

微波诱变结合化学诱变选育酸性蛋白酶高产菌*

李永泉 翁醒华 贺筱蓉

(浙江大学生命科学学院 杭州 310012)

关键词 微波诱变, 化学诱变, 宇佐美曲霉, 酸性蛋白酶

分类号 Q933 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)02-0181-84

酸性蛋白酶是酶制剂工业比较重要的酶种, 广泛应用于饲料、食品、皮革、医药和酿造工业中^[1~4], 具有较大的市场潜力。本研究以宇佐美曲霉 (*Aspergillus usamii*) 白色突变株 B₁ 为出发菌株, 通过微波诱变和亚硝基胍、硫酸锂复合诱变剂点试平板法诱变, 选育到一株产酸性蛋白酶的高产菌—栗色变种 (*Aspergillus usamii* var. *maroon*) L336, 遗传性状非常稳定。微波在生物学上主要用于杀菌、刺激植物生长^[5~6], 微波用于工业微生物遗传育种, 国内至今未见文献报道。本研究表明, 微波诱变正变频率高、效果好、操作简便, 所选育菌株遗传性状稳定。

1 材料和方法

1.1 出发菌株

宇佐美曲霉白色突变株 B₁ (*Aspergillus usamii* AS3.2919), 本研究室保藏。

1.2 培养基

1.2.1 基本培养基: (NH₄)₂SO₄ 0.1g, K₂HPO₄ 0.7g, KH₂PO₄ 0.3g, 柠檬酸钠 0.005g, MgSO₄·7H₂O 0.001g, 葡萄糖 0.5g, 琼脂 2.0g, 用水定容到 100mL。

1.2.2 斜面孢子培养基: 5 Brix 麦芽汁 100mL (配制前用 10% NaOH 调 pH 至 5.4), 琼脂 2.0g, 31℃ 培养 90h。

1.2.3 平板分离培养基: 5 Brix 麦芽汁 100mL, 干酪素 0.4g, 胆酸钠 0.2g, 琼脂 2.0g, pH5.4。

1.2.4 简化发酵培养基: 黄豆粉 5.0g, 玉米粉 1.0g, Na₂HPO₄ 0.4g, CaCl₂ 0.5g, NH₄Cl 1.0g, 用水定容到 100mL。自然 pH, 500mL 三角瓶装液 50mL, 孢子接种, 31℃ 220r/min 培养 88h。

1.2.5 发酵培养基: 玉米粉 1.0g, 黄豆粉 5.0g, 鱼粉 0.6g, 蚕蛹水解液 10.0g, CaCl₂ 0.5g, Na₂HPO₄ 0.2g, NH₄Cl 1.0g, 用水定容到 100mL, pH 5.4。500mL 三角瓶装量 50mL, 孢子接种, 31℃ 220r/min 振荡培养 88h。

1.3 实验方法

1.3.1 孢子悬浮液制备: 取 31℃ 培养 4d 的试管斜面菌种加生理盐水, 刮下孢子, 置于盛有玻璃珠的三角瓶中, 31℃ 充分振荡 5h, 使孢子分散和活化, 诱变处理时将孢子浓度稀释至 10⁶/mL。

1.3.2 诱变筛选: 本实验选用最大功率 700w、脉冲频率 2450MHZ 的微波炉, 按不同的辐照时间, 对孢子悬浮液进行辐照处理。微波诱变选育到较高产量的菌株, 再用亚硝基胍、硫酸锂复合诱变剂点试平板法进行处理。点试平板内的硫酸锂浓度为 0.1%, 将亚硝基胍少许粉末置于平板中央, 使亚硝基胍逐步扩散、浓度自中央向外逐步稀释形成梯度, 此法可在不同致死率下产生不同程度变异菌种。诱变后在平板分离培养基上利用透明圈大小进行初筛, 然后摇瓶发酵复筛。

* 浙江省教育委员会资助课题

收稿日期: 1997-11-03, 修回日期: 1998-10-31

1.3.3 缺陷型鉴定:采用生长谱法^[7]。

1.3.4 酸性蛋白酶活力测定:采用 Folin 法^[8]测定,定义每分钟水解酪素蛋白产生 1 μ g 酪氨酸为一个酶活力单位,以每毫升所含酶活力单位(即 u/mL)表示发酵单位。

