

黑曲霉产纤维素酶菌种的激光选育

赵小立 贺筱蓉 周红军 李永泉

钱育军

(杭州大学生命科学学院, 杭州 310028)

(浙江大学物理系光学研究所, 杭州 310027)

提要 报道了以黑曲霉为出发菌株, 采用铜蒸气激光诱变处理, 筛选纤维素酶高产菌株, 获得了4株高产的突变菌株, 用稻草麸皮固体培养基, 28℃发酵培养4天, 每克湿曲的最高酶活: CMC酶活(C_s)为2839 mg 葡萄糖/g·h, 滤纸酶活(C_L)为299 mg 葡萄糖/g·h, β -葡萄糖苷酶活为1091 mg 葡萄糖/g·h。并且对突变株 No. 8号菌株的菌落形态、生长发育及发酵周期等变异性状、纤维素酶高产性状的稳定性等方面都进行了深入的测试和分析对比, 从试验结果表明, 激光诱变技术方便实用, 效果明显, 是一种新的微生物诱变育种的理想方法之一。

关键词 激光诱变, 纤维素酶, 黑曲霉

1 引言

纤维素酶的研究和开发应用, 是解决全球能源危机、食品和饲料资源紧张及环境污染的一条重要途径, 近年来, 颇受人们的青睐^[1,2]。但是, 目前对纤维素酶的研究, 大多数集中于木霉, 而木霉的安全性存在问题^[3], 因而在食品和饲料上的应用就受到限制。

黑曲霉不仅是公认的安全菌株, 而且也是产纤维素酶能力较强的微生物之一, 因此, 我们选用黑曲霉为出发菌株, 由于该菌株已经过紫外、化学诱变剂等诱变剂的处理, 为避免出现饱和现象, 提高诱变选育的效率, 故选用新的诱变方法——激光诱变技术来诱变筛选纤维素酶的高产菌株。激光诱变育种技术在农业上已广泛采用, 并已取得了许多理想的成果^[4]; 但是, 有关微生物激光育种的文献报道甚少^[5,6]。我们在吴振倡等人的抗生素诱变育种的实验基础上^[7], 将铜蒸气激光技术应用于黑曲霉菌株的诱变育种, 筛选纤维素酶的高产菌株, 获得了比较理想的结果。

2 材料与方 法

2.1 激光辐照光源

系浙江大学物理系光学研究所研制的铜蒸气激光器。光斑直径 $\phi = 2$ cm, 脉冲重复频率为7 kHz。

2.2 出发菌株

黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 系本实验室保藏。

2.3 培养基

2.3.1 斜面培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基。

2.3.2 筛选培养基^[8]: 查氏固体培养基(内含 0.2% 的胆酸钠)。

2.3.3 稻草麦麸固体培养基^[3]: 稻草 60 g, 麦麸 40 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, KH_2PO_4 0.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, 水 200 ml, 自然 pH 值。

2.4 方法

2.4.1 孢子悬浮液制备: 黑曲霉接种于斜面培养基上, 培养取得成熟的分生孢子, 用无菌生理盐水制取孢子液, 于盛有小玻璃珠的无菌三角瓶内, 充分振荡培养, 过滤除去菌丝及成团孢子, 取滤液调节孢子浓度为 $10^6/\text{ml}$ 的孢子悬液。

2.4.2 激光辐照: 本实验选用 $\lambda_1 = 510.6 \text{ nm}$ 激光, 按不同的激光脉冲能量及若干辐照时间, 对孢子进行辐照处理。

2.4.3 筛选培养: 取处理后的孢子液, 经适当稀释, 涂布于查氏固体培养基上, 28°C 培养, 随机挑取单菌落。

2.4.4 制曲培养: 将单菌落接种于稻草麸皮培养基, 28°C , 培养 4 天。

2.5 酶活测定^[9,10]

