

# 大气压辉光放电低温等离子体诱变选育谷氨酰胺转氨酶高产菌株

夏书琴<sup>1,2</sup> 刘龙<sup>1,2\*</sup> 张东旭<sup>1,2</sup> 李江华<sup>1,2</sup> 堵国成<sup>1,2\*</sup> 陈坚<sup>3</sup>

- (1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)  
(2. 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)  
(3. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 以茂源链轮丝菌(*Streptovercillium mobaraense*) 03-10 为出发菌株, 采用一种新型的裸露电极大气压辉光放电的冷等离子体技术对链霉菌孢子进行诱变。根据双层平板法菌落显色及诱变处理后菌落形态差异快速筛选谷氨酰胺转氨酶高产突变株。突变率、正突变率分别达到 42.8% 和 20.6%。最后复筛选育出具有较好遗传稳定性和形态稳定性的高产突变株 G2-1, 酶活达到 2.73 U/mL, 比出发菌株提高了 82%。

**关键词:** 大气压辉光放电低温等离子体, 谷氨酰胺转氨酶, 茂源链轮丝菌, 显色

## Mutation and Selection of Transglutaminase Producing Strain by Atmospheric Pressure Glow Discharge Plasma

XIA Shu-Qin<sup>1,2</sup> LIU Long<sup>1,2\*</sup> ZHANG Dong-Xu<sup>1,2</sup> LI Jiang-Hua<sup>1,2</sup>  
DU Guo-Cheng<sup>1,2\*</sup> CHEN Jian<sup>3</sup>

- (1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)  
(2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)  
(3. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** A novel mutation approach, namely, the atmospheric pressure glow discharge (APGD) plasma jet driven by a radio frequency (RF) power, was used to treat the spores of *Streptovercillium mobaraense* 03-10 for the selection of transglutaminase (TGase) producer. The mutant with high TGase production was quickly screened according to the formation of color on the double-layered plate and the different appearances of colonies. The total mutation rate was over 42.8% and the positive mutant rate was 20.6%. The obtained mutant G2-1 has good genetic and morphological stability and TGase activity reached 2.73 U/mL, which was higher 82% than that of original strain.

**Keywords:** Atmospheric pressure glow discharge plasma, Transglutaminase, *Streptovercillium mobaraense*, Color-forming

基金项目: 国家杰出青年基金项目(No. 20625619); 国家 973 计划项目(No. 2007CB714306); 国家自然科学基金重点项目(No. 20836003); 国家 973 计划研究专项(No. 2010CB535014); 中央高校基本科研业务费专项(No. JUSR30901)

\* 通讯作者: 刘龙: Tel: 86-510-85329031; Fax: 86-510-85918309; ✉: longliu@jiangnan.edu.cn  
堵国成: Tel: 86-510-85918309; Fax: 86-510-85918309; ✉: gdcdu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2010-04-30; 接受日期: 2010-07-09

微生物谷氨酰胺转氨酶(蛋白质-谷氨酸-谷氨酰胺转氨酶, Microbial Transglutaminase, EC21312113, 简称 MTGase)是一种催化酰基转移反应的转移酶。它能催化蛋白质分子内、分子间发生交联、蛋白质和氨基酸之间的连接以及蛋白质分子内谷氨酰胺基的水解反应,从而直接改变蛋白质本身以及蛋白质所附着的细胞、组织等的结构与功能特性,提高蛋白质的营养价值。因此,MTGase 在食品、纺织、生物制药等领域有着广泛的应用前景<sup>[1-3]</sup>。

由于 MTGase 特殊的催化特性,设计一种高效的初筛方法成为筛菌工作的关键且面临着极大的挑战。有关设计筛选高产 MTGase 菌株的研究很多,主要是通过液体培养产酶菌对蛋白质的交联絮凝沉淀或菌落形态与产酶关联或直接液体发酵来筛选<sup>[4-7]</sup>。本研究依据 *S. mobaraense* 在固体培养基中分泌产酶的特性以及酶的催化特性,设计双层平板法显色来反映平板上菌落产酶水平,用于 MTGase 高产菌株筛选,并探讨了该方法的可行性,为高效和定向选育 MTGase 高产菌株奠定了坚实基础。

同时,本研究利用一种新型诱变技术——大气压辉光放电(APGD)低温等离子体技术对 *S. mobaraense* 进行诱变处理,以获得 MTGase 的高产菌株。近期研究表明,大气压低温等离子体是一种新型等离子体源,所产生的等离子体具有气体温度低、电子温度高的非平衡特性以及活性粒子浓度高的特点,能作用于微生物的遗传物质,使其在短时间内致畸突变<sup>[8]</sup>。由于等离子体温度低,不会对菌种造成热损伤,而活性粒子浓度高则可以产生明显的诱变效果,因此可以用于诱变育种。该方法首次应用在 *Streptomyces avermitilis* 的选育中<sup>[9]</sup>,取得了较好的效果。本研究应用大气压低温等离子体育种装置进行诱变<sup>[10]</sup>,与低气压低温等离子体相比,此装置产生的大气压低温等离子体源,由于不需要真空腔及相应的辅助运输设备,因而具有成本低、体积小、操作简便、安全性高、对人体无副作用、对环境无污染等优点。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

