

# 微生物转谷氨酰胺酶生产菌的“神舟四号”飞船 搭载育种研究<sup>\*</sup> ——搭载前地面育种试验(I)

王 璋<sup>1</sup> 王灼维<sup>1</sup> 袁 辉<sup>2</sup> 王 洁<sup>1</sup> 刘新征<sup>1</sup>

1( 中国食品发酵工业研究院 北京 100027 )

2( 北京天星航天育种技术开发中心 北京 100081 )

**摘 要** 结合“神舟四号”无人飞船的试验条件和具体搭载要求,对转谷氨酰胺酶生产菌株 *Streptomyces* sp. WZFF.L-M1( 酶活 1.74 U/mL )的孢子和菌丝体以 1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍( NTG )分别进行多种地面模拟比较性的诱变育种试验,发现诱变处理后菌落的形态变异等特征与产酶能力相关,经初筛和复筛的菌种驯化选育,获得具优异性能的突变菌株,酶活得到了明显提高。

**关键词** 链霉菌 转谷氨酰胺酶 空间育种 诱变 NTG

最近,有关微生物转谷氨酰胺酶( microbial transglutaminase, MTG )生产和应用的研究受到高度重视。该酶又称谷氨酰胺转氨酶,即蛋白质-谷氨酸-谷氨酰胺转移酶, EC 2.3.2.13。催化蛋白质或多肽链中的谷氨酰胺残基的  $\gamma$ -酰胺基和一级氨基之间酰胺基转移反应,蛋白质中的赖氨酸残基的  $\epsilon$ -氨基也可以作为一级氨基参与反应,从而可以将蛋白质进行分子之间的共价交联聚合,并由此能够直接改变蛋白质本身以及蛋白质所附着的细胞、组织、甚至器官的特性。MTG 已经在国外医药工业和食品工业等得到广泛应用<sup>[1]</sup>,被认为是用于生产各种新型食品蛋白类加工产品的最重要酶种。1989 年日本的科研人员首先报告了利用链轮丝菌( *Streptovercillium* )直接发酵生产 MTG<sup>[2]</sup>,以及随后发表了许多包括酶的分离提纯、酶的基本结构分析和酶分子结晶构造<sup>[3~5]</sup>、酶基因本身和化学合成基因的克隆表达<sup>[6,7]</sup>等基础研究和该酶在各种食品加工中的广泛应用<sup>[8]</sup>,并成功地将酶产品大批量推向市场,而且已经获得了巨大的经济效益。目前,国内也有一些该酶发酵生产与应用的研究报道<sup>[9,10]</sup>,但都处在实

验室水平。

开发 MTG 资源,最关键的是获得新的优良菌种。菌种选育方法的研究难度很大,然而却又十分重要。

近年来,我国空间科学技术发展相当迅速,同时也开创性地利用空间育种技术进行农作物航天育种研究,据报道已经 8 次利用返回式卫星,3 次利用“神舟”号宇宙飞船主要进行了植物种子和幼苗搭载试验,取得了明显的社会效益<sup>[11]</sup>。但是,关于微生物菌种搭载诱变育种试验尚未见报道。

本研究室在合理地设计出一套从土壤中筛选 MTG 生产菌株技术路线的基础上,建立了廉价、高效、快速的 MTG 生产菌种筛选流程,并完善了高产菌株的优化改良工作<sup>[12,13]</sup>。

本实验以我研究室从土壤分离筛选、保藏的 MTG 生产菌链霉菌( *Streptomyces* sp. ) WZFF.L-M1,借助搭载“神舟四号”飞船的机遇进行微生物菌种的空间诱变育种实验。

实验根据“神舟四号”无人飞船的具体搭载要求,将该放线菌孢子和菌丝体以 NTG 分别进行常规和高速度下的多次地面模拟比较性的诱

第一作者:博士,高级工程师。

<sup>\*</sup> 国家“十五”科技攻关计划项目( No. 2001BA708B03-05 )和科技部科研院所技术开发研究专项资金资助项目( No. NCST-2001-JKZX-006 )

收稿时间 2002-12-14

变育种试验,为空间育种试验创造条件,也为飞船搭载菌种返回后的优良菌株选育打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

