

复合诱变原生质体选育耐热碱性蛋白酶高产菌*

冯清平 薛林贵

(兰州大学生物系 兰州 730000)

摘 要 以地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) 53 号为原始菌株, 在原生质体形成和再生的最佳条件下制备原生质体, 对原生质体进行复合诱变, 对大量再生突变株进行筛选, 最终获得了高产、稳定、耐热的碱性蛋白酶产生菌 53-G38-6, 产酶活力由 1104U/ml 提高到 22080U/ml。适宜的发酵条件: 培养基(%) 胰蛋白胨 1, 酵母膏 0.5, 玉米粉 5, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.4, KH_2PO_4 0.03, Na_2CO_3 0.1, 自然 pH。42℃ 旋转培养 44~48h, 得到的蛋白酶热稳定性强, 60℃ 处理 1h 剩余酶活 55%。酶反应最适条件: 62℃, pH10.0, 在 pH9~10.5 范围内稳定。

关键词 地衣状芽孢杆菌, 原生质体, 诱变, 碱性, 蛋白酶

碱性蛋白酶广泛存在于微生物中, 该酶是加酶洗涤剂的主要添加剂之一, 在制革、丝绸工业也有广泛的用途^[1]。目前, 酶制剂厂及洗涤剂工业迫切需求一种耐高温而且热稳定性很强的碱性蛋白酶, 因此该酶制剂也是当前国内外研究的热点。一般认为地衣芽孢杆菌和短小芽孢杆菌所产生的碱性蛋白酶, 组成洗涤剂时去污效果好^[2]。我们用地衣芽孢杆菌作为原始菌株, 经理化因素对其原生质体直接进行诱变处理, 得到一株热稳定性很强的碱性蛋白酶高产菌株。

1 材料和方法

1.1 菌种

地衣状芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) 由本实验室筛选^[3]。

1.2 培养基

完全培养基(CM)(%): 葡萄糖 0.5, 蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.5, NaCl 0.25, pH9.5(固体培养基加 0.2% 琼脂)。

再生培养基(DM₃): 参照文献[4]进行。

斜面培养基 I (%): 牛肉膏 1, 蛋白胨 1, 葡萄糖 0.5, NaCl 0.5, 琼脂 2, pH9.5。

斜面培养基 II: 同培养基 I, 不加葡萄糖。

摇瓶发酵培养基 I (%): 豆饼粉 2, 麸皮 3, 玉米粉 4, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.4, KH_2PO_4 0.03, CaCl_2 0.1, $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.1, pH10.0。

* 甘肃省自然科学基金资助项目。

本文于 1995 年 12 月 15 日收到。

摇瓶发酵培养基Ⅱ(%)：胰蛋白胨 1, 酵母膏 0.5, 玉米粉 5, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.4, KH_2PO_4 0.03, Na_2CO_3 0.1, 自然 pH。

芽孢培养基(%)：酵母膏 0.07, 蛋白胨 0.1, 葡萄糖 0.1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.02, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, K_2HPO_4 0.1, 琼脂 2, pH9.5。

酪素琼脂培养基(%)：酪素 0.4, CaCl_2 0.0002, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.107, KH_2PO_4 0.036, ZnCl_2 0.0014, NaCl 0.016, FeSO_4 0.0002, 酪素水解液 0.005, 琼脂 1.8, pH9.5。

双基质平板培养基(%)：酪蛋白 1, 白明胶 1, 琼脂糖 1.5, pH10.0。

1.3 试剂

高渗溶液(DF)：参照文献[4]进行配制。

1%磷酸缓冲液(pH7.5)：青霉素(齐鲁制药厂产品, 用磷酸缓冲液配制), 溶菌酶(Sigma 产品, 用 DF 液配制), 酪蛋白(进口分装), 酪素水解液(进口分装), 硼砂-NaOH 缓冲液(pH 10.0)。

