

紫外线诱变青霉 P-M1 选育柚苷酶高产菌株研究

崔培梧, 黎继烈, 文蓉, 黄凌, 杨杰

(中南林业科技大学 生命科学与技术学院发酵工程实验室, 湖南 长沙 412006)

摘要: 采用紫外线对野生型柚苷酶产生菌青霉 P-M1 进行诱变处理以提高柚苷酶的产量, 经过初步筛选最佳诱变条件为: 孢子悬液 (10^7 个/mL) 稀释度为 10^{-5} , 15 W 紫外灯, 垂直照射距离为 30 cm, 处理时间为 5 min。通过透明圈初筛和摇瓶复筛选育出一株柚苷酶高产菌株青霉 PU-15, 酶活达到 334.3 U/mL, 比出发菌株提高了 137.4%, 将其连续传代 10 次测定遗传稳定性, 结果显示稳定性良好, 是一株比较理想的柚苷酶高产菌株。

关键词: 柚苷酶; 青霉; 紫外诱变

中图分类号: TQ 920.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)02-0042-03

我国是世界柑橘主产国, 柑橘栽培面积和产量分别居世界第一和第二位^[1], 因此开展柑橘深加工和综合利用很有必要, 然而柑橘加工过程会出现明显的苦味, 在很大程度上限制了其在食品工业中的广泛应用, 因此消除柑橘加工过程中的苦味很有必要。柚苷(Naringin)是柑橘类水果中最主要的苦味物质, Yusof^[2]及 Soares等^[3]研究发现柚苷的苦味阈值大约为 20 mg/kg, 但是在 1.5 mg/kg 时便可以感觉到苦味, 差不多所有柑橘类产品的柚苷浓度都在 300 mg/kg 以上, 可见降低柑橘类产品的柚苷含量对于柑橘脱苦有十分重要的意义。

柚苷酶(Naringinase)可以将柚苷分两步水解成无苦味的鼠李糖、葡萄糖和柚配质(Naringenin), 其脱苦效率可达 90%以上, 苦味基本消除^[4], 因而可广泛用于柑橘类产品的脱苦。柚苷酶的生产国外已有报道^[5], 但我国却一直没有在生产中得到广泛应用, 主要原因就是缺乏适合工业化生产的柚苷酶高产菌株^[6], 因此选育一株稳定性好、产酶活力高的优良菌株是当务之急。从自然界分离出来的野生菌株通常性能和耐受性差、遗传不稳定, 往往不能满足工业生产的要求, 因此采用不同的手段对筛选出来的野生菌株进行诱变选育是必不可少的。紫外线是一种使用最早、沿用最久且应用效果明显的微生物诱变剂, 其诱变频率高, 迄今仍然是微生物育种中最常用和有效的诱变剂之一^[7]。该研究利用紫外线诱变处理柚苷酶产生菌青霉 P-M1, 期望能够获得一株柚苷酶高产菌株, 解决柚苷酶产量低的难题。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

为中南林业科技大学生命科学与技术学院发酵工程实验室由堆积腐烂的柚子皮上筛选而来的野生型柚苷酶产生菌青霉 P-M1。

1.2 主要试剂

柚苷: 98%, HPLC 级 南京青泽医药科技开发有限公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器

戴安 P680 高效液相色谱仪; 灭菌锅; 超净工作台等。

1.4 培养基

斜面培养基: 麦芽汁 50 mL, 水 50 mL, 琼脂 2.5 g, 121 °C 灭菌 20 min。筛选培养基: 蔗糖 2%, 1% 柚苷, NaNO₃ 0.3%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, FeSO₄ 0.001%, K₂HPO₄ 0.1%, KCl 0.05%, 琼脂 2.0%, pH 自然, 121 °C 灭菌 20 min。发酵培养基: 蔗糖 2%, 柚苷 1%, 豆饼粉 2%, 蛋白胨 0.5%, K₂HPO₄ 0.5%, CaCl₂ 0.1%, ZnSO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, 每 50 mL 分装于 250 mL 三角瓶中, 121 °C 灭菌 20 min。

1.5 方法

1.5.1 培养方法 斜面及平板培养: 28 °C, 培养 72 h。发酵培养: 28 °C, 初始 pH 自然 250 mL 三角瓶装液量为 50 mL, 摇床转速 120 rpm。

