

内切葡聚糖酶高产菌株的诱变选育

张素敏¹ 陈彩芳² 叶秀云^{1,2} 林娟^{1,2*}

(1. 福州大学 生物科学与工程学院 福建 福州 350108)

(2. 酶高效表达国家工程实验室 福建 福州 350002)

摘要: 【目的】建立里氏木霉(*Trichoderma reesei*)高产突变菌株的快速筛选方法,选育出高产内切葡聚糖酶的突变株。【方法】对里氏木霉 T306 菌株的初筛培养基进行优化,建立快速筛选方法;通过紫外诱变手段选育内切葡聚糖酶高产突变菌株,并对突变菌株的产酶培养基进行优化。【结果】在初筛培养基中添加浓度为 0.1% (W/V)的乳糖、蛋白胨及脱氧胆酸钠有利于菌株的筛选。诱变后筛选出菌落形态发生明显变化的内切葡聚糖酶高产突变株 0516,其羧甲基纤维素酶活力(CMC 酶)较出发菌株提高了 38.9%。其产酶培养基经优化后,得到最适碳、氮源分别为:乳糖 1.50%、硫酸铵 0.14%、尿素 0.05%、蛋白胨 0.10%,优化后 CMC 酶活力达 64.2 U/mL,较优化前提高了 2.3 倍。【结论】建立了里氏木霉高产突变菌株的快速筛选方法,通过紫外诱变育种获得了产内切葡聚糖酶能力高且遗传稳定的突变株 0516。

关键词: 里氏木霉, 内切葡聚糖酶, 紫外诱变, 快速筛选方法

Mutation breeding of endoglucanase high production strain

ZHANG Su-Min¹ CHEN Cai-Fang² YE Xiu-Yun^{1,2} LIN Juan^{1,2*}

(1. College of Biological Sciences and Technology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

(2. National Engineering Laboratory for Enzyme Expression, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: [Objective] To establish the rapid screening method of mutant strain of *Tricho-*

基金项目: 福建省发改委生物技术开发专项项目(No. 闽发改高技【2011】1598号); 福州市科技计划项目(No. 榕科【2012】78号); 2013年海洋公益性行业科研专项项目(No. 201305015)

*通讯作者: Tel: 86-591-22866376; 信箱: ljuan@fzu.edu.cn

收稿日期: 2012-10-19; 接受日期: 2013-01-08

derma reesei and to screen out mutants with high yield endoglucanase. **[Methods]** The screening medium of *Trichoderma reesei* T306 was optimized to establish the rapid screening method, and the mutant strain with high-production endoglucanase was screened through UV mutation. Furthermore, the fermentation medium of mutant strain was optimized. **[Results]** Addition of 0.1% (*W/V*) lactose, peptone and sodium deoxycholate was beneficial for the screening of mutants. The mutant strain 0516 was obtained, which had higher production of endoglucanase and obviously varied in colony morphology. The CMCase activity of the mutant was increased by 38.9% compared with original strain. The optimum carbon source and nitrogen source of culture medium were as follows: lactose 1.50%, ammonium sulfate 0.14%, urea 0.05%, and peptone 0.10%. Under these conditions, the CMCase activity of mutant 0516 reached 64.2 U/ mL, which was 2.3 times higher than before. **[Conclusion]** A method for rapidly screening mutant of *Trichoderma reesei* with high production endoglucanase was established, and mutant 0516 with higher production of endoglucanase and genetic stability was obtained after UV mutation.

Keywords: *Trichoderma reesei*, Endoglucanase, UV mutation, Rapid screening method

随着养殖业的不断发展, 饲料行业面临着严峻的资源短缺状况。纤维素是自然界蕴藏量最丰富、最廉价的可再生资源, 但由于其结构特点, 目前对纤维素的利用仍然十分有限。通过纤维素酶有效地转化纤维素为饲料原料, 对解决饲料资源短缺及促进畜牧业的可持续发展具有十分重要的现实意义。纤维素酶是能够水解纤维素生成葡萄糖的一类多组分酶系, 主要由内切葡聚糖酶(Endo-1,4- β -D-glucanase)、外切葡聚糖酶(Exo-1,4- β -D-glucanase)和 β -葡萄糖苷酶(β -1,4-D-glucosidase)组成^[1]。其中, 羧甲基纤维素酶(CMC 酶)属于内切型葡聚糖酶, 作用于纤维素分子内部非结晶区, 可随机水解 β -1,4-糖苷键, 产生大量带有非还原性末端的小分子纤维素, 是纤维素酶系中的重要组成成分, CMC 酶活力的高低直接影响着纤维素酶作用效率的高低^[2-3]。目前, 饲用纤维素酶活性的检测主要是测定 CMC 酶活力^[4]。

