

紫外线与微波复合诱变选育 高产脂肪酶菌株的研究

赵兴秀,何义国,赵长青*,方春玉,张静,邹伟

(四川理工学院,四川自贡 643000)

摘要:研究选育高产脂肪酶菌株。采用紫外线诱变、微波诱变和紫外微波复合诱变出发菌株 H3,测定比较酶活,确定最佳诱变效果。结果表明,出发菌株经紫外线和微波诱变后,所产脂肪酶的最高酶活分别为 57.984 U/mL 和 57.1 U/mL,比出发菌株 H3 提高了 38.3% 和 36.2%,经微波辐射 40 s 和紫外线照射 80 s 的复合诱变菌株 M3 产酶活力最高,达 61.6 U/mL,比出发菌株 H3 提高了 46.85%。

关键词:脂肪酶,紫外线,微波,复合诱变,脂肪酶菌株

Research of UV/microwave irradiation for breeding of a high lipase-producing strain

ZHAO Xing-xiu, HE Yi-guo, ZHAO Chang-qing*, FANG Chun-yu, ZHANG Jing, ZOU Wei

(Sichuan University of Science and Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: Breeding of a high lipase-producing strain was studied. The original strain H3 was treated by UV mutation, microwave mutation and compound mutation of 40 s UV and 80 s microwave, the optimum effect was determined by comparing with the enzyme activity. The result showed that the enzyme activity of the strain treated by UV mutation and microwave was 57.984 U/mL and 57.1 U/mL. The enzyme activity was improved 38.3% and 36.2% than H3. The enzyme activity of the stain treated by compound mutation was 61.6 U/mL, it was improved 46.85% than H3.

Key words: lipase; UV; microwave; compound mutation; the strain producing lipase

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)21-0192-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.21.031

脂肪酶(Lipase)是一类特殊的酯键水解酶,广泛应用于食品、化妆品、皮革、洗涤剂、医药、印染、能源等领域^[1]。在食品方面,利用脂肪酶可生成短链脂肪酸酯、乙醛、乙醇等风味物质,增加食品香味^[2],在纺织方面,脂肪酶能水解织物表面脂质成脂肪酸,更易于脱除^[3]。用脂肪酶和淀粉酶协同处理棉布纤维,可使棉布白度提高,手感更柔,染色更好^[4]。在医药方面,脂肪酶可作为诊断工具预测疾病,血清中脂肪酶还可用于检测急性胰腺炎和胰腺损伤^[5]。在生物能源方面,将脂肪酶进行固定化,可催化泔水油合成生物柴油^[6]。目前,有研究将脂肪酶固定在 pH 或氧化电极上,联合葡萄糖氧化酶制成脂质生物传感器,测定人体甘油三酯和胆固醇含量^[7],进一步扩大了脂肪酶的应用前景。

目前,脂肪酶的供应却远远小于需求,研究如何

快速高产脂肪酶,具有很高的经济价值和科研价值,当前脂肪酶主要来源于动植物和微生物,苗长林等采用微波-亚硝基胍诱变方法对米黑根毛霉进行诱变处理,获量 1 株酶活达 20.50 U/mL 的突变菌株^[8]。Beisson F. 等从萌发的向日葵种子分离纯化得到 GDSL 脂肪酶^[9]。由于微生物具有种类多、繁殖快、易发生遗传变异,与底物具有专一性等优点,因此利用微生物产脂肪酶是获到脂肪酶的主要来源,本文通过从富含油脂的土样中富集产脂肪酶菌株,通过紫外和微波等诱变方法,获得了一株高产脂肪酶菌株,对选育和提高菌株高产脂肪酶活力提供了新的手段。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

富集培养基(g/L): (NH₄)₂SO₄ 1.0, NH₄NO₃ 1.0,

收稿日期: 2015-01-28

作者简介: 赵兴秀(1977-),女,硕士,副教授,主要从事微生物研究, E-mail: zhaoxingxiu@sohu.com。

*通讯作者: 赵长青(1981-),女,博士,副教授,主要从事微生物研究, E-mail: 33137390@qq.com。

基金项目: 四川省教育厅项目(14ZA0206, 11ZB244); 绿色催化四川省高校重点实验室项目(LYJ1304); 四川理工学院科研项目(2012PY08); 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室项目(NJ2012-16); 泸州老窖科研奖学金项目(13ljzk05)。

NaCl 1.0, KH_2PO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 橄榄油 10.0, 用 10% NaOH 溶液调 pH 至 9。