*N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (亚硝基胍,NTG)购自瑞士Fluka公司,Casein from bovine milk (酪蛋白),*L*-glutamic acid- $\gamma$ -monohydroxamic acid (谷氨酸单氧肟酸,Glu-MHA)和 $\alpha$ -carbobenzoxyl-*L*-glutaminyglycine (CBZ-谷氨酰胺-甘氨酸二肽,CBZ-Gln-GLy)购自美国Sigma公司,其他均为国产分析级药品和生化试剂。

### 1.2 菌种

链霉菌(*Streptomyces* sp.) WZFF.L-M<sup>[14]</sup>,本实验室保藏土壤筛选菌株,MTG生产能力1.74 U/mL。

### 1.3 培养基

#### 1.3.1 麦芽汁斜面培养基

麦芽汁(12°Brix)20 mL,葡萄糖4 g,酵母提取物4 g,琼脂20 g,蒸馏水1 000 mL,pH 7.0。

#### 1.3.2 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)

马铃薯(以500g马铃薯制备)1 000 mL,葡萄糖20 g,琼脂20 g,pH 7.0。

#### 1.3.3 无机盐淀粉培养基(ISP-4)<sup>[15]</sup>

可溶性淀粉10 g,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>1.0 g,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O1.0 g,NaCl1.0 g,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>2.0 g,CaCO<sub>3</sub>2.0 g,微量元素溶液1.0 mL,琼脂20 g,蒸馏水1 000 mL,pH 7.0。微量元素溶液配方:FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O1.0 g/L,MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O1.0 g/L,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O1.0 g/L。

#### 1.3.4 分离培养基

麦芽汁(12°Brix)100 mL,琼脂20 g,蒸馏水1 000 mL,pH 7.0。

#### 1.3.5 发酵培养基

可溶性淀粉20 g/L,蛋白胨20 g/L,酵母提取物2.0 g/L,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>2.0 g/L,NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>2.0 g/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O1.0 g/L,pH 7.0。

### 1.4 培养方法

摇瓶发酵条件:取1环麦芽汁斜面培养基旺盛生长的斜面孢子,接入装有150 mL发酵培养基的500 mL三角瓶中,30℃,200 r/min条件下连续培养3d,进行蛋白质交联凝聚-沉淀性能分析、酶活和细胞干重(DCW)等的测定。

### 1.5 诱变方法

#### 1.5.1 孢子悬浮液的制备<sup>[16]</sup>

用无菌生理盐水洗出用于诱变处理菌株的经PDA活化的斜面孢子,6层纱布过滤,离心洗涤,适当稀释后制成孢子浓度在10<sup>7</sup>个/mL单孢子悬浮液。

#### 1.5.2 孢子悬浮液的NTG诱变处理

在装有2 mL孢子悬浮液的试管或带有微孔滤膜的Ultrafree-CL离心过滤管(Millipore公司生产)中加入NTG,使其终质量浓度为0.5~1 mg/mL,各组分别置于30℃恒温水浴中振荡处理5~8d,或者置于高速离心机(GL-20G-II,上海安亭科学仪器厂制造)上,在20 000r/min的高速度下连续运行5~8d,为确保机器安全,温度设定在(2±0.5)℃,然后将处理液稀释100倍,并以10倍稀释法再适当稀释后各取0.2 mL涂布分离培养基平板,30℃培养3~5d。对照组的孢子悬浮液以同样方法进行适当稀释、涂布平板培养后,计算致死率和形态突变率。

致死率(%) = 100 × (对照每mL活菌数 - 处理后每mL活菌数) / 对照每mL活菌数

形态突变率(%) = (诱变涂布平板的形态突变菌落 / 诱变涂布平板的总菌落) × 100

#### 1.5.3 斜面菌体生长的NTG诱变处理

将孢子悬浮液适当稀释后各取0.2 mL分别涂布在装有0.5 mg/mL NTG的PDA和ISP-4平板上,30℃培养5~8d。再用灭菌牙签挑出生长菌落,转接分离培养基平板,30℃培养3~5d。不加NTG的对照组以同样方法进行处理后,同上方法计算致死率和形态突变率。

