

ARTP 诱变及高效筛选高产葡萄糖氧化酶菌株

肖成建¹, 陈楠¹, 江慰², 罗玮¹, 王强¹, 李汉广¹, 余晓斌^{1*}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以黑曲霉为出发菌株, 采用常压室温等离子体 (ARTP) 注入技术对前培养后的出发菌株进行诱变, 并结合改进后的邻联茴香胺高效平板显色圈进行初筛及摇瓶复筛。获得一株产葡萄糖氧化酶高产菌株, 其产量由出发菌的 45.6 U/mL 提高到 85.3 U/mL。通过对发酵关键条件碳酸钙和吐温-80 添加量进行优化, 结果显示酶活提高到 125.6 U/mL, 较原始菌株提高了 175.4%。经 6 代传代培养, 产葡萄糖氧化酶性能稳定。

关键词: 常压室温等离子体; 邻联茴香胺显色圈; 葡萄糖氧化酶; 诱变; 黑曲霉

中图分类号: Q 814 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)05—0525—06

Screening Mutation of High Glucose Oxidase Activity Using Atmospheric and Room Temperature Plasmas

XIAO Chengjian¹, CHENG Nan¹, JIANG Wei², LUO Wei¹, WANG Qiang¹, LI Hanguang¹, YU Xiaobin^{1*}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Pre-cultured *Aspergillus niger* was treated using ARTP for the development of high glucose oxidase strain. Improved O-dianisidine color-developing circle method was used for preliminary screening and the mutant strains were re-screened by liquid state fermentation in flasks. Mutant strain T-6's enzyme activity increased from 45.6 U/mL to 85.3 U/mL and was selected for its high glucose oxidase-producing ability. Glucose oxidase activity reached 125.6 U/mL which was 175.4% higher than that of the original strain when the critical fermentation conditions, calcium carbonate and Tween-80 were optimized. The genetic expression of glucose oxidase was showed to be stable when the strain was cultured for 6 generations.

Keywords: ARTP, O-dianisidine color-developing circle, glucose oxidase, mutagenesis, *Aspergillus niger*

葡萄糖氧化酶 (Glucose oxidase 简称 GOD) 作为一种需氧脱氢酶, 能在有氧条件下专一地将 β -

D-葡萄糖催化生成过氧化氢和 D-葡萄糖- δ -内酯, 且 D-葡萄糖- δ -内酯会自发地进一步转化为葡萄

收稿日期: 2014-10-23

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK20130130)。

* 通信作者: 余晓斌 (1965—), 男, 安徽芜湖人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵健康食品和酶技术方面的研究。

E-mail: xbyu@jiangnan.edu.cn

糖酸^[1-2]。在发酵工程、食品添加剂、生物传感器、动物饲料添加剂、生化材料和检测试纸等方面葡萄糖氧化酶都有着广泛的应用^[3]。目前,黑曲霉和青霉是大规模生产葡萄糖氧化酶最主要的菌株,但我国工业生产葡萄糖氧化酶的活性、纯度以及酶的稳定性都普遍偏低,长期依赖于进口^[4-5]。常压室温等离子体 (Atmospheric and Room Temperature Plasmas, 简称 ARTP) 诱变育种经过长期实践,证明其有对操作者安全、操作简单、环境友好、突变率高、突变快速、获得的突变株性能稳定的特点,目前成功应用于包括细菌、真菌、放线菌、酵母、微藻等在内的 40 余种微生物的诱变育种^[6]。因此,作者采用常压室温等离子体诱变育种技术并结合理性筛选模型获得一株高产葡萄糖氧化酶菌株,并对发酵条件进行优化以提高该菌产酶能力。

