

# 黑曲霉单宁酶高活性菌株的诱变选育\*

郭鲁宏 杨顺楷\*\*

(中国科学院成都生物研究所天然药物开放实验室 成都 610041)

**摘要:** 以黑曲霉 (*Aspergillus niger*) No.13 为出发菌株,经紫外线诱变处理,获得一株制备原生质体的起始菌,该菌株单宁酶活性比 No.13 提高 55%;并对其制备原生质体的条件进行了研究,在优化方案基础上,紫外诱变原生质体,诱变株经筛选,最后得到一株具有稳定遗传性的单宁酶高活性菌株,在摇瓶培养基中进行生物转化实验,连续传代 10 次,结果显示发酵液中没食子酸浓度始终维持在 22.8~23.9mg/mL 范围内,它的单宁酶活性(或生物转化能力)大约是菌株 No.13 的 2 倍。

**关键词:** 黑曲霉单宁酶,原生质体和紫外诱变,生物转化,五倍子,没食子酸

**中图分类号:** Q93-3    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654(2000)02-0105-04

## MUTATION BREEDING OF HIGH TANNASE ACTIVITY STRAINS FROM *ASPERGILLUS NIGER*

GUO Lu-Hong    YANG Shun-Kai

(Laboratory of Natural Material Medica, Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu 610041)

**Abstract:** As a original strain, *Aspergillus niger* No.13 was mutated by UV treatment. One strain was obtained

\* 国家自然科学基金及地奥基金资助课题

\*\* 通讯联系人

收稿日期:1998-12-10, 修回日期:1999-02-24

from mutants. It could act as beginning strain to produce protoplasts. Tannase activity of this strain increased by 55%. And its conditions of producing protoplasts were studied. Based on the optimal program, the protoplasts were mutated by UV. Finally, one strain which was with high tannase activity and stable genetic property was acquired from mutants by means of screening. The strain was inoculated in the shake flask media to make the biotransformation experiments. In the situation of ten times continuous transfer of culture, the result showed that the gallic acid concentration in the broth ranged from 22.8mg/mL to 23.9mg/mL. Its tannase activity (or ability of biotransformation) was about twice as many as that of strain No.13.

**Key words:** *Aspergillus niger* tannase, Protoplasts and UV mutation, Biotransformation, Chinese gallotannin, Gallic acid

单宁酶(EC3.1.1.20)主要由真菌中的曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)、根霉属(*Rhizopus*)、以及毛霉属(*Mucor*)产生<sup>[1]</sup>,尤其是产生于曲霉属的黑曲霉(*Aspergillus niger*)。单宁酶用途广泛,既可以水解五倍子单宁成没食子酸<sup>[2]</sup>,也可以把没食子酸和丙醇合成没食子酸丙酯<sup>[3]</sup>;它还能水解茶叶中的酯型儿茶素制备儿茶素单体<sup>[4]</sup>;另据报道,单宁酶还可作为食品添加剂和用于开发茶饮料等<sup>[5]</sup>。由于单宁酶的研究开发迄今为止并未引起人们应有的重视,目前有关筛选产酶菌株的报道较少,仅有的几篇也只局限于从天然源获得的产酶菌株<sup>[1,2,6]</sup>,酶活性较低,因此有必要对单宁酶产生菌进行诱变选育,以提高产酶水平。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

黑曲霉 No.13、No.17、No.43 由本实验室从天然源经富集分离、筛选得到。

### 1.2 培养基和培养条件

**1.2.1 摇瓶培养基:**由察氏培养基改变而成,即将原培养基中的蔗糖浓度由3%降低为1.5%,另加3%的五倍子单宁作为单宁酶的底物和诱导物。

**1.2.2 平板培养基:**上述液体培养基中加入4%的琼脂和0.004%的溴酚兰。

**1.2.3 培养条件:**250mL三角瓶装入50mL培养基,30℃,150~200r/min培养2d。

### 1.3 产物没食子酸的分析方法

**1.3.1 TLC法:**硅胶 GF<sub>254</sub> 铺成20×20cm的薄

层,展开剂为苯:异丁醇:醋酸=10:4:1(V/V),显色剂是碘蒸气。

**1.3.2 定量方法:**把薄层上只含没食子酸斑点的硅胶刮下,加入甲醇,离心,弃去硅胶,置气流下使甲醇挥发,然后加蒸馏水,标准品也作同样处理,在263nm下测其光密度值,数据经线性回归分析,配直线,计算产物浓度。根据发酵液中没食子酸浓度高低,评价单宁酶产生菌的酶活水平或生物转化能力。