茂源链轮丝菌(*Streptovercillium mobaraense*) 03-10(实验室保藏编号)。

### 1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基(g/L): 麦芽粉(Difco) 3, 葡萄糖

4, 酵母膏 4, 琼脂粉 20, pH 7.0。

1.2.2 孢子萌发培养基: 2XYT 培养基<sup>[11]</sup>。

1.2.3 稀释液: 同 1.2.2。

1.2.4 种子培养基(g/L): 甘油 20, 蛋白胨 20, 酵母膏 5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2, pH 7.0。

1.2.5 发酵培养基(g/L): 甘油 20, 蛋白胨 20, 酵母膏 5, 大豆粉 15, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2, CaCO<sub>3</sub> 5, pH 7.4。

### 1.3 主要试剂

$\alpha$ -N-Carbobenzyloxy-Glutamine-Glycine ( $\alpha$ -N-CBZ-GLN-GLY)和 L-谷氨酸- $\gamma$ -单羟胺酸(HCA)均购自 Sigma 公司; 谷胱甘肽(还原型)购自华美生物公司; 固体培养基用的蛋白胨、麦芽粉、酵母粉均购自美国 BD 公司; 蛋白胨为海豚牌食品级蛋白胨(酶解蛋白胨), 购自上海食肉类有限公司; 酵母膏购自广东一品鲜生物科技有限公司; 大豆粉购自北京康明威培养基技术有限公司; 其余试剂均为国产分析级纯。

### 1.4 方法

1.4.1 谷氨酰胺转氨酶酶活测定: 比色法测定酶活<sup>[12]</sup>, 以  $\alpha$ -N-CBZ-GLN-GLY 为作用底物, L-谷氨酸- $\gamma$ -单羟胺酸做标准曲线。1 个单位谷氨酰胺转氨酶酶活定义为: 37°C 时每分钟催化形成 1  $\mu$ mol L-谷氨酸- $\gamma$ -单羟胺酸的酶量(U/mL)。酶活测定条件: 37°C 反应 10 min。酶催化反应方程式如图 1 所示。

1.4.2 出发菌株准备: 将菌种从安培管中转接入茄子瓶斜面培养基上, 置于 32°C 培养 7 d, 传 1 代活化。

1.4.3 孢子悬液的制备: 用接种铲刮茄子瓶菌苔 1/4 左右于装有 20 mL 无菌水和 20 颗玻璃珠的 250 mL 三角瓶中, 200 r/min、32°C 振荡 30 min, 经 3 层灭菌擦镜纸过滤即得孢子悬液。

1.4.4 诱变前培养: 10 mL 孢子悬液接种于装有 25 mL 孢子萌发培养基 250 mL 三角瓶中, 200 r/min、32°C 培养 3 h。

1.4.5 双层平板法显色实验: 在涂有孢子稀释液 32°C 培养 6 d 的斜面培养基平板上, 倒入 10 mL 冷却至 50°C 左右的上层培养基。待一定时间后, 均匀覆盖 2.8 mL 显色剂显色(显色剂的量保证在反应中过量且能覆盖整个平板)。显色反应为: 100 mg 的底物<sup>[13]</sup>  $\alpha$ -N-CBZ-GLN-GLY 溶解于 2 mL 0.2 mol/L 的 NaOH 溶液中, 加入 0.2 mol/L pH 6.0 的 Tris-HCl 缓冲液 4 mL, 0.1 mol/L 羟胺 2 mL, 0.01 mol/L 的还原型谷胱甘肽 2 mL, 并调节 pH 至 6.0。

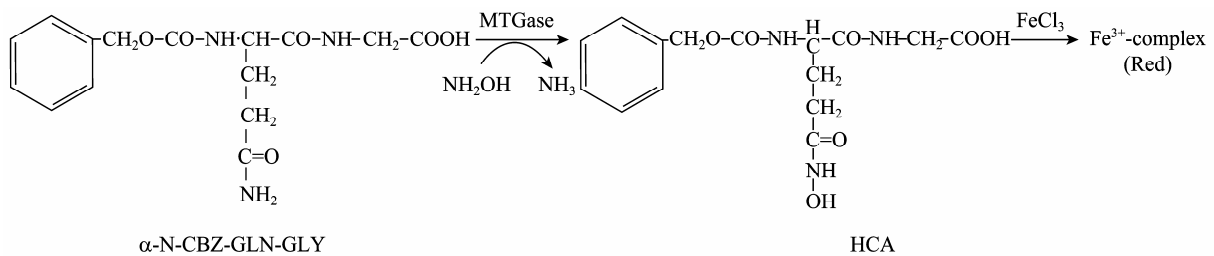


图1 酶催化反应方程式  
Fig. 1 Enzymatic reaction equation

上层培养基: 0.1%琼脂, 一定量底物, 0.2 mol/L Tris-HCl (pH 6.0)缓冲液, 总体积 10 mL, 底物待琼脂培养基冷却至 50°C 左右经过 0.22 μm 针头式过滤器(水系)过滤后加入。