1 材料与方法

1.1 菌种

作者所在实验室保存,具有产葡萄糖氧化酶能力的黑曲霉菌株。

1.2 培养基

1.2.1 固体平板培养基(g/L) 马铃薯 200,葡萄糖 20,琼脂 20;pH 自然。

1.2.2 种子培养基(g/L) 蔗糖 70,鱼蛋白胨 10,玉米粉 15,吐温-80 15,KH₂PO₄ 0.2,(NH₄)₂HPO₄ 0.4,MgSO₄·7H₂O 0.2。

1.2.3 发酵培养基(g/L) 蔗糖 85,牛肉膏 3.5,玉米粉 15,(NH₄)₂SO₄ 17,(NH₄)₂HPO₄ 0.6,KH₂PO₄ 0.3,吐温-80 20,CaCO₃ 35;pH 5.5。

1.3 常压室温等离子体 (ARTP) 诱变

首先用无菌的种子培养液将已成熟(斜面培养 5 d)的黑曲霉孢子洗下,加入玻璃珠于摇床 180 r/min、30 ℃振荡培养 6 h(前期培养)。用无菌脱脂棉过滤即得到处于萌发状态的孢子悬液,调整孢子悬液浓度为 10⁶ 个/mL。打开 ARTP 紫外杀菌预热 20 min,设定诱变处理参数。等离子工作气体为氦气,设定工作电源功率 120 W,气体流速为 12 L/min,照射距离 2 mm。吸取孢子悬液涂布于小钢板上,每个钢板涂布菌悬液 10 μL。照射处理时间为 0~240 s。用无菌生理盐水将照射处理完的孢子洗下,涂布于筛选平板。通过菌落形成单位,计算菌株致死情况,并以此绘制致死率曲线^[7]。诱变后显色圈直径大于

诱变前的菌株显色圈直径 5%以上的记为正突变菌株,正突变菌株数除以总显色菌株数记为正突变率。

1.4 筛选

1.4.1 初筛 利用双层平板进行高产葡萄糖氧化酶的初步筛选,下层平板为葡萄糖 10 g/L,邻联茴香胺 0.1 g/L,辣根过氧化物酶 0.05 g/L(200 U/mg)和琼脂粉 20 g/L;上层平板为 20 g/L 的琼脂粉。为了保证酶的活力,待培养基温度降低至 50 ℃左右时候,加入辣根过氧化物酶。经诱变处理后的孢子,涂布在筛选平板上,30 ℃培养 24 h,根据呈现的棕色圈的大小,挑选棕色圈较大的进行复筛^[8]。

1.4.2 复筛 将初筛得到的菌株接种到发酵培养基,200 r/min、30 ℃培养 48 h,测定各自酶活,挑选出产酶提高大的菌株。

1.5 酶活测定方法

15 mL 刻度管里加入 1 mL 醋酸-醋酸钠缓冲溶液;2.9 mL 邻联茴香胺葡萄糖溶液(0.01 g 邻联茴香胺溶解于 8 mL 甲醇,取 5.25 mL 加水定容到 100 mL。再加入 10%的葡萄糖溶液;葡萄糖溶液与邻联茴香胺溶液比为 16:100);100 μL 辣根过氧化物酶(60 U/mL);在 38 ℃水浴锅振荡预热 20 min。取发酵液稀释 10 倍,制成粗酶液,水浴预热 20 min。取酶液 50 μL 加入刻度管,振荡反应 60 s,加入 2 mL 浓盐酸(5 mol/L)终止反应。置于凉水使得反应颜色稳定。

酶活单位定义:在上述实验条件下,一分钟内葡萄糖氧化酶催化葡萄糖产生 1 μmol 过氧化氢所需酶量为一个单位 U。

1.6 遗传稳定性分析

连续传代 6 代,分析所筛选的高产菌株产葡萄糖氧化酶的能力和性能变化。

2 结果与分析

2.1 ARTP 对菌株的致死率和正突变率曲线

经过长期使用 ARTP 技术对黑曲霉孢子诱变发现,黑曲霉孢子在较长的照射时间下仍然致死率低,同时发生正突变的菌株少。因此对孢子进行前期培养,以期提高 ARTP 的作用效果。图 1-2 分别为经过前期培养和未经过前期培养进行诱变处理后致死率和突变率结果对比。