纤维素酶作为一种新型饲料添加剂, 是一种无毒、无害、无副作用的绿色生物制剂, 对提高

饲料利用率, 改善饲料营养价值, 提高畜禽生产性能等具有积极的作用, 在饲料工业和畜牧业中具有广阔的应用前景^[5]。纤维素酶的生产主要依靠微生物发酵, 目前用于生产纤维素酶的微生物菌种大多为真菌, 如木霉、青霉、曲霉以及腐质霉等, 其中以里氏木霉尤为典型, 被广泛用于生产纤维素酶^[6-11]。但纤维素酶菌株产量低、成本高及稳定性不理想等因素仍制约着纤维素酶的生产 and 应用, 因此, 开展纤维素酶高产菌株的选育及发酵工艺研究等基础工作是十分必要的。

本文以课题组前期筛选获得的具有较高 CMC 酶活力的里氏木霉 T306 为实验菌株, 对其进行紫外诱变育种。为了提高突变菌株的筛选效率, 对初筛培养基进行了优化, 建立高产突变菌株的快速筛选方法; 进一步利用该方法快速筛选出经过紫外诱变获得的 CMC 酶高产突变株 0516, 并对其产酶培养基进行优化研究, 为里氏木霉 0516 菌株的工业化生产和推广在饲料中的应用打下基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 里氏木霉 T306 为课题组前期筛选获得的菌株。

1.1.2 培养基: PDA培养基(g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂 15, pH 自然。制备方法: 马铃薯去皮, 切成块煮沸 0.5 h, 然后用纱布过滤, 再加葡萄糖及琼脂, 溶化后补足水至 1 000 mL, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

初筛培养基(g/L): CMC-Na 2.0, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 蛋白胨 1.0, 琼脂 15.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

产酶培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, KH_2PO_4 6.0, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, CaCl_2 0.3, 乳糖 15.0, 微量元素液 1.0 mL, pH 自然, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

微量元素液(g/L): $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.500, MnSO_4 0.156, ZnCl_2 0.167, CoCl_2 0.200, 蒸馏水定容至 100 mL。

1.1.3 主要实验仪器: YXQ-LS-50G 型高压蒸汽灭菌锅, 上海博迅实业有限公司; SW-CJ-2FD 型超净工作台, 苏州净化设备有限公司; MJX-250S 智能霉菌培养箱, 宁波海曙赛福实验仪器厂; UV-9600 型紫外可见分光光度计, 北京瑞利分析仪器公司; Hitachi CF16 RXII 型高速离心机, 天美科技有限公司; SKY-1102C 型气浴摇床, 上海苏坤实业有限公司; DK-S24 型电热恒温水浴锅, 上海精宏实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 初筛培养基的优化: 在初筛培养基中分别添加不同浓度(W/V)的脱氧胆酸钠(0、0.05%、0.10%、0.15%、0.20%)、乳糖(0、0.10%、0.20%)、蛋白胨(0、0.10%、0.20%、0.30%、0.40%), 观察其对菌落生长及透明圈大小的影响。

1.2.2 紫外诱变方法: (1) 孢子悬液的制备: 用

无菌生理盐水洗下 PDA 培养基上刚成熟的新鲜孢子, 振荡使孢子分散均匀, 经血球计数板计数后, 调整孢子数量约为 10^6 个/mL, 备用。

(2) 紫外诱变处理: 将孢子悬液用无菌生理盐水稀释至 10^3 个/mL, 移至无菌平皿中, 置于磁力搅拌器上, 在 15 W 紫外灯下距离 28 cm 处进行诱变处理。将未经诱变处理及诱变处理后的孢子悬液各取 100 μL 分别涂布于初筛培养基上, 29°C 暗处培养 5–7 d, 计算致死率。

致死率=(未经诱变处理菌落数–诱变处理后菌落数)/未经诱变处理菌落数 $\times 100\%$

1.2.3 筛选方法: (1) 平板初筛: 待初筛培养基上长出菌落后, 挑选刚果红透明圈直径和菌落直径比值(HC 值)相对较大及菌落形态发生明显变化的菌落转接到斜面培养基上, 以待进一步筛选。

