

文章编号:1673-1689(2006)06-0107-04

## 高产纤维素酶菌株的诱变选育和筛选

李西波<sup>1,2</sup>, 刘胜利<sup>3</sup>, 王耀民<sup>3</sup>, 王文兵<sup>1\*</sup>

(1. 江苏大学生命科学研究院, 江苏 镇江 212013; 2. 河南科技大学, 河南 洛阳 471003; 3. 河南仰韶生化工程有限公司, 河南 浉池 472400)

**摘要:** 用青霉(*Penicillium sp.*) HK-003 为原始菌, 经亚硝基胍(NTG)、羟胺复合诱变, 根据变异菌株菌落形态变化与产酶高低的关系, 结合酶活力检测理化指标, 筛选出一株高产稳定的纤维素酶菌株 LX-435, 其产酶能力由 200 U/mL 提高到 415 U/mL, 较出发菌株提高 2.08 倍。对该菌种进行了连续 8 次继代培养, 结果表明其遗传性状稳定。

**关键词:** 青霉; 亚硝基胍; 羟胺; 复合诱变

**中图分类号:** TQ 920

**文献标识码:** A

## Screening of Mutant Strains with High Cellulose Activity

LI Xi-bo<sup>1,2</sup>, LIU Sheng-li<sup>3</sup>, WANG Yao-min<sup>3</sup>, WANG Wen-bing<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013 China; 2. Henan University of Science And Technology, Luoyang 471003 China; 3. Henan YangShao Bio-products CO., Ltd, Mianchi 472400 China)

**Abstract:** A higher cellulose production mutant strain *Penicillium* SP LX435 was isolated and mutagenized from parent strain HK003 by using NTG and hydroxylamine mutation combinative. 415 U/ml cellulose activities were produced by the mutant strain *Penicillium* SP LX435, which higher 108% than that of the parent strain (200 U/mL). Furthermore, the genetic stability of mutant strain LX435 was also investigated for 8 consecutive generations. This mutant was also genetic-stable over 8 generations and therefore it was chosen as a working strain for industry.

**Key words:** *Penicillium sp.*; NTG; hydroxylamine; compound induction mutation

纤维素酶是使纤维素降解生成葡萄糖的一组酶的总称。纤维素酶根据酶的作用方式分为 C1 酶、CX 酶和纤维二糖酶等类型<sup>[1]</sup>。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、工业洗涤和中草药提取等各个领域, 其前景十分广阔。长期以来, 缺失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<sup>[2]</sup>。作者以青霉(*Penicillium sp.*) HK-003 为原始菌株, 通过亚

硝基胍、羟胺复合诱变得到一株纤维素酶高产菌株青霉 LX-435, 其摇瓶产酶能力为 415 U/mL, 较原始菌株的酶活提高了 2.08 倍, 为工业生产筛选到一株优良的高产纤维素酶菌株。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料

1.1.1 菌种 实验用原始菌青霉(*Penicillium*

收稿日期: 2006-05-21; 修回日期: 2006-07-02.

作者简介: 李西波(1977-), 男, 河北邢台人, 讲师, 生化与分子生物学硕士研究生; \* 为通讯作者。

sp.)HK-003由河南科技大学食品学院生物工程研究所提供,产酶活力约200 U/mL。

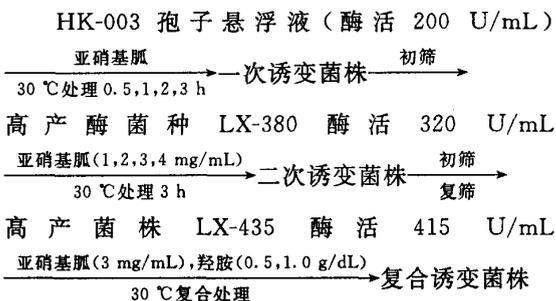
### 1.1.2 培养基

1) 斜面培养基(组分 g/dL): 酵母膏 0.1, 蛋白胨 0.2, 纤维素粉 2, 琼脂 2; pH 自然。

2) 摇瓶培养基(组分 g/dL): 玉米草粉 2, 麸皮 1, 磷酸二氢钾 0.3, 硫酸镁 0.05, 葡萄糖 0.5, 重质碳酸钙 3, 氯化钙 0.1, 尿素 0.1, 硫酸铵 0.5; pH 自然。

3) 发酵培养基(组分 g/dL): 玉米草粉 5, 麸皮 1, 磷酸二氢钾 0.4, 硫酸镁 0.05, 葡萄糖 0.5, 氯化钙 0.05, 硫酸铵 0.5, 玉米浆 2; pH 自然。

