

## ARTP-NTG 复合诱变选育高产中性蛋白酶菌株

钱娟娟, 王克芬, 宋静静, 刘胜利, 王兴吉, 刘文龙\*

(山东隆科特酶制剂有限公司, 山东省酶制剂发酵技术重点实验室, 山东临沂 276400)

**摘要** 以枯草芽孢杆菌 A-06 为出发菌株, 利用 ARTP-亚硝基胍 (NTG) 复合诱变方法对该菌株进行遗传改造。经过平板初筛, 摇瓶复筛, 最终筛选出一株酶活提高明显、遗传稳定的菌株 N-36。其摇瓶发酵酶活达 29 500 U/mL, 较出发菌株酶活提高 90% 左右。

**关键词** 中性蛋白酶; ARTP; NTG; 复合诱变; 筛选

中图分类号 Q933 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)21-0005-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.21.002



开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):

### Screening of High Neutral Protease Producing Strains by ARTP-NTG Compound Mutagenesis

QIAN Juan-juan, WANG Ke-fen, SONG Jing-jing et al (Shandong Long Kete Enzyme Co., Ltd., Shandong Province Key Laboratory of Enzyme Preparation Fermentation Technology, Linyi, Shandong 276400)

**Abstract** The original strain of *Bacillus subtilis* A-06 was modified in genetic characteristics by ARTP-NTG compound mutagenesis. One high neutral protease-yielding strain N-36 was screened from the mutants by slab screening and shake flask rescreening, which the enzyme activity increased obviously and had good genetic stability. The enzyme activity of the shake flask-fermentation reached 29 500 U/mL, which was 90% higher than that of the original strain.

**Key words** Neutral protease; ARTP; NTG; Compound mutagenesis; Screen

中性蛋白酶主要是由微生物发酵提取而得的, 可用于各种蛋白质水解处理, 水解产物为氨基酸、小肽等<sup>[1]</sup>。它是最早发现并广泛应用于工业化生产的蛋白酶制剂, 可用于皮革脱毛、畜禽血液蛋白质水解、酒和饮料的澄清以及医药治疗等领域<sup>[2-5]</sup>。近年, 也有应用于多肽制备、降解棉酚、破乳等的相关研究<sup>[6-9]</sup>。相对国外酶制剂活性来说, 国产酶制剂活性很低, 而酶制剂活性的提高, 关键需要采用合适的技术手段来选育高产菌种。

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, 而诱变方法的选择是菌种选育能否成功的关键<sup>[10]</sup>。其方法有多种, 如物理诱变、化学诱变及基因工程育种等<sup>[11-13]</sup>。新型的常压室温等离子体 (ARTP) 诱变育种技术在具有操作简易、条件温和的基础上, 可达到一次诱变便能获得 2 万个以上突变体的大库容高效诱变<sup>[14-15]</sup>。亚硝基胍 (NTG) 作为一种超强诱变剂, 是公认效果显著的化学超诱变剂。该研究拟采用 ARTP-NTG 复合诱变技术处理对数生长期的中性蛋白酶菌液, 筛选酶活提高的菌株。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 出发菌株。**枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 山东隆科特酶制剂有限公司菌种实验室保藏。

**1.1.2 主要仪器与设备。**ARTP-IIS 常压室温等离子体诱变系统 (无锡思清源生物科技有限公司); ZXSD-A1270 生化培养箱 (上海智诚分析仪器制造有限公司); ZWF-B3612 摇瓶机 (上海智诚分析仪器制造有限公司); 5810R 离心机 (德国 Eppendorf 公司); Plus384 酶标仪 (美国 MD 公司); UV-

1800 紫外可见分光光度计 (日本岛津公司)。

**1.1.3 试剂。**蛋白胨、酵母粉 (美国 BD 公司); 酵母膏、牛肉膏 (北京奥博星生物技术有限责任公司); 葡萄糖、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化锌、琼脂粉、酪蛋白均为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司); 玉米淀粉、豆饼粉、麸皮 (市售)。

**1.1.4 培养基。**

**1.1.4.1 分离筛选培养基。**蛋白胨 1.00%、牛肉膏 0.5%、氯化钠 0.5%、酪蛋白 1.00%、琼脂粉 2.00%, pH 7.0。

**1.1.4.2 种瓶培养基。**蛋白胨 1.00%、牛肉膏 0.5%、酵母膏 0.30%、葡萄糖 1.00%、氯化钠 0.2%, pH 7.0。

**1.1.4.3 摇瓶培养基。**玉米淀粉 6.30%、豆饼粉 2.00%、麸皮 2.50%、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.20%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.04%、ZnCl<sub>2</sub> 0.05%, pH 7.0。

