

产中性纤维素酶特异腐质霉 H31-3 复合诱变研究*

芦敬华^{1,2} 石家骥^{1**} 葛克山² 崔福绵¹ 钱世钧¹(中国科学院微生物研究所 北京 100080)¹(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)²

摘要: 中性纤维素酶在纺织、食品、饲料和制药行业均具有广泛的应用。采用离子束注入技术对中性纤维素酶产生菌特异腐质霉 (*Humicola insolens*) H31-3 进行诱变, 经发酵筛选获得较高酶活力且传代稳定的正突变菌株 H14, 制备其原生质体后进行紫外诱变。筛选后得到正突变菌株 H14-2, 最终 CMC 酶、滤纸酶活力分别达 82.56IU/mL 和 5.77IU/mL, 较原始菌株提高了 78.57% 和 106.81%。

关键词: 中性纤维素酶, 特异腐质霉, 离子注入, 紫外诱变

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-0074-05

Complex Mutagenesis to *Humicola insolens* H31-3 Producing Neutral Cellulase*LU Jing-Hua^{1,2} SHI Jia-Ji^{1**} GE Ke-Shan² CUI Fu-Mian¹ QIAN Shi-Jun¹(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)¹(Food Science and Nutrition Engineering College, Chinese Agricultural University, Beijing 100083)²

Abstract: Neutral cellulase has been broadly used in a lot of industries like food, textile, forage and pharmacy. We screened a positive mutant strain H14 from *Humicola insolens* H31-3 by ion implantation. And then UV irradiation on the protoplasts from *Humicola insolens* H14 was performed. After regeneration and screening we obtained another mutant strain, *Humicola insolens* H14-2, in which CMC enzyme activity and filter paper enzyme activity are raised 78.57% and 106.81% compared with the parent strain of *Humicola insolens* H31-3.

Key words: Neutral cellulase, *Humicola insolens*, Ion implantation, UV Induced mutation

中性纤维素酶在纺织、食品、饲料和制药行业均具有广泛的应用前景。中性纤维素酶在牛仔布“洗旧”整理过程中具有不易产生返染现象等优点^[1]。国外近年才开始生产中性纤维素酶, 报道的产中性纤维素酶的菌种有: 漆斑菌属 (*Myrothecium* sp.)、毛壳菌属 (*Chaetomium* sp.)、腐质霉属 (*Humicola* sp.)、木霉菌属 (*Trichoderma* sp.) 和金孢霉属 (*Chrysosporium* sp.) 等。国内也开始了对中性纤维素酶产生菌的研究, 方法以自然筛选和诱变为主^[2-5], 生产用酶主要依赖进口, 且价格昂贵。特异腐质霉是一株我所于 70 年代筛选获得的产中性纤维素酶的优良菌株, 可耐受较高温度和 pH^[6], 为满足国内对中性纤维素酶的需要, 以此作为出发菌株进行突变筛选。

低能离子注入是一种新颖诱变源, 具有损伤轻, 突变率高, 突变谱广等特点, 我国利用离子注入对真菌进行诱变育种取得了丰硕的成果^[7-10]。李平等利用理化诱变结合离子束照射进行复合诱变实验也取得较好的诱变效果^[11]。原生质体作为单个脱壁

* 国家十五科技攻关项目 (No. 2004BA713B03-01)

中国科学院知识创新工程重要方向项目 (No. KSCX2-SW-324)

** 通讯作者 Tel: 010-82617341, E-mail: shijj@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2006-02-22, 修回日期: 2006-04-12

的细胞,可在渗透压稳定液中处于悬浮状态,且具有细胞的全能性及再生细胞壁的能力,因此利用原生质体进行诱变育种是获得高产菌株的一个行之有效的方法^[12,13]。本文采用离子束注入技术结合原生质体紫外照射对特异腐质霉 H31-3 进行诱变,以期获得较原始菌株产酶活力有较大提高且传代后产酶性能稳定的突变菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种:特异腐质霉 (*Humicola insolens*) H31-3 由本试验室提供、保存。

1.1.2 培养基:初筛培养基:纤维素粉 30g, Urea 2g, 微量元素 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg, MnSO_4 1.6mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3mg), 蒸馏水定容至 1,000mL, pH7.5。复筛培养基:麦麸 20g, 纤维素粉 30g, Urea 2g, 微量元素 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg, MnSO_4 1.6mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3mg), 蒸馏水定容至 1,000mL, pH7.5。250mL 三角瓶, 每瓶装 40mL。菌丝培养基^[14]: Glucose 15g, 酵母抽提物 20g, 多聚蛋白胨 1g, 微量元素 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg, MnSO_4 1.6mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3mg), 蒸馏水定容至 1,000mL, pH6.8。250mL 三角瓶, 每瓶 30mL。固体高渗再生培养基:葡萄糖 20g, 甘露醇 91.09g, 琼脂 20g, 土豆汁定容至 1,000mL。刚果红筛选培养基:参照文献 [15]。

