

中性蛋白酶高产菌株的诱变选育

朱明军, 区健发, 陈鸿图

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 对产中性蛋白酶的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) SHB 2010-1 进行物理和化学诱变以筛选高产菌株。考察了6种筛选培养基在分辨中性蛋白酶高产菌株上的效率, 菌株在脱脂牛奶培养基上生长状态最佳, 水解圈易于观察。以紫外线、硫酸二乙酯为诱变剂, 研究了两者的致死率曲线, 选择致死率为90~95%的剂量进行两轮复合诱变, 诱变菌的发酵液酶活依次较出发菌提高1.49%、10.99%、38.77%和59.68%, 复合诱变表现出较单一诱变更强的效应, 并能利用弱诱变剂紫外线积累的隐性突变。最终筛选得到的菌株命名为DES-59, 在50 mL发酵培养基中培养60 h酶活达到7307 U/mL, 相应的生物量为 2.205×10^{10} CFU/mL, 表现出典型的生长偶联型。突变菌的*nprE*基因经克隆及测序与数据库上的序列一致, 酶活性的提高并非由中性蛋白酶A结构改变引起, 突变出现在生产蛋白酶的其他位点上, 有利于潜在性能的提高。

关键词: 中性蛋白酶; 枯草芽孢杆菌; 诱变; 选育

文章编号: 1673-9078(2013)11-2686-2691

Mutation and Screening of Neutral Protease High-yield Strain

ZHU Ming-jun, OU Jian-fa, CHEN Hong-tu

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou Higher Education Mega Center, Panyu, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The biological effects of physical and chemical mutagenesis inducements on neutral protease produced by *Bacillus subtilis* SHB 2010-1 were investigated. Six selective media were studied on screening the efficiency of high-yield strain. Skim milk agar was proved to be the excellent cell culture medium, with which the hydrolysis zone was easily observed. On the base of the corresponding death curves, death rate at 90~95% was selected to take two-round ultraviolet-diethyl sulfate mutation. The enzyme activities of mutant strains from each step were 1.49%, 10.99%, 38.77% and 59.68%, respectively, higher than the original strain. The results showed that complex mutagenesis performed a more significant effect than single factor. The mutant strain named DES-59 were finally screened with the maximum enzyme activity of 7307 U/mL in 50 mL fermentation medium after 60 h, and the cell density of 2.205×10^{10} CFU/mL. The *nprE* gene of the mutant DES-59 was the same as sequence in database, indicating that the improvement was not contributed by the structural modification of neutral protease A, but by some unstated sites.

Key words: neutral protease; *Bacillus subtilis*; mutation; screening

中性蛋白酶是其最适作用pH介于6.0~7.5之间的一类蛋白酶, 作用底物广泛, 反应条件温和, 加工废水不会对环境造成酸碱污染, 是目前蛋白质水解处理的重要酶种, 主要用于皮革加工、纺织和食品工业上, 近年来更发展出许多新的用途^[1-2]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种常用的中性蛋白酶生产菌种。国内的工业生产菌种大多为上世纪八十年代所开发的诱变菌株, 经过长期的传代都出现产酶能力及稳定性下降、部分优良性状退化或丧失等问题。加上近年来原材料价格上涨、酶制剂行业竞争激烈, 微生物

收稿日期: 2013-07-05

基金项目: 广东省省部产学研结合项目(2011B090400033); 广东高校特色调味品工程技术开发中心开放课题(GCZX-B1103)

作者简介: 朱明军(1969-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程

育种对提高发酵水平和降低成本具有重要意义。随着基因工程技术和代谢控制理论的发展, 定向育种发挥着越来越大的作用, 但传统的诱变技术仍然是大多数工业微生物育种的重要技术^[3]。根据诱变剂的不同, 诱变手段主要分为物理诱变、化学诱变及生物诱变。各种诱变剂具有不同的诱变效应, 在育种工作中常使用两种或以上的手段进行复合处理以提高诱变效应, 包括不同诱变剂的先后使用、同一种诱变剂的重复作用、及不同诱变剂同时使用^[4]。根据复合诱变的协同效应, 游致娟与冯刚利^[5]使用紫外线与亚硝酸复合诱变选育出中性蛋白酶酶活较出发菌提高了75.3%的枯草芽孢杆菌。另外, 在中性蛋白酶生产菌株的选育工作上, 合适的筛选培养基是影响筛选效率的重要因素, 而各研究者所使用的培养基不尽相同。本研究在比较

