

重离子诱变技术选育碱性蛋白酶高产菌株

薛林贵^{1*} 景春娥¹ 赵旭¹ 张红² 武振华² 常思静¹

(1. 兰州交通大学化学与生物工程学院 甘肃 兰州 730070)

(2. 中国科学院近代物理研究所 甘肃 兰州 730000)

摘要: 从采集的土壤样品中分离筛选出一株碱性蛋白酶产生菌 G-41, 经 16S rRNA 分子鉴定为芽孢杆菌属菌株。该菌株在发酵培养基中能产生较高产量的胞外碱性蛋白酶(1.7×10^4 U/mL)。以 G-41 为出发菌株, 对其进行重离子辐照诱变处理, 获得突变株 G-41-68, 将该突变株再次经重离子诱变, 从大量突变株中筛选出碱性蛋白酶高产菌株 15Gy-54, 其酶活力达到 6.22×10^4 U/mL。与出发菌株相比较, 突变株 G-41-68 和 15Gy-54 的酶活力分别提高了 1.58 倍和 2.65 倍。对突变株 15Gy-54 的发酵条件进行了优化研究, 结果表明, 该菌株的碱性蛋白酶活力得到进一步提高, 达到 7.18×10^4 U/mL, 其最适发酵条件为: 培养基(g/100 mL)为胰蛋白胨 1、酵母膏 0.5、乳糖 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、 MgSO_4 0.0481 (4×10^{-3} mol/L)、pH 8.0, 培养温度 41°C , 振荡培养时间 42-48 h。实验结果表明, 重离子辐照诱变技术是一种非常有效的微生物诱变育种新技术。

关键词: 重离子诱变, 芽孢杆菌属, 碱性蛋白酶, 发酵

The Selection for High-yield Alkaline Protease Producing Strain by Heavy-ion Irradiation

XUE Lin-Gui^{1*} JING Chun-E¹ ZHAO Xu¹ ZHANG Hong²
WU Zhen-Hua² CHANG Si-Jing¹

(1. College of Chemical and Biology Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

(2. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: Strain G-41 was isolated from the soil. The strain was identified as *Bacillus* by 16S rRNA method. Growing in fermentative medium, the strain can produce high-yield alkaline protease (1.7×10^4 U/mL). We dealt with the original strain (G-41) by the heavy-ion irradiation and obtained the mutant G-41-68. The mutant G-41-68 was again treated by the heavy-ion irradiation. We screened a high-yield alkaline protease producing strain 15Gy-54 from many of mutants and its enzyme activity reached to 6.22×10^4 U/mL. Compared with the original strain, the enzyme activity of mutant strains G-41-68 and 15Gy-54 increased by 1.58 and 2.65 times, respectively. The fermentation conditions of the mutant strain 15Gy-54 were optimized and its enzyme activity further increased, reaching to 7.18×10^4 U/mL. The mutant's optimum conditions for enzyme production consisted of 1% tryptone,

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30870384); 甘肃省科技支撑计划项目(No. 090NKCA079)

* 通讯作者: Tel: 86-931-4938619; 信箱: xuelg@mail.lzjtu.cn

收稿日期: 2009-12-08; 接受日期: 2010-03-03

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

0.5% yeast extract, 5% lactose, 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 , 4×10^{-3} mol/L MgSO_4 , the initial pH 8.0, shaking culture for 42–48 h, at 41°C. These results showed that the heavy-ion irradiation is an effective method for microbe mutagenesis.

Keywords: Heavy-ion irradiation, *Bacillus*, Alkaline protease, Fermentation

碱性蛋白酶是研究得较为广泛和深入的一种酶制剂,我国酶制剂的研究主要集中在已有菌株产酶活力的提高和生产应用。科学研究工作者负有酶制剂研制和应用开发的双重任务^[1],从特殊生境中分离筛选产酶微生物并对其进行诱变选育仍为酶制剂生产应用的重要途径和良好手段。诱变选育具有优良性状的微生物菌种,是发酵工业的关键环节,而有效的诱变方法的选择是菌种选育能否成功的关键。重离子辐照作为微生物诱变育种的一种新技术,其建立和应用对整个微生物发酵行业生产水平的进一步提高具有现实意义^[2]。