#### 1.5.4 高速度下斜面菌体生长的NTG诱变处理

将孢子悬浮液按一定比例接入不加琼脂的PDA或ISP-4液体培养基(含0.5 mg/mL

NTG)装入带有微孔滤膜的过滤离心管中,确保培养基没盖过滤膜上表面,20000 r/min 运转 5~8d 为使菌体有所生长,温度升高为 $(10 \pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 。然后稀释 100 倍,0.2 mL 涂布分离培养基平板。对照组以没有 NTG 的培养基,一样进行高速运行、转接培养处理,计算致死率和形态突变率。

## 1.6 筛选方法

### 1.6.1 初筛

各诱变处理后,从 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 72h 以上生长的菌落,根据以往的经验,有针对性地大量挑取可能与产酶能力有关联的形态变异性突变菌株菌落,逐步提高产酶菌株的定向筛选范围,并在分离培养基上将突变株进行传代培养 2~3 代以初步确保菌种性能稳定性。然后作为初筛,进行摇瓶培养后的蛋白质交联絮凝-沉淀试验<sup>[12,13]</sup>,淘汰低产酶菌株,并分析菌落形态变异与产酶能力之间的关系。

### 1.6.2 复筛

初筛得到的高产酶菌株经斜面活化后,进行摇瓶发酵试验测定酶活等。突变菌株与对照菌株相比较,相对酶活 $\leq 90\%$ 的为负突变株,相对酶活 $\geq 110\%$ 的为正突变株,相对酶活在 90%~110%的视为等性变异株,并分别计算正突变率、负突变率和等性突变率。

## 1.7 分析方法

### 1.7.1 菌体细胞生长量测定

取发酵液 5 mL,4000 r/min 离心 10 min,蒸馏水洗 3 次,105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至衡重后称重。

### 1.7.2 蛋白质交联絮凝-沉淀性能测定方法<sup>[12,13]</sup>

根据 MTG 将蛋白质或多肽进行共价交联的催化作用原理和作用结果的特征性质,设计了一经济性的观察判断酶活力的反应体系。即以酪蛋白作为酶催化作用的底物,将摇瓶培养液按一定比例添加进含有一定浓度酪蛋白的

0.5mol/L 磷酸缓冲溶液(pH6.5),37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中振荡反应一定时间后静置,观察实验现象,依据是否有凝絮或沉淀产生及其产生量判断是否产 MTG,并大致估计酶活性。

### 1.7.3 MTG 酶活力测定方法

参照 Folk 的比色法<sup>[17]</sup>,以 CBZ-Gln-Gly 和氯化羟胺作为底物。以 Glu-MHA 制作标准曲线。一个 MTG 酶活单位(1 U/mL)定义为 37 $^{\circ}\text{C}$ 下每分钟催化 1 $\mu\text{mol}$ 底物(CBZ-Gln-Gly)生成其单氧肟酸产物所需的酶量。

## 1.8 遗传稳定性实验

在分离培养基上将复筛所得高产酶突变株进行每月一次的传代培养,连续 8~10 代,并摇瓶发酵测定酶活。

## 2 结果与讨论

### 2.1 模拟诱变试验的路线设计

首先,根据“神舟四号”无人飞船的实际可搭载情况和目前实验条件,统筹规划设计搭载前地面预备性诱变比较试验。整个诱变育种模拟实验如图 1 所示,以 WZFF.L-M1 菌株为出发菌株,进行不同条件下的 4 次 NTG 诱变实验,再经过初筛、复筛方法测定产酶活力,筛选高产酶活菌株。

### 2.2 NTG 诱变时间的影响

考虑到“神舟四号”飞船将在太空运行一段时间,但事先不能知道准确天数,将处于浓度为 $10^7/\text{mL}$  WZFF.L-M1 菌株的孢子悬浮液用低质量浓度的 NTG(0.5 mg/mL 和 1.0 mg/mL)分别处理 5~8d 后,每个处理试验各挑取 110~120 个菌落,2 个大组总共 946 个菌落。然后进行初筛的蛋白质交联絮凝试验和复筛的酶活测定试验,分析突变菌株的产酶活力,并统计分析各自诱变后的致死率、形态突变率、正突变率、负突变率、等性突变率等的变化情况,结果见表 1 和表 2。

