

# 丝裂霉素诱变黑曲霉产植酸酶过程模型化

贺淹才 陈 路 周文刚

(华侨大学材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021)

**摘要** 用均匀设计分析方案, 进行丝裂霉素 C 对黑曲霉化学诱变菌丝体和原生质体诱导产植酸酶选育, 并以诱变时间( $X_1$ )和丝裂霉素 C 的浓度( $X_2$ )建立回归方程. 实验筛选出具有 4 株较高酶活的菌株, 诱变菌丝体得到 2 株酶活是始发菌株 183.89% 和 147.55%; 诱变原生质体得到 2 株酶活是始发菌株 395.52% 和 381.98%. 由响应面模型初步判断, 在丝裂霉素 C 浓度为  $5 \sim 30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和诱变时间  $45 \sim 60 \text{ min}$  时, 丝裂霉素 C 对黑曲霉诱变原生质体选育产植酸酶菌株的效果比对菌丝体诱变效果好. 用均匀设计对丝裂霉素 C 诱变菌丝体和原生质体的效果进行回归分析, 所得模型调整后的相关系数分别为 89.02% 和 99.13%, 模型拟合程度好, 实验误差小, 可以用此模型较好的对丝裂霉素 C 的黑曲霉菌丝体诱变进行分析和预测.

**关键词** 植酸酶, 黑曲霉, 丝裂霉素 C, 诱变, 模型化, 参数估计

**中图分类号** Q 933; Q 550.03; TS 202.3

**文献标识码** A

植酸(肌醇六磷酸)是植物中磷和肌醇的基本贮存形式, 是一种广谱抗营养因子, 它在动物肠胃的消化吸收过程中, 与多种金属离子及蛋白质螯合成相应的不溶性复合物, 降低对这些营养元素的有效利用<sup>[1]</sup>. 植酸酶是催化植酸(肌醇六磷酸)及植酸盐水解成肌醇与磷酸(或磷酸盐)的一类酶的总称, 将植酸酶作为饲料添加剂, 可以提高植物饲料中磷的利用率和食品、饲料的生理功能和营养效价<sup>[2]</sup>. 植酸酶广泛存在于植物、动物和许多微生物中, 但是含量很低, 因此工业上难以从生物材料提取, 而是通过基因工程方法或通过诱变方法从微生物制造植酸酶<sup>[3,4]</sup>. 基因工程方法制造植酸酶目前在工业中应用还比较困难, 通过诱变方法选育高产菌株是行之有效的途径之一. 丝裂霉素 C(Mitomycin, MMC)是从链霉菌(*Str. caespitosus*)中分离出来的, 可使哺乳动物和蚕豆等的染色体发生畸变<sup>[5]</sup>, 可与 DNA 的双螺旋形成交联使其分解, 从而引起基因突变. 以丝裂霉素 C 对黑曲霉产植酸酶进行化学诱变选育还未见报道. 本研究以均匀设计法<sup>[6]</sup>优化实验步骤, 以丝裂霉素 C 对黑曲霉产植酸酶进行化学诱变选育研究.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和培养基

黑曲霉 *A. niger* (II), 华侨大学材料科学与工程学院细胞生物实验室保藏菌种. (1) 斜面培养基(土豆培养基, 200 mL): 葡萄糖 4 g;  $\text{CaCO}_3$  0.04 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.04 g; 琼脂 3 g; 土豆(去皮、切片) 40 g; pH 值自然. (2) 普通平板培养基(质量分数, %): 葡萄糖 1.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05; 植酸钙 0.5;  $\text{KCl}$  0.05;  $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.5;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001; 琼脂 2.0; pH 值为 5.0. (3) 摇瓶培养基(质量分数, %): 葡萄糖 1.0; 玉米淀粉 10.0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001;  $\text{KCl}$  0.05;  $\text{NaNO}_3$  1.0; pH 值自然. (4) 再生平板培养基(g): 葡萄糖 40;  $\text{NaNO}_3$  3.0;  $\text{KCl}$  5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0; 琼脂 2; 用 1 L  $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{NaCl}$  溶液配制, pH 值为 6.0. (5) 筛选培养基(质量分数, %): 植酸钙 0.1; 葡萄糖 3.0;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.5;  $\text{KCl}$  0.05;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05;  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.003;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.003; 琼脂 1.8.