显色剂: 0.2 mol/L Tris-HCl (pH 6.0)缓冲液: 5% FeCl<sub>3</sub>:水 = 1:1:1 混合, 经 0.22 μm 针头式过滤器(水系)过滤。

**1.4.6 RF APGD 等离子体诱变方法:** 大气压低温等离子体诱变育种装置<sup>[14]</sup>及操作方法<sup>[9]</sup>, 本研究采用高纯氦气作为等离子体的工作气体, 电源功率 40 W, 照射距离 2 mm, 等离子体的温度 < 40°C, 气流量 12.5 L/min, 处理菌液 10 μL。孢子前培养液稀释至适当倍数(实验以 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup>为宜, 浓度用 CFU 法确认)<sup>[9]</sup>, 进行等离子体照射, 选择照射时间 1、2、3、4、5、6 min。

**1.4.7 初筛:** 每个实验平板采用双层平板法初筛, 加入显色剂观察显色变化。挑出所需要的菌落保藏斜面试管, 32°C 培养 7 d, 接种一环生长良好的斜面培养物至装有 25 mL 发酵培养基 250 mL 的三角瓶中, 200 r/min、32°C 培养 45 h, 发酵液于 8000 r/min 离心 4 min, 取上清液测酶活。

**1.4.8 复筛:** 接种一环生长良好的初筛斜面培养物至装有 100 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 200 r/min、32°C 培养 24 h, 按 10%的接种量接种于发酵培养基中, 培养测定条件同初筛。

**1.4.9 遗传稳定性和形态稳定性实验:** 将复筛所得的高产突变株每 7 d 传代 1 次, 连续 6 代, 摇瓶发酵测定酶活(方法同复筛), 并将新传代的斜面制备孢子悬液, 稀释涂布斜面培养基平板, 32°C 培养 6 d, 得到菌落数在 10 个左右的平板 10 个, 观察菌落形态变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 出发菌株双层平板法实验验证

**2.1.1 上层培养基中底物量的确定:** 在有关产酶机理的研究中指出, 在链霉菌中 TGase 是以酶原形式分泌到胞外, 并在自身蛋白酶作用下活化为成熟酶<sup>[15]</sup>。关于 TGase 固体培养中活化过程的研究结果表明: TGase 在营养菌丝的生长阶段并不分泌, 而是在分化形成气生菌丝时才开始分泌和活化, 并在形成孢子后停止酶原的活化过程<sup>[16]</sup>。本研究中基于上述理论, 设计双层平板法, 即选择菌落培养至处于气生菌丝生长阶段的平板, 加上含有酶作用底物的上层培养基, 并通过添加显色剂显色来反映单菌落产酶水平, 显色反应式见图 1。

首先考察上层培养基中不同底物添加量对出发菌株菌落显色的影响, 选择单菌落数在 15-20 个之间的平板作为实验平板, 倒入上层培养基, 32°C 培养 12 h 后, 加入显色剂。结果如图 2 所示。

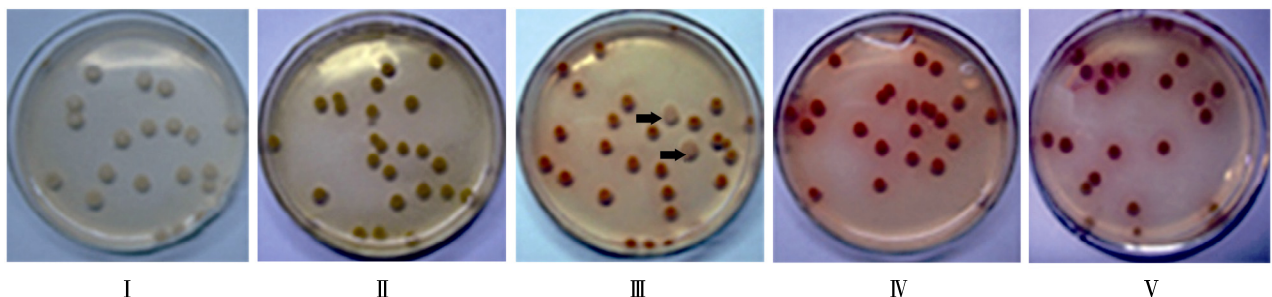


图2 不同底物添加量平板显色图

Fig. 2 The images of the plates after the addition of different doses of substrate

注: I、II、III、IV、V 底物添加量分别为 0、0.2、0.4、0.6 和 1 mL。

Note: The substrate dose in I, II, III, IV, V was 0, 0.2, 0.4, 0.6 and 1 mL, respectively.

