

文章编号:1009-038X(2004)03-0085-04

中性纤维素酶高产菌株的诱变选育及产酶条件

韩铭海¹, 黄俊¹, 余晓斌^{1*}, 缪静²

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡, 214036; 2. 烟台师范大学生命科学院, 山东 烟台 264025)

摘要: 通过紫外线和 γ 射线交替诱变, 筛选得到一株高产纤维素酶的突变菌株 BE40-39. 与出发株相比, 其产酶能力提高 1.3 倍, 发酵性状与出发菌株也有明显的差异. 突变菌株发酵试验发现, Avicel 是突变菌株产酶最合适的纤维素质碳源. 通过对发酵培养条件的试验, 得出最佳培养条件是: Avicel 质量浓度为 0.1 g/dL, 胰蛋白胨质量浓度为 0.3 g/dL, 最适发酵温度为 30 $^{\circ}$ C, 最佳培养基初始 pH 4.2, 发酵 5 d 达到产酶高峰.

关键词: 纤维素酶; 诱变; 木霉

中图分类号: TQ 925

文献标识码: A

Screening of Mutant Strains with High Neutral Cellulase Activity and Its Enzyme Production Condition

HAN Ming-hai¹, HUANG Jun¹, YU Xiao-bin^{1*}, MIAO Jing²

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. School of Life Science, Yantai Normal University, Yantai 264025, China)

Abstract: The mutant strain BE40-39 with relatively high neutral cellulase activity was isolated. The mutant's ability to produce cellulase increased 2.3 times after treating with UV and γ -ray, and the fermentation properties were different. Avicel was the optimal carbon source. The concentrations of avicel and tryptone were also optimized. The maximum medium cellulase activity reached at 30 $^{\circ}$ C and pH 4.2 after 5 days' culture.

Key words: cellulase; mutation; *Trichoderma* sp.

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、中草药提取等各个领域^[1,2], 其前景十分广阔. 其中, 中性纤维素酶在纺织、食品、饲料和制药行业均广泛应用, 尤其是在纺织领域应用较广. 中性纤维素酶在牛仔布“洗旧”整理加工过程中, 其 pH 值变化对中性纤维素酶的影响比较小, 而且酶洗也不易产生返染现象^[3]. 目前, 中性纤维素酶市场需求量较大, 价格

昂贵.

纤维素酶是水解纤维素 β -1,4 葡萄糖苷键, 使纤维素分解成纤维二糖和葡萄糖的一组酶的总称. 纤维素酶由葡聚糖内切酶、葡聚糖外切酶、 β 葡萄糖苷酶 3 个主要成分组成的诱导复合酶系. 前两者主要溶解纤维素, β 葡萄糖苷酶将纤维二糖转化为葡萄糖. 只有当三者主要成分活性比例恰当, 才能表现出较高的活性^[4].

收稿日期: 2003-06-10; 修回日期: 2003-09-23.

基金项目: 国家十五科技攻关项目(2001BA708B03-04)资助课题.

作者简介: 韩铭海(1976-), 男, 江苏无锡人, 发酵工程硕士研究生; * 责任作者.

目前中性纤维素酶主要还依赖进口,因此,开展中性纤维素酶高产菌株的选育和高效提取研究,对缩短我国与国际先进水平的差距,降低生产成本,实现中性纤维素酶国产化,具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 菌种

出发菌株木霉 ZC,由作者所在实验室保存。

1.2 培养基和培养方法

1.2.1 试管斜面种子 将菌种接种于 5 g/dL 的麸皮汁斜面培养基上,30 ℃ 培养 3 d 后使用或 4 ℃ 保存。

1.2.2 摇瓶培养基和培养方法 250 mL 三角瓶装 2 g/dL 麸皮,1.5 g/dL Avicel,0.4 g/dL KH_2PO_4 ,0.2 g/dL 胰蛋白胨,0.2 g/dL $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,0.1 g/dL CaCO_3 ,0.03 g/dL MgSO_4 ,自来水配制成 100 mL,自然 pH 值;121 ℃ 灭菌 25 min,接种斜面孢子,30 ℃ 旋转式摇床(150 r/min)培养 5 d,经过滤发酵液得到纤维素酶溶液。

