



Effect of Different Mutation Methods on Xylanase Production Ability by *Aspergillus Niger*

Zheng Lili^{1,2}, Sheng Zhanwu^{1,2,*}, Ai Binling^{1,2}, Zheng Xiaoyan^{1,2}, Jin Zhiqiang^{1,2}

¹Haikou Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou, China

²Hainan Key Laboratory of Banana Genetic Improvement, Haikou, China

Email address:

lily_0909@126.com (Zheng Lili), shengzhanwu100@163.com (Sheng Zhanwu)

To cite this article:

Zheng Lili, Sheng Zhanwu, Ai Binling, Zheng Xiaoyan, Jin Zhiqiang. Effect of Different Mutation Methods on Xylanase Production Ability by *Aspergillus Niger*. *Science Discovery*. Vol. 4, No. 2, 2016, pp. 70-74. doi: 10.11648/j.sd.20160402.13

Received: January 11, 2016; Accepted: March 22, 2016; Published: May 4, 2016

Abstract: Based on the *Aspergillus niger* AS3.350, the mutants were brewed through inducing five treatments. The effect of different mutation methods on enzyme production ability of Xylanase was discussed and obtained mutant strain of Xylanase production high ability. The results indicate that: the mutagenesis of UV irradiation and fast neutron irradiation was sensitive to increasing Xylanase activity. UV irradiation seted at 256 nm wavelength, the vertical distance was 20cm, exposure time was 90s, obtained mutant UV256-90 of the enzyme activity was 170.79U/ml, it was 2.18 times of the original strain. The rate 0.0025Gy / s of fast neutron irradiation and vertical distance 12cm, the optimal dose is 0.75Gy, screened out the mutant Fn5-2, the activity is 134.77U/ml, its 1.72 times of the original strain. Mutagenesis by diethyl sulfate, sodium nitrite, and nitrosoguanidine, enzyme activity of the optimal mutant strains were recently starting strain of 1.51 times, 1.46 times, and 1.38 times. Two physical mutagenic methods include ultraviolet mutagenesis and fast neutron irradiation were more sensitive on producing xylanase based on *aspergillus Niger*.

Keywords: Mutation, *Aspergillus Niger*, Xylanase, Enzyme Activity

五种诱变方法对黑曲霉产木聚糖酶能力的影响

郑丽丽^{1,2}, 盛占武^{1,2,*}, 艾斌凌^{1,2}, 郑晓燕^{1,2}, 金志强^{1,2}

¹中国热带农业科学院海口实验站, 海口, 中国

²海南省香蕉遗传改良重点实验室, 海口, 中国

邮箱

lily_0909@126.com (郑丽丽), shengzhanwu100@163.com (盛占武)

摘要: 为获得高产木聚糖酶的突变株, 利用五种方法对黑曲霉AS3.350进行诱变, 研究不同诱变方法对黑曲霉产木聚糖酶的影响。结果表明: 紫外诱变在波长256nm, 照射垂直距离20cm, 照射时间90s, 获得突变株UV256-90产木聚糖酶酶活为170.79U/ml, 是出发菌株的2.18倍。快中子辐照以剂量率为0.0025Gy/s, 垂直距离为12cm, 获得突变株Fn5-2产木聚糖酶酶活为134.77U/ml, 是出发菌株的1.72倍, 硫酸二乙酯诱变、亚硝酸钠诱变、亚硝基胍诱变获得的最优突变株酶活分别是出发菌株的1.51倍、1.46倍、1.38倍。紫外诱变和快中子辐照两种物理诱变对黑曲霉产木聚糖酶更为敏感。