由图 2 可知: 随着底物添加量的增加, 在平板上逐渐显现出肉眼可见的红色现象, 说明本实验设计的双层平板法能够直观快速地反映出菌株的产酶特性; 同时底物添加量有一临界点, 低于一定的量肉眼观察显色不明显, 考虑成本, 在后面研究中选择底物添加量为 500  $\mu\text{L}$ ; 第 III 个平板中黑色箭头标示出的两个菌落, 为出发菌株在传代中自然突变产生的光秃型, 没有显色现象, 同时摇瓶发酵验证两株菌不产酶, 这说明该方法可以用于产酶菌株的筛选。

**2.1.2 出发菌株显色时间的确定:** 确定出发菌株显色所需的底物添加量(500  $\mu\text{L}$ )后, 进一步考察了在固定的培养时间(6 d)和显色剂的量(2.8 mL)时, 出发菌株分泌的酶量能够催化生成足够肉眼可见的红色络合物所需要的时间。

为确定出发菌株显色时间, 选择单菌落数在 15–20 个之间的 6 个平板作为实验平板, 待上层培养基凝固后立即添加显色剂, 32 $^{\circ}\text{C}$  放置不同时间后, 观察显色现象出现的情况, 如表 1 所示。

表 1 平板上显色结果							
Table 1 The result of color reaction on plate							
时间 Time (h)	0	2	4	6	8	10	12
显色 Color reaction	-	-	-	+	++	+++	++++

注: +: 显红色, “+”越多表示红色越深; -: 无显色现象。

Notes: +: Red color, the more “+”, the deeper color; -: No color reaction.

从表 1 可知: 出发菌株显色的临界时间为 6 h, 添加上层培养基和显色剂后, 培养时间低于 6 h 时无显色现象。由以上结论, 在筛选突变体产酶菌株中, 可以按照如图 3 所示的模型图指示的原理进行突变株的筛选, 即当含有突变体菌落的实验平板在培养时间、上层培养基中底物量以及显色剂量均与出发菌株实验平板相同的情况下, 菌落显色时间先于出发菌株, 且在出发菌株显色的时间点颜色深于出发菌株, 说明该突变株达到与出发菌株相同酶量所需的时间短, 产酶能力高于出发菌株, 能够初步判断为正突变菌株。但由于颜色的时间判断不能排除主观误差, 不能得出最后的准确酶活高低, 该方法能用于初筛。

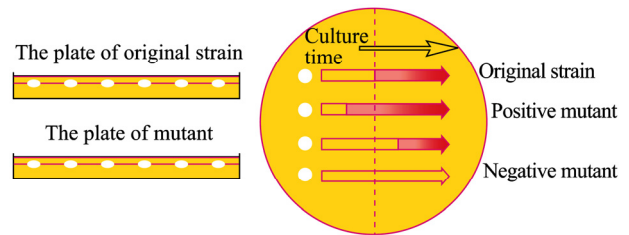


图 3 双层平板法用于突变株筛选的原理模型图

Fig. 3 The double-layered plate model for the screening of mutant

## 2.2 RF APGD 等离子体诱变育种

**2.2.1 RF APGD 等离子体照射剂量的确定:** 出发菌株前培养液经不同时间照射后, 用稀释液进行梯度稀释, 然后涂布于斜面培养基平板, 培养 6 d, 不经过照射处理的对照组孢子悬液以同样方法过程进行, 用于计算致死率和形态突变率<sup>[5]</sup>。根据致死率 (%) = 100 × (对照组每 mL 活菌数 - 诱变组每 mL 活菌数) / 对照组每 mL 活菌数, 得到每个照射时间下的致死率, 如图 4 所示; 根据形态突变率 (%) = 100 × (诱变涂布平板的形态突变菌落 / 诱变涂布平板的总菌落), 本研究对菌落形态突变的定义为: 菌落表面凹凸或褶皱形成纹理或颜色不同于出发菌株的情况, 计算得到每个照射时间下的形态突变率, 如图 5 所示。

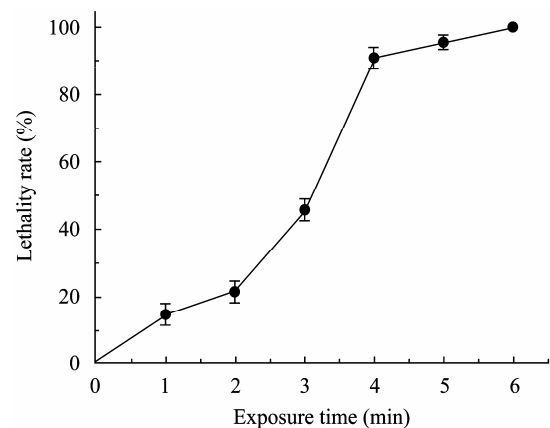


图 4 不同照射时间下的致死率曲线

Fig. 4 Influence of exposure time on the lethality rate

由图 4 可知, 等离子体对实验菌株的致死率之间存在着明显的剂量效应关系, 随着照射时间的延长, 致死率逐渐增加, 当照射时间达到 6 min 时, 致死率达到 100%; 由图 5 可知, 形态突变率随着照射时间的增加而提高, 当达到 4 min 时达到最大, 延长