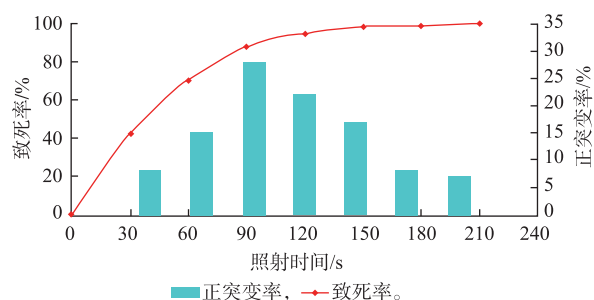


图1 菌株经过前期培养不同照射时间下的致死率和正突变率

Fig. 1 Death rate and positive mutation of the strain at different irradiation time after pre-culture

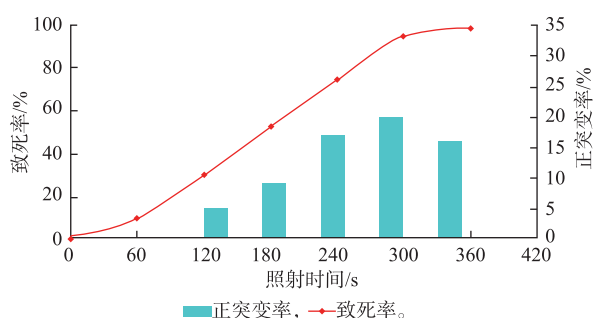


图2 菌株未经过前期培养不同照射时间下的致死率和正突变率

Fig. 2 Death rate and positive mutation of the strain at different time without pre-culture

图1-2分别为经过前培养和未经过前培养的诱变致死曲线和正突变曲线。可见黑曲霉孢子在经过前期的培养后,在仅照射时间不同的情况下,其达到相同的致死率所需要的照射时间明显缩短。经过前期培养的孢子在照射时间120 s的时候,致死率达到95%以上。而没有经过前培养的孢子,达到95%以上的致死率需要300 s以上。氢离子产生的活性粒子,一方面能够破坏细胞结构;另一方面穿过细胞壁进入细胞内,打断基因和蛋白质分子内键等。大部分的微生物因此死亡,也有小部分微生物通过修复系统而存活。而正是在这过程中发生了基因突变^[9]。所以通过ARTP技术操作来快速获得突变菌株成为可能。孢子前期培养萌发进入同步生长状态,生理活性较高。进一步增强了离子对细胞的作用效果。经过前期培养后诱变的正突变率明显高于没有前培养菌的正突变率;当照射时间在90 s左右时,致死率在85%~95%的时候,正突变率最高,达到28%。因此确定诱变条件是,黑曲霉孢子经过

前培养后,照射90 s左右,控制致死率在90%左右。

2.2 葡萄糖氧化酶高产菌株的筛选

2.2.1 初筛 菌种选育是一项工作量巨大的工作,一种理性筛选模型能有效地减少工作量,提高选育效率。而在筛选高产葡萄糖氧化酶的黑曲霉工作过程中,有效的平板筛选能大量减少后续工作。图3-4为邻联茴香胺显色平板改进前后的显色效果对比图。

