

米曲霉纤维素酶高产菌株的诱变育种研究

马琼^{1,2}

(1. 生物资源保护与利用湖北省重点实验室, 湖北 恩施 445000;

2. 湖北民族学院生物科学与技术学院, 湖北 恩施 445000)

摘要: 以米曲霉作为原始菌株, 通过在纤维素培养基上驯化, 经硫酸二乙酯(DES)、紫外线照射复合诱变, 确定最适复合诱变条件为: 用 0.1ml 15% DES 处理后, 紫外线照射用 30W 紫外灯, 垂直距离 20cm, 照射时间为 60s, 得到一株高产纤维素酶的突变菌株 II 5, 其纤维素酶活力高达 100.23U/100ml, 为出发菌株的 1.39 倍。

关键词: 米曲霉; 诱变育种; 纤维素酶

Screening High-yield Cellulase-producing Mutants of *Aspergillus oryzae*

MA Qiong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization of Hubei Province, Enshi 445000, China;

2. College of Bioscience and Technology, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China)

Abstract: *Aspergillus oryzae* was selected as the initial strain for breeding cellulase-producing mutants. A mutant strain, C₃ was obtained through combinatorial mutagenization with UV and DES. The optimal mutation conditions were sequential treatment with 0.1 ml of 15% DES and then illumination with 30 W UV lamp for 60 seconds at a distance of 20 cm. The cellulase activity of this high-yield strain reached 100.23 U/100 ml, which was 1.39 times of that of initial strain.

Key words: *Aspergillus oryzae*; breeding; cellulase

中图分类号: Q936

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)19-0207-03

米曲霉(*Aspergillus oryzae*)是曲霉属的一个种, 它能够产生多种酶系, 包括纤维素酶、蛋白酶、果胶酶、糖化酶、淀粉酶等^[1-2], 目前, 该菌株被广泛应用于农产品酿造产业, 通过固体发酵利用米曲霉所产生的复杂酶系来降解原料中的纤维素、半纤维素、蛋白质、淀粉和果胶等大分子物质^[3-4]。考虑到米曲霉能够产生多种胞外酶, 本研究以米曲霉为原始菌株, 采取化学与紫外线照射复合诱变的方法, 用纤维素培养基定向选育纤维素酶高产菌株, 对米曲霉的原始酶系进行改造, 若能将选育成功的菌株应用于食用菌栽培料的前发酵以及农业堆肥化处理^[5], 促进农业及工业生产, 将产生巨大的经济效益及社会效益。

1 材料与方法

1.1 菌种

原始米曲霉(*Aspergillus oryzae*)菌种从工业微生物菌种保藏中心购买。

1.2 培养基

纤维素培养基: CMC 5.0g、Na₂HPO₄ 6.0g、K₂HPO₄ 4.0g、(NH₄)₂SO₄ 2.0g、矿物盐溶液 500ml、蒸馏水 500ml、pH 值自然。

1.3 方法

1.3.1 驯化

将米曲霉菌株接种于纤维素固体培养基, 28℃培养 6d, 测定菌落直径及透明圈直径, 转接 5 次, 定向驯化米曲霉。

1.3.2 米曲霉孢子悬浮液的制备

用接种环刮取纤维素培养基斜面上的米曲霉孢子, 转入装有无菌水和玻璃珠的三角瓶中, 充分振荡 2min, 用血球计数板计数孢子悬液浓度, 并用无菌水调节孢子浓度为 10⁶ 个/ml, 备用。

1.3.3 诱变处理

取孢子悬浮液 10ml 于 250ml 三角瓶中, 分别加入 0.1、0.2ml 15% 的硫酸二乙酯(DES), 在 28℃ 200r/min 摇床振荡 90min, 加入 25% 的 Na₂S₂O₃ 1ml 终止诱变。

取经 DES 诱变的孢子悬浮液 10ml 于 90mm 直径的平

收稿日期: 2009-06-15

基金项目: 湖北省教育厅重点项目(D20092904); 恩施自治州科技攻关项目(2007A06)

