

α -葡萄糖苷酶高产菌株诱变选育的研究

陈桂光, 管立忠, 李玮, 陈山岭, 梁智群

(广西大学生命科学与技术学院, 广西 南宁 530004)

摘要: α -葡萄糖苷酶是生产异麦芽低聚糖的关键酶。本文以 α -葡萄糖苷酶产生菌黑曲霉 M-1 为出发菌株, 经 UV、UV-LiCl 复合诱变和 ^{60}Co 诱变选育, 成功筛选出了一株遗传稳定性较好的高产菌株 C-1, 其产酶活力是出发菌株的 2.7 倍。有望将来应用于异麦芽低聚糖的生产中。

关键词: α -葡萄糖苷酶; ^{60}Co ; 诱变选育

中图分类号: TS261.1⁺5; **文献标识码:** A; **文章篇号:** 1673-9078(2007)07-0019-03

Screening of a Mutant Strain Producing Alpha-transglucosidase

CHEN Gui-guang, GUAN Li-zhong, LI Wei, CHEN Shan-ling, LIANG Zhi-qun

(College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: Alpha-transglucosidase plays a critical role in producing isomaltoligosaccharide. In the paper, A stable mutant strain *A.niger*C-1 producing alpha-transglucosidase was obtained by ^{60}Co , UV and UV- LiCl mutant experiments. The productivity of the Alpha-transglucosidase of the mutagenesis is 2.7 times higher than that of the wild strain *A.niger* M-1. The strain would be applied in the production of isomaltoligosaccharide in the future.

Key words: alpha-transglucosidase; ^{60}Co ; mutation breeding

α -葡萄糖苷酶又称 α -葡萄糖苷转移酶(α -GTase), 是一种 α -D-葡萄糖苷酶, 它可以从低聚糖的非还原性末端切开 α -1,4 糖苷键, 释放出葡萄糖, 或将游离出的葡萄糖残基以 α -1,6 糖苷键转移到另一个糖类底物上, 从而得到非发酵性的异麦芽低聚糖(简称 IMO, 主要包括异麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖等)、糖脂或糖肽等。该酶既具有水解能力, 又具有转苷能力。

由于近年来发现异麦芽糖、潘糖等低聚糖是一种很好的双歧因子, 摄入后不被人体消化吸收, 也不被大肠中多数腐败细菌所利用, 却能作为双歧杆菌的碳源而利用, 而双歧杆菌是众所周知的人体有益微生物。作为生产功能性食品的主要原料的 IMO, 备受国内外的广泛关注。由于异麦芽低聚糖生产中最关键的酶是 α -葡萄糖苷酶。^[1-4]目前, 国外生产 α -葡萄糖苷酶主要以纯酶为主, 酶活较高; 国内研究主要以菌种的选育、粗酶液为主, 酶活较低。

本文从实验室保藏的黑曲霉 M-1 菌株出发, 经诱变选育, 筛选出高产 α -葡萄糖苷酶菌株, 酶活达到国内领先水平, 有较好的应用前景。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

菌种: 黑曲霉 M1 (广西大学食品发酵所保藏, 酶活为 301.31 U/mL); α -D-葡萄糖苷(α -MG) (Sigma 公司); 其它试剂均为分析纯。

1.2 培养基

菌种保藏及试管斜面培养基: 马铃薯琼脂(PDA)培养基^[5]。

种子培养基: 淀粉 3%, 麸皮 3% (麸皮加水, 沸水煮 30 min, 6 层纱布过滤), pH 值自然。

液体发酵培养基: pH 值调至 6.0, 其它同种子培养基。

1.3 方法

1.3.1 粗酶液的制备

将发酵液抽滤, 收集菌体用蒸馏水洗两次, 将湿菌体用 0.2 mol/L pH 6.0 乙酸-乙酸钠缓冲液, 定容至 100 mL, 用均质机破碎菌体, 在压力 25 MPa 下循环 5 次, 所得匀浆液即为粗酶液。