重离子辐照技术是 80 年代兴起的一种材料表面处理技术,由我国科学工作者余增亮首创,将重离子辐照技术应用于农作物品种改良并获得成功。在后续研究中,重离子辐照技术被逐步应用于微生物诱变育种和肿瘤治疗中。余曾亮等对重离子的作用机制总结为 4 方面:即能量沉积、动量传递、离子注入和电荷交换。这四种过程在生物体内发生的理化反应,形成的生物效应,使离子注入法育种具有许多独特的特点,这些开创性的研究工作受到国内外学术界的关注,为离子束生物工程学的发展奠定了基础,它将对生命科学中一些重大问题的研究提供技术支撑,同样,其在微生物育种中独具特色^[3-4]。

重离子辐照技术应用于工业微生物诱变育种中,因其损伤小、突变率高、突变谱广、诱变效果好,而受到愈来愈广泛的关注,并取得了显著的经济效益和社会效益^[5-7]。重离子辐照技术作为一种全新的方法技术应用于微生物菌种选育中,具有广阔的发展应用前景。本文利用重离子辐照诱变技术选育碱性蛋白酶高产菌株,取得了良好的诱变效果。

1 材料与方法

1.1 菌株

芽孢杆菌属菌株 G-41,由本实验室分离筛选获得。

1.2 主要仪器设备及试剂

恒温振荡培养箱 HZQ-X100 (太仓市华美生化

仪器厂); 不锈钢手提式灭菌器 BSX-280B (上海申爱医疗器械厂); 洁净工作台 SW-CJ-1BU (苏州安泰空气技术有限公司); PHSJ-4A 型酸度计(上海精密科学仪器有限公司); 酪氨酸为层析纯(华美生物工程公司); 干酪素(上海润捷化学试剂有限公司); WFZ-UV-2100 紫外分光光度计(尤尼柯仪器有限公司)。

1.3 培养基

斜面培养基(g/100 mL): 牛肉膏 1, 蛋白胨 1, NaCl 0.5, 琼脂 2, pH 10。

酪素琼脂培养基(g/100 mL): 酪蛋白 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, 水解干酪素 0.005, 琼脂 1.8, pH 10。

发酵培养基(g/100 mL): 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。

1.4 碱性蛋白酶活力测定

按轻工业部部颁标准 QB724-80 规定的 Folin 法测定酶活力^[8]。1 mL 酶液在 pH 10、40°C 的条件下,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)。

1.4.1 酶液的稀释及酪蛋白的配制: 粗酶液用 pH 10 硼砂-NaOH 缓冲液稀释 2000 倍。

1%酪蛋白的配制: 称取酪蛋白 1 g 于研钵中,先用少量蒸馏水湿润后,慢慢加入 0.2 mol/L NaOH 4 mL 充分研磨,于水浴中煮沸 15 min,溶解后冷却定容至 100 mL,保存于冰箱,有效期 3 天。

标准酪氨酸溶液配制: 精确称取酪氨酸 50 mg,加入 1 mL 1 mol/L 盐酸溶解后用蒸馏水定容至 50 mL,即得 1 g/L 标准溶液。

1.4.2 酶活力的测定: 取 1 mL pH 10.0 硼砂-NaOH 缓冲液; 1 mL 1:2000 的稀释酶液; 1 mL 1%酪蛋白溶液,40°C 水浴保温 15 min,立即加入 0.4 mol/L 三氯乙酸 3 mL 终止反应; 静置片刻。离心后取上清液 1 mL,加入 0.4 mol/L 碳酸钠溶液 5 mL,福林试剂 1 mL,充分摇匀,于 40°C 水浴保温 15 min,然后每管各加入 3 mL 蒸馏水,摇匀。用 UV-2100 紫外分

光光度计在波长 680 nm 处, 以对照管为对照, 测定两管的光密度。

1.4.3 酶活力的计算: 每毫升碱性蛋白酶的活力单位 = $m / t \times f$ [m : 样品所测定的光密度值, 经查标准曲线求得的酪氨酸量(μg); t : 酶促反应的时间(以分钟为单位); f : 酶的稀释倍数, 本实验中 $f=2000$]。

1.5 诱变处理方法

重离子辐照实验在兰州重离子加速器国家重点实验室(NL-HIAL)重离子研究装置(HIRFL) TL2 终端上进行。重离子束流为 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束, 能量为 831 MeV, LET 为 35.5 keV/ μm , 吸收剂量率 3 Gy/min, 用空气电离室监测剂量。辐照碱性蛋白酶产生菌所用剂量分别为 4、5、10、15 Gy, 以未照射菌种作为对照^[9-11]。

