

产聚半乳糖醛酸酶的黑曲霉诱变育种

张媛媛, 郝林*, 王倩

(山西农业大学食品科学与工程学院, 山西 太谷 030801)

摘要: 利用透明圈法对黑曲霉SH312菌株进行初筛, 得到黑曲霉SH312-26菌株。对其进行紫外线诱变, 筛选出SH312-26-19菌株, 该菌株聚半乳糖醛酸酶活力为113.68kU/mL, 较出发菌株SH-312-26提高了1.44倍; 果胶酯酶活力为14.34kU/mL, 较出发菌株提高了0.14倍, 其幅度远小于聚半乳糖醛酸酶活力的提高幅度。突变株SH312-26-19经斜面传代培养了5代, 产酶遗传特性稳定。

关键词: 聚半乳糖醛酸酶; 诱变育种; 筛选

Mutation Breeding of a High Polygalacturonase-Producing *Aspergillus niger* Strain

ZHANG Yuan-yuan, HAO Lin*, WANG Qian

(College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: *Aspergillus niger* strain SH312-26 was isolated by apparent circle method from strain SH312. A mutant strain named as SH312-26-19 was obtained by UV radiation using SH312-26 the original strain. The polygalacturonase activity of SH312-26-19 was 113.68 kU/mL, a 1.44-fold increase than that of strain SH-312-26. The pectin esterase activity was 14.34 kU/mL, a 0.14-fold increase than that of the original strain. After 5 passages on slant culture medium, the mutant remained genetically stable.

Key words: polygalacturonase; mutation breeding; selection

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)07-0231-03

果胶酶是分解果胶质酶类的总称, 主要包括聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, PG)、果胶裂解酶(pectin lyases, PL)和果胶酯酶(pectinesterase, PE)等组分^[1-2]。聚半乳糖醛酸酶专一性地分解果胶中两个非酯化半乳糖醛酸间的糖苷键, 使果胶很快从大分子降解为分子质量较小的低聚糖类, 能很快降低果胶溶液的黏度^[3-5]。果胶裂解酶通过反式消去作用生成半乳糖醛酸, 黏度下降不明显^[5]; 果胶酯酶是一种催化果胶分子中的甲酯水解生成果胶酶和甲醇的水解酶, 对果胶溶液的黏度基本没有影响^[4,6]。目前我国研究聚半乳糖醛酸酶较少且菌株产酶活力普遍不高^[7-8], 王志伟等^[7]筛选出1株M-8, 其聚半乳糖醛酸酶的酶活仅为964U/mL。本实验筛选出1株产果胶酶的黑曲霉为出发菌株, 采用紫外诱变育种筛选聚半乳糖醛酸酶高产菌株, 为果汁果酒澄清的研究提供了理论支持。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

黑曲霉(*Aspergillus niger*)SH312: 从工业用商品果胶

酶中分离筛选得到, 由山西农业大学食品科学与工程学院生物工程实验室保藏。

3,5-二硝基水杨酸 成都科龙化工试剂厂; 果胶 北京索莱宝科技有限公司。

1.2 培养基

1.2.1 PDA培养基(斜面)

称取200g马铃薯, 洗净去皮切成小块, 加水煮沸20~30min, 能被玻璃棒戳破即可, 用4层纱布过滤, 再加葡萄糖20g及琼脂20g, 继续加热搅拌混匀后补足水分至1000mL, pH值自然。

1.2.2 果胶平板培养基^[9]

K₂HPO₄ 0.1g、MgSO₄ 0.05g、NaNO₃ 0.3g、Fe₂(SO₄)₃ 0.001g、琼脂2.0g、果胶0.2g、水1000mL, pH5.5。

1.2.3 固体发酵培养基

麸皮10g装入250mL三角瓶, 按料液比1:1.5(m/V)加入蒸馏水。以上培养基均在121℃灭菌20min。

1.3 方法

1.3.1 出发菌株的筛选

1.3.1.1 菌种的活化

取斜面保藏的黑曲霉菌种SH312, 接种于PDA培养基, 36℃恒温培养5d。

收稿日期: 2011-12-21

作者简介: 张媛媛(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物与发酵技术。E-mail: zyysxnd@yahoo.cn

