

复合诱变筛选产细胞壁水解酶木霉菌株及产酶条件的优化*

李 蕤^{1,2} 骆 军² 虞 磊² 鲁润龙¹ 潘仁瑞¹

(中国科学技术大学生命科学学院 合肥 230026)¹ (合肥联合大学化学与生物工程系 合肥 230022)²

摘要: 利用复合诱变技术, 筛选到一株产几丁质酶和葡聚糖酶能力较强的绿色木霉菌株 (*Trichoderma viride*) LD-18。并对其产酶条件进行了优化, 发现在麸皮: 诱导物: 麦秸粉 = 2:2:7 的固体培养基上, 以 4g/L (NH₄)₂SO₄ 为氮源, 起始 pH8.0, 经 25℃ 培养 72h, 产生的真菌细胞壁水解酶, 用以溶解食用菌、黑曲霉等丝状菌丝体的细胞壁, 制备原生质体, 效果较优。

关键词: 复合诱变, 细胞壁水解酶, 绿色木霉, 原生质体

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0047-06

STUDY ON SCREENING FOR *TRICHODERMA VIRIDE* BY COMPLICATION MUTAGENICITY: PRODUCTION OF CYTOHYDROLIST AND CULTURE CONDITION

LI Rui^{1,2} LUO Jun YI Lei² LU Run-Long¹ PAN Ren-Rui¹

(School of Life Science University of Science and Technology of China, Hefei 230026)¹

(Department of Chemistry and Biotechnology, Hefei Union University, Hefei 230022)²

Abstract: A strain LD-18 which produced chitinase and glucanase was screened by mutagenicity method and identified

* 安徽省自然科学基金资助项目 (No. 98241515)

收稿日期: 2001-08-03, 修回日期: 2001-11-15

as *Trichoderma viride*. Effects of medium composition on producing cytohydrolist were investigated. LD-18 was cultured on complex medium in which wheat bran: inducer: straw powder is 2:2:7 as carbon source and 4g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as nitrogen source, and the culture conditions are initial pH8.0, 25°C and 72h. The protoplast formations of domestic fungus and *Aspergillus niger* prepared by the cytohydrolist is the more efficient.

Key words: Complication mutagen, Cytohydrolist, *Trichoderma viride*, Protoplast

制备原生质体中最关键的环节是选择去除细胞壁的酶系。1957年 Eddy 等人首次应用蜗牛酶制得酵母原生质体, 1958年 Emerson 用蜗牛酶加半纤维素酶制得丝状真菌原生质体。迄今为止, 国外已有数种真菌细胞壁水解酶产品, 如丹麦 Novo 公司的 Mutanase 和 Novozym 234; 英国的 Strepzyme M 和 Strepzyme RA^[1]。国内产品有 Lywallzyme, 其生产菌种主要为木霉属 (*Trichoderma* spp.) 及链霉菌属 (*Streptomyces* spp.)。

本文通过对绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 野生菌株 T6 进行复合诱变, 经筛选得到一株分解几丁质、葡聚糖能力较强的菌株 LD-18, 并对其产酶条件进行了优化。利用其产生的真菌细胞壁水解酶对几种真菌进行原生质体制备试验, 发现效果较好。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种: 绿色木霉 (*Trichoderma viride*) T6 由本实验室提供。

1.1.2 斜面培养基: PDA 配方。

1.1.3 初筛培养基 (g): 胶体几丁质 30, 微晶纤维素 2.5, 平菇细胞壁粉 10, KH_2PO_4 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, NaNO_3 1, 刚果红 1, 琼脂 20, 定容至 1L。

1.1.4 复筛培养基: 麸皮: 诱导物: 麦秸粉 = 1:1:9 (W/W, 诱导物为蚕蛹粉和平菇细胞壁), 每份共 7.5g, 加 11.5mL Mandels 营养盐液。