1.5.1 菌悬液的制备: 接一环活化的出发菌株 G-41 于盛有 50 mL 无菌种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 恒温振荡培养箱(150 r/min), 于 41°C 培养 18 h 得到种子液。以 10^{-2} – 10^{-3} 的稀释度, 将菌体浓度稀释为 10^8 – 10^9 个/mL, 制成靶子悬液, 冷冻保藏备用。

1.5.2 重离子辐照: 取制备的靶子悬液 2 mL 分别加入到铺有纱布的无菌 30 mm 皿中, 用封口膜密封, 分别于 4、5、10、15 Gy 辐照剂量下处理。

1.6 突变菌株选育

初筛: 将不同辐照剂量处理后的菌液稀释后涂布于酪素琼脂培养基平板上, 于 41°C 培养后测定透明圈直径与菌落直径之比(HC 比值), 根据比值大小来初步衡量该菌种产酶能力的高低。

复筛: 接一环初筛菌种于种子培养基中, 于恒温振荡培养箱 150 r/min、41°C 培养 18 h 得到种子液, 按 2%接种量接入发酵培养基, 41°C 恒温振荡培养 48 h, 培养液离心(8000 r/min, 10 min)后取上清测定酶活力^[12-14]。

1.7 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计确定菌株最佳产酶条件。

1.8 采用 SPSS 软件对实验数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 菌株的形态

G-41 菌体为杆状, 末端圆, 单个或呈短链排列, 能运动(图 1 和图 2 所示)。芽孢为椭圆形, 中生或次端生。经 16S rRNA 分子鉴定为芽孢杆菌属菌株。

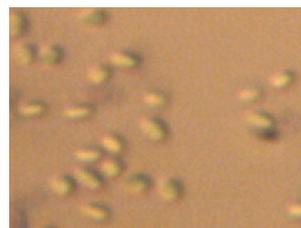


图 1 冷冻保藏的 *Bacillus* G-41 菌体形态($\times 1000$)

Fig. 1 Microbial morphology of *Bacillus* G-41 freeze preservation ($\times 1000$)

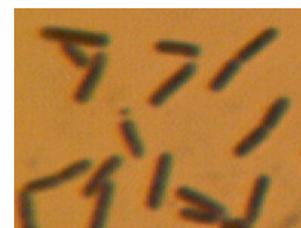


图 2 摇瓶培养 18 h 的 *Bacillus* G-41 菌体形态($\times 1000$)

Fig. 2 Microbial morphology of *Bacillus* G-41 after shaking culture for 18 h ($\times 1000$)

2.2 重离子辐照处理后 *Bacillus* G-41 的致死率

出发菌株 G-41 的重离子处理剂量为 4 Gy。突变株 G-41-68 的重离子诱变处理的剂量分别为 5、10、15 Gy, 不同剂量重离子处理后, 测定其致死率, 结果见表 1。

表 1 重离子诱变突变株 G-41-68 的致死率
Table 1 Mortality rate of *Bacillus* G-41-68 by heavy ion irradiation

剂量(Gy) Dose (Gy)	对照 Control	5	10	15
致死率(%) Mortality (%)	0	16	48	58

注: 表中数据为 3 次实验结果的平均值。

Note: The data is the average of three experimental results.

从上表可以看出, 重离子辐照处理对突变株 G-41-68 的作用效果非常明显。随着辐照剂量的增加, 其致死率逐渐增大, 但不存在线性关系。将酶活力为出发菌株 90% 及以下的菌株作为负突变株, 110% 及以上的菌株为正突变株, 90%–110% 之间的视为不变异株。研究结果表明, 不同剂量重离子处理菌株后, 以 10 Gy 和 15 Gy 剂量时正变效果最佳。