了不同培养基筛选效率的基础上,使用紫外线和硫酸二乙酯(DES)两种传统的物理诱变剂和化学诱变剂,通过两轮的物理-化学诱变,以期获得高性能的中性蛋白酶生产菌株。

1 材料与方法

1.1 菌种

枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* SHB 2010-1 由华南理工大学生物科学与工程学院发酵工程实验室分离保存。

1.2 培养基

种子培养基:胰蛋白胨 10 g/L,酵母粉 5 g/L, NaCl 10 g/L,调节 pH 到 8.0, 121 °C 灭菌 20 min 备用;添加琼脂 20 g/L 制成试管斜面培养基。

鉴别培养基:

(1) 淀粉酪素培养基^[6]:可溶性淀粉 10 g/L, 酵母膏 5 g/L, 干酪素 10 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, MgSO_4 0.2 g/L。

(2) 酵母膏酪素培养基^[6]:酵母膏 2 g/L, 干酪素 10 g/L。

(3) 酪素培养基^[6]: KH_2PO_4 0.36 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, ZnCl_2 0.014 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.07 g/L, NaCl 0.16 g/L, CaCl_2 0.002 g/L, FeSO_4 0.002 g/L, 干酪素 4 g/L, Tryptilase 0.05 g/L。

(4) LB+酪素培养基^[7]:蛋白胨 10 g/L, 牛肉膏 5 g/L, NaCl 5 g/L, 葡萄糖 1 g/L, 酵母膏 2 g/L, 干酪素 10 g/L。

上述培养基各成分溶解后,调节 pH 7.0, 加入琼脂 20 g/L, 121 °C 灭菌 20 min 备用。

(5) 脱脂奶粉培养基^[7]:脱脂奶粉 10 g/L, 琼脂 20 g/L, 115 °C 灭菌 15 min 备用。

(6) 脱脂奶粉培养基 2:用 10 g/L 脱脂奶粉替代酪素培养基(3)中 4 g/L 的干酪素。115 °C 灭菌 15 min 备用。

摇瓶发酵培养基:玉米粉 40 g/L, 豆粕粉 30 g/L, 麸皮 30 g/L, Na_2HPO_4 4 g/L, KH_2PO_4 0.3 g/L, pH 自然, 121 °C 灭菌 30 min; 按 47.5 mL/500 mL 三角瓶配制。

1.3 实验方法

1.3.1 种子液和菌悬液制备

挑取在试管斜面活化 48 h 菌苔 2 环到 10 mL 种子培养基, 30 °C、200 r/min 培养 11~12 h (OD_{600} 约为 1.5), 以 5% 的接种量转接到含 47.5 mL 种子培养基的

500 mL 三角瓶中, 30 °C、200 r/min 培养 6 h, 4 °C、5000 r/min 离心 10 min 去上清, 用等量无菌水悬浮, 即得菌悬液和种子液。

1.3.2 鉴别培养基的筛选

菌悬液稀释后, 取 0.1 mL 涂布于各鉴别平板, 30 °C 培养 48 h, 观察菌落生长状况及水解圈情况。选择菌体易于生长且容易观察的作为鉴别培养基, 同时以该培养基进行稀释涂布计算生物量。

1.3.3 菌株生长曲线及比生长速率和倍增时间测定

(1) 菌株生长曲线测定

菌苔经 10 mL 种子培养基活化后, 转接到 47.5 mL 种子培养基中, 培养方法同 1.3.1, 每隔 1 h 取样, 以培养基为空白, 测定 OD_{600} , 制作生长曲线。