(2) 摇瓶复筛: 将平板初筛获得的菌株接种至液体产酶培养基中, 29°C 、180 r/min 振荡培养 7–8 d, 测定羧甲基纤维素(CMC)酶活力。

1.2.4 产酶培养基的优化: (1) 碳源对产酶的影响: 分别采用 1.5% (W/V) 的微晶纤维素、CMC-Na、乳糖、葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉和纤维二糖作为碳源, 考察其对 CMC 酶活力的影响; 确定最适碳源后, 进一步研究不同添加量(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%)的影响。

(2) 氮源对产酶的影响: 在确定最适碳源及其添加量的基础上, 分别采用 0.2% (W/V) 的酵母粉、蛋白胨、尿素、硝酸铵、硫酸铵、氯化铵、硝酸钠、硝酸钾作为氮源。

复合氮源配比的正交试验: 在单一氮源实验的基础上, 选择合适的有机氮源和无机氮源作为复合氮源, 进行正交试验, 研究复合氮源的配比及其适宜的添加量。

1.2.5 CMC 酶活力测定方法: (1) 粗酶液制备: 取摇瓶发酵液于 10 000 r/min 离心 3 min, 取上清液, 作为粗酶液。

(2) CMC 酶活力测定方法: 采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 显色法)^[12]。酶活力单位定义: 在 50 °C 的反应条件下, 每分钟水解底物生成 1 μmol 还原糖时所需的酶量为一个酶活力单位, 表示为 U/mL。

1.2.6 滤纸酶(FPA 酶)活力测定方法: 滤纸酶活力测定方法采用 DNS 显色法^[13]。FPA 酶活力单位定义: 以滤纸为底物, 在 50 °C 反应条件下, 每分钟水解底物生成 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个酶活力单位, 以 U 表示。

2 结果与分析

2.1 刚果红染色对里氏木霉 T306 菌株生长的影响

在培养基中添加 0.01%刚果红时, 菌体生长非常缓慢; 当刚果红浓度大于 0.02%时, 菌体无法生长, 说明刚果红对里氏木霉的生长具有较强的抑制作用。因此, 要观察菌落透明圈情况, 须待菌落长出后, 用 1 g/L 的刚果红染色 30 min, 再用 1 mol/L 的 NaCl 脱色 30 min, 即可见透明圈。

2.2 初筛培养基的优化

2.2.1 脱氧胆酸钠对里氏木霉 T306 菌株生长和产酶的影响: 初筛培养基中添加适量脱氧胆酸钠可抑制霉菌扩散生长, 有利于诱变后单菌落的筛选。实验结果表明, 添加脱氧胆酸钠的平板上菌落相对较小、较密实, 透明圈更清晰(图 1), 有利于提高单位平板的筛选量。当脱氧胆酸钠浓度在 0–0.20%范围内时, 菌落密度相对稳定; 但当脱氧胆酸钠浓度为 0.15%及 0.20%时, 菌落增长速度明显变慢。综合考虑脱氧胆酸钠对菌落扩散的抑制程度及菌株生长的影响, 采用 0.10%的脱氧胆酸钠浓度较为适宜。

2.2.2 乳糖对里氏木霉 T306 菌株生长和产酶的影响: 培养基中添加乳糖对菌落出现时间及菌落大小影响不大, 但未添加乳糖的培养基上菌落薄, 孢子量较少; 添加乳糖的平板上菌落经刚果

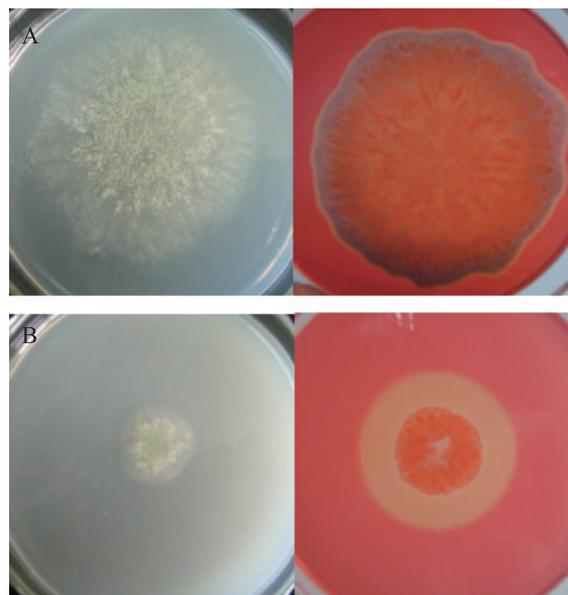


图 1 脱氧胆酸钠对菌落生长及透明圈的影响

Fig. 1 Effect of sodium deoxycholate on the growth and transparent circle of *Trichoderma reesei* T306

