

高产蛋白酶菌株等离子体诱变及其在提高豆粕发酵效果中的应用

曲文娟, 张天, 马海乐, 何荣海

(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要: 采用常压室温等离子体 (ARTP) 技术对 *Bacillus amyloliquefaciens* 10160 进行诱变处理。以致死率达到 80% 作为 ARTP 诱变(诱变时间为 10 s)的最佳剂量, 筛选得到了 C5 和 C12 两株遗传稳定的诱变菌株。与初始菌株相比, 诱变菌株的中性蛋白酶酶活分别提高了 86.0% 和 85.0%。十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析显示, C5、C12 以及初始菌株提取的蛋白的组成无明显的差异, 然而诱变样品的蛋白浓度明显高于初始菌株。通过豆粕液态发酵发现, 与初始菌株相比, 菌株 C5 发酵后的多肽得率和含量分别提高了 14.2% 和 15.6%; 菌株 C12 发酵后的多肽得率和含量分别提高了 13.2% 和 11.8%。诱变后发酵液中中性蛋白酶的酶活也大大提高, 菌株 C5 和 C12 发酵后中性蛋白酶酶活分别增加了 26.0% 和 29.8%。多肽分子量分布和 ACE 抑制率无显著差异。可见, ARTP 处理 *Bacillus amyloliquefaciens* 10160 可以显著提高其豆粕液态发酵制备降血压肽的产率。

关键词: 常压室温等离子体 (ARTP); 解淀粉芽胞杆菌 10160; 豆粕; 液态发酵; 肽

文章编号: 1673-9078(2018)10-133-140

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.10.019

High-yield-of-protease Strain Treated by ARTP and Its Improvement of Fermentation of Soybean Meal

QU Wen-juan, ZHANG Tian, MA Hai-le, HE Rong-hai

(College of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: *Bacillus amyloliquefaciens* 10160 was treated by the technology of atmospheric and room temperature plasma (ARTP). Under the optimum dose of lethality 80% for ARTP-induced mutagenesis (10 s), two stable mutant strains of C5 and C12 were successfully screened. Compared with the original strain, the neutral protease activities of C5 and C12 strains were increased by 86.0% and 85.0%, respectively. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) observations indicated that, the composition of the proteins extracted from C5, C12, and the original strains was similar, while the treated samples exhibited higher protein concentrations. The liquid fermentation experiments of soybean meal showed that, as compared with the original strain, the yield and content of peptides in the fermentation broth of C5 and C12 strains increased by 14.2% and 15.6%, and 13.2% and 11.8%, respectively. Neutral protease activities in the fermentation broths of C5 and C12 strains increased by 26.00% and 29.84%, respectively. There was no significant difference in the molecular weight distribution and ACE inhibition rate between the strains. Therefore, ARTP treatment of *Bacillus amyloliquefaciens* 10160 can significantly increase the yield of peptides produced by liquid fermentation of soybean meal.

Key words: Atmospheric and room temperature plasma (ARTP); *Bacillus amyloliquefaciens* 10160; soybean meal; liquid fermentation; peptides

通过改变基因组来进行微生物的培育对于生物技术和生物产业是非常重要的。在自然界中, 突变和自然选择结合是生命进化的关键驱动力^[1]。但是自然进化自发突变率低, 造成进化效率不高并且需要很长时间^[2], 所以为了提高突变率和筛选出有益的变种,

收稿日期: 2018-03-31

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0401401); 江苏省重点研发计划项目 (BE2016352); 江苏省高校优势学科项目 (PAPD)

通讯作者: 曲文娟, 博士, 副教授, 研究方向: 食品物理加工技术

很多人造的诱变技术已经被广泛研究和应用起来。迄今为止, 化学和物理诱变剂已经在工业菌株改造中发挥着重要作用^[3], 虽然化学诱变剂是有效的、经典的诱变手段, 但是化学诱变剂多为剧毒的致癌物质, 所以研究者目前也更倾向于利用物理法来进行诱变处理。

常压室温等离子体 (ARTP) 是一种新型的微生物诱变工具, 在常压常温下 (25~40 °C) 能瞬间破坏 DNA 链, 避免对热敏微生物的潜在热损伤^[4]。与传统

的诱变育种相比, ARTP 诱变育种有更强的 DNA 损伤, 较高的突变率, 并且突变菌株由良好的遗传稳定性^[5,6]。大量的研究也证实了 ARTP 对微生物的诱变有显著的正效应。MA^[7]利用 ARTP 成功诱变出了一株高产淀粉酶的枯草芽孢杆菌 WB600 mut-12#, 与未诱变的菌株相比, 淀粉酶的产量和产率分别增加了 35.0% 和 8.8%, 胞外蛋白浓度增加了 37.9%, 表现出良好的遗传稳定性。