1.4 方法

1.4.1 原生质体的制备及再生：见参考文献[6]。

1.4.2 计数观察方法：原菌和原生质体的计数用血球计数板在显微镜下以及在平板上用活菌计数法进行。用相差显微镜 Olympus 对原生质体形成和再生进行观察。用负染色制片, 在 Philips EM400T 型电镜下进行观察。

1.4.3 原生质体的诱变处理：如前 1 制得的 53 号菌原生质体液用 DM_3 稀释成 10^8 个/ml 细胞, 然后分别用 UV 和 UV+ NaN_3 多次诱变原生质体, 涂布于再生皿, 30°C 培养长出菌落, 转接于酪素平板, 进行初筛。

$$\text{原生质体死亡率} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

$$\text{菌体死亡率} = \frac{C-D}{C} \times 100\%$$

A 为再生培养皿上菌落数; B 为诱变处理后再生培养皿上菌落数; C 为完全培养皿上菌落数; D 为诱变处理后完全培养皿上菌落数。

1.4.4 发酵：250ml 三角瓶装 25ml 发酵培养基。 42°C 旋转培养 44h, 4000r/min 离心 10min, 测定发酵液碱性蛋白酶活力。

1.4.5 初筛菌种蛋白酶活力的测定：将处理后的再生菌株转接到酪素平板上, 40°C 培养 36h, 根据透明圈与菌落直径比值的大小确定蛋白酶活力。再将比值大的菌株的发酵液 20 μl 注入双基质平板的小孔中, 40°C 培养 20h, 根据水解透明圈的大小确定蛋白酶活力。

1.4.6 复筛菌蛋白酶活力的测定：按轻工业部部颁标准方法测定, 1ml 酶液在 40°C , pH10.0 条件下, 每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸的酶量为一个酶活力单位(U)。

2 结果和讨论

2.1 原生质体及菌体的紫外诱变处理

2.1.1 53 号菌体及其原生质体对紫外线的敏感性：按方法 1 将 53 号菌原生质体化, 用

DM₃ 液稀释成 10^{-5} , 取 5ml 原生质体液加入平皿中, 用 15W 紫外灯 253.7nm 常规处理 1、2、3、4min, 然后避光培养 25min。各取 0.1ml 涂再生平皿, 30℃ 培养 48h, 如前所得的菌液, 在加溶菌酶前分别用生理盐水和 DM₃ 液稀释成 10^{-5} , 在紫外灯下照射 30~65s, 避光培养 25min, 然后取 0.1ml 涂完全平皿, 30℃ 培养, 结果见表 1。

表 1 菌体在生理盐水和高渗液中的死亡率(%)

Table 1 Cell death frequency in physiological saline and hypertonic solution

		紫外线照射时间 Tune of UV irradiation (s)						
		30	40	50	60	120	180	240
生理盐水		84.5	98.6	99.2	99.5			
Physiological saline								
高 渗 液	菌 体	69.7	86.9	90.5	93.2			
Hypertonic solution	Cell							
	原生质体	11.8			20.9	50.0	70.1	78.9
	Protoplasts							

表 1 结果表明, 在菌体浓度、生理状态相对一致的情况下, 由于所用稀释液不同, 菌体死亡率也不同, 说明高渗溶液对细胞有一定的保护作用。试验结果还证明原生质体对紫外线的敏感性较差, 当照射 60s 时原生质体死亡率为 20.9%, 而菌体死亡率为 93.2%。在电镜及显微观察中发现, 原生质体易聚集成团, 堆积成串或堆, 使紫外线照射不均匀, 这可能是原生质体对紫外线耐受力强的原因之一, 至于其他原因, 如紫外线对其表面结构状态的作用机制等, 有待于进一步研究。

