

· 离子束生物工程 ·

离子束诱变木聚糖酶产生菌(*Aspergillus niger* A3) 筛选方法的比较研究

李市场¹, 白爱枝², 姚建铭¹, 潘仁瑞¹, 余增亮¹

(1. 中国科学院离子束生物工程学重点实验室, 等离子体物理研究所, 中国安徽 合肥 230031

2. 内蒙古大学, 中国内蒙古, 呼和浩特 010021)

摘要: 木聚糖酶产生菌株的初筛方法主要分为平板法和液体发酵法。它们都有一定的优点和不足。找出适宜于离子束诱变育种的初筛方法, 是必要而且是必须的。本文就木聚糖酶产生菌的几种初筛方法做了比较研究, 以便找出适宜于离子束诱变高产木聚糖酶菌株育种的初筛方法。

关键词: 离子注入; 木聚糖酶; 透明圈; 摇瓶发酵

中图分类号: Q691

文献标识码: A

文章编号: 1007-7146 (2002) 02-0149-04

A Comparative Study on Several Screening Methods to High Xylanase-producing Strains by Ion Implantation

LI Shi-chang¹, BAI Ai-zhi², YAO Jian-ming¹PAN Ren-rui¹, YU Zeng-liang¹

(1. Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering of Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, Anhui, China;

2. Inner Mongolian University, Huhhot 010021, Neimenggu, China)

Abstract: Screening methods of high xylanase-producing strains have a plate isolation technique and shake-flask fermentation technique. It is necessary and indispensable for us to find out an optimal screening method. In this article, several screening techniques were studied, in order to find out a good method that fits for xylanase-producing strains by Ion implantation.

Key words: ion-implantation, xylanase, the transparent halos, shake-flask cultures

半纤维素是一种异质多糖, 在植物性材料中占15—30%, 是陆生植物细胞壁的一种主要组分^[1]。木聚糖酶是一类重要的半纤维素酶, 微生物分泌的木聚糖酶可降解半纤维素生成的木糖及其它少量的单糖, 它不仅在生物转化、食品与饲料工业方面的应用已较为成熟, 而且在制浆造纸工业中的应用正在引起人们的高度重视, 故开发和研制木聚糖酶工业制剂的研究工作已倍受国内外关注。国外已有不少研究者对黑曲霉^[2]、木霉(*Trichoderma sp.*)^[3]等真菌及短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)^[4]、环状芽孢杆菌

(*B. circulans*)^[5]等细菌的木聚糖酶进行了研究, 国内也有对木聚糖酶研究的报道^[6,7,8]。作者以离子束为诱变源来诱变木聚糖酶产生菌, 以便筛选到高产木聚糖酶的菌株。而菌种的选育工作不仅费时而且工作量巨大, 因而确定适当、有效的初筛方法, 对菌种的选育是非常有益的, 而且也不漏掉高产菌株的筛选。本文就离子束这一特殊的诱变源用来诱变木聚糖酶产生菌的过程中, 对选育菌株的几种初筛方法做了比较研究, 目的是找出适宜于木聚糖酶产生菌株选育的初筛方法。

基金项目: 国家十五攻关项目; 离子束应用技术研究, 课题号: 2001BA302B。
收稿日期: 2003-01-21

1 材料与方法

1.1 菌种

黑曲霉 A3 (*Aspergillus niger* A3), 由合肥联合大学提供。

1.2 培养基与培养方法

1.2.1 产生孢子培养基: PDA 培养基 (g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20, PH 值自然。

1.2.2 菌种保存培养基 (g/L): 麸皮 5, 蛋白胨 1, 琼脂 20, 用改良的 Mandels 营养盐^[9]配制。

1.2.3 孢子悬液制备: 向种子斜面中加入适量的无菌水, 洗脱, 并稀释一等的倍数配制成所需浓度的孢子悬液。

1.2.4 发酵培养: 在 250ml 的三角烧瓶中加入适量的玉米芯和 30ml 的改良的 Mandels 营养盐液, 在 28℃, 150r/min 下恒温振荡培养 72 小时。

