

米曲氨基酰化酶菌株的选育*

邢来君 李明春 张峻 周与良

(南开大学生物系,天津)

摘要 利用原生质体融合技术对米曲霉 3042 和米曲霉 10B, 进行了营养互补融合。以 30% PEG (MW = 6000)、0.01mol/L CaCl_2 、0.05mol/L Gly 做为融合剂,融合频率达到 0.47%。共获得 26 株绿色融合株,并对其杂合二倍体的孢子进行了 PFA 和 UV 的诱发分离,获得一株生长速度快、氨基酰化酶活性高的单倍体菌株。

关键词 原生质体融合;氨基酰化酶;米曲霉

目前氨基酸的生产一般采用化学合成法和发酵法,其中化学合成法以石油化工原料合成制造,成本低,适用于大量生产,但需要经过光学拆分才能得到 L 型氨基酸。使用氨基酰化酶进行酶法拆分是工业化生产纯光学氨基酸最有利的方法^[1]。

Chibata 等人首先发现米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 的氨基酰化酶^[2,3],替代了由动物

肾脏提取的酰化酶。米曲霉含有较高活性的酰化酶,适用于大规模的消旋氨基酸拆分,而且培养和提取方法简单易行。日本从 60 年代至今仍使用这种液体酶进行工业化生产氨基酸。

目前我国主要应用 *Asp. oryzae* 3042 做

* 李明春、张峻为 86、85 级本科毕业生,参加了本文的部分工作。

为产酶菌株,依靠固体培养获取液体酶。而米曲霉 3042 主要用途是利用其高产蛋白酶的特性,用来生产酱油。氨基酰化酶不是它的主要酶系,酶活力并不理想,但它的生长速度快,一般在培养 48 小时后达到产酶高峰。*Asp.oryzae* 10B₁ 菌株生长速度较慢,但产酶活性高。为了获得生产速度快和产酶活性高的菌株,我们利用了原生质体融合技术进行了研究,现报告如下。

材料与方法

(一) 供试菌株

1. *Aspergillus oryzae* 3042 天津光荣酱油厂生产菌株。

2. *Aspergillus oryzae* 10B₁ 天津轻工业学院提供。

3. N₁₂₀ 来源于 *Asp. oryzae* 3042,精氨酸缺陷型 (Arg⁻) 孢子浅绿色,生长旺盛。

4. N₇₂₀ 来源于 *Asp.oryzae* 10B₁,腺嘌呤缺陷型 (Ade⁻),孢子浅白色,生长弱。

(二) 培养基

1. 豆汁培养基 (CM):豆汁 100ml(10克大豆加水 100ml,浸泡过夜,煮沸 2 小时,用纱布过滤即可)蔗糖 3g,pH 自然。

2. 基本培养基 (MM):见文献 4。

3. 再生和融合培养基: 0.8mol/L NaCl 配制的 CM 和 MM 培养基。

4. 麸曲培养基: 豆饼粉 55%, 麸皮 45%, 料:水=100:85, 1.2kg/cm² 灭菌 40 分钟。

(三) 融合剂

聚乙二醇 (MW = 6000) 上海试剂一厂,气相色谱纯。

融合剂: 30%PEG + 0.01mol/L CaCl₂ + 0.05mol/L Glycine,pH7.5,1.05kg/cm² 灭菌 20 分钟。

(四) 原生质体的制备和分离

参见文献[4]。

(五) 原生质体的融合处理

参见文献[5]。

(六) 倍性测定

1. 孢子体积的测定: 取 CM 上生长的成熟孢子,在油镜下测定 100 个孢子的直径,取平均值按公式体积 = $1/6\pi d^3$ 计算^[9]。

2. 孢子 DNA 含量的测定: 取 CM 上生长的成熟孢子,过滤除菌丝,离心洗涤二次,调整孢子量为 1×10^8 个/ml。方法见文献 5。

(七) 杂种的诱发分离

1. PFA 诱发分离: 采用 0.01—0.02mol/L 对氟苯丙氨酸 (PFA) 制备的 CM 培养基平板,将融合二倍体点种培养,30℃ 培养 4 天后出现异样菌落,转接 2—4 次后出现角变菌落,将角变菌落分离于试管中,进行传代和倍性测定^[6,7]。

