

## 曲霉与木霉属间融合重组单倍体 ATH-1376 的动力学杂种优势

艾云灿<sup>1</sup> 孟繁梅<sup>1</sup> 许耀才<sup>2</sup>

(中山大学生命科学院 广州 510275)<sup>1</sup>

(华中农业大学生命科学院 武汉 430070)<sup>2</sup>

**摘 要** 比较研究了重组单倍体 ATH-1376 与其双亲本 *Aspergillus niger* AMS11, *Trichoderma reesei* QM9414 在菌丝生长、纤维素酶系合成和发酵原液协同降解滤纸纤维素积累还原糖等方面的动力学特征。结果表明重组体的菌丝比生长速率与纤维素酶系合成速率均具有显著的超双亲优势,且重组体中这两种速率负相关的程度要比双亲本中的情形弱得多。双亲本在几个不同组合方式下的发酵原液降解滤纸纤维素积累还原糖的生成量差异较大,混合制曲的效果居于双亲本独立发酵的效果之间,远未达到双亲的理论加和值,反映出物种间菌体生长的拮抗作用。而二次制曲的效果则最佳,其中又以双亲本发酵滤液按相同比较混合(1:1)后的处理还原糖生成量最大。重组体则具备了极显著的杂种优势,在所试验的不同酶解时间内,它所积累还原糖量可达到双亲本在相应最佳处理情形下最大产量的 1.19~2.26 倍。显示出所构建的这两属远缘杂种优势工程菌株具有克服常规混合制曲或二次制曲生产局限性的潜力。

**关键词** 纤维素酶, 杂种优势, 动力学, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*

曲霉(*Aspergillus* sp.)和木霉(*Trichoderma* sp.)是丝状真菌中两个相当远缘的典型代表属,在包括产纤维素酶系在内的许多发酵工业生产性状方面存在优势互补性。为了克服二次制曲高成本消耗,我们虽曾尝试混合制曲,但由于木霉产生木霉毒素的拮抗作用强烈抑制曲霉生长,结果未能如愿。降低产酶或菌体培养成本是拓展纤维素酶在农林废弃物转化方面应用的关键环节之一。因此实现属间远缘融合重组获得其杂种优势工程菌株,以克服工业生产上混合制曲或二次制曲的诸多局限性,就成为人们的宿愿。然而迄今国外只见有 Kirimura 等<sup>[1]</sup>用常规融合方法获得了 *A. niger* × *T. viride* 不稳定的异核体,能够短暂集中双亲产纤维素酶和产柠檬酸等杂合性状,而第二代又分离。Tahoun 等用电融合方法也只获得了极不稳定的杂合二倍体,具备超双亲的纤维素酶活性,但第二代也分离<sup>[2]</sup>。要获得稳定杂种优势的首要基础在于创造出类型齐全的基因型和表型广泛变异。艾云灿等针对常规途径各个环节的缺陷,系统地改良了融合育种方法<sup>[3-5]</sup>,从而实现了 *A. niger* AMS11 × *T. reesei* QM9414 属间远缘融合真正重组,在变异类型齐全的子代群

本工作受到国家自然科学基金、中国博士后科学基金、国际科学基金(IFS)、广东省自然科学基金、中国科学院纤维素化学开放实验室科学基金及中山大学测试科学基金资助。

本文于 1996 年 9 月 9 日收到。

体中也筛选获得了包括 ATH-1376 在内的若干具有纤维素酶系杂种优势的稳定重组单倍体<sup>[3]</sup>。特别是历经 5 年自然传种接代分离过程后,仍然能够证明部分重组单倍体中远缘基因组间遗传和表达上的相容性及杂种优势的分子基础<sup>[6]</sup>。本文着重报道其中一个优秀重组单倍体 ATH-1376 菌株在菌丝生长、纤维素酶系合成及发酵原液降解纤维素积累还原糖等动力学方面的表观杂种优势特征。

## 1 材料方法

### 1.1 菌株

亲株 *A. niger* AMS11 由赵学慧教授选育<sup>[7]</sup>,亲株 *T. reesei* QM9414 由美国选育,中国科学院微生物研究所菌种保藏中心提供。融合重组单倍体 ATH-1376 由艾云灿构建,并历经 5 年自然传种接代分离过程后未发生表型和基因型变异<sup>[6]</sup>。

### 1.2 培养基和培养方法

在 Mandels 营养液<sup>[8]</sup>中加入 0.5% 自制稻草纤维素粉或 0.5% 乳糖作碳源的培养基中(250ml 三角瓶盛 50ml)接种孢子,转速 180r/min,30℃ 下,培养 96h。

