

酱油曲霉孢子原生质体的制备与紫外诱变育种*

潘 力 李立凤 彭 昶 叶燕锐 王 斌

(华南理工大学 生物科学与工程学院, 510640, 广州)

摘 要 由1株分离、纯化自曲霉的酱油曲霉的分生孢子制备原生质体,并进行紫外诱变,得到7株中性蛋白酶活提高幅度较大的紫外突变株U系,中性蛋白酶活最高的1株达到6 197.4U,为出发株的1.94倍。对原生质体制备条件进行了优化:选取孢子生长旺盛的新鲜斜面培养物(培养5 d左右)制备孢子悬浮液;采用25 mmol/L β -巯基乙醇+5 mmol/L Na_2EDTA 体系预处理20 min;酶解条件是:1%溶菌酶+1%蜗牛酶+1%纤维素酶,山梨醇作为渗透压稳定剂(0.6 mol/L, pH 6.88),酶解温度33℃,酶解5 h;再生培养基为0.6 mol/L NaCl高渗透压豆汁培养基,涂布法再生。

关键词 酱油曲霉, 中性蛋白酶活, 分生孢子, 原生质体, 紫外诱变

酱油的主要质量指标为全氮和氨态氮的含量,提高原料全氮利用率是生产考核的主要内容^[1]。要达到这一点除了改进生产工艺外,还可以通过育种,改良菌种特性等方法实现。

酱油的酿造涉及到一个复合酶系,其中中性蛋白酶是主要的代表酶,通过育种提高菌种的中性蛋白酶活力对酱油酿造是有益的^[2]。常规育种一般是采用诱变剂对菌丝体直接进行处理,诱变效果不佳,而且由于存在多核问题,造成了遗传的不稳定性和筛选的困难。采用分生孢子制备原生质体,再对其进行紫外诱变可避免上述问题。

原生质体育种与常规真菌诱变育种相比有许多优点:操作简单、诱变效果好、易于形成单核体等。尤其是孢子原生质体的生理状况较为一致且多为单核,这比利用菌丝制备原生质体要优越得多,但是用分生孢子制备原生质体比菌丝更为困难^[3]。文中采用酱油曲霉的分生孢子制备原生质体并对其进行紫外诱变,获得了中性蛋白酶活有较大提高的突变菌株。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 出发菌株

酱油曲霉 BI, 分离纯化自石家庄鼎鑫牌酱油曲种。

1.1.2 培养基

豆汁培养基: KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g,

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, 可溶性淀粉 20 g, 琼脂粉 20 g, 豆汁 1 000 mL; 豆汁再生培养基: KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaCl 35.1 g, 可溶性淀粉 15 g, 琼脂粉 20 g, 豆汁 1 000 mL; 酪蛋白水解培养基: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.07 g, KH_2PO_4 0.36 g, 酪蛋白 8 g, 琼脂粉 20 g, 水 1 000 mL, pH 6.5~7.0; 三角瓶种曲培养基: 麸皮 85 g, 豆粕粉 15 g, 水 95 mL。

1.1.3 试 剂

0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 6.88)、0.6 mol/L 梨醇渗透压稳定剂(0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液+0.6 mol/L 山梨醇+0.01 mol/L Na_2EDTA)、 β -巯基乙醇反应体系(25 mmol/L β -巯基乙醇+5 mmol/L Na_2EDTA ^[6])、溶菌酶(Sigma)、蜗牛酶、纤维素酶(Novozyme188, Sigma)、溶壁酶(广州市微生物研究所)。所有试剂均用去离子水配制。

1.2 实验方法

1.2.1 原生质体制备^[7]

孢子悬浮液制备:用无菌水从新鲜斜面培养物洗脱孢子至有玻璃珠的试管,振荡使孢子分散,过滤除去菌丝和成团的孢子。

β -巯基乙醇预处理:离心收集孢子(8 000 r/min, 5 min, 4℃),用10 mL 无菌水悬浮,加0.1 mL Na_2EDTA 、17.34 μL β -巯基乙醇,室温下小心振荡20 min。