取鲜曲 5 g, 加蒸馏水 50 ml, 于 40°C 浸泡 3 h, 过滤制得原酶液, 用相应 pH 值的缓冲液稀释 15 倍后, 供测酶活。

2.5.1 滤纸酶活(FPA)(C_L): 0.5 ml 稀酶液, 加 1.5 ml pH 5.0 的 0.2 M 醋酸缓冲液及一条 $1 \times 6 \text{ cm}$ 滤纸条 ($50 \pm 1 \text{ mg}$), 45°C , 酶解 1 h。

2.5.2 羧甲基纤维素(CMC)酶活(C_x): 0.5 ml 稀释酶液, 加 1.5 ml 用 pH 3.5 醋酸缓冲液配制的 1% CMC 液, 60°C 酶解 20 min。

2.5.3 β -葡萄糖苷酶活: 0.5 ml 稀释酶液, 加 1.5 ml 用 pH 4.5 的缓冲液配制的 0.5% 水杨素溶液, 60°C 酶解 30 min。

上述酶活测定中, 均用 DNS 法测定还原糖(以葡萄糖计), 每克鲜曲的酶活单位均用 mg 葡萄糖/g · h 表示。

3 结果与讨论

3.1 激光辐照黑曲霉孢子的致死率

选用波长 $\lambda_1 = 510.6 \text{ nm}$ 的激光, 辐照激光脉冲能量面密度分别是 $0.225 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ 与 $0.450 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, 黑曲霉分生孢子的致死率与激光辐照时间的关系如图 1, 图 2 所示。

激光的生物学效应, 一方面依赖于激光特征, 包括脉冲能量、功率、能量密度、脉宽、波长、脉冲重复频率等。另一方面还依赖于生物对激光的敏感性, 包括不同生物结构上的差异和生物体所处的生理状态^[10]。从我们的实验结果来看, 黑曲霉孢子的致死率, 随着激光能量和辐照时间的增加而增加, 另外, 用相同波长与照射时间处理, 尽管能量密度相差一倍, 但致死效应并不显示倍性关系, 这些结果与方善康等人^[5,7]的结论是一致的。但是, 在我们的实验中, 用 0.225 mJ 激光, 需要照射 120 s 以上, 致死率接近 100%, 而 0.450 mJ 激光, 需要照射 80 s, 致死率就接近 100%, 这些结果, 都无法与其他人的实验结果找到共性和规律性, 这也许是由于使用的激光器的不同和生物材料与生理状态(本实验所用孢子已处于萌动状态)不同所致。有待进一

