马玮超,杜茂林,谷亚楠,等. 高通量法选育果胶酶高产菌株[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):513 - 516.
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2016.07.146

高通量法选育果胶酶高产菌株

马玮超, 杜茂林, 谷亚楠, 郭彦昭, 薛婷婷, 陈五岭
(西北大学生命科学学院,陕西西安 710069)

摘要:用深孔微培养 - 酶标仪检测替代摇瓶培养 - 紫外分光光度计检测,以期建立 1 种高通量选育果胶酶高产菌的方法。试验确立的最佳微培养条件为:转速 280 r/min,振幅 45 mm,装液量 1.2 mL/孔。经统计软件分析表明:2 种检测方法的检测值、酶产值间线性回归关系均极显著,且数值排序大致相同,表明用深孔微培养 - 酶标仪检测体系选育菌种是可行的。通过复合诱变(超声波处理 40 min,紫外照射 60 s),经过高通量筛选,得到 4 株高产菌。经传代培养后证明:C23 - 7、C23 - 9 这 2 株菌遗传稳定,酶活效价均值分别可达 705.7、695.0 U/mL,分别比出发菌株(477.3 U/mL)提高了 47.85%、45.61%,适合应用。

关键词:果胶酶;高通量;复合诱变;超声波;紫外诱变
中图分类号: S182　　**文献标志码**: A　　**文章编号**:1002 - 1302(2016)07 - 0513 - 04

果胶酶被广泛应用于食品加工、纺织加工、造纸制浆、医疗卫生等领域[1-2],是世界四大酶制剂之一。目前果胶酶主要采用微生物发酵法大规模生产,具有较高的市场价值和应用价值。高效生产果胶酶具有十分重要的现实意义,而提高酶的产量,离不开高产菌种的选育。目前,菌种选育的技术手段十分丰富,如原生质体杂交育种、不定向诱变、转基因定向育种等,大大提升了育种效果,但是与其配套的高效筛选方法却进展不大。已报道的果胶酶高产菌种选育方法,多数仍为传统的平板筛选法[3-5]。传统方法在初筛时,对诱变后菌液的梯度稀释过程中,很有可能遗漏高产正突变菌株,而且人工、设备消耗较大,效率低下。建立 1 种可有效减少筛选遗漏、工作强度、材料消耗,提高工作效率的果胶酶高产菌选育方法,就成为亟待解决的问题。

1　材料与方法

1.1　主要材料与仪器

1.1.1　出发菌株　出发菌株为笔者所在实验室保藏的 1 株可产果胶酶的黑曲霉(*Asperillus*. spp)及其多个突变株。

1.1.2　主要仪器　SP - Max 2300A 光吸收型全波长酶标仪;VIS - 7220N 紫外分光光度计;ZWY - 200D 摇床;Matrix EXP 6 道移液器;TDZ5 - WS 孔板离心机;YLN - V 紫外诱变箱;xrc - 80AD 超声波清洗器;孔板固定架;48 孔矩形深孔板(4.6 mL)。

1.1.3　主要试剂　果胶粉(Sigma 公司,分析纯)。DNS 溶液为自行配制,储存于棕色容器避光保存 1 周后备用。

1.1.4　培养基　种子培养基:40 g 果胶,10 g $(NH)_2SO_4$,38 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$,2 g KH_2PO_4,加蒸馏水定容到 1 000 mL,将 pH 值调至 6。

发酵培养基:30 g 蔗糖,2 g 果胶,20 g $(NH_4)_2SO_4$,3 g $NaNO_3$,3.8 g K_2HPO_4,0.2 g $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$,0.25 g $MgSO_4$,0.15 g $Fe_2(SO_4)_3$,加蒸馏水定容到 1 000 mL,将 pH 值调至 6。

筛选平板培养基:28 g 果胶,20 g $(NH_4)_2SO_4$,3.8 g K_2HPO_4,0.2 g $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$,0.18 g $CaCl_2$,0.25 g $MgSO_4$,0.15 g $Fe_2(SO_4)_3$,20 g 琼脂条,0.2 g 溴酚蓝,加蒸馏水定容到 1 000 mL,将 pH 值调至 6。

