

木聚糖酶高产菌株的诱变*

陈红歌** 刘新育 张世敏 宋安东 贾新成

(河南农业大学生物技术与食品科学学院 郑州 450002)

摘要: 出发菌株 *Aspergillus niger* M1 经过紫外线诱变得一株木聚糖酶活力提高 30% 的突变株 *A. niger* J506。木聚糖酶谱带检测发现, 突变株成熟发酵液中有 3 种类型的木聚糖酶, 而出发菌株中只有两种。经过正交试验得出突变株产酶的最佳发酵条件为: 主碳源浓度 4%、麸皮与玉米芯的比例为 5:5、葡萄糖浓度 0.1%、草酸铵浓度 2.0%, 培养基初始 pH 为 5.0, 250 mL 三角瓶的装液量为 100 mL。

关键词: 木聚糖酶, 诱变

中图分类号: Q936, TQ925.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 06-0033-04

Mutation of the Strain Producing Higher Xylanase*

CHEN Hong-Ge** LIU Xin-Yu ZHANG Shi-Min SONG An-Dong JIA Xin-Cheng

(The college of Biotechnology and Food Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Abstract: *A. niger* M1, the initial strain, was treated by UV and a mutant with 30% higher xylanase activity was obtained. Zymogram for detecting xylanase showed there are three different xylanases in the mutant mature culture, while two xylanases in initial strain. After orthogonal experiment, the optimum fermentation conditions of the mutant were obtained as follows: concentration of the major carbon resource 4%, ratio between bran and corn cob 5:5, concentration of glucose 0.1%, concentration of ammonium oxalate as supplemental nitrogen resource 2.0%, the initial pH of liquid medium 5.0, 100mL/250mL flask.

Key words: Xylanase, Mutation

地球上植物性材料主要由纤维素、半纤维素和木质素 3 种成分组成, 其中半纤维素(主要是木聚糖)的含量可达 30% ~ 35%, 尤其在禾本科植物中含量最高^[1]。木聚糖是由木糖分子以 β -1, 4 糖苷键连接而成的多聚体, 外连阿拉伯糖和葡萄糖醛酸构成的侧链基团。参与木聚糖骨架降解的酶系很复杂, 如内切 β -1, 4-木聚糖酶 (EC 3.2.1.8)、内切 β -1, 3-木聚糖酶^[2,3] (EC 3.2.1.32)、内切 α -1, 3-木聚糖酶、外切 β -木糖苷酶^[4] (EC 3.2.1.37) 等。

木聚糖酶主要应用于纸浆漂白、饲料添加剂、功能性低聚木糖生产、果汁澄清、生产溶解性纤维素浆等, 另外用木聚糖酶来处理麦类淀粉原料中的半纤维素, 可使淀粉分子最大程度地释放出来, 降低粘性, 提高淀粉的利用率^[5]。

由于木聚糖酶在实际生产中有着越来越广泛的用途, 因而人们对木聚糖酶高产菌株的需求也越来越迫切, 但目前限制木聚糖酶产业化生产的主要因素仍然是菌株的酶活力问题, 本论文通过常规方法对黑曲霉 (*A. niger*) M1 进行诱变, 筛选出一株酶活力较高、遗传稳定的木聚糖酶产生菌。

* 河南省科技厅科技攻关资助项目 (No. 0224010005)

** 联系人 E-mail: honggeyz@163.com

收稿日期: 2004-01-05, 修回日期: 2004-03-15

1 材料与amp;方法

1.1 菌株

出发菌株 *A. niger* M1 由河南农业大学微生物教研室分离并保存。

1.2 试剂

桦木木聚糖 (Birchwood xylan)、亮蓝 (Rezamol Brilliant Blue, RBB) 购自 Sigma 公司, 其它化学试剂均为国产分析纯。玉米芯半纤维素制备方法见参考文献 [6]。

1.3 主要仪器

紫外分光光度计 7230G 型, 由上海精密科学仪器厂生产; DYY-111 28A 型电泳系列由北京六一仪器厂生产; 凝胶成像分析系统为 VILBER LOURMAT 产品。

1.4 方法

1.4.1 培养基: 斜面培养基: PDA 培养基; 初筛培养基: 采用双层平板培养基, 下层是灭菌的 1.5% 水琼脂, 上层为灭菌的选择性培养基 (g/100 mL): 玉米芯半纤维素 1.0, NaNO₃ 1.0, MgSO₄ 0.5, FeSO₄ 0.5, 去氧胆酸钠 0.02。先将水琼脂倒入培养皿中, 完全凝固后再倒上层选择性培养基。复筛液体培养基 (g/100 mL): 玉米芯 2.0, 麸皮 2.0, 葡萄糖 0.2, 蛋白胨 1.0, Tween-80 0.15 mL, CaCO₃ 0.6, 初始 pH 为 6.0, 250 mL 三角瓶的装液量为 50 mL。

