

同步辐射对黑曲霉 β -葡萄糖苷酶 产生条件及酶学性质的影响

潘利华, 罗建平*, 罗水忠
(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘 要: 本实验对出发菌黑曲霉 M85 和经软 X 射线 Nk 同步辐射所得突变株(产 β -葡萄糖苷酶)的营养条件、培养条件和产酶动力学进行了比较, 并研究了两菌株 β -葡萄糖苷酶的酶学性质。实验结果表明, 与出发菌相比, 突变株在营养需求、培养条件、产酶动力学和产物的酶学性质都有所改变。突变株的氮源谱更宽, 对 KH_2PO_4 的需求从 0.2% 降为 0.1%; 培养条件实验表明突变株需氧量增加; 突变株发酵周期缩短了 16h, 产酶能力提高了约 80%; 突变株 β -葡萄糖苷酶的最适反应温度从 60℃ 降为 50℃, 最适反应 pH 由 4 升为 5。

关键词: 黑曲霉; β -葡萄糖苷酶; 软 X 射线; 酶学性质

Effects of X-Ray Nk Synchronous Radiation on Production and Characteristics of
Aspergillus niger β -glucosidase Mutant

PAN Li-hua, LUO Jian-ping*, LUO Shui-zhong
(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: Production and characteristics of two β -glucosidase strains, *Aspergillus niger* M85 and its mutant obtained by soft X-ray Nk, synchrotron irradiation were studied. The results showed that the nutrient demands, culture condition, β -glucosidase production kinetics and properties of the mutant strain are distinctively changed in comparison with the original strain M85. The spectrum of nitrogen sources of the mutant has been broadened and the demand of KH_2PO_4 reduced from 0.2% to 0.1%. The mutant was addicted to enough oxygen. The fermentation kinetics test showed that fermentation cycle of the mutant is shortened by 16 hours and the β -glucosidase activity is raised about 80%. The optimal temperature and pH for the mutant β -glucosidase reaction are shifted from 60 °C to 50 °C and from 4.0 to 5.0, respectively.

Key words *Aspergillus niger*; β -glucosidase; soft X-ray; enzymatic properties

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)05-0245-05

β -葡萄糖苷酶(EC3.2.1.21), 能够水解多种 β -葡萄糖苷, 同时释放出葡萄糖和相应的配基。它在不同的生物体中具有多种生物学功能^[1]。它与其他纤维素酶共同作用, 可以将自然界中含量丰富的纤维素水解成人类可以直接利用的能源物质葡萄糖。植物中 β -葡萄糖苷酶在防御害虫方面起着非常重要的作用。在医学上, β -葡萄糖苷酶可用于一些肿瘤疾病的诊断和治疗。人缺乏 β -葡萄糖苷酶, 可以引起葡萄糖苷-N-脂酰鞘氨醇在巨噬细胞溶酶体内积累, 引发戈谢病(Gaucher disease)。 β -葡萄糖苷酶食品工业中的应用更加广泛, 它有助于酿酒、制茶、果汁生产等过程中香气物质的

形成, 也是生产天然蓝色素花青素的关键酶, 此外, 它能够水解大豆异黄酮糖苷生产大豆异黄酮活性苷元。因此, 对 β -葡萄糖苷酶的研究具有重要的理论和实用价值。

β -葡萄糖苷酶存在于自然界许多植物、昆虫、酵母、曲霉、木霉及细菌体内。但是, 目前主要用微生物发酵的方法获得 β -葡萄糖苷酶, 由于酵母、细菌产生的酶大部分是胞内酶, 不易提取, 因此, 产生胞外酶的霉菌倍受青睐, 不产生毒素的黑曲霉已成生产 β -葡萄糖苷酶的典型代表菌株之一。但是, 黑曲霉发酵 β -葡萄糖苷酶普遍存在酶活力低、发酵周期长等缺

收稿日期: 2007-04-19

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(050410301); 合肥工业大学科学发展基金项目(053001F)