关键词: 诱变, 黑曲霉, 木聚糖酶, 酶活

1. 引言

植物的纤维组分中半纤维素约占20%~30%，植物光合作用产生资源的三分之一是半纤维素^[1]。半纤维素是继纤维素后第二丰富的可再生资源，在造纸、食品、纺织、饲料等行业具有广阔的应用前景^[2]。木聚糖(xylan)是半纤维素的重要组成部分，在自然条件下，木聚糖难以被降解利用。木聚糖酶(xylanase)以内切的方式降解木聚糖分子中 β -1,4木糖苷键，是一类能够降解木聚糖的复合酶系^[3]。开展木聚糖酶高产菌株的研究对木聚糖的利用具有重大意义^[4-5]。这些高产木聚糖酶菌株大多是经过多次、多种诱变方法处理得到的优良菌株。目前诱变方法主要有物理法、化学法等，本文重点探索紫外诱变、快中子辐照、硫酸二乙酯诱变、亚硝酸钠诱变及亚硝基胍诱变五种方法对黑曲霉AS3.350在提高木聚糖酶活性程度上的优劣，为应用木聚糖酶降解半纤维素奠定理论基础。

目前，降解木聚糖的主要方法包括：高温水解，酸水解，酶降解等^[6-8]。其中利用木聚糖酶进行降解的方法，具有条件温和，容易控制，产物单一等特点，在木聚糖的降解方面有很大的优势。但木聚糖酶的生产成本高，产量低，酶活力是推动木聚糖酶的研究和木聚糖的利用的瓶颈，因此开展高产木聚糖酶菌株的改良和筛选的研究具有非常重要的意义。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 菌种

出发菌株黑曲霉AS3.350购自中国科学院微生物研究所。

2.1.2. 紫外源与中子源

紫外源由上海市闻天仪器设备有限公司的QY-20三用紫外分析仪。中子源是由东北师范大学辐射技术研究所提供。

2.1.3. 试剂

pH5.0柠檬酸缓冲液，pH4.5醋酸缓冲液，pH6.0磷酸缓冲液，DNS试剂，0.5ml/L硫代硫酸钠溶液，亚硝基胍(MNNG)，硫酸二乙酯(DES)，亚硝酸钠(NaNO_2)，D-木糖溶液。

2.1.4. 培养基

(1) PDA斜面培养基配方：葡萄糖20g， KH_2PO_4 1g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g，马铃薯200g，琼脂粉20g，蒸馏水1000ml；(2) 液体发酵培养基配方： KH_2PO_4 26g， CaCl_2 5g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10g， FeSO_4 0.16g，酵母膏10g，麸皮20g，Tween-80 5ml，pH5.0；(3) 初筛培养基配方^[9-10]；(4) 种子培养基配方： K_2HPO_4 1g，KCl 0.5g， NaNO_2 2g，

MgSO_4 0.5g， FeSO_4 0.01g，蔗糖30g，琼脂20g，蒸馏水1000ml。

2.2. 菌种培养

2.2.1. 菌种活化

取黑曲霉AS3.350用PDA斜面培养基活化2代备用。

2.2.2. 菌种培养

取活化后的2代黑曲霉AS3.350于查氏液体培养基中，250ml三角瓶装液量50ml，置于摇床中28℃，200r/min振荡培养60h。

2.2.3. 发酵培养

5%的接种量接种种子液至发酵培养基，装液量为50ml/250ml，置于摇床中28℃，200r/min，震荡培养108h。

2.3. 菌悬液的制备

用生理盐水将PDA斜面培养基中的2代黑曲霉AS3.350孢子洗脱下来，置于三角瓶中，放入玻璃珠，置于摇床中200r/min振荡1h，取无菌纱布过滤孢子悬液，利用血球计数板计算孢子个数，取生理盐水稀释一定倍数，使孢子浓度保持在 10^7 - 10^8 个/ml^[11-12]。

2.4. 筛选方法

2.4.1. 初筛

将菌悬液涂布于刚果红初筛培养基上培养60h，用生理盐水进行脱色，挑选透明圈较大的单菌落接种于PDA培养基，以备复筛。

2.4.2. 复筛

将初筛得到的菌株接种于查氏液体培养基，置于摇床中28℃振荡培养60h，按照一定比例加入到液体发酵培养基中，摇床中28℃振荡培养108h，测木聚糖酶活。

2.5. 诱变方法

2.5.1. 紫外诱变

诱变前紫外灯预热20min，待光波稳定后取菌悬液置于无菌平板，在波长256nm，照射距离15cm，20cm，在搅拌的状态下分别照射30s，60s，90s，120s，150s，180s，将照射后的菌悬液稀释并涂布于初筛培养基。

