

产生淀粉糖化酶菌株的诱变选育

潘 明,周永进,张 强

(四川理工学院生物工程系,四川 自贡 643000)

摘 要: 以黑曲霉 vin-1 为研究对象,通过紫外诱变(UV)和硫酸二乙酯(DES)两次诱变,获得产酶较高的菌株 vin-1-24-72,酶活达到 527 u/g,比原始菌株提高 154%,RDA %值为 40%。菌株经过 7 次传代,酶活较稳定。

关键词: 微生物; 黑曲霉; 突变; 曲利苯兰; 硫酸二乙酯

中图分类号:Q93-3;TS261.1 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2006)10-0037-03

Mutating of Raw Starch-digesting Glucoamylase Strain

PAN Ming, ZHOU Yong-Jin and ZHANG Qiang

(Sichuan College of Science and Technology, Zigong, Sichuan 643000 China)

Abstract: A mutant strain vin-1-24-72 with high yield of raw starch-digesting glucoamylase was isolated from protoplast of *Aspergillus niger* vin-1 treated by UV and DES. The raw starch-digesting glucoamylase activity of the strain raised to 527 u/g, which was 154 % higher than the enzyme activity of protoplast strain. The RDA were 40 %. The enzyme activity of the mutant strain was very steady cultured by seven times.

Key words: microbe; *Aspergillus niger*; mutant; trypan blue; DES

生淀粉糖化酶是可以水解生淀粉的葡萄糖糖化酶(Ec 3.2.1.3, α -1,4-糖苷酶),它是近代工业中极为重要的酶类之一,由于其在作用生淀粉质原料时不经蒸煮,而是直接分解成葡萄糖,简化了现代发酵工业中的生淀粉的前期处理过程,为节约能源,降低发酵工业的生产成本做出了很大的贡献,但得到的菌株由于酶活低、不稳定等原因,不符合工业生产要求。目前国内外很多学者都在从事这方面的研究^[1~7],希望能得到针对不同生产条件的产生淀粉糖化酶的菌株,力求在这个领域找到一个突破点,推动发酵工业的发展。本文报告了采用传统的微生物选育方法对筛选到的生淀粉糖化酶产生菌株的选育工作。

1 材料与方

1.1 材料

出发菌株:本实验室筛选出的黑曲霉 vin-1。

1.2 主要试剂

3,5-二硝基水杨酸,曲利苯兰,硫酸二乙酯。

1.3 部分仪器设备

SHA-C 往复式水浴恒温水浴振荡器(上海华燕医

疗器械有限公司),HZQ-R 振荡器(东联电子技术开发有限公司),721E 分光光度计(上海光度仪器有限公司)。

1.4 培养基

1.4.1 选择性平板培养基:生马铃薯粉 1%,酵母膏 0.5%,蛋白胨 0.5%,NaCl 0.5%,琼脂 1.5%,质量分数为 0.5%的曲利苯兰 10 mL。制备时,将除马铃薯淀粉以外的成分于 121℃ 灭菌 20~30 min,冷却到 45℃,加入经 160℃ 干热灭菌 3 h 的马铃薯淀粉。

1.4.2 固体发酵培养基:麸皮:水=1:1.2(250 mL 三角瓶装量 30 g)。

1.4.3 试管斜面:察氏琼脂培养基。

1.4.4 孢子活化培养基:察氏培养基补加 0.2% 的蛋白胨。

1.5 菌株诱变^[8]

1.5.1 诱变过程:菌株(黑曲霉)→孢子悬浮液→紫外诱变→涂布选择性平板→接入斜面→筛选→复筛→诱变菌株获得→硫酸二乙酯进一步诱变→涂布选择性平板

1.5.2 诱变方法

单孢子悬液制备:将单孢子悬液接入孢子活化培养

收稿日期:2006-08-11

作者简介:潘明(1966-),女,副教授,博士,主要从事生物工程方面研究。

基中, 30 摇床培养 12 h, 即得活化的单孢子悬液, 取 10 mL 活化的单孢子悬液, 4000 r/min 离心 10 min, 沉淀用生理盐水 (0.75 % 的 NaCl) 洗涤两次, 再加入一定量的生理盐水, 调整浓度, 使孢子浓度达 10^6 个 /mol/L。