## 1.2 诱变育种技术路线



## 1.3 诱变方法

### 1.3.1 等剂量亚硝基胍对菌株不同时间的诱变

1) 出发菌株斜面加入无菌生理盐水洗涤, 6 层纱布过滤, 得单孢子溶液。

2) 液体培养基于  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 200 r/min 摇床培养 16 h, 使孢子处于萌发状态, 离心洗涤, 制成孢子浓度约  $10^7$  个/mL 孢子悬浮液<sup>[3]</sup>。

3) 将处于萌发状态浓度为  $10^7$  个/mL 的 HK-003 菌株的孢子悬浮液用 2 mg/mL 的亚硝基胍分别处理一定时间后, 每个处理组各挑取 120 个菌落, 按初筛、复筛方法测定产酶活力<sup>[4]</sup>。

### 1.3.2 不同诱变剂量的亚硝基胍对菌株的诱变处理

1) 向 5 mL 孢子悬浮液中加入亚硝基胍, 使其浓度分别为 1, 2, 3, 4 mg/mL (羟胺复合处理时, 其终浓度分别为 0.5 g/dL 或 1.0 g/dL), 各组分别于  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$  恒温水浴振荡处理 30~180 min, 然后迅速稀释处理液 100 倍, 并以 10 倍递增稀释方法适当稀释, 各取 0.2 mL 涂布平板, 对照组以孢子悬浮液同样方法适当梯度稀释后涂布平板, 并计算致死率和形态突变率。

致死率(%) =  $100 \times (\text{对照每毫升活菌数} - \text{处理后每毫升活菌数}) / \text{对照每毫升活菌数}$

形态突变率(%) =  $100 \times (\text{诱变涂布平板的形$

态突变菌落) / 诱变涂布平板的总菌落

2) 将 HK-003 菌株处于萌发状态的孢子悬浮液, 从低剂量到高剂量分别处理 3 h, 共进行 4 次诱变实验, 各剂量处理后经平板培养, 都有针对性地挑取 120 个形态变异菌落, 共挑取 480 个菌落, 同上述方法进行初筛和复筛的摇瓶培养测定酶活实验选育高产酶菌株, 每次得到的酶活最高菌株作为下一次较高剂量诱变的出发菌株。

1.3.3 亚硝基胍和羟胺的复合诱变作用 选取上两次亚硝基胍单独诱变后筛选得到的酶活最高菌株 LX-380、LX-333 的斜面菌种, 制成浓度为  $10^7$  个/mL 的孢子悬浮液, 加入 0.5% 羟胺, 振荡培养 16 h, 使孢子处于萌发状态, 再用亚硝基胍 (质量浓度 3 mg/mL) 诱变处理 3 h, 经平板培养后挑取 80 个形态变异菌落, 根据下面初筛方法的酶活分析测定实验, 筛选得到最高酶活菌株, 然后以该菌株为出发菌株, 再进行第二轮的复合诱变, 除羟胺浓度升为 1.0 g/dL 外, 其它时间与第一次一样。

## 1.4 优良菌株的筛选

1.4.1 初筛 一次诱变的初筛是广泛挑取在  $30^\circ\text{C}$ , 48~72 h 培养后的菌落, 进行摇床培养后进行蛋白质交联絮凝—沉淀实验, 获得产酶菌株, 并分析菌落形态变异与产酶能力之间的关系。二次诱变和复合诱变的初筛时, 则有针对性的挑取与产酶能力有关联的形态变异性菌落。

1.4.2 复筛 初筛得到的产酶菌株经斜面活化后, 接入装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶,  $30^\circ\text{C}$  200 r/min 连续培养 3 d, 进行酶活测定, 突变菌株与对照菌株相比较, 相对酶活  $\leq 90\%$  的为负突变株, 相对酶活  $\geq 110\%$  的为正突变株, 相对酶活在  $90\% \sim 110\%$  的视为等性突变异株, 并分别计算正突变率、突变率和等性突变率。

## 1.5 分析方法

1.5.1 菌株细胞生长量测定 取发酵液 5 mL, 4 000 r/min 离心 10 min, 蒸馏水洗涤 3 次,  $105^\circ\text{C}$  干燥至衡重称重<sup>[5]</sup>。

1.5.2 纤维素酶活力测定 滤纸崩潰法测定酶活性 (FP 酶活)。一个 FP 酶活定义为: 在 pH 4.6,  $(50 \pm 0.1)^\circ\text{C}$  时每毫升 (克) 纤维素酶水解崩潰滤纸产生 1  $\mu\text{g}$  葡萄糖的酶量为 1 个单位 (新华 1 号中速滤纸)<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 处理时间对亚硝基胍诱变的效应影响