斜面培养基:PDA 培养基。

1.1.5　种子液制备　挑单菌落接在 PDA 斜面上,于 30 ℃培养 7 d,用无菌生理盐水冲洗斜面,装入含有玻璃珠的锥形瓶中,振荡。用血球计数板计数,调节孢子浓度为 2×10^7 个/mL,作为种子液。

1.2　培养条件和酶活效价测定方法

1.2.1　摇瓶培养及其酶活效价测定　摇瓶培养:250 mL 三角瓶中装液 23 mL,接种 2 mL 种子液;转速 200 r/min,振幅 25 mm;温度 30 ℃,培养 58 h。以下如无专门说明,均与此相同。

在其他条件一定的情况下,单位酶活力与反应后显色物浓度呈线性相关,显色物浓度又与 D 值呈线性相关。因此可以直接用 D 值代表酶活力效价,用来反映单位酶活力。

摇瓶培养酶活力效价测定:培养结束后,取发酵液,用离心机离心,上清液即为粗酶液。

试管中加入 0.9 mL 含 1% 果胶的缓冲溶液,40 ℃水浴保温 3 min;加入 0.1 mL 适度稀释的粗酶液,反应 10 min;加入 3 mL 3,5 - 二硝基水杨酸(DNS)溶液,混匀,沸水浴 3 min;冷却,定容到 15 mL。以煮沸灭活酶液作为空白对照调零。适度稀释反应液(使 D 值保持在 0.1 ~ 1.0 之间),装入 1 cm 石英皿中,用紫外分光光度计测定 540 nm 处 $D_{540\ nm}$。以加煮沸灭活酶液的试管为空白对照。每次测定 3 个平行。相关计算公式:

摇瓶培养酶活力效价(U/mL) = $D_{540\ nm}$ × 反应液稀释倍

收稿日期:2015 - 05 - 24
基金项目:陕西省重大科技创新项目(编号:2009ZKC04 - 16)。
作者简介:马玮超(1990—),男,河南郑州人,硕士研究生,从事应用微生物研究。
通信作者:陈五岭,教授,研究方向为应用微生物。E - mail:1336479916@qq.com。

数×酶液稀释倍数。

1.2.2　深孔培养及其酶活效价测定　深孔培养:在适当单孔装液量、振幅、转速下,培养温度为 30 ℃,培养时间为 58 h。以下如无特别说明,均与此相同。

深孔培养酶活力效价测定。培养结束后,在各孔取 0.1 mL 发酵液,转入空白深孔板对应孔中,用无菌水补足至 1 mL,混匀,孔板离心机离心,孔中上清液即为粗酶液。

为方便比较起见,其他测定条件完全同本节。不同的是先在试管中进行 DNS 反应,适度稀释反应液后,再将反应液移至 48 孔孔板对应孔中,利用酶标仪快速测定 $D_{540\ nm}$。原因是直接利用孔板进行显色反应,沸水浴容易使孔板受热变形,且 DNS 反应液呈碱性,具有一定的腐蚀性,且稀释样液不方便,都会影响到测定。以加煮沸灭活酶液并经扫板检测的深孔为空白对照。每次测定 3 个平行,相关公式:

孔板培养酶活力效价(U/mL) = $D_{540\ nm}$ × 反应液稀释倍数×酶液稀释倍数。

1.3　复合诱变条件的确认

超声波可产生空化作用,使液体中小气泡产生高温高气压,冲击细胞,破坏壁膜,促使胞内外物质交换,从而引发突变。在紫外线照射下,嘌呤、嘧啶会形成嘧啶二聚体,阻碍碱基配对,引发突变。2 种诱变方式操作简便,安全无毒,设备易得,突变率高,适合作为诱变因子。而复合诱变具备有效克服疲劳效应、提高突变率的优势。因此本研究决定采用紫外线 – 超声波复合诱变的方式选育高产菌种。

在平皿中分别装入 10 mL 种子液,超声波功率 480 W,频率 40 Hz,分别作用 10、20、30、40、50、60、70 min(每个梯度 3 个平行),计算各梯度致死率。