平板筛选培养基 (g/L): (NH_4)₂SO₄ 1.0, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NH_4NO_3 1.0, NaCl 1.0, FeSO_4 0.01, 琼脂 20.0, 橄榄油-聚乙烯醇乳化液 12 mL, 8 滴 0.1 g/L 中性红溶液, 用 10% NaOH 溶液调 pH 至 9。

斜面培养基 (g/L): 蛋白胨 5.0, 葡萄糖 5.0, 酵母膏 3.0, NaCl 1.5, KH_2PO_4 1.0, 琼脂 15.0。

种子培养基 (g/L): 蛋白胨 5.0, 蔗糖 5.0, NaCl 3.0, KH_2PO_4 2.0, 酵母浸膏 5.0。

发酵培养基 (g/L): 蛋白胨 20.0, 蔗糖 5.0, 橄榄油 5.0, (NH_4)₂SO₄ 1.0, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0。

SP-Max 2300A 酶标仪 上海闪谱生物科技有限公司; D8023CTL-K4 微波炉 顺德格兰仕电器有限公司; ZYT-DDT 紫外线诱变台 济南杰康净化设备厂。

1.2 产脂肪酶菌株的筛选

1.2.1 取样培养 从自贡地区油坊土壤、饭店、食堂油烟机排气孔等富油土壤中取土样 25 g 于 225 mL 无菌生理盐水中, 用玻璃珠打散, 浸泡 30 min。取 5 mL 土壤悬液加入到 30 mL 富集培养基中, 于 37 °C 摇床振荡培养 3 d。

1.2.2 分离与初筛 将富集培养的菌悬液加入无菌生理盐水中, 分别配制成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 的菌悬液。将各浓度菌悬液均匀涂布于筛选培养基, 于 37 °C 恒温培养 3 d。观察菌落出现的变色圈, 挑取变色圈大而变色明显的菌体于筛选平板上划线分离培养, 再转接于斜面培养基低温保存。

1.2.3 复筛 将各斜面培养基上菌种分别接种于种子培养基, 于 37 °C、160 r/min 摇床培养 12 h 后, 以 6% 接种量接入产酶发酵培养基, 于 37 °C、160 r/min 培养 3 d。将各发酵液于 5000 r/min 离心 15 min, 取上清液测酶活, 选取酶活最高的菌株作为本实验出发菌株。

1.3 脂肪酶活力测定

采用对硝基苯酚法测脂肪酶活力^[10]。

1.4 诱变

1.4.1 紫外诱变 取 10 mL 菌悬液置于无菌培养皿中, 在 30 cm 处用 30 W 紫外灯照射, 同时磁力搅拌, 照射时长分别为 20、40、60、80、100、120 s。每组做多个重复。诱变后, 取 0.2 mL 菌悬液涂布到初筛平板培养基中, 于 37 °C 避光培养 3 d, 以出发菌株作空白对照, 待平板长出菌落后, 计算致死率, 最后将各时间段菌种接种到斜面培养基上培养, 挑取菌落较深的菌落进行发酵培养, 取上清液测酶活。

1.4.2 微波诱变 将菌悬液置于微波炉中用同一功率处理 10、20、30、40、50、60、70 s, 每组 3 个重复。诱变后, 取 0.2 mL 菌悬液涂布到初筛平板培养基中, 于 37 °C 避光培养 3 d, 以出发菌株作空白对照, 待平板长出菌落后, 计算致死率。最后将各时间段菌种接种到斜面培养基上培养, 挑取菌落较深的菌落进行发酵培养, 取上清液测酶活。

1.4.3 复合诱变 选取致死率在 70%~80% 时间段的紫外诱变菌种于微波中进行再次诱变, 通过初筛和复筛, 对目标菌株发酵培养, 取上清液测酶活。每组 3 个重复, 选取最高产酶菌株作为目的菌株。

致死率 (%) = $1 - (\text{处理后菌落中的活菌数} / \text{对照原菌液中的活菌数}) \times 100$

参考单因素诱变所得的致死曲线, 利用产酶活力最高的紫外线和微波菌悬液, 进行复合诱变, 诱变方法为: 1. 紫外线 60 s + 微波 40 s; 2. 紫外线 60 s + 微波 50 s; 3. 紫外线 80 s + 微波 40 s; 4. 紫外线 80 s + 微波 50 s。