酶解:离心收集经预处理的孢子,再用无菌水洗涤1次,渗透压稳定剂悬浮,加入酶液,33℃水浴酶解。

取样:离心去除反应液,沉积的孢子用渗透压稳定剂洗涤1次,离心收集后用渗透压稳定剂悬浮,置

第一作者:博士,副教授。

* 广东省科技计划项目(2004B20201011)资助

收稿日期:2006-03-20, 改回日期:2006-06-20

冰中保存备用。

原生质体制备率(获得率)和再生率的计算:通过血球计数板计算孢子浓度。取空白对照菌液稀释一定倍数,在普通培养基培养并计菌落数为 A;将原生质体悬浮液稀释一定倍数,在普通培养基培养并计菌落数为 B;将原生质体悬浮液稀释一定倍数,在高渗再生培养基培养并计菌落数为 C。原生质体的制备率(获得率)和再生率按以下公式计算:

$$\text{原生质体制备率(获得率)} = [(A - B) / A] \times 100\%$$

$$\text{原生质体再生率} = [(C - B) / (A - B)] \times 100\%$$

1.2.2 原生质体紫外诱变

孢子原生质体浓度约 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL,磁力搅拌下紫外照射 30 s、60 s、90 s、120 s、150 s、180 s、210 s,照射距离为 10 cm。每 30 s 取菌液冰浴 1 h,用渗透压稳定剂稀释后涂布平板,每个样做 3 个平行,30℃ 避光培养 2 d。

1.2.3 初筛

将诱变所得的菌株分别穿刺接种于酪蛋白平板上,每个板都接 1 株对照出发株,30℃ 培养,测量 HC 值(HC=水解圈直径/菌落直径)。

1.2.4 复筛

种曲制备:参考文献[6]的方法进行。

粗酶液的浸提与福林酚法测定中性蛋白酶酶活:取种曲样品 1 g,加入 0.14 mol/L NaCl 30 mL,37℃ 浸提 3 h,离心提取酶液,用福林酚法测定中性蛋白酶酶活。

1.2.5 遗传稳定性试验

选取复筛得到的酶活较高的突变菌株进行连续传代,每次传代后制曲,利用福林酚法测定中性蛋白酶酶活。

2 结果与讨论

2.1 原生质体制备与再生

原生质体制备条件、再生方式、再生培养基、培养条件等因素都会影响其再生率^[8]。通过对原生质体制备条件的优化,综合制备率和经济节约考虑,最后确定酱油曲霉 BI 原生质体制备条件为:选取培养 5 d 开始旺盛生长、孢子呈绿色的新鲜斜面培养物制备孢子悬浮液,采用 25 mmol/L β -巯基乙醇 + 5 mmol/L Na_2EDTA 体系预处理,酶解条件是 1% 溶菌酶 + 1% 蜗牛酶 + 1% 纤维素酶,山梨醇作渗透压稳定剂(0.6 mol/L, pH 6.88),酶解温度 33℃,作用时间 5 h,再生培养基为 0.6 mol/L NaCl 高渗透压豆汁培养基,涂

布法再生。

2.1.1 破壁时间的初步确定

以 3% 纤维素酶为破壁酶,根据再生平板与普通平板的菌落数之间的差值,以及再生菌落数的多少,初步确定酶解破壁时间为 3% 纤维素酶酶解 5 h(酶解温度 33℃)。

2.1.2 不同破壁酶对原生质体制备的影响

真菌细胞壁的成分和结构变化很大,因其种类、部位、发育阶段以及培养方式而不同,因此酶解所需酶的种类、浓度以及酶解时间等要求不同^[8]。以蜗牛酶、纤维素酶、溶壁酶、Lysingenzyme、溶菌酶等的不同组合对最佳的破壁用酶及其条件进行优化,原生质体制备条件为:总酶浓度为 3%,渗透压稳定剂 0.6 mol/L KCl, pH 5.88, 33℃, 5 h。实验结果表明,1% 溶菌酶 + 1% 蜗牛酶 + 1% 纤维素酶的组有最佳的原生质体制备率和再生率,制备率达到 60%,再生率达到 20%。