2.5.2. 快中子诱变

快中子剂量率为0.0025Gy/s，分别照射5min，10min，15min，20min，30min，即0.75, 1.50, 2.25, 3.00, 4.50Gy 5个剂量来处理，将照射后的菌液稀释 10^2 ~ 10^6 ，抽取不同稀释倍数的菌液各0.25ml并涂布于初筛培养基。

2.5.3. 亚硝酸钠诱变

分别取0.02mol/L, 0.03mol/L, 0.05mol/L, 0.1mol/L亚硝酸钠溶液, 菌悬液1ml及pH4.5醋酸缓冲液2ml, 26℃分别保温10min, 15min, 20min, 25min, 加入0.07mol/L pH8.6的磷酸氢二钠溶液20ml终止反应, 将诱变后的菌悬液稀释并涂布于初筛培养基。

2.5.4. 硫酸二乙酯诱变

取0.5mlDES和4.5ml95%乙醇制成DES溶液, 将DES溶液与菌悬液按一定体积比混合, 不同体积比 (DES/菌悬液) 分别为: 0.2%, 0.4%, 0.5%, 1%, 30℃振荡处理不同的时间20min, 30min, 40min, 60min, 加入0.5mol/L 硫代硫酸钠溶液2ml终止反应, 稀释并涂布于初筛培养基。

2.5.5. 亚硝基胍诱变

取菌悬液1ml, 加入1ml浓度分别为0.3mg/ml, 0.4mg/ml, 0.5mg/ml, 0.6mg/ml的亚硝基胍溶液, 将试管放入28℃水浴中静置20, 30, 40, 50min, 向试管中加入0.5mol/L硫代硫酸钠18ml终止反应, 稀释并涂布于初筛培养基。

2.6. 分析方法

将发酵液过滤, 滤液在4℃, 8000 r/min条件下离心, 取上清液即粗酶液。绘制木糖标准曲线, 分别在试管中加入10 μmol/ml D-木糖溶液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 ml, 补入柠檬酸缓冲液至1ml, 再加入3ml DNS煮沸15min, 取出后迅速冷却, 加蒸馏水补至25ml, 以不加木糖溶液的0号管为对照, 在540nm波长处测OD值。木糖含量为横坐标, OD值为纵坐标, 绘制标准曲线。

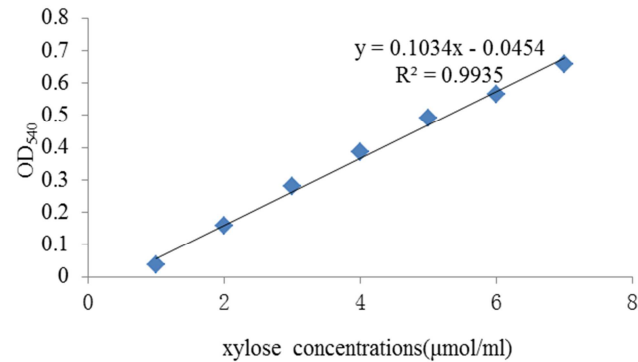


图1 木糖标准曲线。

木聚糖酶活力的测定: 取1%的木聚糖底物0.9ml加入到25ml具塞试管中, 置于50℃水浴保温10min, 加入经柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液适当稀释的酶液0.1ml, 在50℃水浴中反应10min, 加入DNS试剂3ml终止反应, 煮沸15min, 迅速冷却后补蒸馏水至25ml, 均匀混合, 在540nm波长处进行比色。对照管中的酶液灭活后加入^[13-14]。

酶活力单位定义: 50℃, pH5.0的条件下, 每分钟每毫升待测酶液分解底物释放出1 μmol还原糖的量, 计算公式如下:

酶活力 (U)=D×V₁×C_x/T×V₂[11]

D—酶液稀释倍数
V₁—比色管定容体积
C_x—木糖摩尔浓度 (μmol/ml)
V₂—酶液体积
T—酶解时间

3. 结果与分析

3.1. 紫外诱变

采用6个不同的照射时间和2个照射距离对黑曲霉进行诱变, 对黑曲霉在每个照射时间下的致死率和正突变率进行比较, 结果在波长256nm及距离20cm的照射条件下菌株的正突变率最高, 致死率处于80%~90%的理想范围。在256nm照射距离为20cm条件下, 对黑曲霉AS3.350照射不同时间进行诱变, 同一条件下挑选5株透明圈较大的突变株进行液体发酵培养, 测定木聚糖酶活力, 并与出发菌株黑曲霉AS3.350进行对照, 结果如图2所示。

