

# 碱性脂肪酶的研究

## II. 诱变育种

施巧琴

(山西省生物研究所,太原)

李辉

(华南热带作物学院\*,海南岛)

前报报道了从土壤中分离出产碱性脂肪酶的青霉菌,其中 596 号菌株为扩展青霉(又称苹果青霉, *Penicillium expansum*\*\*)。为进一步提高其产酶水平,我们采用了物理和化学相结合的诱变育种方法,获得了酶产量较高的菌株,现报道如下。

## 材 料 和 方 法

### 一、原始菌株

扩展青霉 (*Penicillium expansum*) 596。

### 二、培养基

1. 斜面培养基(%) : Czapeck 培养基。

2. 琼脂块产酶培养基(%) : 大豆粉 1.5, 玉米浸出液 0.7, 葡萄糖 0.7,  $\text{NaNO}_3$  0.4,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.4。

3. 摇瓶发酵培养基(%) : ①一号配方: 大豆粉 2.0, 玉米浸出液 1.0, 葡萄糖 1.0,  $\text{NaNO}_3$  0.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5, 柠檬酸钠 0.1,  $\text{FeSO}_4$  0.006。  
②二号配方: 用小麦粉代替一号配方中的葡萄糖,其他成份不变。

### 三、发酵条件

斜面种子于 27℃ 培养 5—6 天。250ml 三角瓶装液体 30ml, 摇床转速为 220 rpm/min, 27℃ 发酵 66 小时。

### 四、酶的测定方法

1. 琼脂板透明圈法<sup>[1]</sup> (发酵液经离心,吸上清液做测定样品)。

2. NaOH 定量测定法<sup>[1]</sup> (测定样品处理法

同上)。

### 五、选育方法

为了提高筛选工作效率,增加高产菌株选出的机率,参照文献并确定如下方法:用一定浓度橄榄油或橡胶油的乳化液做底物,制成琼脂板,代替由检验菌作成的生物检定板。橄榄油琼脂板置于 28—30℃ 下保温 24 小时,观察琼脂板上的水解圈大小,以此决定微生物的取舍。将水解圈大的菌落分别接入斜面进行摇瓶复筛。每代诱变可取琼脂块菌落 800—1000 个,经上述方法筛选可淘汰 95% 菌株。取保留的优良菌株作摇瓶复筛,复筛时各菌的发酵液酶活力采用琼脂板透明圈法和化学定量法进行测定,两者比较,加以选择。

### 六、诱变因子的种类、处理剂量和方法

在以下各处理时菌悬液浓度控制在  $0.5-1 \times 10^6$  个/ml。

1. 亚硝基胍:以孢子悬液静止处理,浓度为 400—1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 在 30℃ 处理 50—60 分钟。