1.1.5 胶体几丁质的制备: 参考 Jeuniaux 的方法^[2]并做了一些改进。

1.1.6 平菇细胞壁的制备: 参考 Ayers 方法^[3]。

1.1.7 酶解液的制备: 按 1:5 (W/V) 浸提粗酶液, 量体积后经真空冷冻干燥浓缩 10 倍, 加入 0.6mol/L 的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 经 4000r/min 冷冻离心 15min 即得。

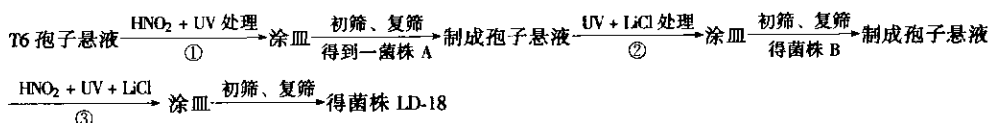
1.2 方法

1.2.1 紫外诱变: 取浓度为 10^4 个/mL 孢子悬液 5mL 于 90mm 无菌培养皿中, 使培养皿距离 15W 紫外灯管 30cm。而后打开培养皿, 并摇动, 使照射均匀, 照射时间为 250s ~ 500s。

1.2.2 亚硝酸诱变: 参考文献[4]方法, 以 HNO_2 为诱变剂, 28°C 处理 100s ~ 300s。

1.2.3 氯化锂诱变: 配制培养基时按 0.3% ~ 0.5% 加入 LiCl, 在生长过程中诱变。

1.2.4 复合诱变流程:



在第①次处理时, 亚硝酸处理剂量有 5 个: 100s、150s、200s、250s、300s; UV 处理从 250s ~ 500s, 每隔 50s 一组, 共 6 组。在第②次处理时, UV 处理时间同上; LiCl 的剂量为 0.3%、0.4%、0.5% 3 组。在第③次处理时 3 种诱变方法的剂量同上。

1.2.5 初筛：采用透明圈法。将经诱变处理后的孢子悬液以 0.2mL 涂皿，25℃下培养，选取平板水解圈直径大的进行复筛。

1.2.6 复筛：将初筛获得的菌株接种到复筛培养基中，25℃下培养 3d 后，用蒸馏水 5:1 浸提 3h 测定粗酶液中几丁质酶、β-葡聚糖酶、内切葡聚糖酶 3 种酶活力，筛选出产酶活力最高的菌株。

1.2.7 酶活力测定：几丁质酶 (EC 3.2.1.14) 活力测定：参照 Ohtakara 方法^[5]。β-葡聚糖酶 (EC 3.2.1.6) 活力测定：参照文献[1]方法，底物为 0.5% 的平菇细胞壁制备物。内切葡聚糖酶 (EC 3.2.1.4) 活力测定：参照 Mandels 方法^[6]。还原糖的测定：用 DNS 比色法^[7]测定。蛋白质浓度测定：采用 Bradford 考马斯亮兰比色法^[8]。

2 结果与讨论

2.1 菌种的诱变与筛选

对绿色木霉 T6 共进行了 3 次复合诱变和筛选。按方法 1.2.6 进行，由于丝状真菌细胞壁的主要成分 is 几丁质和葡聚糖^[4]，故我们以几丁质酶、β-葡聚糖酶、内切葡聚糖酶 3 种酶活力作为菌种筛选的标准。结果见表 1。

表 1 可见复合诱变对木霉产几丁质酶、β-葡聚糖酶、内切葡聚糖酶这 3 种酶活力分别提高了 20 倍、2.8 倍和 12 倍。同时还发现，在 3 种复合诱变处理中以亚硝酸 + 紫外线对酶活力的影响最大。

2.2 产酶条件的优化

2.2.1 碳源的选择：按 1.2.6 方法，以不同比例分别称取麸皮、诱导物、麦秸粉共 7.5g，25℃ 发酵培养 3d，测定其酶活力，结果见表 2。

由表 2 可知，采用麸皮:诱导物:麦秸粉 = 2:2:7 的这个比例，LD-18 表现出较高的产酶能力，且菌丝生长状态良好。从表中还可发现诱导物含量过多时，总酶活却降低，这可能与诱导物造成的底物抑制和吸附作用有关。