照射时间, 突变率反而下降。通过以上研究结果可以得出: RF APGD 等离子体照射剂量-存活率-形态突变率三者的最佳结合点为 4 min, 本研究选择 4 min 的剂量为诱变剂量。

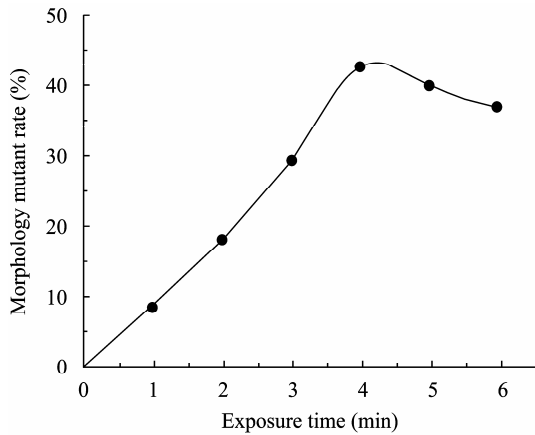


图 5 不同照射时间下的形态突变率曲线

Fig. 5 Influence of exposure time on the morphology mutation rate

**2.2.2 RF APGD 等离子体照射处理后菌落形态:** 对出发菌株进行 RF APGD 等离子体诱变, 照射时间 4 min, 斜面培养基平板培养 6 d, 250 个单菌落生长在 30 个平板上(平均每个平板菌落数在 8-12 之间), 大约有 100 个单菌落形态发生了突变, 将形态突变的菌落分为 14 类(代号为 G1-G14), 其他与出发菌株形态相同的菌落代号为 G15, 每一类形态挑选一株典型菌落代表, 各形态特征如图 6 所示。代号为 G15, 与出发菌株形态同, 呈馒头型, 表面没有褶皱, 白色; 代号为 G1、G2、G4、G5、G6、G8、G9、G10、G11、G12、G13、G14 与出发菌株形态相比, 表面凹凸或形成褶皱不同; 代号为 G3, 菌落中心凹陷, 菌落表面气生菌丝略呈黄色; 代号为 G7, 菌落中心呈黄绿色, 略有褶皱。

**2.2.3 诱变初筛结果:** 首先利用双层平板法对 30 个平板上 250 个单菌落进行初筛, 待上层培养基凝固后立即添加显色剂, 32°C 培养, 每隔 2 h 观察平板显色情况, 结果如表 2 所示。

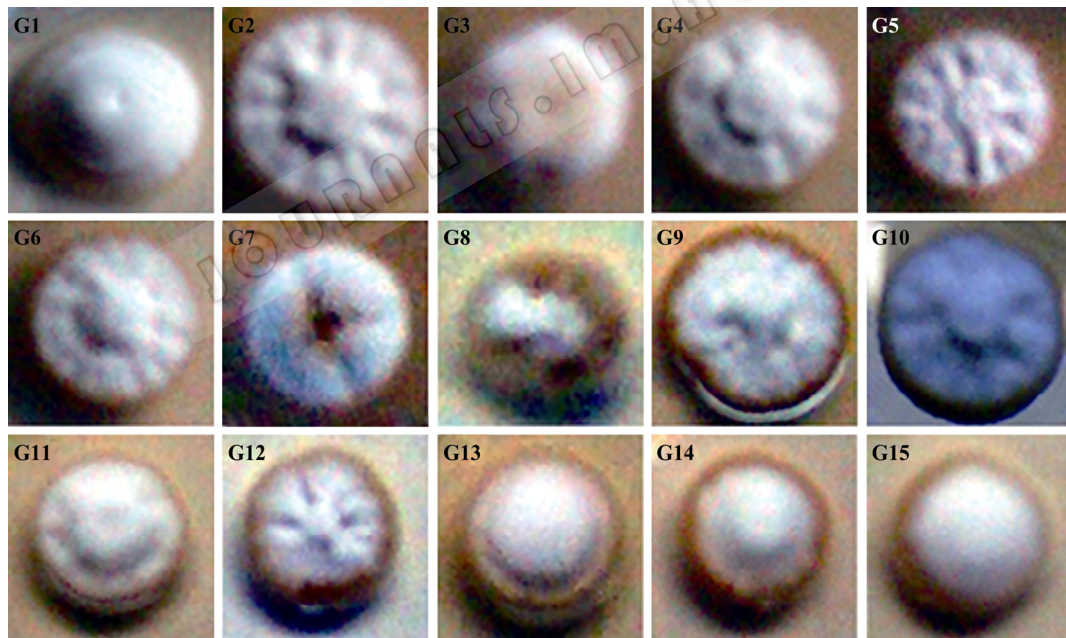


图 6 RF APGD 等离子体诱变后的典型菌落形态特征

Fig. 6 Typical images of the colonies after treated by RF APGD plasma jet

注: G1-G14 为形态与出发菌株不同的典型菌落代表; G15 为与出发菌株形态相同菌落代表; 所有的菌落形态来自于等离子体照射孢子液, 涂布后 32°C 生长 6 d 的平板。各菌落实际直径: G1: 2 cm; G2: 9.3 mm; G3: 8 mm; G4: 9 mm; G5: 8.5 mm; G6: 8.5 mm; G7: 6.5 mm; G8: 5.5 mm; G9: 8.5 mm; G10: 8 mm; G11: 8 mm; G12: 7.5 mm; G13: 6 mm; G14: 7 mm; G15: 5 mm-7 mm。