(2) 菌株比生长速率和倍增时间测定

以时间为横坐标, 吸光值的自然对数为纵坐标作曲线。对对数生长期的数据点拟合直线, 其斜率为比生长速率 μ 。倍增时间 $T_d=0.693/\mu$ (h)。

1.3.4 中性蛋白酶活力测定

采用《中华人民共和国国家标准》GB/T 23537-2009, 蛋白酶制剂, 使用福林法测定酶活。

1.3.5 紫外诱变处理

1.3.5.1 菌悬液的制备

按 1.3.1 方法收集菌体, 用无菌生理盐水洗涤离心两次并震荡重悬至原体积。

1.3.5.2 紫外线诱变剂量的确定

固定紫外灯的功率和照射距离, 通过改变照射的时间来获得不同的诱变剂量。紫外灯预热 30 min 后, 取 3 mL 菌悬液加入到的无菌平皿 ($\Phi 60$ mm, 内加 50 mm 铁丝、磁力转子), 在 18 W 紫外灯下 30 cm 处, 启动磁力搅拌器并调整转速为 200 r/min, 30 s 后转速稳定, 打开皿盖并立即计时, 分别照射 0 s、15 s、30 s、45 s、60 s、75 s 后加上皿盖。在红灯下将紫外照射后的菌悬液吸出平皿, 并用 7 mL 的无菌生理盐水洗涤平皿, 稀释涂布于鉴别平板。以未经紫外照射的菌液做对照计算致死率, 公式如下:

致死率 = (1 - 处理后菌液中的活菌数 / 对照原菌液中的活菌数) \times 100%

以照射时间为横坐标, 致死率为纵坐标, 绘制致死率曲线。对致死率曲线进行指数拟合, 选择 90~95% 的致死率时的诱变时间为最佳诱变剂量。

1.3.5.3 紫外诱变后突变菌株的筛选

在最佳紫外诱变剂量下对菌悬液进行处理, 稀释涂布于鉴别平板, 30 °C 避光恒温培养 60 h, 记录培养 36~60 h 的水解圈直径 H (mm) 和菌落直径 C (mm)。

初筛标准为 C 在 1.0~1.5 mm 之间且 H/C 较大。初筛到的单菌落于斜面传代,活化种子液按 5% 接种至发酵培养基, 30 °C、200 r/min 摇床培养 60 h, 发酵液 12000 r/min 离心 5 min 取上清测定中性蛋白酶的酶活进行复筛。

1.3.6 硫酸二乙酯诱变处理

1.3.6.1 菌悬液的制备

按 1.3.1 方法收集菌体,用 pH 7 无菌磷酸缓冲液洗涤离心两次并震荡重悬至原菌液体。

1.3.6.2 硫酸二乙酯诱变剂量的确定

固定 DES 的终浓度 (0.5%), 通过改变处理时间来获得不同的诱变剂量。取 4 mL 菌悬液与 16 mL 磷酸缓冲液混合 (50 mL 三角瓶), 加入 0.2 mL 50% DES 乙醇溶液, 盖紧硅胶塞, 于摇床中 30 °C、200 r/min 分别振荡处理 15 min、30 min、45 min、60 min, 再加入 2.5 mL 25% 的硫代硫酸钠振荡 5 min 终止反应。稀释涂布于脱脂奶粉平板。以未经 DES 处理的菌液做对照计算致死率, 选择 90~95% 致死率下振荡时间为最佳诱变剂量。

1.3.6.3 硫酸二乙酯诱变后突变菌株的筛选

同 1.3.5.3。

1.3.7 高产中性蛋白酶菌株 DES-59 的发酵曲线

种子液以 5% 的接种量接到发酵培养基中。30 °C、200 r/min 摇床培养。每隔 12 h 取发酵液, 绘制发酵曲线。

1.3.8 中性蛋白酶基因序列分析

基因组 DNA 提取采用 G⁺细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (北京庄盟生物公司), 按照其操作步骤进行提取。根据 NCBI 上公布的枯草芽孢杆菌中性蛋白酶基因及基因组上其前后 200 bp 序列设计用于扩增的一对引物: 上游引物 F 为 5'-GCTGGTTTATTAACAATATAAG-3', 下游引物 R 为 5'-AAGACATATATGATCATGGTGAAG-3'。使用高保真酶 PrimeSTAR (宝生物工程 (大连) 有限公司) 进行 PCR 反应, 50 μ L 体系中含: 5 \times PS Buffer 10 μ L, dNTP Mixture (各 2.5 mM) 4 μ L, F 和 R 引物 (10 μ M) 各 1 μ L, 基因组 DNA~150 ng, PrimeSTAR DNA Polymerase 1.25 U。PCR 反应条件: 94 °C 1 min; 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 1 min 45 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物送北京六合华大基因, 使用 F 和 R 引物测序。根据第一次测序结果, 设计引物 M 加测得到全长序列, M 为 5'-GCGTTGTTGTATTGCTGC-3'。