作者简介: 马琼(1979—), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为发酵工程。E-mail: maqiong110@126.com

皿, 在 30W 紫外灯下 20cm 处, 紫外诱变 30、60、90、180s, 处理液涂布平板, 28℃ 培养, 统计诱变致死率, 测定菌落直径及透明圈直径。

$$\text{诱变致死率}(\%) = \frac{\text{诱变前长出的菌落数} - \text{诱变后长出的菌落数}}{\text{诱变前长出的菌落数}} \times 100$$

1.3.4 液体发酵

250ml 三角瓶各分装 100ml 纤维素液体培养基, 接入 10ml 10^6 浓度的突变株 II 5 孢子液, 同时, 以原始米曲霉菌株作对照, 28℃ 200r/min 振荡发酵 7d, 进行液体发酵产酶研究。

1.3.5 酶液的制备

从发酵的第 3 天开始取样, 持续取样 4d, 样品于 4000r/min 冷冻离心 10min, 上清液即为初酶液, 并取此初酶液 10ml 用无菌水定容至 50ml, 即得用于测定的酶液。

1.3.6 纤维素酶活力的测定

参照文献[6]的方法进行, 纤维素酶活力定义为: 在 50℃、30min 内水解羧甲基纤维素钠产生 1mg 葡萄糖的酶量, 定义为 1U。

2 结果与分析

2.1 米曲霉菌株的驯化

原始米曲霉菌株在平板上生长缓慢, 孢子细小, 透明圈不明显, 经 5 次转接培养, 利用米曲霉所产纤维素酶会使 CMC 溶解, 在平板上会出现透明圈的方法即 K 值大小作为指标, 获得纤维素酶活较高的米曲霉菌株, 其 K 值见表 1。

表 1 米曲霉菌株的驯化结果
Table 1 Breeding results of *Aspergillus oryzae*

测定项目	培养时间(d)			
	3	4	5	6
透明圈直径 D (cm)	1.8	3.4	4.6	5.4
菌落直径 d (cm)	1.2	2.2	3.1	4.2
K 值(D/d)	1.38	1.45	1.48	1.28

2.2 DES 与紫外线照射复合诱变结果

由于诱变的协同作用, 以及对 DNA 改变位点的不同, 采取 DES 与紫外线照射复合诱变效果比单一诱变效果要好。米曲霉菌株经不同浓度的 DES 与紫外线照射复合诱变处理, 统计诱变致死率, 实验发现 0.1ml 15% DES, 60s 紫外线照射的诱变条件效果较好, 米曲霉孢子的致死率为 75.9%, 在 70%~80% 之间, 致死率在该范围内正突变率较高。选取生长速度快、孢子致密的突变株移入纤维素培养基斜面(图 1)。

采取最佳的复合诱变条件, 诱变米曲霉效果显著,

获得 5 株 K 值较大的菌株, 表 2 为 5 株突变株培养 5d 后的菌落 K 值, 与原始米曲霉菌株比较, 突变株菌落生长速度加快, 孢子粗壮密集, 透明圈更明显。

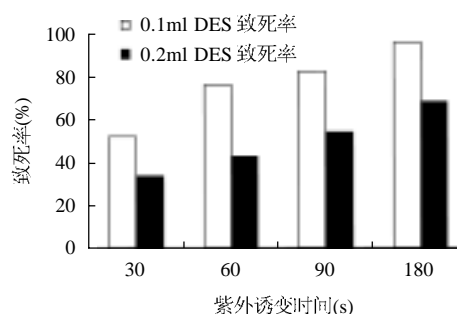


图 1 不同诱变条件下菌株的致死率

Fig.1 Lethality rates at different mutation conditions

从表 2 可看出, 突变株 II₃ 和 II₅ K 值较大, 分别为原始菌株的 1.05 倍和 1.13 倍, K 值大小与纤维素酶活有相关性, 因此, 突变株 II₃ 和 II₅ 纤维素酶活力也可能较高。