作者简介: 潘利华(1973-), 女, 讲师, 博士研究生, 研究方向为农产品加工生物技术。E-mail: lihuapan@163.com

*通讯作者: 罗建平(1966-), 男, 教授, 博士, 研究方向为细胞培养。E-mail: jianpingluo1966@yahoo.com.cn

陷^[2], 因此, 选育酶活力高、发酵周期短、不产毒素的 β -葡萄糖苷酶生产菌是人们亟待解决的问题。

诱变育种是一种重要的不可替代的育种手段。在发酵工业中使用的优良菌株, 几乎都是通过诱变育种而大大提高了生产性能的菌株。同步辐射软X射线是一种新的诱变源, 具有频谱宽、连续可调、通量大、亮度高、偏振性好等优点, 在疾病治疗、基因工程工业、微生物工业、良种选育等领域有着广泛且重要的应用价值。已有的试验^[3-4]结果证明, 同步辐射软X射线对微生物芽孢和孢子有一定的诱变作用。但同步辐射软X射线对黑曲霉的诱变效应尚未见报道。本实验利用国家同步辐射实验室软X射线辐照黑曲霉孢子, 研究出发菌黑曲霉M85和诱变后突变株的 β -葡萄糖苷酶产生条件及酶学性质变化, 对进一步开展同步辐射诱变育种具有理论和应用意义。

1 材料与方法

1.1 菌株

1.1.1 出发菌株

黑曲霉(*Aspergillus niger*)M85 上海工业微生物研究所。

1.1.2 突变株

黑曲霉M85经同步软X射线Nk辐射诱变所得。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基

PDA培养基。

1.2.2 种子培养基

可溶性淀粉2%, 葡萄糖1%, KH_2PO_4 0.15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, 酵母膏0.5%, NaNO_3 0.3%, pH自然。

1.2.3 产酶基础培养基

麸皮4%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, pH自然。

1.3 培养方法

1.3.1 PDA斜面平板培养

$30 \pm 1^\circ\text{C}$, 培养3~4d。

1.3.2 种子培养

100ml三角瓶装入10ml种子培养基, 115°C 灭菌20min, 按 $10^5 \sim 10^6$ 个孢子/ml的量接种, $30 \pm 1^\circ\text{C}$, 200r/min培养20~24h。

1.3.3 产酶培养

500ml三角瓶按试验需要装入一定量发酵培养基, 115°C 灭菌20min, 接入10%的对数期种子培养液, $30 \pm 1^\circ\text{C}$, 200r/min培养60h。

$\pm 1^\circ\text{C}$, 200r/min培养60h。

1.4 同步软X射线Nk辐射诱变

参考文献[4]进行。通过初筛和复筛, 得一株 β -葡萄糖苷酶产量提高、遗传稳定的突变株。

1.5 酶活力的测定

培养液0.1MPa真空抽滤, 取滤液; 滤液于12000r/min离心10min, 上清液即为粗酶液。取适当稀释的酶液0.1ml于试管中, 加入5mmol/L的对-硝基苯基- β -D-葡萄糖苷(p-NPG) 0.2ml和pH5.0醋酸缓冲溶液0.7ml, 45°C 反应30min。反应结束后向反应体系中加入2ml 0.5mol/L的 Na_2CO_3 溶液终止反应, 再加水到12ml, 在400nm波长下测吸光度。加热失活的酶液为空白对照。产酶条件研究时, 取35%~80%饱和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的沉淀溶解液为酶液; 酶学性质研究时, 取过DEAE-52柱后的 β -葡萄糖苷酶活性组分为酶液。

酶活力的定义: 在上述测定条件下每分钟释放出 $1\mu\text{mol}$ 对-硝基苯酚所需要的酶量为一个酶活力单位(U)。

相对酶活力: 以各自处理条件下的最高酶活力为100%, 与各自活性最大值的相对活性。

2 结果与分析

2.1 同步辐射前后黑曲霉M85的产酶条件

2.1.1 不同碳源、氮源和磷源浓度对产酶的影响

根据报道^[5], 改变产酶基础培养基中对黑曲霉产 β -

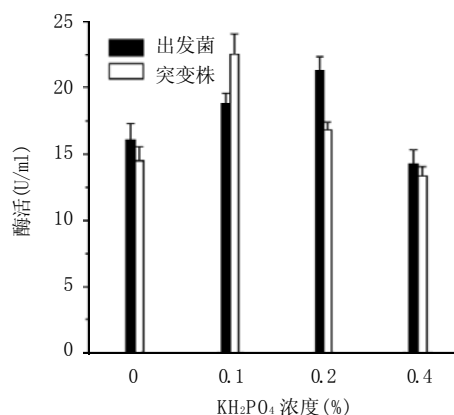


图1 不同 KH_2PO_4 浓度对产酶的影响
Fig.1 Effects of KH_2PO_4 concentration on β -glucosidase production