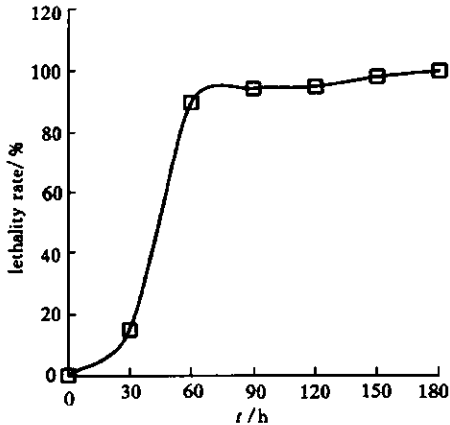


图1 微波辐照宇佐美曲霉孢子致死率

Fig.1 lethality rate of spores of *A. usamii* by microwave irradiation

其中两株变成了栗色,5株呈肉色,某些低产菌株出现了浅黄色,其变化机理有待进一步探究。

从以上正变的菌株中选出五株突变株:W₁₆ 3046u/mL, W₂₅ 2769u/mL, W₂₇ 2918u/mL, W₃₃ 3380u/mL, W₄₀ 3416u/mL。经三次传代 W₄₇ 和 W₄₀ 出现了较大的回复突变,只好弃置。W₁₆ 和 W₂₅ 冷藏备用, W₃₃ 系栗色变种,作为下一步诱变的出发菌株。

2.3 亚硝基胍复合诱变剂点试平板法诱变效果

培养过程中,亚硝基胍逐步扩散,在平板上形成自中央向外的浓度梯度,出现了以平板中央为圆心的同心圆菌落圈,平板中央邻近区域菌落数为零,而平板边缘区域菌落数最多,可见菌落数与平板内亚硝基胍浓度浓度相关。从不同菌落圈上挑出单菌落,点种到新的分离平板上,根据透明圈选出 20 个菌种进行摇瓶复筛,结果正变频率在 30.0%,同时发现离平板中心 2~3cm 之间的同心环内正变频率较高,其中一株在简化培养基上培养,最高酶活力达 4230u/mL,提高了 25.1%;在发酵培养基上培养酶活力达 5500u/mL,将此菌株命名为 L336。

2.4 选育过程各阶段产酶水平

将选育过程中各阶段代表菌株,在简化培养基上进行摇瓶发酵,结果见表 2。

2.5 L336 菌株的特性

2.5.1 L336 菌株传代稳定性;经斜面培养基连续 5 次传代,酶活力稳定在 5400u/mL 左右,参照

2 结果

2.1 微波辐照诱变

根据平板分离培养基产生透明圈与菌落直径之比值,初筛出 20 个菌株。通过简化培养基摇瓶复筛,选取酶活力为 2130u/mL 的 15 号 B₁ 突变株作为出发菌株。然后选用频率 2450MHZ 的微波对出发菌株单孢子悬浮液进行辐照诱变,辐照时间为 15s、30s、60s、120s、180s。辐照处理后,孢子致死率和辐照时间关系见图 1。120s 致死率达 95%,180s 孢子死亡率接近 100%。

2.2 微波诱变效果

微波诱变后,在平板分离培养基上初筛出 80 个菌株,经简化培养基反复摇瓶复筛,结果见表 1。

诱变结果可知,120s 辐照处理,正变频率最高,酶活提高率最大达 47%。诱变过程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;同时还发现诱变后某些单菌落孢子颜色发生变化,其

表 1 微波对宇佐美曲霉的诱变效果

辐照处理 t/s	时间致死率 /%	正变率 /%	最高酶活 /(u/mL)	最大提高率 /%
120	94.7	33.3	3380	58.7
60	89.4	26.7	3046	43.0
30	15.0	10.0	2515	18.1
15	8.9	4.8	2395	12.4

表 2 选育过程中菌种产酶水平比较

菌种	选育方法	酶活力/(u/mL)	酶活提高率/%
B ₁		1895	
B ₁ No. 15	自然分离	2130	11.0
W ₃₃	微波辐照	3380	58.7
L 336	复合诱变	4230	25.1

