

# 原生质体诱变选育乳糖酶高产菌株\*

杜海英 于宏伟 韩军 李宁 贾英民\*\*

(河北农业大学食品科技学院 保定 071001)

**摘要:** 采用紫外线诱变和<sup>60</sup>Co-γ射线协同诱变的方法,对出发菌株 Uco-3 的原生质体进行诱变处理,通过正突变率与诱变剂量的相互关系,确定最佳诱变剂量。采用 4 min 的紫外线照射和剂量为 500 Gy 的 γ 射线对黑曲霉 Uco-3 的原生质体进行诱变,获得一株产高温乳糖酶的高产突变株,突变株产乳糖酶能力显著提高,产酶活力达 44.37 U/mL,是出发菌株 Uco-3 的 2.73 倍。

**关键词:** 黑曲霉,原生质体,乳糖酶,诱变育种

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-0048-04

## Breeding of High-yielding β-galactosidase Strains from Protoplast of *Aspergillus niger*\*

DU Hai-Ying YU Hong-Wei HAN Jun LI Ning JIA Ying-Min\*\*

(Institute of Food Science and Technology, Agricultural University of HeBei, Baoding 071001)

**Abstract:** The protoplasts of original *Aspergillus niger* strain Uco-3 were treated with the cooperation of UV and γ-ray to obtain the high-yielding strain producing the thermostable β-galactosidase. Under the optimum conditions of formation and regeneration protoplasts were prepared. According to the interaction of positive mutation rate and radiation dose, the optimum condition was determined. The optimum dose of UV was 4 minutes and the optimum dose of γ-ray was 500 Gy. After mutagenetic treatment of protoplasts and selection from a lot of mutants, a mutant DL116 producing the thermostable β-galactosidase was obtained. The β-galactosidase activity of DL116 was increased from 16.27 U/mL to 44.37 U/mL, which was higher than that of strain Uco-3.

**Key words:** *Aspergillus niger*, Protoplast, Lactase, Induced breeding

乳糖酶 (Lactase, EC 3.2.1.23), 其系统名为 β-D-半乳糖苷半乳糖水解酶 (β-D-galactoside galactohydase), 或简称 β-半乳糖苷酶 (β-galactosidase)<sup>[1]</sup>。该酶可用于降解乳糖变为半乳糖和葡萄糖,亦具有半乳糖苷的转移作用<sup>[2]</sup>。

目前用于牛奶中乳糖分解的商品化乳糖酶主要是来源于酵母菌的中性乳糖酶<sup>[3]</sup>,但这类酶的作用温度低(40℃下较稳定),生产中容易污染杂菌,且生产周期长,生产成本低。高温乳糖酶在工业应用中具有明显的优点,如水解温度高,生产中能够有效防止杂菌污染,酶反应速度快,酶用量少,反应时间短等。但是,目前国内外报道的产高温乳糖酶的菌株通常酶活力都比较低<sup>[3]</sup>。为此,本试验在已有的产高温乳糖酶的黑曲霉菌株 Uco-3 的基础上,以其原生质体为出发材料,利用紫外线和 γ 射线对其进行诱变,选育高温乳糖酶高产菌株。

\* 河北省“十五”农副产品加工重大科技专项课题“酶工程技术在农产品深加工中应用研究资助项目”(No. 03220173D)

\*\* 通讯作者 Tel: 0312-7528186, E-mail: ymjia@hebau.edu.cn

收稿日期: 2006-01-23, 修回日期: 2006-03-02

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 试验菌种：黑曲霉 (*Aspergillus niger*) Uco-3：由河北农业大学食品科技学院酶工程实验室保存。