*通信作者: 郝林(1957—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物与发酵技术。E-mail: haolinsxnd@126.com

1.3.1.2 制备孢子菌悬液

菌种活化后,加入85%无菌生理盐水洗下孢子,利用漩涡混合器振荡均匀,制成均匀的孢子悬液,采用血球计数板法将孢子悬液浓度调整为 10^6 个/mL。

1.3.1.3 平板分离

把配制好的孢子悬液进行梯度稀释,取稀释至 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 个/mL的孢子悬液各0.2mL涂布于果胶平板培养基上,36℃恒温培养5d。观察并挑选单个菌落进行编号,然后将每个菌落接种在另一个果胶平板培养基平皿上,做3个平行,36℃恒温培养5d。

1.3.1.4 筛选

向平皿中加入3mL碘液,静止片刻即可见清晰的透明圈,选取透明圈与菌落直径比大的菌株SH312-26作为出发菌株接种于斜面培养基上,36℃恒温培养5d。

1.3.2 出发菌株酶活力的测定

1.3.2.1 粗酶液的制备

将斜面培养的SH312-26菌株用生理盐水洗下孢子,振荡均匀,调整孢子浓度为 10^6 个/mL,取1mL孢子悬液加入固体发酵培养基中36℃恒温培养3d。3d后向固体发酵培养基的三角瓶中加入250mL蒸馏水,静置3h,4层纱布过滤,滤液即为得到的粗酶液。

1.3.2.2 PG活力的测定^[10-12]

取稀释10倍的粗酶液0.5mL,以灭活的酶液为对照。以0.5mL质量浓度为1g/100mL的果胶溶液为底物,加入pH4.8的乙酸-乙酸钠缓冲液1.0mL,加入酶液后,48℃反应30min。取出后加入2mL DNS溶液,沸水浴保持5min,流水冷却。蒸馏水定容至25mL,混合均匀后,在540nm波长处测定吸光度。酶活力单位定义为:1mL酶液每分钟分解果胶生成 $1\mu\text{mol}$ 半乳糖醛酸需要的酶量为1个酶活力单位。

1.3.2.3 PL活力的测定^[13]

取适当稀释的粗酶液20 μL ,加入到2mL 0.2g/100mL的聚半乳糖醛酸溶液(聚半乳糖醛酸溶于pH9.4的0.2mol/L甘氨酸-NaOH缓冲溶液中,其中含有0.44mmol/L的 CaCl_2)中,以无活性的酶液作为空白对照,在45℃反应15min,用3mL 0.03mol/L的磷酸终止反应,在235nm波长处测定吸光度。酶活力单位定义为:每分钟使果胶裂解酶产生 $1\mu\text{mol}$ 的不饱和半乳糖醛酸所需的酶量为一个酶活单位。

1.3.2.4 PE活力的测定^[6,14-15]

PE作用于聚半乳糖醛酸甲酯产生自由羧基和甲醇采用滴定羧基来评价酶活力。

取5mL 1g/100mL的果胶溶液于三角瓶中,50℃条件下恒温,用0.1mol/L的NaOH调节pH值至4.0,加入0.5mL粗酶液,同时计时开始。用0.01mol/L的NaOH溶液调节pH值至4.5。果胶酯酶催化果胶水解,使体系的pH值不断下降,利用自动滴定仪不断地滴入0.01mol/L的NaOH,

使体系pH值始终保持在4.5。每隔1min记1次NaOH的消耗量,反应5min。以加入的NaOH的微摩尔数-反应时间作图,所得直线的斜率(K_x)计算果胶酯酶的活力。

1.3.3 紫外线照射剂量的选择

在红光条件下将SH312-26菌株活化,浓度调整为 10^6 个/mL。利用紫外灯照射,照射时间分别为0、10、20、30、40、50s。涂布于平板,置于36℃恒温箱中倒置培养,菌落长好后(约5d)计数。计算不同照射时间的相对致死率,选择致死率70%~80%的照射时间作为紫外线照射剂量。

$$\text{相对致死率}/\% = \frac{\text{未处理组存活孢子数} - \text{处理组存活孢子数}}{\text{未处理组存活孢子数}} \times 100$$

