

郭宏文,王 艳,江成英,等. 酸性 α -淀粉酶菌种的诱变选育[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):356-357.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.100

酸性 α -淀粉酶菌种的诱变选育

郭宏文^{1,2}, 王 艳^{1,2}, 江成英^{1,2}, 郭建华^{1,2}

(1. 齐齐哈尔大学食品与生物工程学院,黑龙江齐齐哈尔 161006;

2. 黑龙江省普通高校齐齐哈尔大学农产品加工重点实验室,黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要:以从黑龙江省齐齐哈尔市北大仓酒厂白酒酒醅中分离筛选到的产酸性 α -淀粉酶的枯草芽孢杆菌菌株 C6 为出发菌,利用紫外线、硫酸二乙酯作为诱变剂对其进行了复合诱变,制作致死率曲线确定诱变剂量,紫外线诱变照射时间为 40 s,硫酸二乙酯诱变处理时间为 20 min。通过初筛、复筛发酵,从大量的突变株中筛选到 1 株产酸性 α -淀粉酶活力较高的菌株 F21,在 pH 值为 4.6 条件下, α -淀粉酶活力达 996.2 U/mL,比原菌株提高了 2.56 倍。产酶稳定性试验表明,菌株 F21 产酶能力稳定,可以作为酸性 α -淀粉酶育种研究的良好菌株。

关键词:酸性 α -淀粉酶;紫外线诱变;硫酸二乙酯诱变;突变株

中图分类号: Q933 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0356-02

我国是农业大国,淀粉产量高,淀粉深加工工业发展前景十分广阔。酸性 α -淀粉酶是一种能够在较低的 pH 值环境下液化淀粉的酶类,被广泛应用在发酵、食品、纺织、饲料、医药等领域,开发新型的酸性 α -淀粉酶具有较好的经济效益和社会效益。自 1963 年日本学者 Minoda 等发现了黑曲霉可以用于生产耐酸性 α -淀粉酶^[1]以来,许多国家对酸性 α -淀粉酶开展了研究。我国学者从 20 世纪 90 年代开始对酸性 α -淀粉酶进行研究,近年来相关研究主要集中在基因工程菌构建、菌种选育等方面^[2-5]。为了得到优良的生产菌种,从自然界筛选及进行诱变选育仍是目前工业微生物育种的有效手段。笔者以从黑龙江省齐齐哈尔市北大仓酒厂白酒酒醅中筛选到的产酸性 α -淀粉酶的枯草芽孢杆菌菌株 C6 为研究对象^[6],通过紫外线和硫酸二乙酯复合诱变,获得产酶能力强的酸性 α -淀粉酶突变株,旨在为开发利用酸性 α -淀粉酶资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养基

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) C6 分离自白酒酒醅。平板筛选培养基:可溶性淀粉 10 g,蛋白胨 5 g, Na_2HPO_4 0.1 g, KH_2PO_4 0.15 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 1 g,琼脂 1.8 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 值自然。产酶种子培养基:可溶性淀粉 12 g,蛋白胨 8 g,酵母粉 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, K_2HPO_4 1 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 值自然。产酶发酵培养基:可溶性淀粉 15 g,蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, K_2HPO_4 1 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 值自然。

1.2 主要试剂及仪器

试验用硫酸二乙酯等试剂均为分析纯。TU-1810 紫外可见光分光光度计(普析通用公司);紫外诱变箱,自制;Hermle 高速冷冻离心机(德国哈默公司);RH-Q 恒温振荡器(金坛市荣华仪器制造有限公司);SYQ-DSX-280 压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)。

1.3 紫外诱变处理

在紫外诱变箱内进行诱变,菌悬液距离 15 W 紫外灯 30 cm,磁力搅拌同时照射不同的时间,对处理液进行稀释后涂布于平板筛选培养基,放在 32 ℃ 培养箱内避光培养 1~2 d。通过对平板菌落计数计算致死率,选定最佳诱变剂量进行诱变。