步的实验比较和数据的积累。

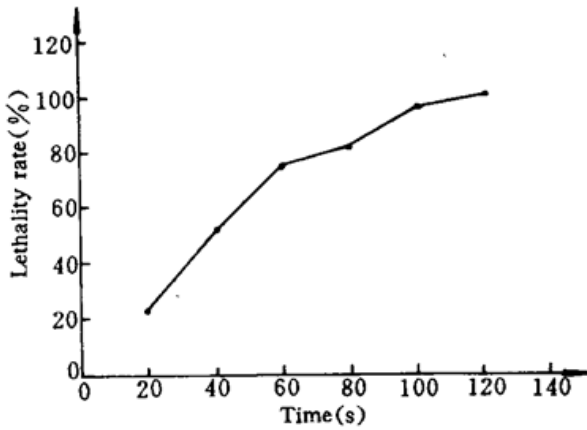


Fig. 1 Lethality rate of spores by a 0.225 mJ laser irradiation

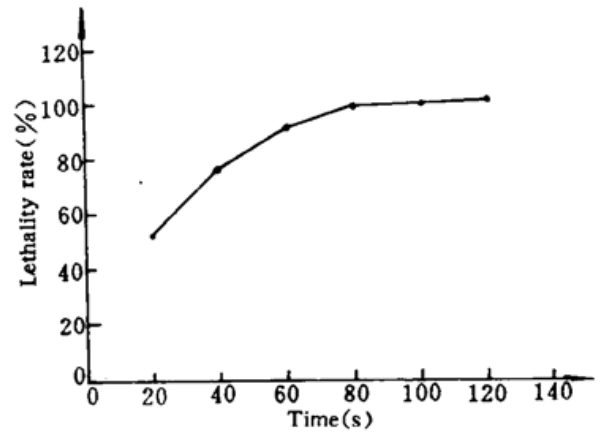


Fig. 2 Lethality rate of spores by a 0.450 mJ laser irradiation

3.2 激光诱变的效果

程极济等人认为低功率激光(特别是可见光范围内的激光)对生物体的影响,主要表现为光效应与电磁场效应,其本质是生物分子吸收不同波长的激光,或在激光的电磁场作用下,分子内发生能级跃迁,达到一定的振动能和产生自由基,引起生物分子内分解、离解或断裂,导致分子激活,产生新的化学反应或损伤^[11],直接的实验结果也证明了上述推断,如用 532 nm 激光处理 DNA 溶液,发现可诱导胸腺嘧啶二聚体的生成^[12],另外, DNA 分子碱基环存在大量的 C—N 键,该键的共振波长为 534.2 nm,用可见光区的激光处理,也可破坏 DNA 分子中的碱基环,随之将导致生物分子的生理、生化及遗传发生变化^[13]。本项实验所采用的铜蒸气激光,其波长位于可见光范围(510.6 nm),因此,只要激光处理适当,显然是可以筛选到突变体。

吴振倡等人应用铜蒸气激光,开展了抗生素菌种诱变选育的研究,试验结果表明,虽然采用同一台激光器^[7],但是随着微生物种类的不同,诱变后的正突变率变化很大^[5]。而方善康等人尽管是以黑曲霉孢子为诱变材料,但所采用的激光器与本项试验不同。为了选择合适的激光处理参数,提高诱变筛选的效率,我们研究了 0.225 mJ 激光辐照黑曲霉孢子,按不同时间处理,检测突变菌株的纤维素 C_x 酶产量分布时,观察到激光辐照 20 s 时,酶活正突变率最低为 43.1%,辐照

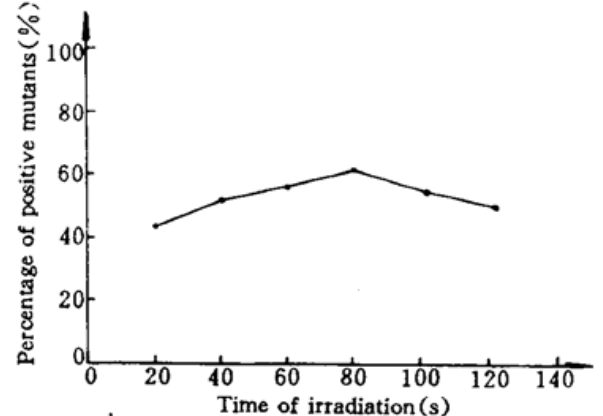


Fig. 3 The relation between positive mutation and time of 0.225 mJ laser irradiation

80 s 时,酶活正突变率最高为 61.5%,而辐照 120 s 时,酶活正突变率反而下降为 50.5%。总平均正突变率为 53%。结果表明,0.225 mJ,照射 80 s 时,正突变率最高,选用这一处理参数,筛选到高产菌株(致死率约在 80%左右)的可能性比较大。正突变率变化结果见图 3。

3.3 纤维素酶高产菌株的选育

纤维素分解的酶系,是由三种功能不同但又互补的酶组成,分别由三种基因所编码。因此,通过激光诱变,三种酶产量的变化是不一致,通过复筛比较,选出 4 株有开发应用前途的变异菌株,在与出发菌株比较时,纤维素 C_x 酶变异最高达 58.1%,滤纸酶活为 42.5%,β-葡萄糖苷酶活为 52.1%,结果见表 1。