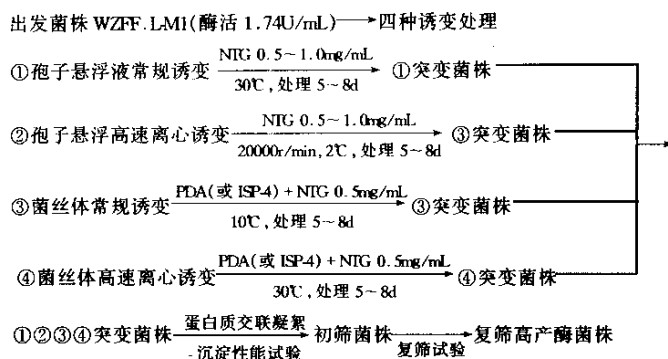


图 1 MITG 高产菌株的诱变筛选过程

表 1 0.5 mg/mL NTG 的诱变效果

处理时间 /d	致死率 /%	形态突变率 /%	正突变率 /%	负突变率 /%	等性突变率 /%	最高酶活 /U·mL <sup>-1</sup>	酶活提高倍数 /%
5	84.6	31.2	3.7	81.5	14.8	2.05	18
6	86.7	28.9	6.1	74.7	19.2	2.17	24
7	92.1	33.5	10.5	76.0	13.5	2.12	22
8	95.9	43.5	8.9	81.8	9.3	2.22	28

表 2 1.0 mg/mL NTG 的诱变效果

处理时间 /d	致死率 /%	形态突变率 /%	正突变率 /%	负突变率 /%	等性突变率 /%	最高酶活 /U·mL <sup>-1</sup>	酶活提高倍数 /%
5	87.6	45.4	5.4	75.9	18.7	2.30	32
6	92.8	48.9	3.4	82.0	14.6	2.00	15
7	95.5	54.1	6.5	85.1	8.4	2.11	21
8	98.8	50.6	10.1	79.0	10.9	2.12	22

结果表明,由于处理时间比较长,诱变剂的致死作用很明显,基本上在 85% 以上。当 NTG 量一定时,随着处理时间的增加,孢子的死亡率逐步增加,高达 98.8%;存活的孢子数也随着浓度的提高而有所下降。

生长的存活菌落中,表观的形态发生多种变化,但变异率却较低,基本上在 50% 或更低。产酶能力的负突变株比例很高,在 75% 以上,而正突变率均比较低,酶活提高幅度在 30% 以内,且规律性也不明显,最高的一突变菌株的酶活力达到 2.30 U/mL,比诱变处理前提高了 32%。

经过几轮的诱变实验,发现了诱变后菌落形态变化与产酶能力呈一定程度上的相互关系,酶活有所增高的变异株大部分是菌落大、具

有典型同心环且乳头状向上凸起、孢子颜色发白的单菌落,这为下面筛选高产酶突变菌株提高了一定的便利条件。

### 2.3 高速度下 NTG 对孢子的诱变效果

由于“神舟四号”无人飞船将围绕地球高速飞行,在此,将含有 0.5mg/mL 或 1.0mg/mL NTG 的 L - M1 菌株的孢子悬浮液置于 20 000r/min(线速度约 190m/s)的高速离心机上连续运转 5 ~ 8d,每个处理试验各挑取 120 个菌落,2 个大组总共 960 个菌落。按初筛、复筛筛选产酶菌株和测定酶活性,统计分析诱变后的致死率和正、负、等性突变率等的变化情况。结果见图 2 和图 3。