2 结果与分析

2.1 出发菌株的确定

通过初筛, 得到了 11 个变色圈大而变色明显的菌体, 再进行分离复筛, 得到了 3 株产脂肪酶菌株, 分别命名为 H1 (图 1)、H2 (图 2) 和 H3 (图 3), 从图 1、图 2 和图 3 可以看出, 3 株菌的变色圈较大, 均呈米黄色, 然后发酵培养, 测定其上清液酶活, 测定结果见图 4。

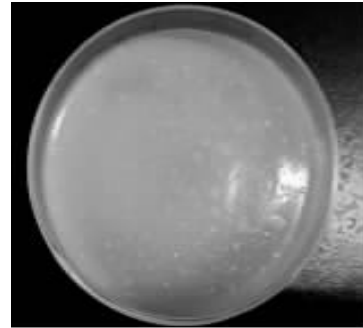


图 1 菌株 H1 生长菌落
Fig.1 The colony of Strain H1

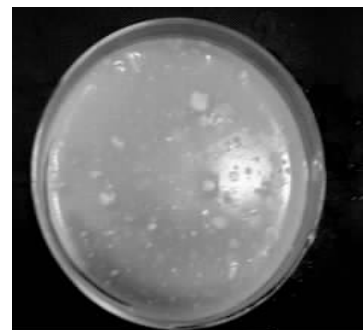


图 2 菌株 H2 生长菌落
Fig.2 The colony of Strain

由图 4 可知, 在同等条件下, 菌株 H3 酶活力最高, 达到 41.9 U/mL, 因此选择 H3 作为出发菌株, 用于后续诱变实验。

2.2 菌株的革兰氏染色鉴定

将紫外诱变前和诱变后的菌液接种到平板培养基中, 再进行斜面培养、革兰氏染色和镜检, 得到如图 5 和图 6 的实验结果。

从图 5 和图 6 可以看出, 诱变前后的微生物在革兰氏染色下均呈现蓝紫色, 证明为革兰氏阳性菌。

2.3 紫外诱变酶活测定



图3 菌株 H3 生长菌落
Fig.3 The colony of Strain H3

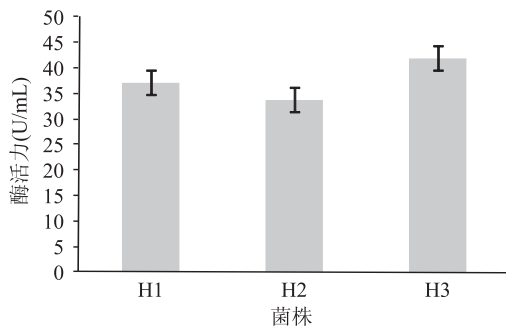


图4 复筛菌株酶活测定

Fig.4 The enzyme activity of the stains by secondary screening

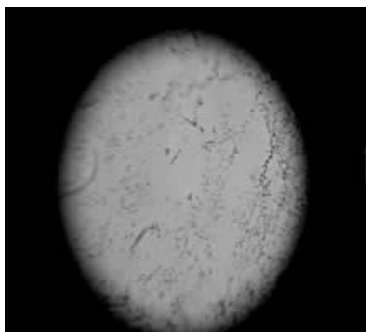


图5 紫外诱变前菌株 H3 镜检图(40 ×)

Fig.5 The microscopic of H3 before UV mutagenesis(40 ×)

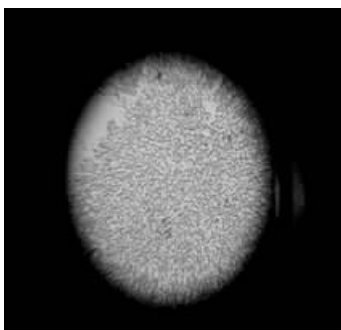


图6 紫外诱变后菌株 H3 镜检图(40 ×)

Fig.6 The microscopic of H3 after UV mutagenesis(40 ×)

将诱变培养的细菌置于菌落计数仪上计数,以未紫外照射细菌为对照,算出不同照射时间段菌株的致死率,以致死率为纵坐标,诱变时间为横坐标,绘制致死曲线,如图7。将各诱变时间段的菌株进行发酵培养,然后测其酶活,结果如图8。