ZHU 等^[8]以产脂肽的枯草芽孢杆菌 723 作为亲本, 利用 ARTP 诱变技术以及高通量筛选方法, 筛选出了 27,000 个突变体, 发现了 37 个高产菌株, 其中一株的产脂肽含量是亲本的 5.4 倍。FAN 等^[9]用 ARTP 改善工程化枯草芽孢杆菌 TD12np 尿苷的生产量, 通过建立的高通量筛选方法筛选出了一株突变体 F126, F126 菌用于摇瓶发酵 30 h 和分批补料发酵 48 h 后, 产生的尿苷含量比亲本分别提高了 4.4 倍和 8.7 倍。但是目前没有关于 ARTP 处理产中性蛋白酶的解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 10160 的任何报道, 所以本研究采用 ARTP 技术对产中性蛋白酶的 *Bacillus amyloliquefaciens* 10160 进行诱变改造, 以提高其产中性蛋白酶的能力, 从而提高豆粕液态发酵制备降血压肽的产率。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Bacillus amyloliquefaciens 10160, 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心; 豆粕 (蛋白含量 48.48%), 购自中储粮镇江有限公司; 三氯乙酸 (TCA)、甲叉丙烯酰胺、丙烯酰胺、过硫酸铵、十二烷基硫酸钠 (SDS)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、冰醋酸、乙腈和考马斯亮蓝 R-250, 购自上海国药集团; 溶菌酶、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、甘氨酸和四甲基乙二胺 (TEMED), 购自上海生工; 血管紧张素转换酶 (ACE) 和马尿酸-组氨酸-亮氨酸 (HHL), 购自 sigma。

1.2 设备与仪器

IS-RDD3 摇床, 上海福玛试验设备有限公司; YM30Z 灭菌锅, 上海三申医疗器械有限公司; SW-CJ-2FD 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; T6 新世纪紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; ARTP 诱变育种仪, 无锡源清天木生物科技有限公司; 电泳仪, 美国 BIO-RAD 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 培养基制备

LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L、牛肉浸取物 5 g/L、NaCl 10 g/L、琼脂 15 g/L、pH 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。

酪素培养基: 牛肉膏 3 g/L、酪素 8 g/L、琼脂 15 g/L、pH 7.0~7.2, 121 °C 灭菌 20 min。

种子培养基^[10]: 酵母膏 1% (m/V)、玉米黄粉 1% (m/V)、KH₂PO₄ 1% (m/V), 121 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基: 豆粕 20% (m/V)、玉米黄粉 1% (m/V)、KH₂PO₄ 0.5% (m/V), 121 °C 灭菌 20 min。

1.3.2 菌体悬浮液制备

将 *Bacillus amyloliquefaciens* 10160 接种到 LB 培养基中 36 °C 培养至对数生长期, 经过适当的稀释使菌体浓度保持在 10⁶ CFU/mL, 然后取 10 mL 稀释后的菌体 4000 r/min、4 °C 条件下离心处理 10 min, 取离心后的沉淀物用 10 mL 无菌生理盐水悬浮, 然后进行等离子体诱变处理。

1.3.3 等离子诱变处理

将上述菌体悬浮液与 10% (V/V) 甘油按 1:1 的比例混合, 混合后取 20 μL 均匀涂在无菌载玻片上, 在 ARTP 上进行诱变, 处理结束后, 用 1 mL 的无菌生理盐水将载片上的菌体清洗后待测。

ARTP 功率设定为 100 W, 通气量设定为 10 L/min, 利用冷却水循环机, 控制温度为 20 °C, 通过改变诱变时间 (2、4、6、8、10、12、14、16、18 和 20 s) 来计算诱变致死率, 以未诱变处理的菌体作为对照, 根据致死率 (%) 确定最终的诱变条件。

$$\text{致死率} = \frac{\text{对照菌落数} - \text{诱变后菌落数}}{\text{对照菌落数}} \times 100\%$$

1.3.4 初筛方法

将诱变完的菌体稀释合适的浓度, 涂于酪素培养基上培养 48 h (36 °C) 后, 记录培养基上菌落和水解圈直径, 根据公式计算 K 值^[11]。初筛的标准为菌落直径在 1.0~2.0 之间且 K 值较大。对初筛得到的菌落进行斜面保存。

$$K = \frac{\text{透明圈直径}}{\text{菌落直径}}$$

1.3.5 复筛方法

将初筛得到的菌株接种到 LB 培养基中进行摇瓶培养 (36 °C) 24 h, 然后离心取上清液, 按照国标 GB/T 23527-2009^[12]测定其中性蛋白酶的酶活。

1.3.6 诱变菌株产蛋白酶稳定性试验

将筛选出的蛋白酶活显著提高的菌株进行遗传稳定性试验, 对突变菌株连续传代培养 10 代, 选取第 1、3、5、7 和 9 代的菌株摇瓶培养 (36 °C) 24 h 后, 测定中性蛋白酶酶活, 来确定筛选出的突变菌株的稳定性。