1.5.2 诱变方法 青霉 P-M1 经斜面活化后用无菌生理盐水洗下新鲜孢子, 制成孢子悬液(浓度为 10^7 个/mL), 取该孢子悬液 5 mL, 置于 9 cm 无菌培养皿中, 放入一无菌磁力搅拌子, 将其置于距紫外灯 30 cm(垂直距离)的磁力搅拌器上, 打开电源接受 UV 灯(15 W, $\lambda = 2.537 \mu\text{m}$)紫外光照射(紫外灯应先打开预热 20 min, 以稳定光波), 1 min 后打开培养皿, 同时打开磁力搅拌器进行搅拌, 立即开始计时。照射时间分别设置为 1、3、5、

第一作者简介: 崔培梧(1983), 男, 河北沧州人, 硕士, 研究方向为工业微生物育种及发酵过程调控。E-mail: cuipeiwu2002@163.com。

通讯作者: 黎继烈。E-mail: lijilie@163.com。

收稿日期: 2008-10-11

7.10 min, 照射完成后取孢子悬液 0.5 mL, 稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} , 分别取后 3 个稀释度的孢子悬液 0.5 mL 均匀涂布于筛选平板上; 按相同方法稀释未照射的孢子悬液并涂布于平板做对照。以上操作均在红光下进行, 最后将所有涂布好的平板用黑纸包好, 放入 28°C 培养箱中培养 2~4 d 直到菌落长出为止^[8]。

$$\text{致死率}(\%) = \frac{\text{未照射的单平板菌落数} - \text{照射的单平板菌落数}}{\text{未照射的单平板菌落数}}$$

1.5.3 筛选方法 初筛: 利用柚苷选择平板水解透明圈法进行初筛。在诱变后的筛选平板上挑取 20 株透明圈较大的菌落分别测定其 HE 值(HE 值=透明圈直径/菌落直径), 选择 HE 值较大者移入斜面保存备用。复筛: 将初筛获得的菌株转入发酵培养基逐个发酵, 于产酶高峰期测定其柚苷酶活力。遗传稳定性测定: 将复筛得到的菌株在麦芽汁斜面上连续传代 5 次, 每次传代后在发

表 1 不同稀释倍数及处理时间的诱变结果(菌落数/平板)

Table 1 Mutational Results of different dilution multiple and different treatment time

稀释度 Dilution multiple	10^{-3}		10^{-4}		10^{-5}		致死率 Lethal rate/ %
处理时间 Treatment time/min	诱变前菌落数	诱变后菌落数	诱变前菌落数	诱变后菌落数	诱变前菌落数	诱变后菌落数	
0	无法计数	无法计数	145	144	15	15	0
1	无法计数	无法计数	151	113	16	12	25.1
3	无法计数	无法计数	139	58	13	6	56.1
5	无法计数	无法计数	142	41	13	3	74.0
7	无法计数	142	137	9	17	2	90.8
10	无法计数	0	150	0	0	0	100

紫外线属于非电离辐射, 作用机理是被照射物质的分子或原子中的内层电子提高能级, 可能导致 DNA 链和氢键断裂等生物学效应。由经验可知, 致死率达到 70%~80% 时, 产生正突变的几率较高, 有利于进一步筛选^[11]。由表 1 可知, 当处理时间为 5 min 时致死率为 74.0%, 比较有利于正向突变。由于试验时采用的是 10^7 个/mL 的孢子悬液, 所以当稀释度为 10^{-3} 时, 菌落数目太多无法计数, 稀释度为 10^{-4} 时可以勉强看清菌落, 但是透明圈分辨起来非常困难, 所以稀释度为 10^{-5} 时效果最佳。故青霉 P-M1 的最佳紫外诱变条件为: 15 W 紫外灯, 距离为 30 cm, 照射时间为 5 min, 孢子悬液稀释度为 10^{-5} 。

2.2 紫外诱变初筛及复筛

2.2.1 透明圈法初筛 采用点植法在柚苷选择平板上培养经过紫外线诱变的单菌落, 4 d 后测量菌落透明圈的直径, 并计算其 HE 值, 发现有 20 株突变株 HE 值大于出发菌株青霉 P-M1(见表 2), 其中 15 号突变株效果最明显(见图 1)。为探讨突变株与原始菌株水解柚苷的能力是否存在差异, 对表 2 数据进行了方差分析, 结果 $F=84.05 > F_{\alpha 0.01}=2.4$, 即 $P < 0.01$, 各菌株水解柚苷能力的差异达到极显著水平。为了解各菌株之间是否有差异, 采用最小显著极差法(LSR 法)进行菌株间的多重比较, 得出如下结论: 06、07、15 号突变株与出发菌株青霉 P-M1 水解柚苷的能力差异极显著, 其它突变株的 HE 值虽然比出发菌株的 HE 值大, 但是差异不显著, 故

