

# 中性蛋白酶生产菌 AS 1.398 抗噬菌体菌株的选育和诱变

上海新型发酵厂菌种室

我厂生产 AS 1.398 中性蛋白酶,自 1969 年投产以来,曾多次发生噬菌体污染。1977 年 7、8 月份再度发生异常发酵:芽孢出现早,发展快,周期短,酶活低。但没有典型的溶菌现象,经反复检查,才证实有噬菌体的污染。当时本厂所保藏的其它菌株对该噬菌体全部敏感。经过筛选得到了抗噬菌体菌株 KC34,生产性能与原生产株基本一致。以后,又对该菌株进行了硫酸二乙酯、紫外线联合诱变,得到了变异株 Kpb 38,其摇瓶产酶比 KC34 提高 20% 以上。经大生产九个月,200 多批次检验,增产效果显著,与摇瓶情况完全相符。认为 Kpb 38 菌株属优良的蛋白酶产生菌。

## 一、抗噬菌体菌株的选育

### (一) 噬菌体的检出

将待测样品(异常发酵液)经 4,000 转/分,离心 15 分钟。吸取上清液(污染较严重的可进行适当稀释),用“双层琼脂法”检查噬菌斑的有无。

双层琼脂培养基配方为菌种斜面配方,即:牛肉膏 1%,蛋白胨 1%,NaCl 0.5%,pH7.0—

7.2。上层琼脂为 1%;下层为 2%。

### (二) 噬菌体的纯化

直接从双层琼脂平板上,挑取形态大小不一的噬菌斑转入 1% 蛋白胨液(pH7.0)中,再用“双层琼脂法”分别获得噬菌斑。按上述方法重复三次得到形态大小一致的噬菌斑。即认为噬菌体基本纯化。本试验检出的噬菌斑,小型、不透明。分离后仍未得到其他型的噬菌斑。

### (三) 噬菌体原液的制备

为选抗种的需要,须得到高效价的噬菌体原液。其方法是:把敏感株接入 pH7.0 的液体肉汤培养基中,摇瓶培养 7 小时至对数生长期前期,加入已纯化的效价较低的噬菌体液,继续培养十几小时后,将培养物离心(4,000 转/分钟,15 分钟),取上清液加入对数生长期的敏感株培养液中,继续培养十几小时,离心,重复数次,直至得到高效价的噬菌体原液( $10^{10}$  单位/毫升)。

为了避免原液中含有的菌体碎片和残存的再生菌对选抗种工作的干扰,所得原液须经细菌滤器过滤。(Seitz 过滤器,滤板型号 ZK;或玻璃滤器 1G50)。

### (四) 抗种选育

利用菌株自然突变,通过少数再生菌选育,即可得到抗噬菌体菌株。

出发菌株为原生产株夕-1.398(无锡轻工学院等1975年5月鉴定)。将菌株接入盛有30毫升肉汤培养基的200毫升三角瓶中,往复摇床(105次/分钟,振幅7.5厘米)30℃培养7小时至对数生长期,加入3—5毫升噬菌体原液,继续培养,待培养物混浊(内含再生菌),吸取培养物0.1毫升接入上述相同的新鲜肉汤培养基中,培养7小时至对数生长期,又加入噬菌体原液3—5毫升,继续重复培养多次,以得到抗性稳定的再生菌。

本试验对出发菌株进行了六次重复处理后,进行划线分离,得到单菌,每一单菌接试管斜面二支;其中一支在接种后,即在斜面自上而下流滴噬菌体原液,次日观察二支斜面菌体生长情况:(1)二支斜面菌体生长同样“丰满”,则初步认为该菌对噬菌体具有抗性。(2)一支斜面菌体生长“丰满”,另一支在噬菌体原液流滴之处不长菌(或长少量菌),则认为该菌对噬菌体敏感。

在初筛的基础上,进行摇瓶复筛。每株菌接2个摇瓶,其中一个摇瓶在接种时加入噬菌体原液0.5毫升,发酵结束后按常规法(Folin法)测定酶活。原生产株夕-1.398作为对照。

由表1看出,KC34对噬菌体具有抗性,产酶能力不受噬菌体影响,与原生产株一致。

表1 KC34,夕-1.398 抗噬菌体性能和生产能力的比较

酶活 (单位/毫升) 批次 处理	1	2	3	4
KC34	4,000	3,800	3,840	3,720
KC34+P*	3,920	3,920	3,840	3,760
夕-1.398	3,960	3,720	4,000	3,560
夕-1.398+P	1,040	3,360	2,580	1,600

\* P: 0.5 毫升噬菌体原液。

由表2看出:中性蛋白酶正常生产时,发酵月平均酶活为3,500单位/毫升左右,因噬菌体污染引起产酶低下,倒罐严重,使用抗株

表2 噬菌体污染前后及使用 KC34 后发酵生产情况 (1977 年)

