

葡甘聚糖酶高产菌株 *Bacillus subtilis* 的超剂量诱变育种

张吨^{1,2}, 张建新¹, 常绪路¹, 冯军厂¹, 郭祥瑞¹, 贵茜¹

(1.河南师范大学 水产学院,河南 新乡 453007;2.周口科技职业学院 医学系,河南 周口 466000)

摘要:超剂量诱变育种就是加大诱变剂处理剂量,提高菌株突变幅度,从而获得较好的诱变效果.以葡甘聚糖酶产生菌 *Bacillus subtilis* MY-1 为初始菌株,先用紫外线、硫酸二乙酯进行单因子诱变,再用超剂量复合诱变,经过透明圈法和摇瓶筛选,得到了一株高产葡甘聚糖酶的突变菌株,命名为 *Bacillus subtilis* UDMY-25,连续传代培养 5 次,发酵酶活稳定在 5 387.2 U/mL 以上,较原初始菌株提高了 44.8%,该菌株产酶能力处于同领域较高水平,具有较好的开发潜力和市场应用价值.

关键词:葡甘聚糖酶;紫外线;硫酸二乙酯

中图分类号:Q814

文献标志码:A

葡甘聚糖酶(glucomannanase)是一种可诱导的细胞外泌酶^[1],能将葡甘聚糖降解为不同聚合度的葡甘低聚糖.近年来,因低聚糖具有独特的生理功能而受到广泛关注^[2-4],不仅能够有效缓解三高(高血糖、高血脂和高血压)患者临床症状,还能作为他们食品方面的甜味剂.目前国内外关于葡甘聚糖酶的研究已取得一定成绩,但普遍存在产量低,酶活力不高的现象^[1, 5-6],离大规模工业化生产还有一定的差距.

超剂量诱变育种就是采用加大诱变剂处理剂量的方法,使杀菌率在 90%~99%,能够筛选酶活力提高幅度更大的突变菌株^[7],多因子复合诱变^[8-10]往往具有叠加效应,能获得更好的诱变效果.本实验以实验室筛选的一株产葡甘聚糖酶的 *Bacillus subtilis* MY-1 为原始出发菌株,根据初始菌株的生长曲线确定最佳诱变时期,先分别采用紫外线和硫酸二乙酯初始菌株进行单因子诱变,找到最佳处理剂量后,再用紫外线-硫酸二乙酯超剂量复合诱变,经过透明圈法初步筛选和摇瓶发酵筛选,期望获得一株高产、稳产葡甘聚糖酶的突变菌株,并对突变菌株的遗传稳定性、最佳发酵产酶时间和酶解魔芋胶产物进行分析.

1 材料与方法

1.1 菌株

葡甘聚糖酶产生菌是由本实验室筛选的一株植物内生菌,命名为 MY-1,经鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*).

1.2 培养基

斜面培养基(W%):魔芋胶 1.0,酵母膏 0.5,蛋白胨 0.5, MgSO₄ 0.03,琼脂 2;

初筛培养基(W%):在斜面培养基中加入 0.01%的曲利苯蓝(trypan blue)制成培养皿;

活化培养基(W%):酵母膏 0.5,蛋白胨 0.5, NaCl 0.5;

种子培养基(W%):魔芋胶 1.0,酵母膏 0.5,蛋白胨 0.5, KCl 0.1, K₂HPO₄ 0.2, MgSO₄ 0.03;

复筛培养基(W%):魔芋胶 1.0,酵母膏 0.2, K₂HPO₄ 0.2, MgSO₄ 0.03, NaCl 0.1, (NH₄)₂SO₄ 0.5,吐温

收稿日期:2017-04-20;修回日期:2018-01-12.

基金项目:河南省重点科技攻关(172102310667;132102310293;142102210453);河南省教育厅科学技术研究重点项目(12A240001;14B180023),河南师范大学国家级科研项目培育基金(2013PL10).

作者简介:张吨(1984—),河南郸城人,河南师范大学硕士研究生,讲师,研究方向为微生物学,E-mail:163zhangdun@163.com.

