文章编号:1674-2869(2012)11-0014-04

降解多聚半乳糖醛酸菌株的诱变

朱雄伟,熊　瑶,苏腾甲
(武汉工程大学化工与制药学院,绿色化工过程省部共建教育部重点实验室,湖北 武汉 430074)

摘　要:从食品工业的废水池中筛选分离得到一株能有效降解多聚半乳糖醛酸的菌株,通过测定其16 S rRNA 的序列,证明该菌株属细菌类,命名为 HDYM-02. 为了使分离得到的原始菌株降解多聚半乳糖醛酸的能力达到实际应用的要求,运用硫酸二乙酯、叠氮钠、马来酰肼及紫外对降解多聚半乳糖醛酸生产菌菌株 HDYM-02 进行诱变,使用刚果红染色法对诱变得到菌株进行筛选,并检测突变菌株对多聚半乳糖醛酸降解能力,选育出高效降解多聚半乳糖醛酸的菌株. 结果表明:出发菌株经过叠氮钠诱变 30 min 时,诱变得到的菌株降解效率高,是出发菌株的 1.66 倍,达到实际应用的要求.

关键词:诱变;紫外;硫酸二乙脂;叠氮钠;马来酰肼
中图分类号:Q933　　**文献标识码**:A　　**doi**:10.3969/j.issn.1674-2869.2012.11.004

0　引　言

半乳糖醛酸是植物细胞间质中纤维素、半纤维素、木质素和多聚半乳糖醛酸的组成成分,是多糖类的物质,以多聚体的形式存在于纤维素、半纤维素木质素和多聚半乳糖醛酸中. 而纤维素、半纤维素、木质素、多聚半乳糖醛酸是难降解的物质[1-2]. 在造纸废水和食品工业废水中,它们的存在对废水的处理增加了很大的难度,如果降解了它们组成中的多聚半乳糖醛酸,对降解废水中这些难降解物质就非常有利.

笔者从含纤维素、半纤维素、木质素的废水池和食品工业的废水池中筛选分离得到一株能有效降解多聚半乳糖醛酸的菌株. 经过前期研究,在食品工业废水中筛选的菌株降解能力强,并在以上两种废水环境生存能力强,以此菌株为研究菌株,通过 16S rRNA 的鉴定,此菌株属细菌类,初步命名为 HDYM-02. 为了进一步提高菌株降解多聚半乳糖醛酸的能力,我们对其作进一步诱变处理,虽然诱变育种方法产生的是不定向变异,但诱变结果相对于单纯的纯培养选育均有较大的突变率. 菌株通过合适的诱变,能更好地选育出产降解能力更强、菌株性质更稳定、针对性更强的新菌株[3]. 本研究通过三种诱变剂(硫酸二乙酯、叠氮钠、马来酰肼)和紫外线对此菌株进行诱变,从诱变菌株中进行筛选,选育出更好的菌株.

1　实验部分

1.1　材　料

1.1.1　菌株及保存条件　　以从食品工业废水池中筛选的具有降解多聚半乳糖醛酸菌株 HDYM-02 为研究菌株,在琼脂斜面保藏培养基上传代,4 ℃保存备用.

1.1.2　试剂与仪器　　0.1%的刚果红染色试剂;DNS 试剂; 0.85%生理盐水;pH 7.0 磷酸缓冲液;多聚半乳糖醛酸(美国 Sigma 公司生产);硫酸二乙酯;叠氮钠;马来酰肼;紫外灯;红外灯;电子天平;2001 型振荡恒温培养箱;水平离心机;立式压力蒸汽灭菌锅;岛津紫外 UV-1800 分光光度计.

1.1.3　培养基　　固体培养基:多聚半乳糖醛酸 0.5%(为质量分数,下同),蛋白胨 1%,氯化钠 0.5%,琼脂 2%;液体培养基:多聚半乳糖醛酸 0.5%,蛋白胨 1%,氯化钠 0.5%;多聚半乳糖醛酸琼脂培养基:多聚半乳糖醛酸 0.2%,琼脂 2%.

1.2　方　法

1.2.1　菌体收集　　将多聚半乳糖醛酸酶生产菌株 HDYM-02,在固体培养基上于 35 ℃培养12 h,待菌落长出后接入液体培养基,35 ℃下 120 r/min 摇床培养 48 h. 将菌体培养液 3 500 r/min 离心 15 min收集菌体,pH 7.0 的磷酸缓冲溶液洗涤离心三次,备用.