2.1.2 不同剂量的紫外线照射对原生质体诱变的影响: 将原生质体用紫外线分别照射 1、2、3、4min, 然后涂再生平皿, 按不同剂量各挑取 100 株转发酵培养基 II 中, 42℃ 培养 44h, 测其酶活力, 用原始菌株作对照。试验结果表明, 以照射 3min 剂量的效果最佳, 原生质体正变率为 32%, 2min 剂量次之, 为 28.6%, 1min 剂量最差, 只有 22%。400 株再生株经初筛后得到 12 株酶活力较高的菌株, 将其进行摇瓶发酵测定。酶活力在 2000U/ml 以上的有 4 株, 其中 53-C132 菌株酶活力虽低于另外 3 株菌, 但耐热性较好, 故用此菌株作为下一步诱变的原始菌株。

2.2 53-C132 菌原生质体 NaN₃-紫外线的复合诱变

将 53-C132 菌株原生质体化, 并调整浓度为 10^8 个/ml 细胞, 先用不同浓度的 NaN₃ 37℃ 处理 2h, 然后用紫外照射 1min, 涂再生平板。结果表明, 复合处理致死率为 70% 左右时正变率最高。重复多次上述诱变方法, 最后得到一株酶活力达 10856U/ml 的突变株 53-G38。试验结果表明, 当 NaN₃ 浓度为 1mmol/L 处理 2h, 紫外线照射 1min 效果最佳(表 2)。

2.3 53-G38 菌株的孢子热处理及高糖溶液培养

将 53-G38 菌株的孢子悬液用 80℃ 和 5% 葡萄糖肉汤培养的方法, 交替处理重复两个循环, 然后进行筛选得到 53-G38-6 菌株, 酶活力为 16530U/ml。

表 2 UV- NaN_3 处理后的原生质体死亡率和正变率Table 2 Death frequency and positive mutative rate of Protoplasts after UV- NaN_3 treatment

NaN_3 $c / \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	死亡率 Death frequency (%)	正变率 positive mutative (%)
0.5	46.7	24.1
0.75	50.5	32.8
1.0	70.9	35.4
1.25	82	28.6
1.50	94.4	25.4

注: 紫外线照射时间为 1min.

Time of UV irradiation 1min.

试验证明, 用加热和含糖溶液生长的交替方法, 可以提高菌株的耐热性和产酶能力。

2.4 53-G38-6 菌株的诱变过程

53 号原始菌株 80°C 处理 10min, 单菌分离, 原生质体化后用紫外线照射, 筛选, 得到 53-C132 菌株, 重复以上过程 3 次, 将筛选出的优良菌株原生质体化再用 UV- NaN_3 复合诱变, 单菌分离, 重复此法多次筛选出 53-G38, 然后进行热处理和高糖溶液交替培养选育出 53-G38-6 菌株。

2.5 碳源和氮源试验

2.5.1 碳源试验: 在发酵培养基中加 5% 的不同碳源, 42°C 发酵 44h. 从表 3 可见, 以葡

表 3 碳源对产酶的影响

Table 3 Effect of various carbonydrate on protease production

碳 源 Carbohydrate	初始 pH Initial pH	终了 pH Final pH	蛋白酶活力 Protease activity / $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$
葡萄糖 Glucose	7.0	7.2	13560
蔗 糖 Sucrose	7.1	7.4	4540
玉米粉 Maize flour	7.2	7.5	8456
果 糖 Fructose	7.0	6.9	9864
麦芽糖 Maltose	7.3	7.0	6888
可溶性淀粉 Soluble starch	7.5	7.7	5014
糊 精 Dextrin	7.0	7.4	7152

葡萄糖作碳源产酶量可达 13560U / ml。以 4%~6%(W / V)的葡萄糖作碳源,产酶水平相差不大,若以 8%以上的葡萄糖作碳源,酶活力下降 15%~20%。说明该菌株只在有限量的葡萄糖培养基中才能产生较高的蛋白酶活力,这正是地衣芽孢杆菌特性之一^[7]。当葡萄糖浓度增高时,酶活力下降可能是分解物阻遏现象的反应^[5,8]。