时间(月)	菌种	发酵月平均酶活(单位/毫升)	平均活力(单位/毫升)	备注
3	夕-1.398	3476	3533	污染前
4	夕-1.398	3520		
5	夕-1.398	3604		
7	夕-1.398	3047	—	因污染倒罐6批未计算在内
8	夕-1.398	2800		
10	KC34	3448	3524	使用抗株
11	KC34	3600		

KC34后生产恢复正常。

二、抗噬菌体菌株 KC34 的诱变处理

(一) 出发菌株

KC34: 系前自然选育得到的抗噬菌体菌株。

悬液制备: KC34 菌株接入肉汤培养基中,30℃ 摇瓶增殖7小时,至对数生长期。于4,000转/分钟离心15分钟,弃去上清液,用pH7.0磷酸缓冲液洗涤二次后,再加入20毫升缓冲液,玻璃珠打碎,得到菌悬液。

(二) 处理条件

加菌悬液20毫升和硫酸二乙酯0.2毫升于无菌平板中,在磁力搅拌下,置于相距50厘米处,用紫外线照射30分钟(二项处理同时进行),致死率99.9%以上。取处理液0.1毫升,接种于30毫升肉汤培养基中中止反应,并于30℃摇瓶培养,待培养物混浊后,进行划线分离。单菌分别摇瓶发酵,测定生产性能(以KC34为对照菌)。

(三) 结果

由表3得出:变异株Kpb38的摇瓶产酶比

表3 变异株 Kpb38 和 KC34 生产性能的摇瓶比较

酶活 (单位/毫升) 菌株	1	2	3
KC34	3,240	3,680	3,920
Kpb38	4,080	4,520	4,720
提高(%)	25.9	22.9	20.4

表 4 Kpb38, 夕-1.398, 5.376(衡阳酒厂变异株)不同配方摇瓶比较

批 次			1			2		
酶活 (单位/毫升)	菌株		Kpb38	夕-1.398	5.376	Kpb38	夕-1.398	5.376
	配方(%)							
豆饼粉	马铃薯粉	麸皮						
2.5	3	5	4,360	3,160	3,360	4,080	3,280	3,280
3	4	4	4,280	3,560	3,640	4,520	3,600	3,720
3	5	2	4,600	3,600	3,600	4,520	3,840	3,680
3.5	6	2.5				4,520	4,040	3,760

KC34 提高 20% 以上。

由表 4 看出: 用四种不同配方的摇瓶培养, 变异株 Kpb38 全部显示最高酶活。

从表 4 数据可以求得各菌株产酶平均值 Kpb 38 为 4,411, 夕-1.398 为 3,583, 5.376 为 3,576。变异菌株 Kpb38 的摇瓶产酶能力比夕-1.398 和 5.376 可提高 23%。

在摇瓶试验的基础上, Kpb38 转入正式生产(5 吨, 10 吨, 20 吨罐)。自 1977 年十二月至 1978 年十二月共生产九个月, 达 200 多批次(发酵配方不变, 即豆饼粉 2.5%, 马铃薯粉 3%, 麸皮 5%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2%), 生产情况见表 5。

由表 5 看出: Kpb38 在生产上使用九个月,

表 5 变异株 Kpb38 在生产上的使用情况

时间(月)	发酵月平均 酶活(单位/ 毫升)	总平均	当月单罐 最高酶活
1977 年 12	4,305	4,345	5,920
1978 年 1	4,392		6,560
2	4,486		7,360
3	4,186		6,080
7	4,182		5,333
8	4,548		6,302
9	4,080		5,171
11	4,268		6,276
12	4,656		6,956

发酵总平均酶活达到 4345 单位/毫升, 比原生产水平 3500 单位/毫升(表 2)提高 23%, 与摇瓶数据相符。

Kpb38 曾提供天津酶制剂厂生产, 据该厂提供: 1977 年 12 月 Kpb38 发酵平均酶活为 4850 单位/毫升, 比该厂原发酵水平 3650 单位/毫升提高 32.5% (天津酶制剂厂发酵配方为豆饼粉 3.5%, 马铃薯粉 4%, 玉米粉 2%, 麸皮 2.5%)。

### 三、小结

用再生菌选育法, 从噬菌体敏感株夕-1.398 筛选得到了抗噬菌体菌株 KC34, 其生产性能与原生产株一致。又以 KC34 为出发株, 用硫酸二乙酯和紫外线处理诱变, 得到了高产菌株 Kpb38, 它既具有抗噬菌体特性, 又比原生产株的产酶量提高 20% 以上, 经本厂九个月大生产鉴定和兄弟厂试用结果, 表明 Kpb38 确实是一株优良的蛋白酶生产株, 值得推广使用。

### 参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所噬菌体组: “噬菌体及其防治”, 科学出版社, 北京, 1974。
- [2] 松井俊规等: 发酵与工业, 3, 4, 5, 1977。