从图7可以看出,随着紫外照射时间的增长,细

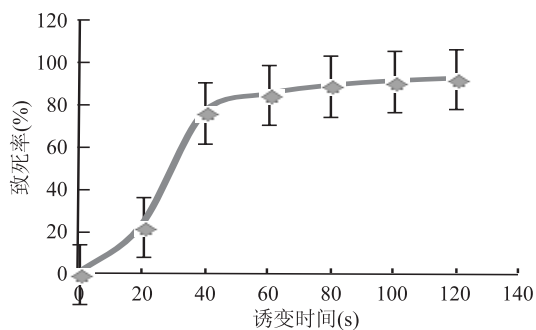


图7 菌株 H3 紫外诱变致死曲线

Fig.7 The lethal curve of H3 by UV mutagenesis

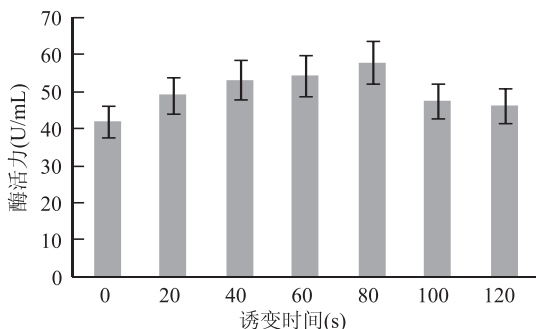


图8 菌株 H3 紫外诱变产酶活性

Fig.8 The enzyme activity of H3 after UV mutagenesis

菌的致死率在逐渐增大,紫外线对细菌的突变方向也有影响,有资料表明,致死率在85%~95%范围内单位存活的菌体正突变较多^[11],从图8也可以得出,在诱变时间为80 s时,其菌株产酶活力最高,达到57.9 U/mL,比出发菌株的菌活提高了38.2%。所以在进行紫外线与微波复合诱变时,紫外线照射选择60~80 s。

2.4 微波诱变酶活测定

将诱变培养的细菌置于菌落计数仪上计数,以未微波辐射细菌为对照,算出不同辐射时间段菌株的致死率,以致死率为纵坐标,诱变时间为横坐标,绘制致死曲线,如图9。将各诱变时间段的菌株进行发酵培养,然后测其酶活,结果如图10。

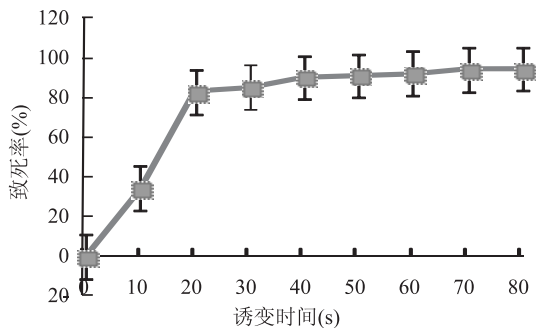


图9 菌株 H3 微波诱变致死曲线

Fig.9 The lethal curve of H3 by microwave mutation

由图9可以看出,随着微波辐射时间的延长,细菌的致死率在逐渐增大,表明微波诱变后会呈现明显的致死规律,微波对细菌的生长有较强的影响。由图10可知,当微波诱变时间为40 s时,其菌株产酶活力最强,达到57.1 U/mL。

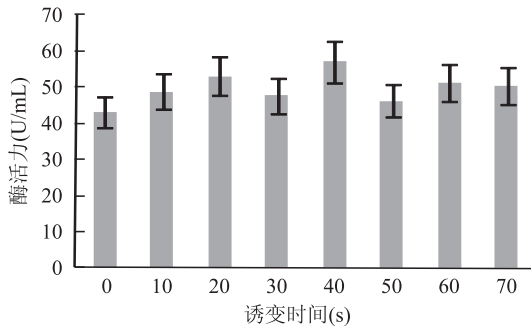


图10 菌株H3微波诱变产酶活性

Fig.10 The enzyme activity of H3 after microwave mutation

2.5 复合诱变结果

通过1.4.3复合诱变的4种方法,得4株产酶活性较高菌株,分别命名为M1、M2、M3和M4,其酶活测定结果如图11。

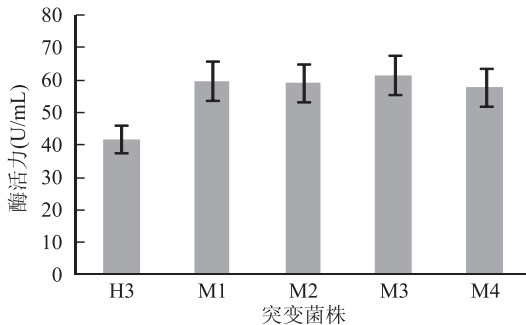


图11 不同菌株产酶活性

Fig.11 The enzyme activity of H3, M1, M2, M3 and M4

从图11可以看出,复合诱变中,利用方法3所得突变菌株M3产酶活力最高,达到61.6 U/mL,均高于紫外和微波单因素诱变结果。说明复合诱变效果更好,该诱变菌株可以用于脂肪酶产酶实验。