1.4 硫酸二乙酯(DES)诱变处理

三角瓶中分别加入磷酸缓冲液 15 mL、待处理菌悬液 5 mL 及硫酸二乙酯溶液 0.2 mL,置于 36 ℃ 振荡器内处理不同时间。取出 1 mL 处理液,加入 1 mL 25% 硫代硫酸钠溶液终止反应。将处理液稀释后涂布于平板筛选培养基,放在 32 ℃ 培养箱内避光培养 1~2 d。通过对平板菌落计数计算出致死率,确定最佳诱变剂量并进行诱变^[7]。

1.5 突变株初筛

用稀碘液对分离平板上生长的菌落显色,计算菌落透明圈直径与菌落直径的比值(D/d 值),选出比出发菌株的 D/d 值增加 10% 以上的菌株,初步认为其发生了正突变,挑至斜面保存。

1.6 液态发酵

250 mL 三角瓶中装有 25 mL 种子培养基,接种后置于 36 ℃ 摇床中 180 r/min 振荡培养 18 h,取出 2 mL 种子培养液转接到装有 25 mL 发酵培养基的三角瓶中,置于 36 ℃ 摇床中 180 r/min 振荡培养 48 h,发酵液用 4 层纱布过滤,测定滤液酶活力。

1.7 酶活力的测定

参照 Yoo 等的改良法^[8-9]进行酶活力的测定。

收稿日期:2015-03-06

基金项目:齐齐哈尔大学青年教师科学技术类科研启动项目(编号:2012k-Z06)。

作者简介:郭宏文(1973—),男,河北深州人,硕士,副教授,主要从事微生物遗传研究。Tel: (0452) 2742731; E-mail: ghw666@126.com。

2 结果与分析

2.1 紫外诱变剂量的确定

由图 1 可以看出,随着照射时间的延长,紫外线诱变致死率逐渐增加。照射 40、60、100 s 的致死率分别为 75.9%、91.3%、100%。依据诱变育种产量变异中多倾向于使用较低剂量的原则,本试验选取致死率为 70%~80% 的诱变剂量,确定用紫外线照射时间为 40 s 的剂量进行诱变处理。

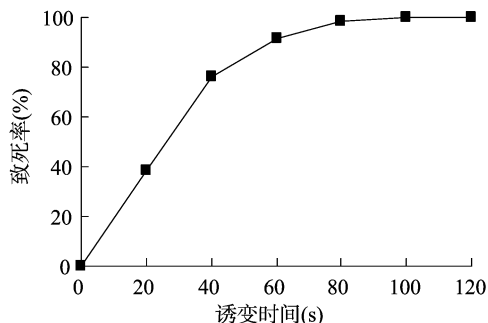


图1 不同诱变时间下紫外线诱变致死率

2.2 硫酸二乙酯诱变剂量的确定

由图 2 可以看出,随着处理时间的延长,DES 诱变致死率逐渐增加。处理时间为 20、30、50 min 时致死率分别为 78.6%、88.7%、100%。本试验选用致死率为 70%~80% 的诱变剂量,确定硫酸二乙酯诱变的处理时间为 20 min。

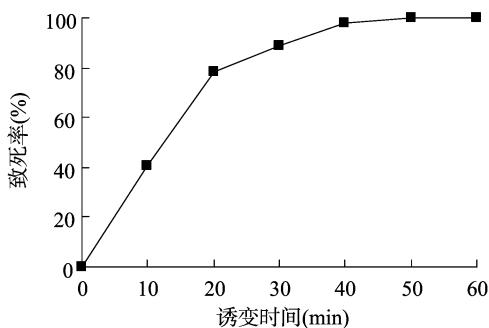


图2 不同诱变时间下 DES 诱变致死率曲线

2.3 紫外线诱变筛选结果

对出发菌株进行了多次紫外线诱变,通过初筛的方法选出了 100 株突变株,对它们进行发酵试验测定其产酶能力,结果表明,65 株突变株的酶活比原出发菌株有所提高,从中筛选出 1 株酶活力高且产酶稳定的突变株 A1,酶活力达到 688.5 U/mL,比出发菌株 C6 提高了 1.77 倍。突变株的菌落形态及颜色与诱变前的出发菌株一致。

