

# 黑曲霉 $\alpha$ -鼠李糖苷酶高产菌株的选育

陈华根 倪 辉 李利君 肖安凤 苏文金 蔡慧农\*

(集美大学生物工程学院 发酵工程研究室 福建 厦门 361021)

**摘 要:** 本文首次报道利用 Davis 方法制备的透明圈法筛选  $\alpha$ -鼠李糖苷酶高产菌株。用甲基磺酸乙酯对出芽 8 h 的黑曲霉孢子进行诱变处理, 用透明圈法初筛出的菌株中, 产量提高 40% 以上的突变菌株占 11%; 用摇瓶培养对初筛出的菌株进行两轮复筛  $\alpha$ -鼠李糖苷酶高产突变株 T-226, 摇瓶培养  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活达 373.4 U/mL, 比出发菌株提高了 22.7%。对该高产突变株进行 5 L 罐发酵实验, 发酵 84 h 测得  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活为 631.9 U/mL。用新建立的方法选育高产  $\alpha$ -鼠李糖苷酶的高产菌株, 不仅具有较高的筛选效率, 还具有良好的准确性。

**关键词:** 黑曲霉,  $\alpha$ -鼠李糖苷酶, 诱变育种, 透明圈, 发酵

## Screening of $\alpha$ -Rhamnosidase High-yield Strain from *Aspergillus niger*

CHEN Hua-Gen NI Hui LI Li-Jun XIAO An-Feng SU Wen-Jin CAI Hui-Nong\*

(Fermentation Engineering Research Laboratory of Bio-tech Engineering College, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China)

**Abstract:** In this study, plate transparent circle by Davis method was introduce firstly screening  $\alpha$ -Rhamnosidase high-yield strain. The spore-sprouted *Aspergillus niger* 8-hour were mutagenized by ethyl methane sulphonate and pre-screened via transparent circle. 11% mutants yield 40% higher of  $\alpha$ -rhamnosidase than the original strain. A high-yield strain, T-226 with the highest  $\alpha$ -rhamnosidase activity of 373.4 U/mL was finally selected from these potential high-yield mutants after rescreened by shake flask fermentation twice. When the T-226 strain was fermented in 5 L bioreactor, the enzyme activity could reach to 631.9 U/mL after 84 h. Thus, the established screening method is highly efficient to isolate  $\alpha$ -rhamnosidase high-yield mutant of *A. niger*.

**Keywords:** *Aspergillus niger*,  $\alpha$ -rhamnosidase, Mutation breeding, Transparent circle, Fermentation

$\alpha$ -鼠李糖苷酶能水解鼠李糖苷而释放出鼠李糖<sup>[1]</sup>, 它在工业上具有许多潜在的应用价值。如: 可用于降低芸香科水果果汁的苦味<sup>[2,3]</sup>, 能够水解葡萄糖中的键合态芳香物质而释放芳香物质<sup>[4]</sup>, 可用于改进传统的鼠李糖生产工艺。国内相关的研究主要有芦丁- $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶<sup>[5,6]</sup>, 人参皂甙 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶

基因的克隆与表达<sup>[7]</sup>, 有关用微生物发酵 $\alpha$ -鼠李糖苷酶的研究报导很少。微生物发酵生产 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶在国外早有报道, 但酶活力都不高。如, Elinbaum等<sup>[8]</sup>采用土曲霉固态发酵生产 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶, 以柚皮苷为诱导物和碳源, 测得最大酶活力为 4.2 U/mL; Gallego等<sup>[9]</sup>采用深层培养生产鼠李糖苷

酶, 以芸香苷为诱导物和碳源, 发酵的酶活力为 530.6 mU/mL。Scaroni等<sup>[10]</sup>将含有柚皮苷、麦麸和腐烂黑籽南瓜果实的土样用甘油培养基分离得到野生型产 $\alpha$ -鼠李糖苷酶的嗜温真菌。而关于 $\alpha$ -鼠李糖苷酶产生菌的诱变选育的报道很少, 目前 $\alpha$ -鼠李糖苷酶几乎没有应用于工业化生产的报道, 主要原因是缺乏适合工业化生产的高产菌株。

在前期研究过程中, 本实验室筛选得到了一株能产生 $\alpha$ -鼠李糖苷酶的黑曲霉菌株<sup>[11]</sup>, 为了提高该黑曲霉产 $\alpha$ -鼠李糖苷酶的性能, 本实验以该菌株为出发菌株, 设计并试验用甲基磺酸乙酯诱变, 用透明圈法初筛, 用摇瓶培养复筛进行高产菌种选育, 为后续研究提供理论依据及技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

