

原生质体诱变选育高纤维素酶活性 枯草芽孢杆菌的研究

谢凤行¹,张峰峰¹,周 可¹,赵玉洁¹,刘韵娅²

(1. 天津市农业生物技术研究中心,天津 300192;2. 天津农学院,天津 300384)

摘要: 采用紫外诱变、化学诱变(DES诱变)及复合诱变的方法对产纤维素酶枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) B6的原生质体进行诱变,选育出10个高纤维酶活突变株。摇瓶发酵试验结果表明,所选突变株酶活都显著高于B6,其中,紫外诱变处理的突变株Z12,化学诱变得到的突变株H1以及复合诱变处理的突变株F12的产酶能力相对较强,且产酶能力稳定,酶活值分别为448.3,450.9,491.8 U/mL,分别为对照的176%,178%,194%。试验结果说明,对枯草芽孢杆菌的原生质进行诱变可以提高菌株产纤维素酶的能力,而原生质体的复合诱变可提高诱变效应。

关键词: 枯草芽孢杆菌;原生质体;紫外诱变;化学诱变;复合诱变;纤维素酶

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2010)05-0211-04

The Mutagenesis of *Bacillus subtilis* Protoplast for Screening Highly Producing Cellulase Strains

XIE Feng-xing¹,ZHANG Feng-feng¹,ZHOU Ke¹,ZHAO Yu-jie¹,LIU Yun-ya²

(1. Tianjin Research Center of Agricultural Biotechnology, Tianjin 300192, China;

2. Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: The *Bacillus subtilis* B6 isolated from environment was used for protoplast Ultraviolet(UV) mutagenesis, diethyl sulfate(DES) mutagenesis and combination mutagenesis to screen high cellulase activity mutant strains. The results showed that the cellulase production of 10 excellent mutant strains chosen from 342 mutants was significant higher than B6 through fermentation culture in shaking flasks. The cellulase activities of Z12 from UV mutagenesis, H1 from DES mutagenesis and F12 from combination mutagenesis were 448.3, 450.9 and 491.8 U/mL respectively, which were more than 70% than that of original strain, further more the mutants producing cellulase abilities had no change over 5 generations. The experimental results showed that the producing cellulase ability of *Bacillus Subtilis* could be increased through protoplast mutagenesis and combination mutagenesis could improve the mutagenic effect.

Key words: *Bacillus subtilis*; Protoplast; UV mutagenesis; DES mutagenesis; Combination mutagenesis; Cellulase

纤维素是植物纤维的主要成分,占其干质量的30%~50%,而所有动物生产都是以植物性日粮为基础,大量未被消化吸收的纤维素随粪便排到体外,造成巨大的资源浪费和环境污染。纤维素酶是一类将纤维素水解成葡萄糖的酶的统称,它可破解富含纤维的细胞壁,使其包含的蛋白质、淀粉等营养物质释放出来并加以利用;同时,又可将纤维降解为可被畜禽机体消化吸收的还原糖,从而提高饲料利用

率^[1]。纤维素酶的产生菌包括细菌、真菌和放线菌等,细菌中的芽孢杆菌由于具有环境适应性强、对温度和pH的耐受范围广、能在动物肠道内定殖调节肠道菌群平衡、提高机体的免疫力等优点,越来越受到人们的关注^[2]。高凤菊等^[3]从废泥浆中筛选到一株高活力纤维素酶生产菌株C-36,并确定该菌为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),韩学易等^[4]对该菌株的纤维素酶发酵条件进行了研究,其他学者也从不同的介质中分离到产纤维素酶的枯草芽孢杆菌。

收稿日期:2010-07-20

基金项目:天津市应用基础研究计划项目(07JCZDJC03600);天津市农业科学院院长基金项目(07012)