2.4 硫酸二乙酯诱变筛选结果

对紫外诱变筛选出的突变株 A1 进行了多次 DES 诱变,通过初筛选出了 150 株突变株,对它们进行发酵试验测定其产酶能力,其中有 72 株突变株酶活比 A1 有所提高,产酶能力高的 5 株突变株分别为 E32、F21、E8、F17、F61,酶活依次为 1 053.1、997.1、932.2、906.3、876.1 U/mL,突变株 E32 的酶

活比出发菌株 A1 提高了 1.53 倍。这些突变株的菌落形态及颜色与诱变前的出发菌株一致。

2.5 突变株的产酶稳定性结果

将酶活最高的 E32 等 5 株突变株连续传代 9 次,用第 1、3、5、7、9 代菌株发酵产酶,测定酶活力,数据见表 1。由表 1 可知,突变株 E32、E8、F17、F61 的产酶能力不稳定,随着代数增加均有所下降,突变株 F21 的产酶能力稳定。可以选用突变株 F21 用作以后发酵产酶的出发菌株。

表 1 突变株的产酶稳定性

突变株 代号	酶活 (U/mL)				
	第 1 代	第 3 代	第 5 代	第 7 代	第 9 代
E32	1 053.1	955.6	960.2	943.2	957.3
F21	997.1	989.3	998.4	995.6	996.2
E8	932.2	905.3	913.6	872.5	890.4
F17	906.3	870.2	839.6	850.3	845.6
F61	876.1	849.6	785.7	802.5	792.8

3 结论与讨论

本研究结果表明,出发菌株 C6 对紫外线及硫酸二乙酯的处理均比较敏感,容易产生突变及死亡。紫外诱变的效果好于硫酸二乙酯诱变。针对产酸性 α -淀粉酶的菌株 C6 进行了复合诱变处理,效果良好,出发菌株 C6 的酶活为 389.2 U/mL,诱变筛选到的突变株 F21 的酶活达到 996.2 U/mL,比诱变前提高了 1.56 倍。本试验结果为今后进一步选育酸性 α -淀粉酶的高产菌株打下了良好基础。

参考文献:

- [1] Minoda Y, Arai M, Torigoe Y. Acid-stable α -amylase of black aspergilli Part II [J]. Agr Biol Chem, 1968, 32(1): 104-109.
- [2] 曾庆梅, 魏春燕, 靳靖, 等. 黑曲霉酸性 α -淀粉酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达 [J]. 食品科学, 2011, 32(17): 219-224.
- [3] 魏涛, 孙浩, 申玉龙, 等. *Sulfolobus tokodaii* strain 7 高温酸性 α -淀粉酶基因在大肠杆菌中克隆表达及其酶学性质 [J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(5): 13-17.
- [4] 王建玲, 陈志鑫, 刘逸寒, 等. 产耐酸性 α -淀粉酶菌株的分离、鉴定、酶学特性研究及发酵培养基的优化 [J]. 生物技术通报, 2014(4): 159-163.
- [5] 黄伟, 刘永乐, 王发祥, 等. 原生质诱变选育高产酸性 α -淀粉酶黑曲霉菌株 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(3): 160-162, 167.
- [6] 郭宏文, 郭建华, 邹东恢. 酸性 α -淀粉酶产生菌的筛选 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12): 360-361, 362.
- [7] 杜连祥. 工业微生物学实验技术 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1992: 185.
- [8] Yoo Y J, Hong J, Hatch R T. Comparison of α -amylase activities from different assay methods [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1987, 30(1): 147-151.
- [9] 史永昶, 姜涌明, 樊颉, 等. 蛋白酶对解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶活力的影响 [J]. 微生物学通报, 1995, 22(1): 23-25.