

黑曲霉原生质体诱变及其产纤维素酶条件研究

游庆红,尹秀莲

(淮阴工学院生命科学与化学工程学院,江苏 淮安 223001)

摘要: 采用紫外、硫酸二乙酯及复合诱变3种方法对黑曲霉原生质体进行诱变育种,以提高其酶活。结果表明,采用复合诱变效果最好,复合诱变所得菌株的酶活比出发菌株大幅度提高,应用单因素实验优化突变菌株的产酶条件,其最佳产酶条件培养基为:5%蔗糖、1.4%蛋白胨、0.2%磷酸二氢钾、0.05%硫酸镁,在250 mL摇瓶中装液60 mL,10%接种量,29℃下200 r/min培养96 h,酶活达到最大。

关键词: 微生物;原生质体;诱变;酶活;单因素实验;黑曲霉

中图分类号:Q93-3;Q813;Q55;TQ925

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2010)04-0034-04

Study on Protoplast Induced Mutation of *Aspergillus niger* and Its Cellulase-producing Conditions

YOU Qing-hong and YIN Xiu-lian

(College of Life Sciences and Chemical Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huaian, Jiangsu 223001, China)

Abstract: Mutation breeding of protoplast of *Aspergillus niger* was performed by UV, DES and UV+DES respectively to increase the enzyme activity of the mutant strains. The results showed that complex mutation (UV+DES) had achieved the best effects (the enzyme activity of the mutant strain improved greatly than that of starting strain). The cellulase-producing conditions of the mutant strain were optimized by single factor experiment and the best technical conditions were summed up as follows: culture medium composed of 5% sucrose, 1.4% peptone, 0.2% KH_2PO_4 and 0.05% MgSO_4 , 60 mL liquid filling in 250 mL flask, 10% inoculation quantity, culture temperature was at 29℃, and fermentation time was 96 h at 200 rpm.

Key words: microbe; protoplast; mutation; enzyme activity; single factor experiments; *Aspergillus niger*

纤维素类物质是自然界中最丰富的一种可再生资源,如果能利用纤维素酶将天然纤维素降解为可利用的低聚糖,再进一步转化为生物乙醇等物质,对解决当前世界所面临的能源危机和环境污染问题具有深远的意义^[1]。据报道,产生纤维素酶的微生物大多是木霉属菌株,而利用黑曲霉生产纤维素酶的报道较少^[2]。本文选择黑曲霉作为出发菌株,通过紫外线、硫酸二乙酯对其原生质体进行复合诱变育种,并对其产酶条件进行了优化,以期进一步提高其纤维素酶活力,弥补木霉属菌株的不足。

1 材料与方法

1.1 材料

黑曲霉 30786,购自中国农业微生物菌种保藏中心;生物传感器(SBA-40型),购自山东省科学院;渗透压稳定剂:0.8 mol/L氯化钾溶液;硫酸二乙酯(DES)溶液:2 mL DES溶于8 mL 95%vol乙醇,备用。

无菌复合酶液:将一定量的纤维素酶、蜗牛酶及溶菌酶溶于渗透压稳定剂,充分振荡溶解后,8000 r/min离心15 min,用0.22 μm滤膜过滤除菌;配制成0.5%纤维素酶+0.5%蜗牛酶+1.0%溶菌酶的混合酶液。

PDA培养基:20%马铃薯,2%蔗糖,2%琼脂,pH自然。

再生固体培养基:0.2%酵母提取物,0.5%蛋白胨,0.2%氯化钠,1%淀粉,1.7%琼脂,加入0.8 mol/L氯化钾溶液作为高渗透压稳定剂,pH5.8。

发酵产酶培养基:1%蛋白胨,0.2%磷酸二氢钾,0.05%硫酸镁,3%蔗糖,自来水配制,pH自然。

筛选培养基^[2]:0.10%磷酸二氢钾,1.0%硫酸铵,0.025%硫酸镁,1.00%羧甲基纤维素钠,0.25%去氧胆酸钠,0.02%刚果红,2.00%琼脂,pH值自然。

1.2 实验方法

1.2.1 纤维素酶活力测定方法^[3]