1.3.4 突变株的筛选

初筛方法同1.3.1节。将初筛所获得菌株进行固体发酵,每株作3个平行,36℃培养3d后,以干基的25倍分别向培养基中加入蒸馏水浸提3h,4层纱布过滤,得粗酶液。将其适当稀释分别测各菌株的聚半乳糖醛酸酶、果胶裂解酶和果胶酯酶的酶活力,筛选出聚半乳糖醛酸酶活力高又具有遗传稳定性的菌株作为目的菌株。

2 结果与分析

2.1 紫外线照射剂量的选择

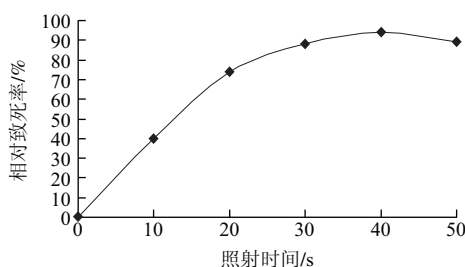


图1 紫外线照射剂量与致死率关系

Fig.1 Relationship between UV exposure dose and lethality

经筛选得到的黑曲霉SH312-26作为紫外诱变的出发菌株。在额定的功率条件下紫外照射不同的时间,孢子致死率计算结果如图1所示。0~40s时突变率随剂量的增高而提高,但超过40s后,提高剂量反而会降低正突变率。在诱变育种工作中,比较倾向采用较低的致死剂量,致死率在70%~80%之间高产菌株诱变效果好。故确定紫外线诱变作用时间为20s。

2.2 紫外诱变结果

2.2.1 高产突变株的初筛

用30W紫外灯照射孢子悬液20s,将诱变后的孢子悬液涂布于果胶平板培养基,36℃培养5d进行初筛。实验过程中发现有菌落较小的也有不长孢子的菌落,说明菌株对紫外线较为敏感。选取40个菌株,测量菌落直径及

透明圈直径, 透明圈与菌落直径的比值较出发菌株都有显著地提高, 部分结果见表1。其中, 19、20、22号菌株提高的最为显著。

表1 部分菌株透明圈直径与菌落直径比
Table 1 Ratio between apparent circle diameter and bacterial colony of partial strains

菌株代号	菌落直径(D)/cm	透明圈直径(d)/cm	D/d比值
SH-312-26	1.4	0.3	4.67
SH-312-26-2	2.3	0.4	5.75
SH-312-26-7	1.7	0.2	8.50
SH-312-26-8	2.2	0.3	7.33
SH-312-26-11	2.4	0.3	8.00
SH-312-26-13	2.1	0.3	7.00
SH-312-26-14	2.2	0.3	7.33
SH-312-26-16	2.3	0.3	7.67
SH-312-26-17	2.5	0.3	8.33
SH-312-26-18	1.9	0.2	9.50
SH-312-26-19	2.7	0.2	13.50
SH-312-26-20	2.9	0.3	9.67
SH-312-26-21	2.1	0.3	7.00
SH-312-26-22	2.7	0.2	13.50
SH-312-26-23	1.8	0.2	9.00

2.2.2 高产突变株的复筛

将初筛所得的正突变株分别接种于固体发酵培养基作进一步复筛, 其中3个较好菌株的聚半乳糖醛酸酶、果胶裂解酶和果胶酯酶的酶活力见表2。最后筛选出SH312-26-19菌株, 该菌株中聚半乳糖醛酸酶活力为113.68kU/mL, 较出发菌株提高了1.44倍; 果胶酯酶活力为14.34kU/mL, 较出发菌株提高了0.14倍, 其幅度远小于聚半乳糖醛酸酶活力的提高幅度, 因此SH312-26-19菌株符合最佳产酶效率菌株。

表2 突变株的复筛结果
Table 2 Re-screening results of mutant strains

酶	酶活力/(kU/mL)			
	SH312-26	SH312-26-19	SH312-26-20	SH312-26-22
PG	46.50	113.68	65.88	72.92
PL	2.77	0.36	0.20	0.23
PE	12.54	14.34	13.27	17.22