2. 紫外线: 30W 灯,距离 45cm, 搅拌照射 1—5 分钟。

3. 盐酸羟胺: 浓度为 0.1%, 加入到琼脂培养基内,用孢子悬液涂皿,即在菌的生长过程中处理。

4. 5-溴尿嘧啶: 浓度为 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 加入到

\* 华南热带作物学院韩翠英和南通生物化学厂周志林同志参加部分工作。

\*\* 承中国科学院微生物研究所齐祖诒先生鉴定。

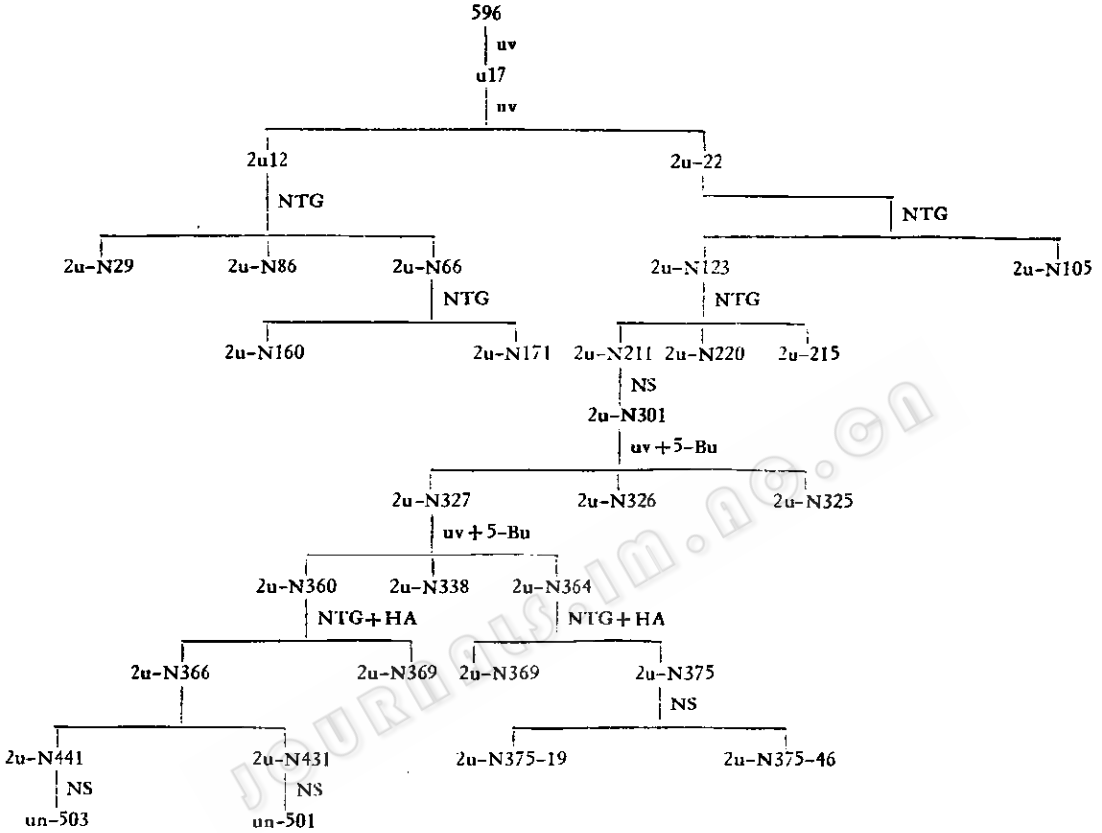
培养基内,孢子悬液涂皿,在菌的生长过程中处理。

5. 秋水仙碱: 振荡培养孢子液, 8 小时后加入一定浓度的秋水仙碱溶液, 使最终浓度为  $600\mu\text{g}/\text{ml}$ , 继续振荡处理 1.5 小时。

## 结果和讨论

### 一、un-503 菌的诱变系谱\*

诱变系谱说明, 以扩展青霉 596 为出发菌株, 经上述处理, 挑取单个菌落近 10000 个, 得



到的 un-503 菌株比原始菌株酶活力增加了近 17 倍。

### 二、突变菌株 un-503 的生物学特性

#### (一) 形态变化

un-503 菌株经多次物理化学因素处理后, 孢子发芽提前, 生长期延长, 菌丝量增加, 孢子生成由原始菌株的 2—3 天推迟到第 5—6 天。在形态上也有较大变化, 菌落在生长前期由白色绒毛状变为蜡质状, 生长后期菌丝束由明显变为不明显, 渗出液消失, 菌落表面变得更紧密, 孢子量减少而颜色由黝绿色变成橄榄灰, 菌落背面色素由紫褐黄色变为橙皮黄。596 菌落 1—1.7cm, 而 un-503 1—1.9cm。596 菌株的菌落表面外观粒状, 菌丝束明显, 有褐红色渗出

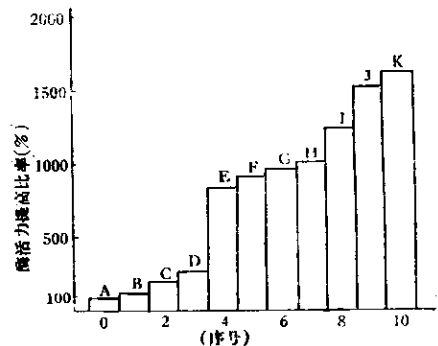


图 1 选育过程中酶活力的变化\*

\* A—出发菌株; B、C—uv 处理; D、E—NTG 处理; F、K—NS 处理; G、H—uv + 5-Bu 处理; I—NTG + HA 处理; J—uv + C 处理。

\* NTG = 亚硝基胍; uv = 紫外线; HA = 盐酸羟胺; 5-Bu = 5-溴尿嘧啶; C = 秋水仙碱; NS = 单株分离

液,孢子松散。而 un-503 菌菌落外观均匀无粒状,菌丝束不明显,无渗出液,孢子较紧密。

## (二) 酶活力的变化

结果见图 1。

图 1 说明,经过十次诱变处理后,并对发酵培养基成分进行调整,菌株的产酶水平从出发菌株的 100% 提高到 1660%。

图 1 还说明,各种诱变剂对扩展青霉的诱变效果是不同的,其中以亚硝基胍最好。而亚硝基胍 + 盐酸羟胺和秋水仙碱 + 紫外线的复合处理效果也较好。

## (三) 对诱变剂的耐受力变化

野生型菌株对各种诱变剂耐受力较强,在

没有获得明显突变的第四次诱变之前的菌株,亚硝基胍浓度为  $1000\mu\text{g/ml}$ ,在  $30^{\circ}\text{C}$ ,60 分钟处理后,孢子致死率为 85% 左右。用紫外线照射 5 分钟致死率可达 95%。但第四次诱变后菌株要达到同样的致死率,剂量就要随诱变次数的增加而逐渐减少,亚硝基胍只能耐受 500— $600\mu\text{g/ml}$ ,紫外线照射只能 2 分钟。

## 参 考 文 献

- [1] Ichkawa, T., M. Date, T. Ishikura and A. Ozaki: *Folia Microbiologica*, **16** (3) 218—224, 1971.
- [2] 国生纯孝等:公开特许公报,特开昭 53-59093,1978.
- [3] 町田晴夫等:特许公报,昭 49-32080,1974.
- [4] 施巧琴:微生物学通报,8(3): 108—110,1981.