基金项目:淮阴工学院青年科学基金项目(HGC0918)。

收稿日期:2010-01-25

作者简介:游庆红(1976-),男,博士,讲师,研究方向为生物化工及生物制药。

取 pH 5.0 的 1% 柠檬酸羧甲基纤维素钠缓冲液 1.0 mL, 加入酶液 0.5 mL, 40 °C 水浴 30 min。在此条件下, 1 h 由底物生成 1 μmol 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位(U/mL); 用生物传感器测定还原糖含量。

1.2.2 原生质体的制备与再生

取培养 24 h 摇瓶种子液 1 mL, 置于 10 mL 无菌复合酶液 30 °C 酶解 3 h, 镜检, 取适量原生质体悬液涂布于原生质体再生培养基, 30 °C 培养 3 d, 计算再生率。

原生质体再生率 = (再生菌落数/原生质体数) × 100 %

1.2.3 原生质体诱变处理

1.2.3.1 紫外线诱变(UV)

将适量原生质体悬液置于无菌培养皿中, 置于 15 W 紫外灯下, 距离 10 cm 照射不同时间, 红灯保护下吸取原生质体悬液 1 mL, 涂布于再生培养基平板上。取未经紫外线处理的原生质体悬液 1 mL, 同样涂布于平板做对照, 置于培养箱中 30 °C 恒温培养 3 d 计数, 计算致死率。

1.2.3.2 硫酸二乙酯(DES)诱变

取 2 mL 原生质体悬液, 适当稀释后加入 10 mL 渗透压稳定剂置于无菌三角瓶中, 再加入 DES 乙醇溶液 0.2 mL, 分别振荡处理不同时间, 加入 0.5 mL 25 % 的硫代硫酸钠溶液终止反应, 并涂平板, 取未经 DES 处理的原生质体悬液涂平板做对照, 置于培养箱中 30 °C 培养 3 d 后计数, 并计算致死率。

1.2.3.3 UV+DES 复合诱变

按上述方法用 DES 处理原生质体一定时间, 再紫外线诱变处理一段时间, 复合诱变后于再生培养基涂平板, 并做对照, 置于培养箱中 30 °C 恒温培养 3 d 后计数, 并计算致死率。

1.2.3.4 致死率的计算

诱变存活率 = (诱变后原生质体再生菌落数/未诱变的原生质体再生菌落数) × 100 %

诱变致死率 = 1 - 诱变存活率

1.2.3.5 突变株的筛选^[4]

选取纤维素水解圈与菌落直径之比大于 1.5 的菌落接种于斜面培养基上, 培养 4~5 d 接种到发酵培养基中, 28 °C 培养 120 h 测酶活, 将每一轮诱变所筛选到的最高酶活突变株, 作为下一轮诱变的出发菌株。

1.2.4 诱变菌株产纤维素酶条件研究

以发酵产酶培养基为基础, 将 1.2.3.5 筛选获得的突变菌株作为出发菌株, 250 mL 摇瓶装液若干, 29 °C 下 200 r/min 振荡培养 96 h。