## 1.2 方法

**1.2.1 菌悬液的制备。**采用常规稀释分离法将菌悬液适当稀释后, 涂布于分离平皿, 并于 30 °C 培养 24 h 可长出菌落, 能观察到生长菌周围有一透明圈, 按透明圈和菌落直径比的大小挑选菌株, 挑取直径比最大的单菌落接种到种瓶培养基中, 于 30 °C 条件下, 200 r/min 培养至对数生长期, 得到待诱变的菌悬液。

**1.2.2 菌种生长曲线的测定。**将菌种接入种瓶, 于 30 °C 培养, 计时, 每隔 1 h 取样 3 mL, 以未接种培养基作空白, 用 UV-1800 紫外可见分光光度计在 680 nm 波长下测定样品的吸光度。以时间为横坐标, 样品吸光度值为纵坐标绘制一条曲线即为菌体生长曲线。

**1.2.3 ARTP 诱变。**吸取 10 μL 菌悬液置于载片中央并涂抹均匀, 用无菌镊子将载片放于 ARTP 系统操作室旋转台上的对应孔位, 调整照射距离 2 mm, 气流量 10 L/min, 功率 100 W, 进行诱变处理。将出发菌株分别照射 0、5、10、15、20、

**基金项目** 国家重点研发计划 (2017YFB0308400)。

**作者简介** 钱娟娟 (1983—), 女, 山东威海人, 工程师, 硕士, 从事酶制剂生产与开发工作。\* 通信作者, 工程师, 硕士, 从事酶制剂生产与开发工作。

**收稿日期** 2019-05-16

25、30、35、40 s,将诱变后的菌悬液稀释不同梯度涂于酪蛋白再生平板,于37℃培养24 h,通过菌落数计算诱变菌株的致死率,并绘出致死率曲线。致死率计算公式如下:

$$\text{致死率} = (1 - \frac{a}{b}) \times 100\%$$

式中, $a$ 为经ARTP系统处理后平板上的平均菌落数(CFU); $b$ 为未经ARTP系统处理平板上的菌落数(CFU)。

**1.2.4 ARTP 诱变菌株的筛选。**将诱变后的菌液涂布于筛选平板上,于37℃培养24 h,挑选酪蛋白水解圈直径与菌落直径比较大的菌株;将这些菌落接入种液培养基培养至对数生长期,然后将种液转入摇瓶培养基,培养结束采用国标法测定中性蛋白酶酶活,并挑选出酶活较高的菌株复筛验证。

**1.2.5 NTG 诱变。**将ARTP诱变处理之后的高产菌株接入种液培养基培养至对数生长期,其菌液经离心洗涤后,加入缓冲液重悬,按不同梯度于250 mL三角瓶中,分别加入重悬液、缓冲液、NTG溶液(NTG浓度取0.1~1.0 mg/mL),于30℃摇床中振荡处理不同时间,处理之后离心,倾去上清液,用缓冲液洗涤3次,最终得到的菌体加入一定浓度甘油,重悬,分装保存,以便后期使用。同时,取出不同梯度诱变种液稀释不同梯度涂于酪蛋白平板,计算诱变致死率,以备后期筛选。

**1.2.6 NTG 诱变菌株的筛选。**将诱变菌悬液适当稀释,涂布分离皿,于37℃培养24 h,根据菌落形态及酪蛋白水解圈直径与菌落大小的比值,初步筛选菌株,然后经摇瓶发酵培养,测定酶活,筛选高产菌株。

**1.2.7 高产菌株遗传稳定性验证。**对经NTG诱变处理之后筛选到的高产菌株进行连续传代试验,考察其遗传性状的稳定性。连续传代6代,每次传代后的菌株经摇瓶培养,测定其中性蛋白酶酶活。

**1.3 酶活测定方法**按国标GB/T 23527—2009,采用Folin法测定中性蛋白酶酶活。中性蛋白酶酶活定义为1 g固体酶粉(或1 mL液体酶)在一定温度和pH条件下,1 min水解酪蛋白产生1 μg酪氨酸,即为1个酶活力单位,以U/g(U/mL)表示。

## 2 结果与分析

**2.1 出发菌株生长曲线的测定**菌体在对数生长期,营养充足,生长迅速,代谢活性高,且此阶段细胞性质稳定统一,对理化因素较为敏感,易变异,重复性较好,所以一般选用处于该生长时期的细胞进行处理。由图1可知,培养后的4~10 h为菌体的对数生长期,10 h后进入稳定期。综合考虑细胞生物量等因素,选择培养7 h的菌体细胞进行诱变处理。

**2.2 ARTP 诱变的致死率曲线**按“1.2.3”进行处理,分析数据得到出发菌株的ARTP致死率曲线(图2)。随着处理时间的延长,ARTP致死率不断增大。依据中等诱变剂量容易筛到正突变菌株的原理,当照射时间达15 s时,菌株致死率达82%。因此,选择15 s作为菌株ARTP诱变的处理时间。