1.3.2 酶活测定方法

以 α -MG 为底物, 取 2% α -MG 溶液, 0.2 mol/L 醋酸缓冲液各 0.5 mL, 40 °C 预热 5 min, 加适量粗酶

收稿日期: 2007-03-22

作者简介: 陈桂光, 副教授, 主要研究方向: 微生物技术与生物制药

液 0.2 mL, 40 °C 反应 40 min 后, 100 °C 沸水浴中加热 5 min 灭酶, 取出 0.2 mL 反应液, 加 2 mL DNS, 沸水浴 2 min, 流动水迅速冷却, 520 nm 测吸光值。

酶活力定义: 在上述条件下, 每小时由底物生成 1 μg 葡萄糖量所需酶量为 1 U。

1.3.3 还原糖的测定: 采用 DNS 法^[6-7]。

1.4 诱变处理

1.4.1 孢子悬液的制备

用无菌 NaCl 溶液 (0.85%) 冲洗一支斜面于装有玻璃珠的三角瓶中, 30 °C 恒温振荡 20 h, 脱脂棉过滤, 即为孢子悬液, 计数并调整其浓度为 10^6 个/mL。

1.4.2 诱变处理方法

1.4.2.1 紫外线 (UV) 与 LiCl 复合诱变

方法参阅文献^[8], 诱变时间分别为 20 s、40 s、60 s、80 s、100 s、120 s。照射完成后, 在红灯下操作, 稀释涂布于含 LiCl 的平板。30 °C 暗箱培养 36 h 后, 观察、记录菌落生长状况。

1.4.2.2 ^{60}Co 诱变

取 10 mL 孢子悬浮液于试管中, 于 30 °C 恒温振荡培养 12 h。分别以 2、4、6、8、10、12 万 γ -伦琴射线处理。将处理液稀释涂布, 于 30 °C 培养 36 h, 观察、记录菌落生长状况。

2 结果与分析

2.1 UV 诱变和 UV-LiCl 复合诱变对菌株的影响

将孢子悬液在紫外灯下照射 20 s、40 s、60 s、80 s、100 s、120 s 后, 取处理后的孢子悬液, 梯度稀释后涂布于平板, 然后进行初筛, 观察菌落的生长情况并记录菌数。根据菌落生长状态和数目绘制致死率、正突变、负突变曲线, 如图 1 所示。

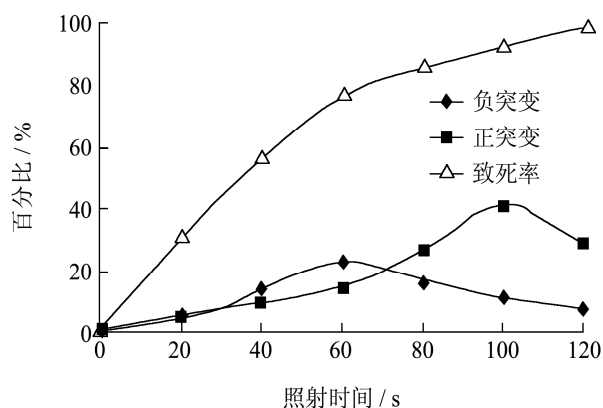


图 1 UV 照射时间与致死率、突变率曲线

图 1 表明: 该菌株对紫外线比较敏感, 随照射时间的延长, 致死率逐渐上升, 当照射时间到 60 s 时,

致死率 75.8%; 而正突变率和负突变率随照射时间的延长先上升后下降, 正突变率、负突变率分别在 60 s、100 s 时达到最大。因此, 选择在 60 s 正突变率最高时进行紫外诱变处理。