注: A: 不添加脱氧胆酸钠; B: 添加 0.1%脱氧胆酸钠。

Note: A: Lack of sodium deoxycholate; B: Addition of 0.1% sodium deoxycholate.

红染色后, 透明圈增大, 见图 2。当乳糖添加量为 0.1%及 0.2%时透明圈大小差别不大, 因此选择乳糖添加量为 0.1%。

2.2.3 蛋白胨对里氏木霉 T306 菌株生长和产酶的影响: 在未添加蛋白胨平板上, 菌落薄, 生长状况差, 透明圈与菌落直径几乎相同; 添加 0.1%蛋白胨有利于菌体生长, 菌落厚、产孢快, 透明圈也变大且清晰(图 3)。因此, 确定在初筛平板中添加 0.1%的蛋白胨。

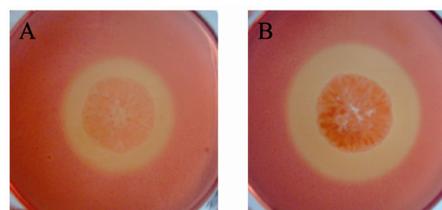


图 2 乳糖对菌落生长及透明圈的影响

Fig. 2 Effect of lactose on the growth and transparent circle of *Trichoderma reesei* T306

注: A: 不添加乳糖; B: 添加 0.1%乳糖。

Note: A: Lack of lactose; B: Addition of 0.1% lactose.

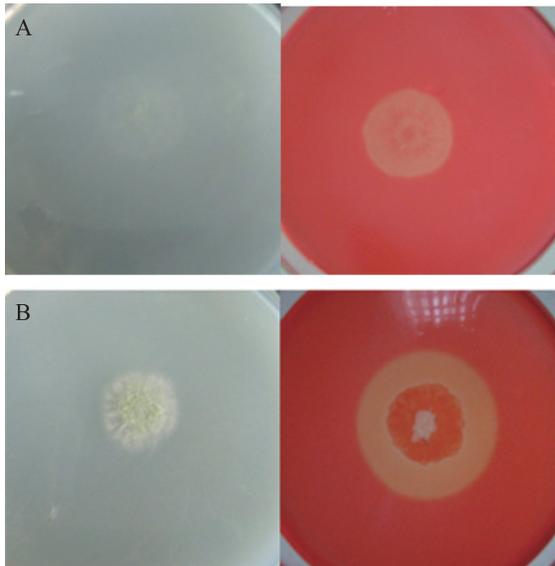


图 3 蛋白胨对菌落生长及透明圈的影响
Fig. 3 Effect of peptone on the growth and transparent circle of *Trichoderma reesei* T306
 注: A: 不添加蛋白胨; B: 添加 0.1%蛋白胨.
 Note: A: Lack of peptone; B: Addition of 0.1% peptone.

2.3 紫外诱变育种

紫外诱变的致死率和正突变率曲线如图 4 所示。由图 4 可知, 紫外灯照射 120 s 时致死率达 80%, 正突变率最高为 7.7%。因此, 本实验选择

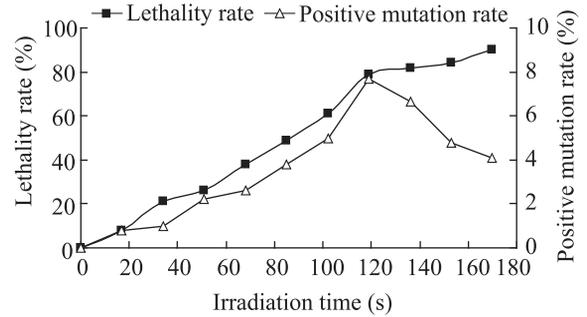


图 4 出发菌株的紫外诱变曲线
Fig. 4 UV mutation curve of original strain

紫外照射时间为 120 s 进行诱变处理。

2.4 突变菌株的筛选

出发菌株 T306 经紫外诱变后, 最终筛选获得 4 株 CMC 酶和滤纸酶(FPA 酶)活力较高的突变株。从表 1 可以看出, CMC 酶活力较高的突变株, 其 FPA 酶活力一般也较高; 但各突变株之间 FPA 酶活力差别很小, 而且 FPA 酶活力普遍偏小。因此, 在后续研究中, 以 CMC 酶活力作为筛选指标。