Table 1 Comparison of cellulase activities between original strain and mutants

Enzyme activity Strain	CMC enzyme	Filter paper enzyme	β -Glucosidase	Average percentage of increase
Original strain	1855	226	754	
No. 32	2574	299	891	45.7%
No. 15	2432	290	1069	40.0%
No. 23	2831	282	995	42.5%
No. 78	2839	253	1091	42.1%

3.4 高产菌株 No. 78 的特性

为了更为全面地评判铜蒸气激光诱变技术,我们选择了 No. 78 号菌株为材料,对激光诱变后,菌落形态、生长发育状况、发酵特征及变异性的稳定性等方面进行了深入试验与对比分析。

3.4.1 No. 78 号菌株的菌落形态与生长发育

铜蒸气激光处理,对黑曲霉菌体的生长发育,产生了显著的变化,用查氏固体平板培养基,28℃培养,与原始菌株对比发现,No. 78 号菌株,菌落平整较薄,菌丝生长较为稀疏,菌落背面淡黄色,生长较慢,菌落也较为小一些,产生孢子较少,同时,孢子颜色由黑色变为浅褐色,这一变异性状,将有利于增进纤维素酶制剂的产品质量,简化脱色工艺。

当 No. 78 菌株于 32℃培养时,发现 No. 78 号菌株生长较快,菌落也稍大于原始菌株,孢子仍较少和浅褐色,但是,No. 78 号菌产生孢子的时间明显提前,约 42 h 就开始产生分生孢子,而原始菌则一般要在 48 h 后,才开始形成分生孢子。No. 78 号菌株发育速度的加快,将有利于缩短生产周期与降低生产成本。

3.4.2 培养温度与产酶周期

鉴于 No. 78 号菌株培养在不同温度时,表现出发育速度上的差异,我们选择了 28℃、32℃、36℃三种培养温度,对该菌株的产酶发酵周期进行了试验研究,结果见表 2 所示(表中显示 CMC 酶的产酶周期),试验表明,原始菌株生长发育、产酶的最适温度是 28℃,一般产酶高峰约在 72h 左右,尽管提高培养温度,产酶高峰有所提前,但是产酶能力也随之有所下降。而 No. 78 号菌株的生长发育的温度则以 32℃为佳,产酶的高峰出现在 60 h 左右,而且酶活水平高于 28℃和 36℃,有试验报道,霉菌分泌的水解酶类,一般是随着分生孢子的形成,产酶水平逐渐达到最高峰。我们的试验结果也证实了这一推断。

Table 2 Cycle of enzyme production of No. 78 Strain at different incubation temperatures

CMC enzyme Temperature (°C)	Time of incubation (h)						
	24	36	48	60	72	84	96
28	583	1207	1865	2569	2580	2587	2580
32	749	1635	2175	2816	2820	2819	2815
36	706	1526	2069	2607	2598	2590	2583

3.4.3 No. 78 号菌株产酶性状的稳定性

诱变育种筛选优良菌种,其目标特征(如产量性状)的稳定性,是检验诱变方法优劣的指标之一。我们用查氏斜面培养基,连续传代培养,选取传代数为 5、10、15、20 代的样本,发酵培养

检测菌株产酶性状的稳定。结果见表 3。另参照方善康建立的霉菌麸曲保藏法保存 No. 78 菌株^[14],选取保藏期分别为 3 个月、6 个月、9 个月、12 个月的样本,发酵培养检测菌株产酶变化。结果见表 4,从试验结果来看,No. 78 号菌株产纤维素酶的性状是相当稳定的,波动性很小。

Table 3 Comparison of producing enzyme abilities of No. 78 strains from different generations

Enzyme activity (mg/g · h)	Generation			
	5	10	15	20
CMC enzyme	2840	2837	2825	2830
Filter paper enzyme	250	245	249	251
β-Glucosidase	1090	1084	1081	1086

Table 4 Comparison of producing enzyme abilities of No. 78 strain from different preservations