1.2.5 平板的制备: 双层平板的下层为水琼脂, 上层为半纤维素 (g) 与 Mandels 盐液 (ml) 按 2:100 比例配制而成。单层平板的制备与双层平板的上层培养基相同。制备好的平板, 在 28℃ 下存放数小时后备用。

1.3 测试方法

1.3.1 木聚糖酶活力的测定: DNS 法, 参照文献 [10]。以木糖为标准, 每分钟生成 1 μ mol 还原糖定义为 1 个酶活力单位 (IU / ml)。

1.3.2 透明圈: 用游标卡尺测量

1.3.3 试剂: Xylan (From Birchwood) 是 Sigma 公司产品, 其余的试剂均为分析纯 (A. R.) 和化学纯

(C. R.)。

1.3.4 半纤维素的制备: 参照文献 [11, 12]。

1.3.5 离子注入工艺: 取适量的孢子悬液涂平皿 → 涂好的平皿在无菌操作台上吹干 → 用 10keV 的能量和一定的剂量的 N⁺ 离子进行注入 → 用无菌水洗脱平皿上的孢子 → 把洗脱的孢子悬液涂在已经置备好的单层平板或双层平板上。

1.3.6 离子束辐照装置

本研究所用的离子束辐照装置是由本实验室研究的。该注入装置由离子源、聚焦系统、质量分析、加速系统、真空系统、靶室和测控系统等基本部分构成。工作原理为: 由离子源产生等离子体, 其中的离子经引出系统引出, 进入质量分析器选择, 然后在加速系统中获得能量后, 即可进行样品注入。其中真空系统是获得束线的基本保障, 聚焦系统是为控制束散而设置的。

2 结果与讨论

2.1 透明圈法

木聚糖酶产生菌的初筛方法主要可以分为平板法和液体发酵法。平板法最常用有有色平板法、单层平板法和双层平板法, 我们比较实验了后两种方法。

2.1.1 单层平板法

经过离子束辐照过的孢子, 从平皿上洗脱, 并稀释, 把经过稀释的孢子悬液涂在已配制好的单层平板上。在 28℃ 下培养数小时后观察透明圈的大小 (见图 3), 并测量其菌斑与菌落的直径 (见表 2)。