紫外线处理: 紫外灯(30 W) 预照射 1 h, 取 5 mL 洗涤过的单孢子悬液注入直径为 9 cm 的培养皿中 (内含无菌搅棒), 置于磁力搅拌器上, 在距离为 30 cm 处搅拌照 0 s, 30 s, 60 s, 90 s, 120 s, 150 s, 180 s, 210 s 和 240 s, 暗室冰浴 2 h, 做梯度稀释, 选取 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 涂选择性平板, 30 避光培养 4 d, 计算致死率, 在不同照射时间挑选其中 D d 值大且生长快速的 10 个诱变菌株, 在发酵培养基中 30 培养 3 d, 测其酶活力, 计算正变率。

DES 处理: 取 5 mL 菌悬液与浓度为 2 % 的 DES 溶液以 5:5 的比例混合, 在 30 振荡培养 0 min, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min 和 70 min, 加入 2 % 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 终止反应, 做梯度稀释, 取 0.1 mL 涂筛选平板, 梯度稀释后, 选取 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 涂平板, 30 避光培养 5 d, 计算致死率, 在不同诱变时间挑选其中 D d 值大且生长快速的 10 个诱变菌株, 在发酵培养基中 30 培养 3 d, 测其酶活。

1.6 生淀粉糖化酶酶活力的测定

1.6.1 葡萄糖标准曲线制作: 分别在 25 mL 具塞比色管中加入 0, 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.8 mg/mL, 1.2 mg/mL, 1.6 mg/mL, 2.0 mg/mL 的葡萄糖标准液, 加蒸馏水补至 2 mL, 再分别加入 2 mL DNS 试剂, 摇匀, 置沸水浴中煮沸 5 min。取出后流水冷却, 加蒸馏水定容至 20 mL。以无葡萄糖标准液管作为空白调零点, 在 520 nm 波长下比色测定。以葡萄糖含量为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线。

酶液的制备: 称取固体曲 5 g, 加入 45 mL 蒸馏水, 40 下浸提 1 h, 用脱脂棉过滤, 得酶液。

1.6.2 酶活测定方法: 2 % 的生玉米淀粉悬浮液 2.0 mL 加入到 25 mL 具塞比色管中, 添加 pH3.6 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液 2 mL, 40 预热 10 min, 加入 1.0 mL 酶液, 在 40 恒温振荡 (180 r/min) 反应 1 h 后, 加入 DNS 试剂 2 mL 终止反应。摇匀, 置沸水浴中煮沸 5 min。取出后流水冷却, 加蒸馏水定容至 20 mL。以不加酶液管作为空白调零点, 在 520 nm 波长下比色测定吸光度值。

1.6.3 降解糊化淀粉(gelitized starch)的活力测定: 用糊化淀粉作为酶的作用底物方法与降解生淀粉活力的测定相同。

酶活力定义: 在以上分析条件下, 1 h 释放 1 mg 葡萄糖的酶量定义为一个酶活力单位。

发酵前称量干培养基的重量, 发酵后称量湿曲的重量, 计算湿曲水分含量。测得湿曲酶活力后, 除以水分含量, 即得干曲酶活力。

2 RDA (Raw starch digesting-ability) 计算

根据资料^[2]介绍的方法: $\text{RDA} \% = \frac{B}{A} \times 100 \%$

式中: B——降解生淀粉的活力;

