

利用原生质体融合技术提高黑曲霉产酶活力的研究

郝 勃 阎淳泰 陈华癸

(华中农业大学微生物系, 武汉 430070)

摘要 以黑曲霉 N343 和 UV-11 为出发株, 分别经亚硝酸诱变处理, 再以制霉菌素浓缩处理, 从中筛得 3 株维生素缺陷型和 1 株氨基酸缺陷型的突变株。选取来自 N343 的突变株 NB₃(B₁⁻, PP⁻, FA⁻)和来自 UV-11 的突变株 UB1(Pro⁻)为融合亲本, 在研究其原生质体释放和再生条件的基础上, 以 PEG 诱导进行了原生质体融合。用直接选择法检出 98 个融合子, 经过筛选得到两株稳定的融合子: FNU32 和 FNU38。它们除了在形态、培养特征等方面具有明显杂种性能以外, 都能将两个亲本各自出发株的酶活性(高活力的纤维素酶或淀粉糖化酶)囊括于一体, 因而大大提高了菌株在诸如制糖与粗饲料精制等方面的应用价值。

关键词 黑曲霉, 营养缺陷型, 原生质体融合, 纤维素酶, 淀粉糖化酶

自 1974 年 Ferenczy 报道^[1]以离心法诱导白地霉 (*Geotrichum candidum*) 营养缺陷型突变株的原生质体融合以来, 国内外陆续报道^[2]了一些在其它丝状真菌应用原生质体融合技术的研究。在我国, 以米曲霉为材料开展的原生质体融合的研究较为多见^[3~5], 在改良酱油酿造的米曲霉菌种方面作了大量有关的研究。

作者从野生黑曲霉筛到一株纤维素酶活力很高的菌株 F27^[6], 并成功地将它应用于酱油酿造, 与米曲霉 3042 混合制曲, 对提高酱油原料蛋白质利用率有显著的效果。随后在研究薯干淀粉糖化时, 发现将黑曲霉 UV-11 与黑曲霉 F27 的衍生菌株 N343 制成混合曲, 其糖化效率明显优于由 UV-11 制成的单一曲^[7]。这表明欲提高薯干等农副产品的糖化效果, 必须要有一株酶系丰富、活力高和比例适当的新型菌株。为此, 作者采用原生质体融合技术并且获得了这一类新型菌株。

1 材料和方法

1.1 菌种

黑曲霉 (*Aspergillus niger*) N343 由华中农业大学微生物系发酵工程室提供, 黑曲霉 UV-11 购自中国科学院微生物研究所。

1.2 培养基

基本培养基 (MM) 为察氏培养基, 如加 0.2% 酵母膏则为补充培养基 (SM)。完全培养基 (CM) 为米曲汁培养基。AM-1 为菌丝体制备用培养基^[8]。PD、PM 和 YM 分别为土豆浸出汁培养基、蛋白胨培养基 (蛋白胨 0.6%, pH7.0) 和酵母浸膏培养基 (酵母膏 0.6%, pH7.0)。

1.3 试剂

效价为 10000u/ml 制霉菌素, 由 70%~

75%乙醇溶解口服片配制成。PB试剂,为1/15 mol/L 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 加0.6mol/L 的 NaCl 配成, pH5.0。PBA试剂,由0.2mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 加0.4mol/L NH_4Cl 配成。20%PEG-6000,以pH7.5的PBA试剂溶解,另补加0.01 mol/L CaCl_2 和0.05mol/L 甘氨酸。工具酶为蜗牛酶(购自中国科学院生物物理研究所)、溶菌酶(SERVA, N.Y., USA)和纤维素酶(日本, ONOZUKA, 12-10型)按不同比例混合后,以PB或PBA试剂溶解,最终pH值为6.0。

1.4 营养缺陷型突变株的获得

1.4.1 原养型株诱变处理:按照常规方法[9]选择致死率为95%以上的处理时间。

1.4.2 浓缩处理:诱变处理后的分生孢子悬液倒入CM平板上28℃培养至下一代孢子长出。然后按文献[9]的方法以制霉菌素进行浓缩处理。

1.4.3 营养缺陷型突变株的检出与鉴定,均按常规方法[9]进行。

1.4.4 原养型株等的固体曲酶活力测定:淀粉糖化酶按照DNS比色法^[10]测定活力;纤维素酶分别以DNS比色法^[11]测定 C_1 酶活和 C_x 酶活。

1.5 营养缺陷型突变株的原生质体的制备

参照文献[8]的方法。纯化原生质体以无菌的双层高级镜头纸(广州耀华仪器用品厂)过滤酶解液,然后以500r/min离心沉淀原生质体。

1.6 原生质体融合处理

等量混和两亲本纯化原生质体各 2.0×10^6 个以上,加入PEG助融,振荡均匀后置28℃处理20min,以适量冷的PBA试剂(pH7.0)中止融合。趁冷离心(1000r/min, 5min)洗涤一次。经稀释后,取 1.0×10^4 个/ml以上稀释液涂布于高渗MM上,取 $10^2 \sim 10^3$ 个/ml稀释液涂布于高渗SM上。