2.1.3 温度对原生质体制备的影响

真菌的原生质体制备温度一般略高于其生长温度。酱油曲霉的生长温度一般是 30℃,因此选取 33、35、38℃ 进行实验,原生质体制备条件为:1% 溶菌酶 + 1% 蜗牛酶 + 1% 纤维素酶,渗透压稳定剂 0.6 mol/L KCl, pH 5.88, 5 h。结果表明 33℃ 时,原生质体的制备率和再生率都比较高,高温下反而下降,到 38℃ 时再生率几乎为 0。

2.1.4 pH 对原生质体制备的影响

分别以 KCl 和甘露醇作为渗透压稳定剂,比较在不同 pH 条件下的原生质体获得率和再生率,原生质体的制备条件为:1% 溶菌酶 + 1% 蜗牛酶 + 1% 纤维素酶,35℃, 5 h。根据实验结果(图 1),结合 2.1.5 的结果,选择 6.88 作为制备原生质体时的 pH。

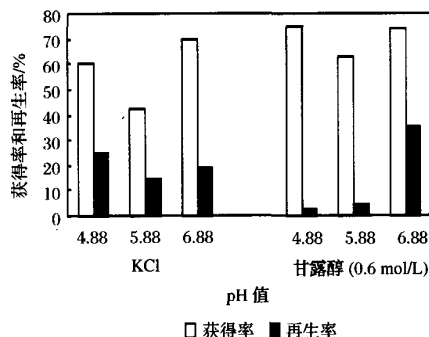
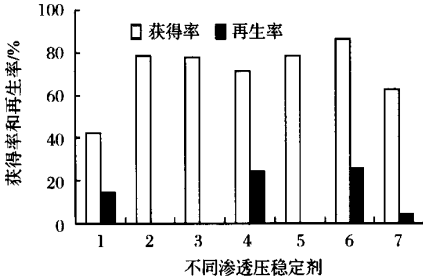


图 1 不同 pH 的渗透压稳定剂对原生质体的获得率和再生率的影响

2.1.5 酶解体系中不同渗透压稳定剂对原生质体制

备的影响

一般认为,在制备原生质体时无机盐作为渗透压稳定剂的效果较好。本实验的结果是蔗糖和山梨醇的原生质体制备率和再生率都较高,山梨醇的效果更好些(图 2)。原生质体制备条件为:1%溶菌酶+1%蜗牛酶+1%纤维素酶,35℃,5 h,pH 5.88。



1-KCl;2-NaCl;3-MgSO₄;4-蔗糖;5-葡萄糖;
6-山梨醇;7-甘露醇

图 2 不同的渗透压稳定剂对原生质体
获得率和再生率的影响

2.1.6 再生培养基中不同渗透压稳定剂对原生质体制备的影响

实验表明,培养基中添加 NaCl、甘露醇作为渗透压稳定剂对原生质体的制备均有较好效果,差别不大。由于 NaCl 便宜,从经济性考虑选择 NaCl 作为渗透压稳定剂,浓度为 0.6 mol/L。

2.2 原生质体紫外诱变

根据育种工作者长期的实践经验,一般认为致死率在 90%~99%的诱变效果好,但也有报道称低致

死率(70%~80%)有利于正突变的产生^[9],但是低致死率加重了筛选负荷。本实验采用 99.95%以上的致死率。

2.2.1 致死率与照射时间的关系

为了确定合适的紫外照射时间,进行紫外照射致死率的时间梯度试验。根据致死率为 99.95%的要求以及诱变后的初筛结果确定诱变照射时间为 90 s、120 s、150 s、180 s、210 s。