**收稿日期** 2005-09-24

**作者简介** 贺淹才(1949-), 男, 教授, 博士, 主要从事生物化学与分子生物学的研究. E-mail: yche@hqu.edu.cn

**基金项目** 福建省自然科学基金资助项目(C040100011)

1.2 原生质体的制备

*A. niger* 摇瓶培养到对数中期(20 h),收集菌丝体. 用  $0.7\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl 高渗液离心洗涤 ( $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 5 min),并用高渗液稀释适当倍数. 取 15 mL 菌丝液,加入等体积纤维素酶(质量分数为 1%,中科院上海生化所东风公司)于  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  下水浴振荡处理 2~3 h,取样镜检. 当 90%转化后停止酶处理,用双层镜头纸过滤酶解液,用高渗液洗涤原生质体 2~3 次, $500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心,即得原生质体.

1.3 黑曲霉丝裂霉素 C 诱变的均匀设计

取 5 支小试管,按均匀设计方案分别加入一定量的 MMC 和菌丝体或原生质体悬液,一定时间后稀释 100 倍,无菌操作涂平板,并转入恒温培养箱内培养. 经 3 次实验,测得各诱变方案菌株的酶活.

1.4 植酸酶酶活测定

参照文[7]的均匀设计优化,用 420 nm 波长测定并绘制标准曲线. 黑曲霉菌株接摇瓶发酵 108 h,过滤菌体得发酵液,经  $3\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心,取上清液 0.2 mL,测酶活. 比照标准曲线计算酶活,即植酸酶酶活  $U(u\cdot\text{mL}^{-1})=1000\cdot u\cdot 6/(t\cdot v)=6000\cdot u/(t\cdot v)$ . 其中, $u$  为标准曲线上查得的无机磷浓度( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), $t$  为反应时间

表 1 均匀设计方案和实验结果

| 因子    | $X_1/\text{min}$ | $X_2/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | $U_{\text{菌}}\times 10^6/u\cdot\text{L}^{-1}$ | $U_{\text{原}}\times 10^6/u\cdot\text{L}^{-1}$ |
|-------|------------------|-----------------------------------|---|---|
| $N_1$ | 45               | 5                                 | 1.507   | 1.865   |
| $N_2$ | 30               | 50                                | 2.619   | 1.611   |
| $N_3$ | 90               | 12                                | 2.102   | 1.606   |
| $N_4$ | 60               | 30                                | 1.766   | 1.931   |
| $N_5$ | 75               | 80                                | 1.969   | 1.771   |

2 结果与讨论

2.1 丝裂霉素 C 诱变结果

表 1 是利用均匀设计<sup>[6]</sup>,用丝裂霉素 C 对黑曲霉菌丝体和原生质体诱变的方案,以及 3 次实验测得植酸酶活最高而稳定的代表株的酶活平均值. 表中  $X_1$  为诱变时间, $X_2$  为丝裂霉素 C 的浓度, $U_{\text{菌}}$  为菌体酶活, $U_{\text{原}}$  为原生质体酶活. 图 1 是丝裂霉素 C 对黑曲霉诱变后的平板菌落的生长情况. 原生质体菌落数较少,表明原生质体菌株对诱变更敏感.