统计分析诱变后的致死率、正突变率、负突变

率、等性突变率的变化情况,结果见表 1。结果表明,当诱变剂量一定时,随着处理时间的增加,孢子的死亡率逐渐升高,最高达到 97.6%。在整个诱变过程中,负突变株占 75% 以上,但随着处理时间的增加,正突变率有所提高,这可能是高致死率起到了优胜劣汰的作用,更多的优良菌种得以存活生长,被挑出的比例增加<sup>[8]</sup>,处理时间为 3.0 h 的这一组得到一株酶活为 247 U/mL 的诱变菌株 LX-373,

表 1 不同亚硝基胍处理时间对酶活生产情况的影响

Tab. 1 Effects of NTG treated time on cellulase production

时间/h	致死率/%	正突变率/%	负突变率/%	等性突变率/%	酶活提高幅度/%	形态突变率/%
0.5	87.7	13.6	82.6	3.8	19.4	86.7
1.0	88.1	17.2	80.5	2.3	20.1	89.8
2.0	95.1	18.5	79.1	2.4	22.6	92.3
3.0	97.6	20.3	77.6	2.1	23.5	93.0

表 2 不同浓度亚硝基胍作用后的酶活变化情况

Tab. 2 Effects of NTG treated concentration on cellulase production

剂量/(mg/mL)	总突变率/%	致死率/%	正突变率/%	负突变率/%	等性突变率/%	诱变前酶活/(U/mL)	诱变后酶活/(U/mL)	酶活提高幅度/%	高产突变株
1	87.7	17.8	15.4	70.2	3.6	245	315	28.6	LX-355
2	97.9	87.7	20.7	75.0	2.2	240	310	29.1	LX-346
3	97.7	94.3	20.7	68.1	2.3	247	320	29.6	LX-380
4	97.1	99.4	19.1	75.8	2.2	246	316	28.5	LX-333

从表 2 可以看出,当亚硝基胍质量浓度为 1 mg/mL 时,致死率较低,为 17.8%;当亚硝基胍质量浓度升高为 2 mg/mL 时,致死率提高到 87.7% 以上,特别是质量浓度到 4 mg/mL 时,致死率高达 99.4%,且处理组孢子萌芽比对照组要晚约 30 h,这可能是孢子长时间处于高浓度诱变剂环境下,改变了正常生理周期,需要一定时间恢复<sup>[9-10]</sup>。诱变菌落的正突变率也随着亚硝基胍浓度的增加先升高后降低,在质量浓度达到 3 mg/mL 时,正突变率最高达 27.3%,经过 4 次诱变实验后,酶活由原来的 247 U/mL 提高到 320 U/mL(LX-380)。结果表明,亚硝基胍质量浓度为 3 mg/mL 处理 3 h 时,诱变效果较好。

2.3 亚硝基胍和羟胺的复合诱变作用

表 3 表明,羟胺质量浓度为 0.5 g/dL 时复合诱变效果最好,正突变率为 30.5%,比单一亚硝基胍处理的所有正突变率都有明显提高,但是当羟胺质量浓度升高到 1.0 g/dL 时,正突变率略有下降。总之,经过两次连续复合诱变,得到一株酶活高达 415 U/mL 的突变株 LX-435,比出发菌株 HK-003 的酶活提高 2.08 倍。

酶活提高 23.5%。

经过几轮的诱变实验,发现酶活高的变异株往往是菌落大、黑青色,具有乳头状同心环向上凸起的单菌落,而且诱变后菌落形态与产酶能力有一定程度的线性相关。

2.2 不同亚硝基胍诱变剂量与菌体存活率及突变率的关系

统计致死率、突变率及酶活变化,结果见表 2。

表 3 亚硝基胍和羟胺的复合诱变作用对产酶的影响

Tab. 3 Effects of the combination of NTG and hydroxylamine on cellulase production

羟胺质量浓度/(g/dL)	致死率/%	正突变率/%	总变异率/%	诱变后酶活/(U/mL)	酶活提高幅度/%
0.5	99.8	30.5	98.2	410	28.1
1.0	99.8	28.4	98.3	415	29.7

2.4 高产酶菌株的(LX-435)的遗传稳定性考察

复合诱变后筛选得到的高产酶菌株 LX-435,每隔一个月转接一次斜面,连续 8 次继代培养<sup>[11]</sup>。将 8 个斜面菌体分别活化,并进行发酵产酶实验,结果见图 1。结果表明,该菌株的遗传性状稳定。