2.2.2 氮源的选择：按 1.2.6 方法，以最佳的比例 2: 2: 7 分别称取麸皮、诱导物、麦秸粉共 7.5g，加入不同氮源，25℃ 发酵培养 3d，测定其酶活力，结果见表 3。

从表 3 发现，改变营养盐中的氮源对产酶有明显的影 响。2g/L 蛋白胨、4g/L (NH₄)₂CO₃ 及 4g/L 的 (NH₄)₂SO₄ 分别对应内切葡聚糖酶、β-葡聚糖酶、几丁质酶活力最高。但若将其配制成复合氮源时，LD-18 产酶活力反而降低，这可能与多种含氮物相互作用有关。故经总体均衡后，选择 4g/L 的 (NH₄)₂SO₄ 作为其最佳氮源。

2.2.3 诱导物组成的选择：在最佳碳、氮源基础上，按 1.2.6 方法，采用平菇细胞壁和蚕蛹粉为产酶诱导物，测定其酶活力。产酶诱导物共设计 4 个比例，从图 1 可看出，

表 1 诱变对酶活力的影响

菌 种	几丁质酶 活力 (%)	β-葡聚糖 酶活力 (%)	内切葡聚糖 酶活力 (%)
T6	100	100	100
A	1268	185.3	840.5
B	1743	243.7	976.5
LD-18	2010	279.4	1213

表 2 麸皮、诱导物、麦秸粉用量对产酶的影响 (%)

麸皮:诱导物:麦秸粉	1:1:9	1:4:6	2:2:7	4:4:3	2:5:4	1:2:8	3:3:5
内切葡聚糖酶活力	63.7	57.8	100	60.9	69.5	55.6	68.9
β-葡聚糖酶	94.7	86.3	100	72.9	49.4	123.1	55.3
几丁质酶	50.2	85.1	100	55.6	48.1	44.4	82.1

表3 不同氮源对产酶的影响

氮源	用量 (g/L)	内切葡聚 糖酶 (%)	β-葡聚 糖酶 (%)	几丁质 酶 (%)
M①+ 蛋白胨	2	118	56	90
	3	105.2	57.8	79.2
	4	117.6	55.5	87.5
脲	2	97.2	37.1	54.6
	3	89.1	62.4	79.2
	4	98.5	68.9	74.5
黄豆粉	2	84.1	70	87.3
	3	112.3	61.4	99.5
	4	107.6	68.9	97.1
NH ₄ NO ₃	2	89.1	50.4	100
	3	79.5	47.6	80.9
	4	88.9	55.3	102.4
(NH ₄) SO ₄	2	87.3	95.7	100.2
	3	102.1	96.2	94.1
	4	97.4	108.6	114.1
(NH ₄) CO ₃	2	90.5	102.4	42.5
	3	72.6	97.1	71.4
	4	90.8	124.4	56.8
2g/L 脲 + 4g/L (NH ₄) CO ₃ + 4g/L (NH ₄) SO ₄		96.4	105.1	103.5
M①+ 不含任何氮源的 Mandels 氏营养盐液				

当蚕蛹粉:平菇细胞壁 = 3:2 时,更有利于总体酶活力的提高。

2.2.4 培养温度对产酶的影响:在最佳碳、氮源的基础上,按 1.2.6 方法,对最佳培养温度进行研究,分别在 20、25、30 和 35℃ 温度下培养 3d,测定其酶活力,结果表明,当培养温度为 25℃ 时的产酶效果最好,而培养温度较高时,菌丝生长旺盛,产热较多,对酶的稳定性造成影响;培养温度较低时,菌丝生长缓慢,不利于产酶。