黑曲霉(*Aspergillus niger*)DB054, 由集美大学生物工程学院发酵工程实验室保藏。

### 1.2 主要试剂及设备

一缩二乙二醇(DES)(AR), 汕头市达濠精细化学品公司; 甲基磺酸乙酯(EMS), 柚皮苷(Naringin)购于 Sigma 公司; 色谱纯甲醇为美国天地公司产品; WATERS1525 型高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; Symmetry C18 column(5  $\mu$ m, 3.9 mm $\times$ 150 mm), 美国 Waters 公司; BIOFLO 110 Fermentor, New Brunswick Scientific Co. Inc.

### 1.3 培养基

斜面培养基(g/L):  $MgSO_4$  0.5,  $KH_2PO_4$  1.5,  $CaCl_2$  0.1,  $(NH_4)_2SO_4$  1.5, KCl 0.5,  $KNO_3$  1.5, 酵母膏 2, 柚皮苷 5, 琼脂 20, pH 6.0,  $1 \times 10^5$  Pa灭菌 20 min;

摇瓶培养基(g/L):  $MgSO_4$  0.5,  $KH_2PO_4$  1.5,  $CaCl_2$  0.1,  $(NH_4)_2SO_4$  1.5, KCl 0.5,  $KNO_3$  1.5, 酵母膏 2, 柚皮苷 2.5, pH 6.0,  $1 \times 10^5$  Pa灭菌 20 min;

选择性平板培养基(g/L): 琼脂 20, 其余同摇瓶培养基,  $1 \times 10^5$  Pa灭菌 20 min;

5 L罐发酵培养基(g/L):  $MgSO_4$  0.5,  $KH_2PO_4$  1.5,  $CaCl_2$  0.1,  $(NH_4)_2SO_4$  4,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.09, 酵母膏 1, 柚皮苷 6, pH 6.0,  $1 \times 10^5$  Pa灭菌 20 min。

### 1.4 实验方法

1.4.1 单孢子菌悬液的制备: 取培养 3 d 以上的成熟孢子的斜面, 用无菌生理盐水洗下孢子, 放到装有玻璃珠和 50 mL 无菌生理盐水的摇瓶中振荡

30 min, 将孢子充分打散, 用脱脂棉过滤掉菌丝, 即得单孢子悬液。将制得的单孢子悬液置于 4 $^{\circ}C$ 冰箱保存 1 h使之生长同步<sup>[12]</sup>。

1.4.2 孢子出芽: 将同步化后的孢子悬液接种到摇瓶培养基中, 在 28 $^{\circ}C$ 、160 r/min 的条件下振荡培养, 每隔 2 h 取样观察孢子形态并计算出芽率。

1.4.3 出芽孢子的诱变: 取 5 mL 出芽孢子, 5000 r/min离心 5 min, 用无菌生理盐水洗涤沉淀, 离心后向沉淀中加入 0.2 mol/L磷酸缓冲液(pH为 7.2), 调整孢子浓度为  $10^7$ 个/mL。加甲基磺酸乙酯至终浓度为 30 mg/L, 混匀后于 28 $^{\circ}C$ 振荡诱变 60 min, 取出 5000 r/min离心 5 min, 倒去上清液, 用磷酸缓冲液洗涤 3 次, 涂布在选择性平板上, 22 $^{\circ}C$ 培养 3 d~5 d, 将生长较快的单菌落重新转接到选择性平板上分离一次, 接出单菌落保种。

1.4.4  $\alpha$ -鼠李糖苷酶高产突变株的筛选: 将突变菌株接种到选择性平板上, 于 22 $^{\circ}C$ 霉菌培养箱中培养 48 h, 用改良Davis法<sup>[13]</sup>中的DES显色反应试剂按比例混合后滴加在菌落平板培养基中, 反应 20 min后, 出现如图 1 所示的透明圈, 根据透明圈直径与菌落直径比值(HC)的大小初筛<sup>[14]</sup>。将HC值大于出发菌株的突变株的孢子接种到装有 45 mL培养基的三角瓶中, 每株菌接种 1 瓶, 28 $^{\circ}C$ 、120 r/min摇瓶培养 48 h, 检测培养液中 $\alpha$ -鼠李糖苷酶的活力, 进行第 1 轮筛选。从中挑选 $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力高于出发菌株的再次培养, 两次培养酶活力都高于出发菌株的突变株进行第 2 轮复筛。第 2 轮复筛时, 每株菌先制备 OD值为 0.2 的单孢子悬液, 吸取这种孢子悬液 5 mL 接种到装有 45 mL培养基的 250 mL三角瓶中, 每菌株接种 4 个摇瓶, 28 $^{\circ}C$ 、120 r/min培养