酶培养基中培养测定其柚苷酶活力。

1.5.4 分析方法 酶活的测定: 取 2 mL 0.1% 柚苷标准液和 0.2 mol/L 的 pH 4.0 醋酸缓冲液 2 mL 置于试管中, 在 40°C 恒温水浴中预热 4~5 min, 然后加入预先稀释好的粗酶液 0.1 mL, 充分摇匀, 加蒸馏水 0.9 mL, 准备保温 30 min, 再置沸水中 5 min 终止酶活, 取该反应液进行 HPLC 分析。色谱条件^[9-10]: 色谱柱为 Hyper-Clone 5 μ ODS(C18)柱(250 mm \times 4.60 mm); 流动相为甲醇-0.5% 乙酸溶液(V/V=38/62); 流速为 0.8 mL/min; 检测波长为 283 nm; 柱温为 25°C ; 进样量 20 μL 。柚苷酶活力定义: 40°C , pH 4.0 条件下 1 mL 酶液 1 min 水解 1 μg 柚苷的酶活力为 1 U。

2 结果与分析

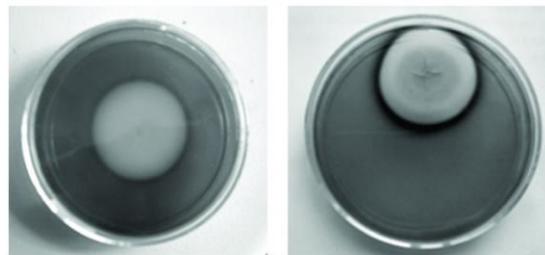
2.1 诱变条件的选择

选择 06、07、15 号突变株进行摇瓶复筛。

表 2 不同突变株的 HE 值

Table 2 The HE of different mutant strains

菌株编号 Strain number	平均 HE 值 Average HE	菌株编号 Strain number	平均 HE 值 Average HE	菌株编号 Strain number	平均 HE 值 Average HE
P15	1.65	07	2.03	14	1.92
01	1.74	08	1.81	15	2.13
02	1.81	09	1.83	16	1.79
03	1.75	10	1.81	17	1.83
04	1.93	11	1.85	18	1.85
05	1.77	12	1.81	19	1.81
06	2.06	13	1.86	20	1.79



出发菌株 P-M1 透明圈 P-M1 clear zones 15 号突变株透明圈 15th mutant strain clear zones

图 1 诱变前后透明圈比较

Fig. 1 Clear zones of P-M1(left) and 15th mutant strain(right)

2.2.2 摇瓶发酵复筛 通过摇瓶发酵的方法对出发菌株青霉 P-M1 及初筛中选育出来的 06、07、15 号突变株进行培养, 每 12 h 取一定发酵液, 冷冻离心除去菌体, 然

后取上清液进行酶活测定(见图2)。从图2可以发现原始菌株和突变株具有极相似的产酶曲线,而且各菌株发酵产酶活力达到顶峰的时间均为60h,因此可以选择培养60h的发酵液酶活力作为评价菌株产酶能力的指标。同时,还可以发现菌株的产酶能力与该菌株在选择培养基上产生透明圈的直径大小成正相关,3株突变株的产酶能力明显高于原始菌株,其中15号突变株的透明圈直径最大,其产酶顶峰时期酶活也高于其它菌株,所以将该菌株作为最佳产酶菌株进行后续研究。

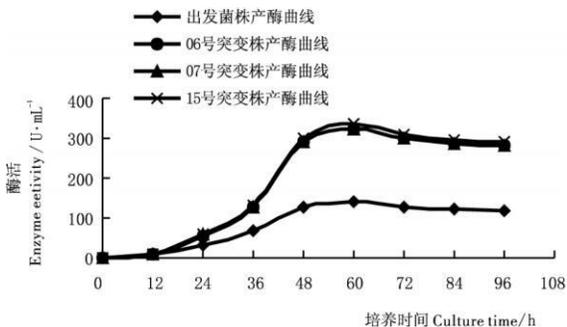


图2 不同菌株发酵产酶曲线

Fig.2 Fermentation curve of different strains

表3 菌株的遗传稳定性测定试验

Table 3 Results of genetic stability verification

传代次数	平均酶活 / U · mL ⁻¹	较出发菌株提高 / %	传代次数	平均酶活 / U · mL ⁻¹	较出发菌株提高 / %
原始菌株	140.8	0	6	334.1	137.3
1	334.3	137.4	7	333.5	136.9
2	334.7	137.7	8	334.0	137.2
3	334.0	137.2	9	333.7	137.0
4	334.0	137.2	10	333.8	137.1
5	334.4	137.5			