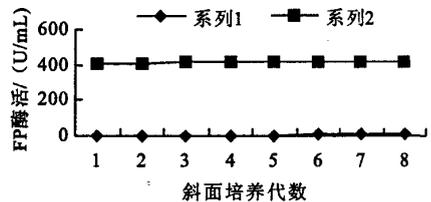


图 1 高产酶菌株 LX-435 的遗传稳定性实验

Fig. 1 The genetic stability of mutant strain LX-435

### 3 结果与讨论

1) 液体培养方法虽深受重视,但缺乏高活力菌种,因此选育诱变高活力产酶菌株是关键问题之一。

首先选用 2 mg/mL 剂量的亚硝基胍,研究不同处理时间对亚硝基胍诱变的效应影响,然后选用从低剂量到高剂量分别处理,研究不同亚硝基胍诱变剂量与菌体存活率、突变率及酶活变化的关系<sup>[12-13]</sup>。结果表明,亚硝基胍质量浓度为 3 mg/mL 处理 3 h 时,诱变效果较好。

在前两次筛选的基础上,选取上两次亚硝基胍单独诱变后筛选得到的酶活最高菌株 LX-380、LX-333 的斜面菌种,选用亚硝基胍(质量浓度 3 mg/mL)诱变处理 3 h,不同浓度的羟胺对菌株进行两次复合诱变筛选,得到一株酶活高达 415 U/mL 的突变株 LX-435,比原始菌株 HK-003 的酶活提高 2.08 倍。筛选到这一株菌株,其产酶酶活得到了大幅度的提高,为工业生产选育了一株高产菌株。

2) 经过几轮的诱变实验,发现酶活高的突变株往往是在菌落大、黑青色,具有乳头状同心环向上

凸起的单菌落中。在实验过程中,发现诱变菌落形态和对照菌落形态存在很大的差异。在筛选高产酶活的菌株时,参考其菌落的形态变化,可以大大提高诱变筛选效率<sup>[14]</sup>。

对照菌落形态:菌落黑青色,向上凸起,边缘呈辐射状;

诱变菌落形态:与对照相比,突变菌株的菌落发生如下变异:1) 单菌落浅灰色,菌落平整,边缘不整齐,孢子很少;2) 单菌落黑色,菌落平整,无孢子;3) 单菌落灰青色菌落大,乳头状同心环向上凸起,有放射纹;4) 单菌落白色,菌落小,乳头状同心环向上凸起,边缘整齐。

其中(1)(2)(3)的变异株中几乎全部为负突变株,且(1)(2)中多数变异株的酶活降低接近零,(3)突变株中大部分为负突变株,部分为正突变株和等性突变株,这为筛选高产酶菌株提供了方便。

对于一株菌株,必须遗传性状稳定才能在工业生产上广泛应用<sup>[7]</sup>。作者对筛选得到的高产酶菌株 LX-435,每隔一个月转接一次斜面,连续 8 次继代培养结果表明,该菌株的遗传性状稳定。

### 参考文献:

- [1] 高培基. 纤维素酶降解机制及纤维素酶分子结构与功能研究进展[J]. 自然科学进展, 2003, 13(1): 21-29.
- [2] Rosanne M. Measurement of Saccharification by cellulases[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1985, (7): 585-588.
- [3] 李日强, 辛小芸. 天然秸秆纤维素分解菌的分离选育[J]. 上海环境科学, 2002, 21(1): 8-10.
- [4] 管斌, 孙艳玲, 谢来苏, 等. 纤维素酶高产菌株的选育[J]. 中国酿造, 2004, (4): 18-21.
- [5] 颜贤仔, 周美凤, 王丽, 等. 深层发酵产纤维素酶菌株的分离选育[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(3): 435-438.
- [6] Lakshmikantham A M. A comparative study of cellulolytic activity of some fungi[J]. *Biological Sci*, 1987, 57(4): 440-446.
- [7] 中国科学院植物生理研究所. 纤维素酶组二株高活力纤维素分解菌 EA3-867 和 N2-78 的获得及其特性的比较[J]. 微生物学报, 1978, 18(1): 27-38.
- [8] 白毓谦, 方善康. 微生物实验技术[M]. 济南: 山东大学出版社, 1986. 459.
- [9] 周与良. 真菌学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986. 417-457.
- [10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [11] 曲音波, 高培基, 王祖农. 斜卧青霉纤维素酶的研究 I JU1 菌株的产酶及酶作用条件[J]. 山东大学学报, 1986, 21(1): 140-143.
- [12] 高凤菊, 李春香. 真菌与细菌纤维素酶研究进展[J]. 唐山师范学院学报, 2005, 27(2): 7-10.
- [13] 宋颖琦, 刘睿倩, 杨谦, 等. 纤维素降解菌的筛选及其降解特性的研究[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2002, 32(2): 197-200.
- [14] 吴长青, 何国庆, 董爱茶. 纤维素酶的液态深层发酵研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(8): 60-64.

(责任编辑: 李春丽)