从图2可知, 在256nm照射距离为20cm条件下, 照射时间从30s到90s的突变株酶活递增, 90s到180s突变株酶活有所下降, 照射时间为90s的突变株UV256-90酶活最高为为原始菌株的2.18倍。因此, 黑曲霉进行紫外诱变的最佳条件为256nm, 照射垂直距离为20cm, 照射时间为90s。

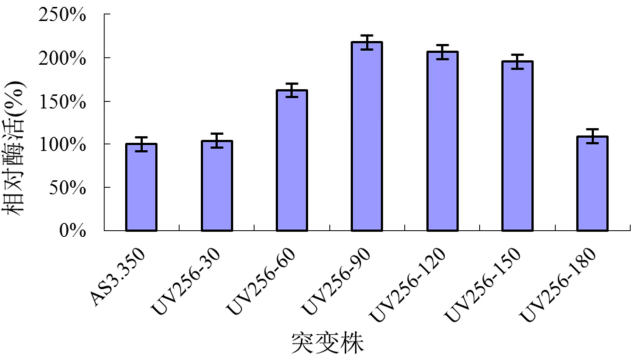


图2 紫外诱变突变株的Xylanase酶活。

3.2. 快中子照射

利用7个不同的的照射剂量对黑曲霉进行诱变, 当照射剂量在0.15Gy~4.50Gy范围内, 致死率逐渐增加, 正突变率上升后随之下降, 当剂量0.75Gy时正突变率最高, 其致死率达到40.6%, 当剂量大于4.50Gy时, 快中子照射黑曲霉的致死率接近100%, 因此0.75Gy为最佳条件。在快中子照射0.75Gy的剂量下, 挑选10株透明圈相对较大的突变株进行液体发酵培养, 测木聚糖酶活, 并与出发菌株黑曲霉AS3.350进行对照, 结果如图3所示。

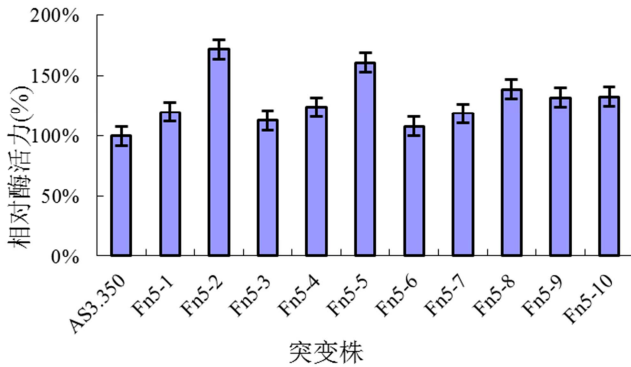


图3 快中子辐照突变株Xylanase酶活。

图3所示, 0.75Gy快中子诱变的突变株酶活力均有不同程度的提高, 其中Fn5-2株木聚糖酶活为134.77U/ml, 是原始菌株的1.72倍。说明黑曲霉对快中子辐照比较敏感, 对黑曲霉进行快中子辐照能显著提高其产木聚糖酶能力。

3.3. 亚硝酸钠诱变

利用4个不同浓度的亚硝酸钠溶液对黑曲霉AS3.350进行诱变, 致死率随着亚硝酸钠溶液浓度的增加及诱变时间的增加而增大, 亚硝酸钠的浓度为0.1%, 诱变时间为20min时致死率为90.5%, 正突变率最大达到16.1%, 属于好的诱变致死率范围。得到最佳诱变条件为亚硝酸钠浓度为0.1%, 诱变时间为20min。选取最佳诱变条件下的水解圈较大的8株突变株, 进行液体发酵培养, 测木聚糖酶酶活力。从图4可以看出, 选出的8株突变株酶活都有不同程度的提高, 其中最优突变株TNa-7酶活为原始菌株的1.46倍, 亚硝酸钠对黑曲霉的诱变效果并不明显。