**2.3 ARTP 诱变筛选结果**通过对ARTP诱变突变株的筛

选,筛选出5株透明圈与菌落直径比值较对照有所增大的菌株,分别进行摇瓶发酵,酶活检测,测定结果如表1所示。

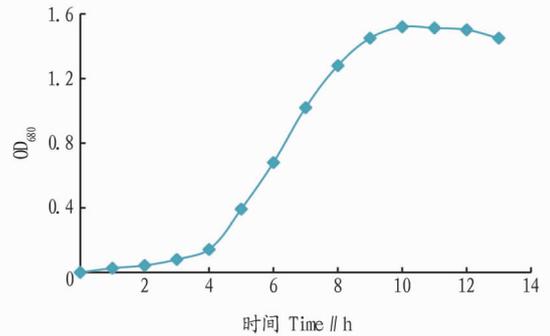


图1 出发菌株A-06的生长曲线

Fig.1 The growth curve of the original strain A-06

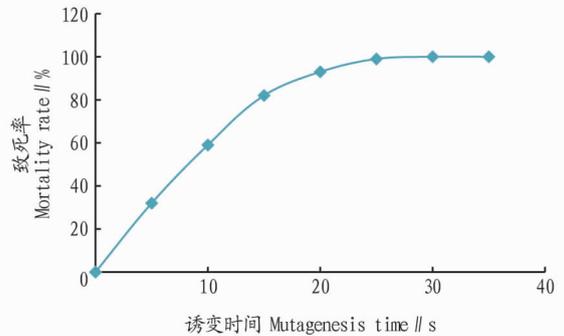


图2 出发菌株ARTP诱变致死率曲线

Fig.2 The death curve of the original strain under ARTP mutation

表1 菌株的ARTP诱变筛选结果

Table 1 The screening result of strains under ARTP mutation

菌株 Strain	诱变时间 Mutagenesis time//s	酶活力 Enzyme activity U/mL	提高比例 Increase proportion %
原始菌株 Original strain	0	15 526	0
1-5	15	18 631	20
1-13	15	18 010	16
1-25	15	21 736	40
1-32	15	19 454	25
1-48	15	20 397	31

由表1可知,突变菌株1-25摇瓶发酵酶活较对照酶活提高了40%,为摇瓶发酵水平最高的菌株,选用该菌株进行后续试验。

**2.4 NTG 诱变的致死率曲线**按“1.2.5”进行诱变处理,分析得到菌株1-25的NTG诱变的致死率曲线(图3)。随着处理时间的延长及NTG诱变剂量的增大,菌株致死率不断增大。NTG浓度较低时,诱变效果不佳,浓度过高会影响菌落再生,不利于筛选。综合考虑再生率与正突变概率存在范围,后续试验在NTG浓度0.4 mg/mL,处理时间15~20 min的条件下进行。

**2.5 NTG 诱变筛选结果**对菌株1-25经NTG诱变后的种液进行平板分离,筛选(筛选菌落形态变化明显及透明圈与

菌落直径比值较大的突变菌株), 然后进行摇瓶发酵, 酶活检测, 结果筛选到 7 株较菌株 1-25 酶活明显的菌株, 测定结果如表 2 所示。

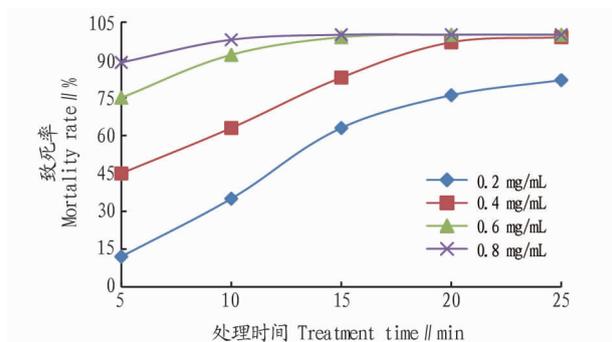


图 3 NTG 诱变致死率曲线

Fig. 3 The death curve under NTG mutation

表 2 菌株的 NTG 诱变筛选结果

Table 2 The screening result of strains under NTG mutation

菌株 Strain	NTG 浓度 NTG concentration mg/mL	诱变时间 Mutagenesis time/min	酶活力 Enzyme activity U/mL	提高比例 Increase proportion %
A-06	—	—	15 526	—
1-25	—	—	21 736	40
N-11	0.4	15	27 996	80
N-19	0.4	15	27 609	78
N-26	0.4	15	26 657	72
N-36	0.4	15	29 500	90
N-42	0.4	15	28 583	84
N-58	0.4	15	27 669	78
N-65	0.4	15	29 301	89