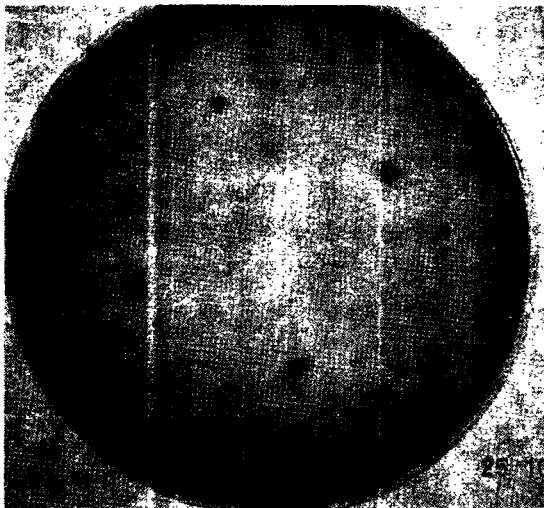


图 1 单层平板所产生的透明圈

Fig. 1 Transparent halos produced in mono-layer

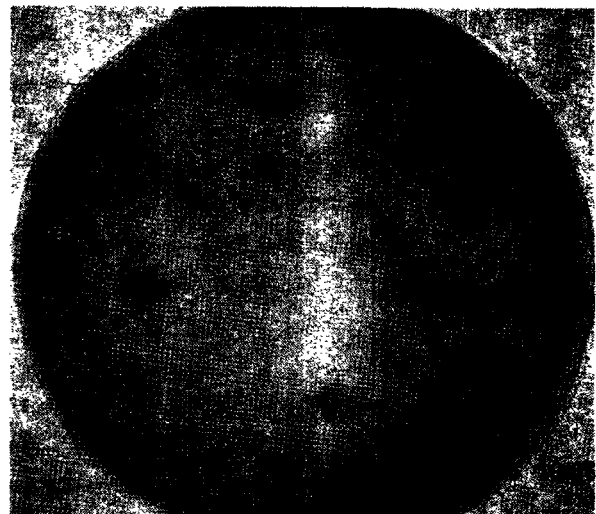


图 2 双层平板所产生的透明圈

Fig. 2 Transparent halos produced in double-layers

2.1.2 双层平板法

把用离子束辐照后的孢子用无菌水稀释到一定的浓度,涂到双层平板上,在 28℃ 的温度下培养一定的时间。等到出现适当大小的透明圈时(图 4),测量透明圈和菌落的大小(表 2)。

2.2 液体发酵筛选法

把单层平板(图 3)上所标记的四个产生较大透明圈菌斑挑到种子斜面上培养四天,然后用无菌水洗脱孢子,并接种一定量的孢子到液体培养基中进行摇瓶发酵。初筛和复筛的结果见表 1。

表 1 液体发酵初筛和复筛木聚糖酶活力的测定
table 1 Mensuration of xylanase in shake-flask cultures

菌株编号 Number of strains	初筛时的酶活 (IU/ml) Xylanase activity in first screening	复筛时的酶活 (IU/ml) Xylanase activity in Second screening
1	325	310
2	322.5	298
3	326	336
4	305	302
CK	305	300

2.3 结果分析

由于透明圈大小不能完全代表酶的活力,仅以水解圈大小作为木聚糖酶的活力大小的定量指标并不可靠。一般的情况下,透明圈产生的早晚、透明圈是否清晰,可以粗略判断产酶时间和酶系情况。一般透明圈出现的越早,酶类产生也越早;透明圈越清晰,说明半纤维素降解越彻底。并且水解圈与菌落的比值越大,该菌株所产生的木聚糖酶的酶活也越高。但是从表 2. 中我们可以看出,事实并不是这样,其原因可能是多方面的。根据研究认为,造成表中结果的主要原因是菌株在用低能离子束进行注入诱变时,为了达到较好的诱变效果,通常的结果是使菌种达到 99% 以上的致死率。因为死亡率越大,菌株受到的损伤也越大,它的 DAN 链断裂的机会就越多,在菌株修复期间,基因的突变的机率就越大,筛选到的突变菌株就越多。而菌株在琼脂平板上培养基上进行修复、生长期间,由于受到损伤大的菌株修复的时间也就越长;并且突变后菌株的发酵条件也不同,这就造成在同等条件下菌斑所产生的透明圈的大小也就不同。因此,如果用平板法对离子束诱变后的菌种进行筛选时,往往可以使辐照后的所得的高产菌株就会被筛选掉。有时透明圈也并不都是很清晰,总

有一定的模糊程度,因而在透明圈测量的时候,它的模糊不清也给透明圈的测量带来一定的困难,这也为菌株的准确筛选带来一定的难度,所以平板法不适宜于离子束诱变育种的初筛。

表 2 单层平板透明圈与木聚糖酶活力的测定
Table 2 Mensuration of transparent halos in mono-layer and xylanase activity

菌株编号 Number of strains	水解圈直径 Diameter of transparent halos (D, mm)	菌落直径 Diameter of colony (d, mm)	D/d	液体发酵酶活力 Xylanase activity in shake-flask cultures (IU/ml)
1	18.54	8.22	2.25	310
2	17.54	6.54	2.68	298
3	16.40	7.20	2.78	336
4	16.40	6.72	2.44	302
CK	\	\	\	300

而根据表 1 的结果可以看出液体发酵的初筛方法在离子束诱变育种中是一种有效的初筛方法。与透明圈法相比,尽管这种方法较为麻烦,但是它能保证初筛结果的准确性,以免高产菌株给遗漏掉。