2.3 突变菌株的选育

初筛使用酪素平板, 采用稀释涂布法进行(图 3), 复筛采用摇瓶发酵法进行, 发酵后测定发酵液碱性蛋白酶活力。出发菌株 G-41 经重离子辐照诱变处理

获得突变株 G-41-68, 其酶活力达到 4.4×10^4 U/mL, 酶活力较 G-41 菌株提高了 1.58 倍。将 G-41-68 再进行重离子辐照处理, 共筛选出 54 株相对产酶活力较高的菌株。从 54 株突变株中经过复筛选育出 11 株相对产酶活力较高的菌株, 其中 15Gy-54 菌株的酶活力最高且稳定, 其酶活达到 6.22×10^4 U/mL (表 2)。

表 2 突变株 G-41-68 菌株的筛选结果
Table 2 The second screening result of mutant strains G-41-68

菌株 Strains	HC 比值 HC ratio	酶活 Enzyme activity (U/mL)
2	20.75	4.40×10^4
18	10.40	4.88×10^4
25	11.62	2.66×10^4
34	11.75	1.33×10^4
35	12.71	2.47×10^4
36	12.50	2.28×10^4
40	13.37	0.88×10^4
41	14.28	3.66×10^4
43	15.50	2.13×10^4
52	12.66	1.66×10^4
54	13.58	6.22×10^4

采用酪素平板稀释涂布法筛选菌株, 培养 48 h 后得到的菌落形态及水解圈(图 3A)。菌落直径在 0.4 cm–0.8 cm 之间, 颜色为乳白色, 且湿润、隆起、多为圆形、半透明、边缘整齐, 菌落周围白色区域为水解圈(图 3B)。

2.4 高产菌株最佳产酶条件的研究

为了进一步考察碱性蛋白酶高产菌株 15Gy54 的最适产酶条件, 我们对其培养基组成及发酵条件做了研究和分析^[15–20]。

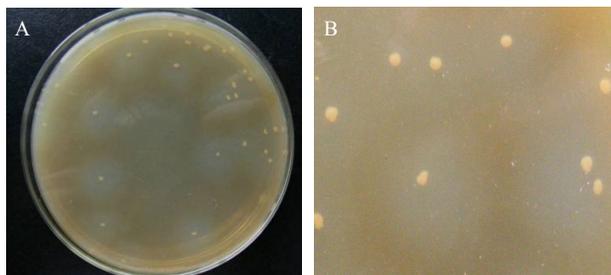


图 3 酪素平板碱性蛋白酶水解圈

Fig. 3 Alkaline protein-hydrolyzed halos in the casein plating medium

2.4.1 培养基组成成分对 15Gy54 菌株产酶的影响: 以初始发酵培养基为基础培养基, 研究不同碳源对菌株产酶的影响。培养基配方是在初始发酵培养基中加入不同碳源(5%), 分别为: 玉米粉、可溶性淀粉、麦芽糖、乳糖, 接种量为 2%, 41°C 振荡培养 48 h 后测定酶活力。结果(图 4)表明, 以乳糖作为碳源时, 其碱性蛋白酶活力最高, 且与其它碳源差异显著。

以初始发酵培养基为基础培养基, 研究不同氮源对菌株产酶的影响。培养基配方是在初始发酵培养基中以乳糖作为碳源, 加入不同氮源(1.5%), 分别为: 胰蛋白胍 + 酵母膏、黄豆粉 + 酵母膏、胰蛋白胍、酵母膏。接种量为 2%, 41°C 振荡培养 48 h 后测定酶活力。结果(图 5)表明, 以胰蛋白胍 + 酵母膏和黄豆粉 + 酵母膏作为氮源蛋白酶活性最高。