2. UV 诱发分离: 对二倍体菌株制作 UV 致死曲线,选取最佳诱变时间,然后将 CM 斜面培养六天的杂种孢子悬浮于 0.01% Tween80 溶液中,经 10 分钟剧烈摇动后用 G₁ 漏斗过滤,将孢子数调整为 1×10^4 个/ml,取 10ml 孢子悬浮液于直径 9cm 平皿中进行 UV 照射,照射后进行传代和倍性测定。

(八) 氨基酰化酶的固体培养和提取

称取 30 克麸曲培养基放入 500ml 三角瓶中,1.2kg/cm² 灭菌 40 分钟,冷却后接入 2ml 菌悬液 (10^8 孢子/ml),28℃ 培养 45 小时,称取 5 克培养物于 250ml 三角瓶中,加入 30ml 预冷的蒸馏水,130r/min 振摇 2 小时,以纱布过滤,滤液在 3000r/min 离心 15 分钟,得到亮黄色酰化酶液。取 10ml 酶液于透析袋内,在蒸馏水中透析 5—6 小时,进行酶活测定。

(九) 氨基酰化酶活力的测定

方法见文献 8, 9。于 570nm 波长测光密度,测得的 OD 值按下式计算酶活力:

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol}/\text{ml} \cdot \text{h}) = \frac{1h}{\text{反应时间}} \times K$$

× OD × 稀释倍数

K 值为标准曲线求得的常数。

结果与讨论

(一) 原生质体融合

以 1% 溶壁酶加 1% 蜗牛酶混合液酶解而

表 1 $N_{120} + N_{720}$ 菌株间原生质体的互补融合

融合剂作用时间 (min)	稀释倍数	在高渗 MM 上形 成的菌落数/ml	在高渗 CM 上形 成的菌落数/ml	融合率 (%)	平均融合率 (%)
10	10^1	256	94800	0.27	0.31
	10^3	32	9476	0.34	
20	10^2	384	101600	0.38	0.47
	10^3	56	10029	0.55	
30	10^2	232	104000	0.22	0.30
	10^3	40	10312	0.38	

表 2 杂种倍性的测定

菌株 测定指标	亲本 N_{120}	亲本 N_{720}	杂种 050	杂种 048	杂种 068
DNA 含量($\mu\text{g}/10^6$ 孢子)	4.32	6.11	9.56	9.36	8.31
亲本 DNA 含量的平均 值($\mu\text{g}/10^6$ 孢子)	5.22	5.22			
杂种与亲本 DNA 之比			1.83:1	1.79:1	1.59:1
孢子直径(μm)	3.237	3.435	3.990	4.161	4.622
孢子体积(μm^3)	17.76	21.22	33.26	37.72	51.72
亲本孢子体积平均值	19.49	19.49			
杂种与亲本体积之比			1.707:1	1.935:1	2.66:1
倍 性	N	N	2N	2N	2N

获得营养缺陷型的原生质体^[4]。以 $N_{120} + N_{720}$ 组合进行了原生质体融合,融合时间分别为 10 分钟、20 分钟、30 分钟,融合温度为 32℃,稀释度为 10^2 和 10^3 ,结果见表 1。

(二) 二倍体的确定

经融合处理的两营养缺陷型原生质体,在高渗 MM 上能互补生长,出现黄色、白色和绿色等菌落。在 CM 上出现亲本类型的分离,形成绿色的扇形角变,此绿色孢子株能在 MM 上生长且较亲本旺盛,属原养型。

从融合菌株中共挑选出 26 株绿色融合株,对其中部分菌株进行了孢子 DNA 含量和孢子体积的测定(表 2),证明融合株孢子 DNA 含

量接近两亲本之和,孢子体积也较亲本大。故认为绿色融合株是细胞核融合的杂合二倍体。二倍体的性状是稳定的,经多次传代后未见分化现象。

(三) 二倍体的诱变分离

从挑选出的 26 株绿色融合株中,对其产生氨基酸化酶的活性进行初筛,选出 048、061、068、096、088、110 等六株菌进行了 PFA 和 UV 的诱变分离。