收稿日期:2012-07-03
作者简介:朱雄伟(1973-),男,湖北咸宁人,讲师,博士研究生. 研究方向:微生物培养.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

1.2.2　诱变方法[4]　**a.** 硫酸二乙酯诱变：取 3 份菌悬液分别标记 I、II、III，各加入质量分数 1% 硫酸二乙酯溶液 0.2 mL，I 号诱变处理 60 min，II 号诱变处理 30 min，III 号诱变处理 10 min. 诱变结束后立即使用 pH 7.0 磷酸缓冲溶液稀释、并离心洗涤三次. 稀释后涂布到固体培养基上，35 ℃恒温培养 48 h.

b. 叠氮钠诱变：取 3 份菌悬液分别编号为 IV、V、VI，各加入质量分数 0.3% 叠氮钠溶液 0.2 mL，IV 号诱变处理 60 min，V 号诱变处理 30 min，VI 号诱变处理 10 min. 诱变结束后立即使用 pH 7.0 磷酸缓冲溶液稀释、并离心洗涤三次. 稀释后涂布到固体培养基上，35 ℃恒温培养 48 h.

c. 马来酰肼诱变：取 3 份菌悬液分别编号为 VII、VIII、IX，各加入质量分数 0.6% 马来酰肼溶液0.2 mL，VII 号诱变处理 60 min，VIII 号诱变处理 30 min，IX 号诱变处理 10 min. 诱变结束后立即使用 pH 7.0 磷酸缓冲溶液稀释、并离心洗涤三次. 稀释后涂布到固体培养基上，35 ℃恒温培养 48 h.

d. 紫外诱变[5]：取 3 份菌悬液分别编号为 X、XI、XII，将菌悬液置于培养皿中培养，X、XI、XII 号培养皿放置在磁力搅拌器载物台上，先开启紫外灯(18 W，距离 24 cm)预热 30 min，然后开启搅拌器，打开皿盖开启紫外灯照射，X 号处理 0 s，XI 号处理 30 s，XII 号处理 60 s. 稀释后涂布到固体培养基上，35 ℃恒温培养 48 h，整个操作需要红光下进行.

1.2.3　突变菌株的筛选　**a.** 刚果红染色法筛选：多聚半乳糖醛酸酶产生菌诱变育种的筛选方法很多，报道较多的是透明区带法. 本研究使用的是刚果红染色法. 将经过紫外及三种化学诱变剂(硫酸二乙酯、叠氮钠、马来酰肼)诱变得到的菌株分别置于固体培养基中培养，并将培养皿编号 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII，35 ℃恒温培养 12 h，待菌落长出后，于其上铺多聚半乳糖醛酸琼脂培养基，继续培养 6 h，然后用质量分数 0.1% 的刚果红染色 15 min，用生理盐水冲洗至无红色水流出，放于冰箱中过夜. 次日观察，有多聚半乳糖醛酸分解能力的菌落周围出现清晰的透明圈. 用游标卡尺测量透明圈直径(H)以及菌落的直径(C)，计算 H/C 值. 计算出上述 12 个平板中的 H/C 值，比值大的说明多聚半乳糖醛酸分解能力强.

b. 降解能力的测定：本研究测定降解半乳糖醛酸能力的方法是 DNS 比色法，是一种比较简单易行的方法. 多聚半乳糖醛酸彻底水解后变为半乳糖醛酸；半乳糖醛酸可与 DNS 试剂在一定条件下发生颜色反应. 反应的结果可以用分光光度计在 540 nm 波长处检测出来，据此可得出菌株降解多聚半乳糖醛酸的能力. 取适量发酵液置于15 mL 离心管中，5 000 r/min 离心 15 min，提取上清液. 质量分数 1% 多聚半乳糖醛酸溶液 1.0 mL，50 ℃预热3 min，加上清液 0.2 mL 混合，50 ℃水解 10 min，加 DNS 试剂 3 mL，混合后于沸水浴中 10 min，冷却定溶 15 mL. 并用等量的煮沸过的上清液 0.2 mL 空白调零，540 nm 下测定吸光度值[6].

2　结果与分析

2.1　硫酸二乙酯诱变处理

2.1.1　刚果红染色法筛选[7]　将硫酸二乙酯诱变得的菌株 I、II、III，对菌株进行刚果红染色，得到菌株 I、II、III 的 H/C. 如表 1 所示.

表 1　硫酸二乙酯诱变菌株的 H/C 值

Table 1　H/C value of strains by ethyl methanessulfonate mutation

菌株	出发菌株	硫酸二乙酯诱变后菌株		
		I	II	III
H/C	1.341	1.435	2.051	1.831
提高	0	0.094	0.710	0.490
提高百分率	0	7.0%	52.9%	36.5%

由表 1 可知，菌株 I、II、III 的 H/C 值都有所增加，提高最大的是菌株 II，提高百分率可达 52.9%.