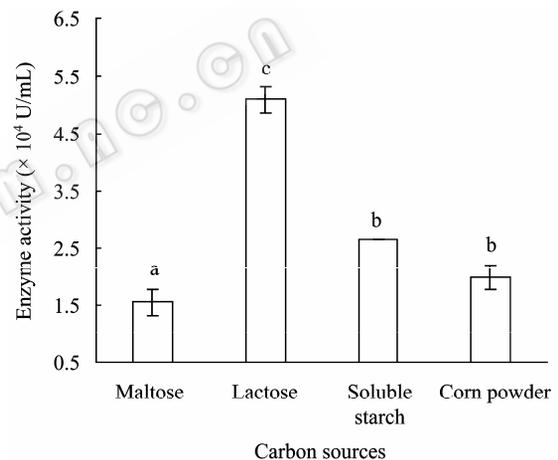


图 4 不同碳源对菌株产酶的影响

Fig. 4 Effect of various carbon sources on enzyme of the strain

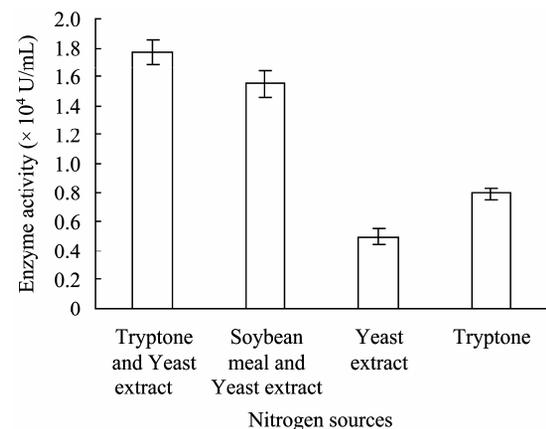


图 5 不同氮源对菌株产酶的影响

Fig. 5 Effect of various nitrogen sources on enzyme yield of the strain

2.4.2 金属离子对菌株产酶的影响: 在以乳糖为碳源, 胰蛋白胨 + 酵母膏为氮源的发酵培养基中加入不同浓度的金属离子溶液, 离子浓度分别为 Mn^{2+} (1×10^{-4} mol/L)、 Fe^{2+} (2×10^{-4} mol/L)、 Ca^{2+} (2×10^{-4} mol/L)、 Zn^{2+} (3×10^{-6} mol/L)、 Mg^{2+} (4×10^{-6} mol/L), 接种量为 2%, 41°C 振荡培养 48 h 后测定酶活力。结果(图 6)表明, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对酶活力提高具有明显的促进作用, 但 Mg^{2+} 对菌株产酶活力影响最显著。

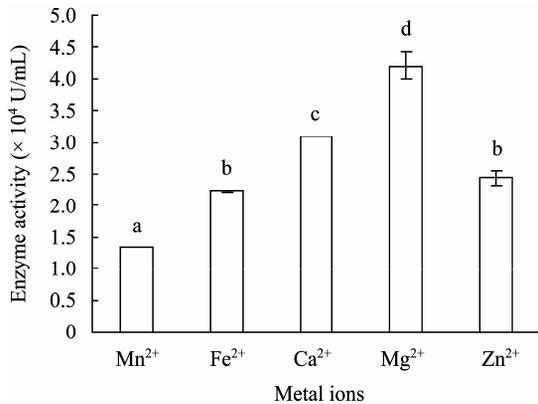


图 6 金属离子对菌株产酶的影响

Fig. 6 Effect of various metal ions on enzyme yield of the strain

2.5 高产菌株发酵条件的研究

2.5.1 初始 pH 对菌株产酶的影响: 采用乳糖(5%)作为碳源, 胰蛋白胨 + 酵母膏(1.5%)作为氮源, 含 Mg^{2+} 的初始 pH 值不同的发酵培养基, 接种量为 2%, 41°C 振荡培养 48 h 后测定酶活力, 结果表明(图 7), 菌株产酶的最适初始 pH 为 8.0–8.5。

2.5.2 种龄及接种量对菌株产酶的影响: 将种龄分别为 18 h 和 24 h 的种子培养基, 分别按不同的接种量(1%、2%、3%、4%、5%)转接入已优化的发酵培养基, 41°C 振荡培养 48 h 后测定酶活力。结果(图 8)表明, 当种龄 18 h, 接种量为 3% 时菌株的发酵产酶量最佳, 当种龄 24 h, 接种量为 1% 时菌株产酶能力明显小于前者。

2.5.3 正交试验确定菌株最佳产酶条件: 采用正交试验法, 选择胰蛋白胨与酵母膏为氮源, 乳糖为碳源, 对碳氮总量、碳氮比、初始 pH 值、 Mg^{2+} 浓度, 4 个因素分别设计 3 个水平: 碳氮总量为 6.5%、10.5%、7.5%, 碳氮比为 10:3、2.5:1、4:1, 初始 pH 值为 8.0、8.5、9.0, Mg^{2+} 浓度为 4×10^{-3} 、 4×10^{-4} 、 4×10^{-6} 。按 $L_9(3^4)$ 正交设计试验, 结果表明, 碳氮