1.4.2 紫外线诱变: 选择致死率在 90% ~ 99% 的紫外线剂量, 参照文献 [8] 进行。

1.4.3 初筛与复筛: 将紫外线处理过的孢子悬液在红光下稀释成一定的浓度梯度, 涂布到初筛固体培养基上, 30℃ 避光培养 4 d 后, 随机挑取有透明圈的菌落转接到 PDA 斜面上扩大培养, 然后接入摇瓶发酵进行复筛。

1.4.4 木聚糖酶活力测定: 见文献 [7]。酶活定义: 在上述条件下, 每分钟产生 1 μmol 木糖所需的酶量为一个酶活力单位 (IU)。

1.4.5 蛋白电泳: 采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)^[7], 分离胶浓度为 8.3%, 浓缩胶浓度为 3%。

1.4.6 木聚糖酶酶谱检测: RBB-木聚糖琼脂板的制备以及酶谱检测见文献 [7]。

2 结果与分析

2.1 紫外线诱变

A. niger M1 单孢子悬液经紫外线照射 3 min, 涂布到初筛选择培养基上, 30℃ 培养 4 d 后, 从培养基上随机挑选有透明圈的黑曲霉菌落, 转接斜面后, 接入产酶液体培养基中发酵 84 h, 测定木聚糖酶的活力。结果筛选到一株木聚糖酶活力比较高的突变株 J506, 在以上产酶条件下该菌株木聚糖酶活力达到 326 IU/mL, 而出发菌株在相同的条件下酶活力为 250 IU/mL, 突变株比出发菌株酶活力提高了约 30%。

表 1 突变株 J506 的遗传稳定性			
传代次数	酶活 (IU/mL)	传代次数	酶活 (IU/mL)
1	326	6	325
2	338	7	328
3	316	8	322
4	320	9	319
5	310	10	320

2.2 突变株 J506 的遗传稳定性

将突变株 *A. niger* J506 的孢子在 PDA 斜面上连续转接 10 代后, 每代均接入产酶液体培养基中发酵, 测定木聚糖酶的活力, 结果如表 1。可以看出 *A. niger* J506

产生木聚糖酶具有较好的遗传稳定性，是一株产酶能力稳定的突变株。

2.3 突变株与出发菌株蛋白谱带与木聚糖酶谱带的比较

将突变株与出发菌株分别接入液体培养中发酵 36、48、60、72 h 后，将粗酶液按相同的上样量进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)，蛋白染色 (图 1) 发现突变株和出发菌株的蛋白谱带明显不同，其中最显著的差别是出发菌株在 36 h 时产生的一种主要蛋白质在 48 h 及以后不再出现，而同一蛋白质在突变株中虽然开始出现的量少于出发菌株，但随着发酵时间的延长，该蛋白逐渐增多，直到 72 h 达到最大的量，这从蛋白质水平上证明突变株 J506 确实是 *A. niger* M1 在遗传物质上发生改变的菌株。

又将突变株与出发菌株发酵 72 h 的粗酶液进行 PAGE，电泳结束后，将凝胶纵向切成两片，一片胶进行蛋白染色，另一片胶进行木聚糖酶酶谱检测，结果如图 2。从酶谱中的透明带可知，出发菌株粗酶液中有两型的木聚糖酶 Xylanase I 和 Xylanase II，而突变株粗酶液中有三型木聚糖酶 Xylanase I、Xylanase II 和 Xylanase III，而且诱变新增的蛋白质恰是木聚糖酶 Xylanase III，该蛋白表达量大，所以导致突变株粗酶液木聚糖酶活力比出发菌株高。

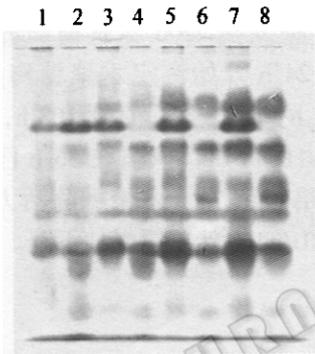


图 1 不同发酵时间突变株与出发菌株的蛋白质带

1、3、5、7 突变株在 36、48、60、72h 的蛋白质带，
2、4、6、8 出发菌株在 36、48、60、72h 的蛋白质带

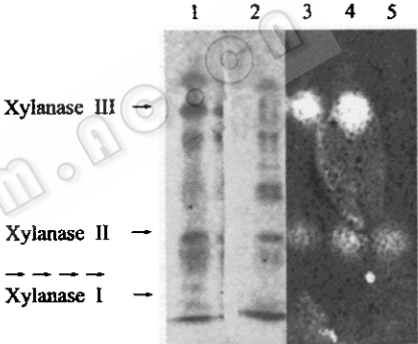


图 2 突变株与出发菌株在 72h 的蛋白质带和木聚糖酶酶谱

1 突变株蛋白质带，2 出发菌株蛋白质带，3、4 突变株的木聚糖酶酶谱，5 出发菌株的木聚糖酶酶谱

2.4 突变株 J506 产酶条件的优化

2.4.1 主碳源总浓度对产酶的影响：在产酶液体培养基中以麸皮和玉米芯作为主碳源，质量比例为 1:1，二者的浓度总和对产酶的影响如表 2。结果发现，当主碳源浓度在 4% 时，木聚糖酶活力达到最大。