Enzyme activity (mg/g · h)	Preservation (month)			
	3	6	9	12
CMC enzyme	2834	2823	2795	2819
Filter paper enzyme	251	247	250	251
β-Glucosidase	1089	1074	1085	1087

构建高活性酶制剂的生产菌株,采用基因工程的手段是努力的方向,但是还存在许多难题有待克服,故一时还不能提供高产和稳定的生产菌株^[2]。而采用常规的诱变手段,筛选高产菌株,仍是目前广泛使用的技术手段。

由于菌株用相同诱变剂重复诱变时,常出现饱和现象,处理效果往往不够理想。故通常采用几种诱变手段交替使用,方能提高诱变效率。但目前诱变剂种类虽多,而常用的却为数有限。激光诱变技术操作方法简便,使用安全,正突变效率较高,诱变效果甚佳,诱变后的变异性状能稳定遗传,故是一种切实可行的新型诱变手段,应用前景看好,值得推广使用。

参 考 文 献

- 1 林 风. 纤维素酶的生物化学和分子生物学研究进展. 生命科学, 1994, 6(1): 18~23
- 2 Pierr Beguin. Molecular Biology of cellulose Degrdaton. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1990, 44: 219~248
- 3 王 沁, 赵学慧. 黑曲霉纤维素酶的研究. 工业微生物, 1992, 22(5): 20~23
- 4 陈震古. 激光育种. 中国激光, 1987, 14(6): 382~384
- 5 方善康, 刘恩泉, 侯学元等. 生淀粉糖化酶菌种黑曲霉 S-1 的激光选育. 中国激光, 1988, 15(7): 447~448
- 6 吴振倡. 微生物激光育种的研究与开拓. 激光生物学, 1992, 1(1): 27~28
- 7 吴振倡, 陈守川, 白 桦等. 金霉素链霉菌(*S. aureofaciens*)激光高产株的选育. 中国激光, 1992, 19(7): 555~557
- 8 曲音波, 高培基, 王祖农. 青霉的纤维素酶抗降解物阻遏突变株的选育. 真菌学报, 1984, 3(4): 238~243
- 9 崔福绵, 那 安, 马建华等. 不同真菌纤维素酶一些生物化学性质的比较. 真菌学报, 1984, 3(1): 59~64
- 10 李峻亨, 梁 宏. 激光医学——激光在生物医学中的应用, 第一版. 北京: 科学出版社, 1989. 35~41
- 11 程极济. 光生物物理学, 第一版. 北京: 高教出版社, 1987. 145~239
- 12 曹恩华. DNA 激光损伤与细胞遗传学效应. 光电子·激光, 1994, 5(1): 5~9

- 13 马兴孝, 孔繁敖. 激光化学, 第一版. 合肥: 中国科技大学出版社, 1990. 112~160
14 方善康. 放线菌和霉菌菌种保藏研究报告. 微生物学通报, 1993, 20(6): 344~347

Mutagenesis and Selection of Cellulase-producing Strains of *Aspergillus Niger* by Laser Irradiation

Zhao Xiaoli He Xiaorong Zhou Hongjun Li Yongquan
(College of Life Science, Hangzhou University, Hangzhou 310028)

Qian Yujun

(Optics Institute, Physics Department, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract A cellulase producing fungus *aspergillus niger* was mutagenized by copper vapor laser irradiation. Four mutant strains of high cellulase production were selected. When they were cultivated in straw-wheat bran solid medium at 28~30 °C for 96 h, the highest enzyme activities were as follows: CMC enzyme activity (C_x): 2839 mg Glucose/g · h, Filter paper enzyme activity (C_L): 299mg Glucose/g · h, and β -glucosidase: 1091 mg Glucose/g · h. In addition, some characteristics of No. 78 strain, such as morphological character, development, fermentation cycle, and stability of enzyme production, were tested. These results were ideal and showed that laser matagenesis was one of the useful mutagenetic techniques newly applied to microbial breeding.

Key words laser mutagenesis, cellulases, *aspergillus niger*