平皿中分别装入 10 mL 种子液。将紫外灯功率调至 15 W,距离 30 cm,电磁搅拌。分别照射 15、30、45、60、75、90、105 s(每梯度 3 个平行)。计算各梯度致死率。致死率用平板计数法计算,3 个平行,相关公式为:

致死率 = (1 – 诱变处理后单位活菌数/未诱变处理时单位活菌数)×100%。

1.4　高通量法筛选和分离纯化单菌株

按适当方法进行诱变,将诱变后菌液尽可能全部、分别接入装有培养基的深孔板,每孔接 50 μL,共得 195 孔。振荡培养。

对照出发菌株深孔培养的酶活效价用酶标仪测量,得到高产孔。高产孔中混有高产单菌株的概率明显较高,起到富集高产株的作用;并且,诱变后的菌液几乎全部转接至各孔,用于筛选,大大减少了遗漏可能。

将高产孔中菌液接种于斜面,培养 6 d,用无菌水冲洗制成孢子悬液,适当稀释后涂布于筛选平板。挑取菌落较大、水解圈/菌落直径比值较高的单菌落,用灭菌牙签分别挑入 48 孔板振荡培养。用酶标仪检测酶活力效价,将高产株转接至斜面并编号保藏;同时,将高活力菌株转接入摇瓶中发酵验证酶活力效价。

2　结果与分析

2.1　深孔板培养方法的优化

2.1.1　转速、振幅对酶产量的影响　设置转速梯度 40 r/min,振幅梯度 10 mm,深孔板装液量 1 mL/孔。在深孔中接入出发菌株种子液,按“1.2”节中的方法培养,研究转速、振幅对酶产量的影响。由图 1 可以看出:当振幅小于 35 mm 时,产物积累量随转速的提高增长十分有限,可能是深孔中、摇瓶中液体的力学状况明显不同,深孔中的液体相对摇瓶会产生明显的表面张力,培养液所受离心力需要克服表面张力,振荡效果较差,影响了溶氧效果[6];当振幅达到 45 mm 时,转速从 240 r/min 增长到 280 r/min 时,产物积累量有了显著提高,可能是在振幅、转速明显提高后,克服了表面张力,改善了供氧条件。而在 45 mm 振幅下,转速超过 280 r/min 后,进一步提高转速,产物积累量没有明显提高,过高的转速还容易使发酵液溢出,增加了交叉污染的可能。因此,选取深孔培养的振动条件为转速 280 r/min,振幅 45 mm。

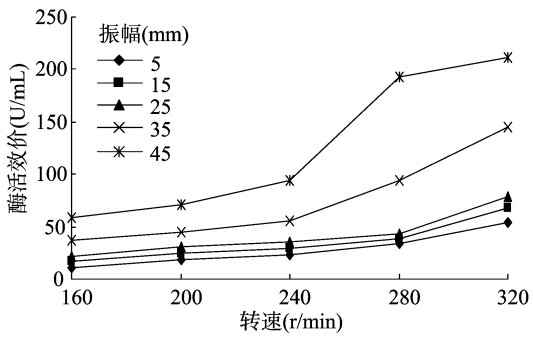

图1　转速、振幅对酶活产量的影响

2.1.2　单孔装液量对酶产量的影响　采用 0.2 mL/孔的装液梯度(每个梯度 3 个平行),转速、振幅同“2.1.1”节中的优化结果,验证装液量的影响。产酶是一个需氧过程,装液量的多少对果胶酶积累量的影响很大[7]。由图 2 可见:装液量为 1.0 mL/孔时,单位效价最高;装液量为 1.2、1.4 mL/孔时有所下降,但下降不多,且相互间差别不大;装液量继续加大后,效价有较为明显的下降。

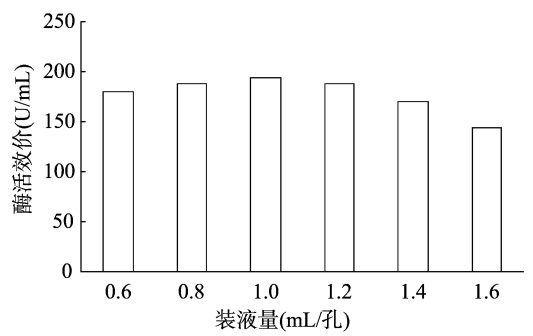

图2　装液量对酶产量的影响

装液量过多会使菌体生长困难,单位产物积累下降,且容易造成交叉污染和空气中的杂菌污染。而装液量过少,会给取样分析造成困难,且容易提高培养液挥发率,影响测定精度。深孔板振荡培养结果表明,四周培养基澄清无生长迹象,因此设置装液量为 1.2 mL/孔。