Notes: G1-G14, the selected mutants had clearly different morphology compared with the original strain; G15, the selected colony had an appearance similarity to the original strain. All pictures were obtained after treated spores plate had been cultivated for 6 days at 32°C. The exact diameter of the colonies: G1: 2 cm; G2: 9.3 mm; G3: 8 mm; G4: 9 mm; G5: 8.5 mm; G6: 8.5 mm; G7: 6.5 mm; G8: 5.5 mm; G9: 8.5 mm; G10: 8 mm; G11: 8 mm; G12: 7.5 mm; G13: 6 mm; G14: 7 mm; G15: 5 mm-7 mm.

由表 2 可知: 菌落形态为代号 G2、G4、G6、G10 的突变株 4 h 显色, 菌落形态为代号 G1、G5、G14、G15 的突变株 6 h 显色, 菌落形态为代号 G3 的突变株 10 h 显色, 且均随着时间延长至 12 h, 显色没有减弱, 其他形态菌落到 12 h 无显色现象。由于出发菌株显色时间为 6 h, 因此可以初步判断菌落形态如代号 G2、G4、G6、G10 为正突变形态, 菌落

形态如代号 G3、G7、G8、G9、G11、G12、G13 为负突变形态。

为了进一步验证, 12 h 内显色菌落进行编号保藏斜面试管, 任意挑选其中每一代号形态菌落斜面试管两株, 分别编号为 Gm-1、Gm-2 (m 显色菌落分类代号), “W”表示出发菌株, 进行摇瓶初筛, 结果如图 7 所示。

表 2 双层平板初筛显色结果  
Table 2 The result of color reaction with double-layered plate screening

菌落编号 No. of colony	菌落数量 Colony number	Time (h)					
		2	4	6	8	10	12
G1	4	-	-	+	++	+++	++++
G2	7	-	+	++	+++	++++	+++++
G3	3	-	-	-	-	+	++
G4	5	-	+	++	+++	++++	+++++
G5	3	-	-	+	++	+++	++++
G6	4	-	+	++	+++	++++	+++++
G7	6	-	-	-	-	-	-
G8	4	-	-	-	-	-	-
G9	2	-	-	-	-	-	-
G10	6	-	+	++	+++	++++	+++++
G11	3	-	-	-	-	-	-
G12	3	-	-	-	-	-	-
G13	3	-	-	-	-	-	-
G14	54	-	-	+	++	+++	++++
G15	143	-	-	+	++	+++	++++

注: +: 显红色, “+”越多表示红色越深; -: 无显色现象。

Notes: +: Red color, the more “+”, the deeper color; -: No color reaction.

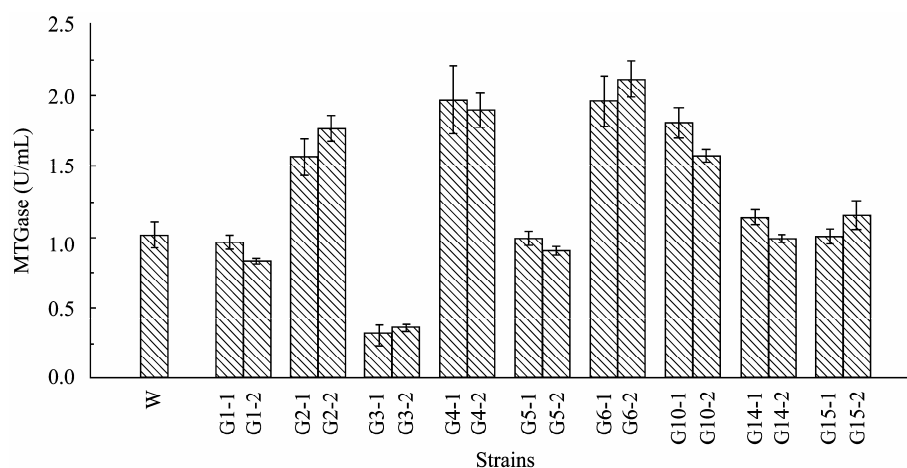


图 7 显色菌落的摇瓶初筛结果

Fig. 7 The primary screening results of shaker culture

由以上选择的 18 株菌和出发菌株的摇瓶初筛结果,进一步确定了菌落形态如代号 G2、G4、G6、G10 形态的菌株为正突变菌株(相对酶活 > 105%),根据平板上各类形态菌落的数量(表 2 所示),得出总突变率和正突变率<sup>[9]</sup>: 总突变率 = 形态突变菌落数/总菌落数 = (250-143)/250 = 42.8%,