### 1.4 紫外诱变

用无菌生理盐水洗下黑曲霉 No.13、No.17、No.43 的孢子,装入盛有玻璃珠的三角瓶中振荡1h,使孢子充分散开,然后用脱脂棉滤去菌丝,制成孢子悬液,并调整孢子浓度为 $1 \times 10^6$ 个/mL左右。在15W紫外灯下距离20cm处,搅拌照射3~4min,于红光下稀释涂平板,30℃培养箱中避光培养3d。

### 1.5 初筛方法

当黑曲霉在含有溴酚兰的平板培养基上生长时,五倍子单宁被分解为没食子酸,培养基颜色由紫色变为黄色,在菌落周围形成明显的变色圈,变色圈的颜色深浅和圈直径大小同该菌株产酶水平呈正相关,据此可估计试验菌单宁酶活性的高低。

### 1.6 原生质体的制备

将培养至对数期的菌液离心,菌丝体用生理盐水洗涤两次后,放入含有纤维素酶和蜗牛酶的混合酶液中,30℃,100r/min振荡酶解一定时间,用塞有脱脂棉的小漏斗滤去未酶解完的菌丝。滤液离心(2000r/min)10min,沉淀用

生理盐水悬浮,离心洗两次,再悬浮于生理盐水中制成原生质体悬液。

### 1.7 原生质体的紫外诱变

稀释原生质体悬液,使原生质体数达到 $1\sim 2\times 10^6$ 个/mL,在15W紫外灯下距离20cm处,轻轻搅拌照射2.5min,于红光下稀释,倒双层平板,30℃避光培养3d。

## 2 结果

### 2.1 原生质体诱变出发菌株的筛选

从诱变 No. 13、No. 17、No. 43 得到的后代

中,经初筛分别选出53株、31株和23株单宁酶活性较高的诱变菌株。接入摇瓶培养基中进行生物转化,培养2d后过滤,分析上清液中没食子酸的含量,结果获得6株产单宁酶活性较高的菌株,这6株菌与出发菌株的比较情况见表1。

由表1可看出,这6株菌中以No.13~13单宁酶活性最高,选No.13~13作为制备原生质体和进行原生质体诱变的出发菌株。

### 2.2 制备原生质体

2.2.1 培养时间对原生质体形成的影响:许多

表1 诱变菌株与原始出发菌株比较

菌株	No.13	No.13~11	No.13~13	No.13~30	No.17	No.17~20	No.17~35	No.43	No.43~13
发酵液中没食子酸含量									
酸含量 (mg/mL)	11.8	15.0	18.3	13.9	9.4	12.8	15.2	12.9	15.1
酶活性较出发菌株提高 (%)	/	27	55	17	/	35	61	/	17

研究表明,菌龄对原生质体的形成和释放有很大的影响,一般取处于对数生长期的细胞进行酶解。对菌株 No. 13~13 而言,30℃下培养40h,得到的原生质体数量最大,而培养时间少于20h时,无法收集菌丝和制备原生质体(图1)。

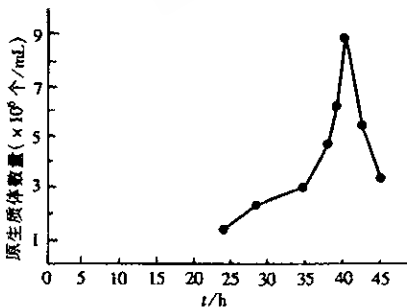


图1 培养时间对原生质体形成的影响

2.2.2 酶组分对原生质体形成的影响:在培养40h的菌丝体中加入不同种类的酶,制备原生质体(见表2)。从表中得出,使用0.5%纤维素酶和0.5%蜗牛酶酶解菌丝,可以得到大量的原生质体,单独用一种酶进行酶解,获得的原生质体数量明显减少。