2.2　深孔板法用于菌种选育的可行性分析

2.2.1　酶标仪替代紫外分光光度计的可行性　取 14 株产酶能力明显不同的突变株,按“1.2.1”节中的方法摇瓶培养后,分别利用酶标仪检测深孔、紫外分光光度计检测石英皿中液

体吸光度,得到 2 组酶活效价。

由图 3 可见,2 组数据排序一致。用 SPSS 软件分析得到 2 组数据的相关性,F 值 =596.122,P 值 =0.000 <0.01。

2 种测定方法所得酶活效价不同,但 2 组数据线性回归关系极显著,说明用酶标仪检测法代替紫外分光光度计检测法是可行的。

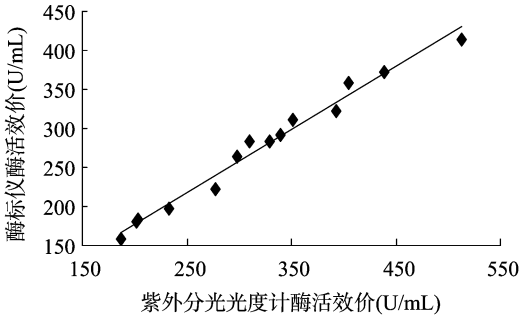

图3　酶标仪和紫外分光光度计测定酶活效价的比较

2.2.2　深孔板培养与摇瓶培养产酶量相关性分析　由于摇瓶培养、深孔板中的菌体生存环境存在一定区别,会对菌体的生长繁殖和新陈代谢过程产生影响,进而影响产物积累。本研究旨在用深孔培养替代摇瓶培养以提高选育效率,考察同一菌株在 2 个不同培养环境下彼此之间产物积累量的相关性,有一定的必要性。

取 14 株产酶能力有明显差异的突变株,分别接入孔板和摇瓶当中培养(做 3 个平行),按“1.2”节中方法测出 2 组酶活效价。由图 4 可见:产量排序大致相同,有 2 株不同,原因可能是同一菌株对不同生长环境的适应能力不同。用 SPSS 软件分析 2 组数据关系可知:F 值 =61.533,P 值 =0.000 <0.01。

2 种培养方法之间酶活效价线性回归关系极显著,说明用微孔板培养替代摇瓶发酵,用于快速挑选高产菌株是可行的。深孔产量偏低,可能是深孔供氧能力较差所致。

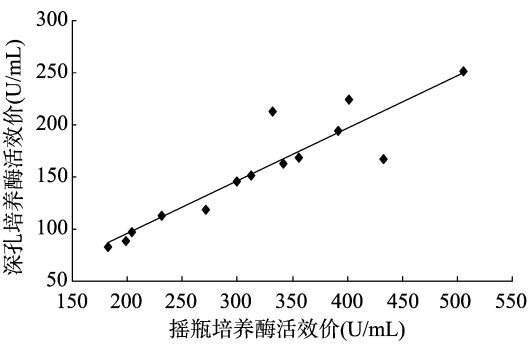

图4　摇瓶培养和深孔板培养酶活效价的比较

2.3　高通量选育

2.3.1　复合诱变条件的确认　如图 5、图 6 所示,随着超声波时间的延长,致死率呈线性提高,30 min 时达到 62.3%,40 min 达到 74.6%,50 min 时即达到 89.3%,70 min 开始达到 100%。随着紫外照射时间延长,致死率同样迅速提高,45 s 后即达 55.6%,60 s 时达到 71.8%,75 s 时达到 86.5%,105 s 开始达到 100%。

致死率过低,会使突变率不足,不利于得到突变菌株。致死率过高,同样不利于得到突变株[8-9]。并且,考虑到要先后进行 2 次诱变,2 种诱变条件均不宜处理过长时间,使致死率过高。因此,选取 2 个诱变因子的致死率均为 70% ~80% 的时间作为处理时间。以此确认诱变条件:超声波处理 40 min,紫外照射时间 60 s。