1.4 数据分析

每组试验实施三个重复, 使用 Origin 软件对所得结果进行统计学分析及曲线绘制。

2 结果与分析

2.1 鉴别培养基的筛选

表 1 各鉴别培养基上水解圈情况

Table 1 Summarize of hydrolytic zone on the different selective

鉴别培养基	水解圈情况
淀粉酪素培养基	不明显
酵母膏酪素培养基	不明显
酪素培养基	不明显
LB+酪素培养基	不明显
脱脂奶粉培养基 1	明显
脱脂奶粉培养基 2	明显

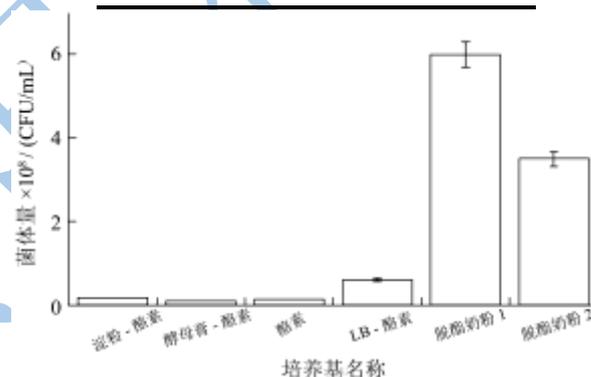


图 1 对数生长期菌液在不同筛选培养基上菌落计数情况

Fig.1 Colony counting of culture in logarithmic phase on the different selective media

在蛋白酶产酶菌株的初筛中通常依据水解圈直径与菌落直径之比 H/C 值的大小来进行筛选, 但不同菌株在不同鉴别培养基中生长情况及透明圈情况均有所不同, 这势必会影响结果的观测。为此, 实验比较筛选了以下六种鉴别培养基, 枯草芽孢杆菌在相应的平板上形成水解圈的情况列于表 1, 其中脱脂奶粉鉴别培养基平板为白色, 在菌株生长并生产蛋白酶的过程中蛋白被分解呈现明显的透明圈。其他的培养基为黄色, 水解圈与培养基色差小, 不易观察且计算生物量的时候容易漏检。图 1 比较了不同培养基下得到的生物量, 值得注意的是脱脂奶粉培养基 1 生物量较脱脂奶粉培养基 2 多, 说明添加了较多的金属离子的脱脂奶粉培养基 2 反而不利于菌体的生长。综上, 菌株在脱脂奶粉培养基 1 生长良好, 水解圈明显利于观察,

且培养基成分简单, 配制方便, 选作最适筛选培养基。其他研究者对于筛选培养基有相似的结论^[8]。

2.2 生长曲线及比生长速率和倍增时间测定

2.2.1 菌株生长曲线测定

经检测, 菌株 *B. subtilis* SHB 2010-1 的生长曲线呈现典型的四个阶段, 接种后 0~1 h 为延滞期, 1h 后开始进入对数生长期, 培养至 5~6 h 时进入对数生长期中后期。菌体在对数生长期对理化因素较为敏感, 菌体大小均匀。因此诱变处理所用菌液及发酵培养的种子液培养时间皆为 5~6 h。

2.2.2 菌株比生长速率和倍增时间测定

比生长速率 μ 为每小时单位质量的菌体所增加的菌体量。它是表征微生物生长速率的一个参数, 也是发酵动力学中的一个重要参数。对对数生长期 1~6 h 的数据进行线性拟合, 比生长速率 $\mu=0.55 \text{ h}^{-1}$ ($R^2=0.96$), 计算倍增时间 $t_d=0.693/\mu=1.26 \text{ h}=85 \text{ min}$ 。