表1 不同碳源对产酶的影响($\bar{X} \pm \text{SD}$)
Table 1 Effects of various carbon sources on β -glucosidase production ($\bar{X} \pm \text{SD}$)

碳源	酶活 (U/ml)	
	出发菌	突变株
麸皮	3.12 ± 0.54	13.53 ± 1.01
玉米粉	1.32 ± 0.33	10.89 ± 1.21
可溶性淀粉	1.03 ± 0.3	8.11 ± 0.64

表2 不同氮源对产酶的影响($\bar{X} \pm SD$)
Table 2 Effects of various carbon sources on β -glucosidase production ($\bar{X} \pm SD$)

氮源	酶活(U/ml)	
	出发菌	突变株
尿素	0.2 \pm 0.13	17.44 \pm 0.82
蛋白胨	11.97 \pm 0.84	13.27 \pm 1.04
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.18 \pm 0.64	20.67 \pm 1.11

葡萄糖苷酶影响较典型的碳源、氮源种类(浓度不变)和KH₂PO₄浓度进行了实验,即将表1中碳源代替产酶基础培养基中的麸皮,其他营养物质不变,培养60h后检测发酵液中 β -葡萄糖苷酶活力;在表1确定的各自最适碳源基础上,将表2中氮源代替产酶基础培养基中的(NH₄)₂SO₄,其他营养物质不变,培养60h后检测发酵液中 β -葡萄糖苷酶活力;在各自最适碳源、氮源基础上,改变产酶基础培养基中KH₂PO₄浓度(图1),其他营养物质不变,培养60h后检测发酵液中 β -葡萄糖苷酶活力;结果见表1、2和图1。表1表明,两者均以麸皮作为碳源时 β -葡萄糖苷酶活力最高,且突变株 β -葡萄糖苷酶酶活力高于出发菌酶活力。表2显示,出发菌产酶最适氮源为蛋白胨,突变株最适产酶氮源为(NH₄)₂SO₄。突变株利用的最适氮源具有价格低廉的优势。图1结果表明,出发菌和突变株分别以0.2%和0.1% KH₂PO₄作磷源时 β -葡萄糖苷酶活力最高。

2.1.2 培养条件对产酶的影响

分别在各自最佳碳源、氮源和磷源浓度的基础上,将出发菌和突变株在不同培养基初始pH(pH4.0、5.0、6.0、7.0和自然pH),不同温度(25、30、37和45℃)和不同摇床转速(150、200、250和300r/min)下培养培养60h后检测发酵液中 β -葡萄糖苷酶活力,研究培养基初始pH、温度和转速对出发菌和突变株产酶的影响(表3),每一影响因素试验均在各自上一最佳试验结果的条件下进行。表3表明,出发菌和突变株的最适产酶温度均为30℃,培养基初始pH自然,最适摇床转速分别为200r/min和250r/min。结果显示,突变株产酶培养条件向好氧方向偏移。

2.1.3 黑曲霉 M85 同步辐射前后的产酶动态

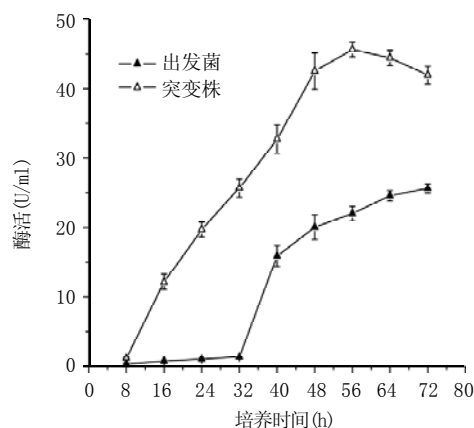


图2 出发菌和突变株的产酶动态
Fig.2 Trends of β -glucosidase activity of strains M85 and mutant during incubation

将出发菌和突变株分别在各自最佳碳源、氮源、磷源浓度和最适培养条件下培养,定时取样检测发酵液中 β -葡萄糖苷酶活力,结果如图2。图2显示,出发菌酶活力从第32h快速增长至第64h(24.54U/ml)后趋于稳定,第72h时为25.60U/ml,以后不再增加;5L发酵罐的发酵结果显示:第64h时酶活力最大(数据未显示)。突变株酶活力从第16h快速增长至第56h达到最大值45.62U/ml。由此可知,与出发菌比较,突变株的发酵周期缩短了16h,产酶能力提高了约80%。