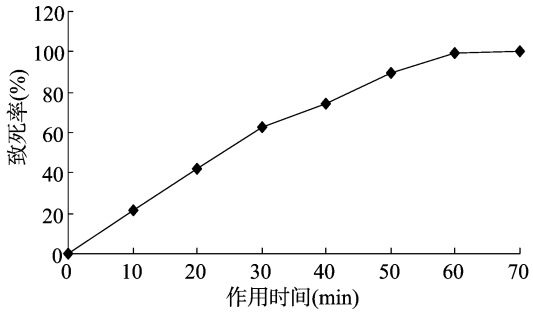

图5　超声波诱变致死率

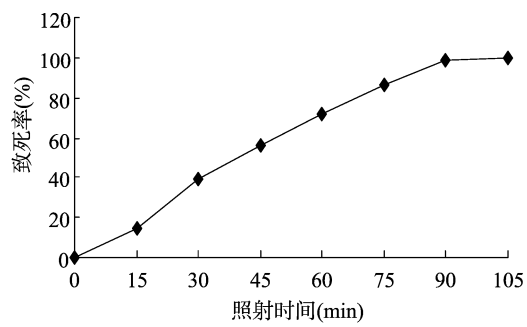

图6　紫外诱变致死率

2.3.2　复合诱变和高通量筛选结果　按“2.3.1”节中确认的诱变条件进行复合诱变,再按“1.4”节中的方法筛选高产孔,分离纯化单菌株。

诱变后分接培养的 195 孔菌中,158 孔无生长迹象,其余 37 孔经酶活检测,结果见图 7。可以看出:多孔正变株酶活力得以提高,其中 C23 孔最高,酶活效价可达 254.6 U/mL。对照组(出发菌株)酶活效价:孔板 186.7 U/mL。可见高产孔 C23 比对照(出发菌株)高 36.19%。

按“1.2.2”节中方法分离纯化 C23 孔中菌株,共得到单菌落 67 株,挑选出 17 株水解圈/菌落直径比较大、生长比较迅速的单菌株,经摇瓶培养验证,共得到 4 株高产菌株,分别为:C23 -4(687.5 U/mL)、C23 -7(701.3 U/mL)、C23 -9(692.3 U/mL)、C23 -14(698.7 U/mL)(图 8)。

2.4　高产株遗传稳定性验证

将斜面转接分离纯化所得 4 株高产菌传代培养,每转接 1 次记为 1 代。取不同代数菌株进行摇瓶试验,测定酶活效价。由表 1 可见,C23 -7、C23 -9 这 2 株菌产酶性能遗传性比较稳定,酶活效价均值分别可达 705.7、695.0 U/mL,与出发菌株的 477.3 U/mL 相比分别提高了 47.85%、45.61%,适合作为生产用菌种;而 C23 -4、C23 -14 随传代培养而酶活效价下降,可能是因为传代过程中相关性状丢失或者发生了自然分化,不适合作为生产用菌种。