图 1 DES 显色反应的透明圈图

Fig. 1 Transparent circle of color reaction by the DES

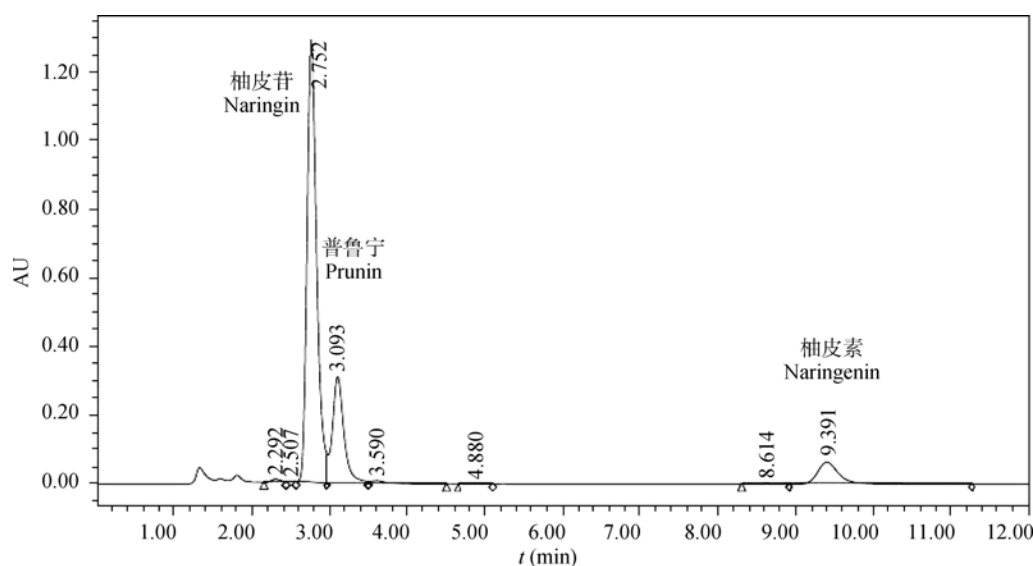


图2 柚皮苷降解 HPLC 图谱  
Fig. 2 HPLC chromatogram of naringin degradation

48 h 后测定发酵液的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶活力。

**1.4.5 5 L 罐发酵试验:** 孢子悬液的浓度为  $10^7$  个/mL, 接种量为 10%, 发酵 pH 为  $6.0 \pm 0.2$ , 发酵温度为  $28^\circ\text{C}$ , 溶解氧水平为 40%; 采用转速与溶氧联动的方法控制溶氧, 采用自动补加酸(盐酸)、碱(氨水)的方法控制 pH。

**1.4.6 酶活力测定方法:** 将发酵液于常温下 5000 r/min 离心 10 min 后取上清液作为粗酶液。取 pH 4.0 的磷酸氢二钠(0.01 mol/L)-柠檬酸 (0.05 mol/L) 溶液 1.9 mL 于试管中, 加入 100  $\mu\text{L}$  粗酶液, 在  $40^\circ\text{C}$  下水浴保温 5 min, 再加入 2.0 mL 300  $\mu\text{g/mL}$  的柚皮苷标准液, 在  $40^\circ\text{C}$  下水浴反应 15 min 后于沸水中失活 20 min, 取出后迅速冷却至室温。空白以粗酶液失活后再加柚皮苷标准液, 其它操作相同。

$\alpha$ -鼠李糖苷酶活力单位定义: 在  $40^\circ\text{C}$ 、pH 4.0 的条件下, 每分钟时间水解 1  $\mu\text{g}$  底物(柚皮苷)的酶量定义为 1 个酶活力单位(U/mL)。

用 Waters 高效液相色谱仪及 Waters Symmetry C18 色谱柱测定底物(柚皮苷)浓度的减少量(见图 2), 色谱条件为: 流速 0.699 mL/min, 进样量 20  $\mu\text{L}$ , 柱温  $35^\circ\text{C}$ , 检测波长 280 nm; 流动相的组成为甲醇: 超纯水=1:1(V/V)。