1.1.2 主要培养基：(1) 菌丝体生长培养基：酵母膏 10 g、蛋白胨 20 g、葡萄糖 20 g、H<sub>2</sub>O 定容至 1,000 mL，自然 pH，1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 15 min。(2) 原生质体再生培养基：FeSO<sub>4</sub> 0.01 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g、NaNO<sub>3</sub> 3 g、MgSO<sub>4</sub> 0.5 g、乳糖 20 g、KCl 45.23 g、H<sub>2</sub>O 定容至 1,000 mL，pH 5.5，1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 15 min。(3) 初筛培养基：乳糖 20 g、蛋白胨 1 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.4 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g、CaCl<sub>2</sub> 0.3 g、MgSO<sub>4</sub> 0.3 g、Tween-80 2 g、FeSO<sub>4</sub> 0.005 g、MnSO<sub>4</sub> 0.0016 g、ZnSO<sub>4</sub> 0.0014 g、CoCl<sub>2</sub> 0.002 g、H<sub>2</sub>O 定容至 1,000 mL，pH 5.5，1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 10 min 冷却后，取 900 mL 加入 100 mL 微滤除菌的 10% (w/w) ONPG (邻硝基-苯基-β-D-半乳糖苷) 母液，混匀，置于冰箱冷藏备用。(4) 摇瓶复筛培养基：果胶 10 g、豆粕粉 20 g、玉米浆 10 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 g、H<sub>2</sub>O 定容至 1,000 mL，pH 5.5。

1.1.3 主要试剂：纤维素酶、蜗牛酶、ONPG、乳糖、果胶、玉米浆、豆粕粉。

### 1.2 试验方法

1.2.1 原生质体制备与再生<sup>[4-9]</sup>：将液体摇瓶法培养 14 h 的菌丝体过滤，生理盐水洗涤 2~3 次，加入微滤除菌的蜗牛酶，纤维素酶混合酶液。30℃ 水浴酶解 4 h，用血球计数板测定原生质体形成数。以无菌双层镜头纸滤去未酶解的菌丝。滤液 2,500 r/min、10 min 离心洗涤两次，沉淀用高渗缓冲液悬浮，测定纯化后原生质体数。系列稀释后取 0.1 mL 于再生培养基平板，同时将原生质体悬液用无菌水稀释，于普通培养基平板作为对照。30℃ 培养 2~3 d 后计算其再生率。

$$\text{再生率}(\%) = 10 \times N \times (B-A) / C \times 100$$

A 为普通培养基平板上菌落数，B 为再生培养基平板上菌落数，C 为纯化后每毫升原生质体数，N 为稀释倍数。

1.2.2 原生质体诱变处理：(1) 紫外线诱变<sup>[8-10]</sup>：取原生质体悬液 5 mL (10<sup>6</sup> 个/mL) 于无菌的 6 cm 平皿内，在磁力搅拌作用下距 18 W 紫外灯 30 cm 处进行不同时间的照射处理，对每个处理进行系列稀释，取 0.1 mL 涂布再生培养基平板，30℃ 避光培养 2~3 d。以上操作均在红光下进行。(2) <sup>60</sup>Co-γ 射线诱变<sup>[10,11]</sup>：取原生质体悬液 5 mL (10<sup>6</sup> 个/mL) 于无菌试管中，按照不同的辐射剂量进行照射处理，对每个处理进行系列稀释，取 0.1 mL 稀释液涂布再生培养基平板，30℃ 培养 2~3 d；(3) 致死率计算方法：致死率 (%) = (D-E) / D × 100，式中：D 为再生培养基平板上菌落数，E 为诱变处理后再生培养基平板上菌落数。

1.2.3 筛选方法：(1) 产酶菌株的初筛<sup>[12,13]</sup>：将再生培养基平板上长出的单菌落转接至初筛培养基，30℃ 培养 3 d。向初筛小管中加入灭菌的 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 100 μL，静置数分钟；挑取颜色较黄的小管，测定其吸光值。按其吸光值大小进行排列、编号。依次转接保存斜面，30℃ 培养至孢子成熟，4℃ 保藏。(2) 产酶菌株的复筛：将初筛菌株转接斜面活化，待孢子成熟后接种复筛培养基，进行摇瓶发酵，接种量 10<sup>4</sup> 个/mL。发酵条件为：30℃，140 r/min，装液量 30 mL/250 mL，培养 4 d 后测定酶活。