2 结果与分析

2.1 原生质体的再生和诱变

2.1.1 原生质体的再生

将原生质体接种到再生培养基上, 30 °C 培养 3 d 后, 经计算其再生率为 25.9 %。

2.1.2 原生质体的诱变

2.1.2.1 紫外线照射对原生质体的诱变致死效应

紫外线照射时间对原生质体致死率的影响结果见表 1。

表 1 紫外照射时间对原生质体致死率的影响

项目	照射时间 (s)					
	0	50	100	150	200	250
致死率 (%)	0	51	62	78	88	97

由表 1 可知, UV 照射时间对原生质体致死率有很大影响, 当用 UV 处理 150 s 时致死率达到 78.7 %, 因此选择 150 s 为最佳处理时间。

2.1.2.2 硫酸二乙酯诱变对黑曲霉原生质体的致死效应
利用硫酸二乙酯作为诱变剂对黑曲霉原生质体进行处理, 其致死效果见表 2。

表 2 硫酸二乙酯诱变对黑曲霉原生质体的致死效应

项目	处理时间 (min)							
	0	10	20	30	40	50	60	70
致死率 (%)	0	13	22	31	58	78	89	98

由表 2 可知, 当用 DES 处理 50 min 时, 致死率达到 79.2 %, 因此 50 min 为最佳处理时间。

2.1.2.3 UV+DES 复合诱变对黑曲霉原生质体的致死效应

利用 UV 与 DES 复合进行诱变, 考察复合诱变对黑曲霉原生质体的致死情况, 结果见表 3。

表 3 UV+DES 复合诱变对黑曲霉原生质体的致死效应

项目	处理时间 (min)				
	20	40	60	80	100
致死率 (%)	57	73	82	92	100

用 DES 处理 40 min 后, 采用紫外诱变。由表 3 可以看出, 当用 UV+DES 处理 50 s 时, 致死率达到 82.1 %。因此, 当采用 DES 处理 40 min 后, 再采用 50 s 紫外诱变为最佳处理方式。

2.2 原生质体诱变菌株的筛选

将突变株初筛后所获得的正向突变菌株共 28 个菌株, 分别取用以上 3 种诱变方法中所获得的正向突变菌株各 2 个菌株, 将这 6 支菌株编号, 经紫外线诱变的 2 株编号为 A1、A2, 经硫酸二乙酯诱变的编号为 B1、B2, 经紫外线 + 硫酸二乙酯诱变的编号为 C1、C2, 各自接种到液体产酶培养基中, 在 30 °C、200 r/min 条件下摇瓶培养 4 d 后, 测其酶活, 并进行比较, 结果见表 4。以未诱变菌株做

表4 3种诱变菌株复筛后的酶活动

菌株	第一轮复筛酶活(U/mL)	第二轮复筛酶活(U/mL)
A1	11.3	—
A2	—	12.5
B1	15.2	13.3
B2	14.2	—
C1	17.6	16.9
C2	16.6	17.8

空白实验,测得其酶活为 9.8 U/mL。

经过二轮复筛后得到 4 株菌保留正突变性状,同时可以看出,UV+DES 复合诱变效果要优于其他 2 种方式。

2.3 传代实验

从复筛后获得的 4 株菌中选择酶活较好的 C1 和 C2 菌株进行传代实验,结果见表 5。

表5 各诱变菌株传代后的酶活

菌株	酶活(U/mL)		
	第1代	第2代	第3代
C1	17.8	17.3	17.5
C2	17.1	17.5	17.2

由表 5 可以看出,诱变菌株传代 3 次产酶性能仍较稳定,而其酶活分别比出发菌株有较大的提高,说明诱变效果较好。

2.4 培养基组成及产纤维素酶单因素试验

以发酵产酶培养基为基础,依次考察不同碳源浓度、氮源浓度、培养基装液量、接种量对黑曲霉产纤维素酶的影响。

2.4.1 蔗糖浓度对黑曲霉产纤维素酶酶活的影响

固定其他条件,分别以 2%、3%、4%、5%和 6%的蔗糖浓度考察其对纤维素酶酶活的影响,设蔗糖浓度为 3%时相对酶活为 100%,结果见图 1。

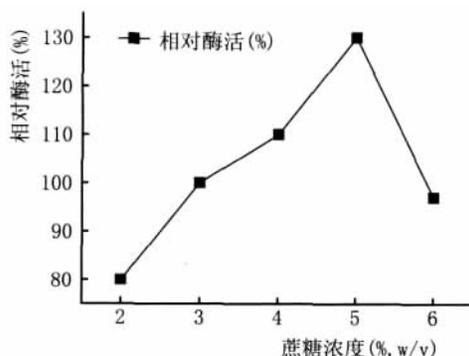


图1 不同蔗糖浓度对黑曲霉产纤维素酶酶活的影响

由图 1 可知,蔗糖浓度对纤维素酶酶活有较大影响,当蔗糖浓度为 2%~5%时,酶活逐步增大,蔗糖浓度为 5%时相对酶活达最大值(130%),之后随着蔗糖浓度增大急速下降。