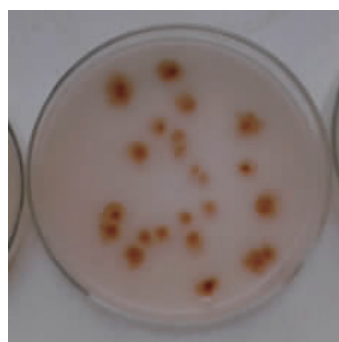


图3 改进前邻联茴香胺显色

Fig. 3 Colour reaction of the O-diani sidine before improvement

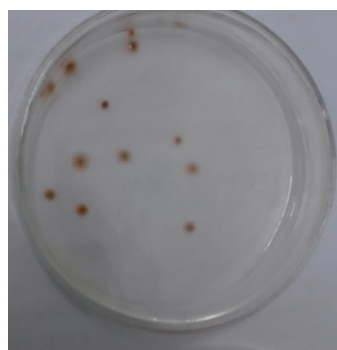


图4 改进后邻联茴香胺显色

Fig. 4 Colour reaction of the O-diani sidine after improvement

图3为作者所在实验室较早的邻联茴香胺显色平板,是将氮源以及碳酸钙混合倒入一层平板。虽然显色反应很明显,但是由于菌丝无规则蔓延和颜色的扩散,使得显色圈不规则且平板都有扩散的褐色,难以区别产酶能力的差异。图4为改进后将筛选平板分为不含氮源的下层和仅有琼脂的上层。所形成显色圈规则,且平板背景没有颜色扩散。能够更高效地筛选出产酶提高的菌株。因此应用本筛选方法,初筛后共获得48株差异较大的正突变菌株。

常用的产葡萄糖氧化酶筛选平板有 Fiedure.K.J 显色法、甲基红显色以及邻联茴香胺显色等^[10]。Fiedure.K.J 显色法,即在培养平板中加入淀粉以及碘化钾。当微生物产生葡萄糖氧化酶与葡萄糖反应时,会伴随过氧化氢的产生。过氧化氢与碘化钾作用形成碘单质,并进一步与淀粉反应形成蓝色圈。同样的原理,与甲基红反应形成红色圈,与邻联茴香胺反应形成褐色圈。

由于显色反应都比较灵敏,因此菌株产酶与否很容易通过显色观察判断。但当菌株的产酶能力达到一定程度以后,这些显色方法就难以区别菌株间产酶能力的提高与否。在碘化钾平板显色和甲基红平板显色过程中,筛选平板中容易形成很大的且形状不规则的显色圈,经常颜色扩散,覆盖整个平板,导致难以区别筛选。本研究筛选平板为改进后的显色平板,下层为邻联茴香胺、辣根酶以及葡萄糖混合琼脂平板;上层为碳酸钙琼脂平板。碳酸钙琼脂层的存在,使得孢子在萌发过程中吸收营养成分受到限制。另一方面,在下层培养基中营养成分缺少氮源,进一步限制了孢子的生长。涂布于表面的孢子更多的靠细胞内的物质以及隔层的葡萄糖生长,在此过程中产生的葡萄糖氧化酶通过琼脂层渗透与下层显色物质反应,以形成规则且区别度大的褐色圈。改进后的筛选平板即有效的限制了菌丝的扩大,又很好的区别不同产酶能力的菌株。再将显色圈大的菌株,挑选接种于营养丰富的平板继续培养即可。

2.2.2 复筛 将初筛得到的 48 株正突变菌株进行发酵培养,48 h 后依次测定每株的产酶能力,选出 7 株产酶能力提高大的菌株,分别命名为 T1 至 T7,实验结果见图 5。

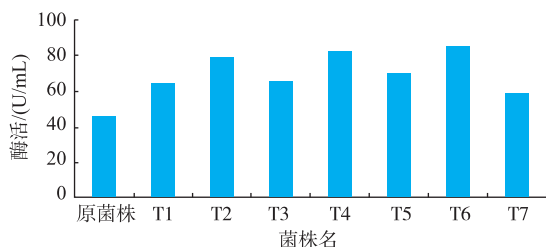


图 5 复筛突变菌株与原菌株产酶对比

Fig. 5 Enzyme production of the mutant strain and the parent strain

7 株菌的产酶性能都有较大提高,其中菌株 T6

的产酶能力最强,达到 85.3 U/mL,较对照菌株提高了 87.8%。实验结果表明,常压室温等离子体诱变相对于操作过程繁杂、环境要求高的常规化学诱变和紫外诱变是一种简单、高效的诱变方法,能够用于诱变筛选高葡萄糖氧化酶活力的黑曲霉菌株。