## 2 结果

### 2.1 选择孢子出芽的时间

用培养基稀释出发菌株的孢子, 研究孢子形

态与培养时间的关系, 结果如图 3 所示。由图 3 可知, 4 h 后有少量的孢子开始出芽, 此后随着时间的延长孢子的出芽率逐渐增大。8 h 取样观察, 大部分的孢子有出芽, 出芽率可达 80%, 此时芽长相当于孢子直径 0.5~1 倍(图 4 A)。培养时间为 10 h 时, 孢子出芽率虽然能达到 95%以上, 但此时芽长可达孢子直径的 2 倍(图 4 B), 已经呈现出短菌丝形态。

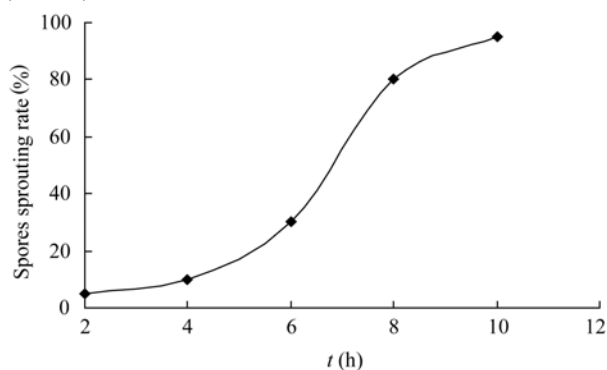


图3 单孢子培养出芽曲线  
Fig. 3 Effects of time on spores sprouting rate

### 2.2 出芽孢子的诱变及 $\alpha$ -鼠李糖苷酶高产菌株的筛选

出芽的孢子经 30 mg/L 的 EMS 诱变后, 选取 200 个菌落用透明圈初筛, 得到透明圈大于出发菌株的菌株 36 株, 对这 36 株菌进行第一轮复筛(数据未给出)。结果, 相对酶活力小于 100% 的负突变株比例为 40.0%, 相对酶活力大于 140% 的突变株占 11.4%, 相对酶活力介于 120%~140% 比例为 10%。

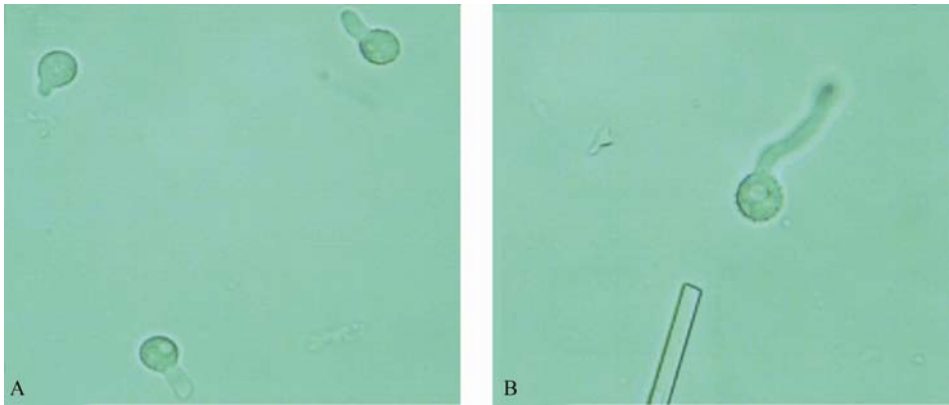


图 4 出芽培养的孢子形态(1000×)

Fig. 4 The spores sprouted modality of different times (1000×)

注: A: 培养 8 h 孢子形态 B: 培养 10 h 孢子形态.  
Note: A: The spores modality of 8 h; B: The spores modality of 10 h.

根据第 1 轮初筛的结果, 选取 α-鼠李糖苷酶活高于出发菌株的 15 株突变株再次培养测定酶活力(数据未给出), 结果只有 9 株菌酶活力高于出发菌株, 对这 9 株菌进行第 2 轮复筛, 实验结果如表 1 所示。由表 1 可知, 突变菌 T-226 的 α-鼠李糖苷酶活力最高, 其值为 373.4 U/mL, 相比出发菌株提高了 22.7%。此外, 复筛结果中有 4 株突变株的 α-鼠李糖苷酶活力低于出发菌株酶活。