突变株 0409 产酶能力提高最多, 其次为 0516、0505 及 0506。同时通过观察发现, 突变株 0506 与 0516 的菌落形态发生了明显变化(图 5, 表 1)。

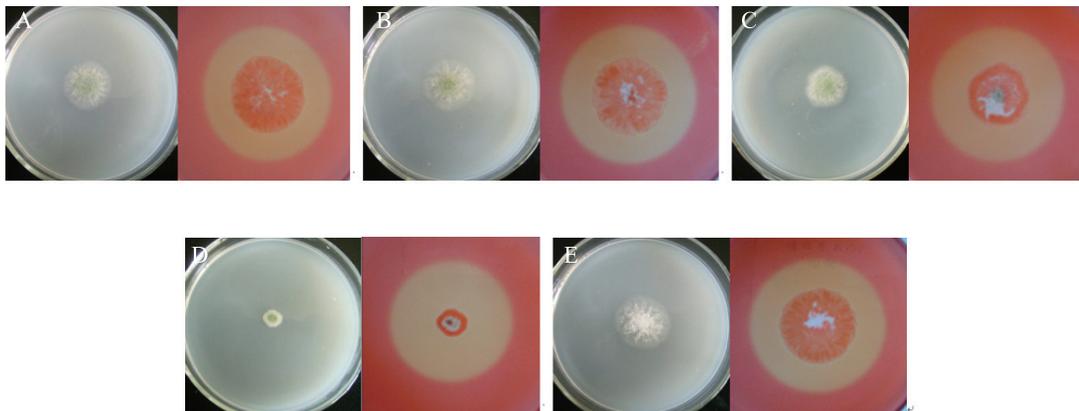


图 5 出发菌株和突变菌株菌落形态及透明圈情况

Fig. 5 Colony morphology and transparent circle of original strain and mutant strains

注: A: 出发菌株 T306; B: 突变株 0409; C: 突变株 0505; D: 突变株 0506; E: 突变株 0516.
 Note: A: Original strain T306; B: Mutant 0409; C: Mutant 0505; D: Mutant 0506; E: Mutant 0516.

表 1 出发菌株与突变菌株的比较
Table 1 Comparison of original strain and mutant strains

| 菌种 Strains | HC 值 HC value | CMC 酶活力 CMCase activity (U/mL) | CMC 酶活力提高率 Increase ratio of CMCase activity (%) | FPA 酶活力 FPA activity (U/mL) | FPA 酶活力提高率 Increase ratio of FPA activity (%) | 生长速度 Growth rate | 菌落形态 Colony morphology |
|-----------------|------------------|-----------------------------------|---|--------------------------------|--|---------------------|---------------------------|
| Original strain | 1.80 | 13.8 | 0 | 0.74 | 0 | 2 d 可见菌落, 3 d 产孢 | 菌落较大, 松散, 孢子深绿色 |
| 0409 | 1.92 | 20.1 | 45.6 | 0.86 | 16.2 | 2 d 可见菌落, 3 d 产孢 | 菌落较大, 松散, 孢子深绿色 |
| 0505 | 2.14 | 18.0 | 30.7 | 0.79 | 6.8 | 3 d 可见菌落, 4 d 产孢 | 菌落较大, 密实, 孢子深绿色 |
| 0506 | 4.56 | 17.7 | 28.1 | 0.77 | 4.1 | 3 d 可见菌落, 4 d 产孢 | 菌落小, 致密, 孢子深绿色 |
| 0516 | 1.85 | 19.2 | 38.9 | 0.84 | 13.5 | 2 d 可见菌落, 3 d 产孢 | 菌落较大, 松散, 孢子白色 |

对筛选获得的突变菌株进行连续传代培养, 突变株 0409 和 0505 在传代过程中, 酶活力呈下降趋势, 传至第 6 代时, CMC 酶活力分别降低了 14.8% 和 10.1%; 突变株 0506 和 0516 产酶稳定性较好。突变株 0516 生长快且酶活力高, 因此在后续研究中以 0516 为实验菌株, 对其产酶培养基进行优化, 以期进一步提高 CMC 酶活力。