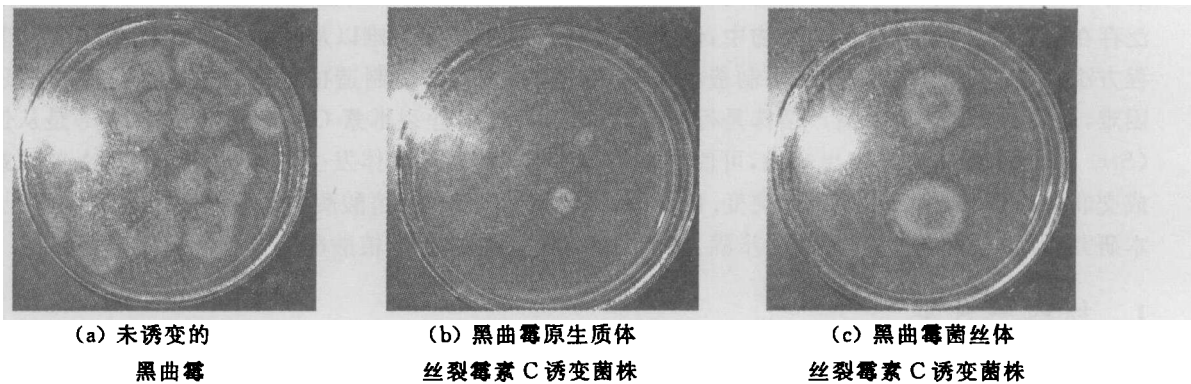


图 1 黑曲霉丝裂霉素 C 诱变前后的菌株菌落的形态

2.2 丝裂霉素 C 诱变均匀设计回归分析与响应面的建立

2.2.1 菌丝体诱变结果 由统计软件 DPS 处理 MMC 诱变菌丝体均匀设计的数据(表 1 均匀设计方案和结果),可以得到回归多项式为

$$Y=529.239\,772+49.995\,887\,3X_1+18.208\,632\,84X_2-0.659\,394\,131X_1\cdot X_2$$

对该模型进行拟合分析,结果如表 2 所示. 该多项式相关系数  $R=0.973\,704$ ,  $F=6.089\,2$ ,显著水平  $p$

表 2 回归拟合比较

| 样本 | 诱变菌丝体 |       |      | 诱变原生质体 |       |      |
|----|-------|-------|------|--------|-------|------|
|    | 实验值   | 拟合值   | 拟合误差 | 实验值    | 拟合值   | 拟合误差 |
| 1  | 1 507 | 1 450 | 57   | 1 865  | 1 876 | -11  |
| 2  | 2 619 | 2 586 | 33   | 1 611  | 1 608 | 3    |
| 3  | 2 102 | 2 055 | 46   | 1 606  | 1 605 | 1    |
| 4  | 1 766 | 1 934 | -168 | 1 931  | 1 917 | 13   |
| 5  | 1 969 | 1 938 | 31   | 1 771  | 1 778 | -6   |

=0.287 5. 回归方程经过调整后,其相关系数  $R_a=0.890\ 167$ ,说明该模型能解释 89.02%响应值的变化. 建立响应面模型和等高线,如图 2 所示. 从图 2 中可以看出,时间不变,随着丝裂霉素 C 浓度的增大,

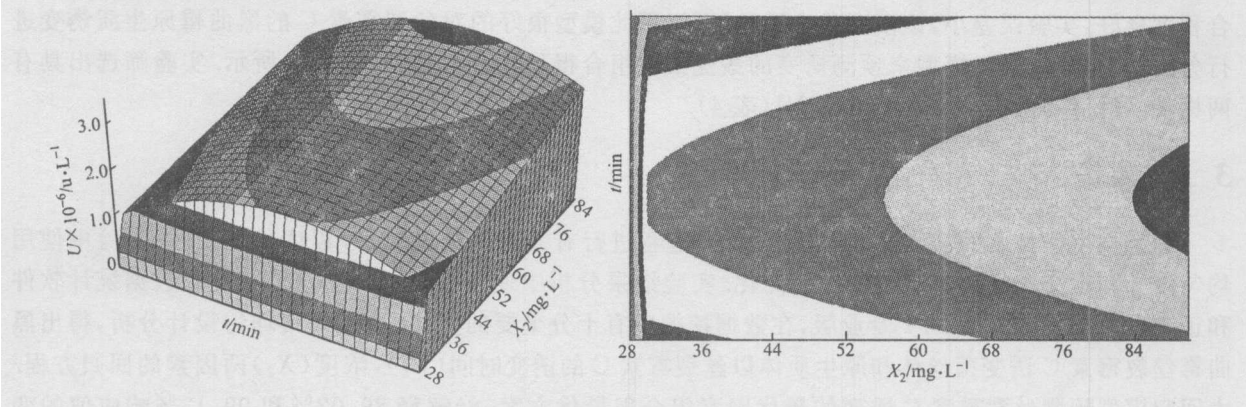


图 2 黑曲霉菌丝体丝裂霉素 C 诱变响应面三维图

黑曲霉产酶活数量级增加,当时间  $X_1$  为 25~35 min 时,酶活处于较高范围. 随着丝裂霉素 C 浓度的增加,处于较高酶活数量级的菌株数量增加. 当丝裂霉素 C 浓度为 75~80  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,酶活处于  $3.0 \times 10^6 \text{ u} \cdot \text{L}^{-1}$  的范围. 该响应面调整后的相关系数  $R_a=0.890\ 167$ ,说明该模型能解释 89.02%响应值的变化. 因而该模型拟合程度较好,实验误差较小. 该模型是合适的,可以用此模型较好地

对丝裂霉素 C 的黑曲霉菌丝体诱变进行分析和预测. 由回归模型来预测紫外诱变的最优因素组合得最优方案,结果如表 3 所示. 菌丝体诱变实验筛选出具有两株较高酶活的菌 ANMN2 和 ANMN3,测得酶活平均值如表 4 所示.