2.4.2 正交试验设计：选择麸皮与玉米芯的比例、辅加碳源的浓度、辅加氮源的浓度、培养基初始 pH 和装液量五个因子的 3 个水平进行正交试验，试验的结果如表 3、4。

表 2 主碳源总浓度对产酶的影响			
总浓度 (%)	酶活 (IU/mL)	总浓度 (%)	酶活 (IU/mL)
2	265	6	315
3	298	7	265
4	336	8	203
5	316	9	156

表 3 因素水平表					
水平	葡萄糖 (%)	草酸铵 (%)	pH 值	装液量 (mL)	麸皮:玉米芯
	A	B	C	D	E
1	0.025	1.5	5	25	5:5
2	0.05	2.0	6	50	4:6
3	0.1	2.5	7	100	3:7

表 4 正交试验结果分析

方差来源	偏差平方和	自由度	方差	F 值	F α	显著性
A	1.18516	2	0.59258	20.39	F _{0.05(2,4)} = 6.94	* *
B	0.26272	2	0.13136	4.52	F _{0.05(4,4)} = 6.39	
A × B	1.53224	4	0.38306	13.1817	F _{0.05(8,4)} = 6.04	*
C	8.2318	2	4.1159	41.635	F _{0.01(2,4)} = 18	* *
D	7.9104	2	3.9552	136.1	F _{0.01(4,4)} = 15	* *
E	8.57704	2	4.28852	147.57		* *
A × B × C	0.7087	8	0.08858	3.05		
Se	0.11624	4	0.02906			

由表可见，因素 A、C、D、E 均高度显著，A × B 显著，各因素及交互作用对试验指标影响的主次顺序为 E > C > D > A > A × B > B > A × B × C。得出最佳的工艺条件为：主碳源浓度 4 %、麸皮与玉米芯的比例为 5：5、辅加碳源葡萄糖的浓度是 0.1%、辅加氮源草酸铵的浓度是 2.0%，培养基初始 pH 为 5.0，250 mL 三角瓶的装液量为 100 mL。

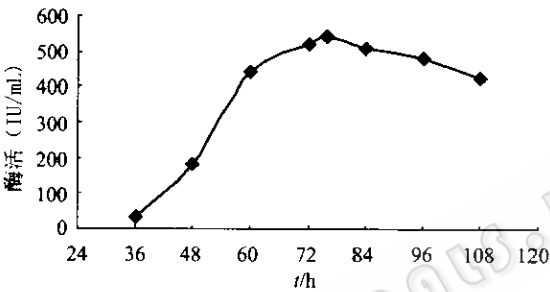


图 3 突变株 J506 木聚糖酶的产酶历程

2.4.3 突变株 J506 木聚糖酶的产酶时程：从 24 h 开始测定木聚糖酶的活力，每隔 12 h 测定一次，直到 108 h，结果如图 3。由图可知，该菌在 36 h 已经开始产酶，培养至 76 h 木聚糖酶活力达到最高 544 IU/mL，然后缓慢地下降。

3 讨论

通过紫外线诱变木聚糖酶产生菌黑曲霉 M1，得到酶活力提高 30% 的突变株，经蛋白和木聚糖酶酶谱检测，该突变株在成熟发酵液中新增加的蛋白带恰是木聚糖酶，而且新增蛋白的表达量很大，因而提高了突变株发酵液的木聚糖酶活力，表明该诱变工作是非常有效的。从突变株和出发菌株不同发酵时间蛋白谱带的比较看，突变株成熟发酵液中新增加的蛋白带在出发菌株发酵前期（36 h）同样也有产生，可能是随后胞内产生可专一降解这一蛋白的蛋白酶因子，使得出发菌株 48 h 后就不再有该蛋白的存在，而经诱变的突变株因不表达该蛋白酶而使这一蛋白质得以保存，也可能是诱变使突变株负责新增木聚糖酶蛋白表达的负控制调节蛋白（可能在出发菌株中存在）不再合成，因而使得这一蛋白能够过量表达，总之其分子机制也是一个值得深入探讨的问题。

参考文献

[1] 杨淑惠. 植物纤维化学 (第二版). 北京: 科学出版社, 2001.6, 214, 228 ~ 229.
[2] Wen P C, Masaru M, Tsuneo Y. Agric Biol Chem, 1986, 50 (5): 1183 ~ 1194.
[3] Toshiyoshi A. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63 (11): 2017 ~ 2019.
[4] Lin L L, Tomson J A. FEMS Microbiol Lett, 1991, 84: 197 ~ 204.
[5] Walsh D J, Bergquist P L. Appl Environ Microbiol, 1997, 63 (8): 3297 ~ 3300.
[6] 北京大学制药厂. 微生物和酶学基本知识. 北京: 科学出版社, 1971.201.
[7] 陈红歌, 朱 静, 梁改芹, 等. 菌物系统, 2000, 19 (1): 111 ~ 116.
[8] 陈红歌, 苗雪霞, 贾新成, 等. 微生物学通报, 1997, 24 (5): 272 ~ 274.