1.1.3 主要试剂:高渗缓冲液:0.5mol/L 甘露醇, 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液 pH6.0。酶解液:50mg/mL 蜗牛酶, 0.5mol/L 甘露醇, 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液 pH6.0。

1.1.4 主要设备:离子注入设备,由中国科学院等离子体物理研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 离子束诱变:离子注入试验在离子束生物工程装置上进行,采用 N^+ 脉冲式辐照处理。离子束辐照能量为 10keV, 以不同剂量的 N^+ 离子进行辐照。样品置于水冷的无菌靶台上。取适当浓度的特异腐质霉单孢子悬液 0.2mL 铺于 90mm 的空白平皿中,于超净台风干制成菌膜以备使用。辐照后将菌膜洗脱于固体培养基中培养,挑取单菌落。

$$\text{致死率}(\%) = [(A - B) / A] \times 100\%$$

其中:A 为对照平板上生长的菌落数;B 为处理后平板上生长的菌落数。

1.2.2 原生质体制备:将培养好的菌丝体过滤,除去培养基。用高渗缓冲液冲洗菌体两遍,装入三角瓶中,加入酶解液 37℃ 酶解。每 30min 取样观察原生质体形成的情况至菌丝体降解彻底,原生质体生成量最大时停止摇床培养。过滤,除去菌丝体碎片。滤液 3,000r/min 离心 10min。用高渗缓冲液洗 1~2 次,每次 3,000r/min 离心 10min。得到纯化的原生质体,将其溶于少量高渗缓冲液中。适当稀释再生。

$$\text{再生率}(\%) = [(C - B) / (A - B)] \times 100\%$$

其中:A 为菌落总数,未经酶处理的菌悬液涂布于平板生长的菌落;B 为未原生质体化细胞,酶解液加蒸馏水破坏原生质体,涂布平板后生长的菌落;C 为再生菌落数,酶解混合液加高渗缓冲液,涂布于再生培养基上生长的菌落。

1.2.3 紫外诱变:浓度为 10^6 个/mL 原生质体悬液 4mL 置于 60mm 无菌培养皿中,培养皿距离 15W 紫外灯管 15cm。而后打开培养皿,照射时间为 60~180s。将处理后的原生质体悬液涂布于固体高渗再生培养基再生培养,挑取单菌落。

诱变致死率 = $[(B - A) / B] \times 100\%$

其中：A 为诱变处理后原生质体再生率；B 为未诱变的原生质体再生率。

1.2.4 初筛：将培养成熟的斜面孢子接种到产酶培养基中，大试管装液量 10mL，42℃，280 r/min，发酵 7d，测定中性纤维素酶活力，挑选较优菌株进行复筛。

1.2.5 复筛：试管初筛选出的较优菌株接到产酶培养基中，250mL 三角瓶装液量 40mL，42℃，200r/min 摇瓶发酵 5d，测定中性纤维素酶活力。

1.2.6 酶活力的测定：还原糖的测定：采用 3，5-二硝基水杨酸法（DNS 法）^[16]。

CMC 酶活性测定：以磷酸盐缓冲液（0.1mol/L，pH6.0）配制 2% CMC 底物溶液。取 0.1mL 样品与 0.9mL 底物 CMC 溶液 65℃ 保温 30min，测定反应后还原糖含量同时作空白对照。酶活定义为上述条件下，1 分钟催化生成 1μmol 葡萄糖的酶量为一个 IU。

滤纸酶活性测定：试管底部预先放置适当大小的滤纸（50 ± 1mg），加入 0.5mL 样品与 1mL 磷酸缓冲液（0.1mol/L，pH6.0），65℃ 保温 1h，测定反应后还原糖含量同时作空白对照。酶活定义为上述条件下，1 分钟催化生成 1μmol 葡萄糖的酶量为一个 IU。

2 结果

2.1 离子束诱变与筛选

2.1.1 特异腐质霉离子束诱变与筛选：采用不同剂量的 N⁺ 注入供试菌株 H31-3，多次试验结果表明，采用离子束辐照能量为 10keV，1.3 × 10¹⁵ ion/cm² 和 2.0 × 10¹⁵ ion/cm² N⁺ 进行辐照效果较好。故本次实验采用上述注入条件进行离子注入实验，平均致死率为 43%。经过大试管初筛，250mL 三角瓶复筛在 839 株诱变菌株中得到正突变菌株 24 株。从中选择酶活有较大提高的 12 株，进行复筛，结果如表 1。