A——降解糊化淀粉的活力。

3 结果与分析

3.1 葡萄糖标准曲线

按照上述葡萄糖标准曲线的绘制方法, 可得标准曲线图(见图 1)。

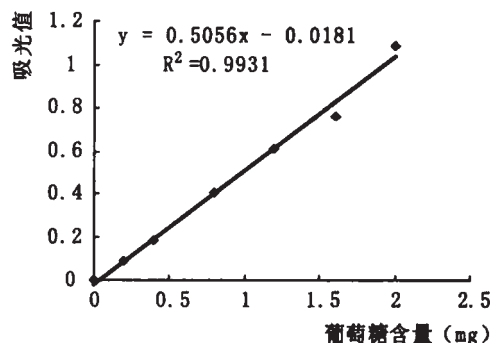


图 1 葡萄糖标准曲线

3.2 菌株选育结果

3.2.1 紫外线诱变

在选择性平板培养基上, 挑选其中 D d 值大且生长快速的诱变菌株, 由于不同种微生物对紫外光的敏感度不同, 以及操作条件的不同, 在相同的时间下, 菌株的致死率会有所不同, 因而相对正突变率高的致死率也会不同。实验结果如图 2 和图 3。从图 3 可以看出, vin-1 的最佳正突变率(45 %)所对应的致死率为 78.6 %, 即紫外灯照射时间为 2 min。

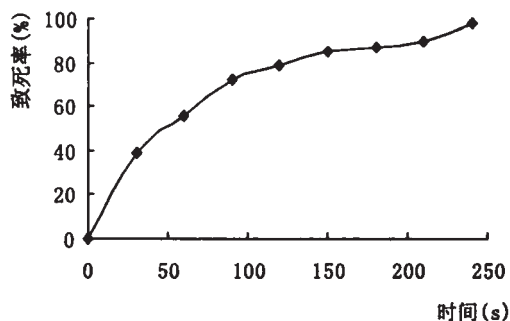


图 2 UV致死率-时间曲线

经过紫外诱变得到 8 株酶活较高的菌株, 见图 4。

由图 4 可知, 编号为 vin-1-12 和 vin-1-42 的 2 菌株酶活最高, 但进一步的稳定性检测以及 RDA 的测定得知, vin-1-42 和 vin-1-12 两菌株的稳定性都不好, 而