表 2 诱变后突变株的粗筛结果
Table 2 Preliminary screening of mutant strains

菌株编号	II ₁	II ₂	II ₃	II ₄	II ₅
透明圈直径 D (cm)	5.7	6.1	6.4	6.8	7.7
菌落直径 d (cm)	3.8	4.0	4.1	4.4	4.6
K 值(D/d)	1.50	1.53	1.56	1.55	1.67

2.3 液体发酵产酶研究

K 值可作为产酶能力大小的粗筛指标, 但要准确判断菌株产酶活力, 需进行液体发酵, 定量测定酶活力大小。发酵实验以突变株 II₃ 和 II₅ 为目的菌株, 原始米曲霉菌株作对照, 进行液体发酵产纤维素酶活力研究, 发酵过程中纤维素酶活力的变化曲线如图 2 所示。

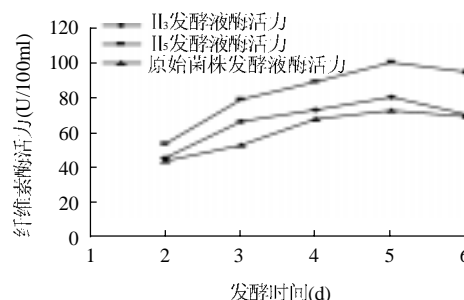


图 2 突变株与原始菌株发酵产酶比较

Fig.2 Cellulase activity comparison between mutated stains and initial strain

从图 2 可以看出, 突变株 II₃、II₅ 和原始米曲霉菌株发酵产酶进程基本一致, 在发酵第 5 天菌株纤维素酶活力达峰值, 之后随发酵进行纤维素酶活力下降。与

原始菌株相比, 突变株 II₃ 和 II₅ 纤维素酶活力均高于原始菌株, 酶活力峰值分别为原始菌株的 1.11 倍和 1.39 倍, 突变株 II₅ 的纤维素酶活力在第 5 天高达 100.23U/100ml。

3 结论与讨论

3.1 本研究以米曲霉作为原始菌株, 通过在纤维素培养基上驯化, 经 DES、紫外复合诱变, 确定复合诱变条件为: 加入 0.1ml 15% DES, 紫外线照射用 30W 紫外灯, 距离为 20cm, 照射时间为 60s, 得到一株高产纤维素酶的突变菌株 II₅, 发酵液酶活力高达 100.23U/100ml, 为原始菌株的 1.39 倍。

3.2 在农产品酿造产业、食用菌栽培料的前发酵以及农业堆肥化处理过程中, 由于植物细胞中的胞内物质均由纤维素类物质包裹, 暴露或释放有用的细胞物质需要纤维素酶首先作用在纤维素类物质上, 再在淀粉酶、蛋白酶等多种酶的作用下水解蛋白质, 故纤维素酶降解细胞壁, 使细胞物质释放出来的步骤是控制步骤, 菌株分泌的纤维素酶含量决定了其他酶系可利用的细胞物质

含量, 也间接决定了相应产品的产量与质量, 因此, 在进行农产品及其下脚料发酵时, 菌株是否具有高产纤维素酶特性, 是应该考虑的重要问题之一。

参考文献:

- [1] 熊薇, 许学书. 定向选育米曲霉提取香菇鲜味成分[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 106-109.
- [2] 赵龙飞, 徐亚军. 米曲霉的应用研究进展[J]. 中国酿造, 2006(5): 25-30.
- [3] 杜娟, 曲音波, 林颢勤. 灰绿曲霉高产纤维素酶突变株的选育[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006(5): 24-26.
- [4] CONVERTI A, del BORGHI M, GANDOLFI R, et al. Ethanol acetylation by mycelium-bound carboxylesterase of *Aspergillus oryzae*: estimation of thermodynamic parameters and integral productivity[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002, 18(5): 409-416.
- [5] 曾莹, 胡赛阳, 丘雁临, 等. 纤维素酶高产菌株的诱变育种[J]. 微生物学杂志, 2003, 23(6): 23-25.
- [6] 周传云, 聂明, 万佳蓉. 酱油生产用菌粉中选育优良米曲霉菌种的研究[J]. 中国酿造, 2004(5): 18-20.