

植酸酶高产菌株的诱变选育

陈红歌 苗雪霞 张世敏 贾新成

(河南农业大学生物工程学院 郑州 450002)

摘要 以黑曲霉 MAO21 为出发菌株,经紫外线、亚硝基胍单独处理和复合处理,获得一株植酸酶高产菌株 UN-12-10。该菌株具有稳定的遗传性能,在经过优化的摇瓶培养基上发酵 108h,其植酸酶活力达到 2950~3015u/ml,是原始出发菌株的 3.6 倍。

关键词 植酸酶,黑曲霉,诱变育种

植酸(肌醇六磷酸)及其盐类是植物中磷的主要贮存形式^[1],作为人和单胃动物食物中的植酸具有强烈的抗营养作用^[6,7]。这是因为植酸常与人和动物所必需的矿质元素 Ca、Mg、Zn、Fe 等以及蛋白质形成复合物,降低了矿质元素和蛋白质的吸收利用率。因此,人们总希望把植酸从食物或饲料中除去。

植酸酶(EC.3.1.3.8,肌醇六磷酸盐磷酸水解酶)能将植酸及其盐类水解为无机磷和肌醇五磷酸盐-肌醇单磷酸盐。大量实验表明在动物饲料中添加植酸酶可以提高饲料中有效磷及蛋白质的含量,提高矿质元素和蛋白质的利用率,同时也降低了残留磷的排出量,减少环境污染。因此,在动物饲料中添加植酸酶成为解除植酸抗营养作用的有效途径。由于植酸酶及产酶菌株的研究起步较晚,目前已有报道的产酶菌株产酶水平都比较低,因此有必要对植酸酶产生菌进行多种方法的改造以期获得高产植酸酶菌株。

1 材料和方法

1.1 出发菌株

黑曲霉 MAO21 (*Aspergillus niger* MAO21),本教研室保存菌种。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基: PDA 培养基。

1.2.2 平板培养基(%): 葡萄糖 1.5, MgSO₄ ·

7H₂O 0.05, 植酸钙 0.5, KCl 0.05, Mn-SO₄ · 2H₂O 0.001, NH₄NO₃ 0.5, FeSO₄ · 7H₂O 0.001, 琼脂 2.0, pH 值 5.5。

1.2.3 摇瓶培养基(%): 葡萄糖 3.0, 玉米淀粉 8.0, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, FeSO₄ · 7H₂O 0.01, KCl 0.05, K₂HPO₄ 0.00017, NaNO₃ 0.86, α-淀粉酶 3 单位/克淀粉(60℃、pH6.0 条件下作用 1h 液化 1 克可溶性淀粉的酶量为 1 个酶活单位。本实验 α-淀粉酶随灭菌过程处理), pH 值自然。

以上培养基灭菌均为 1×10^5 Pa。

1.3 主要试剂

亚硝基胍(Fluka 公司产品);植酸钠(测酶活的底物, Sigma 公司产品);植酸钙(自制,制备方法参阅文献[4,10])。

1.4 培养条件

斜面菌种与平板菌落培养为 28℃, 3 d; 摇瓶培养条件为: 250ml 三角瓶装液量 50ml, 接种两环孢子, 于 30℃, 150r/min 旋转式摇床上培养 108h。

1.5 诱变方法

斜面菌种 → 孢子悬液 → 计数并调整孢子浓度 → 诱变剂处理 → 稀释涂植酸钙平板 → 挑取透明圈大的菌落 → 摇瓶初筛 → 复筛 → 传代试验。

1.5.1 孢子悬液制备: 用无菌生理盐水洗下斜

面孢子, 倒入盛有玻璃珠的三角瓶中, 28℃振荡30min, 然后用脱脂棉滤去菌丝片段, 血球计数板计数并调整孢子浓度为 $1\sim 5 \times 10^6$ 个/ml。

1.5.2 紫外线诱变处理: 15W紫外灯, 距离28cm, 搅拌照射5min, 红光下涂平板后避光培养。

1.5.3 亚硝基胍诱变处理: 称取一定量的亚硝基胍, 先溶于少量助溶剂甲酰胺中, 再用pH值为6.0的HAc-NaAc缓冲液定容, 将亚硝基胍溶液加入到孢子悬液(也用pH6.0的HAc-NaAc缓冲液制备)中, 使亚硝基胍的最终浓度为 $500\mu\text{g}/\text{ml}$, 作用pH为6.0, 28℃摇床处理60min, 大量稀释以中止诱变作用。

1.5.4 紫外线、亚硝基胍复合处理: 孢子悬液经紫外线照射4min后, 保持黑暗3h, 然后倒入亚硝基胍溶液, 使亚硝基胍最终浓度为 $500\mu\text{g}/\text{ml}$, 28℃振荡处理60min, 大量稀释以中止反应。

