

# 氦-氖激光诱变细菌细胞及原生质体选育 果胶酶高产菌株\*

朱宏莉<sup>1,2</sup> 郭爱莲<sup>1</sup> 宋纪蓉<sup>2,\*\*</sup> 杨秀芳<sup>3</sup> 张 嘉<sup>1</sup> 张晓瑞<sup>1</sup>

(1 西北大学生命科学学院, 西安 710069)

(2 西北大学化工学院, 西安 710069)

(3 西安理工大学机械与精密仪器工程学院, 西安 710048)

**摘 要** 利用氦-氖激光(波长 632.8 nm, 功率 15 mW)诱变果胶酶产生菌的菌体细胞, 获得了突变株 ZH-g, 其酶活达到  $301 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 是出发菌株的 1.3 倍. 进一步用氦-氖激光照射 ZH-g 的原生质体, 从而得到了高产突变株 ZH-gA, 其酶活达到  $357 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 比 ZH-g 提高了 18%, 是出发菌株的 1.6 倍. 该菌株在好氧和静置条件下均能良好产酶, 经传代实验证明其产酶性能稳定.

**关键词** 果胶酶; 细菌; He-Ne 激光; 原生质体; 诱变

**中图分类号** Q93 **文献标识码** A

## 0 引言

果胶酶是作用于果胶质的一类酶的总称<sup>[1]</sup>. 它可以存在于植物初生细胞壁和胞间层中的果胶质分解为半乳糖醛酸等物质, 从而破坏植物细胞壁, 并使细胞分离, 结构受损. 利用此性质果胶酶被广泛应用于食品、造纸、麻料脱胶、木材防腐、环境保护及饲料加工等多个领域<sup>[2~6]</sup>. 目前, 对于果胶酶产生菌的研究以霉菌居多<sup>[7~9]</sup>, 对于细菌作为酶源的研究和报道极少<sup>[10,11]</sup>. 在诱变育种方面, 国内外大多采用 UV, NTG, Co<sup>60</sup>, EMS 等理化诱变剂, 而利用 He-Ne 激光作用于产果胶酶细菌的原生质体以提高酶活, 这方面的研究还鲜有报道<sup>[12]</sup>.

激光可直接损伤或切割 DNA, 引起染色体结构或染色体数量的变化, 通过细胞分裂将这些变化遗传给下一代; 也可使其能量在染色体及 DNA 分子周围聚集, 引起分子剧烈运动或变化, 从而使 DNA 分子发生突变, 这就为微生物的诱变育种提供了有利的条件<sup>[13]</sup>. 选用原生质体作为诱变对象, 是因为原生质体与菌体细胞相比缺少了细胞壁的保护, 因此对于各种诱变剂更为敏感, 且更易发生变异, 据资料显示<sup>[14,15]</sup>, 当用菌体细胞作诱变对照时, 原生质体的正变株及其产量的正变幅度均大于菌体细胞. 基于此, 本文采用 He-Ne 激光先后照射果胶酶产生菌的菌体细胞及原生质体, 以筛选酶活明显提高的高产菌株.

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种来源

菌株 ZH-A 为本实验室选育菌株

### 1.2 培养基

#### 1.2.1 试管斜面培养基

牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 20 g, 自来水 1000 mL, pH7.0~7.2.

#### 1.2.2 平板分离培养基

牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 4.16 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.36 g, 桔皮粉 10 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL, pH7.0~7.2.

#### 1.2.3 种子培养基(%)

葡萄糖 1, 果胶粉 0.5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.42, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.14, pH7.0~7.2, 固体培养基加 2% 琼脂粉.

#### 1.2.4 初筛培养基

上层: 果胶粉 1%, 琼脂粉 3%, 10 mL;  
底层: 固体种子培养基, 琼脂粉 2%, 12mL, pH7.0~7.2.

