

利用纤维素酶酶解粗饲料的研究

第四报：纤维素酶产生菌激光诱变育种

任守让 赵贵彬 王瑞霞

(吉林省农业科学院土肥所)

当前,纤维素酶在应用上要解决的主要问题之一是要获得活力高的纤维素酶产生菌菌种。国内外研究工作者利用诱变的方法获得了高酶活的菌株。美国陆军 Natick 实验室的 Qm9419 与原野生菌株 Qm 6 a 比较,酶活提高 4 倍;日本外山等诱变选育出高活力的黑曲霉 T₅; 在国内中国科学院上海植生所采用物理化学诱变因素结合最后以高能电子处理获得了二株高酶活菌株 EA₃-867 和 N₂-78, 比其出发菌株分别提高酶活一倍和数倍。四川省生物所采用紫外线和亚硝酸复合处理,亦获得了比出发菌株酶活提高 3~5 倍的绿色木霉变异株(“408-2”)。此外西北水保所采用 r-射线、甲基磺酸乙酯和 NTG 反复处理,选得比出发菌株酶活高两倍以上变异菌株(9023)。此外,亦有用钴⁶⁰快中子等物理因素提高酶活的报导。

我们试用激光进行纤维素酶产生菌的诱变育种,结果获得了一批纤维素酶活比出发菌株高的变异株。其中典型代表是变异株“L₂-26”,其纤维素酶活(滤纸糖酶活与 CMC 酶活),比出发菌株 323.1 提高 2.7 倍和 2.5 倍。同时某些遗传性状如菌落形态、水溶性色素、分生孢子产生的时间等均发生了明显变化。

本文报导了我们的实验经过和结果。

材 料 和 方 法

(一) 出发菌株:

木霉 323.1, 是由野生菌株“3236”经 NTG 诱变得到。保存于马铃薯葡萄糖琼脂斜面上, 试验菌龄 7 天。

(二) 诱变剂与剂量:

采用波长为 1.06 微米的钕铝石榴石激光器, 光斑直径为 5 毫米, 处理剂量以输入电压为 1100V, 辐照能量(即剂量)以 44.16、110.40 及 184.00 焦耳为主。

(三) 试验方法:

(1) 孢子悬液制备: 取在马铃薯葡萄糖琼脂斜面上培养 7 天的分生孢子少许, 放入盛

激光处理承中国科学院长春光机所张彩霞、高永楣同志协助, 特此致谢。

有玻璃珠的灭菌生理食盐水(0.85%氯化钠)的三角瓶中,充分振荡,制成孢子悬液。血球计数,并调正其孢子密度至 10^5-6 /毫升左右。

(2)辐照处理:用卡介苗注射器取上述孢子悬液0.2毫升,注入边长为5毫米特制方形小玻管中(灭菌)。辐照时再将小玻管固定于具有分度为5毫米刻度的小木板上,立于激光管口前10厘米处,按上述剂量脉冲辐照。

(3)平板分离:将辐照处理的孢子悬液稀释一倍,在加有去氧胆酸钠(0.1%)的马铃薯葡萄糖琼脂平板上进行表面接种。保温培养,菌落出现并有孢子形成后,挑取并接种全部菌落于斜面上,保存待测纤维素酶活。为了统计存活率和致死率,另取一组辐照处理的孢子悬液,定量稀释后,平板接种计算菌数,算出存活率和致死率。

(4)纤维素酶活测定:用麦麸固体曲(每瓶麦麸1克,水5毫升)的浸提液(20倍)为酶液。DNS法测定以滤纸、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)及玉米秸粉为底物的还原糖。滤纸崩溃活力(FDP)用新华1号滤纸片(1×1厘米)静置测定。

结 果

(一)辐照量与孢子存活率和致死率:

为了选择适宜的辐照能量,先后试验了次数不同辐照能量与孢子存活率和致死率的关系。第一次测试结果见表1。

表1 不同能量与木霉孢子致死率的关系 (第一次)

输入电压(伏特)	辐照能量(焦耳)	孢子存活数(万/毫升)	孢子存活率(%)	孢子致死率(%)
0	0	93	100	0
700	0.05	57	61	39
900	0.20	57	61	39
1100(1)	0.35	20	22	78
1100(3)	1.05	10	11	89
1100(5)	1.75	28	28	72
1100(10)	3.50	20	24	76

注:()内数字为脉冲次数。

由表1所列结果可以看出,输入电压的强弱对木霉孢子的致死率影响较大。用电压为700与900伏特产生的激光能量辐照,木霉孢子的致死率甚低,仅有39%,而加大电压至1100伏特时,致死率明显提高至71%以上,最高达89%。同时还可看出,在电压为1100伏特的基础上,随脉冲次数的增加,致死率亦略有提高的趋势。