作者简介:谢凤行(1979-),女,湖南邵阳人,助理研究员,硕士,主要从事微生物发酵研究工作。

通讯作者:赵玉洁(1964-),女,河北唐山人,研究员,硕士,主要从事农业微生态制剂研究。

但细菌产纤维素酶的量较少,产酶活力也不高,导致应用成本偏高,限制了细菌纤维素酶在饲料工业中的产业化。因此,选育高纤维素酶活性的菌株具有重要的现实意义。

本研究以自然环境中筛选的产纤维素酶枯草芽孢杆菌为材料,通过对原生质体进行单一诱变和复合诱变,筛选高酶活突变株,以期获得一种改良枯草芽孢杆菌的有效途径,并为饲料添加剂提供一种优质的菌种资源。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 试验用菌种为实验室分离并保存的产纤维素酶枯草芽孢杆菌菌株 B6。

1.1.2 培养基 完全培养基:蛋白胨 10.0 g,牛肉膏 3.0 g,氯化钠 5.0 g,琼脂 18.0 g,蒸馏水 1 000 mL。基本培养基:葡萄糖 5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g,柠檬酸钠 1 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 14 g, KH_2PO_4 6 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g,琼脂 18 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。再生基本培养基:其中固体培养基为将基本培养基中的蒸馏水换成原生质体稳定液,半固体培养基琼脂减半。纤维素刚果红鉴别培养基:羧甲基纤维素钠 5.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g,刚果红 0.1 g, KH_2PO_4 1.0 g, NaCl 0.5 g, MgSO_4 0.5 g,蛋白胨 5.0 g,琼脂 18.0 g,蒸馏水 1 000 mL。发酵培养基:麸皮 50.0 g,蛋白胨 3.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, NaCl 5.0 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 6.0。

1.2 方法

1.2.1 原生质体的制备 将菌种转接于液体完全培养基中,37℃振荡培养 3 h,使细胞生长进入对数前期,加入 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素,使其终浓度为 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$,继续振荡培养 5 h。取对数后期菌液离心弃上清,将菌体用磷酸缓冲液洗涤 2 次后离心,菌体用 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶菌酶 37℃处理 30 min 进行脱壁,脱壁后离心,弃上清,菌体用高渗缓冲液洗涤 2 次,除菌后将原生质体悬浮于原生质体稳定液中备用。

1.2.2 原生质体紫外诱变 将制备好的原生质体悬液用稳定液稀释至 10^6 cfu/mL,取 5 mL 于无菌培养皿中,将培养皿置于磁力搅拌器上,调整距离 30 cm,紫外灯照射剂量为 0.5,1.0,2.0,3.0 min,照射的同时进行搅拌。取诱变和未经诱变(对照)的原生质体梯度稀释,取 0.1 mL 原生质体于再生半固体培养基中,混匀倒入再生固体培养基中,每个梯度 3 个重复,37℃培养,2 d 后计算原生质体的致死率。将诱变再生的突变株接种在纤维素酶筛选培养基

上,中间接对照,四周接 4 株突变株,37℃培养,2 d 后观察,挑选水解圈较大的突变株测量菌落大小(C)和水解圈大小(H),通过比较 H/C 比值筛选产酶高的突变株。

1.2.3 原生质体化学诱变 取梯度稀释的原生质体 5 mL 和 2% 硫酸二乙脂(DES) 5 mL 充分混合,37℃振荡处理 10,30,60 min,然后用 5 mL 2% 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 终止反应。再生和筛选的方法同 1.2.2。

1.2.4 原生质体的复合诱变 根据单一诱变确定的剂量进行复合诱变。将制备的原生质体进行梯度稀释后取原生质体 2 mL 和 2% DES 2 mL 充分混合,振荡处理 30 min 后加入 2 mL 2% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 终止反应,然后取 5 mL 混合液置于紫外灯下诱变处理 2 min。再生和筛选的方法同 1.2.2。

1.2.5 葡萄糖标准曲线的绘制 按参考文献[5]的方法绘制葡萄糖标准曲线,该曲线回归方程为 $Y = 0.4893X + 0.1156$,相关性 $R^2 = 0.9932$ 。

1.2.6 突变株酶活测定 将紫外诱变、化学诱变和复合诱变筛选到的优良突变株第一代、第五代及未经诱变的对照以 10% 的接种量接种到发酵培养基中,30℃振荡培养 42 h,将菌液 6 000 r/min 离心 15 min,上清液即为粗酶液,粗酶液适当稀释后用于酶活的测定。纤维素酶的测定方法参照文献[6]。