从文献^[13, 14]可以看出平板法适合用于那些不经过诱变的菌株的筛选或对于那些经过诱变,但对菌株伤害不严重的诱变筛选,如从其他菌或土壤中筛选出能产生透明圈的菌株,或经过紫外线诱变的菌株等。另外从图 3. 图 4. 中可以看出用单层平板法和双层平板法筛选菌株差别不是很大,但是用自制的甘蔗渣半纤维素制成平板要比买来的木聚糖的在用透明圈法筛选菌株效果要好的多,透明圈也比进口的木聚糖产生的透明圈清晰。

从上面关于离子束诱变筛选木聚糖酶高产菌的初筛方法的比较研究可以看出,几种初筛方法各有利弊。为避免高产菌株的遗漏,平板法并不适用于经过离子束诱变后的菌株的筛选,而液体发酵却能够保证筛选结果的准确可靠性。本实验为今后的关于离子束诱变高产木聚糖酶菌株的大批量筛选打下了基础。

References

- [1] WU Dong-fu. Biochemistry of saccharide[M]. Beijing: Higher Education Press, 1978. 362-364(in Chinese).
- [2] COATA-FERREIRA M, DIAS A, et al. Xylanolytic enzyme production by an *Aspergillus niger* isolate [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1994, 44: 231-242.
- [3] TENKANEN M, PULS J and POUTANEN K. Two

- major xylanases of *Trichoderma reesei* [J]. *Enzyme Microb Technol*, 14:566-574.
- [4] PANBANGRED W, SHINMYO A, KINOSHITA S, et al. Purification and Properties of endoxylanase produced by *Bacillus pumilus*[J]. *Agric Biol Chem*, 1983, 47: 957~963.
- [5] LIU Yue-ying, ZHENG Zhong-hui, et al. Studies on xylanase production by *Aspergillus Clavatus* 22 [J]. *Microbiology*, 1993, 20(6): 331~335.
- [6] KONG Jian, MA Gui-ming, et al. Xylanase production on starch waste with solid state fermentation by *Asp. Nigr As7* [J]. *Food and Fermentation Industries*, 1992, (3): 13-16(in Chinese).
- [7] LIU Yue-ying, ZHENG Zhong-hui, FU Yu-xiao. Studies on xylanase production by *Aspergillus Clavatus* 22 [J]. *Microbiology*, 1993, 20(6): 331~335 (in Chinese).
- [8] WU Ke, CAI Jing-min, LIU Bin, PAN Ren-rui. Isolation and purification of xylanase from paccilomyces varioti bairner [J]. *Industrial Microbiology*, 1998, 28(2): 31~34 (in Chinese).
- [9] WU Ke, CAI Jing-min, LIU Bin, et al. studies on the properties of xylanases of *Aspergillus Niger* A3 [J]. *Mycosystema*, 2002, 19(3): 383-388.
- [10] BAILEY MJ, et al. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity [J]. *Biotechnol*, 1992, 23: 257-270.
- [11] WANG Yi-lei, DENG Zhen-xu. Rapid screening of xylanolytic bacteria using transparent halos [J]. *Biotechnology*, 2000, 10(1): 37~39(in Chinese).
- [12] BRECCIA J D, Castro G R, et al. Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method [J]. *Journal of Applied Bacteriology*. 1995, 78: 469~472.
- [13] XU Zheng-hong, BUI Yun-ling, SUN Wei, YAO Wen-yi. Screening and fermentation conditions of a bacterial strain over-producing xylanase. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40(4): 440-442(in Chinese).
- [14] KIM S W, MOON K H, TAE B S. Simple and rapid method for the isolation of *Aspergillus niger*, mutants with enhanced cellulase and xylanase activity [J]. *Biotechnology Techniques*, 1996, 10(10): 735-736.

致谢:感谢合肥联合大学的吴克、刘斌等老师在出发菌株培养条件方面给予的帮助。



作者简介

李市场:男,1976年出生,博士研究生,主要从事利用离子束生物工程技术进行术聚糖酶菌株育种的研究。

Biography

LI Shi-chang: male, Doctor, born in 1976. He is interested in focusing on studying on breeding and mutation of xylanase-producing strains by ion implantation technology.