2.2.2 紫外诱变结果

选用分离菌株 BI 制备原生质体,随之对原生质体进行紫外诱变,总共得到 230 余株突变株,从中筛选得到 7 株酶活有较大提高的菌株系列 U,分别为: UI-2、UIII-2、UIII-22、UIII-35、UIII-43、UIII-60、UIII-81。

实验结果(表 1)显示,各突变株的 HC 值和中性蛋白酶活(用福林酚法测定)并非严格正相关,但基本一致。其中菌株 UI-2, UIII-60, UIII-81 的 HC 值很高,但是酶活并没有对应幅度的提高;其它 4 株菌的 HC 值和中性蛋白酶活的相关性较好。经过对豆汁平板穿刺培养(图 3)观察发现,菌株 UI-2, UIII-60, UIII-81 的菌落直径小,孢子生长致密而旺盛;而其它 4 株菌的菌落特征与出发株 BI 相似。可能这种差别导致了菌株 UI-2, UIII-60, UIII-81 的 HC 值很高(图 4)而酶活并没有相应幅度的提高,只是因为菌落直径小导致了 HC 值(水解圈直径/菌落直径)偏高。

表 1 BI 菌株的紫外诱变筛选结果

	BI	UI-2	UIII-2	UIII-22	UIII-35	UIII-43	UIII-60	UIII-81
初筛(HC 值)	1.6	3.86	1.80	2.20	2.0	1.83	4.0	8.0
复筛(酶活)/U·g ⁻¹ (干基)	3 191.0	4 784.7	5 417.1	6 197.4	5 104.8	4 757.9	4 678.5	4 789.3

注:中性蛋白酶活测定的 pH 为 7.2。



图 3 紫外诱变后得到 2 种典型的菌落形态
(豆汁平板穿刺培养)
左: UI-2, UIII-60, UIII-81 的典型菌落形态;中:
UIII-2, UIII-22, UIII-35, UIII-43 的典型菌落形态;
右: BI 的典型菌落形态

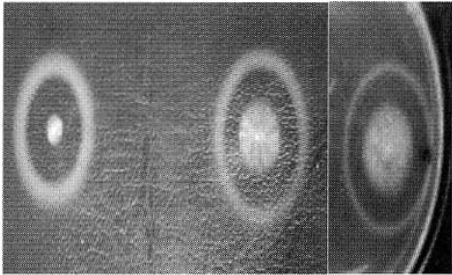


图 4 酪蛋白平板培养特征
左: UI-2, UIII-60, UIII-81 的典型酪蛋白平板水解特征;
中: UIII-2, UIII-22, UIII-35, UIII-43 的典型酪
蛋白平板水解特征; 右: BI 的典型酪蛋
白平板水解特征

2.3 遗传稳定性试验

选取中性蛋白酶酶活高于 5000 U/g(干基)的突变菌株 UIII-2、UIII-22、UIII-35 传代 10 次以检验其遗传稳定性。以相对于未传代突变菌株的酶活变化

率作为评价指标,认为酶活变化率在 $\pm 5\%$ 以内的菌株具有遗传稳定性。实验结果如表 2。由表 2 可以认为复筛得到的菌株具有遗传稳定性,中性蛋白酶活力相对稳定并保持较高水平。

表 2 复筛菌株的遗传稳定性试验结果

	复筛株	第 1 代	第 2 代	第 3 代	第 4 代	第 5 代	第 6 代	第 7 代	第 8 代	第 9 代	第 10 代
UIII- 酶活/U	5 417.1	5 304.1	5 371.2	5 290.4	5 401.5	5 480.2	5 466.5	5 506.3	5 490.7	5 480.8	5 475.6
2 变化率/%	0	-2.1	-0.8	-2.3	-0.3	1.2	0.9	1.6	1.4	1.2	1.1
UIII- 酶活/U	6 197.4	6 008.3	6 115.7	6 080.4	6 306.5	6 280.5	6 258.3	6 301.2	6 325.4	6 316.5	6 320.8
22 变化率/%	0	-3.1	-1.3	-1.9	1.8	1.3	1.0	1.7	2.1	1.9	2.0
UIII- 酶活/U	5 104.8	5 216.2	4 980.6	5 060.3	5 103.2	5 160.6	5 180.4	5 204.3	5 215.3	5 230.6	5 208.5
35 变化率/%	0	2.2	-2.4	-0.9	-0.03	1.1	1.5	1.9	2.2	2.5	2.0

