

文章编号: 1001-3806(2004)02-0128-03

CO₂ 激光辐射总状毛霉发酵产蛋白酶优化条件

李 佳, 刘 鑫, 刘克武, 国锦林, 张勇侠, 肖 炯, 黄新河
(四川大学 生命科学学院, 成都 610064)

摘要: 为了选育高产食品蛋白酶菌株并研究其最佳发酵条件, 从豆腐乳中分离出总状毛霉 MR137, 用 CO₂ 激光辐射诱变。激光功率 10W, 扩束光斑直径 0.4cm, 照射距离 22cm, 照射时间 40s。经初筛、复筛, 选育出高产蛋白酶变异株(MR137-3)。经传代培养, MR137-3 具有稳定的高产蛋白酶活性。对 MR137-3 的固体发酵条件进行研究发现, 培养温度 30℃, 培养时间 72h, 培养基 pH6.0, 培养基含水量 65%, 是 MR137-3 固体发酵产蛋白酶的优化培养条件。

关键词: CO₂ 激光; 总状毛霉; 发酵; 蛋白酶; 优化条件

中图分类号: O658.1⁺3 文献标识码: A

Study on optimal culturing of high proteinase-producing *mucor racemosus* mutated by CO₂ laser

LI Jia, LIU Xin, LIU Ke-wu, GUO Jin-lin, ZHANG Yong-xia, XIAO Ge, HUANG Xin-he
(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: *Mucor racemosus* 137 was isolated from fermented bean curd and brought to mutation by radiation of CO₂ laser. The duration for radiation was 40s with distance of 22cm, and the diameter of laser beam was 0.4cm. High proteinase producing mutant MR137-3 was obtained after screening cultures. The MR137-3 was found to have stable proteinase producing activity in descendant cultures. The optimal culturing could be obtained at 30℃, pH6.0, culturing duration of 72h, with water content of 65% of culture medium.

Key words: CO₂ laser; *mucor racemosus*; fermentation; proteinase; optimization condition

引 言

用于食品加工的蛋白酶有动物蛋白酶、植物蛋白酶、微生物蛋白酶。在 3 种不同来源的蛋白酶生产过程中, 动物蛋白酶原料生产周期长, 价格昂贵, 来源有限。当酶的市场需求大范围波动时, 蛋白酶原料的生产缺乏弹性。植物蛋白酶原料的生产受土地资源与季节限制。采用发酵工程技术, 用微生物发酵生产蛋白酶, 则不受时间、地点和季节限制^[1]。

目前, 我国酶制剂虽有 20 多个品系, 但糖化酶产量占酶制剂比例过大, 许多蛋白酶短缺并依赖进口, 国产酶制剂生产的发酵水平仅达国外的一半。为了培养高产蛋白酶菌株, 从豆腐乳中分离出总状毛霉(*mucor racemosus* 137, MR137), 并以此为亲株,

用 10W 的 CO₂ 激光辐射, 筛选出总状毛霉变异株 (*mucor racemosus* 137-3, MR137-3), 具有高产蛋白酶活性, 对促进我国食品蛋白酶的生产具有重要意义。

1 材料、仪器与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 以本实验室从长霉豆腐坯上分离筛选获得的总状毛霉菌株(MR137)为诱变出发菌株。

1.1.2 培养基 斜面种子培养基(*w* 为质量分数):
 $w(\text{酵母膏}) = 0.7\%$, $w(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0.1\%$,
 $w(\text{K}_2\text{HPO}_4) = 0.1\%$, $w(\text{MgSO}_4) = 0.05\%$,
 $w(\text{CaCl}_2) = 0.05\%$, $w(\text{ZnSO}_4) = 0.02\%$,
 $w(\text{豆饼粉}) = 2.0\%$, $w(\text{葡萄糖}) = 1.5\%$, $w(\text{琼脂}) = 1.0\%$, pH6.0。

平板初筛培养基: $w(\text{酪蛋白}) = 0.4\%$, $w(\text{琼脂}) = 1.5\%$, 用 pH6.0, 0.1mol/L 的磷酸缓冲液配制。

复筛培养基: 每个 250mL 三角瓶中装入麸皮

作者简介: 李 佳(1979), 女, 硕士研究生, 主要从事蛋白质化学与分子生物学的研究。

E-mail: lijia.bio@163.net

收稿日期: 2003-08-11; 收到修改稿日期: 2003-11-20

9.0g, 豆粉饼 1.0g, 水 10.0mL。

液体种子培养基: w (酵母膏) = 0.7%, w (KH₂PO₄) = 0.1%, w (K₂HPO₄) = 0.1%, w (MgSO₄) = 0.05%, w (CaCl₂) = 0.05%, w (ZnSO₄) = 0.02%, w (豆饼粉) = 2.0%, w (葡萄糖) = 1.5%, pH6.0。

