

蛋白酶产生菌种间融合子的细胞及其原生质体的诱发突变

诸葛健 甘为民 方慧英

(无锡轻工业学院, 无锡)

以酶产量较生产用菌株高15—20%的种间融合子F-126-2为诱变出发株,对细胞和原生质体二种状态进行了紫外线诱变。试验中发现融合子细胞诱变时的死亡率和正突变率在相同条件下较原生质体为高,产酶正突变幅度以原生质体为高。从原生质体诱变处理筛选出一株产酶较出发株高20—30%的FPU-8-18株。

材料和方法

(一) 菌种和培养基

1. 菌株: 种间融合子 F-126-2^[1]。
2. 培养基: 完全培养基组成同前报^[1]。摇瓶培养基组成(%): 玉米粉2.5; 山芋粉2.5; 豆饼粉3.0; 麸皮2.0; Na₂HPO₄ 0.4; KH₂PO₄ 0.03; pH 7.0—7.2, 1 kg/cm²灭菌40min。

(二) 原生质体的制备

制备方法、稀释缓冲液及试剂同前报^[1]。

(三) 中性蛋白酶分析方法

参见轻工业部统一分析方法。

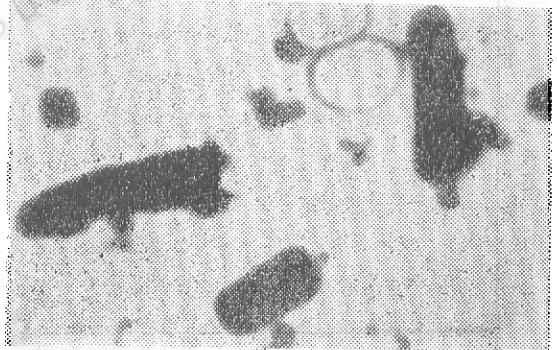
(四) 诱变处理

细胞诱变按常法进行。原生质体诱变系将原生质体 4000rpm离心洗涤二次,加 0.55M NaCl 液恢复原体积,经玻璃珠振动 5 min 即得原生质体液,按常法诱变。

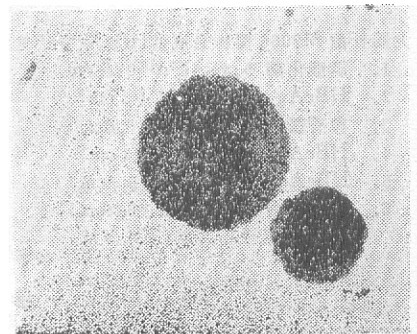
结果和讨论

(一) 融合子细胞和原生质体对紫外线的敏感性

融合子细胞和原生质体的照片见图 1。对它们经15W杀菌灯、32cm 距离照射不同时间的结果如图 2。



细胞 (×10000)



原生质体 (×15000)

图1 融合子细胞及其原生质体

本文于1985年2月4日收到,

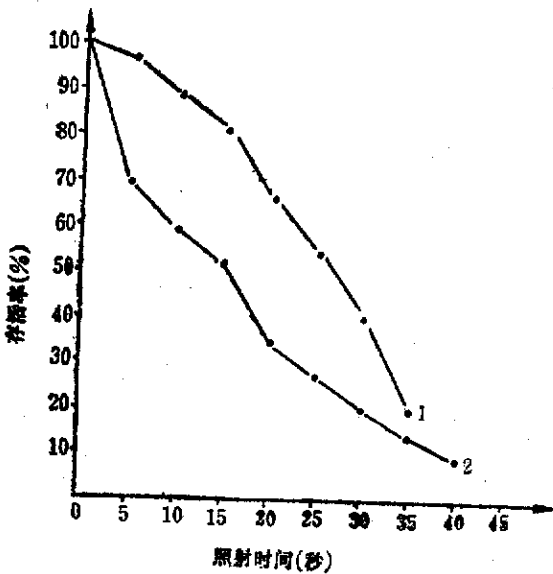


图 2 F-126-2 细胞和原生质体紫外线诱变的存活率比较
1. 细胞; 2. 原生质体

原生质体仅12%。但提高产酶幅度30%以上的高产株是原生质体的突变株。产酶较出发株低10%以上的负变株，细胞诱变的为25%，而原生质体为28.7%。这些数据出现是否与原生质体照射时局部剂量过高有关，还可进一步探讨。

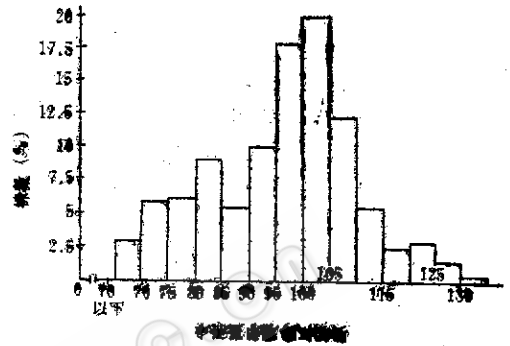


图 4 原生质体诱变后变株相对产酶量分布情况

从存活率观察，原生质体远较细胞为高，其原因主要可能是，细胞脱壁后，原生质体中部分原生质外泄，使成胶粘状，没有细胞悬浮液分散度高，照射处理就不均匀，外层原生质体所受剂量过大。另外照射处理介质系高渗溶液，高浓度盐类和外泄的原生质对原生质体起了保护作用。

(二) 融合子细胞和原生质体诱变后产量性状突变的分析

以死亡率为80%左右的剂量处理后，涂布培养，尔后挑取菌落进行筛选测试。图3、4的结果表明，细胞诱变后相对酶活较出发株高10%以上的正变率为27%；

(三) 变株FPU-8-18 产酶稳定性的测定

该变株发酵40多小时，菌体仍细长整齐，较少自溶，不产芽孢，相对产酶量较出发株高37%。经过连续传代7次，并相应连续摇瓶发酵，结果酶活水平稳定(表1)。将移接的第六代进行分离，随机挑

表 1 传代稳定性试验

| 传代次数 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|------|---|-----|-----|-----|----|-----|-----|
| 相对酶活 | / | 100 | 102 | 101 | 98 | 101 | 101 |

选10个菌落进行摇瓶发酵，发现其产酶水平较一致(表2)，说明此变株稳定性较好，可能是高剂量处理时突变株较纯^[2]。

表 2 菌株纯度鉴定

| 菌落号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|------|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 相对酶活 | 100 | 99 | 103 | 105 | 102 | 100 | 109 | 105 | 106 | 102 |

参 考 文 献

- (1) 诸葛健等：微生物学报，24(1):74-79, 1984.
- (2) 盛祖嘉等：微生物学通报，4:34, 1974.

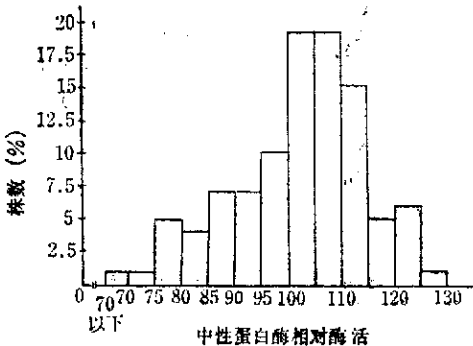


图 3 细胞诱变后变株相对产酶量分布情况