表2 酶组分对原生质体形成的影响

酶种类	1%纤维素酶	1%蜗牛酶	0.5%纤维素酶+0.5%蜗牛酶
原生质体数量 ( $\times 10^6$ 个/mL)	2.51	3.74	9.03

2.2.3 酶解时间对原生质体形成的影响:在菌丝中加入纤维素酶和蜗牛酶进行破壁,每间隔1h取一次样,显微镜下计数原生质体数量。数据表明,酶解3h时原生质体形成数量最大,时间少于或超过3h,得到的原生质体数量降低(表3)。

表3 酶解时间对原生质体形成的影响

酶解时间(h)	1	2	3	4	5
原生质体数量 ( $\times 10^6$ 个/mL)	1.12	4.58	9.03	5.07	3.25

综合以上实验,破壁的优化条件为:No.13~13培养40h后,菌丝用含0.5%纤维素酶和0.5%蜗牛酶的混合酶液酶解3h,此时原生质体形成率为93.5%,再生率为7.1%。原生质体形成率和再生率计算方法分别参考文献[7]和[8]。

### 2.3 单宁酶高活性菌株的获得

对原生质体进行紫外诱变, 诱变株经平板初筛和摇瓶复筛, 最后得到一株单菌(No. 13~13~37), 其发酵液中没食子酸含量达23.9mg/mL, 酶活较出发菌株 No. 13~13 提高30.9%。

### 2.4 No. 13~13~37 菌株的遗传稳定性

将该菌株10次连续传代, 进行生物转化实验, 发酵液中的没食子酸含量始终不低于22.8mg/mL, 这表明该菌具有较稳定的遗传性。

## 3 讨论

由于原生质体诱变不存在遗传标记问题, 其基本实验方法也比较成熟, 所以目前已成为一种有效的育种手段<sup>[9]</sup>。但是进行原生质体诱变, 工作量大, 花费时间长, 为了提高工作效率, 我们特地设计了一种初筛模式。黑曲霉在平板培养基上生长时, 五倍子单宁被分解成没食子酸, 培养基的pH值由4.5左右降为3左右, 这与溴酚兰的变色范围基本一致, 因此培养基由紫色变为黄色, 可初步估计黑曲霉菌株的产酶能力, 而且如此低量的溴酚兰(0.004%)并未对黑曲霉的生长及单宁酶活性造成不利影响, 这说明我们设计的初筛方法是行之有效的, 具有简

便、快速、准确的特点。

总之, 经由富集分离、紫外诱变、原生质体制备及诱变等一系列方法, 选育出了黑曲霉单宁酶高活性菌株, 它的生物转化能力较原出发菌株提高约1倍, 这对我国特有的生物资源——五倍子单宁的酶法加工具有重要的应用价值。

## 参 考 文 献

- [1] Ikeda Y, Takahashi E, Yokogawa K *et al.* J Ferment Technol, 1972, 50:361~370.
- [2] 王蔚文, 李务强. 工业微生物, 1990, 20: 1~5.
- [3] Weetall H. Appl Biochem Biotechnol, 1985, 11:25~28.
- [4] 程琦, 程启坤, 李名君. 生物化学杂志, 1996, 12(4): 423~426.
- [5] Agbo F, Spradlin J E. U. S. US5445836. 1995.
- [6] 郭鲁宏, 杨顺楷. 应用与环境生物学报, 1998, 4(4): 386~389.
- [7] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学. 福州: 福建科学技术出版社, 1991, 231~235.
- [8] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1994, 476~477.
- [9] 朱宝成, 王俊刚, 成亚利等. 微生物学通报, 1994, 21(1): 15~18.