由表 2 可知, 经 NTG 诱变后, 正突变菌株酶活提高明显, 其中, 菌株 N-36 较原始菌株 A-06 酶活提高了 90%。

**2.6 高产菌株遗传稳定性试验结果** 作为生产菌株, 其遗传稳定性对于稳定生产具有极其重要的作用。对突变菌株 N-36 进行连续 6 次传代试验, 经摇瓶发酵培养, 酶活检测, 验证其遗传稳定性。由表 3 可知, 经连续 6 次传代, 其摇瓶发酵酶活均在 28 000 U/mL 以上, 相对酶活均在 97% 以上, 结果表明突变菌株 N-36 具有良好的遗传稳定性。

### 3 结论

采用 ARTP-亚硝基胍(NTG)复合诱变的方式对出发菌株枯草芽孢杆菌 A-06 进行遗传改造, 经平板筛选, 摇瓶发酵培养, 筛选到一株遗传稳定性良好的突变菌株 N-36, 其发酵

酶活力相对于出发菌株提高 90% 左右。试验结果表明, 产中性蛋白酶的枯草芽孢杆菌通过 ARTP-NTG 复合诱变, 其诱变效应大大提高, 该研究为选育具有优良性状的微生物菌种提供了依据。

表 3 突变株 N-36 的遗传稳定性

Table 3 The genetic stability of the mutant strain N-36

传代次数 Passage number	酶活力 Enzyme activity U/mL	相对酶活力 Relative enzyme activity %
0	29 500	100
1	29 135	98.76
2	29 162	98.85
3	28 895	97.95
4	28 658	97.15
5	28 702	97.29
6	28 833	97.74

### 参考文献

- [1] 刘婷, 张天斌, 林元山. 产中性蛋白酶菌株的筛选及其发酵条件的优化[J]. 湖南农业科学, 2009(5): 102-104, 107.
- [2] 李泰明, 徐秀兰. AS1.398 中性蛋白酶固定化条件的初步研究[J]. 药物生物技术, 1998, 5(4): 214-218.
- [3] 陈武勇, 辜海兵, 秦涛, 等. 中性蛋白酶水解铬革屑的研究[J]. 中国皮革, 2001, 30(21): 2-5.
- [4] 唐兵, 周林峰, 陈向东, 等. 嗜热脂肪芽孢杆菌高温蛋白酶的产生条件及酶学性质[J]. 微生物学报, 2000, 40(2): 188-192.
- [5] 李永泉, 朱志成, 李向晨, 等. 中性蛋白酶发酵工艺优化研究[J]. 微生物学通报, 1995, 22(5): 155-154.
- [6] 马淑慧, 李学军, 都兴范, 等. 脱脂炸蚕蛹蛋白用复合中性蛋白酶水解制备多肽的工艺条件优化试验[J]. 蚕业科学, 2017, 43(6): 991-997.
- [7] 王攀, 范娜. 中性蛋白酶酶解核桃饼粕制备抑菌多肽的研究[J]. 食品工业, 2018, 39(9): 153-157.
- [8] 元秀晔, 谢全喜, 陈振, 等. 中性蛋白酶降解棉粕中棉酚的研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(10): 144-148.
- [9] 蓝灿华, 吴菲菲, 郑丹梅, 等. 中性蛋白酶在麦迪霉素溶媒萃取中的破乳作用[J]. 福建畜牧兽医, 2016, 38(3): 20-23.
- [10] 薛林贵, 景春娥, 赵旭, 等. 重离子诱变技术选育碱性蛋白酶高产菌株[J]. 微生物学通报, 2010, 37(6): 845-851.
- [11] 潘明, 周永进, 张强. 产生淀粉糖化酶菌株的诱变选育[J]. 酿酒科技, 2006(10): 37-39.
- [12] 姚婷婷, 王衍敏, 顾建龙, 等. 携多拷贝 *glaA* 的重组黑曲霉过量合成糖化酶的研究[J]. 生物工程学报, 2006, 22(4): 567-571.
- [13] 乔殿华, 唐国敏, 钟丽娟, 等. 黑曲霉糖化酶基因表达调控的研究 I. 高产及低产菌株糖化酶表达的总体分析和比较[J]. 微生物学报, 1997, 37(5): 349-354.
- [14] ZONG H, ZHAN Y, LI X, et al. A new mutation breeding method for *Streptomyces albulus* by an atmospheric and room temperature plasma[J]. African journal of microbiology research, 2012, 6(13): 3154-3158.
- [15] ZHANG X, ZHANG X F, LI H P, et al. Atmospheric and room temperature plasma(ARTP) as a new powerful mutagenesis tool[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2014, 98(12): 5387-5396.