2.5.2 氮源试验: 发酵培养基中分别加入相同浓度的不同氮源,试验结果表明以胰蛋白胨结合酵母膏为氮源产酶量最高,可达 13820U / ml,其次是胰蛋白胨(表 4)。

表 4 不同氮源对产酶的影响

Table 4 Effect of various nitrogen compounds on protease production

氮源	初始 pH	终了 pH	蛋白酶活力
Nitrogen source	Initial pH	Final pH	Protease activity / U · ml ⁻¹
豆饼水溶液	7.7	7.5	10520
Soy bean cake meal hydrolysate			
豆饼粉	7.2	7.4	8852
Soy bean cake meal			
酵母膏	6.8	7.4	11380
Yeast extract			
牛肉膏	7.0	7.3	10115
Beef extract			
胰蛋白胨	6.7	7.2	12750
Trptone			
胰蛋白胨(加酵母膏)	7.3	7.6	13820
Tryptone(+yeast extract)			

2.5.3 蛋白酶产生的时间与细胞生长的关系: 试验结果表明,在培养 44~48h,酶活力达到最高峰,以 48h 酶活力最高,达 22840U / ml。菌体在 24h 内生长迅速,当细胞增长处于稳定期 30~50h 时,正是产酶高峰时期。50h 后酶活力下降,细胞衰老自溶(图 1)。

2.5.4 初始 pH 和培养温度对 53-G38-6 菌株产酶的影响: 试验证明,初始 pH 为自然 pH 对产酶最有利,培养温度以 42~44℃ 培养 48h 酶活力可达 20258U / ml。

2.6 53-G38-6 菌株产酶的稳定性
每隔一个月转接一次斜面,将

6 个月的斜面同时活化进行发酵实验。结果表明,53-G38-6 菌株的遗传性比较稳定。1

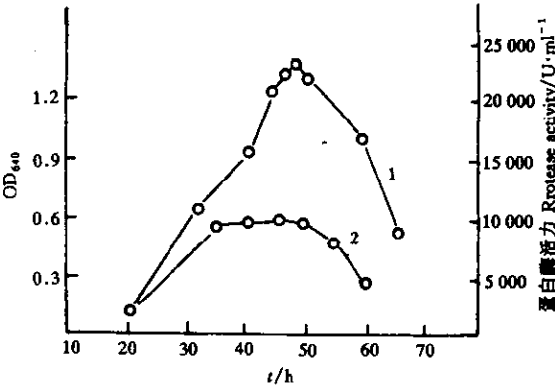


图 1 蛋白酶产生的时间及细胞生长过程

Fig.1 Time course of protease production and cell growth duration cultivation

1. 蛋白酶活力 Protease activity; 2. OD₆₄₀

个月时酶活力为 22080U/ml, 3 个月时酶活力为 22006U/ml, 6 个月时酶活力为 21986U/ml。

2.7 53-G38-6 菌株产酶耐热性试验

从图 2 看出, 在 62℃ 酶活力可达 24500U/ml, 高于 70℃ 酶活力显著下降。表 5 说明, 该酶的稀释液具有很强的耐热性, 当用 60℃ 和 65℃ 处理 60min, 酶活力仍能保留 55% 和 36%, 70℃ 处理 60min, 酶活力仍保留 11%, 说明该酶具有很强的热稳定性。若有底物保护时, 酶反应进行 100min 完全不失活。

表 5 无底物存在时酶的热稳定性

Table 5 Thermal stability of enzyme at the absence of substrate

$t/^\circ\text{C}$	保温时间 t/min	剩余酶活力 Residual activity(%)
60	60	55
65	60	36
70	11	39
70	60	11
80	11	0.8
对照	—	100
Control		