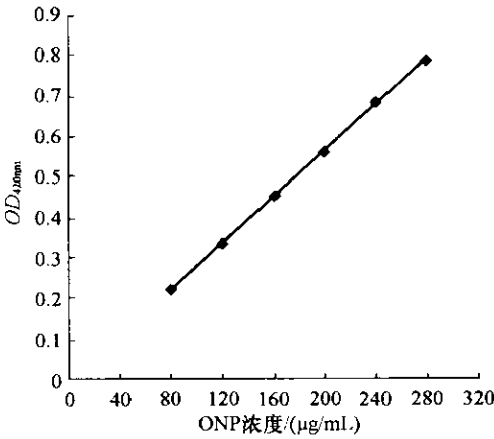


图1 ONP校正曲线

1.2.4 乳糖酶活力的测定: 0.6% ONPG 溶液 0.7 mL, 55℃水浴预热 5 min, 加入适当稀释的待测酶液 0.1 mL, 继续保温 10 min 取出, 加入 0.8 mL 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液显色, 定容至 8 mL, 420 nm 处比色。以加热灭活的待测液同样处理作为空白<sup>[12,13]</sup>。

在上述条件下, 每分钟水解产生 1 μmol ONP (邻硝基苯) 的量定义为 1 个酶活力单位 (U)。用已知浓度的 ONP 溶液做标准曲线, 见图 1。根据 ONP 的浓度 C 对应的 OD 值, 利用最小二乘法建立回归方程:  $C = 353.64 \times OD + 0.6046$  相关系数  $R =$

0.9997;

酶活力计算公式为:  $E = 2.062 \times OD \times N$  (U/mL)

2.062; 当 OD 值为 1 时, 每分钟产生 2.062 μmol 的 ONP, N: 酶液的稀释倍数

## 2 结果与分析

### 2.1 原生质体形成率和再生率

菌丝体 30℃ 培养 14 h 后, 用蜗牛酶和纤维素酶混合酶液 30℃ 酶解 4 h, 原生质体形成数为  $2.2 \times 10^6$  个/mL, 再生率为 2.04%。

### 2.2 不同剂量的紫外线照射对原生质体的诱变效果

使用功率为 18 W 的紫外灯管, 照射距离为 30 cm, 照射不同时间的原生质体悬液系列稀释后涂布于再生培养基平板, 30℃ 培养 2~3 d, 测定不同剂量的致死率。然后, 将经不同剂量紫外线照射的再生菌株转至初筛培养基中, 30℃ 培养 3 d 后测定其吸光值, 以出发菌株为对照, 测定不同致死剂量的诱变效果, 结果见表 1。由表 1 可知, 紫外线照射 4 min, 致死率为 81.8% 时诱变效果最好, 正突变率为 15.2%。

表 1 紫外线处理后再生菌株的正突变率

照射时间 (min)	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
致死率 (%)	22.7	47.0	52.3	69.1	81.8	90.1
正突变率 (%)	9.5	10.9	11.3	11.3	15.2	10.0

### 2.3 不同剂量的<sup>60</sup>Co-γ射线照射对原生质体的诱变效果

按照不同的辐射剂量对原生质体进行照射处理, 对每个处理进行系列稀释后涂布再生培养基平板, 30℃ 培养 2~3 d, 测定不同辐射剂量时的致死率。并对不同辐射剂量的诱变效果进行考察, 结果见表 2。由表 2 可知, <sup>60</sup>Co-γ 射线辐射剂量为 500 Gy, 致死率为 71.5% 时诱变效果最好, 正突变率为 28.2%。

表 2 <sup>60</sup>Co-γ 射线处理后再生菌株的正突变率

辐射剂量 (Gy)	250	500	750	1,000	1,250	1,500
致死率 (%)	51.2	71.5	92.2	94.2	98.1	99.9
正突变率 (%)	25.1	28.2	23.5	15.4	13.2	8.9