表 3 均匀设计丝裂霉素 C 诱变黑曲霉最优指标时各个因素组合

| 诱变     | $Y \times 10^6 / \text{u} \cdot \text{L}^{-1}$ | $X_1 / \text{min}$ | $X_2 / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ |
|--------|--|--------------------|---------------------------------------|
| 菌丝体诱变  | 2.780  | 30                 | 80                                    |
| 原生质体诱变 | 1.943  | 58                 | 5                                     |

表 4 丝裂霉素 C 诱变黑曲霉得到高产植酸酶菌株平均酶活

| 菌株  | 诱变菌丝体 |        |        | 诱变原生质体 |        |        |
|---|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
|   | 始发菌种  | ANMN2  | ANMN3  | 始发菌种   | ANPN4  | ANPN1  |
| OD 值  | 0.299 | 0.516  | 0.422  | 0.129  | 0.391  | 0.379  |
| 酶活 $\times 10^6 / \text{u} \cdot \text{L}^{-1}$ | 1.424 | 2.619  | 1.865  | 0.488  | 1.931  | 1.865  |
| 相对酶活/(%)  | 100   | 183.89 | 147.55 | 100    | 395.52 | 381.98 |

2.2.2 原生质体诱变结果 由统计软件 DPS 处理 MMC 诱变原生质体均匀设计的数据(表 1 均匀设计方案和结果),可以得到回归多项式

$$Y=751.390\ 518+40.614\ 462\ 5 \cdot X_1-1.029\ 372\ 862 \cdot X_2-0.344\ 324\ 708 \cdot X_1 \cdot X_2.$$

对模型进行拟合分析,如表 2 所示. 相关系数  $R=0.997\ 846$ , $F=77.118\ 5$ ,显著水平  $p=0.083\ 5$ ;回归方程经过调整后,其相关系数  $R_a=0.991\ 355$ . 由此可见,回归式的拟合程度较好,说明该模型能解释 99.13%响应值的变化,建立响应面模型和等高线,如图 3 所示. 从图 3 中可看出,时间不变,随着 MMC