1.3.7 诱变机理试验

1.3.7.1 菌体蛋白样品的制备

参考石坡^[13]的方法制备菌体蛋白样品。

1.3.7.2 菌体蛋白浓度的测定

采用 Bradford (1976) 法^[14]测定样品中蛋白浓度。

1.3.7.3 SDS-PAGE 电泳

(1) 浓缩胶配方见表 1。

(2) 分离胶配方见表 2。

表 1 浓缩胶配方

Table 1 The formula of concentration gel

组分名称	2 mL 凝胶所对应的各组分的取样量/mL
H ₂ O	1.4
30% 丙烯酰胺	0.33
1.0 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.25
10% SDS	0.02
10% 过硫酸铵	0.02
TEMED	0.002

表 2 分离胶配方

Table 2 The formula of separation gel

组分名称	5 mL 凝胶所对应的各组分的取样量/mL
H ₂ O	1.9
30% 丙烯酰胺	1.7
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	1.3
10% SDS	0.05
10% 过硫酸铵	0.05
TEMED	0.002

(3) 电极缓冲液: 称取 15.1 g Tris、94 g 甘氨酸, 加入 5.0 g SDS, 用去离子水溶解并定容到 1 L, 调至 pH 8.3。

(4) 脱色液配方: 量取 100 mL 醋酸和 50 mL 乙醇, 加入去离子水定容到 1 L。

(5) SDS-PAGE 操作步骤: 将 20 μL 电泳菌体蛋白样品与 5 μL 上样缓冲液混合, 在沸水浴中煮 5 min, 根据样品的蛋白浓度计算出上样的体积, 使上样蛋白量达到 15 μg, 然后缓慢的在梳孔中加样, 浓缩胶稳压 80 V, 分离胶稳压 120 V, 电泳时间 2 h。取下凝胶后, 加入考马斯亮蓝 R-250 染色 2 h。染色结束后, 加入脱色液脱色过夜。

1.3.8 豆粕液态发酵试验

将筛选出的蛋白酶活性高且稳定性好的两株突变菌进行豆粕液态发酵试验, 发酵结束后, 5000 r/min 离心 15 min 取上清液用于测定各类指标, 其结果与初始菌株 *Bacillus amyloliquefaciens* 10160 发酵结果进行

比较。

豆粕液态发酵的工艺条件为: 豆粕添加量 20% (m/V)、KH₂PO₄ 浓度 0.5% (m/V)、玉米黄粉 (提供碳源和氮源) 添加量 1% (m/V)、温度 32 °C、自然 pH (5.8)、接种量 10% (V/V)、发酵时间 24 h。

1.3.8.1 多肽含量的测定

参照陈钧辉等^[15]双缩脲法测定多肽浓度。多肽含量 (%) 计算公式如下:

$$\text{多肽含量} = \frac{C \times V}{m} \times 100\%$$

式中: C, 发酵液的多肽浓度, mg/mL; V, 发酵液的总体积, mL; m, 发酵液放入 105 °C 烘箱中烘干至恒重后的质量, mg。

1.3.8.2 多肽得率的测定

样品的多肽得率 (%) 计算公式如下:

$$\text{多肽得率} = \frac{C \times V}{M} \times 100\%$$

式中: M, 豆粕和玉米粉总质量, mg。

1.3.8.3 ACE 抑制率的测定

取发酵上清液与 15% (m/V) TCA 按 1:1 的比例混合均匀, 30 °C 反应 30 min 后 10000 r/min 离心 10 min, 然后取上清液调节 pH 为中性, 用去离子水将上清液统一稀释到 10 mg/mL 后, 参考 JIA^[16]的 ACE 抑制率方法测定 ACE 抑制率 (%)。

1.3.8.4 发酵液分子量分布的测定

参考 JIN^[17]的方法测定。采用高效凝胶过滤色谱法测定多肽的分子量分布。色谱柱: TSK-gelG2000 (300 mm×7.8 mm)。

将发酵上清液配置成浓度 10 mg/mL 的样品溶液, 依据上述方法进行分析计算出多肽的相对分子量及其分布范围所占的质量分数 (%)。

1.3.8.5 发酵液上清液酶活的测定

中性和碱性蛋白酶酶活参考国标 GB/T 23527-2009^[12]进行测定。

1.3.9 数据统计分析

所有测量数据均重复测定三次, 结果以平均值±标准偏差表示。用 SPSS 16.0 软件进行统计学差异性分析, 以 p<0.05 表示具有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 致死率曲线绘制结果

采用平板计数法绘制 *Bacillus amyloliquefaciens* 10160 的 ARTP 诱变致死率曲线, 建立 ARTP 诱变时间与致死率的关系曲线, 结果见图 1。