图 2 和图 3 结果很相似,致死率仍然居高不下,接近 90% 以上。形态变异率略增

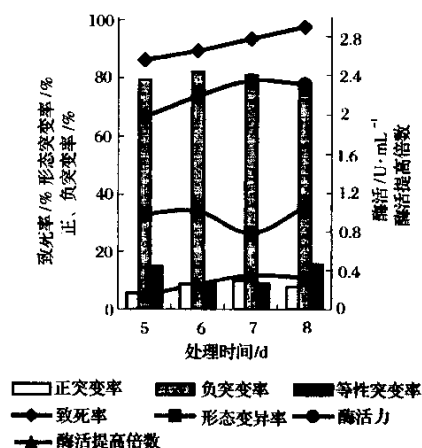


图2 高速度下 0.5mg/mL NTG 的孢子诱变效果

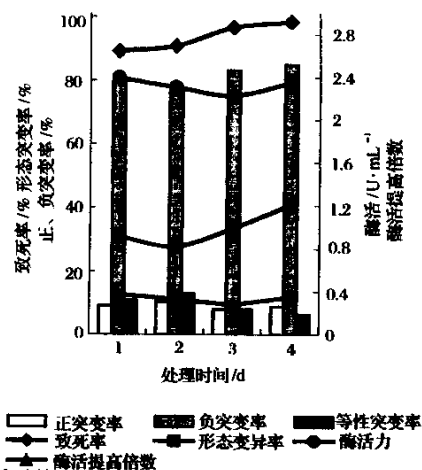


图3 高速度下 1.0mg/mL NTG 的孢子诱变效果

表3 PDA 中添加 NTG 对 L-M1 菌株生长和产酶能力的诱变情况

诱变处理时间 /d	致死率 /%	形态突变率 /%	正突变率 /%	负突变率 /%	最高酶活 (U·mL <sup>-1</sup> )	酶活提高倍数 /%
5	83.2	65.0	13.8	74.9	2.37	0.36
6	82.8	71.9	10.3	73.5	2.21	0.27
7	81.7	75.5	12.3	81.1	2.44	0.40
8	79.8	68.5	15.1	72.2	2.33	0.34

表4 ISP-4 中添加 NTG 对 L-M1 菌株生长和产酶能力的诱变情况

诱变处理时间 /d	致死率 /%	形态突变率 /%	正突变率 /%	负突变率 /%	最高酶活 (U·mL <sup>-1</sup> )	酶活提高倍数 /%
5	77.2	64.5	9.8	76.5	2.55	0.46
6	80.1	70.8	13.8	81.1	2.38	0.37
7	79.5	75.7	10.8	70.2	2.45	0.41
8	84.1	74.6	8.9	74.4	2.28	0.31

加,但对正突变率的提高却未见有贡献。负突变基本上保持在 80% 以上,正突变率为 10% 或更低。但是,较高浓度的 NTG 1.0mg/mL 处理下,酶活提高幅度基本上都在 30% 以上,最高的产酶菌株提高了 35%,达到了 2.35U/mL MTG 生产能力,取得了一定的菌株诱变育种效果。但是,在总体上未能实现预期的目标。分析其原因可能是 (1) 高速离心时从保护设备的角度出发,将温度下降至接近 0℃ 进行诱变处理,对孢子的生存及复活有一定的影响; (2) 在这样高强离心力的长时间作用下,所有孢子都沉淀在过滤离心管的微孔滤膜表面上成坚硬的膜面甚至不均匀的块状物,实际上未能起到很好的诱变作用,也难于与航天飞船上的存在状态相提并论。

## 2.4 高速度下 NTG 对菌丝体的诱变效应

由于高速度下 NTG 对孢子的诱变作用效果有限,因此,进一步检查对处于生长状态下的菌丝体的影响结果作为对照,首先采用常规诱变方法,即观察 NTG 对 L-M1 菌株在 PDA 和 ISP-4 平板上适温培养后的菌落生长、形态突变和产酶能力变化情况,结果见表 3 和表 4。

从表 3 和表 4 的结果可以看出,虽然结果没有明显的区别,但 PDA 和 ISP-4 的 2 种培养基下 L-M1 菌株都能很好地生长,并达到了所期待的诱变育种基本目的,虽然致死率大体上保持在 80% 左右,比较低,但形

态突变率有了明显的提高,有利于优良突变菌株的定向性挑选。因而,诱变菌落的正突变率有所增加,在10%以上。同样,所选出的正突变菌株的酶生产能力普遍在一定程度上得到了强化,总体的酶活提高幅度大致在30%以上,并从ISP-4平板中成功选得一株产MTG能力增加了46%的突变株L-M1-③I5-035,酶活由原来的1.74U/mL提高到2.55U/mL。