#### 1.2.5 发酵培养基(%)

麸皮 2, 桔皮粉 2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.42, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.14, CaCl<sub>2</sub> 0.01, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.001, pH7.0~7.2.

#### 1.2.6 再生培养基(DM)

给 CM<sup>[17]</sup> 培养基内加入 0.5 M 蔗糖, pH7.0~7.2, 固体培养基加 2% 琼脂粉, 半固体培养基加 0.7% 琼脂粉<sup>[14]</sup>.

#### 1.2.7 原生质体制备液或原生质体稀释用高渗缓冲液(DF)

0.25 M 蔗糖, 0.25 M 丁二酸钠, 0.001 M

\* 陕西省教委基金资助项目(00JK138)

\*\* Tel: 029-88302043 Email: zhuyjw1971@126.com

收稿日期: 2005-04-01

EDTA, 0.02 M  $K_2HPO_4$ , 0.11 M  $KH_2PO_4$ , 0.01 M  $MgCl_2$ , pH7.0<sup>[14]</sup>.

### 1.3 He-Ne 激光诱变 ZH-A 菌体

1) 菌悬液的制备: 将 ZH-A 培养液以 1% 接种量转接到新鲜的种子培养液中, 35℃ 振荡培养 12 h, 取 10 mL 离心 (4000 r/min) 15 min, 弃去上清液将菌体沉淀用无菌生理盐水洗涤, 制成浓度为  $10^6$  个/mL 菌悬液.

2) He-Ne 激光处理过程: 将 0.2 mL 菌悬液置于已灭菌的小试管中进行照射, He-Ne 激光 ( $\lambda = 632.8$  nm) 的输出功率为 15 mW, 扩束光斑直径 0.3 cm, 输出电流 11 mA, 照射距离 30 cm, 照射剂量分别为: 15 min、20 min、25 min、30 min, 另设对照 (CK) 0 min.

### 1.4 He-Ne 激光诱变 ZH-g 的原生质体

原生质体的制备与再生过程参照文献[14~20]进行.

将按上述文献制备好的原生质体液 (原生质体含量约  $10^6$  个/mL) 0.2 mL 装入无菌小试管中, 用 He-Ne 激光 ( $\lambda = 632.8$  nm) 辐射, 照射条件同上.

### 1.5 突变株的筛选

将照射后的菌悬液和原生质体液先经过中间培养 4~6 h, 然后, 对于菌悬液采用无菌生理盐水进行系列稀释, 涂布于初筛平板上进行初筛; 对于原生质体液则采用 DM 液系列稀释, 涂布于 DM 平皿上培养, 33℃ 倒置培养 48 h. 将再生单菌落 (尤其是生长迅速、表型特征典型的菌落) 镜检并移接斜面, 33℃ 培养 24 h 后, 在初筛培养基平板上点种 (每板点三个菌株), 33℃ 培养, 将其中生长快及透明圈与菌落直径比大的菌株挑出, 进行复筛.

复筛方法: 将初筛选出的菌株先移接斜面, 然后取一环菌接入种子培养液中, 33℃ 摇床培养 12~14 h, 再以 5% 的接种量接入发酵培养基中, 33℃ 摇床发酵, 测发酵液中果胶酶的活力, 确定高产稳定株.

### 1.6 酶活测定

采用次亚碘酸法<sup>[21]</sup>. 酶活单位 (IU) 定义为: 50℃, pH6.5-7.0, 每分钟水解聚半乳糖醛酸产生 1  $\mu$ g 游离半乳糖醛酸的酶量.

### 1.7 产酶曲线的测定

将菌种接一环于种子培养液中, 33℃ 振荡培养 12~14 h, 再以 5% 的接种量接入发酵培养基中进行摇床培养, 从第 12 h 起, 每隔 4 h 取样, 测酶活力.