1.2.3 筛选平板培养基和培养方法 筛选培养基采用双层培养基。上层:粉碎均质后的新华 1 号滤纸 0.5 g/dL,蛋白胨 0.3 g/dL, K_2HPO_4 0.1 g/dL,菌落扩展抑制剂 0.15 g/dL,琼脂 2 g/dL。下层:水和 2 g/dL 琼脂。制备筛选平板时,先在直径 9 cm 的培养皿中倒入适量的水,琼脂冷却后,用 10 mL 移液管移入 10 mL 上层培养基。适当浓度的孢子悬液涂布于平板,30 ℃ 培养 3 d 后,测量透明圈。

1.3 诱变方法

1.3.1 紫外线诱变 用生理盐水制备 $10^{5\sim6}$ 个/mL 的孢子悬液,取孢子悬液 10 mL 于半径 9 cm 的培养皿中磁力搅拌,距离 30 W 紫外灯 15 cm 处照射 3 ~ 5 min。

1.3.2 γ 射线(^{60}Co)诱变 在内径为 1.5 mL 试管中加入 0.5 mL 分生孢子悬液,浓度为 $10^{5\sim6}$ 个/mL, ^{60}Co 射线以 650 Gy 的剂量照射。

1.3.3 紫外线和 γ 射线复合诱变 用紫外线处理 2 min,之后用 γ 射线以 450 Gy 的剂量处理。

1.3.4 致死率的计算 致死率 = $1 - \frac{\text{诱变后孢子液的浓度}}{\text{诱变前孢子液的浓度}}$

1.4 测定方法

1.4.1 滤纸酶活单位定义 50 ℃ 下,每 30 分钟水解底物生成 1 μmol 葡萄糖所对应的酶活定义为 1 个滤纸酶活单位(U)。

1.4.2 还原糖测定 采用 DNS 法^[6]。DNS 试剂与还原糖发生氧化还原反应,生成 3-氨基-5-硝基水

杨酸,其产物在煮沸后显色,颜色深度与还原糖的质量浓度呈线性关系,用分光光度计测还原糖质量浓度。

1.4.3 滤纸酶活(FPA)测定 取适当稀释酶液 0.5 mL 于 1 mL pH 6.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中,加入 Whatman No.1 滤纸条(0.5 cm×5 cm)一片,50 ℃ 酶解 30 min,然后测定还原糖含量。

2 结果与讨论

2.1 变异菌株的获得

以产中性纤维素酶的木霉^[6,7] *Trichoderma* sp. ZC(PFA 滤纸酶活力 39 U/mL)作为出发菌株,采用上述筛选方法,诱变后的孢子培养 3 d 后观察透明圈(见图 1)。挑选透明圈大的菌株摇瓶发酵后测定酶活。整个诱变过程分 3 次进行,经过紫外线和 γ 射线几次诱变筛选,获得突变菌株 BE40-39,发酵液酶活提高到 90 U/mL。具体诱变过程如下:

出发菌株 ZC(39 U/mL) $\xrightarrow[\text{致死率 85\%}]{\text{紫外线反复诱变}}$ UI-12(44 U/mL) $\xrightarrow[\text{致死率 82\%}]{\gamma \text{ 射线反复诱变}}$ ER-45(59 U/mL) $\xrightarrow[\text{致死率 91\%}]{\text{紫外线和 } \gamma \text{ 射线复合诱变}}$ BE40-39(90 U/mL)

从 3 次诱变和复筛的情况看,紫外线反复诱变使菌株产酶能力提高 13%, γ 射线反复诱变产酶能力提高 34%,紫外线和 γ 射线交替诱变后菌株的产酶能力提高 53%。

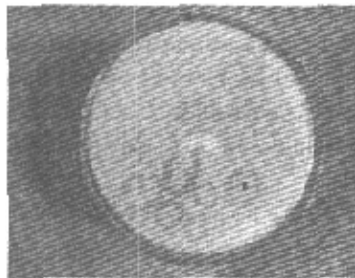


图 1 在筛选平板上出现透明圈的菌落

Fig.1 The clone surrounded by clear zone on the plate

2.2 培养条件的优化

2.2.1 纤维素质碳源对产酶的影响 纤维素酶是诱导酶,在微生物发酵过程中,作为碳源的纤维素也是诱导物的主要来源。微生物利用不同碳源的难易程度不同,碳源的分解产物有作为诱导物的,也有作为阻遏物的,因此,不同的碳源对微生物产酶影响很大。比较几种不同的纤维素质碳源(1 g/dL)对产酶的影响,结果见表 1。从表 1 可以看出,Avicel(微结晶纤维素)对产酶最有利。