2.2.5 培养的起始 pH 值对产酶的影响:按 1.2.6 方法,用 2mol/L 的 HCl 或 2mol/L 的 NaOH 调改良 Mandels 营养盐(氮源为 4g/L 的 (NH₄) SO₄) 的 pH 至 3 ~ 9,各取 11.5mL 加入发酵培

养基中 25℃ 培养 3d,测定其酶活力,结果见表 4。

从上表可看出,起始 pH 值在 7.0 ~ 8.0 可显著提高 LD-18 菌株的产酶能力。

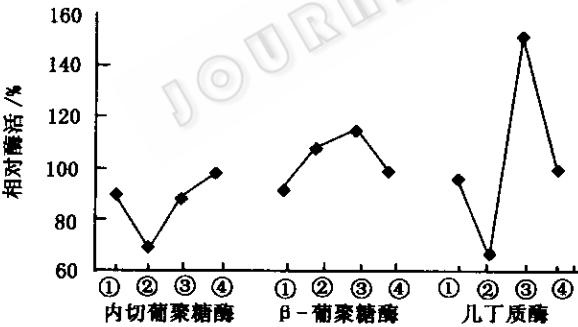


图1 诱导物组成对产酶的影响

蚕蛹粉:平菇细胞壁 (w/w)

①1:4, ②2:3, ③3:2, ④4:1

2.2.6 接种量对产酶的影响:采用最佳碳、氮源,按 1.2.6 方法,以 1、2、3、4 和 5mL 不同的接种量培养 3d,测定其酶活力,其结果表明,接种量对产酶有着明显的影响。接种量过低,菌体生长缓慢,产酶周期延长;而接种量过高,则菌体生长过快,产生的大量生物热,使曲温升高,同样不利于产酶。而以 4mL 孢子悬液(浓度 2.03×10^8 个/mL)接种时,无论在总体酶活方面,还是在菌丝生长方面,都较为理想。

2.2.7 木霉固态发酵过程:综合以上优化的产酶条件进行培养,在碳源组成为麸皮:诱

导体:麦秸粉 = 2:2:7 的固体培养基上,诱导物为蚕蛹粉:平菇细胞壁 = 3:2,以 4g/L (NH₄)₂SO₄ 为

表4 起始 pH 对产酶的影响 (%)

pH 值	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
内切葡聚糖酶	73.4	87.6	87.8	89.3	96.2	100	95.8
β-葡聚糖酶	46.4	46.7	52.1	66.2	100	39.5	
几丁质酶	74.1	85.4	88.6	89.7	100	93.6	87.2

氮源, 起始 pH8.0, 25℃ 下培养, 木霉 LD-18 的生长、产酶情况如下:

在第 1d 菌丝刚刚开始生长, 其分泌的胞外酶分解培养基, 还原糖和粗酶蛋白的含量也开始升高; 在第 2、3d, 菌丝生长旺盛, 并开始产生孢子, 其总体酶活力达到最大, 还原糖和粗酶蛋白也分别达到最大值; 第 4d 时, 绿色孢子基本覆盖了培养基表面, 酶活力、还原糖及粗酶蛋白都开始下降。但是在第 5d, 几

丁质酶和 β -葡聚糖酶, 出现第 2 个酶活高峰。由于第 2 次的酶活高峰较第 1 次低许多, 而且蛋白质含量也低, 所以我们选用木霉最佳发酵周期为 72h。

2.3 真菌细胞溶壁酶的应用效果

按菌丝 (g): 酶液 (mL) = 1:8 加入浓缩 10 倍以 0.6mol MgSO_4 为稳定剂的酶解液, 置于小三角瓶中, 在摇床上 50r/min 30℃ 振荡酶解, 每隔 30 min 取样一次, 显微镜下计原生质体个数并摄影。我们对香菇 (*Lentinula edodes*)、糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*)、金针菇 (*Flammulia velutipes*)、毛木耳 (*Auricularia polytricha*)、草菇 (*Volvariella volvacea*)、大紫蘑菇 (*Agaricus augustus*)、青霉 (*Penicillium* sp.)、绿色木霉 (*Trichoderma*