纤维素酶活力单位 = $(B \times n \times 1\,000) / (T \times M)$

式中,B 为标准曲线得葡萄糖含量;n 为稀释倍数;T 为恒温时间;M 为酶液体积。

酶活力单位定义为:1 mL 酶液每分钟产生 1 μg 葡萄糖为一个酶活单位(U)。

2 结果与分析

2.1 原生质体紫外诱变

由表 1 可知,随着诱变时间的延长,致死率逐渐升高,其中紫外诱变 3 min,原生质体的致死率为 75.2%。据文献报道,致死率在 70%~80% 时存活菌变异现象显著,正突变率高,诱变效果较好^[7],因此,对原生质体悬浮液进行紫外诱变处理的时间选择 3.0 min。

表 1 紫外诱变剂量与致死率的关系

Tab.1 Effect of UV treatment time on mortality rate				
诱变剂量/min Mutation dose	0.5	1.0	2.0	3.0
致死率/% Mortality rate	28.0	56.3	62.6	75.2

在以纤维素为唯一碳源的培养基中,刚果红与纤维素等大分子物质结合而不与小分子糖类结合,故纤维素被降解形成透明圈。透明圈的大小与酶活

的高低存在一定正相关性^[8],透明圈越大,表明菌株降解纤维素的能力越强,酶活就越高。因此,选择 H/C 值相对较大的菌株为初筛菌株。

将用紫外诱变处理 3.0 min 的突变株 84 株接种在纤维素刚果红鉴别培养基上,观察水解圈大小,挑选其中 15 株(编号分别为 Z1~Z15)水解圈明显的再生株接种在纤维素刚果红鉴别培养基上做验证试验,以原始菌株 B6 为对照。2 d 后测量菌落直径(C)和水解圈直径(H),比较 H/C 值的大小,将其中 H/C 值大于对照的再生株进行比较筛选优良突变株,结果见表 2。

表 2 原生质体紫外诱变再生株的 H/C 值

Tab.2 The H/C value of protoplast irradiated by UV										
菌株 Strain	Z1	Z4	Z6	Z7	Z8	Z10	Z12	Z13	Z15	
H/C	1.28	1.21	1.27	1.31	1.33	1.23	1.63	1.27	1.26	

由表 2 可知,所测突变株 H/C 值在 1.27~1.63 之间,通过水解圈直径与菌落直径的比值可以发现,紫外诱变得到的突变株 Z7、Z8 和 Z12 的 H/C 值较高,分别为 1.31、1.33 和 1.63,因此,挑选菌株 Z7、Z8 和 Z12 为优良突变株用于定量测定酶活值。

2.2 原生质体化学诱变

从表 3 可知,在所试的时间范围内,菌株的致死率随 DES 作用时间的延长而升高,其中,用 2% DES 处理 30 min 的致死率为 74.8%,70%~80%,为最佳诱变条件。

表 3 化学诱变剂量与致死率的关系

Tab.3 Effect of DES treatment time on mortality rate			
诱变剂量/min Mutation dose	10	30	60
致死率/% Mortality rate	43.5	74.8	90.1

选取 2% DES 处理 30 min 的突变株 100 株接种在纤维素刚果红鉴别培养基上,观察水解圈大小,挑选出 30 株(编号 H1~H30)水解圈明显的再生株在纤维素刚果红鉴别培养基上做验证试验。2 d 后测量菌落直径(C)和水解圈直径(H),比较 H/C 值的大小,将其中 H/C 值大于对照的再生株进行比较筛选优良突变株,结果见表 4。由表 4 可知,化学诱变得到的突变株 H1、H26 和 H29 相对酶活最高,H/C 值分别达 1.31、1.34 和 1.30,因此,挑选突变株 H1、H26 和 H29 用于定量测定酶活值。

表 4 原生质体 DES 诱变再生株的 H/C 值

Tab.4 The H/C value of protoplast irradiated by DES									
菌株 Strain	H1	H2	H8	H12	H13	H26	H29	H30	
H/C	1.31	1.26	1.18	1.17	1.23	1.34	1.30	1.26	