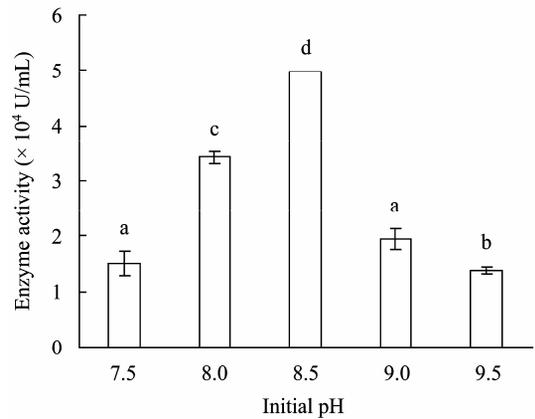


图 7 初始 pH 值对菌株产酶的影响

Fig. 7 Effect of initial pH in fermentative medium on enzyme yield of the strain

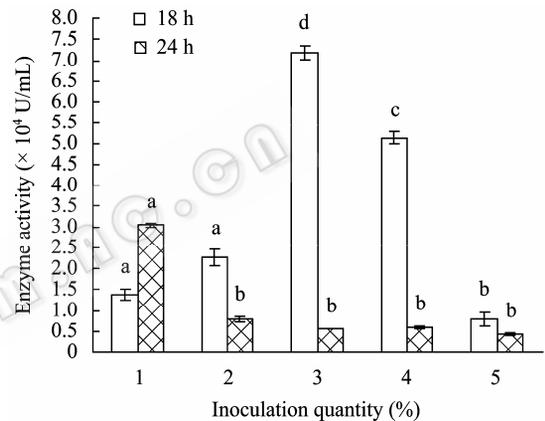


图 8 种龄及接种量对菌株产酶的影响

Fig. 8 Effect of inoculation quantity on enzyme yield

比对产酶影响显著, 碳氮比以 10:3 为宜, 最佳发酵 pH 为 8.0。根据正交试验结果, 确定了该菌株的最适发酵培养基组成为(g/100 mL): 胰蛋白胨 1, 酵母膏 0.5, 乳糖 5, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.4, KH_2PO_4 0.03, Na_2CO_3 0.1, $MgSO_4$ 0.0481 (4×10^{-3} mol/L), pH 8.0。

2.6 发酵过程中相关参数的测定

采用优化的培养基, 在适宜的发酵条件下, 分别测定反应液的 pH、 OD_{680} 及酶活力。先将菌种预培养, 种龄为 18 h, 接种量为 3%, 接入装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 发酵温度 41°C、150 r/min 振荡培养, 每隔 2 h 取样, 分别测定发酵液的 pH 值、菌株产酶活力和菌体生长量的变化。

图 9 结果表明, 发酵 6 h 时, pH 值在 8.5, 24–36 h 时, pH 降至 8.0, 且保持了 12 h, 48 h 时降至 7.0, 54 h 时转而上升至 7.8。

图 10 结果表明, 种子接种于发酵培养基后, 延

滞期为 2 h, 此后菌体进入对数生长期, 30 h 后进入稳定期, 此时菌体生长达到最高浓度, 持续 12 h 左右, 42 h 以后明显开始衰亡, 菌体浓度缓慢下降。发酵 6 h 时菌体开始产酶, 当菌体进入对数期后, 产酶量明显提高, 发酵 48 h 时达到最高酶活。菌体生长与酶活力变化并不是完全同步的, 该酶的生物合成类型属于半耦联合成型。12–30 h 之间 pH 明显下降, 说明在菌株产酶过程中 pH 并不是处在碱性环境中而是接近于中性。42–48 h 时, 发酵液 pH 为 7.0–7.2 左右时, 酶活达到峰值, 48 h 以后, 菌株产酶能力显著下降, pH 回升至 7.8–8.0。若继续发酵, 发酵液的 pH 值迅速上升, 酶活力则迅速下降。同批次的发酵, 酶活力达到峰值的时间不同, 但酶活最高时发酵液 pH 值仍在 7.2 左右。故发酵终点的判断以发酵液的 pH 变化为依据最佳, 发酵时间只能作为参考。