表 1 α-鼠李糖苷酶突变菌株复筛结果 Table 1 The results of rescreening the producing- α-rhamnosidase mutants			
序号 No.	菌株编号 No. strain	酶活 Enzyme activity (U/mL)	相对酶活 Relative enzyme activity (%)
1	T-226	373.4	122.7%
2	TH-17	350.2	115.1%
3	TH-12	342.8	112.6%
4	T-78	337.4	110.9%
5	TH-10	323.5	106.3%
6	TH-34	287.1	94.3%
7	T-102	286.4	94.1%
8	TH-39	267.8	88.0%
9	TH-20	243.8	80.1%
10	DB054	304.4	100.0%

2.3 T-226 菌株遗传稳定性

将菌株 T-226 连续传代 5 代, 液体摇瓶发酵测其每代的 α-鼠李糖苷酶活力, 实验结果(表 2)表明, 不同代菌株所产生的 α-鼠李糖苷酶活力差别不大, 说明此菌株具有良好的遗传稳定性。

2.4 突变株 T-226 的 5 L 罐发酵

对菌株 T-226 进行 5 L 罐发酵试验, 发酵曲线如

表 2 T-226 的遗传稳定性实验					
Table 2 The genetic stability tests of the strain T-226					
代数	1	2	3	4	5
Inherited generation number					
α-鼠李糖苷酶活	350.5	373.4	358.8	364.8	347.6
α-rhamnosidase activity(U/mL)					

图 5 所示。由图 5 可知, 发酵前 36 h 碳源快速消耗, 生物量快速增加, 为菌体对数生长期。随着碳源的消耗, 菌体分泌 α-鼠李糖苷酶能力逐渐增强。碳源利用完后, 进入稳定期, α-鼠李糖苷酶活力仍然缓慢上升, 发酵至 84 h 时 α-鼠李糖苷酶活力达到最大值, 其值为 631.9 U/mL。

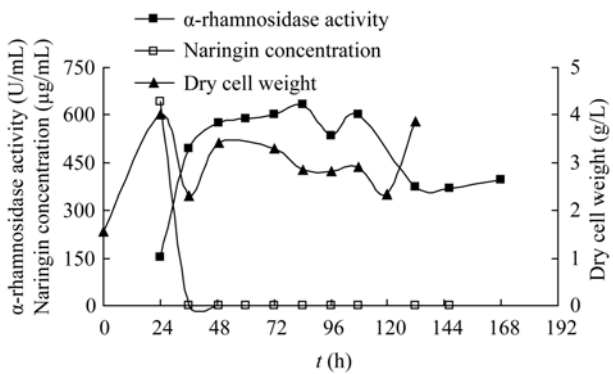


图 5 5 L 发酵罐产 α-鼠李糖苷酶曲线  
Fig. 5 Curve of producing α-rhamnosidase by 5 L bioreactor

3 讨论

黑曲霉的孢子具有坚硬的孢子壁, 不利于诱变剂进入; 此外, 成熟的孢子处于休眠状态, 遗传物质处于不活跃的状态, 不利于诱变作用的产生。因

此,在育种工作中,常采用发芽的孢子进行诱变,这样不仅能使遗传物质容易接触诱变剂,而且能提高诱变效率<sup>[15]</sup>。用出芽孢子作为育种材料时,选择孢子出芽的时间非常重要,通常选择孢子大部分出芽,但还没有形成菌丝状态的孢子作为育种材料,这样有利于减少突变表型延迟现象及增加突变菌株的稳定性。本实验选择出芽培养 8 h 后的孢子作为诱变材料,一方面是考虑到大部分孢子已经出芽,另一方面还没有形成菌丝。但从实验结果来看,筛选出的大部分菌株的产量性状退化较快。因此,后续实验应重点研究出芽时间对菌种稳定性的影响或采用原生质体为育种材料,提高突变菌株的稳定性。

Wataru<sup>[16]</sup>和 Scaroni<sup>[10]</sup>等在含有柚皮苷的土样中分离得到  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶产生菌。本文利用改良 Davis 显色液能与柚皮苷发生颜色反应的原理,在长有菌落的平板中加入一定量的显色液,反应后便能看到清晰可见的透明圈。筛选的实验结果表明,采用透明圈法对突变株进行初筛,可以淘汰大量的非突变株和负突变株,对 200 株菌株进行了透明圈初筛,淘汰了 164 株非突变株,这大大提高了筛选效率。用 2 轮摇瓶培养,测定酶活力的方法进行复筛,可以提高筛选结果的可靠性,有利于筛选获得高产的稳定型突变株。用这种初筛和复筛方法筛选  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶高产菌株,不仅具有较高的筛选效率,还具有有良好的准确性。