3 结 论

通过对酱油曲霉孢子原生质体的制备条件进行优化,得到酱油曲霉 BI 孢子原生质体的制备条件为:选取培养 5 d、绿色孢子开始旺盛生长的新鲜斜面培养物制备孢子悬浮液,采用 25 mmol/L β -巯基乙醇 + 5 mmol/L Na_2EDTA 体系预处理 20 min,酶解条件是 1%溶菌酶 + 1%蜗牛酶 + 1%纤维素酶,山梨醇渗透压稳定剂(0.6 mol/L, pH 6.88),酶解温度 33℃,酶解 5 h,再生培养基为 0.6 mol/L NaCl 高渗透压豆汁培养基,涂布法再生。选用致死率为 99.95% 以上的诱变剂量对制备的原生质体进行紫外诱变处理,最终从 230 余株突变株中筛选得到 7 株酶活有较大提高的菌株系列 U,遗传稳定性试验证明它们均具有高水平且稳定的中性蛋白酶酶活。实验结果表明,通过对酱油曲霉孢子原生质体直接进行紫外诱变育种,对改良菌种特性具有良好的效果。

参 考 文 献

- 1 鲁肇元. 酱油生产技术(一)酱油的起源及酱油生产工艺的沿革[J]. 中国调味品, 2002, 1(1):43~46
- 2 林祖申. 21 世纪酱油调味品的发展方向[J]. 中国调味品, 2001, 3(3):6~8
- 3 林祖申. 加强生产定额管理, 提高企业经济效益[J]. 中国酿造, 2005(7):62~64
- 4 林祖申. 酱油生产技术的研讨[J]. 中国酿造, 2003(1):1~3
- 5 张志光. 真菌原生质体技术[M]. 湖南: 湖南科学技术出版社, 2003. 26~48
- 6 冯兰庄. 酱油生产问答[M]. 北京: 轻工业出版社, 1987. 57~60
- 7 Yali Cheng, Richard R Bélanger. Protoplast preparation and regeneration from spores of the biocontrol fungus *Pseudozyma flocculosa*[J]. FEMS MICROBIOLOGY Letters, 2000, 190: 287~291
- 8 张志光. 真菌原生质体技术[M]. 湖南: 湖南科学技术出版社, 2003. 26~44
- 9 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学. (第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2003. 71~74

Protoplast Preparation and Regeneration of *Aspergillus sojae* Spore and Improvement of Its Protease Activity by UV Treatment

Pan Li Li Lifeng Peng Chang Ye Yanrui Wang Bin

(South China University of Technology, College of Bioscience and Bioengineering, Guangzhou 510640, China)

ABSTRACT Protoplasts were prepared from spores of an *Aspergillus sojae* and treated by UV. Seven strains with improved neutral protease activity were obtained, of which the highest protease activity is 6 197.4U, about 1.94 times of its parent. A series of optimum data for preparing protoplast from *Aspergillus sojae* spore were obtained: The strain was incubated on slant for the preparation of spore suspension until the green spore was in full bloom (about 5 days). The spore suspension were pretreated in the system (25mmol/L β -mercaptoethanol + 5 mmol/L EDTA) for 20 min. Enzymatic digestion was optimized with: 1% lysozyme + 1% snailase + 1% novozyme188, 0.6mmol/L sorbitol citrate buffer (pH6.88). The digestion system was incubated at 33℃ for 5 hours and 0.6mmol/L NaCl was used as the osmotic stabilizer in the regeneration medium for protoplast regeneration.

Key words *Aspergillus sojae*, neutral protease, conidium, protoplast, UV treatment