2.8 53-G38-6 菌株所产酶的耐碱性试验

将粗酶液及酪蛋白用不同 pH 的缓冲液配制, 40℃ 反应 10min 测定酶活力。结果 (图 3) 表明, 该酶的最适 pH 为 10.0, pH9~10.5 活力均较高, 当 pH 值超过 11 时, 酶活力急剧下降。将用不同 pH 缓冲液稀释的酶液, 在 62℃ 保温 2h 后, 测定酶活力。结果表明, pH7.5~10.5 剩余酶活力在 85%~90%, pH 值大于 11 时, 剩余酶活为 60%。

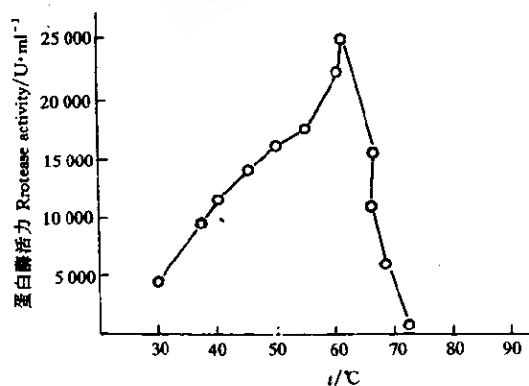


图 2 温度对蛋白酶活力的影响

Fig. 2 Effect of temperature on protease activity

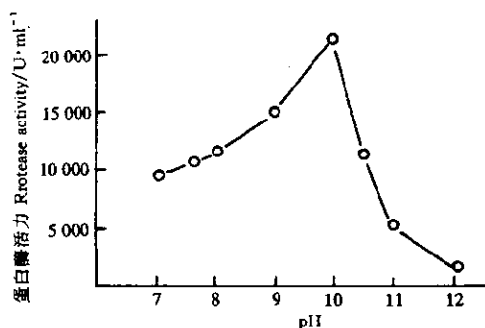


图 3 pH 对酶活力的影响

Fig. 3 Effect of pH on enzyme activity

参 考 文 献

- [1] Fogarty W M. *Process Biochemistry*, 1974, 9: 27~35.
- [2] 胡学智. 酶制剂工业(下). 北京: 科学出版社, 1984. 387~455.
- [3] 冯清平, 沈剑敏, 高 燕. 兰州大学学报, 1994, 30(4): 83~87.
- [4] 王 弘, 齐秀兰, 李福德. 生物工程学报, 1990, 6(1): 32~38.
- [5] Duball D A. *Molecular Biology of Bacilli*, 1982, 1: 331~363.
- [6] 冯清平, 薛林贵. 兰州大学学报, 1995, 31(3): 80~85.
- [7] Laishley E J. *J Bacteriol*, 1968, 96: 322~329.
- [8] Arndt L D. *Methodes in Enzymology*, 1971, 22: 86~95.

THE STUDY OF SELECTION FOR HIGH-YIELD THERMOSTABLE ALKALINE PROTEASE PRODUCING STRAIN AFTER COMPLEX MUTAGEMESIS OF PROTOPLASTS

Feng Qingping Xue Lingui

(Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Abstract Under the optimum condition of formation and regeneration, protoplasts of primitive strain *Bacillus licheniformis* 53-As were prepared. After many mutagenetic treatment of protoplasts of strain 53 and selection from a lot of mutants, a mutants 53-G38-6 producing high-output, stable and thermo-stable alkaline protease was obtained. The enzyme activity was increased to 22080 U/ml from 1104 U/ml. The medium for fermentation consisted of 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 5% sweet potato meal, 0.4% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.03% KH_2PO_4 , 0.1% Na_2CO_3 . The strain produced maximux alkaline protease activity after growth at 42℃ for 44~48 h on a rotary shaker. The alkaline protease produced by this strain was thermostable, it even retained 55% activity after incubation at 60℃ for 1 h. The optimum temperature and pH for the protease activity production are 61℃, pH 10.0 and stable at pH 9~10.5.

Key words *Bacillus licheniformis*, Protoplasts, Mutagenesis, Alkaline, Protease