顶囊球形，小梗双层，小梗长 9—13 微米，宽 3—5 微米，分生孢子呈球形，光滑，浅棕色，直径 3—5 微米，同化亚硝酸盐。537 菌株与 B₁ 菌株形态上的区别主要是 537 菌株的菌落小，分生孢子梗较短，孢子头较小。537 菌株与 B₁ 菌株形态比较见表 3，图 2，图 3。

表 3 537 菌株与 B₁ 菌株菌落形态比较

菌号	形态 菌落直径(厘米) (察氏平板长 7 天)	分生孢子梗 长度(微米)	分生孢子头 直径(微米)
B ₁	5.0	2100—2800	100—250
537	2.5	600—1000	50—170

(三) 537 菌种的发酵条件

以简化培养基作为基本培养基，改变其中某一成分选择最佳发酵条件。

1. 碳源：采用四组配方，对玉米粉、米糠、麸皮进行选择试验，结果见表 4：

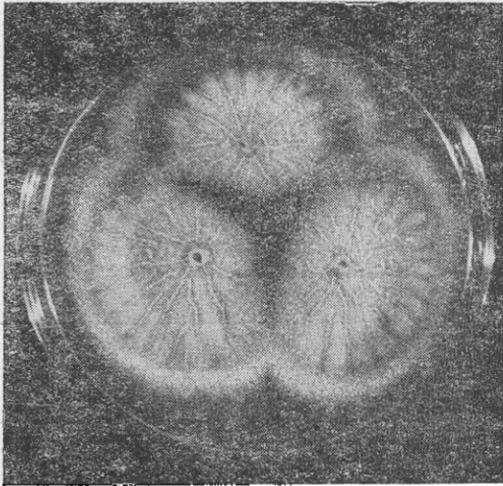


图 2 B₁ 菌株菌落形态

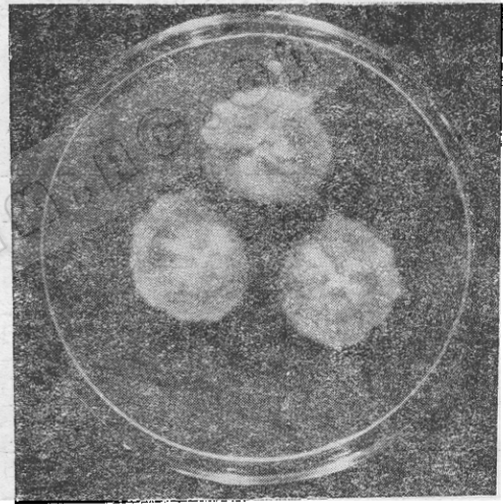


图 3 537 菌株菌落形态

表 4 不同碳源的培养基比较

配 比 % 成 分	组 号			
	1	2	3	4
米 糠	1	0	0	0
麸 皮	0	2	1	0
玉米粉	0	0	0	1
NH ₄ Cl	1.0	1.0	1.0	1.0
CaCl ₂	0.5	0.5	0.5	0.5
Na ₂ HPO ₄	0.4	0.4	0.4	0.4
豆饼粉	5.0	4.0	5.0	5.0
酶活力(单位/毫升)	4800	4500	4400	5150

表 4 结果说明第 4 组配方最佳，即用玉米粉为碳源最适宜。

2. 氮源和碳源的比例: 将黄豆饼粉和玉米粉按 3:3、4:2、5:1 三种比例混合(固形物浓度为 6%, 无机盐同前)进行碳氮比对产酶影响的试验, 结果说明 5:1 的配比最佳, 见表 5。

表 5 碳氮比对产酶的影响

豆饼粉: 玉米粉	3:3	4:2	5:1
酶活力(单位/毫升)	4190	5070	5300

3. 无机氮^[6]: 用 9 组无机氮化合物进行产酶试验, 含氮量按 0.26% 计, 其它成分不变, 结果见表 6, 由表 6 可以看出 NH_4Cl 最适宜, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 次之, 其它效果不好, 有的还有抑制作用。

表 6 无机氮源对产酶的影响

无机氮源	酶活力(单位/毫升)
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	3680
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3360
NH_4NO_3	2960
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	4050
NH_4Cl	5120
KNO_3	4000
NaNO_3	3920
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4500
NH_4HCO_3	2240
对照(不加盐)	4080

4. 钙盐: 用浓度为 0.5% 的 CaCl_2 及 CaCO_3 进行产酶试验, 结果表明 CaCl_2 对产酶有显著促进作用。

5. 磷酸盐: 在培养基中分别添加焦磷酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾, 按含纯磷量 0.046% 计。结果表明磷酸氢二钠和焦磷酸钠可稍提高产酶水平, 磷酸二氢钾效果不明显。

6. 表面活性剂: 对平平加、吐温 80、209、雷米邦等 8 种表面活性剂进行试验,

均未见对 537 菌种产酸性蛋白酶有促进作用。

7. 537 发酵培养基成分配比的正交试验: 根据以上培养基成分的单因素选择试验, 确定了 537 发酵培养基成分为黄豆饼粉、玉米粉、 NH_4Cl 、 CaCl_2 、 Na_2HPO_4 或 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 各成分之间的配比通过设计正交试验来确定, 选 L_9 表(3')。