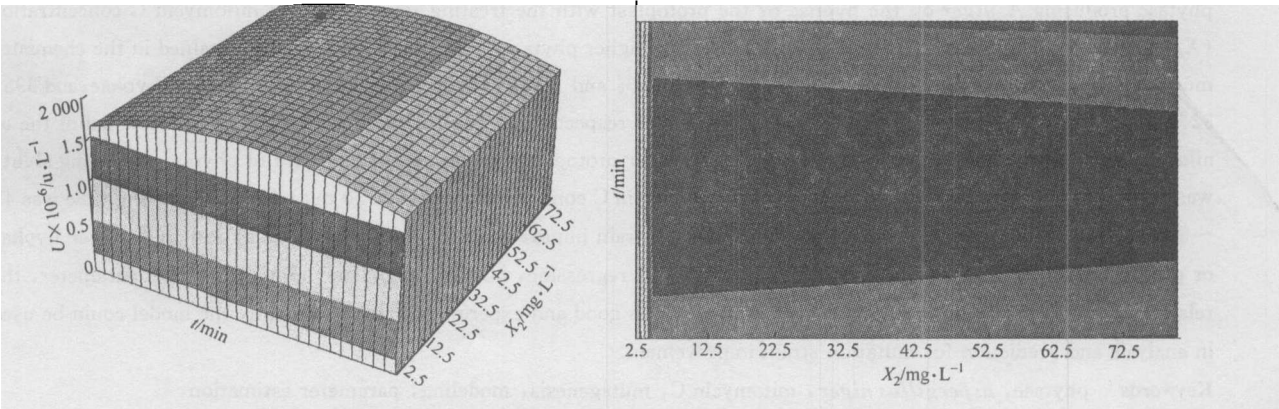


图 3 黑曲霉原生质体丝裂霉素 C 诱变响应面三维图

浓度的增大,黑曲霉产酶活趋于减小. 当诱变时间  $X_1$  为 10~80 min,酶活处于较高范围时,随着 MMC

浓度的增加,处于较高酶活数量级的菌株数量减少.当 MMC 浓度较低时,酶活处于相对较高的范围.该响应面调整后的相关系数  $R_1=0.991\ 355$ ,说明该模型能解释 99.13% 响应值的变化.因而该模型拟合程度良好,实验误差小,该模型是合适的,可以用此模型很好的对丝裂霉素 C 的黑曲霉原生质诱变进行分析和预测.由回归模型来预测诱变的最优因素组合得最优方案,结果如表 3 所示.实验筛选出具有两株较高酶活的菌株 ANPN4,ANPN1(表 4).

### 3 结束语

为挖掘生物技术的潜力,必须对生物技术过程进行有效的描述,实现过程优化控制.本实验中使用均匀设计和正交设计使实验过程大大简化.实验结果分析中使用的 DPS V 3.01 专业版数据统计软件和正交设计助手(Ⅱ) V 3.1 专业版,在数据挖掘中有十分重要的作用.通过采用均匀设计分析,得出黑曲霉丝裂霉素 C 诱变菌丝体和原生质体以丝裂霉素 C 的诱变时间( $X_1$ ),浓度( $X_2$ )两因素的回归方程.由回归模型预测丝裂霉素 C 诱变的最优因素组合得最优方案,能解释 89.02% 和 99.13% 响应值的变化.该模型拟合程度好、实验误差小,可较好地对丝裂霉素 C 的黑曲霉菌丝体诱变进行分析和预测.

### 参 考 文 献

- 1 Lott J N A, Ockenden I, Raboy V, et al. Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits, A global estimate[J]. Seed Sci Res, 2000, (10):11~33
- 2 Mitchell D B, Vogel K, Weimann B J, et al. The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: Isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*[J]. Microbiology, 1997, 14(3):245~252
- 3 Chen C C, Wu P H, Huang C T. A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, (35):315~320
- 4 Tseng Y H, Fang T J, Tseng S M. Isolation and characterization of a novel phytase from *Penicillium simplicissimum* [J]. Folia Microbiol, 2000(45):121~127
- 5 张铁鹰.植酸酶体外消化评定技术的研究[D].[学位论文].北京:中国农业科学研究院畜牧研究所,2002.28~36
- 6 方开泰.均匀设计及其应用[J].数理统计与管理,1994,13(1):56~63
- 7 黄遵锡,章克昌,徐 柔.植酸酶活测定不同方法的比较研究[J].饲料检测,1999,20(12):20~23

## Modeling and Parameter Estimation on Strain Improvement in Phytase Producing *Aspergillus niger* by Mitomycin C Mutagenesis

He Yancai Chen Lu Zhou Wengang

(College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, 362021, Quanzhou, China)

**Abstract** Uniform design was employed to optimize the process of mitomycin C mutation for strain improvement in phytase producing *A. niger* on the hyphae or the protoplast with the treating time ( $X_1$ ) and mitomycin C concentration ( $X_2$ ) as two factor regression equation. Four strains of higher phytase producing *A. niger* were obtained in the chemistry mutagenesis, their relative phytase activities were 183.89% and 147.55% of the originals from *A. niger* hyphae, and 395.52%, 381.98% of the original from *A. niger* protoplasts, respectively. Their regression response surface model of the uniform design show that mitomycin C mutation on *A. niger* protoplasts for strain improvement of phytase producing ability was better than that of on *A. niger* hyphae when mitomycin C concentration was  $5\sim 30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  and treating time was 45~60 min. Using the uniform design for the process of strain improvement by mitomycin C mutation on *A. niger* hyphae or protoplasts and using the experiment result analysis by regression, obtain a model and adjust the model parameter, the relative coefficients were 89.1% and 99.13%, the fit was good and experiment error was small, the model could be used in analysis and prediction for mutation strain improvement.

**Keywords** phytase, *aspergillus niger*, mitomycin C, mutagenesis, modeling, parameter estimation