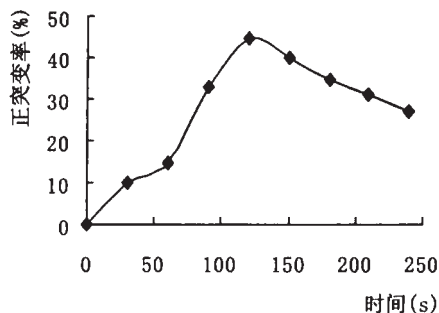


图3 正突变率-时间曲线

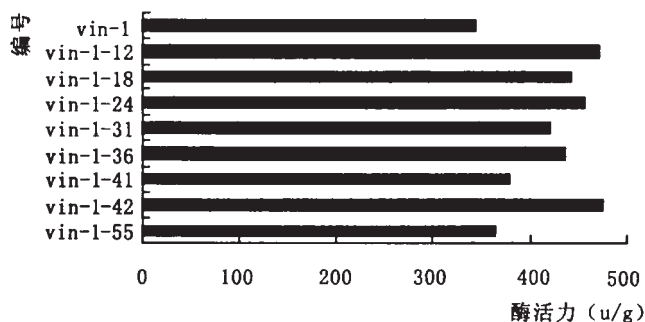


图4 紫外灯诱变后菌株酶活力

vin-1-24 的稳定性非常好, 其酶活力为 456 u/g, RDA 值为 35%, 因而选取 vin-1-24 菌株为再次诱变的出发菌株。

3.2.2 DES 诱变

以 vin-1-24 为出发菌株进行硫酸二乙酯诱变, 得到 DES 致死率-时间曲线图(图 5)。

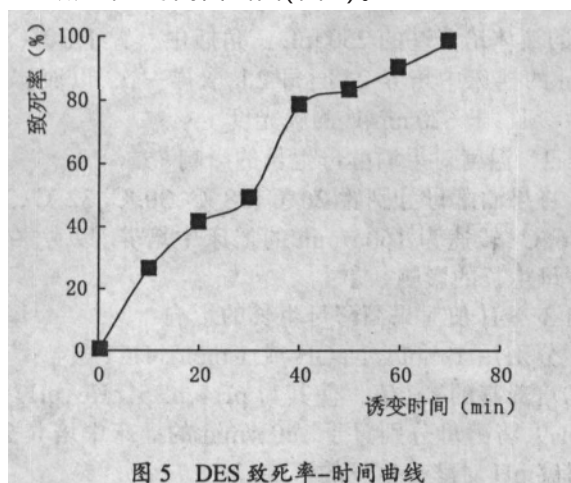


图5 DES 致死率-时间曲线

从图 5 可知, 随着时间的延长, 菌株致死率逐渐增大, 在诱变时间为 50 min 时致死率为 83%, 实验结果得到 3 株高酶活突变菌株, 结果见图 6。

从试验结果可以看出, vin-1-24 经过硫酸二乙酯诱变, 筛选出一株生淀粉糖化酶菌株 vin-1-24-72, 酶活达到 527 u/g, RDA 值为 40%, 酶活力比原始出发菌株提高了 54%。

3.3 稳定性检验

将 vin-1-24-72 菌株在斜面培养基上连续传种 7

次, 每次接种发酵测定酶活以及 RDA 值, 结果见表 1。从表 1 可知, vin-1-24-72 的产酶能力和 RDA 值均具有较好的稳定性。

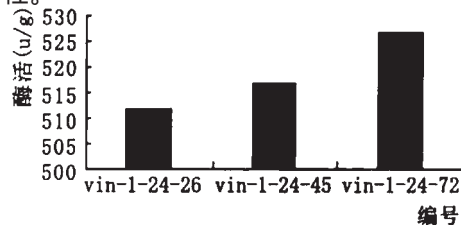


图6 DES 诱变后的菌株酶活力

表1 诱变菌株的稳定性

项 目	传种代数						
	1	2	3	4	5	6	7
酶活 (u/g)	520	524	528	522	518	530	525
RDA %	38	35	41	38	39	43	40

4 结论

以本实验室筛选出的黑曲霉 vin-1 为出发菌株, 经过紫外和 DES 诱变, 筛选出一株菌株 vin-1-24-72, 其酶活达到了 527 u/g, 比出发菌株提高了 54%, RDA% 值为 40%。菌株经紫外诱变后, 酶活提高了 33%, 效果比较显著; 经 DES 诱变后, 酶活在紫外诱变的基础上提高了 16%, 不是很显著。选育得到的菌株经遗传稳定性试验表明有较好的遗传稳定性。

参考文献:

- [1] 苏建宇, 姚澍晖. 黑曲霉固体发酵生产淀粉分解酶的研究[J]. 宁夏农学院学报, 2002, 23(1): 70-71.
- [2] 诸葛斌, 姚惠源, 诸葛健. 生淀粉糖化酶高产菌的选育[J]. 微生物学通报, 2001, 28(6): 60-64.
- [3] Hiroshi Morita, Kouhei Mizuno, Mayumi Matsunaga, Yusaki Fujio [J]. J Appl Glycoci, 1999, 46: 15-21.
- [4] 刘建军, 姜鲁燕, 赵祥颖. 根霉 PE-8 菌株淀粉降解酶类的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(11): 34-37.
- [5] Sevcik, J.; Hostinova, E.; Solovicova, A. Structure of the complex of a yeast glucoamylase with acarbose reveals the presence of a raw starch binding site on the catalytic domain[J]. Febs Journal, 2006, 273(10): 2161-2168.
- [6] Silveira, S. T.; Oliveira, M. S.; Costa, J. A. V. Optimization of glucoamylase production by Aspergillus niger in solid-state fermentation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006, 128(2): 131-135.
- [7] Roy, Ipsita; Gupta. Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads[J]. Enzyme & Microbial Technology, 2004, 34(1): 26-32.
- [8] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.