## 2.4 诱变选育

出发菌株 Uco-3 的原生质体经诱变剂处理后,适当稀释涂布于再生培养基上,30℃ 培养 2 d 后,将长出的单菌落转接初筛培养基进行筛选。将初筛菌株接种复筛培养基,进行摇瓶发酵,选出高产突变菌株,连续选优纯化后,作为下一步诱变的出发菌株。诱变谱系及酶活提高情况如下:

	Uco-3	$\xrightarrow{\text{UV}}$	D-20	$\xrightarrow{\gamma\text{射线}}$	DL17	$\xrightarrow{\gamma\text{射线}}$	DL116	
酶活 (U/mL)	16.27		21.25		37.67		44.37	

## 2.5 目的菌株遗传稳定性测定

为了观察乳糖酶突变株 DL116 的遗传稳定性,进行了菌种传代产酶性能试验。将突变株 DL116 连续传代 10 次后制备孢子悬液,涂布察氏培养基平板,30℃ 培养 2 d 后随机挑取 10 个单菌落,分离纯化,比较不同单菌落的乳糖酶活力,结果见表 3。

表 3 突变株 DL116 的遗传稳定性

不同单菌落	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
酶活 (U/mL)	44.26	47.49	43.01	44.99	43.20	43.41	42.55	44.16	44.19	44.93

突变株 DL116 经传代 10 次后,制备孢子悬液,涂布于察氏培养基平板,30℃ 培养 2 d 后随机挑取 10 个单菌落,其产乳糖酶活力与传代前菌株相比无显著差异,表明突变株 DL116 遗传性质稳定。

## 3 讨论

本实验的出发菌株 Uco-3 是经过对已有的产高温乳糖酶的黑曲霉野生菌株的孢子进行紫外线与<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线多次诱变筛选获得的,孢子对诱变剂较为迟钝,获得的大部分是负变菌株,且长期使用同一种诱变剂处理,孢子对此诱变条件会产生一定抗性,而原生质体一般由对数生长期细胞制得,活力较强,对环境和诱变剂较为敏感,破壁和再生过程中又淘汰了大量弱势菌株,能再生的菌株不论初级代谢与次级代谢过程均较活跃,正变菌株比例大。为了进一步提高该菌株的生产性能,本试验以原生质体为诱变出发材料,将紫外线和<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线结合使用,诱变效果较好。酶活力在出发菌株基础上提高了 1.73 倍,突变株遗传性质稳定。结果表明紫外线和<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线的协同作用对黑曲霉 Uco-3 的原生质体诱变效果较好,突变株乳糖酶活力得到显著提高。

## 参 考 文 献

- [1] 张树政. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社, 1989.
- [2] 王 敏, 檀建新, 张 伟, 等. 河北农业大学学报, 2003, 26: 167 ~ 169.
- [3] 陈 卫, 张 灏, 丁霄霖. 中国乳品工业, 2002, 30: 15 ~ 18.
- [4] Nohmi T, Ichishima E. Agric Biol Chem, 1982, 46: 809 ~ 810.
- [5] Hing G T, Normansell I D, Peberdy J F. Gen Microbiol, 1989, 135: 2289 ~ 2297.
- [6] 王建华, 赵学慧. 微生物学杂志, 2004, 11: 15 ~ 17.
- [7] 郝 博. 生物学杂志, 1997, 4: 18 ~ 20.
- [8] 彭益强, 贺淹才, 全成恒, 等. 微生物学杂志, 2002, 9: 7 ~ 11.
- [9] 杨 谦, 孙冬梅, 张 晶. 微生物学通报, 2005, 32 (4): 62 ~ 67.
- [10] 付艳平, 王明祖, 姜道宏. 华中农业大学学报, 1998, 17: 20 ~ 23.
- [11] 李 平, 苑晓春. 菌物系统, 2000, 19: 117 ~ 121.
- [12] Itoh T, Suzuki M, Adachi S. Agric Biol Chem, 1982, 46: 899 ~ 901.
- [13] 李 宁, 贾英民, 韩 军. 河北农业大学学报, 2005, 28: 64 ~ 66.