### 1.3 菌丝生长测定

可溶性胞外蛋白质用 Lowry 法<sup>[9]</sup>测定。菌丝蛋白测定为以 0.5% 乳糖碳源培养的菌丝体洗涤悬浮后,加入 1mol/L NaOH 于 100℃ 煮沸 5min,滤液经 3000g 离心 10min,在 280nm 处测定上清液的光吸收,以牛血清白蛋白为标准,求出蛋白含量。菌丝干重测定为培养液离心后所得沉淀在 80℃ 烘干至恒重称重。

定义:比生长速率  $\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} (h^{-1})$ ,即每 mg 菌体蛋白每小时所增加的蛋白含量(mg)。文中使用的是全程的平均比生长速率<sup>[10]</sup>。世代倍增时间  $g = \ln 2 / \mu = 0.693 / \mu$ <sup>[11]</sup>。自定义纤维素酶合成速率(以总纤维素酶 FPase 活性计)  $\omega = dFP/dx (u/mg)$ ,即每合成单位菌体蛋白(mg)所能增加的纤维素酶活性(u)。

### 1.4 纤维素酶系活性及还原糖量测定

参照标准方法<sup>[12]</sup>进行。以 0.5% 纤维素粉为碳源培养,滤液经 4500r/min 离心 10min,上清液为原酶液。测定滤纸酶活(FPase)、羧甲基纤维素酶活(CMCase)和  $\beta$ -葡萄糖苷酶活( $\beta$ GLase)。用适当稀释的酶液加入相应底物后在 50℃ 反应 30min,以 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法显色后,在 540nm 处测定光吸收。以葡萄糖为标准,定义 1 个酶活力单位(u)为:在上述条件下,每毫升酶液每分钟所产生的微摩尔葡萄糖( $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{ml}$ )。发酵原酶液降解滤纸纤维素产生的总还原糖量也以 DNS 法测定。

## 2 结果分析

### 2.1 ATH-1376 与双亲株 AMS11, QM9414 的菌丝生长动力学比较

表 1 给出了重组子 ATH-1376 与双亲株 AMS11、QM9414 菌丝生长的动力学特征,可以看出亲本 AMS11 比亲本 QM9414 生长势要快得多,而 ATH-1376 又较亲本 AMS11 还快,这表明重组子 ATH-1376 的生长势很旺。

### 2.2 ATH-1376 与双亲株 AMS11, QM9414 纤维素酶系合成进程比较

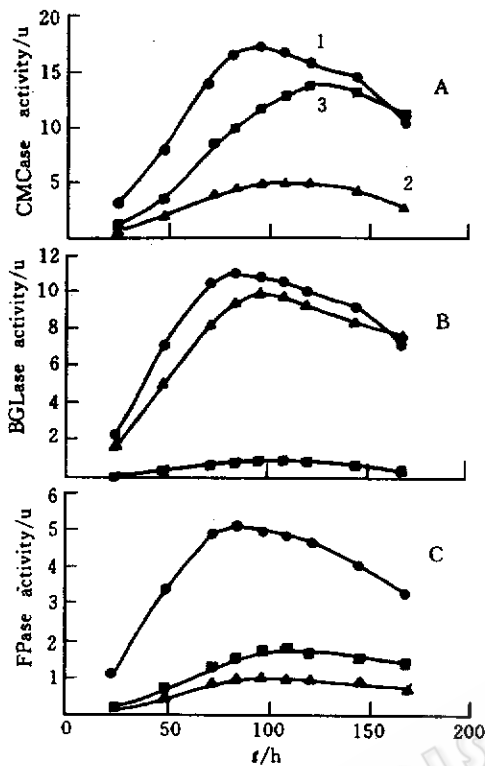


图1 纤维素酶系合成进程  
Fig.1 The course of cellulases production  
A. CMCase, B. BGLase, C. FPase; 1. ATH-1376, 2. AMS11, 3. QM9414

2.3 重组体 ATH-1376 和双亲本的菌体比生长速率与纤维素酶系合成速率的关联

图2显示总纤维素酶系合成速率的增长与菌体比生长速率的增加呈负相关,这与前人研究的一般规律相吻合。但相对于双亲本而言,重组子中这种负相关性的程度较低。

2.4 ATH-1376 与双亲株 AMS11, QM9414 发酵原滤液对滤纸纤维素协同降解的动力学比较

表3给出了双亲本 AMS11, QM9414 的几个不同组合方式,即双亲

表1 菌丝比生长速率( $\mu$ )、世代倍增时间( $g$ )、初始产孢时间( $t$ )比较

Strains	$\mu/h^{-1}$	$g/h$	$t/d$
AMS 11	0.378	1.834	>4
QM9414	0.305	2.276	>7
ATH-1376	0.451	1.537	3~4