表1 不同纤维素质碳源对产酶的影响

Tab.1 Effects of various cellulosic carbon sources on cellulase production

纤维素质碳源(1 g/dL)	酶活力/(U/mL)
Avicel	85
CMC	43
Solka Floc	58
细菌纤维素	43
果胶	35

2.2.2 Avicel的质量浓度对产酶的影响 纤维素酶是一种胞外酶,也是一种诱导酶,易受到分解代谢产物阻遏。诱导作用的强弱因诱导物而异,易受诱导物浓度的影响。同时,碳源被微生物利用后,产生有机酸,培养基的pH值下降,影响微生物的生长和产物的合成。因此,合适的碳源浓度对产酶是很重要的。从图2可以看出,Avicel的质量浓度为1 g/dL时,发酵液的酶活最高。

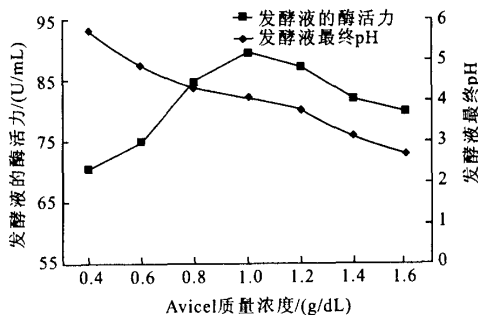


图2 Avicel质量浓度对菌株产酶的影响

Fig.2 Effect of Avicel concentration on cellulase production

2.2.3 氮源的质量浓度对产酶的影响 有一定的氮源浓度才能满足蛋白质的合成需要,维持菌体的生长,有机氮的消耗也会使培养基的pH值上升。因此,微生物菌体的生长需要合适的氮源浓度。图3比较了不同质量浓度的胰蛋白胨对产酶的影响。可以看出,当胰蛋白胨为0.3 g/dL时,发酵液酶活最高。

2.2.4 培养基起始pH对产酶的影响 培养基的pH值影响微生物的生长也影响产物的形成。根据霉菌的特点,将培养基起始pH调至不同的值,结果见图4。培养基的起始pH为4.2时,产酶最理想。

2.2.5 发酵温度对产酶的影响 发酵温度过低时,微生物的新陈代谢速度减慢,菌体生长缓慢,发酵周期延长。发酵温度过高时,微生物的生长加快,影响生理机能,影响代谢产物的合成。因此,在不同的温度下进行发酵试验,结果见图5。最佳发酵温度