表 1 H31-3 离子注入诱变菌株复筛酶活测定结果

菌株	CMC 酶活力 (IU/mL)	CMC 酶活提高率 (%)	滤纸酶活力 (IU/mL)	滤纸酶活提高 (%)
H31-3	45.93	-	2.79	-
H209	46.78	1.85	3.82	36.92
H19	54.14	17.87	3.34	19.71
H3	55.43	20.68	3.65	30.82
H32	58.03	26.34	4.23	51.61
H45	63.21	37.62	4.06	45.52
H251	68.39	48.9	4.23	51.61
H13	70.12	52.67	3.59	28.67
H168	73.58	60.2	4.07	45.88
H28	74.22	61.59	4.69	68.10
H183	75.35	64.05	4.51	61.65
H255	76.17	65.84	4.51	61.65
H14	77.78	69.34	4.86	74.36

由表 1 可得，12 株诱变菌株 CMC 酶活力平均提高 43.91%，滤纸酶活力平均提高 54.60%。进行显著性差异分析表明，H14、H255、H183、H28 在 CMC 酶和滤纸酶活力上与其他菌株的差异是极显著的（P < 0.01），它们的 CMC 酶活力分别提高了 69.34%，65.84%，64.05%，61.59%；滤纸酶活力分别提高了 74.36%，61.65%，61.65%，68.10%。

2.1.2 特异腐质霉突变菌株传代稳定性: 将在 CMC 酶和滤纸酶活力上与其他菌株的差异是极显著菌株的 H14、H28、H183、H255 进行连续传代培养, 结果见表 2。诱变菌株 H14、H28、H183、H255 连续传代至第 9 代产酶性能稳定。

表 2 传代后诱变菌株酶活力测定结果

菌株	CMC 酶活力 (IU/mL)					滤纸酶活 (IU/mL)				
	1 代	3 代	5 代	7 代	9 代	1 代	3 代	5 代	7 代	9 代
H14	77.78	77.79	77.76	77.79	77.78	4.86	4.88	4.79	4.94	4.89
H28	73.58	73.69	73.41	73.27	73.56	4.69	4.72	4.68	4.74	4.69
H183	74.22	74.39	74.45	74.26	74.11	4.51	4.50	4.53	4.46	4.55
H255	76.17	76.23	76.12	76.20	76.10	4.51	4.49	4.56	4.50	4.52

综合 CMC 酶和滤纸酶活力复筛的情况, 选取较 H31-3 两种酶活都有较大提高的 H14, 作为原生质体紫外诱变的出发菌株。

2.2 原生质体紫外诱变

2.2.1 紫外光对特异腐质霉原生质体的致死效应: 制备特异腐质霉 H-14 原生质体, 经紫外线照射不同时间后, 取样适当稀释后涂布于再生培养基上再生, 3 天后计算紫外照射处理的致死率 (表 3)。对特异腐质霉 H-14 原生质体进行紫外照射诱变发现, 10s 后致死率已达到 94.07%, 照射 120s 后致死率达到 100%。通过不同照射时间处理后再生菌落数量和致死率的比较选择诱变照射时间为 90s。

表 3 不同照射时间再生菌落数量

照射时间 (s)	0	10	30	60	90	120	150
再生菌落数 (个/mL)	1.94×10^6	1.15×10^5	2.01×10^4	1358	140	0	0
致死率 (%)	0	94.07	98.96	99.93	99.99	100	100

对特异腐质霉 H-14 原生质体进行紫外照射诱变发现, 10s 后致死率已达到 94.07%, 照射 120s 后致死率达到 100%。通过不同照射时间处理后再生菌落数量和致死率比较选择诱变照射时间为 90s。

2.2.2 特异腐质霉原生质体诱变及筛选: 原生质体进行紫外诱变后涂布于刚果红再生培养基上再生, 在再生菌落中选择产生较大透明圈的菌落, 接种于 PDA 斜面恒温培养。经过初筛选择其中的 14 株诱变菌株进行连续传代培养后复筛, 结果见表 4。

表 4 H14 原生质体紫外诱变菌株复筛酶活测定结果

菌株	CMC 酶活力 (IU/mL)	CMC 酶活提高率 (%)	滤纸酶活力 (IU/mL)	滤纸酶活提高 (%)
H14	77.78	-	4.85	-
H14-9	78.14	0.46	4.51	-8.05
H14-13	78.72	1.21	4.97	1.32
H14-25	79.38	2.06	5.37	9.48
H14-10	79.44	2.13	4.94	0.71
H14-4	80.17	3.07	5.24	6.83
H14-36	80.17	3.07	5.30	8.05
H14-20	80.23	3.15	4.57	-6.83
H14-18	80.97	4.10	5.1	3.98
H14-14	81.10	4.27	4.44	-9.48