通信作者:张建新(1974—),男,山东陵县人,河南师范大学教授,博士,研究方向为微生物酶制剂,E-mail:zjxlql@163.com.

80 0.1;

发酵培养基(W%):同复筛培养基;

以上培养基用氢氧化钠和稀盐酸调节 pH 至 7.0~7.2,121 °C 湿热灭菌 20 min.

1.3 仪器和试剂

722 分光光度计(上海光学仪器一厂),曲利苯蓝(trypan blue)(sigma 公司),硫酸二乙酯(广东翁江化学试剂有限公司),魔芋胶(纯度>95%,成都路特实业有限公司).

1.4 方 法

1.4.1 初始菌株生长曲线 将出发菌株活化 8~10 h 后,以 2%的接种量移入活化培养基,500 mL 摇瓶装液量为 80 mL,设置三组对照分别编号为摇瓶 A、摇瓶 B 和摇瓶 C;分别于 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h 取样 2 mL,600 nm 测 OD 值,以 OD 值为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制出发菌株生长曲线图.

紫外线诱变^[7] 菌液用 20 W 紫外灯距离 30 cm 分别照射 0、1、2、3、4、5、6、7 min,黑布包裹 4 °C 冰箱过夜保存,红光下操作.

1.4.2 硫酸二乙酯诱变^[7] 选择 1%的硫酸二乙酯分别处理菌液 0、10、20、30、40、50、60 min;分别用终浓度为 0.0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%的硫酸二乙酯处理菌液 20 min,迅速加入一定量的硫代硫酸钠溶液,充分混合,终止反应.

1.4.3 UV + DES 超剂量复合诱变 参考文献[8,9]的方法加以改进,取 2 mL 单细胞菌液,采用紫外线和硫酸二乙酯最佳组合方案进行处理,先用紫外灯照射,再用硫酸二乙酯黑暗处处理,黑布包裹 4 °C 冰箱过夜保存,红光下操作.

1.4.4 高产菌株初筛 根据菌株计数结果,参照杨文博等人^[11,12]的方法,选取一定致死率的培养皿,挑取 300 个菌落接种到初筛培养基上,以原始出发菌株作为对照,暗处过夜培养,选取不少于 40 株透明度好,透明圈变大的菌落进行复筛;

1.4.5 高产菌株复筛 将初步筛选获得的高产菌落分别接种到活化培养基,过夜培养后再接种到种子培养基培养 8~10 h,最后以 2%的接种量移入复筛培养基(250 mL 摇瓶装液量 30 mL)连续培养 72 h;以上培养条件为 35 °C,160 r/min 振荡培养.

1.4.6 酶活测定 本文采用 DNS 法测酶活,参照文献[13,14],在 0.9 mL 0.5%的魔芋胶底物中加入 0.1 mL 适当稀释的酶液,50 °C 条件下保温处理 5 min 后,加入 2 mL DNS 煮沸 5 min 以终止反应,分光光度计 540 nm 测吸光值并计算酶活力.上述反应条件下,每分钟产生 1 μ mol 甘露糖所需要的酶量为 1 个酶活性单位(U/mL).

1.4.7 突变菌株产酶稳定性实验 将高产突变菌株于种子培养基中,24 h 为一代,连续传代 5 次,以 2%的接种量分别接种于发酵培养基,每组设置 3 个对照,35 °C,160 r/min 振荡培养 3 d,DNS 法测酶活力.以酶活力大小为 X 轴、传代次数为 Y 轴做柱状图.

1.4.8 突变菌株产酶曲线 将高产突变菌株以 2%的接种量接种于发酵培养基(500 mL 摇瓶装液量为 100 mL),35 °C,160 r/min 摇床振荡连续培养 4 d,设 3 组对照,每 6 h 取样 1 mL,4 °C 冰箱保存,DNS 法测酶活,以相对酶活为 Y 轴、发酵时间为 X 轴,绘制产酶曲线图.