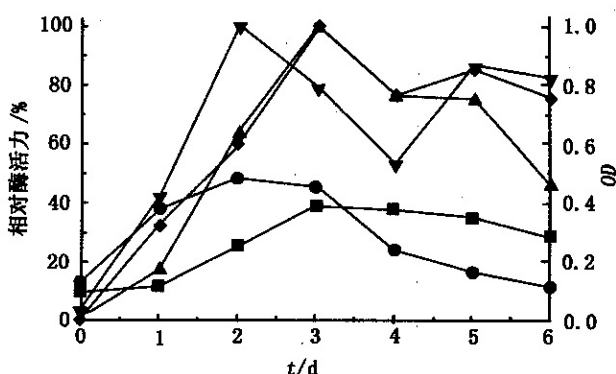


图 2 LD-18 发酵过程

—■—蛋白质, —●—还原糖, —▲—内切葡聚糖酶,
—▼—葡聚糖酶, —◆—几丁质酶

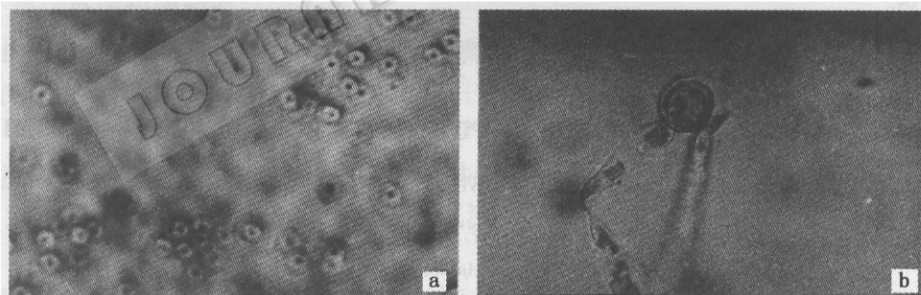


图 3 香菇和黑曲霉的原生质体

a 香菇原生质体 (400x), b 黑曲霉原生质体 (400x)

viride)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 共计 9 种真菌进行原生质体制备试验, 结果见图 3。试验表明, 原生质体制备效果以糙皮侧耳、香菇及黑曲霉最好, 酶解 4h 后均能获得 10^6 个/mL 以上的原生质体, 且形成的原生质体典型, 质膜完整发亮, 生成量多。其余 6 株菌也能产生典型的原生质体, 但生成量不多。

3 结论

通过对绿色木霉 T6 进行复合诱变获得一株分解几丁质、葡聚糖能力较强的菌株 LD-18, 在经过优化后的产酶条件下培养, 得到的酶液经 10 倍浓缩制成真菌细胞壁水解酶。它对多种真菌尤其是糙皮侧耳、香菇和黑曲霉效果较好。这说明该酶是一种作用

范围广, 有很大应用前景的工具酶。

参 考 文 献

- [1] 陈 兵, 林开江. 生物技术, 1995, 5 (4): 16 ~ 19.
- [2] Jeuniaux C. Methods Enzymol, 1966, 8: 644 ~ 650.
- [3] Ayers A R, Ebel J, Valent B, Albersheim P, *et al.* Plant physiol. 1976, 57: 760 ~ 765.
- [4] 杨新美. 食用菌研究法 (第一版). 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [5] Ohtakara A, Mitosutomi M, Uchida Y. J Ferment Technol, 1979, 57 (3): 169 ~ 177.
- [6] Mandels M, Weber J. Adv chm ser. 1969, 95: 391 ~ 414.
- [7] Miller G L. Chem, 1959, 31 (3): 426 ~ 428.
- [8] Bradford M M. Anal Biochem, 1976, 72: 248 ~ 254.