### 1.8 静置条件对 ZH-gA 产酶的影响

将原生质体诱变所筛选的突变株 ZH-gA 接种于起始 pH7.0 的处于静置状态的发酵培养基中, 33℃ 静置发酵, 测定静置条件对 ZH-gA 产酶的影响.

## 1.9 ZH-gA 的斜面传代稳定性测定

将 ZH-gA 每月传代一次, 连续传代五次, 将五次传代的斜面同时活化进行发酵, 测定每次传代后的酶活力.

## 2 结果和讨论

### 2.1 He-Ne 激光诱变 ZH-A 菌体

He-Ne 激光可诱发细菌染色体畸变、造成 DNA 分子损伤, 从而引起细胞遗传物质改变和细胞代谢活动变化, 这就为诱变育种提供了有利条件.

分别从不同照射时间组平板培养基上挑取相同数量的单菌落, 先移接斜面培养, 然后摇床发酵测酶活, 以未处理的菌株作对照, 求出其正变率<sup>[22]</sup>.

如表 1, 随着照射时间的延长, 致死率不断上升, 而正变率却存在一个先升后降的趋势. 这就说明致死率与正变率并非正相关.

表 1 He-Ne 激光不同辐射剂量下 ZH-A 的致死率及正变率

| 辐射剂量/min | 0    | 15  | 20   | 25   | 30  |
|----------|------|-----|------|------|-----|
| 菌株数      | ZH-A | 50  | 50   | 50   | 50  |
| 致死率/(%)  | 0    | 51  | 54   | 63   | 70  |
| 正变率/(%)  | 0    | 5.2 | 10.1 | 10.7 | 6.9 |

分别用 4 个不同的辐照剂量处理 ZH-A, 获得了几百株辐照菌, 经初筛、复筛从中选出了四株产酶较 ZH-A 明显增高的突变株, 结果如表 2.

表 2 He-Ne 激光诱变所筛选的突变株的酶活力

| 菌株编号                        | 1 <sup>#</sup> | 2 <sup>#</sup> | 3 <sup>#</sup> | 4 <sup>#</sup> | ZH-A |
|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------|
| 辐射剂量/min                    | 25             | 15             | 20             | 15             |      |
| 酶活力/(u · mL <sup>-1</sup> ) | 265            | 301            | 316            | 282            | 227  |

由表 2 可看出, 2<sup>#</sup> 菌的产酶活力是 ZH-A 的 1.3 倍, 3<sup>#</sup> 为 1.4 倍, 经传代测酶活, 2<sup>#</sup> 菌的酶活力变化不大较稳定, 因此选择生长快, 形成透明圈大且产酶性能稳定的 2<sup>#</sup> 菌作为下一步诱变菌, 定名为 ZH-g.

### 2.2 He-Ne 激光诱变 ZH-g 原生质体

将制备好的 ZH-g 原生质体液 (原生质体含量  $10^6$  个/mL), 用 15 mW 的 He-Ne 激光辐射后, 其致死率及正变率见表 3.

表 3 He-Ne 激光照射 ZH-g 原生质体的致死率及正变率

| 辐射剂量/min | 0    | 15  | 20   | 25   | 30  |
|----------|------|-----|------|------|-----|
| 菌株数      | ZH-g | 50  | 50   | 50   | 50  |
| 致死率/(%)  | 0    | 62  | 71   | 79   | 87  |
| 正变率/(%)  | 0    | 9.0 | 21.4 | 16.8 | 6.5 |

如表 3, 脱去细胞壁的原生质体对激光的反应更为敏感, 因此相同照射剂量下, 原生质体的致死率要高于菌体的致死率. 随着辐射剂量的延长, 致死率也呈明显上升趋势. 分析其正变率可以看出, 由于原生质体缺少了细胞壁的阻挡, 对激光辐射更为敏感, 更易于发生变异, 而且正变率更高, 这一结果

与文献报道相吻合<sup>[14,15]</sup>.