2.2 同步辐射前后黑曲霉 M85 β -葡萄糖苷酶的酶学性质

2.2.1 酶的最适温度及热稳定性

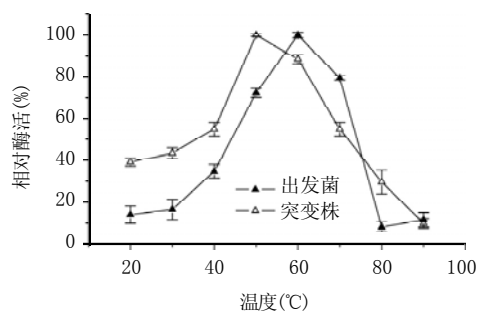


图3 β -葡萄糖苷酶的最适反应温度
Fig.3 Optimum temperature for β -glucosidases

表3 培养条件对产酶的影响
Table 3 Effects of incubation conditions on β -glucosidase production

pH	相对酶活($\bar{X} \pm SD$)		温度(℃)	相对酶活($\bar{X} \pm SD$)		转速(r/min)	相对酶活($\bar{X} \pm SD$)	
	出发菌	突变株		出发菌	突变株		出发菌	突变株
4.0	18.02 \pm 3.20	49.88 \pm 4.01	25	58.08 \pm 2.56	61.40 \pm 4.13	150	31.39 \pm 2.68	70.76 \pm 3.47
5.0	48.44 \pm 6.23	62.35 \pm 5.78	30	100	100	200	100	83.96 \pm 4.63
6.0	5.66 \pm 2.35	8.89 \pm 3.51	37	34.08 \pm 2.68	69.12 \pm 4.24	250	95.84 \pm 2.12	100
7.0	2.82 \pm 3.66	6.82 \pm 2.69	45	0.67 \pm 1.21	4.53 \pm 1.48	300	82.87 \pm 5.26	81.66 \pm 5.52
自然	100	100						

在 pH5.0 条件下, 将出发菌和突变株 β -葡萄糖苷酶分别同时置于不同温度中测定活力。图 3 结果表明, 出发菌 β -葡萄糖苷酶的最适反应温度为 60℃, 在 50~70℃ 范围内较稳定; 而突变株 β -葡萄糖苷酶的最适反应温度为 50℃。

2.2.2 酶的最适 pH 及 pH 稳定性

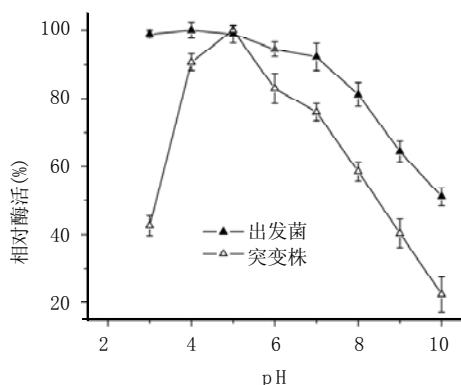


图 4 β -葡萄糖苷酶的最适反应 pH
Fig.4 Optimum pH for β -glucosidases

在各自最适反应温度条件下, 将出发菌和突变株 β -葡萄糖苷酶分别同时置于不同 pH 值的缓冲溶液中测定活力。图 4 显示, 出发菌 β -葡萄糖苷酶的最适反应 pH 值为 4, 在 pH3~7 之间较稳定; 突变株 β -葡萄糖苷酶的最适反应 pH 值为 5, 在 pH4~7 之间较稳定。

2.2.3 酶的底物特异性

用表 4 所列各化合物作底物在各自最适反应温度和最适反应 pH 条件下, 进行反应, 以 p-NPG 作对照。结果表明, 出发菌和突变株 β -葡萄糖苷酶的底物专一性都较差, 特别是对水杨素的催化活力大于 100%, 但对异丙基硫代半乳糖苷的水解能力相对较弱。

表 4 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶的底物特异性

Table 4 Substrate specificity of β -glucosidase from *Aspergillus niger*

底物	底物浓度	相对酶活 (%) $\bar{x} \pm SD$	
		出发菌	突变株
p-NPG	5mmol/L	100	100
异丙基硫代半乳糖苷	5mmol/L	32.15 \pm 1.23	45.76 \pm 4.21
纤维二糖	1% (W/V)	88.79 \pm 3.65	87.86 \pm 3.54
水杨素	1% (W/V)	105.62 \pm 4.22	106.21 \pm 2.41
柚皮苷	0.1 mg/ml	75.68 \pm 5.12	66.75 \pm 4.85