2.5 突变菌株 0516 产酶培养基的优化

(1) 碳源对产酶的影响

实验结果如图 6 所示, 微晶纤维素的诱导产酶效果最好, 其次为乳糖与纤维二糖。考虑到实际应

用的生产成本, 选择乳糖作为碳源。当乳糖添加量为 1.5% 时, 发酵液 CMC 酶活力最高, 为 19.4 U/mL。

(2) 氮源对产酶的影响

实验结果如图 7 所示, 对于单一氮源, 蛋白胨和硫酸铵的效果最好, 而在无机氮源中, 铵态氮要优于硝态氮, 菌体在 2 种供试的硝态氮中生长状况差, 未产酶。因此, 选用效果较好的蛋白胨、硫酸铵和尿素(作为单一氮源时 CMC 酶活力分别为 19.1、18.9 和 14.2 U/mL)作为复合氮源, 进行 $L_{16}(4^5)$ 正交试验, 研究不同配比对产酶的影响。

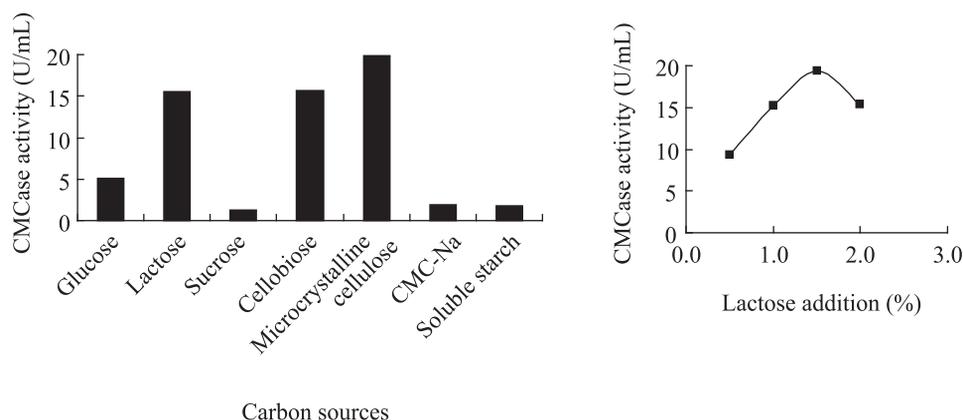


图 6 碳源对产酶的影响

Fig. 6 Effect of different carbon sources on production of cellulose

复合氮源配比的正交试验结果见表 2, 复合氮源的效果明显优于单一氮源。由表 2 可知, $R_A > R_B > R_C$, 即各因素对试验指标 CMC 酶活力影响的主次顺序为: 硫酸铵>尿素>蛋白胨。由方差分析表(表 3)可知, 硫酸铵和尿素的添加量对 CMC 酶活力的影响显著, 蛋白胨的添加量对 CMC 酶活力影响不显著。对因素 A 和 B, 通过比较 K 值大小, 选择最优水平为 A_3 和 B_3 , 而对于因素 C, 由于水平的变化对试验指标影响不大, 结合实际生产成本考虑, 选择 C_1 , 则最终确定的水平组合为 $A_3B_3C_1$, 即硫酸铵 0.14%、尿素 0.05% 及蛋白胨 0.10%。

优化后的产酶培养基为(g/L): 乳糖 15, $(NH_4)_2SO_4$ 1.4, 尿素 0.5, 蛋白胨 1.0, KH_2PO_4 6.0,

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3, $CaCl_2$ 0.3, 微量元素液 1.0 mL (具体配方见 1.1.2)。在此培养基中培养, CMC 酶活力可达 64.2 U/mL, 较优化前提高了 2.3 倍。