在上述基础上,又进行了第二次试验。以输入电压为1100伏特为基准,增加了脉冲次数以增强辐照能量。结果见表2。

表 2

输入电压和辐照能量与木霉孢子致死率的关系

(第二次)

输入电压(伏特)	脉冲次数(次)	辐照能量(焦耳)	孢子存活数 (万/毫升)	孢子存活率(%)	孢子致死率(%)
0	0	0	25.3	100	0
1100	20	9.8	14.6	57.7	42.3
1100	60	29.4	10.0	39.5	60.5
1100	120	58.8	6.0	23.5	76.5
1150	1	0.55	2.7	10.7	89.3

从表 2 可以看出, 输入电压一定, 随脉冲次数的增加亦即辐照能量增加而木霉孢子的致死率提高。本结果再一次表明输入电压的强弱, 对木霉孢子致死率的影响较大。如电压为 1150 伏特, 虽脉冲数仅为一次, 辐照能量不高(0.55 焦耳), 但孢子致死率达 89.3%, 出现该现象的物理学原因, 有待进一步探讨。

为追求高致死率, 继续增加辐照能量, 又进行了第三次试验, 结果见表 3。

表 3

辐照能量与木霉孢子致死率的关系

(第三次)

输入电压(伏特)	脉冲次数(次)	辐照能量(焦耳)	孢子存活数 (万/毫升)	孢子存活率(%)	孢子致死率(%)
0	0	0	2.35	100	0
1100	120	44.16	1.00	43.0	57.0
1100	300	110.40	0.65	28.0	72.0
1100	500	184.00	0.50	21.0	79.0

从表 3 结果再一次看出, 在一定输入电压下, 增加脉冲次数亦即增加辐照能量, 木霉孢子的致死率有提高的趋势。但同前两次的试验结果比较, 虽然能量大幅度增加, 但致死率无明显变化。一般波动在 70~80% 之间, 最高达 89%。

由于我们采用的激光器性能所限, 继续增强输入电压与增加脉冲数有困难, 所以我们即以第三次辐照处理的孢子悬液为诱变选育材料。试验证明: 激光辐照木霉孢子致死率虽未达到一般要求的 99.0~99.9%, 但获得了在生化特性和形态学特征上发生明显变化的变异菌株。

(二) 变异菌株的纤维素酶活和某些性状的变化

(1) 纤维素酶活

经激光诱变获得一批变异菌株, 其纤维素酶活与出发菌株和野生菌株比较普遍提高。经分批筛选和多次复筛选出纤维素酶活较高的四株变异菌株, 其中 L₂-26 为典型代表, 滤纸糖酶活为 2.62 毫克(糖)/毫升·小时, 比出发菌株 323.1 和野生菌株 3.23.6 的酶活分别提高 2.7 倍和 2 倍(表 4)。诱变效应显著。

为了进一步比较诱变前后的酶活, 对变异株的 CMC 酶活, 滤纸崩溃活性(FDP)和玉米粘粉酶解得糖率进行了测定。结果表明(表 5), L₂-26 的 CMC 酶活较出发菌株 323.1 和野生菌株 3.23.6 分别提高 2.5 倍和 2.4 倍。玉米粘粉酶解得糖率亦有提高。同时在静置条件下 L₂-26 的 FDP 活性于 17~24 小时内滤纸呈现全崩, 而野生型 3.23.6 和出发菌株 323.1 二菌株至 41 小时仅有某种程度的崩溃。

表 4 变异菌株与出发菌株的纤维素酶活 (滤纸糖酶活) 比较

菌 株	滤纸糖酶活 (毫克/毫升·小时)	与出发菌株323.1比较	与野生菌株3.23.6比较
野生菌3.23.6	0.85	—	100
出发菌323.1	0.71	100	—
变异菌	L ₁ -8	241	202
	L ₂ -8	256	214
	L ₂ -11	254	212
	L ₂ -26	369	308

表 5 变异菌株与出发菌株酶活比较

菌 株	CMC酶活 (毫克/毫升·小时)	FD _p 活性 (小时/全崩****) *	玉米淀粉酶解 得糖率 (%)
3.23.6	149.6	41 (++)	14.9
232.1	144.0	41 (+)	14.6
L ₂ -26	504.0	17~24 (****)	17.3

* 静置测定。

(2) 某些形态学性状的变化

观察比较了变异菌株和出发菌株在形态学方面的某些性状, 差异明显 (表 6)。

表 6 变异菌株 L₂-26 与亲本菌株 323.1 和 3.23.6 某些形态学性状比较 *

观 察 项 目	变异菌株 L ₂ -26	出发菌株 323.1	野生菌株 3.23.6
菌落结构	散开丛束状	紧密絮状	紧密絮状
菌落大小 (毫米) **	3—5	10—13	—
色素分泌	绿黄色	杏黄色	杏黄色
孢子形成	快	慢	慢