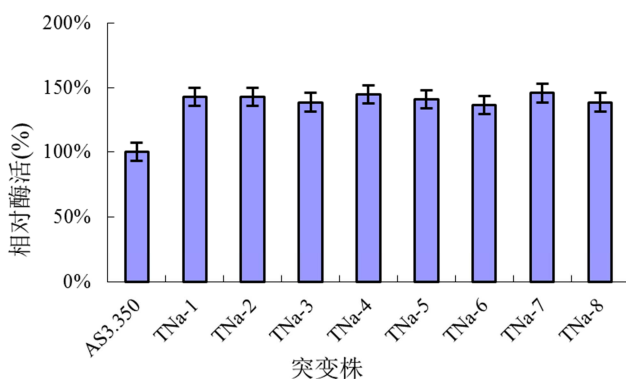


图4 亚硝酸钠诱变突变株Xylanase酶活。

3.4. 硫酸二乙酯诱变

利用硫酸二乙酯对黑曲霉AS3.350进行诱变, 发现硫酸二乙酯对黑曲霉AS3.350的致死率与硫酸二乙酯的浓度和诱变时间均成正比关系, 随着硫酸二乙酯与菌液比例的增大及诱变时间的增加, 致死率也随之增加。硫酸二乙酯诱变的最佳条件为: DES/菌液体积比为0.4%, 诱变时间为20min, 此时正突变率最高, 达40.5%。在最佳条件下对黑曲霉AS3.350进行诱变处理, 挑选透明圈相对较

大的8株突变株, 进行液体发酵培养, 测木聚糖酶活, 结果如图5所示。

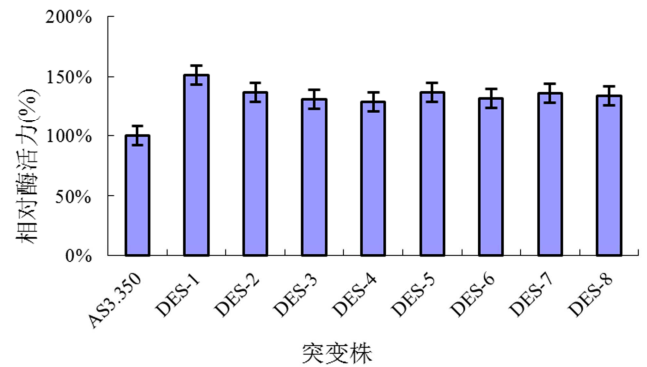


图5 硫酸二乙酯诱变突变株Xylanase酶活。

图5表明, 黑曲霉AS3.350经过硫酸二乙酯的诱变, 酶活均有不同程度的提高, 最佳诱变时间为20min, 突变株DES-1酶活为原始菌株的1.51倍, 在化学诱变中效果比较显著。

3.5. 亚硝基胍诱变

利用4种不同浓度的亚硝基胍溶液对黑曲霉AS3.350进行诱变, 发现MNNG对黑曲霉的致死率是此文介绍的三种化学诱变方法中最高的, MNNG浓度在0.3~0.5%范围内, 正突变率随浓度增大而增大, 当浓度大于0.5%正突变率有所下降, 在MNNG浓度为0.5%诱变时间为20min正突变率最高, 致死率也在较优范围, 因此MNNG诱变的最佳条件为: MNNG浓度0.5%, 诱变时间20min。在最佳条件下选透明圈相对较大的8株突变株, 进行液体发酵培养, 测木聚糖酶活, 结果如图6所示。