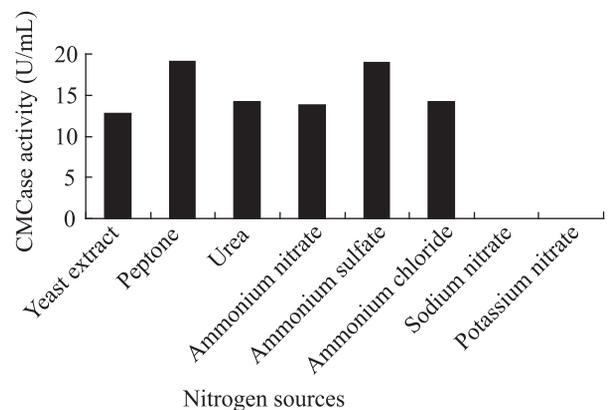


图 7 不同种类氮源对产酶的影响

Fig. 7 Effect of different nitrogen sources on production of cellulase

表 2 $L_{16}(4^5)$ 正交试验结果
Table 2 Results of $L_{16}(4^5)$ orthogonal experiment

| 试验号 Test number | 因素 Factors | | | | | CMC 酶活力 CMCase activity (U/mL) |
|--------------------|---------------------------------|--------------------|------------------------|---|---|-----------------------------------|
| | A 硫酸铵 Ammonium sulfate (g/L) | B 尿素 Urea (g/L) | C 蛋白胨 Peptone (g/L) | D | E | |
| 1 | 1(0.6) | 1(0.1) | 1(1.0) | 1 | 1 | 34.7 |
| 2 | 1(0.6) | 2(0.3) | 2(1.5) | 2 | 2 | 51.0 |
| 3 | 1(0.6) | 3(0.5) | 3(2.0) | 3 | 3 | 48.3 |
| 4 | 1(0.6) | 4(0.7) | 4(2.5) | 4 | 4 | 44.7 |
| 5 | 2(1.0) | 1(0.1) | 2(1.5) | 3 | 4 | 58.5 |
| 6 | 2(1.0) | 2(0.3) | 1(1.0) | 4 | 3 | 58.5 |
| 7 | 2(1.0) | 3(0.5) | 4(2.5) | 1 | 2 | 61.2 |
| 8 | 2(1.0) | 4(0.7) | 3(2.0) | 2 | 1 | 47.6 |
| 9 | 3(1.4) | 1(0.1) | 3(2.0) | 4 | 2 | 51.4 |
| 10 | 3(1.4) | 2(0.3) | 4(2.5) | 3 | 1 | 72.0 |
| 11 | 3(1.4) | 3(0.5) | 1(1.0) | 2 | 4 | 64.2 |
| 12 | 3(1.4) | 4(0.7) | 2(1.5) | 1 | 3 | 52.5 |
| 13 | 4(1.8) | 1(0.1) | 4(2.5) | 2 | 3 | 37.9 |
| 14 | 4(1.8) | 2(0.3) | 3(2.0) | 1 | 4 | 46.4 |
| 15 | 4(1.8) | 3(0.5) | 2(1.5) | 4 | 1 | 61.4 |
| 16 | 4(1.8) | 4(0.7) | 1(1.0) | 3 | 2 | 45.1 |
| K_1 | 44.7 | 45.6 | 50.6 | | | |
| K_2 | 56.5 | 57.0 | 55.9 | | | |
| K_3 | 60.0 | 58.8 | 48.4 | | | |
| K_4 | 47.7 | 47.5 | 53.9 | | | |
| R | 15.4 | 13.2 | 7.4 | | | |

表 3 方差分析表
Table 3 Analysis of variance

| 方差来源 Sources of variance | 偏差平方和 Square of deviance | 自由度 Degree of freedom | 方差 Variance | F 值 F value | 显著性 Significance |
|---|-----------------------------|--------------------------|----------------|----------------|---------------------|
| 硫酸铵 Ammonium sulfate | 627.084 | 3 | 209.028 | 5.751 | * |
| 尿素 Urea | 528.267 | 3 | 176.089 | 4.845 | * |
| 蛋白胨 [△] Peptone | 134.249 | 3 | 44.750 | | |
| 误差 e Error e | 192.859 | 6 | 32.143 | | |
| 误差 e [△] Error e [△] | 327.107 | 9 | 36.345 | | |
| 总和 Sum | 1 482.457 | 15 | | | |

注: *: 影响显著($P < 0.05$).

Note: *: Significant influence ($P < 0.05$).