* 在马铃薯葡萄糖琼脂上生长。 ** 在加有 0.1% 去氧胆酸钠马铃薯葡萄糖琼脂上生长菌落的直径。

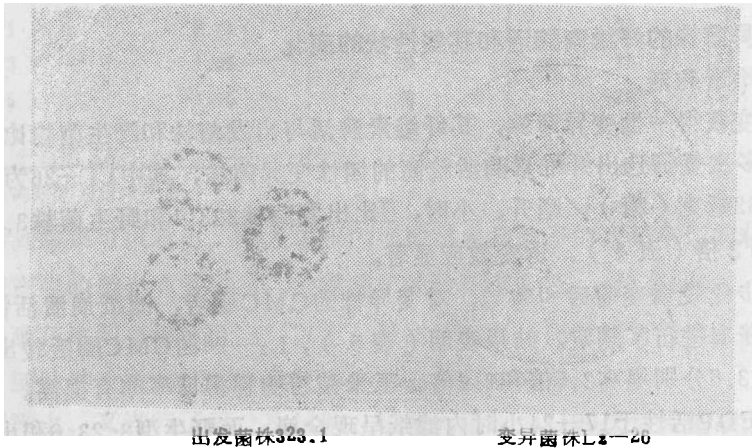


图 1 出发菌株与变异菌株菌落特征

从表6看到变异菌株 L₂-26与出发菌株323.1和野生菌株3.23.6比较,菌落变小,菌落结构由紧密度为松散,培养基背面产生的水溶性色素由桔黄色变为绿黄色,分生孢子形成变快。

讨 论 与 结 论

微生物诱变育种的理论是诱发基因突变。采用物理、化学诱变手段获得了多种微生物的高产突变型菌株。但由于诱变剂在DNA的复制中不容易显出它的专一性,故难以定向选择诱变剂。激光做为一种微生物诱变剂,国内外应用甚少。且未见明显诱变效应的报导。从我们的试验结果看来,激光做为微生物育种的一种诱变剂是可行的。在诱变处理的方法上,我们注意到两点:①使处理材料置于激光辐射光斑范围之内,以防止在平板分离时误取未经辐照孢子形成的菌落。我们设计并使用的辐照小玻管及小木板就是为此目的。②改变了目前微生物诱变育种上所采用的随机取菌的做法,而是将受处理孢的菌落尽可能全部取得,减免选取育种材料上的盲目性和遗弃高产菌株的弊病。

目前,在微生物诱变育种上十分重视死亡率的问题。一般要求致死率高达99.0~99.9%。但近来在生产上为了得到正变类型,有采用致死率为70~80%,甚至30~70%的。就我们在木霉激光诱变过程中,孢子致死率,以三次试验为例,仅为57~79%。试验结果表明,即使致死率未达到一般标准,而获得的木霉变异菌株某些遗传性状已发生明显变异。因而作者认为:对微生物诱变剂的致死率要求不能一致,应根据诱变剂的不同而异。激光诱变剂其致死率达50%以上即可。

关于纤维素酶菌种筛选中酶活力测定指标问题。由于纤维素酶是一个复合酶,各酶组分又未完全搞清,对C₁和C_x概念和作用尚有争论,因而至今未统一。一般多以CMC酶活和滤纸酶活为指标。根据作者等近几年菌种筛选的实践经验,两项指标又往往出现不一致的现象。难以判断优劣。我们考虑到C₁酶是决定天然纤维素降解的主要组分,应筛选C₁酶活高的菌株。因而以C₁酶活做为菌种筛选的指标是比较符合实际的。有报导指出,反应C₁酶的适宜底物是滤纸。因此我们把滤纸糖做为筛选菌种的一个主要指标。

激光做为微生物诱变育种的一种诱变剂。仅仅是开始,对于激光器类型的选择、能量大小、诱变材料的予处理以及激光诱变机制等问题,有待进一步探讨。

主 要 参 考 文 献

- (1) Mandel M.J. Weber & R. Parijek: 1971 Enhanced cellulose production by a mutant of *T. Viride.*, *Appl. Microbiol.* 21: 152-154.
- (2) Mandel. M: 1976, *Biofechnol. Bioeng. Symposium.* 6: 21-23.
- (3) 中国科学院上海植生所纤维素酶组、上海酒精二厂: 1978, 二株高活力纤维素分解菌EA 3-867和N2-78的获得及其特性比较, *微生物学报* 18: (1) 27-38.
- (4) 四川省生物所纤维素酶组: 1975, 绿色木霉纤维素酶高产突变型的诱变和筛选, *遗传学报* 2: (2) 156-163.
- (5) 江益良等: 197木霉纤维素酶高产变异菌株9023的选育, *遗传学报* 5(4): 322-329.
- (6) 微生物诱变育种编写组: 1973, *微生物诱变育种*, 科学出版社, 北京.