2.2.4 酶的动力学参数

取不同浓度 p-NPG, 分别加入出发菌和突变株的产物酶, 于各自最适温度、最适合 pH 条件下测定两种酶水解 p-NPG 的反应初速度, 根据酶催化底物的 $[S]^{-1} - v^{-1}$ 关系, 通过双倒数作图法得出出发菌和突变株产物酶的 K_m

和 V_{max} 分别为 0.77, 0.62mmol/L 和 1.92, 2.43mol/L·min。突变株 β -葡萄糖苷酶对 p-NPG 具有更大的亲和力和反应速度。

3 讨论

射线对生物体的诱变是一种非常复杂的物理、化学、生物等过程。研究表明, X 射线与物质相互作用时, 主要产生光电效应、康-吴效应和电子对的产生三种效应。究竟发生哪种效应, 主要与射线的能量 E 和介质的原子序数 Z 有关^[6]。同步软 X 射线 Nk 辐照孢子 (重要组成元素多为低 Z 值的元素) 时光电效应是最主要的, 能够导致孢子在 DNA 等分子水平上的原初损伤。孢子在萌发前, 基本上不存在任何代谢活力, 其 DNA 受损并不立即表现某种生物学效应, 只有在萌发、培养代谢过程中才表现出来。如果 DNA 损伤严重, 将导致致死效应; 相反, 若 DNA 损伤较轻, 则孢子在萌发过程中能将其修复而存活下来, 产生突变菌株, 表现出间接的诱变效应。对枯草杆菌芽孢^[3]和米根霉孢子^[4]的辐射研究均表明, 菌株致死率与辐射剂量相关。本研究也证明, 黑曲霉孢子经同步软 X 射线辐射后的突变株, 在 β -葡萄糖苷酶的产生条件和酶学性质方面表现了显著的诱变效应。但是, 对于突变产生过程中的关键问题——软 X 射线对孢子 DNA 损伤的修复机理有待于进一步深入研究。

除水之外, 碳、氮源的需求量居微生物六大营养要素之首, 而在无机盐中磷需求最大。因此, 碳源、氮源和磷源的合理优化, 不仅关系微生物能否正常生长、繁殖, 而且关系到资源的高效、合理利用。已有的许多研究^[7-9]都表明, 4% 麸皮作碳源, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% 作氮源为黑曲霉发酵产 β -葡萄糖苷酶的最佳碳源和氮源, 这可能与麸皮的组成成分有关, 即麸皮中易利用的糖类含量低, 不致产生分解代谢产物阻遏, 而且麸皮中含有一定量的有机氮 (蛋白质含量达 16.4%)^[11], 可以满足微生物对有机氮的生长需要, 添加适量 $(NH_4)_2SO_4$, 有利于培养基中有机氮与无机氮的协同作用。本研究结果显示, 麸皮仍是黑曲霉 M85 和突变株的最佳碳源; 但是, 突变株和出发菌的氮源需求有所差异, 蛋白胨更有利于出发菌产酶, 而突变株更偏好 $(NH_4)_2SO_4$, 这可能与它们对氧的需求差异有关, 突变株耗氧量更大, 麸皮结构较疏松, 与 $(NH_4)_2SO_4$ 同时使用, 更适于通气和溶氧, 因此, 更有利于产酶。试验结果还表明, 突变株比出发菌的产酶能力提高了, 这可能是同步辐射软 X 射线辐照米根霉孢子引发的间接诱变效应。对于黑曲霉 M85 和突变株的最佳碳源、氮源以及碳氮比将有待于进一步优化。KH₂PO₄ 不仅为微生物生命活动中提供磷源, 而且对培养基的 pH 有一定的调节作用。孙力军等

[9]的研究表明, 0.2% KH_2PO_4 有利于黑曲霉产 β -葡萄糖苷酶, 本研究中出发菌的最适 KH_2PO_4 浓度亦为0.2%, 而突变株对 KH_2PO_4 的需求浓度为0.1%, 比出发菌M85降低。