2 实验结果

2.1 初始菌株生长曲线

初始菌株 *Bacillus subtilis* MY-1 的生长曲线分为 4 个时期:调整期、对数期、稳定期和衰亡期,如图 1 所示,0~6 h 为调整期,OD 值仅上升到 0.032,此时期的菌株合成、储存大量的能量、中间代谢产物和酶,为对数期快速繁殖做准备;6~13 h 为对数期,菌体开始快速分裂繁殖,对外界环境刺激最为敏感,所以本实验采用培养 8~10 h 菌体进行诱变;13~21 h 为菌体生长的稳定期,新陈代谢发生了一系列变化,对外界环境产生了一定的抵抗力;21 h 以后菌体生长开始进入衰亡期.本实验结果与刘雪等^[15]人的报道基本一致.

2.2 紫外线单因子诱变结果

紫外诱变后,根据培养皿上长出的菌落进行计算存活率(图 2),随着照射时间的延长,初始菌株存活率大幅度降低,处理 2 min 时存活率为 15.6%,处理 4 min 时存活率还有 1.7%,直到处理 7 min 时才将初始菌株全部杀死,可见平时用紫外线消毒时,要求照射时长不少于 10 min 是有一定意义的.为获得产量大幅度提高的突变菌株,本实验选用 1.2% 的存活率的紫外线照射剂量,即紫外线照射 5 min.通过图 3、图 4 可以看出,紫外线单因子诱变具有一定效果,透明圈比出发菌株有所增大,部分突变菌株产酶能力明显提高,36 号突变菌株酶活力比原出发菌株提高了 33%.

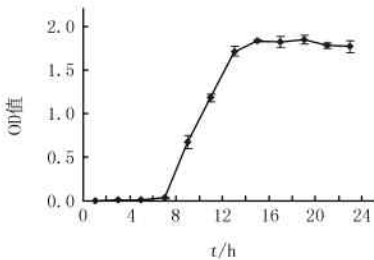


图1 初始菌株生长曲线

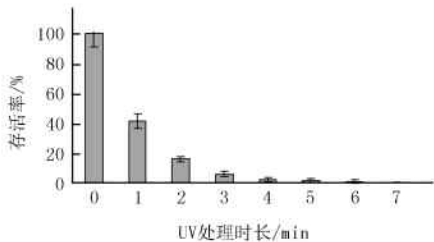


图2 紫外线诱变存活率-时间柱状图

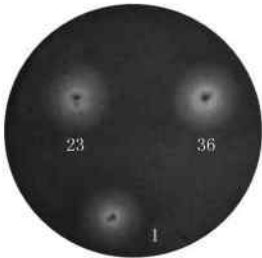


图3 紫外线处理后部分菌株的透明圈变化情况

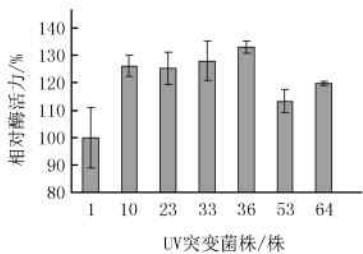


图4 部分紫外突变菌株酶活情况

2.3 硫酸二乙酯单因子诱变结果

硫酸二乙酯诱变后,根据培养皿上长出的菌落进行计数计算存活率(图 5~6),出发菌株对硫酸二乙酯的敏感度不高,1% 的硫酸二乙酯处理 5 min 存活率高达 91.0%,处理 15 min 存活率为 32%,处理 25 min 存活率还有 8.6%,处里 40 min 才将菌株全部杀死,30 ℃ 环境下硫酸二乙酯的半衰期仅为 1 h;随着硫酸二乙酯处理剂量的增大,菌株的致死率并没有发生显著的变化,再加上硫酸二乙酯本身的毒性,实际生产中处理计量不宜过大,本实验选择 1% 的硫酸二乙酯处理 35 min 的处理计量,结果统计显示:硫酸二乙酯单因子诱变有一定的效果,但不及紫外线单因子诱变效果明显(图 7),仅有 3% 的突变菌株酶活力提高较明显,最高酶活力较出发菌株提高了 19.6%.

