

文章编号 :1009-038X(2000)03-0244-04

抗分解代谢阻遏纤维素酶变异株的选育*

管 斌¹, 孙艳玲¹, 谢来苏², 隆言泉²

(1. 山东轻工业学院, 山东济南 250100; 2. 天津轻工业学院, 天津 300222)

摘 要:利用紫外线、亚硝基胍等对里氏木霉进行诱变处理,采用低剂量、多次复合诱变处理方法,以 2-脱氧葡萄糖作为降解产物阻遏物进行高效筛选,选育得到一株抗分解代谢阻遏的突变株,使纤维素酶活力提高了 3 倍。

关键词:纤维素酶 抗分解代谢阻遏 突变株 筛选 里氏木霉

中图分类号:Q556.2 **文献标识码:**A

Screening of Cellulase Mutant Resistant to Catabolite Repression

GUAN Bin¹, SUN Yan-ling, XIE Lai-su², LONG Yan-quan²

(1. Shandon Institute of Light Industry, Jinan 250100; 2. Tianjin Institute of Light Industry, Tianjian 300222)

Abstract: In screening high-production mutant of cellulase, *Trichoderma reesei* DWC was treated repeatedly in lower dosage with UV, NTG, and so on. After screened by selection for resistance to 2-deoxyglucose, the mutant *T. Reesei* GB6-4 was obtained. The cellulase activity of the mutant strain is four times as high as the original strain. A high efficient screening method has been investigated.

Key words: cellulase, resistant to catabolite repression, mutant, screen, *Trichoderma reesei*.

纤维素的酶促水解具有很高的应用价值。纤维素酶解在经济上的可行性主要受到纤维素酶成本的限制。木霉,特别是里氏木霉被认为是最具有应用前景的纤维素酶生产菌株。该酶具有较强的分解天然纤维素的能力^[1]。纤维素酶酶系较宽,纤维素酶属于胞外酶,分离、纯化较方便,这对酶制剂生产非常有利。另外,木霉具有培养粗放,适应能力强等特点,适用于固体培养和液体深层发酵,这为大规模工业化生产奠定了基础^[2]。

目前存在的主要问题是酶解效率不高。为提高纤维素酶解的效率,多采用选育高产纤维素酶菌种和改变纤维材料的结构,提高对酶的敏感性等方法^[3]。选育优良菌种是提高纤维素酶活力的关键。从自然界分离筛选的野生型菌株其产酶能力一般

较低,为提高纤维素酶活力,诱变育种是一种有效的方法。

作者选育了木霉纤维素酶高产菌株,探讨选育纤维素酶高产菌株的有效途径,提高纤维素酶产生菌的筛选效率。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养方法

1.1.1 菌株 原始出发菌株为里氏木霉(*Trichoderma reesei*)-DWC,作者所在微生物教研室保藏。

1.1.2 培养基 菌种保藏培养基:马铃薯琼脂(PDA)培养基^[4] 菌种分离培养基:以 2% 磷酸溶解纤维素作为碳源,加入 Mandel's^[5] 无机盐溶液的琼

* 收稿日期:199-10-26 修订日期:2000-03-11.

作者简介:管斌(1957 年 11 月生),男,山东济南人,工学博士,教授。

脂培养基 ;产酶培养基 :微晶纤维素粉末 2%,麸皮浸出液 10%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%, KH_2PO_4 0.75%,蛋白胨灭菌后备用.

1.1.3 培养方法 保藏菌种接种到 PDA 斜面进行活化培养,经表面皿稀释或划线分离纯化,三角瓶摇瓶筛选,选育出具有较高活力的菌株作为出发菌株.

1.2 分析方法

1.2.1 还原糖测定 取上清液,按照 Miller^[6] 方法,以葡萄糖作为标准,使用 DNS 试剂测定还原糖的含量.

1.2.2 纤维素酶活力测定 采用 Mandels^[7] 方法来测定滤纸酶活(Filter Paper Activity, 简称为 FPA)和 CMC 酶活(CMC 'ase). 其酶活力单位用国际单位(IU/mL)来表示.

1.2.3 可溶蛋白测定 发酵上清液的可溶蛋白质质量浓度采用 Lowery^[8] 方法测定,并以牛血清蛋白作为标准.

1.2.4 菌体蛋白测定 发酵液经离心,取沉淀加入 1 mol/L NaOH 在 100 ℃ 下萃取 3 次,冷却、经离心后,加入一定量的生理盐水溶解,用 Lowery^[8] 方法测定蛋白质含量. 经换算可分别得到菌体蛋白质质量浓度.