融合频率(Ff):

在MM上出现菌落数 × 相应稀释倍数
在SM上出现菌落数 × 相应稀释倍数

1.7 融合子的检出与鉴定

综合文献[12, 13]的方法进行。

2 结果和讨论

2.1 营养缺陷型突变株的获得

从菌株N343筛到3株维生素缺陷型突变株,编号NB1(B_1^- , PP^-), NB2(B_2^- , FA^-)和NB3(B_1^- , PP^- , FA^-);从菌株UV-11筛到1株氨基酸缺陷型突变株,编号UB1(Pro^-)。

以上突变株的显微形态和培养特征均与各自的原养型菌株基本相同,但它们的产酶活力均比相应的原养型株明显下降。例如,突变株UB1的淀粉糖化酶活力仅为UV-11的50%,突变株NB3的纤维素酶活力仅为N343的45%(C_1 酶)和35%(C_x 酶)。

回复突变率的测定结果还表明,以上突变株均低于 10^{-6} 水平,故将它们作为融合亲本不会干扰以直接法检出融合子的可靠性。

2.2 原生质体制备和再生的适宜条件

以突变株UB1和NB3为材料,比较了不同的培养方法、菌龄、工具酶配比和渗透压等因素对原生质体制备和再生的影响,以找出最适宜的条件。

2.2.1 培养方法对原生质体制备的影响:选用6种菌丝体生长培养基进行摇瓶培养,结果表明,无论是菌株UB1或NB3,生长在CM与AM-1两种培养基中的菌丝体,经溶菌后,原生质体的释放量都最高;如果将CM改成固体CM并在其平板上放一块无菌玻璃纸进行培养,则效果比CM摇瓶培养更佳(表1)。并且玻璃纸培养法在随后的操作中具有简便和快速的优点。

表1 菌丝体培养方法对原生质体释放的影响*

菌株		NB3	UB1
播	PD	$<10^4$	5.0×10^4
	SM	2.0×10^4	1.0×10^5
瓶	PM	$<10^4$	$<10^4$
	YM	$<10^4$	$<10^4$
培	AM-I	2.0×10^4	3.0×10^5
	CM	3.2×10^4	4.5×10^5
CM玻璃纸培养		1.6×10^5	6.6×10^5

* 表中为镜检的每ml原生质体数

2.2.2 菌丝体的菌龄对原生质体释放和再生

的影响:以突变株 UB1 为材料,用玻璃纸培养法,在 12~24h 之间每 2h 取一块生长的菌丝体进行酶解。结果表明,菌龄 14~16h 的菌丝体,酶解 3h 释放的原生质体量最高,可达 1.1×10^6 个/ml,这些原生质体在 CM 上再生率为 54.4%~59.2%。

生长 16h 以后的菌丝体,随着菌龄延长,在同样的酶解时间内,原生质体释放量有逐渐下降的趋势,但其再生率则变化不大。

2.2.3 工具酶对原生质体释放的影响:将纤维素酶、蜗牛酶和溶菌酶以不同比例混和进行比较,结果表明,它们分别为 0.8%、0.4%和 0.2% 时,两个突变株(UB1 和 NB3)的原生质体释放量均为最高(表 2)。

表 2 工具酶的配比对原生质体释放量(个/ml)的影响

突变株	A*	B	C	D	E
NB3	$<10^4$	$<10^4$	4.0×10^4	3.5×10^4	5.0×10^4
UB1	5.0×10^4	1.0×10^4	8.0×10^5	1.2×10^6	7.4×10^5

* A=1.0%纤维素酶+0.5%溶菌酶;B=1.0%蜗牛酶+0.5%溶菌酶;C=1.0%纤维素酶+1.0%蜗牛酶;D=1.0%纤维素酶+0.5%蜗牛酶+0.25%溶菌酶;E=0.8%纤维素酶+0.4%蜗牛酶+0.2%溶菌酶

结果还表明,酶解温度以 31~34℃ 最合适。当温度升至 37~40℃ 则明显不利于原生质体释放。酶解时间在适温下以 2~3h 为宜。

2.2.4 稳定剂对原生质体释放和保存的影响:结果表明,突变株 NB3 和 UB1 的原生质体对半高渗溶液(如 0.3mol/L NaCl)和高渗有机质溶液(如 0.6mol/L 蔗糖)都比较敏感,即它们在上述溶液中,分别在 20~60min 内就会破裂。但在高渗无机盐溶液中这些原生质体较为稳定,其中尤以在 pH6.0 的 PBA 试剂中最好。在此试剂中,NB3 和 UB1 的原生质体释放量分别可达 2.5×10^5 个/ml 和 9.0×10^5 个/ml,而且将它们保存于 4℃ 中,7~8h 内不会破裂。