筛选得到黑曲霉 T-226 突变株,其酶活力相比出发菌株提高了 22.7%,在摇瓶培养中其酶活力的值为 373.4 U/mL,而 5 L 罐发酵实验所获的酶活力为 631.9 U/mL,该产量高于所查到的相关文献所报导的产量<sup>[9,10]</sup>。对比分析摇瓶培养和 5 L 罐发酵的差异,分析其主要原因可能有: 1) pH 的影响,在 5 L 罐发酵过程中 pH 始终控制在 6.0 $\pm$ 0.2 的范围内,而在摇瓶培养过程稳定期 pH 会降低到 3.0 以下; Gallego 等<sup>[9]</sup>发现酵培养基 pH 低于 5.8 时,土曲霉不合成  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶。2) 溶氧的影响,相关研究表明,溶氧对黑曲霉的生长及产酶具有重要影响,在 5 L 罐发酵过程中,溶氧始终可以控制在 40% 的水平,而在摇瓶培养过程中,溶氧值遵循先降后升的变化规律,其值不稳定,在对数生长期和稳定期容易产生供氧不足。3) 碳源(柚皮苷,既是碳源,又是诱导物)浓度的影响,在摇瓶试验中,碳源为 2.5 g/L,而在 5 L 罐中,碳源浓度为 6 g/L。这些问题一方面说明该菌株适宜在搅拌型反应器中培养,另一方面说明通过培

养条件的改变及优化还可能大幅度提高该菌发酵  $\alpha$ -鼠李糖苷酶的产量。

## 参 考 文 献

- [1] Roitner M, Schalkhammer Th, Pittner F. Preparation of prunin with the help of immobilized naringinase pretreated with alkaline buffer. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1984, **9**: 5-6.
- [2] 单 扬, 李高阳, 张菊华. 柑桔发酵酒脱苦技术研究. *食品与机械*, 2001, **85**(5): 14-15
- [3] 徐中伟, 刘心恕. 三种脱苦方法脱除柑桔汁果味的研究. *食品与发酵工业*, 1992, **18**(14): 6-16.
- [4] Gunata YZ, Bayonove CL, Baumes RL, *et al.* Stability of free and bound fractions on some aroma components of grape c.v. Muscat during the wine processing: preliminary results. *American Society for Enology and Viticulture*, 1986, **37**: 112-114.
- [5] 马安周, 王棚林, 鱼红闪, 等. 芦丁- $\alpha$ -鼠李糖苷酶基因的克隆. *大连轻工业学院学报*, 2005, **24**(1): 8-11.
- [6] 秦嗣卿, 金凤鸾, 鱼红闪. 芦丁鼠李糖苷酶基因在巴斯德毕赤酵母中的表达. *大连轻工业学院学报*, 2007, **26**(2): 112-115.
- [7] 杨 菲, 汤敏谦, 袁晓东, 等. 人参皂苷- $\alpha$ -鼠李糖苷酶基因的 cDNA 5'末端的快速扩增. *大连轻工业学院学报*, 2007, **26**(4): 307-309.
- [8] Elinbaum S, Ferreyra H, Ellenrieder G, *et al.* Production of *Aspergillus terreus*  $\alpha$ -L-rhamnosidase by solid state fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, **34**: 67-71.
- [9] Gallego MV, Piñaga F, Ramón D, *et al.* Production and characterization of an *Aspergillus terreus*  $\alpha$ -L-rhamnosidase of oenological interest. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*, 1996, **203**: 522-527.
- [10] Scaroni E, Cuevas C, Carrillo L, *et al.* Hydrolytic properties of crude  $\alpha$ -L-rhamnosidase produced by several wild strains of mesophilic fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, **34**: 461-465.
- [11] 郭 倩, 邬应龙, 黄高凌, 等. 柚苷酶产生真菌的复筛及菌种初步鉴定. *食品科学*, 2008, **2**: 225-228.
- [12] 诸葛健, 沈 微. 工业微生物育种学. 北京: 化学工业出版社, p.87.
- [13] Davis DW. Determination of flavonones in citrus juice. *Analytical Chemistry*, 1947, **19**: 46-48.
- [14] 陈 玲, 涂国全. 透明圈法筛选柚苷酶高产菌株. *江西科学*. 2007, **25** (1): 27-29.
- [15] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学. 北京: 科学出版社, p.138.
- [16] Wataru H, Kousaku M.  $\alpha$ -L-rhamnosidase of *Sphingomonas* sp. R1 producing an unusual exopolysaccharide of sphingan. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 1998, **62** (6): 1068-1074.