方善康建立的霉菌麸曲保存法^[9]保存 2 个月,经摇瓶发酵,酶活力变化不大。

2.5.2 缺陷型鉴定:L336 菌株涂布在基本培养基平板上基本不生长,仅出现几个非常小的局限性菌落,涂布在添加了 750 $\mu\text{mol/L}$ 腺嘌呤的基本培养基上却能生长,因此 L336 菌株是腺嘌呤缺陷型,这可能是突变株丧失或部分丧失了 IMP 脱氢酶,从而切断了 IMP \rightarrow XMP \rightarrow GMP 的代谢支路^[10]。在基本培养基中不添加、添加 1000 $\mu\text{mol/L}$ AICAR、750 $\mu\text{mol/L}$ 腺嘌呤、1000 $\mu\text{mol/L}$ AICAR 的酸水解液^[11]分别进行摇瓶培养 40h,结果空白组和 AICAR 组不长菌,而腺嘌呤组菌丝浓度增加 12mg/mL、AICAR 水解液组菌丝浓度增加了 23mg/mL,进一步证实了这一点。

2.5.3 L336 菌株在察氏平板上的形态:呈局限性菌落、圆形、边缘光滑、表面初时略向中心凹,菌落背面呈浅黄色,分生孢子呈球形、光滑,孢子颜色为栗色。与出发菌株 B₁ 相比,主要区别是 L336 菌株菌落小,分生孢子梗较短,孢子较少,孢子栗色。

3 讨论

实验结果表明,诱变效果远比传统的理化因子好,而且设备简单、操作简便、安全可靠。

化学诱变剂剂量和正变率相关性不强,因此很难选择一个较合适的剂量以达到高效诱变的目的。点试平板法中,一个平板内存在连续变化的梯度剂量,很好地解决了这个问题,因此诱变效果较单一剂量强,筛选速度快。

微波诱变机理可能缘于以下几个方面:(1)微波是一种电磁波,能引起水、蛋白质、核苷酸、脂肪和碳水化合物等极性分子转动,尤其是水分子在 2450MHZ 微波作用下,能在 1s 内 180° 来回转动 24.5×10^8 次,从而引起分子间强烈的摩擦,使得胞内 DNA 分子氢键和碱基堆叠化学力受损,最终引起 DNA 分子结构发生变化,导致遗传变异。(2)微波具有极强的穿透效应,因此能同时使细胞壁内外的水分子产生剧烈转动,从而引起细胞壁通透性发生变化,更易使胞内酶分泌出来。(3)微波引起的分子强烈的热运动所产生瞬时强烈热效应,容易引起酶失活,从而引起生理生化变异。(4)微波对微生物的诱变效应,除了热效应外,还存在非热效应^[12]。这是由于诱变过程中,微生物体的动态代谢受微波“干扰”而平衡过程紊乱,从而使代谢路径发生改变。这种非热效应萌动孢子可能比休眠孢子更明显,可由进一步的实验加以证明。

参 考 文 献

- [1] Arai S. *Agr Biol Chem*, 1970, 34(9):1338.
- [2] 日本特许公报,昭 43-4436.
- [3] 赵 华,赵树欣,张 维等.食品与发酵工业,1996,23(2):26~28.
- [4] 李永泉,赵小立,贺筱蓉等.饲料研究,1993,11:10~11.
- [5] 梁海曼,周菊华.广西植物,1992,12(1):64~75.
- [6] Moor G M, Hall R G, James E L. *Combined Proceedings International Plant Propagators Society*, 1982, 32:45~55.
- [7] 白毓谦,方善康,高 东等.微生物实验技术.济南:山东大学出版社,1987.407.
- [8] 松岛钦一,鸠山协.日本农芸化学会志,1976,41(2):761~674.
- [9] 方善康.微生物学通报,1993,20(6):344~347.
- [10] Okazaki M, Terui G, Konno N. *J Ferment Technol*, 1963, 41:266~270.
- [11] Greenberg G R. *J Biol Chem*, 1956, 219:423~428.
- [12] 黄卡玛,刘永清,唐敬贤等.微波学报,1996,12(2):126~132.

STUDIES ON THE SCREENING HIGH YIELD ACID PROTEASE PRODUCING STRAIN L336 BY COMBINING MICROWAVE IRRADIATION WITH CHEMICAL INDUCING

Li Yongquan Weng Xinghua He Xiaorong

(College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012)

Abstract A high yield acid protease producing strain *Aspergillus usamii* L336 was screened from its parent strain B₁ by combining microwave irradiation with inducing of nitrosoguanidine and Li₂SO₄. By incubation of L336 in shaking flask at 31°C for 88 h, its enzyme activity was 5500u/mL, and its properties for high yield producing acid protease remained stable after many times of subculture and storage for two months.

Key words Microwave irradiation, Chemical inducing, *Aspergillus usamii* L336, Acid protease