固体发酵培养基: w (豆粉饼) = 40%, w (玉米粉渣) = 57.5%, w (酵母膏) = 0.7%, w (KH₂PO₄) = 0.1%, w (K₂HPO₄) = 0.1%, w (MgSO₄) = 0.05%, w (CaCl₂) = 0.05%, w (ZnSO₄) = 0.02%, w (葡萄糖) = 1.5%, pH6.0。

以上培养基的灭菌条件均为 121℃, 30min。

1.2 仪器

pH 计 (PSH-3B)。连续 CO₂ 激光器: 输出电压 210V, 功率 10W, 成都红旗玻璃研究所。紫外可见分光光度计 (UV-752C), 上海第三分析仪器厂。超净工作台 (SW-CJ-1F), 苏州安泰空气技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化 取 MR137 菌种 1 环, 接入新鲜培养基斜面内, 置 30℃ 培养 16h~18h 后, 制成 1.5×10^3 个细胞的悬液, 取 2mL 于安培管内供照射用。

1.3.2 CO₂ 激光照射^[2~4] 激光扩束光斑直径为 0.4cm, 照射距离为 22cm, 照射时间为 40s。

1.3.3 辐照菌培养 将照射菌悬液用生理盐水稀释成 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 浓度, 取 0.2mL 涂皿, 每个稀释度 3 个平皿。在 30℃ 下培养 72h 后, 挑出形态大小不同的单菌落纯培养。

1.3.4 高产蛋白酶菌株筛选 初筛采用平板透明圈法^[5]。在直径 9cm 的无菌培养皿中, 注入 15mL 平板初筛培养基, 待凝固成平板后, 挑取单菌落辐照菌接种于平板上, 置 30℃ 下保温 48h, 测定透明圈直径, 选取透明圈直径较大的菌株进行复筛。取透明圈较大的平板菌种一小块接入三角瓶复筛培养基中, 于 30℃ 下培养 72h, 提取酶, 测定蛋白酶活性。

1.3.5 蛋白酶活性测定 用 Folin 法测定, 规定在 pH7.0、温度 37℃ 条件下, 每分钟水解酪蛋白产生 1μg 酪氨酸所需的酶量为 1 个蛋白酶活性单位。

1.3.6 总状毛霉固体发酵条件的优化 分别采用不同发酵条件, 包括: 培养温度、培养时间、培养基 pH、培养基含水量, 研究这些因素对总状毛霉产蛋白酶活性的影响。蛋白酶提取方法参照文献[6]。

2 结果与讨论

2.1 CO₂ 激光照射对总状毛霉菌株的诱变作用

激光是一种量子流, 又称为光微粒。激光辐射可以通过产生光、热、压力和电磁效应的综合作用, 直接或间接地影响生物有机体, 引起细胞 DNA 或 RNA 改变, 导致酶的激活或抑制, 进而引起细胞分裂和细胞代谢活动的改变^[7,8]。

2.1.1 初筛结果 挑选 15 株 CO₂ 激光辐照后的总状毛霉, 以亲株 (MR137) 为对照, 经过平板透明圈法初筛, 其中有 4 株毛霉透明圈直径在 1.8cm 以上, 表明其蛋白酶活力较高, 见表 1。

Table 1 Result of elementary screening culture

No.	MR	MR	MR	MR	MR
	137	137-2	137-3	137-7	137-11
diameter of transparent circle/cm	1.5	1.9	2.5	2.0	2.3

2.1.2 复筛结果 选取透明圈直径最大且生长速度最快的 MR137-3, MR137-11 进行复筛, 并以亲株为对照。酶活力测定显示, 以 MR137-3 蛋白酶活力最高 (见表 2)。

Table 2 Result of repeatedly screening culture

No.	MR137	MR137-3	MR137-11
activity/(U·g ⁻¹)	781	1108	989

2.1.3 变异株 MR137-3 产蛋白酶稳定性 通过固体发酵, 对变异株 MR137-3 产蛋白酶的能力及遗传稳定性进行了观察 (见表 3)。可见, 变异株 MR137-3 在固体发酵条件下的蛋白酶活力平均可达 1106U/g, 经过 10 次传代培养, 其蛋白酶活力正负相差为 15U/g~17U/g。表明 MR137-3 产蛋白酶能力具有较好的遗传稳定性。

Table 3 Proteinase producing ability of Mutant MR137-3 and the inheritance stability

generation	1	2	3	4	5	6
activity/(U·g ⁻¹)	1108	1120	1101	1094	1110	1092
generation	7	8	9	10	average	
activity/(U·g ⁻¹)	1089	1112	1121	1117	1106	