1.2.5 纤维素质量浓度测定 发酵液经离心,取沉淀加入 3 mL 醋酸-硝酸试剂,沸水浴中保温 30 min,冷却,离心后经蒸馏水反复洗涤,残存纤维素在减压下 40 ℃ 烘至恒重. 经换算可得残存纤维素质量浓度.

2 结果与分析

2.1 出发菌株的筛选与特性比较

2.1.1 出发菌株的筛选 在磷酸膨胀纤维素(Walseth)培养基上,用稀释法或划线法分离出能使磷酸膨胀纤维素降解形成水解透明圈的菌落 236 株,接种于含有 1% 微晶纤维素的基本培养基上进行摇瓶筛选,把滤纸酶活和 CMC 酶活较高的 6 株进行复筛,把其中 1 株分泌纤维素酶的优良菌株(*T. reesei* DWC)作为出发菌株.

2.1.2 出发菌株与变异菌株的特性 出发菌株在 PDA 琼脂培养基上与变异菌株菌落差异较大,如表 1 所示. 变异菌株菌落小,生长缓慢,孢子较少,颜色呈淡绿或黄白色;而出发菌株在 PDA 琼脂培养基上菌丝生长迅速,菌苔较厚,孢子颜色呈绿色,孢子产生较多.

万方数据

表 1 里氏木霉出发菌株与变异菌株的比较
Tab.1 Comparison of *Trichoderma reesei*-DWC with Mutant Strain

菌种	菌落形态	菌丝	孢子颜色	生长速率	形成孢子数量
出发菌株	大	松散	绿色	快	多
变异菌株	小	紧密	浅绿色	慢	少

2.2. 经诱变选育抗分解代谢阻遏的纤维素酶高产菌株

以 *T. reesei* DWC 为诱变处理的出发菌株,经紫外线(uv)照射处理、紫外线照射与 NaNO_2 复合处理和亚硝基胍(NTG)反复多次诱变处理,根据磷酸膨胀纤维素琼脂表面上纤维素水解透明圈大小、L 型试管纤维素酶活力进行初筛以及摇瓶复筛,选育出抗分解代谢阻遏的纤维素酶高产菌株. 其育种过程如图 1 所示. 经反复诱变处理选育抗分解代谢阻遏的纤维素酶高产菌株的试验结果如表 2 所示.

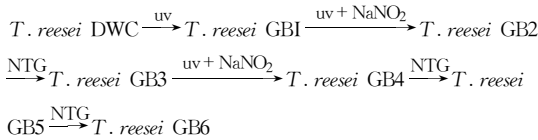


图 1 纤维素酶高产菌株的育种过程

Fig.1 Procedure of high-prroducing mutant of cellulase
表 2 经反复诱变处理选育抗分解代谢阻遏的纤维素酶高产菌株的结果

Tab.2 Time course of growth and cellulase production by mutant strain

诱变步骤	诱变剂	摇瓶酶活/(IU/mL)		表面皿筛选(培养基质量浓度为 10 g/L)
1		0.82	4.21	Walseth 上纯种分离
2	uv	1.48	7.63	Walseth + 2-DG
3	uv + NaNO_2	1.84	9.46	Walseth + 2-DG
4	NTG, 500 $\mu\text{g/mL}$	2.14	12.72	Walseth + 2-DG
5	uv + NaOH	2.76	16.44	Walseth + 10 g/L 甘油
6	NTG, 750 $\mu\text{g/mL}$	3.01	20.76	Walseth + 30 g/L 甘油
7	NTG, 1500 $\mu\text{g/mL}$	3.62	24.64	Walseth + 30 g/L 葡萄糖

可以看出,出发菌种(DWC)经反复多次复合诱变处理,在含有磷酸膨胀纤维素(Walseth)培养基中,加入 2-DG(2-脱氧葡萄糖)以及甘油(或者葡萄糖)作为降解产物阻遏物,在其介质上培养诱变处理过的分生孢子,对抗降解产物阻遏突变型进行富集培养(对降解产物阻遏具有抗性的分生孢子能产生足以水解所有底物的酶并在给定条件下生长),获得抗分解代谢阻遏的纤维素酶高产突变菌株,使得纤维素酶活力有了较大的幅度提高. 在经 6 次诱

变处理之后,其抗降解产物阻遏突变株的滤纸酶活和 CMC 酶活分别达到了 3.63 和 24.64 (IU/mL),较出发菌株酶活提高了 3 倍,这说明该诱变处理及菌株选育方法是行之有效的. 再者,经 uv 、 $uv + NaNO_2$ 和 NTG 反复多次诱变处理,使里氏木霉的纤维素酶活力得到了逐步提高. 另外,经多次诱变处理的变异菌株产酶稳定性相对较差,必须经反复多次纯种分离和摇瓶比较,才能逐步筛选出产酶稳定性较好的菌种.

2.3 *T. reesei* 培养及产酶的进程

图 2 为 *T. reesei* 变异菌株菌种生产和产酶的进程曲线. 可以看出,在 48~120 h 之间,菌体生产较快,144 h 后菌体达到最高质量浓度. CMC 酶活几乎与菌体生产平行增长,第 6 天酶活达到最高;而滤纸酶活在培养初期比 CMC 酶活的出现提前一些,随着培养时间的延长,滤纸酶活比 CMC 酶活增长稍缓慢一些,它在第 8 天酶活达到最高. 而纤维素在 48~120 h 内消耗速率较快,其后减慢,到第 6 天消耗降到较低水平.

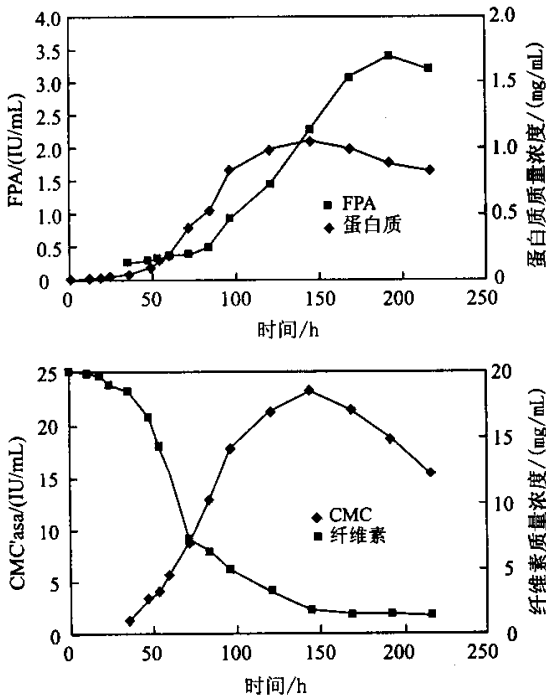


图 2 *T. reesei* 变异菌株菌种生长和产酶的进程曲线

Fig.2 Time course of growth and cellulase production by mutant strain

由于在纤维素与水构成的多相复杂体系中,纤维素是不溶于水的高聚糖,它不能直接被细胞吸收利用. 菌体生产和酶蛋白的合成需要消耗大量碳源,这要由纤维素酶解产生的葡萄糖或者纤维二糖来获得,而纤维素酶解所需要的纤维素酶必须与菌

体的酶合成和分泌相配合. 所以,CMC 酶活力的增长几乎同菌体生产同步进行. 从图 2 可以看出,纤维素消耗速率、菌体生产速率和 CMC 酶活增长速率最快的时期在 3~6 d.

经发酵得到的粗制酶液,以可溶性蛋白浓度与滤纸酶活关系来作图,得到图 3 的试验结果. 可以看出,随着可溶性蛋白质量浓度的增加,滤纸酶活几乎呈线性增加,这说明 *T. reesei* 变异菌株所分泌的纤维素酶与该菌体分泌的可溶性蛋白质量浓度成正比.

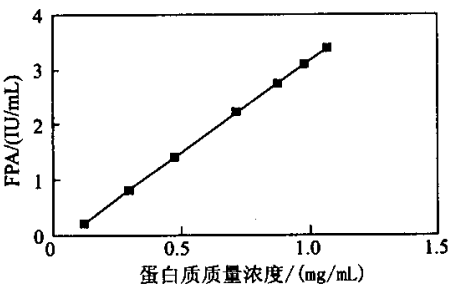


图 3 可溶性蛋白质质量浓度与滤纸酶活的关系

Fig.3 Relation between soluble protein and cellulase activity

2.4 葡萄糖对 *T. reesei* 变异菌株所分泌的纤维素酶的分解代谢阻遏效应

把出发菌株和变异菌株接种于 10 g/L 的微晶纤维素和 5 g/L 的葡萄糖培养基中,在 28 ℃ 条件下发酵 6 d,其试验结果如表 3 所示. 可以看出,出发菌株补加葡萄糖后,产生的分解代谢阻遏效应^[9]明显,其产酶能力比对照组要低 5.2 倍,而变异菌株则比对照组低 1.5 倍. 变异菌株即使在有葡萄糖的环境中,其对菌种产酶影响也较小. 该变异菌株是一株较好的抗分解代谢阻遏纤维素酶突变菌株.