2.3 突变株产酶性能研究

2.3.1 胞外酶变化 黑曲霉产葡萄糖氧化酶是一种半分泌酶,且不同菌株的胞外酶所占比例并不相同。当胞外酶比例大时更有利于酶的后期提取,故测定突变株胞外酶所占比例,结果见图 6。

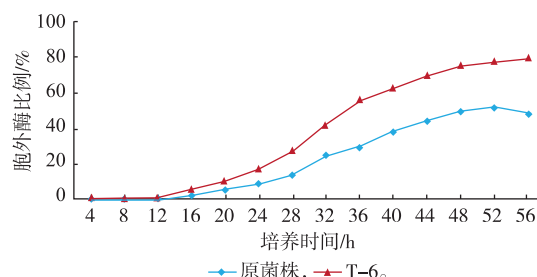


图 6 突变菌株和原菌株不同培养时间下产胞外酶占总酶活比例

Fig. 6 Ratio of extracellular enzyme in total enzyme activity of the mutant and the parent strain at different culture time

由图 6 可知,T6 菌株与原菌株对比,总的酶活单位提高。而且在 48 h 培养总酶活达到最高时,胞外酶占总酶的比例也明显高于原菌株。原菌株的胞外酶活比例达 50% 左右,而诱变菌株在 48 h 左右,胞外酶活比例达到 76%,这将更便于酶的后期提取和纯化。

2.3.2 关键产酶激活剂效应 碳酸钙对葡萄糖氧化酶的分泌有着重要意义。一方面是菌体生长过程的载体,另一方面又可以中和反应产生的葡萄糖酸,从而可调节发酵液 pH,因此是一种产酶促进剂。同样吐温-80 作为一种有效的表面活性剂,加入发酵液大大提高了细胞膜的通透性,有利于酶的释放,两者对发酵产酶都有重要意义。因此以不同的添加量加入发酵,以找到最合适的碳酸钙和吐温-80 的添加量,结果见图 7、图 8。

图 7 为诱变前后菌株不同碳酸钙添加质量分数下的产酶活力。经过诱变菌株与原菌株对比,最适碳酸钙的添加质量分数由原来的 3.5% 提高到 5.0%,酶活达到 115.7 U/mL。如图 8 所示,在最适碳酸钙添加质量分数的基础上,最适的吐温-80 添加

质量分数由原来的 2.0%变为 3.0%,此时酶活达到 125.6 U/mL。

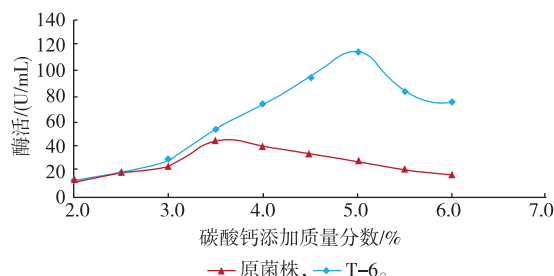


图7 突变株和原菌株不同质量分数的碳酸钙添加量下产酶对比

Fig. 7 Enzyme production of the mutant and the parent strain at different concentrations of calcium carbonate

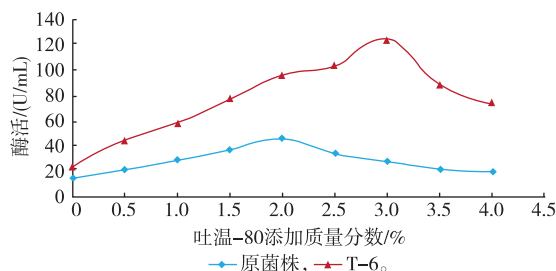


图8 突变菌株和原菌株不同吐温-80的添加质量分数下产酶对比

Fig. 8 Enzyme production of the mutant and the parent strain at different concentrations of Tween 80