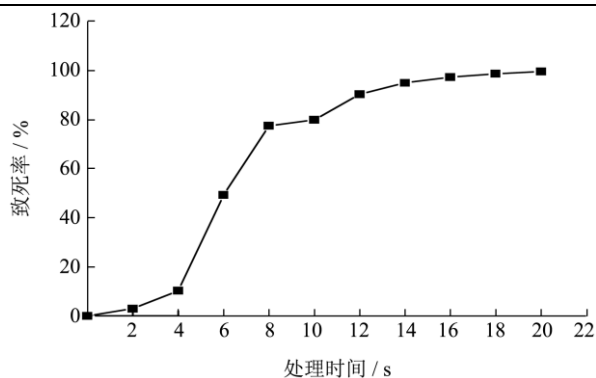


图1 ARTP处理时间与致死率的关系曲线

Fig.1 Relation curve between ARTP treatment time and lethality

由图1可知,在处理时间在2~12s之间时,随着处理时间的增加,致死率迅速的增加。研究报道显示^[18],菌体突变率会随着诱变剂量的增加而增加,但是当达到一定的诱变剂量,负突变率会增高,正突变率有所下降,诱变剂量使致死率在80%时^[19],正突变率高,诱变效果较好。推测可能是因为ARTP产生的活性粒子能够穿透细胞膜到达细胞内部,破坏DNA、蛋白键等,当能量适中时,细胞中DNA不完全修复引起控制产生目标产物的遗传片段的改变,最终导致性状发生改变;当能量过大时,对DNA键的破坏较大,菌体自身很难修复,控制目标产物产生的基因没有得到修复反而产生了负效应^[20,21]。本研究结果显示在诱变时间为10s时,致死率达到80.0%,因此ARTP诱变处理时间10s最适宜,并将其用于后续试验中。

2.2 初筛结果

将ARTP处理后的菌株在酪素筛选培养基中进行初筛,从诱变后的菌落中得到K值较大的12株菌体,结果见表3。K值在一定程度上反映了菌体分泌的蛋白酶的酶活力大小,K值越大表示菌体分泌的蛋白酶分解酪素的能力越高,酶活力越高。从表中可以看出,与初始菌株相比,诱变后12株菌C1~C12的K值分别提高了33.37%、32.00%、6.76%、18.48%、21.33%、40.23%、10.24%、22.49%、12.04%、18.48%、33.37%和46.57%。在这12株诱变菌中,K值增加较显著的菌株为C1、C2、C5、C6、C8、C11和C12,增加率均大于20%。根据邢新会等^[22]对ARTP诱变出来的高产色氨酸大肠杆菌,通过对其进行基因组重测序并进行COG分类分析,发现16组基因与氨基酸的转运和代谢相关,推测ARTP处理造成K值的增加可能是因为ARTP通过发射等离子体射流,穿过细胞膜使控制蛋白酶产生的遗传物质发生改变,引起代谢通路的改变,从而导致分泌的胞外蛋白酶活性提高。舒冬梅等

^[9]利用酪素培养基对ARTP诱变后的米曲霉进行初筛时,也筛选出了与初始菌株K值(1.13)相比较大的三株菌(2.00、1.88和2.14)。

表3 初筛菌株的水解圈直径、菌直径和K值

Table 3 Hydrolysis circle diameter, bacteria diameter, and K values of strains by initial screening

菌株编号	水解圈直径/mm	菌直径/mm	K值
对照	14.20±0.02	1.50±0.07	9.47
C1	14.90±0.16	1.18±0.02	12.63 (↑33.37%)
C2	22.50±0.08	1.80±0.06	12.50 (↑32.00%)
C3	16.18±0.15	1.60±0.01	10.11 (↑6.76%)
C4	20.20±0.02	1.80±0.10	11.22 (↑18.48%)
C5	20.00±0.22	1.74±0.03	11.49 (↑21.33%)
C6	17.26±0.01	1.30±0.10	13.28 (↑40.23%)
C7	16.70±0.10	1.60±0.12	10.44 (↑10.24%)
C8	17.40±0.12	1.50±0.05	11.60 (↑22.49%)
C9	19.10±0.02	1.80±0.03	10.61 (↑12.04%)
C10	20.20±0.05	1.80±0.02	11.22 (↑18.48%)
C11	20.20±0.14	1.60±0.01	12.63 (↑33.37%)
C12	22.20±0.23	1.60±0.03	13.88 (↑46.57%)

注:括号里的数值为诱变菌株的K值与对照相比的增加率。

2.3 复筛结果

表4 复筛菌株中性蛋白酶酶活

Table 4 Neutral protease enzyme activities of strains by secondary screening

菌株编号	中性蛋白酶酶活/(U/mL)	酶活增加率/%
对照	41.10±0.83	-
C1	66.23±0.41	61.13
C2	62.65±0.15	52.43
C3	42.93±0.20	4.45
C4	44.18±0.10	7.49
C5	66.14±0.31	60.93
C6	45.09±0.13	9.72
C7	43.85±0.12	6.68
C8	43.26±0.11	5.26
C9	44.60±0.02	8.50
C10	43.68±0.01	6.28
C11	43.26±0.20	5.26
C12	76.04±0.12	85.02

虽然可以从酪素筛选平板上筛选出正突变的菌株,但是其筛选的结果存在一定的误差,所以需要进一步复筛验证^[23],对表3中的12株菌进行摇瓶培养复筛测定其中性蛋白酶酶活,中性蛋白酶酶活力结果见