2.1.2　硫酸二乙酯诱变菌株降解能力的测定

将硫酸二乙酯诱变得的菌株 I、II、III[8]，分别测定菌株 I、II、III 降解能力的相对值. 如表 2 所示.

表 2　硫酸二乙酯诱变菌株降解能力

Table 2　Degradation ability of strains by ethyl methanessulfonate mutation

	I	II	III	出发菌株
降解能力(相对值)	483.28	707.85	600.18	507.90

由表 2 可知，菌株 II、III 的酶活力都有所增加，提高最大的是菌株 II，此菌株的降解能力是出发菌株的 1.39 倍.

2.2　叠氮钠诱变处理

2.2.1　刚果红染色法筛选　将叠氮钠诱变得的菌株 IV、V、VI，对菌株进行刚果红染色[9]，得到菌株 IV、V、VI 的 H/C. 如表 3 所示.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 3 叠氮钠诱变菌株的 H/C 值

Table 3 H/C value of strains by sodium azide mutation

菌株	出发菌株	叠氮钠诱变后菌株		
		IV	V	VI
H/C	1.341	1.142	2.169	1.820
提高	0	−0.199	0.828	0.479
提高百分率	0	−14.8%	61.7%	35.7%

由表 3 可知，菌株 V、VI 的 H/C 值都有所增加，提高最大的是菌株 V，提高百分率可达 61.7%.

2.2.2 叠氮钠诱变菌株降解能力的测定 将叠氮钠诱变得的菌株 IV、V、VI[10]，分别测定菌株 IV、V、VI 降解能力的相对值. 如表 4 所示.

表 4 叠氮钠诱变菌株降解能力

Table 4 Degradation ability of strains by sodium azide mutation

	IV	V	VI	出发菌株
降解能力(相对值)	440.22	812.45	594.03	507.90

由表 4 可知，菌株 V、VI 的降解能力都有所增加，提高最大的是菌株 V，此菌株的降解能力是出发菌株的 1.60 倍.

2.3 马来酰肼诱变处理

2.3.1 刚果红染色法筛选 将马来酰肼诱变得的菌株 VII、VIII、IX[11]，对菌株进行刚果红染色，得到菌株 VII、VIII、IX 的 H/C. 如表 5 所示.

表 5 马来酰肼诱变菌株的 H/C 值

Table 5 H/C value of strains by maleic hydrazide mutation

菌株	出发菌株	马来酰肼诱变后菌株		
		VII	VIII	IX
H/C	1.341	1.457	1.957	1.745
提高	0	0.116	0.616	0.404
提高百分率	0	8.7%	45.9%	30.1%

由表 5 可知，菌株 VII、VIII、IX 的 H/C 值都有所增加，提高最大的是菌株 VIII，提高百分率可达 45.9%.

2.3.2 马来酰肼诱变菌株降解能力的测定 将马来酰肼诱变得的菌株 VII、VIII、IX[12]，分别测定菌株 VII、VIII、IX 降解能力的相对值. 如表 6 所示.

表 6 马来酰肼诱变菌株降解能力

Table 6 Degradation ability of strains by maleic hydrazide mutation

	VII	VIII	XI	出发菌株
降解能力(相对值)	504.82	630.95	547.89	507.90

由表 6 可知，菌株 VIII、IX 的降解能力都有所增加，提高最大的是菌株 VIII，此菌株的降解能力是出发菌株的 1.24 倍.

2.4 紫外诱变处理

2.4.1 刚果红染色法筛选 紫外诱变得的菌 X、XI、XII[13]，对菌株进行刚果红染色，得到菌株 X、XI、XII 的 H/C. 如表 7 所示.

表 7 紫外诱变菌株的 H/C 值

Table 7 H/C value of strains by ultraviolet light mutation

菌株	出发菌株	紫外诱变后菌株		
		X	XI	XII
H/C	1.341	1.341	1.795	1.847
提高	0	0	0.454	0.506
提高百分率	0	0	33.9%	37.7%

由表 7 可知，由于菌株 X 紫外诱变的时间为 0 s，相当于没有诱变，故其与出发菌株相同. 菌株 XI、XII 的 H/C 值都有所增加，提高最大的是菌株 XII，提高百分率可达 37.7%.

2.4.2 紫外诱变菌株降解能力的测定 将紫外诱变得的菌株 X、XI、XII，分别测定菌株 X、XI、XII 降解能力的相对值. 如表 8 所示.