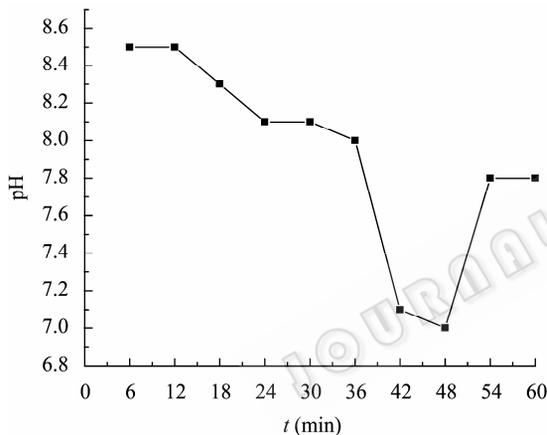


图 9 发酵液 pH 值变化

Fig. 9 pH variation of fermentation liquor

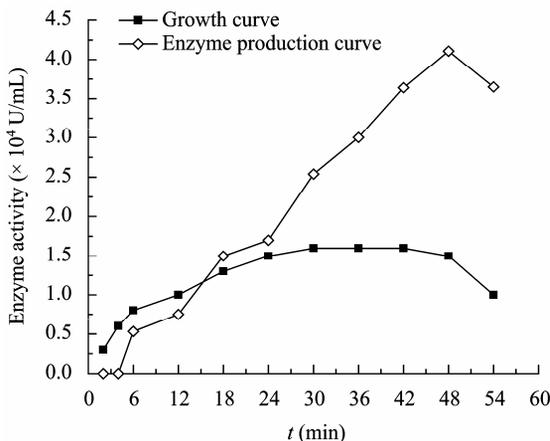


图 10 菌体生长与碱性蛋白酶的合成

Fig. 10 Growth and protease synthesis of the strain

3 讨论

本实验通过对碱性蛋白酶产生菌株进行重离子辐照诱变, 研究表明, 菌株的致死率随着辐照剂量的增加而增大, 但不存在线性关系。存活率是微生物育种中常测指标, 存活曲线是存活率的趋势直观表现。在离子注入生物效应研究中, 发现了一些新现象, 致死突变剂量效应非指数规律, 存活曲线呈“马鞍型”变化(即存活率随着注入离子剂量的增大, 表现为先降后升、再降的变化)。而传统的物理、化学诱变方法(UV、 γ -ray、EMS、DMS)均产生指数型或肩型的存活曲线。出发菌株 G-41 产酶活力为 1.7×10^4 U/mL, 经重离子辐照诱变处理获得突变株 G-41-68, 其酶活力达到 4.4×10^4 U/mL, 酶活力比出发菌株提高了 1.58 倍。将 G-41-68 再次进行重离子辐照处理, 筛选出碱性蛋白酶高产菌株 15Gy54, 其产酶活力达到 6.22×10^4 U/mL, 酶活力比出发菌株提高了 2.65 倍。通过发酵试验研究, 得到 15Gy54 菌株的最佳发酵条件。在最适发酵条件下, 15Gy54 菌株产酶活力可达到 7.18×10^4 U/mL。研究结果充分证实了重离子辐照诱变对微生物的诱变效应。

国内有关碱性蛋白酶方面的研究成果比较多。邱秀宝^[21]从甘蔗渣中分离出一株嗜碱性短小芽孢杆菌, 用 NTG 反复处理后得到抗利福平突变株 SMI-P, 在 3 m³ 发酵罐的产酶活性达 18000 U/mL, 该酶即使在 28°C 测定活力也有 9600 U/mL。薛林贵等^[22]用 UV 对地衣芽孢杆菌 No.53 原生质反复多次处理, 获得突变株 53-C38-6, 使产酶活力提高了 20 倍, 达 22080 U/mL。潘延云等^[23]利用原生质体融合法将地衣芽孢杆菌 2709 与含有碱性蛋白酶基因克隆载体 PDW₂ 的工程菌枯草芽孢杆菌 BD105 进行细胞融合得到一株高产菌株 A16, 发酵产酶比 2709 高 50%–100%, 摇瓶试验产酶可达 30000 U/mL。李祖明等^[24]采用 5 L 发酵罐研究短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) 2080 产碱性蛋白酶的扩大培养, 在较优的扩大培养条件下, 短小芽孢杆菌 2080 碱性蛋白酶的产率较摇瓶水平提高了 28%, 达到 5.17×10^6 U/mL, 而发酵时间缩短为 42 h, 从而提高了生产效率, 降低了产酶成本。本研究筛选出的碱性蛋白酶高产菌株 15Gy54 产酶活力较出发菌株有很大提高, 进一步证实了重离子束辐照技术在微生物诱变育种中具