### 2.3 突变株的筛选

挑取几百株辐照后的再生菌落镜检并移接斜面培养 24 h, 然后进行初筛、复筛, 从中选出了三株酶活明显提高的突变株, 结果见表 4.

表 4 原生质体诱变所筛选的突变株的酶活力

| 菌株编号                      | 1 <sup>#</sup> | 2 <sup>#</sup> | 3 <sup>#</sup> | ZH-g | ZH-A |
|---------------------------|----------------|----------------|----------------|------|------|
| 辐射剂量/min                  | 20             | 20             | 15             |      |      |
| 酶活力/(u·mL <sup>-1</sup> ) | 341            | 357            | 338            | 301  | 227  |

如表 4, 经过原生质体诱变后, 筛选出了一株高产果胶酶菌株, 其酶活比 ZH-g 提高 18%, 比 ZH-A 提高 60% 左右, 产酶达到 357 u·mL<sup>-1</sup>, 将其最终定名为 ZH-gA.

### 2.4 He-Ne 激光诱变前后菌体形态的对比

诱变前显微镜观察 ZH-A 为杆状菌, 杆端半圆形, 菌体常排列呈链状, 菌体直径为 0.7 μm 左右, 菌体长度为 2.2~3.0 μm; ZH-A 的菌落形状不规则, 边缘呈放射状, 表面有褶皱, 菌落灰白较干燥.

诱变后的 ZH-gA 个体形态尽管仍为杆状, 但明显变粗, 菌体直径达到 0.9~1 μm, 其菌落比 ZH-A 大, 表面细皱不明显, 菌落较白更干燥, 且这种改变是稳定可遗传的.

这可能因为 He-Ne 激光照射引起了决定形态特征的某些基因发生突变, 从而使菌种的个体形态和群体形态均发生了相应改变. 这种形态上的变化有利于进行突变株的筛选.

### 2.5 He-Ne 激光诱变前后菌体产酶情况对比

由图 1 可看出, ZH-A 在发酵第 36 h 产酶达到最高, 约为 227 μ/mL. 而经 He-Ne 激光照射后的 ZH-gA 产酶高峰期可比 ZH-A 提前 4 h, 大约在第 32 h 出现产酶最高峰, 且酶活明显提高, 达到 357 μ/mL. 这样, 在发酵大生产中, 既可缩短发酵周期, 又可提高酶活, 具有较高的应用价值.

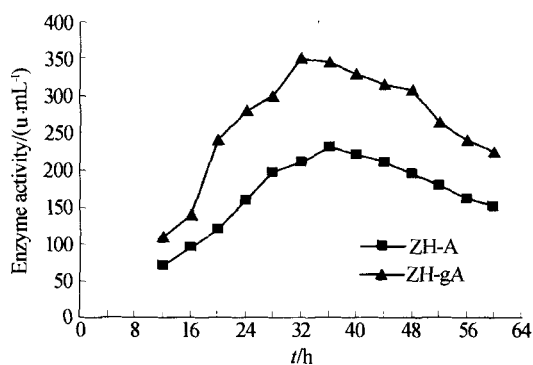


图 1 培养时间与菌体产酶的关系

Fig. 1 Time course of enzyme production

分析上述结果可能由于酶是基因表达的产物, 而 He-Ne 激光照射引起了合成相应酶的基因发生

了改变, 从而使其产酶能力明显提高.

### 2.6 静置条件对 ZH-gA 产酶的影响

ZH-gA 于起始 pH7.0 的发酵培养基中, 33℃ 静置发酵 50 h 左右, 产酶达到最高, 约为 308 u·mL<sup>-1</sup>, 说明 ZH-gA 在好氧和静置条件下均能良好产酶.

### 2.7 ZH-gA 斜面传代稳定性的测定结果

由表 5 可看出, 经传代五次后, 酶活变化不大, 证明 ZH-gA 的遗传性比较稳定.