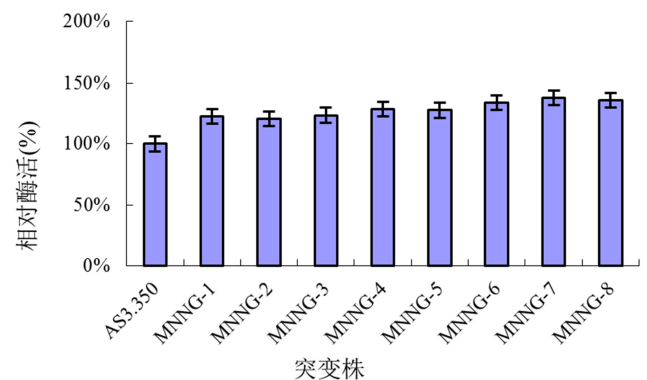


图6 亚硝基胍诱变突变株Xylanase酶活。

如图6所示, 8株突变株酶活力均有不同程度的提高, 但效果并不显著, 筛选出突变株MNNG-7的最高酶活是原始菌株的1.38倍。

4. 结论

本试验采用5种诱变方法对黑曲霉AS3.350进行诱变, 其中2种物理诱变(紫外诱变和快中子辐照)对黑曲霉产

木聚糖酶相对敏感。实验得出紫外诱变的最佳条件为: 波长256nm, 照射垂直距离20cm, 照射时间90s, 得到的突变株UV256-90产木聚糖酶 酶活为170.79U/ml, 是原始菌株的2.18倍。快中子诱变的最佳条件为: 照射剂量0.75Gy, 得到突变株Fn5-2产木聚糖酶酶活为134.77U/ml, 是原始菌株的1.72倍。化学诱变剂对其敏感度不高, 但有一定的诱变作用。化学诱变中的硫酸二乙酯诱变效果比较明显, 硫酸二乙酯诱变的最佳条件为: DES/菌液体积比0.4%, 诱变时间20min, 得到的突变株DES-1酶活为原始菌株的1.51倍。亚硝酸钠和亚硝基胍对黑曲霉AS3.350诱变效果并不显著。

参考文献

- [1] 阮同琦, 赵祥颖, 刘建军. 木聚糖酶及其应用研究进展. 山东食品发酵, 2008(1):42-45。
- [2] Vasimon Ruanglek, Rutchadaporn Sriprang, Nakul Ratanaphan. Cloning, expression, characterization, and high cell-density production of recombinant endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* [J]. Enzyme and Microbial Technology. 2007, 41(1-2):19-25.
- [3] 徐君飞, 张居作. 木聚糖酶的应用研究进展[J]. 农产品加工, 2007, (8):58-59。
- [4] 李秀婷. 微生物木聚糖酶及在食品工业中的应用[J]. 农业机械学报, 2008, 39(2):175-179。
- [5] 王修启, 邢宝松, 张兆敏, 等. 小麦基础日粮添加不同水平木聚糖酶对猪生产性能的影响[J]. 华北农学报, 2003, 18(3):114-116。
- [6] 王春雨, 邓雪娟, 李婷婷, 张爱华, 杨禄良. 饲用木聚糖酶研究进展、开发及产业化[J]. 饲料与畜牧, 2015, (7):46-50。
- [7] 赵力超, 王燕, 刘晓娟, 林俊芳. 重组多功能木聚糖酶解条件的优化[J]. 农业工程学报, 2014, 30, (1):270-277。
- [8] 郭宁. 高效耐酸耐热木聚糖酶及木聚糖酶/甘露聚糖酶双功酶的构建[D]. 湖南长沙, 中南大学, 2012, 1-69。
- [9] 黄运红, 龙中儿, 李素珍. 木聚糖酶高产微生物的筛选和鉴定[J]. 江西师范大学学报:自然科学版, 2002, 6(3):245-248。
- [10] 江均平, 严自正, 张树政. 海枣曲霉木聚糖酶降解寡聚木糖的特性[J]. 生物化学与生物物理学报, 1995, 27(3):287-92。
- [11] 王聪, 张光杰. 木聚糖酶高产黑曲霉的选育及其酶学性质研究[J]. 生物技术通报, 2010, (6):227-230。
- [12] 陈凤莲, 朱兴杰, 许世玉, 方桂珍. 黑曲霉的紫外诱变及其液体发酵产木聚糖酶[J]. 哈尔滨商业大学学报, 2009, 25(1):47-50。
- [13] 李彩霞, 房桂干, 刘书钗. 木聚糖酶酶活测定方法[J]. 纸和造纸, 2011(1):60-61。
- [14] 武玉波, 冯秀燕. 木聚糖酶酶活测定方法的研究[J]. 中国饲料, 2008(4):34-36。