表4。从表4中可以看出,与初始菌株相比,12株菌的中性蛋白酶活力都有不同程度的增加,其中C1、C2、C5和C12四株菌的产酶活力增加较大,中性蛋白酶活力分别为66.23、62.65、66.14和76.04 U/mL,与初始菌株相比,酶活增加率都大于50%,比舒冬梅等^[11]用ARTP诱变产蛋白酶的米曲霉筛选出的诱变菌株的中性蛋白酶活力提升(19.1%)效果好。ARTP能够使诱变菌株分泌的蛋白酶活力不同程度的提升,这可能是因为ARTP产生的等离子射流中包含多种具有化学活性的粒子,对胞内DNA损伤具有多样性,因而获得的突变型也具有很大的多样性^[24]。

2.4 遗传稳定性结果

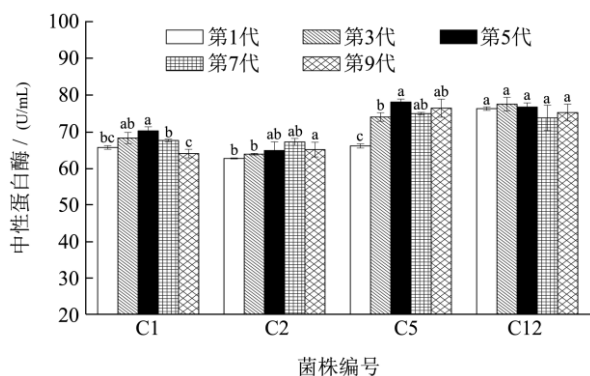


图2 诱变菌株遗传稳定性

Fig.2 The hereditary stability of mutant strains

注:不同小写字母表示各诱变菌株在不同传代次数之间存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

对复筛筛选出的C1、C2、C5和C12四株诱变效果较好的菌株进行遗传稳定性验证,结果见图2。

由图2看出,C1诱变菌株中性蛋白酶活力,在第1代到第5代的传代过程中逐渐增大,但在后续传代过程中显著下降 ($p < 0.05$);C2菌株在传代过程中,中性蛋白酶活力逐渐增加,从62.73 U/mL(第1代)上升到最大67.22 U/mL(第7代),在后续传代过程中趋于稳定;C5菌株中性蛋白酶活力,从第1代到第5代传代过程中显著提高 ($p < 0.05$),从66.14 U/mL(第1代)上升到最大78.12 U/m(第5代),在后续传代过程中趋于稳定。这可能是因为,在诱变后,虽然菌体的基因有所改变,但并不一定能立即表现出来,在传代培养过程中表现型才逐渐显现出来^[25]。舒冬梅等^[11]在对米曲霉进行ARTP诱变过程中也发现了这一现象,在对诱变后筛选出的H15菌株进行遗传稳定性测定中,也得出中性蛋白酶活力在传到第9代时蛋白酶活力从1792.8 U/g上升到1816.3 U/g。C12诱变菌株稳定性较好,中性蛋白酶活力无显著性变化 ($p > 0.05$)。综合考虑中性蛋白酶活力和遗传稳定性两

个因素,选取C5和C12两种诱变菌株进行后续研究。

2.5 SDS-PAGE 电泳分析结果

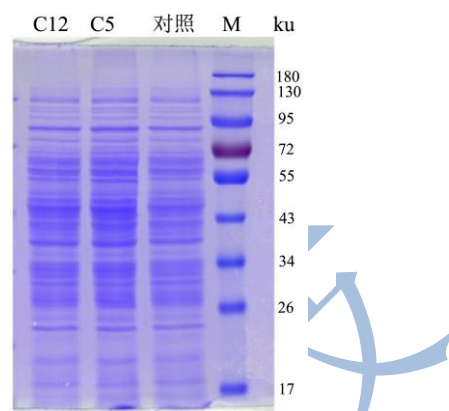


图3 诱变菌株和初始菌株菌体蛋白的SDS-PAGE电泳图

Fig.3 SDS-PAGE electrophoretograms of proteins from the mutant and original strains

注: M: Marker (分子量范围10~180 ku)。

对诱变菌株C5、C12以及亲本*Bacillus amyloliquefaciens* 10160提取的菌体总蛋白进行SDS-PAGE电泳分析,经过凝胶成像分析系统分析并拍照形成电泳图,结果见图3。

从图3可以看出,*Bacillus amyloliquefaciens* 10160经过ARTP处理后,诱变菌株C5和C12与未处理的菌株条带并没有明显的差异,仅在蛋白条带的深浅上有差异,其中诱变处理的两株菌蛋白条带颜色加深,说明诱变后蛋白浓度有所增加,推测可能是因为ARTP在此诱变条件下产生的化学活性粒子,不足以引起菌体蛋白组成的改变,只是在某种程度上使菌体蛋白的表达量增加。该结果与吴平等^[26]报道的结论一致,其利用SDS-PAGE电泳分析脉冲磁场处理对格式李斯特菌蛋白层面的影响研究中,也发现蛋白条带未发生改变,只是条带变深。