2.2 ^{60}Co 诱变对菌株的影响

按照 1.4.2.2 方法, 绘制 ^{60}Co 诱变处理是的致死率、正突变率、负突变率曲线。由图 2 可知, 致死率随剂量的增加, 逐渐升高, 当诱变剂量 100 万 γ -伦琴射线时, 致死率达 94%; 正突变率在诱变剂量为 6 万 γ -伦琴射线时达最高, 负突变率在 8 万 γ -伦琴射线时达最高。因此, 选择在 6 万 γ -伦琴射线正突变率最高时进行诱变处理。

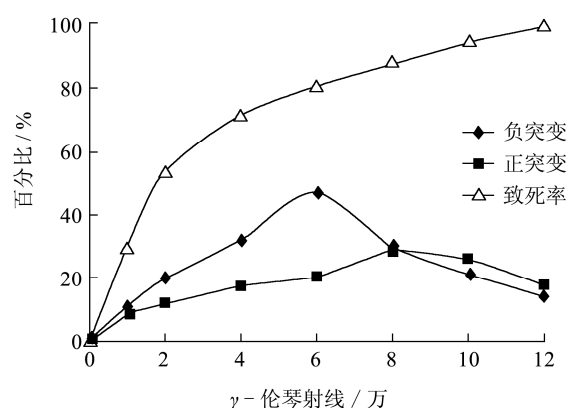


图 2 ^{60}Co 诱变照射剂量与致死率、突变率曲线

2.3 诱变筛选结果

经 UV-LiCl 复合诱变处理后, 筛选出 5 株高产菌株, 其中 U1 提高较为明显约为出发菌株的 170%; 然后以 U1 作为出发菌株, 筛选 5 组酶活较高的菌株经 6 万 γ -伦琴射线处理, 筛选结果见图 3。

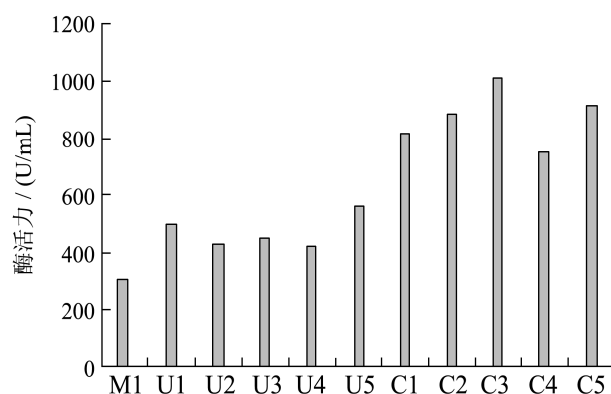


图 3 诱变筛选结果

由图 3 可知 ^{60}Co 诱变后的效果较好, 其中 C1 酶活为 814.95 U/mL, C3 的酶活为 1015.32 U/mL。

2.4 遗传稳定性分析

取 ^{60}Co 诱变菌株 C1、C2、C3、C4、C5 连续传 7 代, 取不同代菌株在同一条件下进行摇瓶发酵培养,

测定不同代菌株的产酶情况, 结果见图 4。

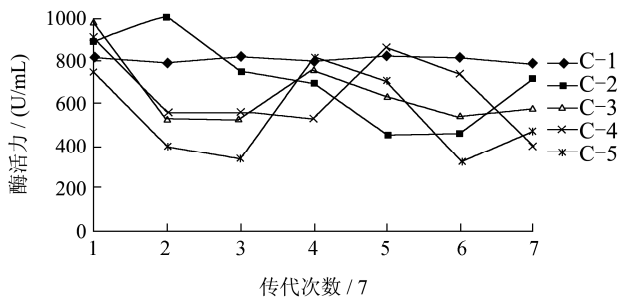


图 4 ^{60}Co 诱变菌株遗传稳定性

由图 4 可知, 5 个诱变菌株分别传 7 代后在相同条件下测酶活, C1 菌株遗传性状比较稳定, 有望将来应用到低聚麦芽糖生产中。

3 讨论

本文以 α -葡萄糖苷酶产生菌黑曲霉 M1 为出发菌株, 通过 UV-LiCl 复合诱变和 ^{60}Co 诱变处理, 得到一株遗传性状较好的高产菌株 C1, 其产酶能力由出发菌株的 301.31 U/mL 提高到 814.95 U/mL, 是出发菌株的 2.7 倍, 为进一步利用 α -葡萄糖苷酶生产低聚异麦芽糖奠定了基础。