表 5 ZH-gA 斜面传代稳定性试验

| 传代次数                             | 一   | 二   | 三   | 四   | 五   |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| ZH-gA 的酶活力/(u·mL <sup>-1</sup> ) | 360 | 362 | 353 | 356 | 344 |

## 3 结论

He-Ne 激光诱变是一种高效的诱变育种新技术, 具有能量密度高、靶点小、单色性和方向性好、诱变当代即可出现遗传性突变等特点, 因此在微生物育种中得到广泛的应用. 然而, 目前利用 He-Ne 激光诱变原生质体获得果胶酶细菌高产菌株的研究还很少. 本文在这方面作了一些有益的探索, 通过采用 He-Ne 激光(波长 632.8 nm, 功率 15 mW)分别以 15 min、20 min、25 min、30 min 照射菌体细胞及原生质体, 筛选到了一株酶活明显提高的突变株. 同时采用一株兼性厌氧的细菌作为出发菌株, 弥补了霉菌生产果胶酶的某些缺陷. 诸如: 霉菌生长和产酶需要充分的氧气, 从而使其在氧气缺乏的条件下分解果胶的应用受到了限制; 而且霉菌产酶周期长, 菌丝缠绕妨碍酶的生产 and 提取等等, 因此筛选需氧量少、产酶周期短的高酶活细菌具有广泛的应用价值.

### 参考文献

- Sathyanarayana N G, Panda T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review. *Process Biochemistry*, 2003, **38**: 987~996
- Kashyap D R, Vohra P K, Chopra S, et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 2001, **77**: 215~227
- Voragen F, Schols H, Visser R. Advances in pectin and pectinase research. *Dordrecht: Klumer Academic Publishers*, 2003. 10~155
- Bhat M K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 2000, **18**: 355~383
- Liliana C, Jorge L. Determination of enzymatic activities of commercial pectinases for the clarification of apple juice. *Food Chemistry*, 1998, **61**(1/2): 237~241
- 葛菁萍, 凌宏志, 宋刚, 等. 果胶酶产生菌的分离及培养条件研究. *中国生物工程杂志*, 2004, **24**(8): 93~95  
Ge J P, Ling H Z, Song G, et al. *China Biotechnology*, 2004, **24**(8): 93~95