2.3 高产中性蛋白酶菌株的诱变筛选

2.3.1 紫外线和硫酸二乙酯诱变剂量的确定

计算不同处理时间下的致死率曲线。以处理时间为横坐标, 致死率为纵坐标, 得致死率曲线如图 2。

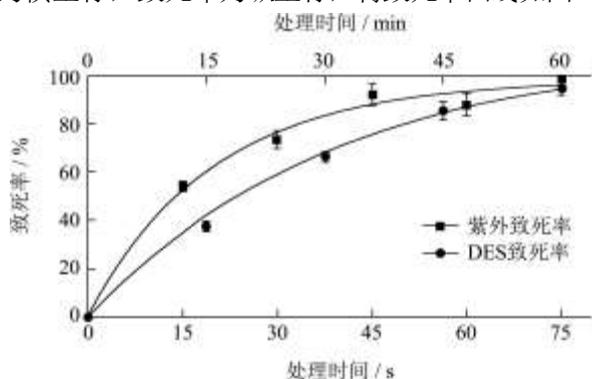


图 2 紫外线和硫酸二乙酯致死率曲线

Fig.2 Death curve of ultraviolet treatment and DES treatment

对其进行指数拟合, 得以下关系:

$$\text{紫外致死率} = -97.65e^{-t/19.84} + 98.02 \quad (R^2=0.9834)$$

$$\text{DES 致死率} = -120.688e^{-t/37.66} + 120.165 \quad (R^2=0.9976)$$

各研究者对最佳诱变剂量有不同的偏好。本研究根据经验选择高致死率 90~95% 下的剂量, 即选取 60 s 为最佳紫外诱变剂量、52 min 为最佳 DES 诱变剂量。

2.3.2 高产中性蛋白酶菌株 DES-59 诱变图谱

出发菌株经过两轮的紫外处理和硫酸二乙酯处理, 最后筛选得到高产菌株 DES-59, 较出发菌株提高了 59.68%。其诱变图谱如图 3, 具体过程如下:

(1) 第一次紫外线诱变突变株的筛选

经紫外诱变后根据筛选标准从 31 株菌株中筛选

出 H/C 值高的前 5 株菌株经过摇瓶复筛测定酶活, 其结果见表 2。诱变菌株 UV-10 的蛋白酶活力最高, 较出发菌株略有提高。因此选取该菌株作为下一步诱变的出发菌株。



图 3 DES-59 诱变图谱

Fig.3 Mutafacient map of DES-59

表 2 第一次紫外诱变后菌株的 H/C 值和酶活

Table 2 The H/C value and protease activity of strains after the first UV treatment

编号	H/C 值	酶活/(U/mL)	编号	H/C 值	酶活/(U/mL)
SHB2010-1		4439±180	UV-12	10.35	4152±87
UV-6	10.02	4326±131	UV-13	11.26	4408±15
UV-10	12.38	4505±194	UV-16	10.93	3997±334

(2) 第一次硫酸二乙酯诱变后突变菌株的筛选

以 UV-10 为出发菌株, 处理后根据筛选标准从 80 个单菌落中挑取出 H/C 值高的前 10 株菌株, 活化后摇瓶复筛测定酶活, 其结果见表 3。诱变菌株 DES-9 的酶活最高, 达到 4927 U/mL, 较原始菌株提高了 10.99%, 因此, 选取该菌株为下一步诱变的出发菌株。

表 3 第一次 DES 诱变后菌株的 H/C 值和酶活

Table 3 The H/C value and protease activity of strains after the first DES treatment

编号	H/C 值	酶活/(U/mL)	编号	H/C 值	酶活/(U/mL)
UV-10	-	4505±194	-	-	-
DES-4	11.84	4485±117	DES-23	10.13	4676±22
DES-6	10.95	4727±7	DES-26	10.37	4521±197
DES-7	9.65	3777±270	DES-31	9.74	4346±8
DES-9	10.12	4927±26	DES-40	9.80	4247±117
DES-21	10.34	4676±197	DES-53	9.95	4443±249

(3) 第二轮紫外-硫酸二乙酯诱变突变株的筛选

表 4 第二次紫外诱变后菌株的 H/C 值和酶活

Table 4 The H/C value and protease activity of strains after the second UV treatment