2.2.3 突变株的产酶遗传稳定性

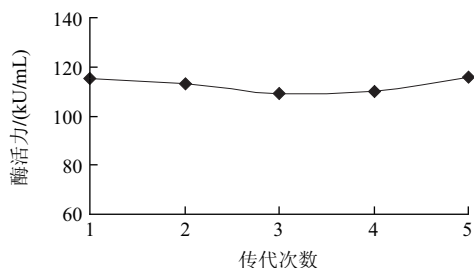


图2 黑曲霉突变株SH312-26-19产酶遗传稳定性曲线
Fig.2 Genetic stability of mutant strain SH312-26-19

对突变株SH312-26-19进行遗传稳定性实验, 将其接种到斜面培养基上连续传代至第5代, 每代均接种到基础固体发酵培养基上进行固态发酵产果胶酶实验, 测定各代的聚半乳糖醛酸酶活力, 结果如图2所示, 突变株SH312-26-19产聚半乳糖醛酸酶的遗传稳定性好。

3 结论

本实验利用透明圈法初筛黑曲霉SH312, 得到黑曲霉SH312-26作为出发菌株。采用紫外线诱变方法, 诱变剂量为20s, 用透明圈法进行了初筛, 共筛选出40株突变株。对这些突变株进行复筛后, 最后筛选出1株高产聚半乳糖醛酸酶的菌株SH312-26-19, 其聚半乳糖醛酸酶活力为113.68kU/mL, 较出发菌株SH-312-26提高了1.44倍; 果胶酯酶活力为14.34kU/mL, 较出发菌株提高了0.14倍, 其幅度远小于聚半乳糖醛酸酶活力的提高幅度。其与王志伟等^[7]筛选出的M-8相比, 明显高于M-8的聚半乳糖醛酸酶活力, 因此本实验取得了很好的效果。突变株SH312-26-19经斜面传代培养5代, 产酶遗传特性稳定。

参考文献:

- [1] KASHYAP D R, VBHRA P K, CHOPRA S, et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review[J]. Bioresource Technology, 2001, 77: 215-227.
- [2] 兰颖辉, 韩振林, 李磊. 果胶酶三种组分的酶学性质检测[D]. 天津: 天津科技大学, 2006.
- [3] IMOTO T, YAGSHITA K. A simple activity measurement of lysozyme[J]. Agri Biol Chem, 1971, 35: 1154-1156.
- [4] 叶华, 马力. 柑橘果胶酯酶的基因克隆[D]. 成都: 西华大学, 2006.
- [5] 张飞, 岳田利, 费坚, 等. 果胶酶活力的测定方法研究[J]. 西北农业大学学报, 2004, 13(4): 134-137.
- [6] 张红霞, 江晓路, 牟海津, 等. 微生物果胶酶的研究进展[J]. 生物技术, 2005, 15(5): 92-95.
- [7] 王志伟, 江晓路, 牟海津. 产聚半乳糖醛酸酶菌株 *Aspergillus niger* M-8的筛选及产酶条件研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(4): 42-45.
- [8] 孟娟, 曾虹燕, 张艳梅, 等. 复合诱变选育高产脂肪酶黑曲霉菌株及其固定化酶性质[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(2): 209-214; 231.
- [9] 陈峰. 果胶酶高产菌株选育及产酶条件与酶学性质研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 1999.
- [10] 冯红, 刘晓兰, 郑喜群. 黑曲霉固态发酵生产果胶酶培养条件的研究[J]. 齐齐哈尔大学学报, 2008, 24(5): 61-64.
- [11] 胡慧磊, 彭丽桃. 产聚半乳糖醛酸酶菌株的筛选、发酵条件及酶学性质的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [12] CUTILLAS I A, ZARRRA I, LORENCES E P. Metabolism of cell wall polysaccharides from persimmon fruit: pectin solubilization during fruit ripening occurs in apparent absence of polygalacturonase activity[J]. Physiol Plant, 1993, 89: 368-375.
- [13] 陈晟, 陈坚, 堵国成, 等. 碱性果胶酶中试生产和稳定性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- [14] MALDONACB M C, de SAAD A M S, CALLIERI D, et al. Purification and characterization of pectinesterase produced by a strain of *Aspergillus niger*[J]. Current Microbiology, 1994, 28(4): 193-196.
- [15] 贾月, 弓爱军, 邱丽娜, 等. 果胶酶分离纯化及分析方法的研究进展[J]. 工业微生物, 2005, 35(3): 55-58.