以上结果表明, 用红外 CO₂ 激光辐照总状毛霉, 具有引起 MR137-3 高产蛋白酶的作用。传代培养证明: 高产蛋白酶能力能稳定传代。

2.2 总状毛霉固体发酵条件优化

2.2.1 培养温度对总状毛霉产蛋白酶的影响 在固体培养基中接种 8% 菌液^[9], 分别置于 15℃,

20℃, 25℃, 30℃, 35℃下培养 72h 后测定酶活力, 结果见表 4。可见, 发酵温度对毛霉产蛋白酶有较大影响, 温度过低则蛋白酶合成滞后, 而温度过高则菌体生长受到影响, 蛋白酶合成也受到相应的影响。因此, MR137-3 最适培养温度为 30℃。

Table 4 The effect of temperature on proteinase producing activity

temperature/℃	15	20	25	30	35
relative activity/%	64.3	75.2	89.9	100.0	59.8

2.2.2 培养时间与产酶活性的关系 在固体培养基中接种质量分数为 8% 的菌液, 30℃恒温培养, 每间隔 12h 取样测酶活力, 结果见表 5。可见, MR137-3 发酵 48h 相对酶活力就可达 72.6%, 发酵 72h 酶活达最高峰, 发酵 72h 后, 酶活性有所降低。

Table 5 The effect of culturing duration on proteinase producing activity

culturing duration/h	24	36	48	60	72	84
relative activity/%	26.4	59.8	72.6	86.5	100.0	81.2

2.2.3 培养基 pH 对产酶活性的影响 用 0.1mol/L HCl 溶液和 0.1mol/L NaOH 溶液分别调节固体发酵培养基的 pH 值, 接种 MR137-3 液体菌 8%, 30℃培养 72h, 测定酶活性, 结果见表 6。可见, MR137-3 产蛋白酶的适宜 pH 为 5.5~6.5 范围。

Table 6 The effect of pH on proteinase producing activity

pH	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5
relative activity/%	82.3	90.7	97.6	100.0	95.8	87.6	71.1

2.2.4 培养基含水量对产酶活性的影响 称取 10g 麸皮, 分别按表 7 配制成不同含水量的培养基, 平铺于 250mL 三角瓶中, 灭菌后接种 MR137-3 液体菌 8%, 30℃培养 72h, 测定酶活性, 结果显示, 培养基含水量为 65% 左右产酶活性最高。

Table 7 The effect of water content of culture medium on proteinase producing activity

water content/%	40	45	50	55	60	65	70
relative activity/%	39.8	43.6	64.7	86.3	88.5	100.0	82.9

3 结论

综上所述, 用 CO₂ 激光辐射 MR137 筛选的变异株 MR137-3, 经过 10 次传代培养, 表现出稳定的高产蛋白酶活性。说明用红外 CO₂ 激光辐照总状毛霉, 具有引起 MR137-3 高产蛋白酶的作用。MR137-3 固体发酵产蛋白酶的优化培养条件是培养温度 30℃, 培养时间 72h, 培养基 pH6.0, 培养基含水量 65%。

参考文献

- [1] 张树政. 酶制剂工业. 3 版. 北京: 科学出版社, 1998. 387~394.
- [2] 胡卫红, 陈有为, 李绍兰. 微生物学通报, 2000, 27(1): 36~38.
- [3] WERTH C R. *Iszyme Bulletin*, 1990, 23(6): 109.
- [4] MULLER D. *Lasers and Application*. 1996, 5(5): 85~89.
- [5] 邓席方, 温琼英, 鲁小春. 中国酿造, 1996(1): 27~30.
- [6] 李理, 罗泽民, 卢向阳. 食品与机械, 1999(1): 15~16.
- [7] 段良和, 雷玉明, 陈有为 *et al.* 昆明理工大学学报, 1997, 22(4): 116~119.
- [8] 吴振倡. 激光生物学, 1992, 1(1): 27~28.
- [9] 潘进权, 刘耘. 食品工业科技, 2002, 23(11): 23~25.

• 简 讯 •

菲涅耳光纤引导光深入中央气孔

悉尼大学的研究人员开发了一种有孔光纤, 可以沿着中央气通道传导光, 不过这种方法并不等同于光子晶体(PC)光纤理论。PC 光纤可用于产生布喇格反射的孔周期列阵, 从而将光限制在中央充气通道或实心通道, 悉尼大学设计的光纤有沿有效菲涅耳区域分布的气孔, 比如在直径为 125 μ m 的光纤处。来自气孔表面的光散射干涉, 在光纤的中心形成了一个强度峰值的分布。这种光纤的生产没有 PC 光纤那么严格。被分开为 8 μ m~12 μ m 的气孔置于菲涅耳区域, 用于产生 30 μ m 直径的场模。做为试验用的菲涅耳光纤的孔大小随着所选用样品的不同而不同。633nm, 1052nm, 1550nm 的光引导至 20cm 长的光纤中, 在 633nm 光时, 气孔之间有许多光漏出; 1052nm 处, 这种情况就好多了(由于偏移中央光纤孔, 有一个偏移中央峰值); 而在 1550nm 处, 模式分布集中在中心孔处。

(蒋锐 曹三松 供稿)