1.6 选育方法

由于平板培养基以不溶性植酸钙为唯一磷源, 这就使得平板呈现白色混浊。当经诱变剂处理的孢子悬液涂于平板后, 黑曲霉产生的植酸酶使菌落周围出现明显的透明圈。挑取透明圈直径与菌落直径比值大的菌落, 每轮诱变均依此选出50~80个菌落接入斜面, 然后进行摇瓶初筛和复筛, 选出酶活高者进行下一轮诱变。

1.7 酶活力测定方法

采用Harland^[8]以及Tausky^[9]的微量比色法定磷, 再根据磷浓度计算活力。

酶活力单位: 在55℃、pH值为4.6的HAc-NaAc缓冲液中水解植酸盐每分钟释放1nmol无机磷的酶量为1个酶活力单位。

2 结果与分析

2.1 诱变谱系



2.2 各轮诱变产酶水平比较

在统一摇瓶发酵条件下, 将出发菌株与每一轮诱变所得高产菌株进行比较, 结果如表1。

表1 选育过程各代菌株的产酶水平

菌株	酶活(u/ml)	相对酶活
SO ₄	824	100%
U-7	942	114%
N-52	1258	153%
UN-12	1878	228%
UN-12-10	1895	230%

2.3 UN-12-10的形态特征

菌落背面颜色由原来的淡黄色变为乳白色, 孢子产生较慢且比原始菌株孢子稀疏, 由2~3d产生孢子延长至4~5d。说明诱变剂作用于黑曲霉MA021后, 不仅引起了其生理代谢上的变化, 也引起了形态特征的改变。

2.4 UN-12-10菌株的遗传稳定性试验

将UN-12-10进行连续10次传代试验, 摇瓶发酵结果如表2。

表2 UN-12-10传代试验

代数	P ₂	P ₄	P ₆	P ₈	P ₁₀
酶活 (u/mL)	1907	1890	1896	1924	1900

表2表明, UN-12-10经10次传代, 酶活能稳定在1890~1925u/mL之间, 具有稳定的遗传性能。

另外又对该菌进行了平板自然分离, 随机挑取50个单菌落进行摇瓶测定, 结果是正变率及负变率均较低, 分别为8.63%和5.76%。同样说明该菌遗传性能稳定。

2.5 UN-12-10最适发酵条件的确定

应用单因子试验和正交试验综合考察了培养基中葡萄糖、玉米淀粉、无机盐、表面活性剂等成分对UN-12-10产酶的影响, 初步确定其优化培养基为(%): 葡萄糖1, 玉米淀粉10, KCl 0.05, MgSO₄·7H₂O 0.05, FeSO₄·7H₂O 0.01, NaNO₃ 1.0, 吐温-80 0.1, α-淀粉酶3单位/克淀粉。在此培养基上, UN-12-10植酸酶酶活可以稳定

在 2950~3015u / mL, 达到出发菌株的 3.6 倍。

3 讨论

3.1 紫外线与亚硝胍诱变效果比较

在选定的诱变剂量作用下, 紫外线和亚硝胍的诱变效果是有显著差异的。

表 3 紫外线与亚硝胍的诱变效果比较

诱变剂	致死率 (%)	正变率 (%)	负变率 (%)
紫外线	87.0	7.6	69.5
亚硝胍	43.4	61.5	20.3

由表可知, 在选定的剂量下, 紫外线是高致死率、低正向突变率的诱变剂, 而亚硝胍则是低致死率、高正向突变率的诱变剂, 诱变效果显著, 但亚硝胍是剧毒药品, 使用起来不如紫外线方便。

至于亚硝胍处理黑曲霉的最佳条件还有待进一步试验, 以提高其诱变效力。

3.2 无机磷源对产植酸酶的影响

菌株 UN-12-10 的优化培养基中没有

K_2HPO_4 , 我们认为培养基中添加微量的 K_2HPO_4 对植酸酶的产生并不是起一种诱导作用, 而是有一定的抑制作用, 这与一些文献的报道是不一致的。

参 考 文 献

- [1] 《微生物诱变育种》编写组. 微生物诱变育种. 北京: 科学出版社, 1973.
- [2] 施巧琴. 微生物学通报, 1982, 9(4): 162~164.
- [3] 章慧德. 微生物学通报, 1989, 16(2): 70~73.
- [4] 郑洪元、张德生. 土壤动态生物化学研究方法. 北京: 科学出版社, 1982.
- [5] Gibson D M. Biotech Letters, 1987, 9(5): 305~310.
- [6] Erdman J W, JR. J Am Oil Chemists' Society, 1979, 56: 736~741.
- [7] Nair V C, Duvnjak Z. Appl Microbiol Biotechnol, 1990, 34: 183~188.
- [8] Harland B F, Harland J. Cereal Chemistry, 1980, 57(3): 226~229.
- [9] Tausky H H, Shorr E. J Biol Chem, 1953, 202: 675~685.
- [10] Shieh T R, Ware J H. Appl Microbiol, 1968, 16(9): 1348~1351.