编号	H/C 值	酶活/(U/mL)	编号	H/C 值	酶活/(U/mL)
DES-9	-	4927±26	-	-	-
UV-14	10.21	5062±373	UV-89	10.04	3594±198
UV-19	10.99	4368±115	UV-121	10.08	4653±277
UV-22	10.17	6159±156	UV-127	10.49	3828±133
UV-23	10.23	3459±78	UV-151	11.65	4751±139
UV-30	10.11	4011±896	UV-152	10.85	5678±932
UV-35	11.68	3190±734	UV-175	10.06	3258±216
UV-78	11.20	3901±103	UV-218	11.63	4037±319

经第二轮紫外处理后, 从 302 株菌株单菌落中挑

取出 H/C 值高的前 14 株菌株, 酶活测定结果见表 4。诱变菌株 UV-22 的酶活最高, 达到 6159 U/mL, 较原始菌株提高了 38.74%, 选取进行下一步诱变。经第二轮 DES 处理后, 从 305 株菌株单菌落中挑取出 H/C 值高的前 20 株菌株, 活化后摇瓶复筛测定酶活, 其结果见表 5。诱变菌株 DES-59 的酶活最高, 达到 7088 U/mL, 较原始菌株提高了 59.67%, 因此选取该菌株作为最后筛选得到的高产中性蛋白酶菌株。

表 5 第二次 DES 诱变后菌株的 H/C 值和酶活

Table 5 The H/C value and protease activity of strains after the second DES treatment

编号	H/C 值	酶活/(U/mL)	编号	H/C 值	酶活/(U/mL)
UV-22	-	6159±156	-	-	-
DES-8	10.43	5747±730	DES-219	11.05	4921±272
DES-35	10.27	6071±83	DES-226	10.08	5990±364
DES-43	10.49	5585±521	DES-227	10.33	6240±219
DES-49	10.55	6712±52	DES-246	10.05	5835±272
DES-54	12.53	4929±469	DES-251	10.06	5813±907
DES-59	10.36	7088±84	DES-264	10.40	6019±93
DES-66	10.18	6329±865	DES-265	10.14	5172±605
DES-149	11.78	5150±240	DES-305	13.81	5599±501
DES-162	10.80	4694±32	DES-306	13.50	5592±532
DES-204	10.58	5047±302	DES-307	10.72	4200±605

2.4 高产中性蛋白酶菌株 DES-59 的发酵曲线

在培养过程中, 每隔 12 h 测定中性蛋白酶的活力、pH 值及生物量, 绘制成发酵曲线 (图 4)。由产酶曲线可知, 酶活力在 60 h 达到最高点, 为 7307 U/mL; pH 值 48 h 前随着菌体的代谢在 6.5~7.0 之间波动, 48 h 后 pH 上升, 可能是因为菌体开始衰亡造成 pH 上升。前 60 h 生物量稳定增加并达到最高点 2.205×10^{10} CFU/mL, 随后进入衰亡期, 酶的合成与菌体生长呈现典型的生长偶联型, 且酶的生产不受体系中分解产物和代谢物的抑制, 与前人的研究结果一致^[9]。酶活达到最高点后迅速降低, 12 h 后约为最高值的 1/4。酶活达到高点后迅速降低, 始终是制约中性蛋白酶生产的一个重要因素。在该基因被鉴定出来后, 就有研究者在基因工程枯草杆菌中进行生产, 王丽影等人使用失去野生菌 99% 胞外蛋白酶活性的 DB403 进行重组表达, 但在发酵后期仍能观察到酶活的明显降低^[10]。张敏等人使用诱导表达策略, 在蛋白酶双缺陷突变株 DB104 中进行表达, 中性蛋白酶在 10~50 h 间维持在一定水平^[11]。说明 *B. subtilis* 分泌的中性蛋白酶处于生产和失活的平衡中, 但失活并非主要由其它胞外蛋白酶的水解作用引起。如果能降低失活的速