温度、培养基起始pH, 溶解氧等培养条件不仅影响微生物的生长速度, 而且影响其产酶的合成。已报道的黑曲霉产 β -葡萄糖苷酶最适温度多在 $30 \pm 1^\circ\text{C}$, 本研究中出发菌和突变株的最适产酶温度都为 30°C , 这可能与霉菌的生理特性有关, 黑曲霉等绝大多数真菌的最适生长温度在 30°C 左右。出发菌和突变株产酶最适培养基起始pH自然, 因此, 在培养基的配制过程中, 不必对培养基进行人为的pH调节。黑曲霉是好氧菌, 在生长和产酶过程中需要消耗一定的氧气。本研究中, 突变株对氧的需求增大, 这与突变株生长快、产酶周期短有关。因此, 在发酵过程中, 适当增加转速, 或减少装液量, 可以增加发酵液中的溶氧浓度, 也可以增加菌丝与发酵液中营养物质的充分接触, 使菌种快速生长, 缩短产酶发酵周期。

β -葡萄糖苷酶来源广泛, 性质各异。黑曲霉 β -葡萄糖苷酶的最适反应温度在 $40\sim 70^\circ\text{C}$ 均有报道, 最适反应pH4.0~5.5, 底物专一性较差^[1]。本研究结果表明, 出发菌最适反应温度 60°C , 最适反应pH4.0, 底物专一性较差, 与报道的黑曲霉 β -葡萄糖苷酶酶学性质相似。突变株 β -葡萄糖苷酶最适反应温度在 50°C , 最适反应pH5.0, 底物专一性较差, 酶学性质与烟曲霉相似^[11]。黑曲霉 β -葡萄糖苷酶酶学性质显示, 它们尤其适合酸性介质如果汁、果酒等制品的脱苦及风味的改良。

4 结 论

本研究采用的突变株由黑曲霉孢子经同步软X射线辐照诱变后所得, 对该突变株与出发菌株在产酶营养谱、培养条件、产酶动力学以及产物 β -葡萄糖苷酶的酶学性质等方面进行了较为详尽的比较研究。结果表

明, 突变株的氮源谱更宽, 能够利用有机和无机氮源产酶, 对 KH_2PO_4 的需求从0.2%降为0.1%; 突变株产 β -葡萄糖苷酶需氧量增加; 突变株发酵周期缩短了16h, 最高产酶能力提高了约80%; 突变株 β -葡萄糖苷酶的最适反应温度从 60°C 降为 50°C , 最适反应pH由pH4转变为pH5。本研究结果说明, 同步辐射诱变育种是行之有效的, 用此方法可以对微生物发酵生产菌种进行发酵性能的改良。

参考文献:

- [1] 潘利华, 罗建平. β -葡萄糖苷酶的研究及应用进展[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 803-807.
- [2] 李平, 宛晓春, 陶文沂, 等. 复合诱变黑曲霉选育 β -葡萄糖苷酶高产菌株[J]. 菌物系统, 2000, 19(1): 117-121.
- [3] 温崇庆, 唐欣昀, 蒋诗平, 等. 同步辐射软X射线对枯草杆菌的诱变效应[J]. 激光生物学报, 2004, 13(1): 30-34.
- [4] 罗水忠, 姜绍通, 郑志, 等. 同步辐射软X射线Nk辐射米根霉的诱变效应[J]. 核农学报, 2006, 20(5): 378-378.
- [5] 郭海风. β -葡萄糖苷酶产生菌及其发酵培养基的优化[J]. 扬州职业大学学报, 1999, 3(4): 7-12.
- [6] 张欣, 徐师国, 张玉恒, 等. 同步辐射产生的Ck软X射线对质粒pBK-CMV DNA的辐射生物效应[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2001, 21(5): 321-324.
- [7] 李平, 宛晓春, 陶文沂, 等. 黑曲霉生产 β -葡萄糖苷酶发酵条件的研究[J]. 应用生态学报, 1999, 10(6): 732-734.
- [8] MUHAMMAD I R, MUHAMMAD W A, ATIF HANIF, et al. Production and characterization of a highly active cellobiase from *Aspergillus niger* grown in solid state fermentation [J]. World J Microbiol Biotech, 2006, 22(9): 991-998.
- [9] TSAO G T, XIAO L, CAO N, et al. Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* for cellobiase production [J]. Appl Biochem and Biotech, 2000, 84(8): 743-749.
- [10] GEORGI T D, IVAN G P, VESELIN S S, et al. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design[J]. Bioresource Technol, 2007, 98(14): 2671-2678.
- [11] RUDICK M J, ELBEIN A D. Glycoprotein enzymes secreted by *Aspergillus fumigatus* purification and properties of β -glucosidase[J]. J Bio Chem, 1973, 248(18): 6506-6513.