有非常良好的效果, 具有广阔的发展应用前景。

参 考 文 献

- [1] 胡学智, 王俊. 蛋白酶生产和应用的进展. 工业微生物, 2008, **38**(4): 49–61.
- [2] 桑金隆, 竺莉红, 李孝辉, 等. 离子注入诱变选育之江菌素产生菌. 科技通报, 2002, **18**(1): 63–66.
- [3] 虞龙, 张宁. 离子注入微生物诱变育种的研究与应用进展. 微生物学杂志, 2005, **25**(2): 80–83.
- [4] 宫春波, 刘鹭, 谢丽源, 等. 离子注入微生物诱变育种研究进展. 生物技术, 2003, **13**(2): 47–49.
- [5] 庞敏, 姚建铭. 低能 N^+ 注入产色氨酸酶大肠杆菌的育种研究. 辐射研究与辐射工艺学报, 2009, **27**(3): 167–172.
- [6] 杨转琴, 李宗伟, 丁晓兵, 等. 低能离子注入高效降解蛋白菌株的诱变选育研究. 生物物理学报, 2009(25): 484–485.
- [7] 陈洪卫, 陈林海, 张国只. 低能氮离子注入诱变选育乳链菌肽产生菌的研究. 食品科学, 2009, **30**(7): 177–180.
- [8] 王福荣. 工业发酵分析. 北京: 中国轻工业出版社, 1997: 90–92.
- [9] 曲颖, 李文建, 周利斌. 重离子辐射植物的诱变效应研究及应用. 原子核物理评论, 2007, **24**(4): 294–298.
- [10] 颜红梅, 王浩瀚, 王菊芳. 重离子束定点诱变育种初探. 原子核物理评论, 2001, **18**(3): 174–176.
- [11] Zheng C. Hadron physics programs at HIRFL-CSRm: plan and status. *High Energy Physics and Nuclear Physics*, 2007, **31**(12): 1177–1180.
- [12] 金志华, 林建平, 梅和乐. 工业微生物遗传育种学原理与应用. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [13] 沈萍微, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [14] K 巴克. 分子生物学实验室工作手册. 北京: 北京科学出版社, 2005.
- [15] Genckal H. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006(39): 703–710.
- [16] Shikha. Improved production of alkaline protease from a mutant of alkalophilic *Bacillus pantotheneticus* using molasses as a substrate. *Bioresource Technology*, 2007(98): 881–885.
- [17] Seyedeh Faranak Ghaemi Oskouie, Fatemeh Tabandeh, Bagher Yakhchali, et al. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, **39**(1): 37–42.
- [18] 胡承, 彭勇, 王忠彦, 等. 地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究 I. 碱性蛋白酶高产菌的筛选及产酶条件初探. 工业微生物, 1999, **29**(4): 27–30.
- [19] 辛益军. 方差分析与实验设计. 北京: 高等教育出版社, 2001: 209–278.
- [20] 黄红英, 方海红, 刘爱民, 等. 一株地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究 I. 微生物学通报, 2001, **28**(5): 20–24.
- [21] 邱秀宝. 嗜碱芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究. 微生物学报, 1990, **30**(2): 129–133.
- [22] 薛林贵, 冯清平. 紫外线处理地衣芽孢杆菌原生质体选育碱性蛋白酶高产株的研究. 兰州大学学报: 自然科学版, 1997, **33**(2): 72–78.
- [23] 潘延云, 张贺迎, 周艳芬, 等. 原生质融合构建高产碱性蛋白酶工程菌. 应用与环境生物学报, 2002, **8**(4): 422–426.
- [24] 李祖明, 李鸿玉, 王德良, 等. 短小芽孢杆菌 2080 产碱性蛋白酶的扩大培养. 食品科技, 2009, **34**(4): 14–17.

栏目介绍

生物实验室

将原来“技术与方法”栏目改为“生物实验室”。刊发的文章主要侧重于从实验室科研人员的角度, 深度报道使用某种仪器设备进行实验后所获得的最新结果, 交流由此衍生出的新技术新方法。希望此栏目能够成为架起实验室与实验室, 以及实验室与仪器生产商之间联系的桥梁。