正突变率 = 正突变的菌落数/总突变菌落数 = 22/(250-143) = 20.6%。

**2.2.4 复筛结果:** 由初筛结果确定了正突变株形态,对正突变菌株进行编号,然后复筛,得到最高酶活的 3 株菌,结果如表 3 所示。

菌株编号 The No. of colony	W	G2-1	G4-3	G6-3
酶活 MTGase (U/mL)	1.50 ± 0.03	2.73 ± 0.09	2.55 ± 0.13	2.97 ± 0.12

由表 3 得: 突变株 G2-1、G4-3、G6-3, 比出发菌株酶活分别提高了 82%、70%、98%。

### 2.3 诱变菌株的遗传稳定性和形态稳定性验证

筛选到的链霉菌突变株除了遗传稳定性外,同时存在着自然分化的现象,主要是由于链霉菌细胞是多核单细胞,且对于诱变选育的突变体在传代中可能会出现表型延迟现象,这样就会出现不纯菌落,这些不稳定性的存在,会导致筛选到的高产菌株经传代后很快出现生产性状“衰退”<sup>[17]</sup>。因此,对筛选到的 3 株高产突变株 G2-1、G4-3、G6-3 进行遗传稳定性和形态稳定性的验证,结果分别如图 8、9 和 10 所示。

经过连续传代 6 次,突变株 G2-1、G4-3、G6-3 酶活分别下降 2.2%、2.9%、9.7%,菌落形态突变分别下降 4.0%、4.2%、15.8%,相比于菌株 G4-3 和 G6-3, G2-1 有较高的酶活,且具有良好的遗传稳定性和形态稳定性。

## 3 结论

本研究采用一种新型的诱变育种手段大气压辉光放电低温等离子体作用于处于活化状态的 *S. mobaraense* 03-10 的孢子,筛选 MTGase 高产菌株,这种诱变方法在 MTGase 菌株选育中首次应用,取得了很好的效果,筛选到了比出发菌株酶活提高 82% 的突变株 G2-1,并通过传代实验验证了该菌株

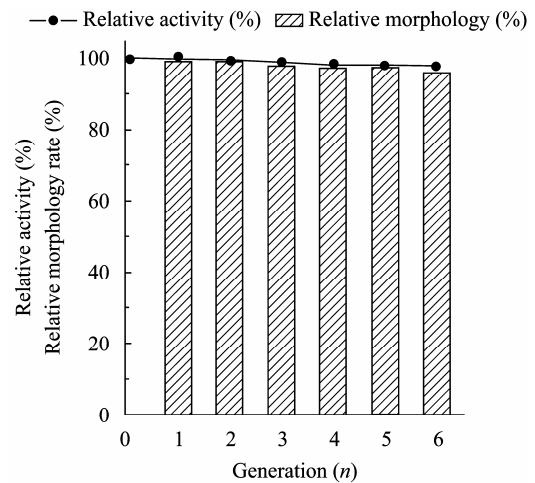


图 8 G2-1 的遗传和形态稳定性

Fig. 8 Genetic and morphological stability of mutant strain G2-1

注: 本研究中相对形态比率指的是考察的 10 个平板上(每个平板单菌落数 10 个左右),具有该菌落形态的菌落数在总菌落数中所占的百分数。下同。

Note: In this work, the relative morphology rate refers to the percentage of the colonies with targeted morphology in the total colonies. Same below.

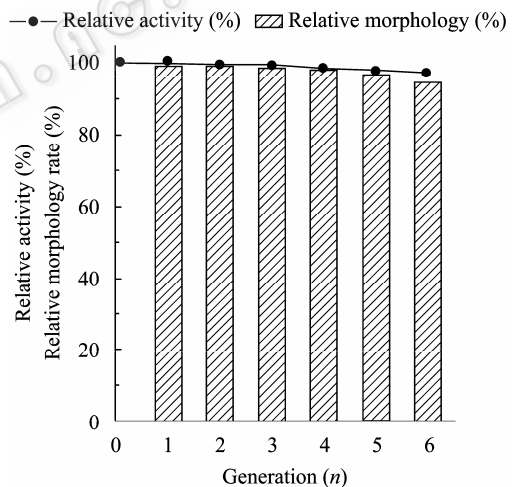


图 9 G4-3 的遗传和形态稳定性

Fig. 9 Genetic and morphological stability of mutant strain G4-3

具有良好的遗传稳定性和形态稳定性。证明了大气压辉光放电低温等离子体技术在微生物育种中切实可行,为诱变选育改善微生物的生产能力提供了一条新的途径。

有研究表明: RF APGD 能够以一种独特的机制破坏单核苷酸的磷酸二酯键,依据核苷酸序列不同将寡核苷酸降解成不同的小片段<sup>[8]</sup>。在放线菌中,形态的多样性反映了基因型的多样性<sup>[18]</sup>,关于放线菌产 MTGase 的研究中也指出:菌落形态与产酶之间存在着一定的相关性<sup>[5,19]</sup>。本研究利用 RF APGD 处