表 8 紫外诱变菌株降解能力

Table 8 Degradation ability of strains by ultraviolet light mutation

	X	XI	XII	出发菌株
降解能力(相对值)	507.90	575.57	517.12	507.90

由表 8 可知，菌株 XI、XII 的降解能力都有所增加，提高最大的是菌株 XII，此菌株的降解能力是出发菌株的 1.33 倍.

3 结 语

本研究使用三种化学诱变剂(硫酸二乙酯、叠氮钠、马来酰肼)及紫外对分离筛选得到的降解多聚半乳糖醛酸生产菌株 HDYM-02 进行诱变，得到多个诱变菌株，并使用刚果红染色法筛选诱变菌株，测定它们的降解能力[14−15]. 结果表明，出发菌株经过叠氮钠诱变 30 min 时，诱变得到的菌株降解能力最高，是出发菌株酶活力的 1.66 倍，诱变得到的菌株降解效率高，符合人们的生产需要.

参考文献：

[1] 张树政. 酶制剂工业[M]. 下册. 北京：科学出版社，1984：233-236.

[2] 李拖平，李苏红. 山楂果胶中多聚半乳糖醛酸多糖的

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

化学构造特征[J]. 食品科学，2008，29(10)：37-40.
[3] 董章勇，王振中. 真菌多聚半乳糖醛酸酶的研究进展[J]. 广东农业科学，2011，38(18)：125-127.
[4] 施巧琴. 工业微生物育种学[M]. 3 版. 北京：科学出版社，2003：35-60.
[5] 杜国军，刘晓兰. 产果胶酶黑曲霉的筛选及诱变育种[J]. 农业与技术，2008，28(2)：68-70.
[6] 苏腾甲，朱雄伟，张佑红，等. 果胶酶生产菌株的分离及其产酶条件优化[J]. 武汉工程大学学报，2012，34(4)：15-18.
[7] 张智维，杨辉. He-Ne 激光诱变选育果胶酶高产菌[J]. 食品工业科技，2006，27(10)：156-157.
[8] 由田，宋刚. 果胶酶高产菌株的紫外线及硫酸二乙酯的诱变育种[J]. 微生物学杂志，2011，31(5)：69-72.
[9] Jayani R S, Saxena S, Guptar R. Microbial pectinolytlc enzymes: a review [J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 2931-2944.
[10] Xu W, Jameson D, Tang B. The relationshipbetween the rate of motecular evolution and the rate of genome rearrangement in animal mitochondrial genomes [J]. Journal of molecular evolution, 2006, 63(3): 375-392.
[11] Chiara V, Michela J, Vincenzo L. The Ectopic Expression of a Pectin Methyl Esterase Inhibitor Increases Pectin Methyl Esterification and Limits Fungal Diseases in Wheat [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2011, 24(9): 1012-1019.
[12] Cascales I R, García J M, Roca J M. The effect of a commercial pectolytic enzyme on grape skin cell wall degradation and colour evolution during the maceration process[J]. Food Chemistry, 2012, 130(3): 626-631.
[13] Wilde H D, Chen Y H, Jiang P. Anjanabha Bhattacharya. Targeted mutation breeding of horticultural plants [J]. Emirates Journal of Food and Agriculture, 2012, 24(1): 31-41.
[14] Shahab S, Hoveize M S. Mutation induction using ethyl methanessulfonate (EMS) in regenerated plantlets of two verieties of sugarcane CP48-103 and CP57-614 [J]. African Journal of Agricultural Research, 2012, 7(8): 1282-1288.
[15] Sridevi A, Mullainathan L. Effect of gamma rays and ethyl methane sulphonate (EMS) in M3 generation of blackgram (Vigna mungo L. Hepper) [J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11(15): 3548-3252.

Mutation of polygalacturonic acid degrading strain

ZHU Xiong-wei, XIONG Yao, SU Teng-jia

(Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: One strain degrading polygalacturonic acid effectively was screened and separated from wastewater reservoir of food industry, the strain was proved to be bacterium by determining its 16S rRNA sequence, which was nominated HDYM-02. To make the originally separated strain ability of degrading polygalacturonic acid reach the requirement of practical application, diethyl sulfate, sodium azide, maleic hydrazide and ultraviolet were used to mutate the strain HDYM-02 which degrades polygalacturonic acid. Congo red decoration method was used to select mutant strain, then the degradation ability of polygalacturonic acid was detected. And the highly efficient strain of degrading polygalacturonic acid was bred. The results show that when the original strain is mutated for 30 min by sodium azide, the mutant strain has a higher degradation ability, which is 1.66 times of the original strain's, and can reach the requirement of practical application.

Key words: mutation; ultraviolet; diethyl sulfate; sodium azide; maleic hydrazid

本文编辑：张　瑞

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn