

文章编号:1009-038X(2004)06-0009-04

高产中性纤维素酶菌株的诱变选育和筛选方法

韩铭海, 黄俊, 余晓斌*

(江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要:设计了一种根据水解透明圈与菌落直径之比(D/d)以初步判断菌株产酶活力大小的方法,发现菌株的液体发酵酶活的对数($\lg E$)和菌落透明圈直径与菌落直径之比(D/d)基本上呈线性关系.采用紫外线和 γ 射线对中性纤维素酶产生菌木霉 ZC(39 U/mL)进行了反复诱变和大量筛选,得到了一株高产中性纤维素酶突变菌株 BE40-39(99 U/mL),并对出发株 ZC 和突变株 BE40-39 的性状进行了比较.

关键词:纤维素酶;透明圈;木霉

中图分类号:TQ 925

文献标识码:A

Screening of Mutant Strains with High Neutral Cellulase Activity

HAN Ming-hai, HUANG Jun, YU Xiao-bin*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: An effect method of initial screening of mutants with relatively high neutral cellulase activities was reported. The correlation between logarithm of the cellulase activities of mutant strains ($\lg E$) and the ratio between the diameter of clear zone and that of clone (D/d) is nearly linear. With the screening method, the parent strain was treated with UV and γ -ray and then screened. As a result, a mutant strain displaying different fermentation performance with higher cellulase activity (99 U/mL) was isolated.

Key words: cellulase; clear zone; *Trichoderma* sp.

目前,纤维素酶的应用已扩展到医药、日用化工、造纸、食品发酵、废水处理、工业洗涤、中草药提取等各个领域^[1~2],其前景十分广阔.其中,中性纤维素酶在纺织、食品、饲料和制药行业均有广泛的应用前景,尤其是在纺织领域应用市场最大.我国是一个纺织生产、消费、出口大国,中性纤维素酶市场需求大约占整个纤维素酶需求的 30% 以上,市场需求至少每年为 4 500 t.特别是中性纤维素酶在牛仔布“洗旧”整理加工过程中,pH 值变化对中性纤

维素酶的作用影响比较小,而且酶洗也不易产生返染现象等优点^[3],目前,中性纤维素酶市场需求量较大,价格昂贵.

纤维素酶是水解纤维素 β -1,4 葡萄糖苷键,使纤维素分解成纤维二糖和葡萄糖的一组酶的总称.纤维素酶由葡聚糖内切酶、葡聚糖外切酶、 β 葡萄糖苷酶 3 个主要成分组成的诱导复合酶系.前两者主要溶解纤维素, β 葡萄糖苷酶将纤维二糖转化为葡萄糖.只有当三者主要成分活性比例恰当,才能表

收稿日期:2004-02-12; 修回日期:2004-03-13.

基金项目:国家“十五”科技攻关计划项目(编号:2001BA708B03-04)资助课题.

作者简介:韩铭海(1976-),男,江苏无锡人,发酵工程硕士研究生;*通讯作者

现出较高的活性^[4]。

目前中性纤维素酶主要还是依赖进口,因此,开展中性纤维素酶高产菌株选育和高效提取研究,缩短我国与国际先进水平的差距,降低生产成本,实现中性纤维素酶国产化,具有重大而深远的意义。

长期以来,缺欠高产菌株一直是制约纤维素酶大规模生产的主要因素,因此诱变筛选高产纤维素酶菌株是关键问题之一。微生物诱变后,正突变的菌株数量很少,要把极少数的正突变高产菌株筛选出来需要花费很大的工作量。因此,设计一种制作方便筛选平板对提高筛选效率非常重要。

1 材料和方法

1.1 菌种

实验用出发菌株木霉 ZC,由作者所在实验室保存。

1.2 培养基和培养方法

1.2.1 试管斜面种子 马铃薯琼脂(PDA)培养基^[5],30℃培养3d后使用或4℃保存。

1.2.2 摇瓶培养基和培养 250 mL三角瓶装质量分数2%麸皮,质量分数1%Avicel,质量分数0.4%KH₂PO₄,质量分数0.3%胰蛋白酶,0.2 g/dL (NH₄)₂SO₄,0.1 g/dL CaCO₃,0.03 g/dL MgSO₄,自来水配制成100 mL,自然pH值,121℃灭菌25 min,接种斜面孢子,30℃旋转式摇床(150 r/min)培养5 d,经过滤发酵液得到纤维素酶溶液。

1.2.3 筛选平板培养基和培养方法 筛选培养基采用双层培养基。上层:粉碎均质后的新华1号滤纸(质量分数0.5%),蛋白胨质量分数0.3%,K₂HPO₄ 0.1 g/dL,菌落扩展抑制剂0.15 g/dL,琼脂质量分数2%。下层:水和质量分数2%的琼脂。制备筛选平板时,先在直径9 cm的培养皿中倒入适当的水琼脂,冷却后,用10 mL的移液管移入10 mL上层培养基。适当浓度的孢子悬液涂布于平板,30℃培养3 d后,观察测量透明圈。

1.3 诱变方法

1.3.1 紫外线诱变 用生理盐水制备10⁵~10⁶个/mL的孢子悬液,取孢子悬液10 mL于半径为9 cm的培养皿中磁力搅拌下距离30 W紫外灯15 cm,照射3~5 min。

1.3.2 γ射线(⁶⁰Co)诱变 在内径为1.5 mL试管中加入0.5 mL分生孢子悬液(10⁵~10⁶个/mL),以650 Gy剂量,⁶⁰Coγ射线照射。

1.3.3 紫外线和γ射线复合诱变 用紫外线处理2 min,接着用γ射线450 Gy剂量处理。

1.3.4 致死率的计算 致死率=(1-诱变后孢子浓度/诱变前孢子浓度)×100%

1.4 分析测定方法

1.4.1 酶活单位定义 50℃下,每30 min水解底物生成1 μmol葡萄糖所对应酶活定义为1个酶活单位(U)。

1.4.2 还原糖测定 采用DNS法^[6];DNS试剂于还原糖发生氧化还原反应,生成3-氨基-5-硝基水杨酸,其产物在煮沸后显色,其颜色深度与还原糖的含量呈线性关系,利用分光光度计测量还原糖。

1.4.3 滤纸酶活(FPA)测定 取适当稀释的酶液0.5 mL加入1 mL pH值6.0的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液,加入Whatman No.1滤纸条(0.5 cm×5 cm)一片,在50℃酶解30 min,然后进行还原糖测定。

2 结果和讨论

2.1 透明圈与纤维素酶活的关系

将诱变后的孢子涂布于筛选平板上,培养3 d后,在平板上生长出大小不同的菌落,周围出现的透明圈大小各异,透明度也有差异(见图1)。选取透明圈较圆整、边缘清晰、易于测量的12个菌落,测量其透明圈的直径D和菌落直径d,并对这12个菌株进行摇瓶发酵,检测其发酵液滤纸酶活(FPA)(见表1)。应用Excel软件分析发酵液酶活对数lgE与菌落透明圈直径与菌落直径之比D/d的关系,结果见图2,酶活力的对数lgE与透明圈直径与菌落直径之比D/d具有近似的线性关系:

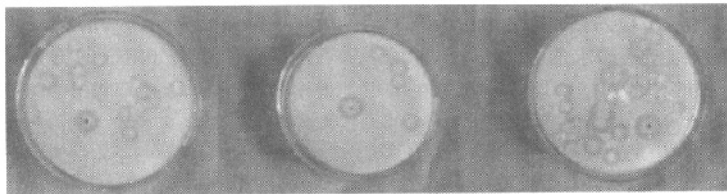


图1 在筛选平板上出现透明圈的菌落

Fig.1 The clone surrounded by clear zone on the plate

表 1 透明圈直径与菌落直径之比 (D/d) 与发酵液 PFA 酶活的对数 lgE 的关系

Tab. 1 The relation between the value of D/d and lgE					
菌株 编号	透明圈 直径 D/cm	菌落 直径 d/cm	D/d	发酵液 PFA 酶活 E/(U/mL)	PFA 酶活 对数 lgE
A1	1.5	0.8	1.88	47	1.672
A2	1.6	0.8	2.00	52	1.716
A3	1.7	0.8	2.13	58	1.763
A4	1.6	0.9	1.78	45	1.653
A5	1.7	0.9	1.89	49	1.690
A6	1.8	1.0	1.80	47	1.672
A7	2.0	1.0	2.00	53	1.724
A8	2.1	1.0	2.10	56	1.748
A9	2.2	1.0	2.20	62	1.763
A10	2.4	1.2	2.00	54	1.732
A11	2.5	1.2	2.08	58	1.763

2.2 透明圈与酶活关系的分析

透明圈的大小与底物的浓度、固体培养基的厚度、菌落的菌体量与培养时间都有关系^[7]。在制备筛选平板时,底物的浓度、培养基的厚度和培养时间是很容易控制的,因此,上述 3 个因素可以认为是常量。菌落的直径不同,菌体量也不同,而菌体量的不同对透明圈的大小有一定影响,为了简化,忽略了这一因素。从图 2 看,上述 lgE 与 D/d 之间的关系只是近似的线性关系,与实际情况有一定的差距。造成线性方程偏离实际情况的原因很多,除了上述忽略菌落菌体量的差异对透明圈的影响,最重要的还是固体培养和液体培养条件的不同。例如,为了易于观察测量,在涂布培养 3 d 后观察测量透明圈,但是,液体发酵是在发酵第 5 d 进行酶活测定的,两种情况下菌株生长和产酶时间不同。还有菌体在平板上和液体培养基中吸收营养物质、排出代谢产物难易不同。根据函数 $lgE = 0.3248D/d + 1.0757$ 的性质分析,当菌株的酶活较高时,菌落透明圈差异较小时,菌株酶活力就可能有较大的差别。所以应结合液体摇瓶复筛,确定产量提高的突变株。但可以肯定的是,通过此平板筛选方法,可以把一大批产酶量低的菌株筛选出去,避免了大量盲目的无效劳动,大大增加了获得高产变异株的几率。

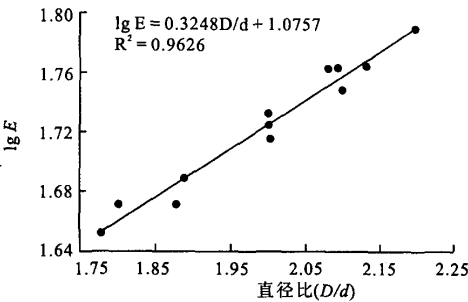


图 2 lgE 与 D/d 成近似的线性关系
Fig. 2 The linear correlation between the value of D/d and lgE

2.3 透明圈与酶活关系的分析

使用该筛选平板,用 D/d 值作为初筛的指标,以产中性纤维素酶的木霉^[8] *Trichoderma* sp. ZC (PFA 滤纸酶活力 39 U/mL) 作为出发菌株,经过紫外线和 γ 射线几次诱变筛选,获得变异株 BE40-39,发酵液酶活提高到 99 U/mL。具体如下:

出发菌株 ZC (39 U/mL) $\xrightarrow[\text{致死率 85\%}]{\text{紫外线反复诱变}}$ UI-12 (49 U/mL) $\xrightarrow[\text{致死率 82\%}]{\gamma \text{ 射线反复诱变}}$ ER-45 (69 U/mL) $\xrightarrow[\text{致死率 91\%}]{\text{紫外线和 } \gamma \text{ 射线复合诱变}}$ BE40-39 (99 U/mL)

2.4 出发菌株 ZC 与高产突变菌株 BE40-39 的性状比较

2.4.1 出发菌株 ZC 与高产突变菌株 BE40-39 菌落形态的比较 出发菌株 ZC 的菌落孢子颜色是深绿色的,而高产突变菌株 BE40-39 的菌落孢子颜色要比前者浅一点,为浅绿色,除此之外,菌落形态上没有明显区别。突变菌株在培养皿上的生长速度没有明显的减慢。

2.4.2 出发菌株 ZC 与高产突变菌株 BE40-39 发酵性状的比较 由图 3 看出,突变菌株与出发菌株摇瓶发酵性状最大的差异是发酵产酶高峰出现的时间不同,突变菌株 BE40-39 达到发酵液酶活最高峰要发酵 120 h,而出发菌株 ZC 为 72 h。突变菌株发酵过程中,发酵液 pH 值能在 60 h 内维持在 3.9,这一段时间正是菌株产酶最旺盛时期。相比之下,出发菌株发酵液 pH 值只能维持 30 h。在发酵后期,因为菌体衰退、自溶,发酵液 pH 值上升。随着发酵液 pH 值上升,发酵液的酶活力开始下降。说明,发酵液的 pH 值与菌体产酶具有相关性的。在发酵后期,突变菌株的发酵液 pH 值回升要比出发菌株要慢,说明突变菌株的发酵后期的自溶趋势减弱。