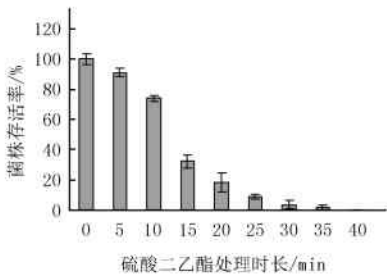


图5 硫酸二乙酯诱变存活率-时间柱状图

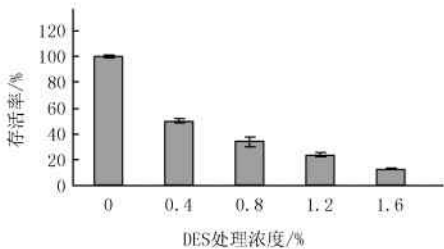


图6 硫酸二乙酯处理剂量存活率柱状图

2.4 UV + DES 超剂量复合诱变结果

参照刘俊梅^[8-9]等人的方法,先用 20 W 紫外灯距离 30 cm 照射 5 min,再用 1.0% 硫酸二乙酯处理 35 min,结果存活率仅剩 0.7%,选取 300 个菌株进行透明圈初筛,再选取 45 株疑似高产突变株进行摇瓶复筛,酶活测定结果显示:复合诱变结果好于单因子诱变结果(图 8),有 10% 的突变菌株酶活力显著提高,其中

突变菌株 *Bacillus subtilis* UDMY-25 的酶活力最高,较原始菌株 *Bacillus subtilis* MY-1 提高了 44.8%.

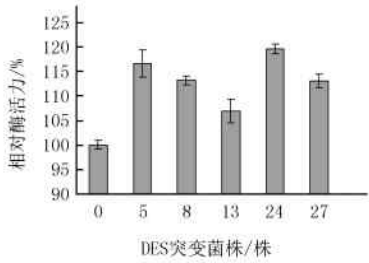


图7 部分DES突变菌株酶活情况

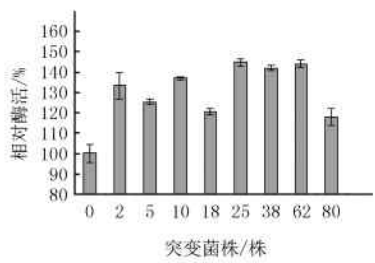


图8 UV-DES诱变部分菌株酶活

2.5 突变菌株产酶稳定性实验

将通过初筛和复筛获得的高产突变菌株 *Bacillus subtilis* UDMY-25 连续传代 5 次,接入发酵培养基,摇床振荡培养 72 h,DNS 法测酶活力;结果如图 9,酶活力稳定在 5 387.2~5 558.2 U/mL 之间,酶活力无明显下降现象,产酶性能基本稳定.

2.6 突变菌株产酶曲线

突变菌株的发酵产酶曲线如图 10 所示,*Bacillus subtilis* UDMY-25 的最佳产酶时间为 60~78 h,与初始菌株没有明显的改变.

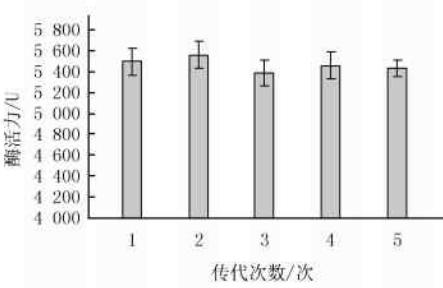


图9 产酶稳定性实验结果

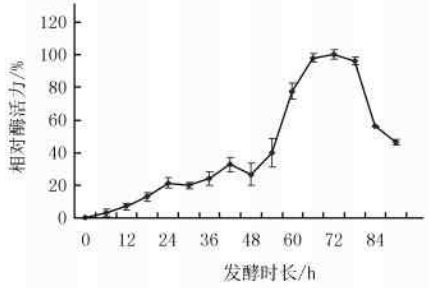
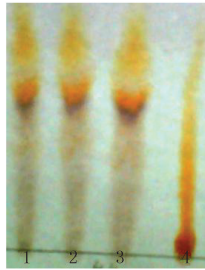