2.4 产酶稳定性研究

为了检测变异菌株 T-6 产酶的遗传稳定性,连续培养 6 代,各代以优化后培养基为发酵培养基,于摇床上 30℃发酵培养 48 h。测定各代产酶活力,实验结果见图 9。

从图 9 可以看出,传代 6 代中产酶活力虽然有所波动,但都在 120 U/mL 左右,第四代和第六代略微有点降低。总体诱变菌株 T-6 具有较好的遗传稳

定性。

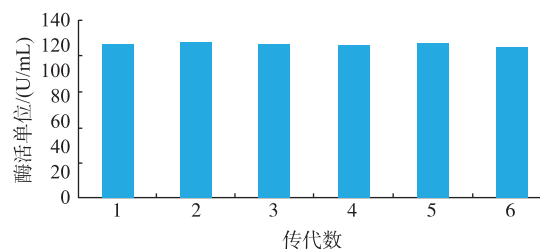


图9 不同传代数下产酶能力差异

Fig. 9 Enzyme production of the mutant during generations

3 结 语

作者构建了黑曲霉产葡萄糖氧化酶菌株的 ARTP 快速诱变和有效筛选方法,并对影响产酶发酵关键条件进行优化。主要结论如下:通过黑曲霉前培养,有效地提高了相同处理条件下的正突变发生率。最高的正突变率能达到 28%。通过改良后的邻联茴香胺显色平板,使得平板能形成均匀对比性强的显色圈,因此该方法是一种筛选产葡萄糖氧化酶高活力菌有效方法,很大程度上提高了筛选效率。对发酵条件进行了优化,诱变菌株最大产酶活力达到 125.6 U/mL,较出发菌株提高了 175.4%,且具有良好的遗传稳定性。相对于常规的诱变处理,ARTP 诱变技术是一种高效、安全的诱变方式,实践证明能有效作用于黑曲霉产葡萄糖氧化酶菌株,获得高产突变株。但与 2014 年报道朱运平等人^[1]对发酵条件优化后最高葡萄糖氧化酶产量达到 363.04 U/mL 还有一定的差距,通过选育优良菌株以及优化培养条件来一步提高产酶能力是今后研究的方向。同时,我国工业生产葡萄糖氧化酶活力普遍偏低、纯度不高,长期依赖进口,如何更经济有效的制取高纯度的葡萄糖氧化酶也有待解决。

参考文献:

- [1] 李艳,李静. 葡萄糖氧化酶及其应用[J]. 食品工程,2006(3):9-11.
LI Yan,LI Jing. The glucose oxidase and its application[J]. **Food Engineering**,2006(3):9-11.(in Chinese)
- [2] LIU J Z,WENG L P,ZHANG Q L,et al. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* in a benchtop bioreactor using response surface methodology[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,2003,19(3):317-323.
- [3] 杨久仙,曹靖. 葡萄糖氧化酶的应用进展[J]. 山西农业大学学报:自然科学版,2013,33(1):88-92.
YANG Jiuxian,CAO Jing. The application progression of the glucose oxidase [J]. **J Shanxi Agric Univ:Natural Science Edition**,2013,33(1):88-92.(in Chinese)
- [4] 郭晓贤,刘峰. 葡萄糖氧化酶产生菌的快速筛选及其产酶条件的研究[J]. 饲料工业,2007,28(8):17-20.