3 结论与讨论

选育高产脂肪酶菌株的文献,已有不少报道。谭珍连等^[12]以白地霉GXU08为出发菌,通过紫外诱变,得到菌株4-39,其酶活为14.2 U/mL符小燕等^[13]将广式腊肠中株葡萄球菌进行微波和紫外单独诱变、微波复合紫外和紫外叠加诱变等方法,获得1株产脂肪酶酶活力为5.26 U/mL的菌株。冀颐之等^[14]采用低能N⁺离子注入技术,对少根根霉BUCT-11进行诱变选育,筛选到高产脂肪酶突变株N103,在摇瓶发酵条件下,其脂肪酶水解酶活为175 U/mL。本实验通过初筛、复筛及紫外、微波诱变,最终获1产酶活性达61.6 U/mL的突变菌株M3。本菌株与其他文献报道脂肪酶活力不同的原因可能有以下三个方面:分离筛选的菌种不同;脂肪酶水解目标物不同;对脂肪酶酶活的定义不同。本实验直接从富油土样中筛选产脂肪酶菌株,使出发菌株本身就具有较高分解和利用脂肪的能力,再通过诱变选育,所得的产

酶活力更强的菌株更有利于分解环境中油类脂肪。如果优化菌株M3的产酶条件,其酶活可能会更高。有研究认为,由于外力影响DNA的正常复制和转录,从而使子代DNA形成缺口,碱基错误插入该缺口,造成新链的碱基序列与母链不同而使诱变能提高菌株产酶活性^[15]。如果能够测得从出发菌株到经诱变选育所得的目的菌株的基因图谱,对比分析找出导致菌株产酶活力增大的控制基因,将有利于从分子水平对菌株产酶活性进行定向选育,这也是本实验亟需完成的后续工作。

参考文献

- [1]戴清源,朱秀灵.非水相中脂肪酶催化合成糖酯类食品添加剂的研究进展[J].食品工业科技,2012,33(10):385-389.
- [2]汪薇,白卫东,赵文红.生物法制备奶味香精的研究进展[J].中国调味品,2009,34(4):27-30.
- [3]EI-syed H, Hamed R R, Kantouch A, et al. Enzyme-based felt proofing of wool[J]. AATCC Rev, 2002, 2(1): 25-28.
- [4]胡学智.酶制剂工业概况及其应用进展[J].工业微生物, 2003, 33(4): 32-41.
- [5]何义国,赵兴秀.脂蛋白酯酶的分离纯化及其部分性质研究[J].四川理工学院学报:自然科学版,2012,25(6):1-5.
- [6]李宇辉,刘成江,王俊钢,等.微生物脂肪酶的性质及应用研究现状[J].食品工业,2013(9):162-165.
- [7]宋英攀,冯苗,詹红兵.石墨烯纳米复合材料在电化学生物传感器中的应用[J].化学进展,2012,24(9):1665-1673.
- [8]苗长林,罗文,吕鹏梅,等.脂肪酶产生菌微波-亚硝基胍复合诱变及培养条件优化.林产化学与工业,2013,33(5):30-34.
- [9]Beisson F, Gardies AM, Teissere M, et al. Anesterase neosynthesized in post-germinated sunflower seeds is related to a new family of lipolytic enzymes. Plant PhysiolBiochem, 1997, 35(10):761-765/.
- [10]王欢,何腊平,周换景,等.脂肪酶活力测定方法及其在筛选产脂肪酶微生物中的应用[J].生物技术通报,2013,23(1):203-208.
- [11]穆昭艳,汪立平,张大兵,等.异甘露聚糖酶生产菌的诱变育种及固态发酵条件的优化[J].食品科学,2012,33(15):220-225.
- [12]谭珍连,梁静娟.原生质体紫外诱变选育白地霉GXU08脂肪酶高产菌株[J].生物技术,2007,17(2):42-44.
- [13]符小燕,郭善广,蒋爱民.广式腊肠中高产脂肪酶葡萄球菌的选育[J].食品与机械,2010(4):5-9.
- [14]冀颐之,李政,谭天伟,等.低能N⁺离子注入选育少根根霉脂肪酶高产菌株[J].食品工业科技,2011(7):197-200.
- [15]曹国珍,陆栋,张苗苗,等.重离子辐照酿酒酵母DNA损伤修复途径研究进展[J].激光生物学报,2013,22(3):201-209.