2.6 豆粕液态发酵试验结果

将诱变菌株C5和C12与初始菌株用于豆粕液态发酵制备降血压肽试验中,对发酵液离心取上清液,进行各项指标测定,结果见表5和表6。

由表5可以看出,诱变后的菌株C5和C12经过发酵后,发酵上清液的多肽含量和得率与初始菌株发酵液相比显著提高 ($p < 0.05$)。这是因为诱变后的菌株生长代谢过程中产生的蛋白酶活力比初始菌株高,所以在发酵过程中,分解豆粕蛋白产生的多肽含量和得率都有所提高。与初始菌株发酵液相比,菌株C5发酵后多肽得率和含量分别提高了14.23%和15.56%;菌株C12发酵后多肽得率和含量分别提高了13.24%

和 11.77%。FAN 等^[9]用 ARTP 改善工程化枯草芽孢杆菌 TD12np 尿苷的生产量, 通过建立的高通量筛选方法筛选出了一株突变体 F126, F126 菌用于摇瓶发酵 30 h 和分批补料发酵 48 h 后, 产生的尿苷含量比亲本分别提高了 4.4 倍和 8.7 倍。同样石琳等^[27]通过传统的紫外诱变红曲霉, 将初筛得到的高产蛋白酶菌株用于高温豆粕发酵, 以发酵产生的多肽含量为指标, 筛选出了一株高产可溶性多肽的突变菌株, 该菌株在同等发酵条件下, 产生的多肽含量是原始菌株的 1.47 倍。此外, C5 和 C12 菌株发酵上清液的中性蛋白酶酶活

也显著提高 ($p < 0.05$), 分别增加了 26.00% 和 29.84%, 但是碱性蛋白酶酶活与初始菌株相比并没有显著性差异 ($p > 0.05$)。从 ACE 抑制率看出, 将 C5、C12 以及初始菌株发酵液多肽浓度稀释到相同浓度 (10 mg/mL) 后, ACE 抑制率无显著差异 ($p > 0.05$)。这可能是由于 ACE 抑制肽活性与其氨基酸组成和氨基酸序列有着重要的联系^[28], 虽然诱变后菌体分泌的蛋白酶酶活增大, 发酵产生的多肽含量提高, 但是产生的多肽的氨基酸组成和序列及分子量分布并无明显的差异。

表 5 诱变菌株和初始菌株豆粕液态发酵结果

Table 5 Results of soybean meal liquid fermentation from the mutant and original strains

测定指标	对照	C5	C12
多肽含量/%	56.26±0.16 ^b	64.27±0.94 ^a (↑14.23%)	63.71±1.04 ^a (↑13.24%)
多肽得率/%	12.15±0.35 ^b	14.04±0.29 ^a (↑15.56%)	13.58±0.24 ^a (↑11.77%)
中性蛋白酶酶活/(U/mL)	350.23±2.37 ^c	441.29±4.99 ^b (↑26.00%)	454.74±4.11 ^a (↑29.84%)
碱性蛋白酶酶活/(U/mL)	274.70±2.69 ^a	267.98±3.23 ^a	272.63±5.45 ^a
ACE 抑制率/%	57.52±0.023 ^a	58.71±0.01 ^a	59.82±0.01 ^a

注: 同行不同小写字母表示同一测定指标下诱变菌株 (C5、C12) 与对照之间存在显著性差异 ($p < 0.05$); 括号里的数值为同一测定指标下, 诱变菌株 (C5、C12) 与对照相比的增加率。

表 6 诱变菌株和初始菌株发酵上清液分子量分布

Table 6 Molecular weight distribution of fermentation supernatants from the mutant and original strains

分子量范围	对照/%	C5/%	C12/%
>10000	1.51±0.02	2.12±0.01(↑40.04%)	2.45±0.01(↑62.25%)
10000~5000	5.44±0.01	6.22±0.03(↑14.34%)	5.22±0.02
5000~3000	5.88±0.02	6.29±0.01(↑6.97%)	5.50±0.01
3000~1500	14.44±0.06	14.73±0.03	14.07±0.01
1500~150	52.92±0.20	52.48±0.12	53.27±0.08
<150	19.81±0.13	18.16±0.05	19.49±0.12

注: 括号里的数值为同一分子量范围下, 诱变菌株 (C5、C12) 与对照相比的增加率。

表 6 列出了经过 ARTP 诱变筛选得到的两株菌以及初始菌株分别用于豆粕液态发酵后, 发酵上清液的分子量分布情况。由表 6 可以看出, C5 和 C12 两菌株发酵上清液的分子量低于 3000 u 的小分子肽比例分别为 85.37% 和 86.83%, 与初始菌株 (87.17%) 相比, 无明显差异。这可能是因为虽然诱变后的菌株酶活性有所提升, 但是所分泌的酶的种类并没有改变, 酶切位点未发生改变, 致使酶解产生的小分子量段肽的肽链长度未发生改变。虽然诱变菌株液态发酵后大分子量段肽含量有所增加, 尤其是 C5 菌株发酵液, 但是由于主要是低分子量多肽提供 ACE 抑制活性, 且活性更高^[29], 所以该结果也为上述诱变后的菌株发酵上清液 ACE 抑制率没有显著性提高提供了理论依据。