度, 将使生产能力达到新的水平^[12]。

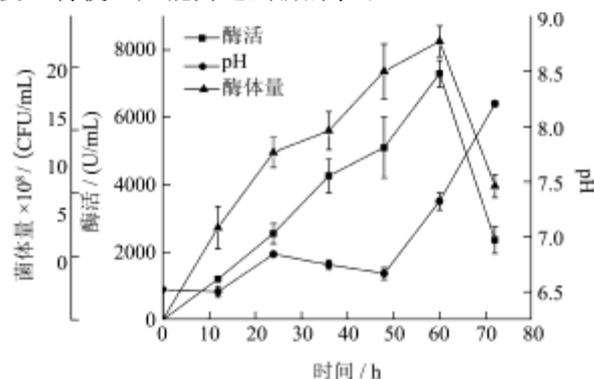


图 4 高产中性蛋白酶菌株 DES-59 的发酵曲线

Fig.4 Fermentation curve of neutral protease high-yield strain DES-59

2.5 诱变菌的中性蛋白酶基因序列分析

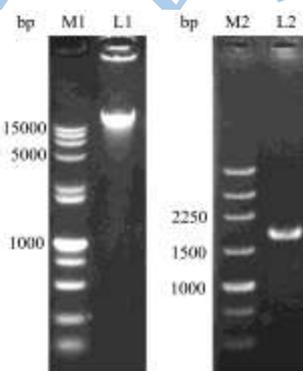


图 5 基因组 DNA 及 *nprE* 基因 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳图
Fig.5 1% Agarose gel electrophoresis of *B. subtilis* genomic DNA and PCR product of *nprE* gene

注: M1: 15000+2000 DNA marker; L1: *B. subtilis* 基因组 DNA; M2: 250bp DNA ladder; L2: *nprE* PCR 产物。

B. subtilis 的中性蛋白酶活性主要由 *nprE* 基因编码的中性蛋白酶 A 贡献^[13]。NCBI 上登记的 *B. subtilis* *nprE* 基因序列主要分两种类型, 一类与 *B. subtilis* strain DB104 (GenBank: EU035553) 相似, 一类与 *B. subtilis* 168 上的基因相似 (GenBank: K01985), 两株菌种均是常用的枯草芽孢杆菌宿主^[14]。各枯草芽孢杆菌菌株的 *nprE* 基因在密码子的偏好上有所差异, 但编码的氨基酸序列并无不同。参照后者的基因信息设计相关引物未能扩增出特异性条带, 因此以前者作为引物设计的信息来源。提取的 DES-59 基因组 DNA 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测显示条带明亮清晰, 质量完好, 以此作为模板进行 PCR 扩增得到单一的目的条带, 电泳检测其大小约 1700 bp (图 5), 与预期的 1705 bp 相符。所设计的引物位置与 *nprE* 基因相距 30~60 bp, 用该引物测序时, 扣除刚开始 20~30 bp 的不稳定信号, 足够分析出 *nprE* 的开放阅读框。将该测序拼接

结果通过 NCBI 上的 BLAST 程序进行比对, 发现诱变菌株 DES-59 的 *nprE* 序列与 EU035553 一致。DES-59 中性蛋白酶发酵液酶活的提高并不是由中性蛋白酶 A 结构改变引起的。

3 结论

3.1 比较筛选了淀粉酪素培养基、酵母膏酪素培养基、酪素培养基、LB+酪素培养基、及两种脱脂奶粉培养基, 其中以只添加 10 g/L 脱脂奶粉的培养基培养效果最好, 水解圈明显, 利于高产菌株的筛选。*B. subtilis* 营养条件简单, 不同条件下都能生长良好, 因此培养基的鉴别性能成了选择的主要依据。

3.2 经过两轮的 UV-DES 处理, 最后筛选的高产菌株 DES-59 在 50 mL 发酵培养基中酶活达到 7307 U/mL。对比四次诱变后菌株的最高产酶量, 分别较出发菌提高 1.49%、10.99%、38.77% 和 59.68%, 第一次 UV 诱变后只有稍许的提高, 随后的 DES 诱变后现比较明显的变化, 在第二轮诱变中 UV 和 DES 处理均获得显著的优化, 说明单一的紫外诱变很难达到理想的诱变结果, 但其积累的隐性突变位点通过复合处理得到体现, 复合因子诱变较单一因子有很大优势。