在高速度运转情况下,在添加有0.5mg/mL NTG的PDA和ISP-4的2种液体培养基中,L-M1菌株被诱变作用的效果也没有表现出显著的结果差异。采用带有微孔滤膜的过滤离心管,使得菌体可以在膜上充分接触到培养基而生长。同时接受NTG的连续诱变影响作用。高速度运转诱变处理之后,将培养的菌丝体液体离心去NTG,适当稀释并转接入分离培养基中,经平板培养后,每个处理样都有针对性地挑取120个形态变异菌落,共挑取960个菌落,同上述方法进行初筛和复筛的摇瓶培养测定酶活,选育高产酶菌株。

作为代表,采用ISP-4中添加NTG对L-M1菌株的高速度运行下的诱变处理后的致死率、菌落形态突变率以及产酶能力变化的实验统计分析结果如图4所示。

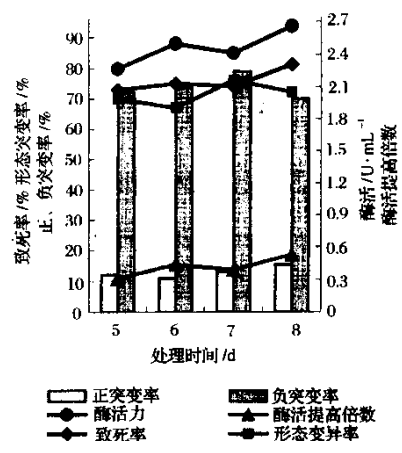


图4 高速度下ISP-4中添加NTG的菌贝丝体诱变效果

可能是由于体实验操作时温度比较低,菌体的生长受到了明显的抑制,表现在致死率均有所下降。但是,形态突变率基本上保持了常温诱变处理的水平,也使得后续的初筛和复筛的菌株定向选育工作能够比较顺利地进行。因而,诱变菌落的正突变率也大体维持在10%以上。同样,所选出的正突变菌株大部分在生产MTG能力上表现出了较好的提高效果,提高幅度在30%以上的菌株比例约高于1/4,并从中筛选得一突变株L-M1-④I6-107,可以生产MTG2.66U/mL,比出发菌株提高了53%。

表5 2 高产酶突变菌株继代培养过程中MTG活力(U/ml)变化状况

突变菌株	斜面继代培养代数							
	1	2	3	4	5	6	7	8
L-M1-③I5-035	2.47	2.41	2.48	2.52	2.56	2.62	2.59	2.65
L-M1-④I6-107	2.72	2.64	2.73	2.58	2.52	2.61	2.68	2.76

2.5 高产酶菌株的遗传稳定性考察

将以上经过多次诱变处理和初筛、复筛选育得到的2高产酶菌株L-M1-③I5-035和L-M1-④I6-107,每隔1个月转接1次斜面,连续8次继代培养。将8个斜面菌体分别活化并进行摇瓶发酵产酶实验,结果见表5。结果表明,酶的活性分别稳定在2.4 U/mL和2.5 U/mL以上,变化幅度在10%以内,说明这2菌株的遗传性状都相对稳定。

2.6 模拟诱变试验结果的综合分析

从整个搭载模拟实验的结果来看,诱变处理条件与实际航天飞船的实际空间飞行时所能提供的条件相差甚远,但是选在NTG长处理时间诱变作用之下,可以达到一种在较高致死率条件下的优良菌种诱变筛选作用。同时利用菌丝体在高速度运转下生存在添加有诱变剂NTG的环境中,这对菌种的生长有所影响的同时,也起到一种驯化、诱导的作用,接着再经过本实验设计的合理性初筛、复筛方法进行反复的选育,大大增加了MTG生产菌株育种的定向