图1显示出ATH-1376在FPase、CM-Case、 $\beta$ GLase的酶比活性(仅就每ml发酵原液相对而言)和合成速率上,都具有显著超双亲优势。这一结果可与表1结果相呼应,即相对于双亲来看,重组体的菌体生长势强而纤维素酶合成能力也强。表2数据进一步印证这种趋势。

表2 重组体 ATH-1376 菌体蛋白生长量与总纤维素酶系活性的正相关联

Table 2 The positive correlationship between mycelia growth and enzyme activity					
$t/h$	24	48	72	96	120
Pr./mg	5.20	13.73	18.43	27.32	28.18
FPase/u	3.78	4.91	5.05	5.61	5.73

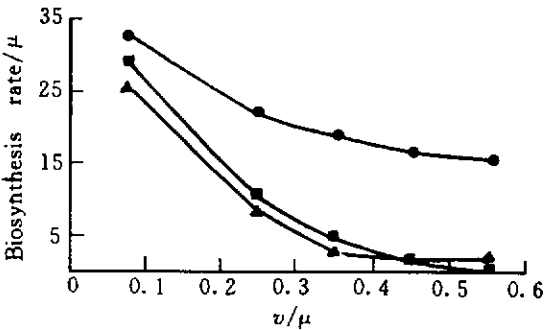


图2 菌体比生长速率与纤维素酶系合成速率的负关联  
Fig.2 The negative correlationship between the specific growth rate of mycelia and the cellulase biosynthesis rate

●ATH-1376, ▲AMS11, ■QM9414

本各自单独发酵(Ⅰ)及其单独发酵液再混合(Ⅱ)(相当于二次制曲)和双亲本混合接种后共同发酵(Ⅲ)(相当于混合制曲)等3种情形下的发酵原滤液降解滤纸纤维素产生还原糖量的比较结果。从中可见,混合制曲(Ⅲ)的效果居于双亲本独立发酵(Ⅰ)效果之间,远未达到双亲的理论加和值。这反映出物种间菌体生长的拮抗作用。而二次制曲(Ⅱ)的效果则显著优于混合制曲(Ⅲ)和双亲本单独发酵(Ⅰ)的效果,其中又以双亲本发酵滤液按相同比例混合(1:1)后的处理所产生的还原糖量最大。这可能是由于分步培养解除了混合培养中所发生的拮抗作用,而双亲单独发酵滤液再混合又能集中双亲协同优势。重组体ATH-1376则具备了极显著的杂种优势,在所试验的不同酶解时间内,它所积累还原糖量可达到上述相应最佳处理情形下最大产量的1.19~2.26倍。表3结果似乎是因为ATH-1376同时具备了强生长势(表1,2)和强纤维素酶系合成能力(图1)等多种杂种优势特征后的必然结果。

表3 不同酶解时间和不同协同处理情形下所产生的还原糖量

Table 3 The amounts of reducing-sugar produced after hydrolysis of filter paper for different time by different fermentation filtrates

Enzymic hydrolysis time/h	1	2	3	4	5	6
I. Fermentation filtrate of single parent strain						
AMS11	11.12	12.92	14.52	15.01	15.10	16.70
QM9414	19.66	22.59	22.58	23.39	24.10	24.36
II. Mixture of fermentation filtrates from two parental strains with different ratio (v:v)						
AMS11 + QM9414 (1:1)	24.31	42.60	51.8	56.50	64.63	70.78
AMS11 + QM9414 (1:2)	21.17	37.10	44.48	49.21	56.28	61.64
AMS11 + QM9414 (2:1)	21.71	38.04	45.62	50.46	57.22	63.21
III. Filtrate from the mixed culture fermentation of two parental strains						
(AMS11 & QM9414)	13.18	15.41	16.04	16.21	16.43	16.50
IV. Fermentation filtrate of recombinant strain ATH-1376						
	54.06	57.30	72.44	78.51	84.70	84.82
$\Delta \frac{\text{ATH-1376}}{\text{Max(AMS11 + QM9414)}}$	2.26	1.35	1.42	1.39	1.31	1.19