3　结论

试验结果表明,本研究尝试建立的采用深孔板微量培育、

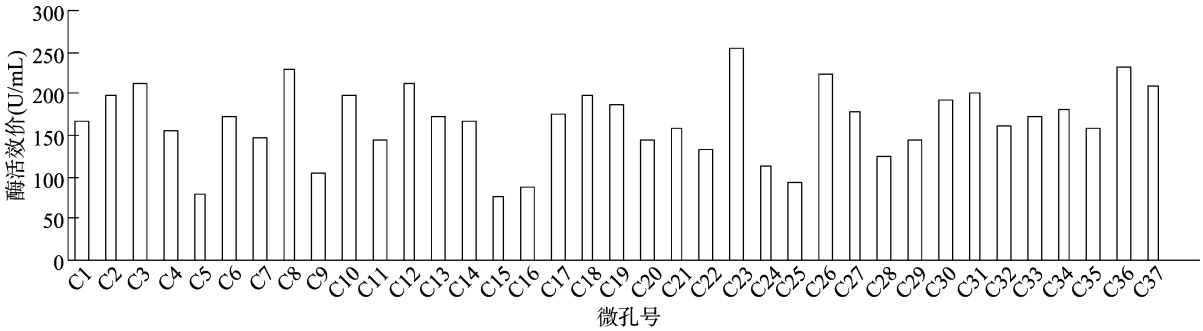

图7　复合诱变结果

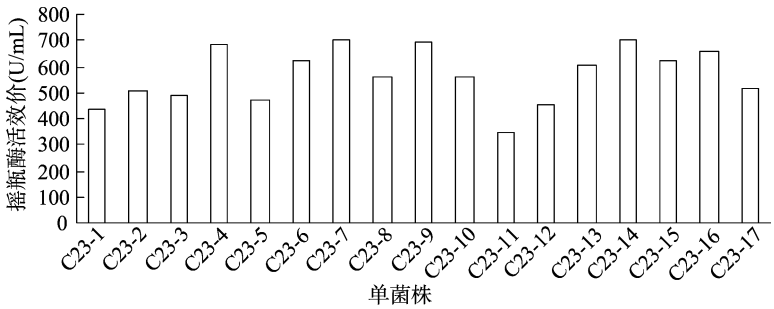

图8　高产孔中高产菌株在摇瓶中的分离纯化结果

表 1　高产突变株的遗传稳定性

代次	酶活力(U/mL)							
	C23 – 4		C23 – 7		C23 – 9		C23 – 14	
	效价	与亲本相差	效价	与亲本相差	效价	与亲本相差	效价	与亲本相差
1	667.6	19.9	709.8	8.5	689.7	2.6	652.5	46.2
3	618.1	69.4	705.6	4.3	699.5	7.2	649.8	48.9
5	592.9	94.6	699.6	1.7	697.1	4.8	665.7	33.0
7	601.3	86.2	703.2	1.9	693.2	0.9	609.8	88.9
9	587.2	100.3	710.5	9.2	695.5	3.2	612.9	85.8

酶标仪快速检测、高通量选育果胶酶高产菌的方法是可行的。与传统选育方法相比,本方法几乎覆盖了诱变后等待初筛的菌,大大减少了高产株遗漏的可能性。最多可一次性利用酶标仪精确测定 48 个待测样本的酶活力效价,单批次检测量大增,显著提高了初次筛选的效率,大大降低了材耗和能耗,节省了人工,提高了效率。

本方法是一种具备一定应用价值的果胶酶高产菌株选育方法,一些其他产酶菌株,如果所产酶可用紫外分光光度法原理测定(如产纤维素酶菌),亦可尝试利用本方法进行菌种选育。

参考文献:

[1]李　琦,李国高,刘　绍,等. 果胶酶应用的研究进展[J]. 中国农学通报,2014,30(21):258 – 262.

[2]李祖明,张洪勋,白志辉,等. 微生物果胶酶研究进展[J]. 生物技术通报,2010(3):42 – 49.

[3]陈勇强,严　芬,叶秀云,等. 高产果胶酶菌株的筛选鉴定及其发酵条件研究[J]. 中国食品学报,2014,14(2):138 – 145.

[4]华宝玉,林　娟,严　芬,等. 产果胶酶菌株的筛选鉴定及其产酶条件的研究[J]. 福州大学学报:自然科学版,2012,40(3):412 – 417.

[5]袁志辉. 一株果胶酶产生菌的筛选、鉴定及其产酶条件研究[J]. 天然产物研究与开发,2013,25(12):1627 – 1630,1637.

[6]Duetz W A. Microtiter plates as mini – bioreactors:miniaturization of fermentation methods[J]. Trends in Microbiology,2007,15(10):469 – 475.

[7]全桂静,王　硕. 果胶酶液体发酵条件与分离纯化的研究[J]. 现代食品科技,2009,25(11):1338 – 1341.

[8]佘秋生,杨海波,杨冠军,等. 紫外诱变黑曲霉筛选高产果胶酶菌种[J]. 中国酿造,2012,31(6):134 – 137.

[9]陈　林,王明兹,柯崇榕,等. 紫外线与超声波复合诱变选育红曲色素高产菌株的研究[J]. 中国酿造,2010(3):66 – 67.