3 结论

3.1 本文采用 ARTP 对 *Bacillus amyloliquefaciens* 10160 进行诱变处理, 以致死率达到 80% 为考察指标优化获得 ARTP 诱变的最佳条件为: 功率 100 W、通气量 10 L/min、处理时间 10 s。经过进一步菌株初筛和复筛, 得到了 C5 和 C12 两株稳定遗传的突变菌株, 与初始菌株相比, 中性蛋白酶酶活分别提高了 86.03% 和 85.02%。并对菌株 C5、C12 以及初始菌株提取的菌体总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析发现, 诱变后蛋白条带数并未发生变化, 只是蛋白条带变深, 表明诱变对菌体蛋白组成并未产生显著影响, 仅是提高了蛋白浓度。

3.2 豆粕液态发酵试验发现, 与初始菌株相比, 诱变后发酵液中多肽含量和得率大大提高, 菌株 C5 发酵后多肽得率和含量分别提高了 14.23% 和 15.56%; 菌株 C12 发酵后多肽得率和含量分别提高了 13.24% 和

11.77%。诱变后发酵液中中性蛋白酶酶活也大大提高,菌株 C5 和 C12 发酵后中性蛋白酶酶活分别增加了 26.00% 和 29.84%,但是碱性蛋白酶酶活并没有明显变化。菌株 C5 和 C12 发酵液分子量分布未发现改变,ACE 抑制率未发生变化,由此得出 ARTP 处理 *Bacillus amyloliquefaciens* 10160 可以显著提高其豆粕液态发酵制备降血压肽的产率。

参考文献

- [1] LEE H, POPODI E, TANG H, et al. Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(41): 2774-2783
- [2] Drake J W, Charlesworth B, Charlesworth D, et al. Rates of spontaneous mutation [J]. Genetics, 1998, 148: 1667-1686
- [3] Kodym A, Afza R. Physical and chemical mutagenesis [J]. Methods in Molecular Biology Clifton, 2003, 236: 189-203
- [4] CAO S, ZHOU X, JIN W B, et al. Improving of lipid productivity of the oleaginous microalgae *Chlorella pyrenoidosa* via atmospheric and room temperature plasma (ARTP) [J]. Bioresource Technology, 2017, 244: 1400-1406
- [5] ZHANG X, ZHANG C, ZHOU Q Q, et al. Quantitative evaluation of DNA damage and mutation rate by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) and conventional mutagenesis [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(13): 5639-5646
- [6] REN F, CHEN L, TONG Q L. Highly improved acarbose production of *Actinomyces* through the combination of ARTP and penicillin susceptible mutant screening [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2017, 33(1): 16
- [7] MA Y F, YANG H Q, CHEN X Z, et al. Significantly improving the yield of recombinant proteins in *Bacillus subtilis* by a novel powerful mutagenesis tool (ARTP): Alkaline α -amylase as a case study [J]. Protein Expression and Purification, 2015, 114: 82-88
- [8] ZHU L Y, XU Q, JING L, et al. Polydiacetylene-based high-throughput screen for surfactin producing strains of *Bacillus subtilis* [J]. Plos One, 2014, 9(2): e88207
- [9] FAN X G, WU H Y, LI G L, et al. Improvement of uridine production of *Bacillus subtilis* by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and high through put screening [J]. Plos One, 2017, 12(5): e0176545
- [10] 罗娟.超声波对枯草芽孢杆菌液态发酵豆粕及其产物功能特性的影响[D].镇江:江苏大学,2016
- LUO Juan. Effect of ultrasound on liquid-state fermentation of soybean meal by *Bacillus subtilis* and functional activity of fermentation products [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2016
- [11] 舒冬梅,王德良,宋续磊,等.常压室温等离子体诱变(ARTP)及高通量筛选高产蛋白酶米曲霉的初探[J].中国调味品, 2016,41(12):67-73
- SHU Dong-mei, WANG De-liang, SONG Xu-lei, et al. Initial study on high proteinase-producing *Aspergillus oryzae* with ARTP mutation and high-throughput screening [J]. China Condiment, 2016, 41(12): 67-73
- [12] GB/T 23527-2009,蛋白酶制剂[S]
- GB/T 23527-2009, Protease preparations [S]
- [13] 石坡.离子注入 D-核糖产生菌的诱变效应及作用机理研究 [D].石家庄:河北师范大学,2013
- SHI Po. Study on the mutagenic effect and mechanism of D-ribose producing strain by ion implantation [D]. Shijiazhuang: Hebei Normal University, 2013
- [14] 柳荫,吴凤智,陈龙,等.考马斯亮蓝法测定核桃水溶性蛋白含量的研究[J].中国酿造,2013,32(12):131-133
- LIU Yin, WU Feng-zhi, CHEN Long, et al. Determination of water-soluble protein in walnut by Bradford method [J]. China Brewing, 2013, 32(12): 131-133
- [15] 陈钧辉,李俊,张冬梅,等.生物化学实验[M].第四版.北京:科学出版社,2002
- CHEN Jun-hui, LI Jun, ZHANG Dong-mei, et al. Biochemistry experiment [M]. 4th ed. Beijing: Science Press, 2002
- [16] JIA J Q, MA H L, ZHAO W R, et al. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein [J]. Food Chemistry, 2010, 119(1): 336-342
- [17] JIN J, MA H L, WANG B, et al. Effects and mechanism of dual-frequency power ultrasound on the molecular weight distribution of corn gluten meal hydrolysates [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2016, 30: 44-51
- [18] 李然.枯草芽孢杆菌胞外蛋白酶突变株的筛选及其拮抗作用[D].济南:山东师范大学,2008
- LI Ran. Screening of extracellular protease mutants of *Bacillus subtilis* and their antagonistic function [D]. Jinan: Shandong Normal University, 2008
- [19] 祝子坪,马海乐.桑黄菌原生质体紫外线诱变及高产菌株选育[J].食用菌,2007,29(5):13-14
- ZHU Zi-ping, MA Hai-le. Protoplast ultraviolet mutation from *Phellinus igniarius* and breeding of high-yield Strains