3 结论

3.1 内切葡聚糖酶高产菌株里氏木霉 T306 初筛培养基的优化

本文首先对 T306 菌株初筛培养基进行了优化, 确定了适宜的培养基成分, 并采用刚果红染色法观察菌落透明圈情况。但在实际筛选过程中, 透明圈(HC 值)的大小只能作为筛选的一个参考指标, 应结合菌株的其他特征并通过测定 CMC 酶活力来最终判断菌株的产酶能力高低。

3.2 里氏木霉 T306 菌株的紫外诱变育种

目前公开报道的通过诱变手段获得的具有较高 CMC 酶活力的里氏木霉菌株有: 傅力等^[12]通过原生质体紫外诱变得得到里氏木霉高产突变株 DWC5, 其 CMC 酶活力达 410.2 mg/(mL·0.5 h); 张秋卓等^[13]通过复合交替诱变获得里氏木霉突变株 ZM4-F3, 其 Cx 酶活达 61.82 U/mL; 国外许多研究者以 *Trichoderma reesei* QM6a 为出发菌株, 通过诱变获得了不少优良突变菌株, 如应用最广泛的 RutC-30、QM9414 等, 其 Cx 酶活可达 100 U/mL^[14]。本研究通过紫外诱变处理获得了产酶能力高且稳定性好的里氏木霉突变株 0516, 其

CMC 酶活力较原始菌株提高 38.9%, 优化后酶活力可达 64.2 U/mL。

3.3 里氏木霉突变株 0516 的产酶培养基优化

对突变株 0516 的产酶培养基进行优化, 确定了适宜的碳、氮源种类及添加量, 进一步提高了突变株的产酶能力。

本文通过对产纤维素酶里氏木霉初筛培养基的优化, 建立了适用于其高产突变菌株快速的筛选方法; 并对里氏木霉 T306 菌株进行紫外诱变育种, 筛选获得了产酶能力高且遗传稳定的突变株 0516; 对其产酶培养基的优化, 进一步提高了突变株 0516 的产酶能力。为后续深入研究里氏木霉 0516 菌株的发酵工艺条件和推广在饲料行业的应用打下基础。

参考文献

- [1] 方诤, 曲音波. 纤维素酶在木质纤维素转化产糖技术中的开发与应用[J]. 生物产业技术, 2010(4): 48-51.
- [2] 孙国强, 吕永艳, 刘建雷. 脂肪酸钙对瘤胃发酵及羧甲基纤维素酶活性的影响[J]. 中国饲料,

- 2010(24): 31–33.
- [3] 霍鲜鲜, 侯先志, 敖长金, 等. 不同粗饲料对绵羊瘤胃内微生物的羧甲基纤维素酶活的影响[J]. 畜牧与兽医, 2008, 40(2): 4–7.
- [4] 岳淑宁, 张红艳, 张强, 等. 饲用纤维素酶质量评价的研究[J]. 中国酿造, 2009(1): 153–154.
- [5] 李桢, 郭雄全, 李亚林. 饲用酶制剂对奶牛生产性能的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012(6): 71–72.
- [6] 高星星, 潘丽军, 杨培周, 等. 里氏木霉与黑曲霉混合发酵产纤维素酶的条件优化[J]. 食品科学, 2012, 33(19): 193–198.
- [7] 王欲晓, 周琳琳. 里氏木霉利用预处理小麦秆生产纤维素酶的应用研究[J]. 广州化工, 2012, 40(4): 29–33.
- [8] Ahamed A, Vermette P. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010(49): 379–387.
- [9] Juhasz T, Szengyel Z, Reczey K, et al. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(11): 3519–3525.
- [10] Wen Z, Liao W, Chen S. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure[J]. Bioresource Technology, 2005, 96(4): 491–499.
- [11] Weber J, Agblevor FA. Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(2): 669–676.
- [12] 管斌, 谢来苏, 丁友昉, 等. 纤维素酶酶活力测定方法的校正[J]. 无锡轻工大学学报, 1999(4): 20–26.
- [13] 严文岱, 周东凯, 杨翔华. 玉米秸秆纤维素分解菌的选育研究[J]. 生物学杂志, 2005, 22(6): 29–31.
- [14] 傅力, 涂正东, 叶凯, 等. 里氏木霉高产纤维素酶菌株的选育及产酶培养基的优化[J]. 食品与机械, 2009, 25(3): 10–13.
- [15] 张秋卓, 蔡伟民. 纤维素酶高产菌株的复合交替诱变选育[J]. 工业微生物, 2008, 38(6): 32–37.
- [16] 覃玲灵, 何钢, 陈介南. 里氏木霉及其纤维素酶高产菌株的研究进展[J]. 生物技术通报, 2011(5): 43–49.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。