参考文献

[1] Kuriki, T. Yanase, M. A new way of producing isomaltooli-

gosaccharide syrup by using the transglucosylation reaction of α -D-glucanase[J]. Applied and Environment Microbiology, 1994, 59(4): 953-959

- [2] Alam, M.S, Shigeru, N. Yoshihiro, D. *et al.* Molecular cloning of a gene encoding α -D-glucosidase from Tetrahymena Pyriforms[J]. Microbiol. 1996 43(4): 295-303
- [3] Akira N., Ikuko N., Akihito Y. *et al.* Cloning and sequencing of an α -D-glucosidase gene from *Aspergillus niger* and its expression in *A.nidulans*[J]. Journal of Biotechnology, 1997 (53): 75-84
- [4] Jong, W.Y. Continuous production of isomaltooligosaccharides from maltose syrup by immobilized cells of permeabilized *Aureobasidium Puriuans*[J]. Biotechnology Letters, 1994, 16(11): 1145-1150
- [5] 祖若夫, 胡宝龙, 周德庆, 等. 微生物学实验教程[M] 复旦大学出版社, 1993: 177-180
- [6] 宁正祥. 食品成分分析手册[M] 中国轻工业出版社, 1998
- [7] 宋占午, 王莱. 3,5-二硝基水杨酸测定还原糖含量的条件探讨[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 1997, 33(2): 52-55
- [8] Yoshiki, Y. and Haruyoshi, K. Purification and properties of wall-bound α -D-glucosidase from suspension-cultured sugarbeet cells. Okayama Daigaku Shigen Seibutsu Kagaku Kenkyusho Hokoku, 1993, 1(2): 158-166

(上接第 18 页)

从表中可看到, 该杆菌在经优化的培养基中培养产酶后, 可获得的酶活为 68.58 U/mL, 说明该优化培养基能大幅提高该杆菌的脂肪酶生成能力, 该优化方法是合理有效的。

3 结论

3.1 本试验是利用酶活单位为指标, 对某一特定微生物(杆菌)产脂肪酶的产酶条件进行了优化分析。结果表明, 通过试验对各影响因素进行合理配置可获得较高的产酶率。

3.2 本试验所选用的本实验室保存的杆菌的最佳产脂肪酶条件为: 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 0.5 g/L, 无机盐-组合 C (即 K_2HPO_4 6.25 g/L, KH_2PO_4 2.5 g/L), 初始 pH 值 5.5。以上结果是通过各个因素进行单因素分析试验后, 再组合进行正交分析后得到的。结果表明, 该杆菌脂肪酶产生菌接入经过优化后的液态培

养基中, 在 40 °C 恒温式摇床培养箱内培养 60 h, 可获得最高的脂肪酶酶活为 68.58 U/mL。

3.3 本试验无论是单因素的确定还是正交优化试验, 都是以酶活替代产酶率作为指标来衡量试验的取舍。这说明, 酶活单位的测定及计算在整个试验过程中是十分重要的。对于酶活测定的方法, 本试验采用传统的酸碱滴定法。其他的测定方法在本试验中未作讨论, 还需要进一步的研究和探讨。

参考文献

- [1] 刘书来. 脂肪酶催化的研究进展[J]. 发展论坛, 2003, 26 (4): 16-19
- [2] 彭立凤. 微生物脂肪酶的应用[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26 (3): 68-72
- [3] 高修功. 脂肪酶产生菌的选育及产酶条件的优化[J]. 微生物学报, 1998, 38(4): 313-317