- [J]. *Edible Fungi*, 2007, 29(5): 13-14
- [20] 朱瑞敏, 邱晨曦, 韩悦, 等. 微生物育种物理诱变技术 ARTP 的应用进展[J]. *生物技术世界*, 2016, 4: 20-23
ZHU Rui-min, QIU Chen-xi, HAN Yue, et al. The application progress of ARTP which is a physical mutation breeding technology of microorganism [J]. *Biotechnology World*, 2016(4): 20-23
- [21] 赵天惠. 枯草芽孢杆菌脉冲强光诱变及其发酵性能研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017
ZHAO Tian-hui. Study on *Bacillus Subtilis* induced by pulsed light and its fermentation performance [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2017
- [22] 邢新会, 张翀, 张雪, 等. 常压室温等离子体(ARTP)微生物诱变育种机理研究及设备集成[C]. 中国酶工程与糖生物工程学术研讨会论文摘要集. 2015
XING Xin-hui, ZHANG Chong, ZHANG Xue, et al. Study on microbial mutation breeding mechanism of atmospheric pressure room temperature plasma(ARTP) and equipment integration [C]. *China Enzyme Engineering and Sugar Bioengineering Symposium Abstracts*, 2015
- [23] 牛春华, 迟燕平, 高岩, 等. 高产蛋白酶枯草芽孢杆菌 JAASB 的多种诱变选育[J]. *食品工业*, 2013, 34(5): 159-162
NIU Chun-hua, CHI Yan-ping, GAO Yan, et al. Selections of high protease-producing strain of *Bacillus subtilis* JAASB by mutations [J]. *Food Industry*, 2013, 34(5): 159-162
- [24] 马娜娜, 马韵升, 张心青, 等. 一株产胶霉菌素菌株的 ARTP 诱变及筛选[J]. *中国农学通报*, 2017, 33(29): 36-41
MA Na-na, MA Yun-sheng, ZHANG Xin-qing, et al. ARTP mutation and screening of a strain producing gliotoxin [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2017, 33(29): 36-41
- [25] 周德庆. 微生物学教程[M]. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 2011
ZHOU De-qing. *Microbiology Course* [M]. 3th ed. Beijing: Higher Education Press, 2011
- [26] 吴平. 脉冲磁场对格氏李斯特菌的杀菌作用及机理研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2015
WU Ping. Research on sterilization effect and mechanisms of *Listeria Grayi* by pulsed magnetic field [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2015
- [27] 石琳, 尹园, 王帅, 等. 红曲霉发酵高温豆粕高产可溶性多肽 [J]. *食品科学*, 2015, 36(19): 137-142
SHI Lin, YIN Yuan, WANG Shuai, et al. Production of soluble polypeptide from fermented high-temperature soybean meal by *monascus purpureus* [J]. *Food Science*, 2015, 36(19): 137-142
- [28] LIU C L, FANG L, MIN W H, et al. Exploration of the molecular interactions between angiotensin-I-converting enzyme (ACE) and the inhibitory peptides derived from hazelnut (*Corylus heterophylla* Fisch.) [J]. *Food Chemistry*, 2018, 245: 471-480
- [29] Moayed A, Mora L, Aristoy M C, et al. Peptidomic analysis of antioxidant and ACE-inhibitory peptides obtained from tomato waste proteins fermented using *Bacillus subtilis* [J]. *Food Chemistry*, 2018, 250: 180-187