试验结果表明, 黄豆饼粉以 5% 为宜, 玉米粉在 0.6—1.0% 之间, NH_4Cl 在 0.5—1.0% 之间。 CaCl_2 的用量控制在 0.5%, 过多则无益。

8. 种子培养基: 537 菌在二级摇瓶发酵试验中, 种子培养基成分配比与发酵培养基大致相同, 仅变动黄豆饼粉与玉米粉的比例, 采用 4:2 的配比。也可直接采用发酵培养基, 结果无明显差别。

9. 种龄: 种龄在 19—30 小时内对产酶水平无明显的影响(见表 7)。

表 7 种龄对产酶的影响

种龄(小时)	19	24	30
酶活力(单位/毫升)	5000	5200	5110

10. 接种量: 接种量对产酶的影响试验, 结果(表 8)表明, 5% 接种量最适宜, 接种量过多或过少都对产酶不利。

表 8 接种量对产酶的影响

接种量%	2.5	5.0	10.0	15.0
酶活力(单位/毫升)	4870	5100	4190	3700

11. 发酵培养基的初始 pH: 当发酵培养基的初始 pH 在 4.5—6.0 范围时, 产酶水平差别不大, pH 低于 4.5 或高于 6.0 时则有较明显的下降(见表 9)。由于 537 菌株发酵培养基的自然 pH 为 5.2 左右, 故不需调节 pH。

12. 摇瓶发酵通气量: 在 250 毫升摇瓶中装 20、30、40、50、60 毫升体积的培

表 9 培养基最初 pH 对产酶的影响

最初 pH	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
酶活力 (单位/毫升)	4070	4900	4870	4990	4830

培养基, 进行产酶试验, 结果说明装液 40 毫升为好, 装液量过多或过少都对产酶不利。

为了进一步试验通气量变动对产酶的影响, 于发酵 20 小时后改变摇瓶装液量, 结果 (表 10) 证明前期通气量适中, 而后期通气量加大, 对产酶有促进作用。但这种变化幅度不宜过大。

表 10 通气量变动对产酶的影响

前期装液量(毫升)	20	40	40	60
后期装液量(毫升)	40	60	20	20
酶活力 (单位/毫升)	4230	3590	5300	4030

13. 培养温度: $31 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

14. 发酵时间: 72—80 小时。

讨 论

本试验采用多因素连续诱变处理的方法选育菌种, 可使每一阶段所获得的高产酶性状在下一阶段处理中加以巩固和提高, 获得较理想的菌种。在连续诱变处理过程中应注意多种诱变因素交替使用, 避

免某一种诱变因素的多次重复。其次采用萌动活化孢子提高菌种对诱变剂的敏感性, 也能得到较理想的效果。

菌种选育工作需尽量采用简单易行的初筛方法, 本试验采用酪蛋白-琼脂平板水解透明圈测定法粗测摇瓶发酵液酶活力, 可节省时间, 提高工作效率。

诱变处理过程中菌种会出现多种性状变异, 对培养条件的要求也可能有所差异, 故应采用便于工业生产的较简化的培养基来筛选突变株。

537 菌种连续传代五次, 高产酶性状不变, 菌种保藏半年后传代使用, 产酶水平保持恒定。经中国科学院微生物研究所编号保藏, 菌号为 AS 3.4310。

参 考 文 献

- [1] 上海市工业微生物研究所, 上海酒精厂: 微生物学报 16(2): 156—165 1976。
- [2] 松岛钦一, 嶋山协: 日本农芸化学会志, 41(2): 671—674, 1976。
- [3] Зуева, Р. В. И С. А. Коновалов: Микробиология, 40(1): 83—87 1971。
- [4] Григорян, П. Т., С. А. Коновалов и Др.: Микробиология, 40(6): 1088—1093, 1971。
- [5] 中国科学院微生物研究所, 微生物诱变育种编写组: 《微生物诱变育种》, 科学出版社, 23—61, 1973。
- [6] Ichishima, E.F. Yoshida: Agr. Biol. chem., 26(9): 547—562, 1962。

更 正

1979 年第 19 卷第 2 期目录倒数第二行及 225 页题目中应为“焦曲霉”。

STUDIES ON THE ACID PROTEASE OF *ASPERGILLUS USAMII*

I. SELECTION OF THE ACID PROTEASE-PRODUCING STRAIN 537 AND ITS FERMENTATION CONDITIONS

Zhou Qin-cheng Guan Gui-lan Ding Zhi

Chen Ju-ying Dong Wen-cai

(Xinjiang Institute of Biology, Pedology and Isammology,
Academia Sinica, Ürümqi)

Sun Shi-zhang Qiu Xiu-bao

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A mutant strain 537 capable of producing 3.5 times as much acid protease as its parent strain white mutant B₁ of *Aspergillus usamii* was obtained by successive and alternative treatment with ultraviolet, EI, ⁶⁰Co, and EMS. Its acid protease activity was 5000 units/ml (Folin test) in shake flasks.

The experiments showed that it was efficient to produce mutant from *Aspergillus usamii* with multiple mutagens and that the activated spores were more sen-

sitive to mutagens.

We had adopted simple medium for screening in order to obtain the mutant strain with less nutrient requirements. The mutant strain 537 could utilize soy-bean cake meal instead of its hydrolysate.

Both CaCl₂ and phosphates enhanced protease production. The high capacity of the mutant strain 537 for producing acid protease remains stable after many generations of subculturing or long period of storage.