2.4.2 蛋白胨浓度对黑曲霉产纤维素酶酶活的影响

以 2.4.1 优化结果为基础,考察不同蛋白胨浓度对菌株产纤维素酶酶活的影响,设蛋白胨浓度为 1%时相对酶活为 100%,结果见图 2。

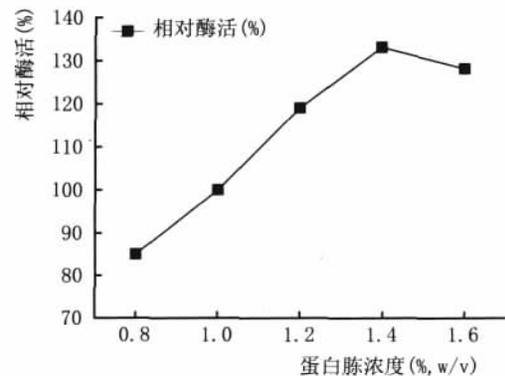


图2 不同蛋白胨浓度对黑曲霉产纤维素酶酶活的影响

由图 2 可知,当蛋白胨浓度为 0.8%~1.4%时,酶活急剧增大,之后酶活逐渐减少,因此,蛋白胨浓度应取 1.4%。

2.4.3 培养基装量对黑曲霉产纤维素酶酶活的影响

对于好氧发酵来说,培养基装液量影响通风和搅拌效果,进而会对溶解氧产生巨大的影响,从而影响发酵产酶过程。以 2.4.2 优化结果为基础,考察在 250 mL 摇瓶中装入不同量培养基,考察装液量对产酶的影响,设装液量 50 mL 时,相对酶活为 100%,结果见图 3。

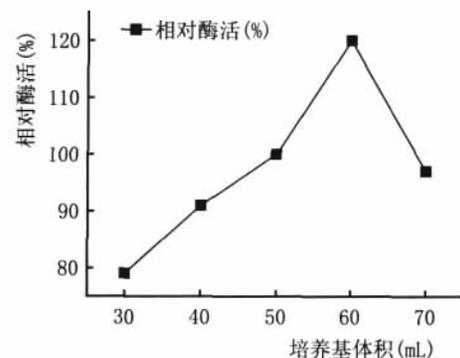


图3 不同培养基装量对黑曲霉产纤维素酶酶活的影响

由图 3 可知,培养基装液量在 30~60 mL 时,相对酶活大大增加,装液量在 60 mL 时酶活达到 120%,之后随着装液量增大,酶活快速下降。

2.4.4 接种量对黑曲霉产纤维素酶酶活的影响

接种量对微生物发酵过程有很大影响,以 2.4.3 优化结果为基础,分别以 3%、5%、8%、10%、12%和 15%的接种量考察其对纤维素酶酶活的影响,设接种量 8%时相对酶活为 100%,结果见图 4。

由图 4 可知,随着接种量的增大,相对酶活逐步增加,在接种量为 10%时,相对酶活达 132%,这可能是由

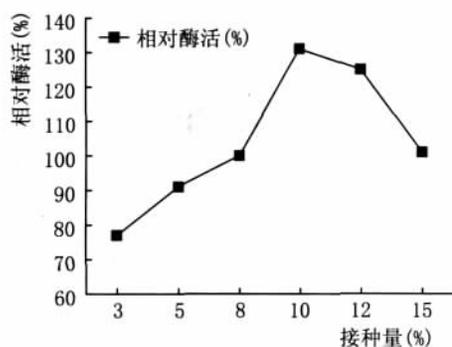


图4 接种量对黑曲霉产纤维素酶酶活的影响

于增大接种量,减少了黑曲霉发酵过程中菌体生长的延迟期,进而增加了酶活,之后随着接种量的再次增大,酶活渐渐降低。

3 结论

3.1 采用UV、DES和UV+DES 3种不同诱变方式对原生质体进行诱变。结果表明,UV+DES复合诱变效果较好,共获得28株正突变菌株;选取其中较好的6株进行