性,取得了一定效果。此外,为了进一步实现空间条件的地面模拟试验,研究空间育种技术的作用机理,完善优异微生物菌株的快速、高效的筛选技术路线,还有许多问题有待进一步研究,如改变诱变对象的存在状态(如制备原生质体等),扩大诱变剂种类(如 $\text{Co}^{60}$ 引起的 $\gamma$ 射线及紫外线照射以及氯化锂等),以及在条件允许的情况下包括利用可以产生高能粒子流的地面加速器,利用可以屏蔽地球磁场效应的零磁空间模拟环境和利用微重力三维旋转仪及回转器模拟微重力环境等各种空间环境模拟试验,都值得进一步研究探讨,从而可以更加简便、快速地得到高产MTG菌株,明确诱变后菌落形态的变异与产酶之间的相关性和特殊联系。

#### 参 考 文 献

- Nelson P M. Food Biotechnology, 1995, 9: 119 ~ 156
- Nonaka M, Tanaka H, Okiyama A et al. Agric. Biol. Chem., 1989, 53: 2 619 ~ 2 623
- Ando H, Adachi M, Umeda K et al. Agric. Biol. Chem., 1989, 53: 2 613 ~ 2 617
- Kanaji T, Ozaki H, Takao T et al. J. Boil. Chem., 1993, 268: 11 565 ~ 11 572
- Kashiwagi T, Yokoyama K I, Ishikawa K et al. Boil. Chem., 2002, 277
- Washizu K, Ando K, Koikeda S, Hirose S et al. Biosci. Biotech. Biochem., 1994, 58(1): 82 ~ 87
- Kawai M, Takehana S, Washizu K et al. Biosci. Biotech. Biochem., 1997, 61: 830 ~ 835
- Kuraishi C, Yamazaki K, Susa Y. Food Rev. Int., 2001, 17: 221 ~ 246
- 郑美英, 堵国成, 陈 坚等. 应用与环境生物学报, 2000, 6: 76 ~ 82
- 唐传核, 杨晓泉, 陈 中等. 食品与发酵工业, 2002, 28(6): 17 ~ 22
- 樊秋玲, 刘 敏. 航天医学与医学工程, 2002, 3
- 王灼维, 王 璋, 刘新征等. 精细与专用化学品(2002年增刊), 2002, 425 ~ 428
- 王灼维, 王 璋, 郝 伟等. 2002年中国酶制剂生产与应用技术交流会论文集, 天津, 2002, 105 ~ 111
- 王 璋, 刘新征, 王灼维等. 纪念中国微生物学会成立五十周年暨学术年会论文摘要集, 北京, 2002, 75
- 伯杰氏细菌分类手册(第八版). 北京: 科学出版社, 1985
- 沈 萍, 范秀容等主编. 微生物学实验(第三版). 北京: 高等教育出版社, 1999
- Folk J E. In Tabor H., Tabor C W (ed.). Methods in Enzymology. New York: Academic Press, 1970. 17: 889 ~ 894

## Space Breeding of Microbial Transglutaminase-producing Strains Through Being Loaded in "Shenzhou 4" Spacecraft

### —Ground Simulated Tests of Mutation before Loading(I)

Wang Zhang<sup>1</sup> Wang Zhuowei<sup>1</sup> Yuan Hui<sup>2</sup> Wang Jie<sup>1</sup> Liu Xinzhen<sup>1</sup>

<sup>1</sup> China National Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing, 100027)

<sup>2</sup> Beijing Tianxing Space Breeding Technology Development Center, Beijing, 100081)

**ABSTRACT** According to the conditions designed for tests in the "Shenzhou 4" spacecraft and requirements of loading, tried a serial experiments for ground simulated test before loading strain of *Streptomyces* sp. WZFF.L-M1 producing microbial transglutaminase (MTG) at the activity of 1.74 U/mL. The spores and mycelia of the strain prepared under the optimal conditions were treated several times by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosogunidine (NTG) at normal conditions or at a high speed. The results showed that some mutants were different from the original strain in morphology, color and edge of colony, and that these mutation phenomena were related to the MTG productivity and thereafter used for strain selection first. Then, test of flocculation-precipitation of proteins through MTG cross-linking as the primary screening and examination test of MTG production as the secondary screening were successively used to select potent strains. Some high-yield strains were obtained by fermentation screening of many regenerative mutants. The MTG activities of these new mutants were higher than 2.55 U/ml, which had been increased about 40% than that of the initial strain.

**Key words** *Streptomyces*, transglutaminase, space breeding, mutation, NTG