经 PFA 诱变分离,048 菌株没有发生角变外其余五株均发生角变分离,在 PFA1—7 ppm 浓度间能引起角变分离,但这种分离似乎没有什么规律。从 PFA 诱变分离中挑选出了

10 株分离子。

UV 诱发分离的照射剂量为 15W 紫外灯, 距离 30cm, 照射时间 1 分钟, 致死率为 70%。对诱发菌株初筛的结果, 挑选出 8 株分离子。

(四) 氨基酰化酶的测定和分离子倍性的确定

将诱发分离获得的 18 株分离子进行了氨基酰化酶的测定。从表 3 中可以看出 B001 菌株氨基酰化酶活性最好, B001 是由杂合二倍体 068 菌株经 UV 诱发分离获得, 因此对 B001 的倍性进行了测定, 证明 B001 为单倍体 (表 4)。

表 3 单倍体分离子氨基酰化酶活性

单倍分离子	氨基酰化酶活性 ($\mu\text{mol}/\text{ml} \cdot \text{h}$)	单倍分离子	氨基酰化酶活性 ($\mu\text{mol}/\text{ml} \cdot \text{h}$)
B001	98.68	G303	61.92
F703	87.07	F702	60.37
B401	85.14	C402	56.89
B303	83.59	C701	54.95
C601	83.20	F704	52.24
F503	74.69	F501	46.44
F502	71.98	F605	36.76
G502	70.43	F301	36.37
G504	65.40	对照 3042	61.15
F705	64.20		

表 4 B001 菌株的倍性测定

菌株	测定指标	孢子 DNA 含量 ($\mu\text{g}/10^4$ 孢子)	亲本与分离子 DNA 含量之比	孢子直径 (μm)	孢子体积 (μm^3)	亲本与分离子 孢子体积之比	倍性
亲本 068		8.31		4.622	51.72		2N
分离子 B001		4.21	1.937:1	3.766	28.19	1.834:1	N

表 5 单倍体 B001 的生理性状

菌株	孢子颜色	生长速度 (cm)	曲孢子含量 (Z/g)	氨基酰化酶 活性 ($\mu\text{mol}/\text{ml} \cdot \text{h}$)	菌落形态
原始亲本 3042	绿色	6.1	41.0	61.15	绿色, 疏松
原始亲本 10B ₁	绿色	3.0	88.62	88.62	绿色, 致密
融合子 068	绿色	5.8	51.85	51.85	绿色, 疏松 菌丝粗壮
单倍体 B001	绿色	6.0	98.68	98.68	绿色, 疏松 孢子小

对 B001 菌株的原始融合亲本和杂合二倍体亲本以及 B001 菌株的生理性状进行了一系列测定。

从表 5 的结果观察到 B001 菌株的生长速度和曲孢子含量与原始亲本之一的 3042 菌株持平, 而氨基酰化酶活性比 3042 提高 61.96%, 比另一亲本略有提高。因此认为 B001 菌株在生长速度方面继承了 3042 菌株的特征, 而氨基酰化酶活性具备了 10B₁ 菌株的产酶基因, 所以该株是通过融合技术选育的一株具有双亲优良性状的单倍体菌株。

参 考 文 献

1. Chibata I et al.: Methods in Enzymology, Vol. 44: 746, K. Mosbach Ed., Academic Press, New York, 1976.
2. Chibata I et al.: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan. 20: 174, 1956.
3. Chibata I et al.: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 21: 305, 1957.
4. 邢来君等: 真菌学报, 6(4): 242—247, 1987.
5. 梁平彦等: 遗传学报, 8(4): 287—293, 1981.
6. 梁平彦等: 微生物学报, 22(3): 248—256, 1982.
7. 邢来君等: 真菌学报, 8(3): 227—232, 1989.
8. 潘家秀等: 蛋白质化学研究技术, 第 27 页, 科学出版社, 北京, 1962.
9. 黄汝多等: 安徽大学学报(自然科学版)第二期, 1981.