稳定性实验,结果获得了2株稳定遗传菌株,其最高酶活可高达17.8 U/mL,而出发菌株的酶活仅为9.8 U/mL,大幅度提高了诱变菌株的酶活。

3.2 通过单因素实验对黑曲霉产纤维素酶的培养基组成及摇瓶发酵工艺进行了初步探讨,发现产酶培养基最佳组成为:1.4%蛋白胨,0.2%磷酸二氢钾,0.001%硫酸亚铁,0.05%硫酸镁,5%蔗糖,pH自然;250 mL摇瓶发酵最佳工艺为:摇瓶装液量60 mL、接种量10%、29℃下200 r/min培养96 h。

参考文献:

- [1] 刘春芬,贺稚非.纤维素酶高产菌株的诱变选育[J].中国酿造,2008,(5):29-33.
- [2] 苏香萍,龚大春,曾晶,殷家红,等.纤维素酶产生菌黑曲霉的选育及其产酶条件的研究[J].酿酒科技,2009,(4):25-30.
- [3] 李兰晓,杜金华,李军训,等.CMC法糖化力法测定纤维素酶活性条件的研究[J].饲料工业,2006,27(24):49-52.
- [4] 冯培勇,张婷,王艳杰.复合诱变选育高产纤维素酶黑曲霉菌株[J].安徽农业科学,2008,36(36):15774-15775.

贵州省酿酒工业协会 2010 年会员代表大会在贵阳召开

本刊讯 贵州省酿酒工业协会 2010 年会员代表大会于 3 月 15 日在贵阳召开。出席本次大会的领导有贵州省人大副主任傅传耀、贵州省政协副主席陈海峰、老同志谢养惠、省九三学社副主委赵维娜等,参加会议的还有省内 120 家白酒企业的领导以及新闻媒体单位。

大会开始,贵州省酿酒工业协会副理事长龙超亚作了酒协的工作报告。龙超亚副理事长分别就全省酒业经济指标运行情况、行业发展宏观政策、企业改组改制、企业科技创新能力、协会工作等方面进行了详实的回顾,对目前贵州省酿酒行业的发展态势进行了分析。总体上,近年来贵州酒业仍然保持持续、健康、稳定的发展态势,产业发展环境得到进一步的改善,行业效益增加明显,产品质量得到提高,贵州酿酒工业正在继续沿着健康有序的方向发展。全省规模以上白酒企业产量从 2002 年的 10.94 万千升增至 2008 年的 18.35 万千升,销售收入从 2002 年的 26.91 亿元增至 2009 年的 138.89 亿元,实现税金从 2003 年的 7.88 亿元增至 2009 年的 30.9 亿元,实现利润从 2002 年的 6.25 亿元增至 2009 年的 66.3 亿元。此外,贵州啤酒产量从 2003 年的 12 万吨增至 2009 年的 27.54 万千升,销售收入从 2003 年的 2.47 亿元增至 2009 年的 4.64 亿元。

会上,贵州省酿酒工业协会理事长季克良作了讲话,季克良首先对酒协工作取得的成绩以及协会理事会和秘书处成立以来的工作作了肯定,同时对今后酒协的工作提出两点建议和要求:一是会员单位要全力支持省酒协工作,积极参加协会召开的会议和举办的活动,多提建议,增加交流,按时足额交纳会费;二是协会秘书处要加强自身建设,提高办事效率。

最后,贵州省经信委主任班程农对协会及其会员为贵州白酒发展所作出的突出贡献表示感谢,也对省委、省人大、省政府、省政协以及省直有关部门及其在座的有关专家,对扶持贵州酒业所付出的心血表示敬意。讲话中,班主任对贵州工业发展、贵州酒业发展的基本思路作了简要介绍。班程农主任还对酒协今后的工作提出了要求,希望酒协积极配合经信委完成“十二五”白酒产业规划,希望协会和会员单位积极配合省政府、省经信委共同打造贵州白酒三大基地(黔北基地、黔南基地、黔东基地)建设,希望协会在企业人才建设、促进加大资源整合、标准体系建设完善等方面做出更大的贡献,协会要加强对对外交流和合作。最后,班主任提出希望大家共同努力,为贵州经济发展作出更大的贡献。

会议还对贵州省酿酒工业协会的常务理事、理事和秘书处人员进行了调整,对贵州省酿酒工业协会《会费的收取和管理规定》进行了修改。(孙悟)



会议现场