### 3 讨 论

国内外学者生理学研究都曾观察到,在一定比生产速率范围内,纤维素酶合成速率与菌丝生长比速率呈负相关,即在分批培养条件下,纤维素酶合成量的增加是以抑制菌丝生长为代价的<sup>[11]</sup>。本项研究则表明相对于双亲本而言,重组子中的这种负相关性程度要低得多。优秀重组子ATH-1376具备了超双亲的菌体比生长速率(表1),同时还具有了较强的纤维素酶系合成速率(图1)等多种优势因而表现出在降解滤纸纤维素积累还原糖量方面的显著超双亲优势(表3)。由这些多方面正向关联的杂种优势看来,通过构建远缘杂种,能够部分改善在普通菌种中所存在的那种较强的菌体比生长速率与产酶速率负相关性局限。这个特点有利于以降低工业生产成本为目的的遗传工程育种实践应用。

## 参 考 文 献

- [1] Kirimura K, Itchiya Y. *Agric Biol Chem*, 1990, 54(5):1281~1283.
- [2] Tahou M K, Ibrahim A A. Seventeenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Program and Abstracts, Poster 94, Colorado, USA, May, 1995, pp. 7~11.
- [3] 艾云灿. 见:中国遗传学会微生物遗传专业委员会编,中国微生物遗传学学术讨论会论文摘要集,武汉:武汉大学出版社,1994, p. 1.
- [4] Ai Y C, Zhao X H, Yu J L. *Chin J Biotechnol*, 1994, 10(1):61~66.
- [5] Ai Y C, Meng F M, Gao P J *et al.* *Chin J Biotechnol*, 1996, 12(1):28~32.
- [6] 艾云灿,孟繁梅. 中国科协首届青年学术年会(湖北)优秀论文集(武汉, 1992, 12), 湖北科学技术委员会编, 武汉:武汉大学出版社, 1994, pp. 295~301.
- [7] 艾云灿. 山东大学博士后研究论文集, 济南, 1995, pp. 25~33.
- [8] 赵学慧, 尹麦生. 国家自然科学基金资助项目研究成果汇编(二), 国家自然科学基金会综合局编, 长春:吉林大学出版社, 1988, p. 60.
- [9] Mandels M. *Annual Report on Fermentation Processes*, 1985, 5:35~78.
- [10] Lowr O H. *J Biol Chem*, 1951, 193:265~275.
- [11] Ma D B, Gao P J, Wang Z N. *Enzyme Microb Technol*, 1990, 12:631~635.
- [12] 多伊尔 HW 著, 郭杰炎等译, 薛应龙等校. 细菌的新陈代谢(第二版), 北京:科学出版社, 1983, pp. 66~71.
- [13] Ghose T K. *Pure Appl Chem*, 1987, 59:257~268.

## Hybridization Dominance of Kinetics in Recombinant ATH-1376 Obtained via Protoplasts Fusion Between *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*

Ai Yuncan<sup>1</sup> Meng Fanmei<sup>1</sup> Xu Yaocai<sup>2</sup>

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)<sup>1</sup>

(School of Life Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)<sup>2</sup>

**Abstract** The comparisons of the kinetics of mycelia growth, cellulase biosynthesis and the degradation of filter paper to accumulate reducing-sugar by using the filtrates of culture were carried out among the recombinant strain ATH-1376 and its two parents, *Aspergillus niger* AMS11 and *Trichoderma reesei* QM9414. The results showed both the specific growth rate and the cellulase biosynthesis rate of recombinant were extremely dominant over those of two parents. In addition, the negative correlationship between the specific growth rate and the cellulase biosynthesis rate of recombinant ATH-1376 was much lower than those of its parents. In terms of the amount of reducing-sugar accumulated from the hydrolysis of filter paper by culture-filtrates, there were great differences among three different treatments, i. e. single parental strain fermentation, mixture of fermentation filtrates from two parental strains and mixed culture of two parental strains. Out of which, the second approach was the best one of accumulating reducing-sugar. Within the tested varied enzymatic times, the reducing-sugar amounts produced by the recombinant were 1.19 up to 2.26 times as much as those maximum amounts, which were produced parallelly by the mixture of filtrates (1:1) from the single fermentation of two parental strains. These results suggested that constructing the engineered strains with the hybridization dominance of these two typical genus of far-heredity could be the effective ways to overcome the great deficiencies of routine mixed culture, single strain fermentation and double fed-batch fermentations.

**Key words** Cellulases, hybridization dominance, kinetics, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*