为30℃。

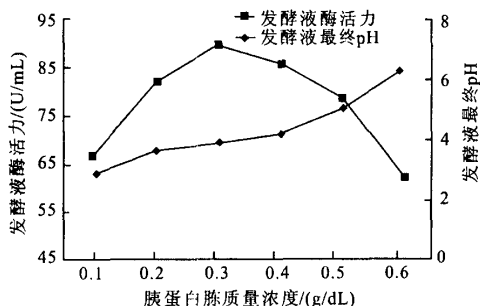


图3 胰蛋白胨对菌株产酶的影响

Fig.3 Effect of tryptone concentration on cellulase production

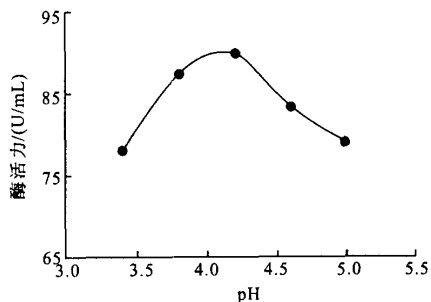


图4 pH对菌株产酶的影响

Fig.4 Effects of pH of culture medium on cellulase production

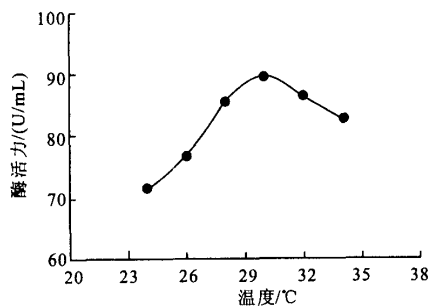


图5 温度对菌株产酶的影响

Fig.5 Effects of culture temperature on cellulase production

2.3 出发菌株 ZC 与高产突变菌株 BE40-39 发酵性状的比较

由图6可以看出,突变菌株与出发菌株摇瓶发酵性状的差异主要是发酵产酶高峰出现的时间不同,突变菌株 BE40-39 发酵 120 h 时达到发酵液酶活最高峰,而出发菌株 ZC 为 72 h。在突变菌株发酵过程中,发酵液 pH 在 60 h 内维持在 3.9 左右,这一段时间正是菌株产酶最旺盛时期。相比之下,出

发菌株发酵液 pH 只维持 30 h. 在发酵后期, 菌体衰退、自溶, 发酵液 pH 上升. 随着发酵液 pH 上升, 发酵液的酶活力开始下降, 说明发酵液的 pH 与菌体

产酶具有相关性. 在发酵后期, 突变菌株的发酵液 pH 回升比出发菌株要慢, 说明突变菌株发酵后期的自溶趋势减弱.

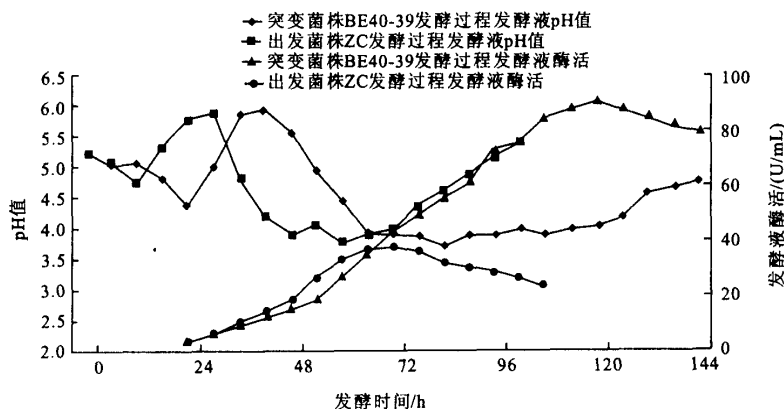


图 6 突变株 BE40-39 与出发菌株 ZC 发酵曲线的比较

Fig. 6 The comparison for fermentation performance between the mutant and original strain

3 结 论

以紫外线和 γ 射线交替诱变的方法筛选到一株产酶能力提高 1.3 倍的突变菌 BE40-39, 其发酵性状与出发菌株有很大差异. 同时, 发酵试验表明,

以纤维素质碳源的 Avicel 最能促进纤维素酶的合成, 其最适质量浓度为 1 g/dL, 当胰蛋白胍质量浓度为 0.3 g/dL, 发酵培养基初始 pH 4.2, 30 °C 发酵 5 d 后产酶达到最高峰.

参考文献:

- [1] 任大明, 刘昭壮. 浅谈饲料用纤维素酶的生产与应用[J]. 饲料工业, 1995, 16(3): 1-3.
- [2] 肖春玲, 徐常新. 微生物纤维素酶的应用研究[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(2): 33-55.
- [3] 王静. 牛仔布纤维素酶“洗旧”整理工艺参数的研究[J]. 安徽农业大学学报, 1997, 24(1): 84-87.
- [4] 曾文青, 刘蓉, 曾勤. 纤维素酶系高产菌株的选育[J]. 四川省卫生管理干部学院学报, 2000, 19(1): 4-6.
- [5] 管斌, 丁友防, 谢来苏, 等. 还原糖测定方法的规范[J]. 无锡轻工大学学报, 1998, 18(3): 74-78.
- [6] Gupta J K, Das N B, Gupta Y P. Effect of cultural conditional on cellulose formation by *Trichoderma virid*[J]. *Agric Biol Chem*, 1972, 36(11): 1961-1967.
- [7] Begium P. Molecular biology of cellulose degradation[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1994, 44: 219-248.

(责任编辑: 李春丽)