3.3 对 *nprE* 基因进行序列分析未发现变化。相对于整个代谢网络, 物理和化学诱变所产生的正向突变位点更容易出现在生产目标蛋白的其它关键点上或者别的代谢途径上, 因此对于潜在性能的提高, 特别是对遗传背景不清楚的对象, 诱变育种更是育种方法的首选。

参考文献

- [1] Queiroga A C, Pintado M E, Malcata F X. Search for novel proteolytic enzymes aimed at textile and agro-industrial applications: An overview of current and novel approaches [J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2012, 30(1): 154-169
- [2] Kasana R C, Salwan R, Yadav S K. Microbial proteases: Detection, production, and genetic improvement [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2011, 37(3): 262-276
- [3] Li X, Yang H, Roy B, et al. Enhanced cellulase production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave and ultraviolet [J]. *Microbiological Research*, 2010, 165(3): 190-198
- [4] Zuo Z, Liu Y, Zhang Y, et al. Mutation of the *Streptomyces clavuligerus* by traditional and molecular breeding to increase the biosynthesis of clavulanic acid [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6(13): 3144-3153
- [5] 游玫娟, 冯刚利. 紫外线与亚硝酸复合诱变选育中性蛋白酶高产菌株 [J]. *食品科技*, 2010, 10: 23-26
- You Wen-juan, Feng Gang-li. Screening of high neutral protease producing strains with compound mutagenesis by UV and HNO₂ [J]. *Food Science and Technology*, 2010, 10: 23-26
- [6] 郝林. 食品微生物实验技术 [M]. 北京市: 中国农业出版社, 2006
- He Lin. *Food Microbiology experimental techniques* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2006
- [7] 肖怀秋. 高活力产中性蛋白酶细菌菌株的选育及酶学性质研究 [D]. 湖南农业大学, 2006
- Xiao Huai-qiu. Study on screening of high-yield neutral protease producing bacterial strain and enzyme characterizations [D]. Hunan Agricultural University, 2006
- [8] 侯化鹏. 枯草芽孢杆菌中性蛋白酶 *nprE* 的定向进化研究 [D]. 华中农业大学, 2008
- Hou Hua-peng. Study on DNA shuffling of extracellular neutral metalloprotease of *Bacillus subtilis* [D]. Huazhong Agricultural University, 2008
- [9] 赵丛, 张敏, 王建玲, 等. N⁺ 离子注入诱变选育中性蛋白酶高产菌株及发酵条件的研究 [J]. *工业微生物*, 2008, 3: 12-16
- Zhao Cong, Zhang Min, Wang Jian-ling, et al. Breeding of neutral protease producing bacteria by low energy ions implantation in *Bacillus subtilis* [J]. *Industrial Microbiology*, 2008, 3: 12-16
- [10] 王丽影, 叶勤, 张宏, 等. 基因工程枯草杆菌生产中性蛋白酶的研究 [J]. *华东理工大学学报*, 1995, 6: 690-695
- Wang Li-ying, Ye Qin, Zhang Hong, et al. Production of neutral protease by a genetically engineered *Bacillus subtilis* strain [J]. *Journal of East China University of Science and Technology*, 1995, 6: 690-695
- [11] 张敏, 赵丛, 杜连祥, 等. 中性蛋白酶基因诱导型表达分泌载体的构建 [J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(3): 105-109
- Zhang Min, Zhao Cong, Du Lian-xiang, et al. Construction of an Inducible Expression and Secretion System for Neutral Protease in *Bacillus subtilis* [J]. *China Biotechnology*, 2007, 27(3): 105-109
- [12] Eijsink V G H, Bjørk A, Gåseidnes S, et al. Rational engineering of enzyme stability [J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 113(1-3): 105-120
- [13] Tran L, Wu X, Wong S. Cloning and expression of a novel protease gene encoding an extracellular neutral protease from *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(20): 6364-6372
- [14] Ou J, Zhu M. An overview of Current and novel approaches for microbial neutral protease improvement [J]. *International Journal of Modern Biology and Medicine*, 2012, 2(1): 1-27

现代食品科技