图10 高产突变菌株产酶曲线图

2.7 酶解产物分析

在 0.9 mL 1.0% 的魔芋胶底物中加入 0.1 mL 酶液,50 ℃保温处理 1 h,使之充分反应,加入 2 mL DNS 显色,6 000 r/min离心 5 min 取上清液,同样的方法使甘露糖、葡萄糖和半乳糖显色,以正丁醇、冰乙酸、和水按照 2 : 1 : 1 (V/V)的比例配制展开剂,纸层析法分析结果如图 11 所示,酶解魔芋胶产物多为寡糖,与文献[1,3-4]报道基本一致,保健功能突出,具有极大的市场应用价值.



1. 甘露糖;2. 葡萄糖;3. 半乳糖;4. 魔芋胶酶解物.

3 讨 论

紫外线诱变和硫酸二乙酯诱变是选育优良突变菌株的常用方法之一,紫外线是通过阻碍碱基之间的正常配对引起突变的,而硫酸二乙酯是一种烷化剂,可以引起 DNA 复制时的碱基错配,从而引起突变.单因子诱变虽然有一定的效果,往往不够理想,多因子复合诱变能从不同角度引起菌株遗传物质的改变,往往具有叠加效应^[7, 16].本实验采用紫外线单因子诱变正突变率为 8%,硫酸二乙酯单因子诱变正突变率为 3%,而复合诱变的正突变率为 10%,复合诱变的正突变率大于单因子诱变.超剂量诱变育种就是采用加大诱变剂处理剂量的方法,使杀菌率在 90%~99%,能够筛选酶活力大幅度提高的突变菌株^[7],本实验紫外线单因子诱变,酶活力较初始菌株提高了 33%,硫酸二乙酯单因子诱变,酶活力较初始菌株提高了 19.6%,紫外线-硫酸二乙酯超剂量复合诱变,酶活力提高了 44.8%,超剂量复

图11 水解产物纸层析图

合诱变好于传统剂量诱变剂的诱变效果,与文献[7—10]的结果基本一致。

本实验通过超剂量复合诱变选育了一株高产、稳产葡甘聚糖酶的突变株 *Bacillus subtilis* UDMY-25,传代 5 次,酶活力稳定在 5 387.2 U/mL 以上,处于同领域较高水平^[1, 5-6],酶解魔芋胶产物多为寡糖,具有较高的开发潜力和市场应用价值。虽然突变菌株的发酵产酶时间并没有明显变化,但经过诱变,菌株的部分基因应该发生了改变,其新陈代谢机能也将随之变化^[17-18],对突变菌株培养条件做进一步的优化,以获得更高的产酶效果,也将是今后研究的方向。周海燕^[5, 19]等对魔芋葡甘聚糖酶产生菌 B23 进行 5 L 发酵罐培养,葡甘聚糖酶比活力从 3 174 U/mg 提高到 4 812 U/mg,为本实验后期研究提供了方案。