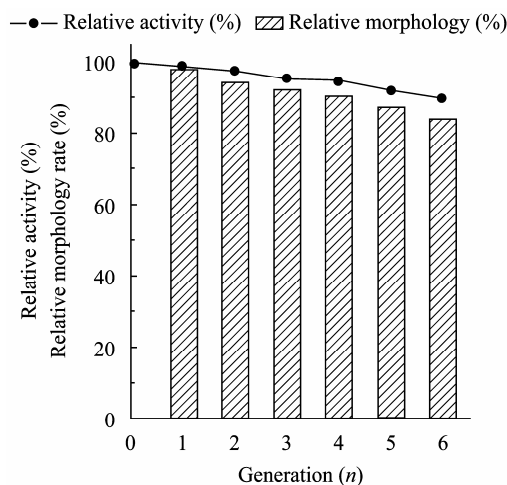


图 10 G6-3 的遗传和形态稳定性

Fig. 10 Genetic and morphological stability of mutant strain G6-3

理 *S. mobaraense* 03-10 孢子液, 培养获得了具有不同表型的突变株, 通过比较不同形态的突变株与出发菌株的产酶能力, 确定了正突变株的形态, 简化了筛选过程, 提高了筛选效率。

另外, 在建立筛选 MTGase 高产菌株方法上, 设计双层平板法比较突变菌株与出发菌株显色差异进行初筛, 在本研究中得到了很好的应用, 并验证了该方法的有效性, 为定向选育 MTGase 高产菌株提供了指导; 与常用的液体培养筛选 MTGase 高产菌株方法相比较, 由于在双层平板法的设计中, 上层培养基是在底层平板菌落未形成孢子时倒入, 不会造成污染, 能够固定菌落, 且通过显色差异进行筛选, 直观、灵敏、简便; 而且, 本研究中设计的双层平板法, 首次利用菌株生长分化与产酶关系, 将生长与产酶相结合用于突变体菌株的筛选过程中, 为定向筛选突变体酶提供了新思路和新方法。

致谢: 清华大学化工学院邢新会教授、金丽华老师, 实验室各位老师同学对本文中的 RF APGD 等离子体诱变提供了帮助, 在此表示衷心的感谢。

## 参 考 文 献

[1] Ando H, Adachi M, Umeda K, *et al.* Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1989, **53**(10): 2613-2617.

[2] Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, *et al.* Microbial transglutaminase a review of its production and application in food processing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995, **44**(3): 277-282.

[3] Seguro K, Nio N, Motoki M. Some characteristics of a microbial protein cross-linking enzyme: transglutaminase.

Washington DC: American Chemical Society [1974], 1996(650): 271-280.

- [4] 王灼维, 王璋, 刘新征, 等. 产谷氨酰胺转氨酶菌株筛选方法初步探讨. 第十届全国生物化工学术会议论文集, 2002: 425-428.
- [5] 王璋, 王灼维, 莫湘筠. 微生物转谷氨酰胺酶的生产菌种选育和发酵生产分析. *生物加工过程*, 2003, **1**(1): 52-59.
- [6] 崔国燕, 胡青平. 蛋白质交联-絮凝沉淀法筛选产转谷氨酰胺酶放线菌株的效果分析. *沈阳农业大学学报*, 2008, **39**(5): 632-634.
- [7] 王璋, 王灼维, 莫湘筠. 微生物谷氨酰胺转氨酶生产菌株的育种研究. *中国生物工程杂志*, 2003, **23**(6): 1-5.
- [8] Li G, Li HP, Wang LY, *et al.* Genetic effects of radio-frequency, atmospheric-pressure glow discharges with helium. *Applied Physics Letters*, 2008(92): 221-504.
- [9] Wang LY, Huang ZL, Li G, *et al.* Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, **108**(3): 851-858.
- [10] 清华大学. 大气压低温等离子体育种装置: 中国, ZL 200820079382.1. 2009.
- [11] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, *et al.* *Practical Streptomyces Genetics*. 2nd. England: The John Innes Foundation Norwich, 2000: 417.
- [12] Grossowicz N, Wainfan E, Borek E, *et al.* The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *J Biol Chem*, 1950, **187**(1): 111-125.
- [13] 段宇珩. 离子束诱变谷氨酰胺转氨酶高产菌株选育. 郑州大学硕士学位论文, 2005.
- [14] Li HP, Sun WT, Wang HB, *et al.* Electrical features of radio-frequency, atmospheric-pressure, bare-metallic-electrode glow discharges. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 2007, **27**(5): 529-545.
- [15] Zotzel J, Keller P, Fuchsbaue HL. Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease. *European Journal of Biochemistry*, 2003, **270**(15): 3214-3222.
- [16] 张东旭. 吸水链霉菌谷氨酰胺转氨酶的活化机制和生理功能. 江南大学博士学位论文, 2008.
- [17] 周德庆. *微生物学教程*. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 213-216.
- [18] Hopwood DA. Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 1988, **235**(1279): 121-138.
- [19] 宋敏, 曹娟, 张颖颖, 等. 不同菌落形态的链霉菌对产谷氨酰胺转氨酶的影响. *广西农业生物科学*, 2008, **27**(4): 435-444.