- 7 杨天波,朱宝成,李潞滨,等. 果胶酶产生菌原生质体高能电子诱变效应. 河北大学学报(自然科学版),1989,3-4:71~76  
Yang T B, Zhu B C, Li L B, et al. *Journal of HeBei University (Natural Science Edition)*, 1989,3-4:71~76
- 8 朱宝成,王俊刚,成亚利,等. 果胶酶产生菌原生质体再生及诱变育种. 微生物学通报,1994,21(1):15~18  
Zhu B C, Wang J G, Cheng Y L, et al. *Microbiology*, 1994,21(1):15~18
- 9 陈荣,谢必峰,陈哲超,等. 激光诱变选育果胶酶高产菌株. 光子学报,1997,26(2):97~100  
Chen R, Xie B F, Chen Z C, et al. *Acta Photonica Sinica*, 1997,26(2):97~100
- 10 Des R K, Sanjeer K S, Rupinder T. Enhanced production of pectinase by *Bacillus sp.* DT7 using solid state fermentation. *Bioresource Technology*, 2003,88:251~254
- 11 张银梅,李心治,黄凡,等. 枯草杆菌产果胶酶的研究. 工业微生物,2000,30(1):25~27  
Zhang Y M, Li X Z, Huang F, et al. *Industry Microbiology*, 2000,30(1):25~27
- 12 吴振昌. 微生物激光育种学的新进展. 激光生物学报,2004,13(1):3~7  
Wu Z C. *Acta Laser Biology Sinica*, 2004,13(1):3~7
- 13 向洋. 激光生物学. 湖南:湖南科学技术出版社,1995. 114~121  
Xiang Y. *Laser Biology*. Hunan: Hunan Science Technology Press, 1995. 114~121
- 14 周东坡,平文祥. 微生物原生质体融合. 哈尔滨:黑龙江省科学技术出版社,1990. 1~106  
Zhou D P, Ping W X. *Microbiology Protoplast Fusion*. Haerbin: Heilongjiang Science Technology Press, 1990. 1~106
- 15 王卫卫,任鹏康,闫明,等. He-Ne激光对 $\gamma$ -亚麻酸产生菌少根根霉的诱变作用. 光子学报,2002,31(2):157~161  
Wang, W W, Ren P K, Yan M, et al. *Acta Photonica Sinica*, 2002,31(2):157~161
- 16 Chang S, Cohen S N. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Molec Gener Genet*, 1979,168(1):111~115
- 17 周东坡,郭德栋,平文祥,等. 提高枯草杆菌原生质体再生率的进一步研究. 微生物学杂志,1985,5(4):51~54  
Zhou D P, Guo D D, Ping W X, et al. *Microbiologica Magazine*, 1985,5(4):51~54
- 18 郭德栋,周东坡,张丽琴,等. 提高枯草杆菌原生质体再生率的研究. 实验生物学报,1984,17(1):119~124  
Guo D D, Zhou D P, Zhang L Q, et al. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*, 1984,17(1):119~124
- 19 周东坡,平文祥,贾树彪,等. 原生质体融合选育赖氨酸高产菌株的研究. 微生物学报,1991,31(4):287~292  
Zhou D P, Ping W X, Jia S B, et al. *Acta Microbiologica Sinica*, 1991,31(4):287~292
- 20 孙剑秋,周东坡. 微生物原生质体技术. 生物学通报,2002,37(7):9~11  
Sun J Q, Zhou D P. *Biology*, 2002,37(7):9~11
- 21 张玉墀. 果胶酶产生菌的选育. 食品科学,1987,2:14~18  
Zhang Y X. *Food Science*, 1987,2:14~18
- 22 黄建新,马艳玲,惠友权,等. He-Ne激光对产ALDC地衣芽孢杆菌的诱变效应. 光子学报,2001,30(6):680~683  
Huang J X, Ma Y L, Xi Y Q, et al. *Acta Photonica Sinica*, 2001,30(6):680~683

## The Breeding of High-Yield Pectinase Producing Bacteria Using He-Ne Laser Irradiation on the Cell and Protoplasts

Zhu Hongli<sup>1,2</sup>, Guo Ailian<sup>1</sup>, Song Jirong<sup>2</sup>, Yang Xiufang<sup>3</sup>, Zhang Jia<sup>1</sup>, Zhang Xiaorui<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Life science, Northwest University, Xi'an 710069

<sup>2</sup> Institute of chemistry Engineering, Northwest University, Xi'an 710069

<sup>3</sup> College of Machinery and Precision Instrument, Xi'an University of Technology, Xi'an 710048

Received date: 2005-04-01

**Abstract** A mutant strain ZH-g was screened by He-Ne laser mutagenesis on the cells. Its pectinase activity was in 1.3 fold of the original one, reaching 301  $\mu$ /mL. On the basis of this, using He-Ne laser irradiating on the protoplasts of ZH-g, the mutant strain ZH-gA with high yield of pectinase was obtained. It accumulated pectinase activity up to 357  $\mu$ /mL which was 18% higher than that of the parent strain. This strain can produce pectinase efficiently under both aerobic and static cultivation. The enzyme activity is stable after several times of batch.

**Keywords** Pectinase; Bacteria; He-Ne laser; Protoplast; Mutagenesis



**Zhu Hongli** is a lecturer in Institute of Life Science, Northwest University. From the same University, she postgraduated in microbiology in 1998. Since then, she has taught and researched in the area of applied microbiology. In result, she has made achievement in the field of fermentation technology. She has published over 10 papers and was in charge of several research projects.