3 结 论

作者介绍的透明圈筛选方法是一种进行高产中性纤维素酶突变株初筛的有效方法,并对菌株的酶活力的对数值 lgE 与该菌落的透明圈直径与菌落直径之比 (D/d) 具有近似的线性关系进行了分析. 因菌株在平板上生长与摇瓶生长的条件不同等

因素,实际情况与理想状态的线性关系与还有差距. 作者在使用筛选平板进行诱变育种,以木霉 ZC 为出发菌株,经过紫外线和 γ 射线几次诱变,筛选到的一株突变株 BE40-39 比出发菌株酶活力提高了 1.5 倍. 高产突变菌株与出发菌株在性状上有明显区别,突变菌株的孢子颜色比出发菌株的稍浅,两者的摇瓶发酵性状有很大的差异.

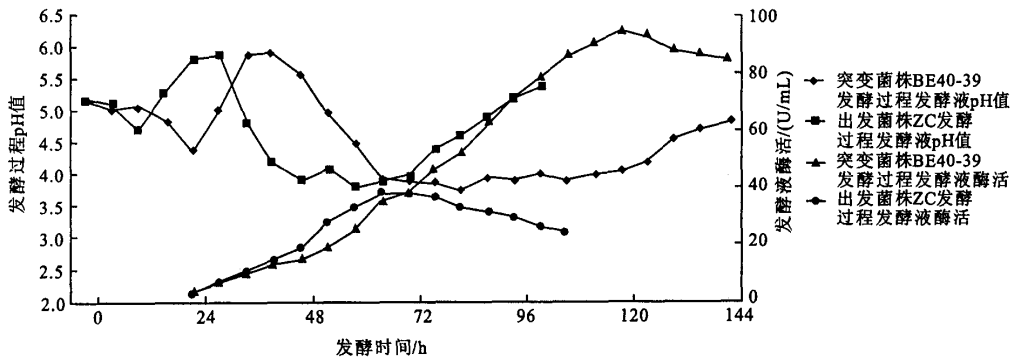


图 3 突变株 BE40-39 与出发菌株 ZC 发酵曲线的比较

Fig. 3 The comparison for fermentation performance between the mutant and initial strain

参考文献:

- [1] 任大明,刘昭壮. 浅谈饲料用纤维素酶的生产与应用[J]. 饲料工业,1995,16(3):1-3.
- [2] 肖春玲,徐常新. 微生物纤维素酶的应用研究[J]. 微生物学杂志,2002,22(2):33-55.
- [3] 王静. 牛仔布纤维素酶“洗旧”整理工艺参数的研究[J]. 安徽农业大学学报,1997,24(1):84-87.
- [4] 曾文青,刘蓉,曾勤. 纤维素酶系高产菌株的选育[J]. 四川省卫生管理干部学院学报,2000,19 (1):4-6.
- [5] Gandii N J. Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma reesei*[J]. *Enzyme Microbiol Technol*,1995,17:942-946.
- [6] 管斌,丁友昉,谢来苏,等. 还原糖测定方法的规范[J]. 无锡轻工大学学报,1998,18(3):74-78.
- [7] 胡学智. 酶制剂生产技术[M]. 北京:化学工业出版社,1994.
- [8] RyuU D. The cellulase of *Trichoderma viride*[J]. *Enzyme Microbiol Technol*,1980,(2):91-96.

(责任编辑:杨 萌)

(上接第 8 页)

- [3] Mayer R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food[J]. *Food Control*, 1999, 10:391-399.
- [4] Swiss Federal Office of Public Health Department of Food Science. Eidgenossische Drucksachen und Materialzentrale[Z]. Switzerland,1995.
- [5] Council Regulation (EC). Concerning the Compulsory Indication of the Labeling of Certain Foodstuffs Produced from Genetically Modified Organisms of Particulars other than Those Provides for in D 79/112/EEC[Z]. Brussels,Belgium,1998.
- [6] 中华人民共和国农业部. 农业转基因生物标识管理办法[Z]. 北京:新华社,2002. 1-2.
- [7] Clark C G. DNA purification from polysaccharide-rich cells[J]. *Protocols in Protozoology*,1992,(3):31-32.

(责任编辑:李春丽)