- GUO Xiaoxian, LIU Feng. The rapid screening of glucose oxidase producing strain and its study of enzyme production conditions [J]. **Feed Industry**, 2007, 28(8): 17-20. (in Chinese)
- [5] 韩建春, 冯镇, 张宏伟. 产葡萄糖氧化酶菌株的筛选及发酵培养基的优化[J]. 食品科学, 2011, 32(1): 149-153.
- HAN Jianchun, FENG Zhen, ZHANG Hongwei. Strain screening and optimization of fermentation medium for higher production of glucose oxidase[J]. **Food Science**, 2011, 32(1): 149-153. (in Chinese)
- [6] 张雪, 张晓菲, 王立言, 等. 常压室温等离子体生物诱变育种及其应用研究进展[J]. 化工学报, 2014, 65(7): 2676-2684.
- ZHANG Xue, ZHANG Xiaofei, WANG Liyan, et al. Recent progress on atmospheric and room temperature plasma mutation breeding technology and its applications[J]. **Ciesc Journal**, 2014, 65(7): 2676-2684. (in Chinese)
- [7] 郑明英, 蔡友华, 陆最青, 等. 常压室温等离子体快速诱变筛选高脯氨酸产率突变株 [J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(1): 36-40.
- ZHENG Mingying, CAI Youhua, LU Zuiqing, et al. Screening of high proline yield mutants by rapid mutation using atmospheric and room temperature plasmas[J]. **Food And Fermentation Industries**, 2013, 39(1): 36-40. (in Chinese)
- [8] SINGH O V. Mutagenesis and analysis of mold *Aspergillus niger* for extracellular glucose oxidase production using sugarcane molasses[J]. **Appl Biochem Biotechnol**, 2006, 135(1): 43-57.
- [9] 金丽华, 方明月, 张翀, 等. 常压室温等离子体快速诱变产油酵母的条件及其突变株的特性[J]. 生物工程学报, 2011, 27(3): 461-467.
- JIN Lihua, FANG Mingyue, ZHANG Chong, et al. Operating conditions for the rapid mutation of the oleaginous yeast by atmospheric and room temperature plasmas and the characteristics of the mutant [J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2011, 27(3): 461-467. (in Chinese)
- [10] 刘峰, 黄鹭强, 林颖, 等. 从土壤中快速筛选葡萄糖氧化酶产生菌及发酵工艺的优化[J]. 生物技术, 2007, 17(3): 64-68.
- LIU Feng, HUANG Luqiang, LIN Ying, et al. Screening of glucose oxidase producing strain from soil and study on the enzyme producing conditions[J]. **Biotechnology**, 2007, 17(3): 64-68. (in Chinese)
- [11] 朱运平, 褚文丹, 李秀婷, 等. 1 株产胞外葡萄糖氧化酶黑曲霉的液体发酵条件优化[J]. 中国食学报, 2014, 14(5): 91-98.
- ZHU Yunping, CHU Wendan, LI Xiuting, et al. Fermentation condition optimization of *Aspergillus niger* producing extracellular glucose oxidase[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2014, 14(5): 91-98. (in Chinese)

科技信息

韩国发行“辐照食品分析指南Ⅲ”

2016年3月15日,韩国食品药品安全部(MFDS)为了让地方自治团体、食品企业等易于确认食品是否经辐照处理,发行了“辐照食品分析指南Ⅲ”。主要内容有:1.食品辐照处理技术介绍;2.食品中辐照处理标准规格;3.辐照食品的确认试验法分析等。

辐照处理是以杀菌、杀虫、抑制发芽等为目的,通过伽马射线或电子辐照技术对食品进行辐照处理。

为确保照射线的安全性,目前韩国仅土豆、洋葱、大蒜等26个品种允许使用辐照处理。并且,使用辐照处理原料的食品应在“原材料名称及含量”标示栏的相关原料名称旁用括号标示“放射线照射”,最终产品经辐照处理时,应标示辐照处理产品及辐照图案(RADURA)。

韩国MFDS称,为保护消费者的知情权,以后还将会不断开发“可确认食品是否经辐照处理的分析法”。

[信息来源]厦门WTO工作站. 韩国发行“辐照食品分析指南Ⅲ”[EB/OL]. (2016-3-17). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=51135>