2.3 菌株的遗传稳定性测定

将复筛所得菌株连续转接10代,同出发菌株青霉P-M1一起进行摇瓶发酵,每代做3个重复,分别测定其在60h的发酵液酶活,其平均值结果记录于表3,然后进行方差分析,结果 $F=3.28 < F_{0.01}=3.46$,说明传代后的菌株产酶能力没有差异,所以该菌株具有较好的遗传

稳定性,其酶活较出发菌株均提高136.9%以上,是一株比较理想的柚苷酶高产菌株,命名为PU-15。

3 结论

紫外诱变是工业微生物菌种选育中最常用、最有效的诱变方法之一,具有作用时间长、效果好、设备简单、对人体无伤害等优点,因此将其作为菌种改良的首选方法。该研究首次利用紫外线对青霉进行诱变选育柚苷酶高产菌株,通过筛选最佳诱变条件为:15W紫外灯,距离30cm,照射处理时间5min。经过直接透明圈法初筛及摇瓶复筛,获得一株高产柚苷酶菌株青霉PU-15,其产酶能力较出发菌株提高了137.4%,经传代验证,该菌株具有较理想的遗传稳定性,而且具有比较理想的产酶潜力,有待进一步开发。该研究为今后柚苷酶的工业化生产及应用提供一定的试验依据,使我国柑橘加工业走上酶法脱苦的道路成为了可能。

参考文献

[1] 程绍南.我国柑橘加工业发展现状及趋势[J].农产品加工,2007,6(11):15-17.
 [2] Yusof S, Gazali H M, King G S. Naringin content in local citrus fruit [J]. Food Chemistry, 1990, 37(2): 113-121.
 [3] Soares N F F, Hotchkiss J H. Bitterness reduction in grapefruit juice through active packaging [J]. Packaging Technology and Science, 1998, 11(1): 9-18.
 [4] 汪钊,毛富根.柚苷酶固体发酵及消除桔子汁苦味的研究[J].食品科学,1996,17(6):17-19.
 [5] Puri M, Kalra S. Purification and characterization of naringinase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger* 1344 for the transformation of flavonoids [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(5): 753-758.
 [6] 王志国.微生物与柑桔汁脱苦[J].食品科学,2000,21(11):10-14.
 [7] 潘涛,周剑,虞龙.紫外诱变柠檬酸生产菌黑曲霉的选育[J].化学与生物工程,2007,24(1):50-52.
 [8] 诸葛健,沈微,方慧英等.工业微生物实验与研究技术[M].北京:科学出版社,2007:213-219.
 [9] Isabel A, Maria H L. Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method [J]. Food Control, 2008, 19(4): 432-438.
 [10] 董朝青,钟世安,周春山.反相高效液相色谱法同时测定柚皮中柚皮甙和橙皮甙的含量[J].理化检验—化学分册,2005,41(1):44-46.
 [11] 施巧琴,吴松刚.工业微生物育种学[M].2版.北京:科学出版社,2004:73-75.

Breeding of High-yield Naringinase Strain from *Penicillium* sp. P-M1 by UV Mutation

CUI Pei-wu, LI Ji-lie, WEN Rong, HUANG Ling, YANG Jie

(Fermentation Engineering Lab, College Life of Science and Technology, Central South University of Forest and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

Abstract: For increasing the yield of naringinase which has great potential in the debittering of citrus the wild *Penicillium* sp. P-M1 was treated with ultraviolet (UV) radiation and the optimum treating conditions which was got by primary screening were as follows: the dilution of the spore suspension (10^7 / mL) was 10^{-5} , the 15W UV lamp was used as UV light with 30 cm radiation distance and 5 minutes treating time. Through UV mutation a mutant strain named PU-15 was obtained. As compared with the initial strain, the activity of naringinase had reached 334.3 U / mL which was 137.4% higher than the initial strain. Then an experiment for studying the genetic stability was took by means of passaging 5 times and its results showed that *Penicillium* sp. PU-15 had a better genetic stability.

Key words: Naringinase; *Penicillium* sp.; UV Mutation