2.3 原生质体融合和融合子的性状

2.3.1 融合处理时间与融合频率(Ff)的关系:融合处理时间对融合频率有明显的影响,表 3 显示,15~20min 处理时间最为合适。如果继

续延长时间,融合频率会迅速下降。这可能与 PEG 对原生质体的毒性和原生质体对有机质稳定剂的敏感性有关。

表 3 融合处理时间(t)与融合频率(Ff)的关系

t/min	5	10	15	20	25	30
Ff $\times 10^{-3}$	1.10	3.73	4.98	4.46	2.32	1.85

2.3.2 融合子的稳定性:以直接选择法从 MM 平板上检出融合子 98 株。其中有 50 株分生孢子颜色与菌株 UV-11 相似,呈深褐色;另外 48 株分生孢子颜色与菌株 N343 的相似,呈黑色。但前 50 株融合子经传代 2~3 代后,其中 29 株的菌落出现镶嵌黑色与褐色的分生孢子,这表明是异核体融合子出现的分离现象。其余融合子在 MM 或 CM 平板上继续传代达 10 次,性状都稳定。

表 4 融合子 FNU32 和 FNU38 的酶活特征

酶活力*	出发菌株		融合子	
	N343	UV-11	FNU32	FNU38
C _L 酶	108.4	28.5	102.1	93.7
C _A 酶	1051.0	365.2	872.5	1122.0
淀粉糖化酶	835.4	7938.0	6664.0	5468.0

* 酶活力单位: C_L 酶与 C_A 酶为 mg 葡萄糖/g(干曲)·h; 淀粉糖化酶为 mg 葡萄糖/g(干曲)·min

2.3.3 融合子的酶系特征:从以上性状稳定的融合子中挑出融合子 FNU32 和 FNU38,发现它们所含的高活力的酶系均为淀粉糖化酶和纤维素酶(表 4),这分别是菌株 UV-11 和 N343 的酶系特征。说明通过融合后所得到的这两个融合子都同时包含双亲的基因组,因此将两个出发株具有的优良性能都分别囊括于一体。

参 考 文 献

- [1] Ferenczy L, Kevei F, Zsolt J. Nature, 1974, 248: 793.
- [2] 辛明秀, 马玉娥. 微生物学通报, 1995, 22(6): 365~370.
- [3] 邢来君, 张 军, 孙 光, 等. 真菌学报, 1987, 6(4): 242~247.
- [4] 邢来君, 温廷益, 罗会文, 等. 真菌学报, 1989, 8(3): 227~232.
- [5] 辛明秀, 蒋亚平. 微生物学通报, 1994, 21(3): 143~147.
- [6] 阎淳泰. 中国调味品, 1985, 11: 26~31.

- [7] 郝 勃, 宋士良, 邓岑华. 中国调味品, 1987, 3: 11~13.
- [8] 曹军卫. 武汉大学学报(自然), 1984, 4: 95~102.
- [9] 《微生物诱变育种》编写组. 微生物诱变育种. 北京: 科学出版社, 1973.
- [10] 阎淳泰, 朱火堂. 酿造学实验指导. 华中农业大学, 1987.
- [11] 齐义鹏. 纤维素酶及其应用. 成都: 四川人民出版社, 1986.
- [12] 牛岛重臣. 日本酿造协会会誌, 1984, 79(10): 721~723.
- [13] 梁平彦, 刘宏迪, 陈开英, 等. 遗传学报, 1981, 8(4): 287~293.

STUDY ON IMPROVING THE COMPONENT AND ACTIVITIES OF ENZYMES EXCRETED BY *ASPERGILLUS NIGER* BY MEANS OF PROTOPLAST FUSION

Hao Bo Yan Chuntai Chen Huakui

(Department of Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070)

Abstract The spores of two prototrophic strains of *Aspergillus niger* (N343 and UV-11) were treated with sodium nitrite as mutagenic agent, then transferred on Koji medium (CM) for growth of viable spores and their progeny. The progenic spores were concentrated in presence of nystatin. As the result, 3 auxotrophic mutants (NB1, NB2, NB3) from N343 about vitamin and 1 auxotrophic mutant (UB1, Pro⁻) from UV-11 were gained. Among them, Mutant NB3 (Thi⁻, PP⁻, FA⁻) and UB1 were selected as the fusion parents and fused by help of PEG after the study on factors affecting the preparation and regeneration of their protoplasts. Among 98 fusants which were collected directly from mineral medium, FNU32 and FNU38 were determined as the stable hybrid in gross morphology as well as high strengths of both cellulase and amylo-glucosidase activities.

Key words *Aspergillus niger*, auxotroph, protoplast fusion, cellulase, amylo-glucosidase