续表 4

H14-45	81.54	4.83	5.50	12.13
H14-16	81.76	5.12	4.77	-2.75
H14-15	81.88	5.27	4.64	-5.40
H14-2	82.56	6.15	5.77	17.63

14 株诱变菌株经过复筛 CMC 酶活力均有提高; 滤纸酶活力除 H14-9、H14-20、H14-14、H14-16、H14-15 有所下降外, 其它 9 株诱变菌株滤纸酶活力均呈正突变。其中诱变菌株 H14-2 其 CMC 酶活力和滤纸酶活力较其它诱变菌株均为最高, 分别为 82.56 IU/mL 和 5.77 IU/mL。按前述, 经传代验证该菌株产中性纤维素酶活力稳定。

3 讨论

本试验通过对特异腐质霉进行离子束注入诱变实验, 得到突变株 H14 且传代稳定。说明, 采用离子束注入诱变对于获得性能稳定酶活提高的特异腐质霉菌株是可行的。

紫外光对特异腐质霉 H14 原生质体的致死效应的实验 (表 3) 说明, 其原生质体对外界环境变化十分敏感。进而采用紫外照射对离子束注入突变菌株 H14 进行原生质体诱变, 所得诱变菌株 CMC 酶和滤纸酶活力又有一定的提高 (表 4)。实验表明离子束注入结合其它诱变方法能够取得较好的诱变效果, 这与相关资料相同^[11]。

另外, 考虑到再生菌落的数量, 本次紫外诱变实验采用了致死率为 99.99% 的照射剂量, 而有报道指出采用致死率在 70% ~ 80% 的照射剂量的诱变效果好^[17], 可以考虑进一步实验确定最佳的诱变条件对特异腐质霉 H14 进行原生质体紫外诱变, 以期获得更好的诱变菌株。

综上所述, 通过对特异腐质霉 H31-3 进行离子束和原生质体紫外照射复合诱变, 筛选后得到正突变菌株 H14-2。所获诱变菌株 H14-2 CMC 酶活力和滤纸酶活力分别为 82.56 IU/mL 和 5.77 IU/mL, 较原始菌株分别提高了 78.57% 和 106.81%, 且传代后性能稳定, 对中性纤维素酶的研究和生产具有积极意义。

参 考 文 献

- [1] 王 静. 安徽农业大学学报, 1997, 24 (1): 84 ~ 87.
- [2] 郑亚平, 余晓斌. 无锡轻工大学学报, 2003, 22 (2): 30 ~ 33.
- [3] 陈士成, 曲音波, 张 岩, 等. 应用于环境生物学报, 2000, 6 (5): 457 ~ 461.
- [4] 韩铭海, 黄 俊, 余晓斌, 等. 无锡轻工大学学报, 2004, 23 (3): 85 ~ 88.
- [5] 韩铭海, 黄 俊, 余晓斌. 无锡轻工大学学报, 2004, 23 (6): 9 ~ 12.
- [6] 崔福绵, 马建华, 那 安, 等. 真菌学报, 1983, 2 (2): 119 ~ 126.
- [7] 虞 龙, 许 安, 王 记, 等. 激光生物学报, 1999, 8 (3): 217 ~ 220.
- [8] 姚建铭, 朱皖宜, 王 记, 等. 激光生物学报, 1999, 8 (3): 214 ~ 216.
- [9] 桑金隆, 竺莉红, 李孝辉, 等. 科技通报, 2002, 18 (1): 63 ~ 66.
- [10] 白爱枝, 梁运章. 中国饲料, 2004, 14: 5 ~ 7.
- [11] 李 平, 宛晓春. 菌物系统, 2000, 19 (1): 117 ~ 121.
- [12] 彭益强, 贺淹才, 全成恒, 等. 微生物学杂志, 2002, 22 (5): 7 ~ 111.
- [13] 张宇昊, 王 颀, 张 伟, 等. 纤维素科学与技术, 2004, 12 (2): 18 ~ 221.
- [14] Tatsuki M, Mannabu W. Biosci Biotechnol Biochem, 2003, 67 (6): 1434 ~ 1437.
- [15] Ronald M, Teather J. Wood. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 43 (4): 777 ~ 780.
- [16] 北京大学生物系生物化学教研室编. 生物化学实验指导. 北京: 人民教育出版社, 1980. 22 ~ 24.
- [17] 陶金莉, 沈亚领, 魏东芝, 等. 微生物学通报, 2004, 31 (2): 45 ~ 481.