表 3 葡萄糖阻遏效应对产酶的影响

Tab.3 Effect of glucose addition cellulase production

菌株	IU/mL	
	补加葡萄糖后的滤纸酶活	对照组滤纸酶活*
出发菌株	0.16	0.83
变异菌株	2.42	3.64

注:对照组为未补加葡萄糖发酵的结果.

3 讨 论

真菌分泌纤维素酶的同时,也产生了较多的分解代谢产物如葡萄糖、纤维二糖等. 这些产物容易被菌体吸收利用,对菌体分泌纤维素酶产生分解代谢产物阻遏效应^[9],从而阻碍了菌体迅速、大量的

分泌纤维素酶. 为了解决这一问题, 作者选育抗降解产物阻遏的纤维素酶突变株, 采用‘富集培养’筛选步骤

1) 采用纤维素酶分泌能力较强的野生型菌株、经初步诱变处理筛选得到变异株或生产性菌株(经发酵生产反复驯化的菌株)作为出发菌株. 经诱变处理得到的突变株往往正突变率较高^[10].

2) 菌种诱变多选用对里氏木霉诱变效果较好的亚硝基胍(NTG)、紫外线($_{uv}$)作为诱变剂, 以新鲜的孢子菌悬液为诱变介质, 采用低剂量、反复多次复合诱变处理方法, 可获得较高的正突变率^[10].

3) 用含有 2-脱氧葡萄糖的磷酸膨胀纤维素(Walseth)作为培养介质进行中间培养. 利用 2-脱氧葡萄糖作为真菌代谢拮抗物和菌体进行纤维素酶酶系合成的降解产物阻遏物, 来富集抗分解代谢阻遏的纤维素酶突变株分生孢子.

4) 在含有磷酸膨胀纤维素(Walseth)的琼脂培养基中加入一定量的 2-脱氧葡萄糖或者甘油作为降解阻遏产物进行‘富集培养’, 以得到抗分解代谢阻遏的纤维素酶突变株分生孢子. 对于降解阻遏产物具有抗性的分生孢子在磷酸膨胀纤维琼脂平板上生长、产酶, 形成分解纤维素的水解透明圈, 同时在甘油琼脂平板上也产生水解透明圈, 这样可大大提高抗分解代谢阻遏的纤维素酶突变株的筛选效率, 起到‘定向筛选’的目的.

5) 经反复多次复合诱变处理和‘富集培养’筛选得到的突变型往往稳定性较差, 必须再经反复多次纯种分离和摇瓶比较, 才能逐步筛选出产酶稳定性较好的菌种.

诱变育种是木霉纤维素酶高产菌株选育的有效途径, 反复诱变可使菌株产生正向变异的积累^[11].

参考文献

[1] RYU D. The cellulase of *Trichoderma viride* [J]. *Enzyme Microbiol Technol*, 1980(2) 31~96

[2] 张树政. 酶制剂工业(下) [M]. 北京 科学出版社, 1985.

[3] MANDELS M. Physical and chemical pretreatments for enhancing cellulose saccharification [J]. *Biochem Soc Trans*, 1985, 13 : 414~418

[4] GADGII N J. Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma reesei* [J]. *Enzyme Microbiol Technol*, 1995, 17 342~946

[5] MANDELS M. Production of cellulase by *Trichoderma* [J]. *Biotech Bioeng*, 1976(6) 35~39

[6] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Anal Chem*, 1959, 17 342~946

[7] MANDELS M. Measurement of saccharifying cellulase [J]. *Biotech Bioeng*, 1976(6) 21~34

[8] LOWERY O H. Protein measurements with the folin phenol reagent [J]. *Biochem*, 1951, 193 265~270

[9] KAWAMORI M. Preparation of mutants resistant to catabolite repression of *Trichoderma reesei* [J]. *Agric Biol Chem*, 1985, 49 (10) 2875~2879

[10] MONTENECOURT B S. Biochemical nature of cellulases from mutants of *Trichoderma reesei* [J]. *Biotech Bioeng*, 1980(10) : 15~26

[11] WASE D A J. Isolation mutation of a highly cellulolytic strain of *Aspergillus fumigatus* [J]. *Process Biochem*, 1983, 18 35~37

(责任编辑 朱 明)