参 考 文 献

- [1] 王强,李旭,窦少华,等.海洋葡甘聚糖酶菌株的分离鉴定及酶学性质研究[J].中国酿造,2016,35(6):65-69.
- [2] 成莉凤,冯湘沅,段盛文,等.新型 β -甘露聚糖酶制备葡甘寡糖工艺优化[J].食品科学,2016,37(6):34-38.
- [3] SUWANNAPORN P, THEPWRONG K, TESTER R, et al. Tolerance and nutritional therapy of dietary fibre from konjac glucomannan hydrolysates for patients with inflammatory bowel disease (IBD)[J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2013(2): 93-98.
- [4] ZHENG Qiaoran, WU Yinglong, XU Huailiang. Effect of dietary oxidized konjac glucomannan on Schizothorax prenanti growth performance, body composition, intestinal morphology and intestinal microflora[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2015, 41: 733-743.
- [5] 周海燕,周大寨,周毅峰,等.高活性魔芋葡甘聚糖酶产生菌 B23 的鉴定及培养条件优化[J].湖北农业科学,2005(4):67-70.
- [6] 王强,李旭,张旭姣,等.葡甘聚糖酶高产菌株 Q1 发酵条件优化及酶的分离纯化[J].中国酿造,2016,35(5):86-91.
- [7] 施巧琴,吴松刚.工业微生物育种学(第四版)[M].北京:科学出版社,2013.
- [8] 刘俊梅,王庆,王丹,等.紫外线和硫酸二乙酯复合诱变选育 PHB 高产菌株[J].微生物学通报,2016,43(10):2242-2248.
- [9] 张建新,赵杰,陈泽田,等.产 β -甘露聚糖酶内生菌的诱变育种及产酶条件优化[J].基因组学与应用生物学,2014,33(4):815-821.
- [10] 彭燕,李戈,陈秀贤,等.抗生素产生菌诱变育种的研究进展[J].生物技术通报,2007(5):34-39.
- [11] 杨文博,沈庆,佟树敏.产 β -甘露聚糖酶地衣芽孢杆菌的分离筛选及发酵条件[J].微生物学报,1995,22(3):154-157.
- [12] 马向东,柯涛,熊兰,等.一种鉴定多糖水解酶类及其产生菌的新方法[J].微生物学报,2007,46(6):1102-1104.
- [13] ZHOU Haiyan, PAN Hongya, RAO Liqun, et al. Redesign the α/β fold to enhance the stability of mannanase man23 from *Bacillus subtilis*[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2011, 163(1): 186-194.
- [14] 张建新,赵丹丹,刘起丽,等.产 β -甘露聚糖酶内生菌的筛选及酶学特性分析[J].微生物学通报,2011,38(8):1172-1178.
- [15] 刘雪,叶婧,穆长青,等.枯草芽孢杆菌 B-332 菌株发酵条件的研究[J].中国农学通报,2012,28(10):230-235.
- [16] 刁欢,汤强,阮玲玲.诱变育种技术在微生物制药中的应用研究进展[J].长江大学学报(自然科学版),2014,11(35):56-58,73.
- [17] 郑琳,张鹤之,崔泰花,等.化学诱变快速筛选高产甘露醇柠檬明串珠菌株的研究[J].河南农业大学学报,2016,50(4):516-520.
- [18] 白兰芳,徐小敏,武临专,等.西罗莫司产生菌 *Streptomyces hygroscopicus* WY-93 的诱变育种与代谢研究[J].中国抗生素杂志,2001,26(1):35-38.
- [19] 周海燕,周大寨,吴永尧.发酵法生产魔芋葡甘聚糖酶的研究[J].中国食品添加剂,2005(3):21-25.

Overdose mutation breeding of *Bacillus subtilis* for producing glucomannanase

Zhang Dun^{1,2}, Zhang Jianxin¹, Chang Xulu¹, Feng Junchang¹, Guo Xiangrui¹, Gui Xi¹

(1.College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. School of Medicine, Zhoukou Vocational college of Science and Technology, Zhoukou 466000, China)

Abstract: Excessive mutagenesis breeding is to increase the dose of mutagen treatment, increase the rate of mutation, so as to obtain better mutagenic effect. The research started from a parent strain *Bacillus subtilis* MY-1 which could produce glucomannanase. First, we used ultraviolet (UV), diethyl sulfate (DES)'s single factor mutagenesis, and then used composite mutagenesis of UV and diethyl sulfate to culture, as well as initial and secondary screening of the original strain *Bacillus subtilis* MY-1. By observing the clear circles on selective plates and rescreening with rescreening medium, we got a mutant strain named *Bacillus subtilis* UDMY-25 after serially passed 5 times' cultivation, which could produce high-yield glucomannanase and the genetic nature is stable, the enzyme activity (5 387.2 U/mL) increase 44.8% more than the original strain *Bacillus subtilis* MY-1. The ability of the strain to produce glucomannanase is the higher level of the same field, which has a good development potential and market value.

Keywords: glucomannanase; ultraviolet; diethyl sulfate

[责任编辑 王凤产]