2.3 原生质体复合诱变

选取复合诱变后突变株 158 株接种在纤维素刚果红鉴别培养基上,根据水解圈大小挑选出 58 株正突变株。将 58 株突变株接种在纤维素刚果红鉴别培养基上做验证试验,2 d 后测量菌落直径(C)和水解圈直径(H),比较 H/C 值的大小,将其中 H/C 值大于对照的再生株进行比较筛选优良突变株,结果见表 5。

表 5 原生质体复合诱变再生株的 H/C 值

Tab.5 The H/C value of protoplast irradiated by UV and DES														
菌株 Strain	F7	F12	F13	F14	F19	F21	F23	F29	F33	F35	F43	F56	F57	
H/C	1.19	1.50	1.28	1.26	1.22	1.44	1.32	1.35	1.43	1.17	1.32	1.30	1.56	

由表 5 可知,复合诱变得到的突变株中 H/C 值大于 1.30 的有 8 株,其中 F12、F21、F33、F57 的 H/C 值均在 1.40 以上,说明其相对酶活较高。一般 H/C 值越大说明菌株的产酶能力越强,在同等条件下,以 H/C 值来初步筛选突变株的产酶能力操作简单且比较直观,是一种行之有效的方法,但 H/C 值只能在一定程度上反映菌株的酶活,要具体比较菌株产酶能力需采取定量测定的方法。

2.4 突变株纤维素酶活的测定

通过测定处理过的粗酶液吸光度值,根据葡萄糖标准曲线计算出粗酶液中糖的含量换算成菌株的酶活值,结果见表 6。从表 6 可知,所有突变株的纤维素酶的酶活值较亲本的提高率都在 50% 以上,其中,紫外诱变的突变株中最高酶活值为 448.3 U/mL,产酶量为对照的 1.76 倍,显著高于原始菌株的 254.0 U/mL;化学诱变的 H1 酶活值最高,达

450.9 U/mL,产酶量为对照的 1.78 倍;复合诱变的 F12 的酶活值高达 491.8 U/mL,显著高于其他菌株的产酶量,其产酶量接近对照的 2 倍。综合比较三种诱变方法发现,复合诱变的效果优于化学诱变,而紫外诱变的效果最差,但复合诱变的效果非紫外诱变和化学诱变的叠加效果。

比较菌株第一代和第五代的酶活发现,无论是产酶的绝对量还是与对照的相对提高率,其值都比较接近,说明 B6 及其诱变再生的突变株产纤维素酶的能力都比较稳定。

3 讨论与结论

原生质体诱变是在诱变育种和原生质融合技术上发展起来的一种育种技术,由于原生质体没有细胞壁,可能对诱变因素更加敏感,因此该技术较传统的诱变处理突变率有很大的提高,已有一些研究工

作者将原生质体诱变的方法用于微生物育种,并成功筛选到了高产突变株。卞小莹等^[9]采用原生质体诱变技术对秦岭链霉菌(*Streptomyces qinlingensis* sp. nov.)的菌种进行了改良,结果发现菌株 R-72、NTG-4 和 H30-7 对 5 种病原细菌和 5 种植物病原真菌的抗菌活性相比原始菌株有显著提高。尹华等^[10]对产朊假丝酵母的原生质体进行复合诱变,筛选到了对重金属铬有较强去除能力的突变株。肖怀

秋等^[11]对产中性蛋白酶的枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*UV11 进行原生质体复合诱变,选育到稳定、高产的中性蛋白酶菌株 UN19。王慕华等^[12]以 D-核糖产生菌枯草芽孢杆菌 B941 为出发菌株,采用紫外诱变原生质体的方法,获得了 4 株可以在含有 6.0% D-核糖的培养基上生长的 D-核糖高产菌株。上述的研究结果说明,利用原生质体诱变技术对真菌和细菌进行优良菌种的选育是一种有效的方法。

表 6 突变株酶活稳定性

Tab. 6 The enzyme activity stability of the mutants

菌株编号 Strain	第一代酶活 First mutant strain enzyme activity	酶活力变化 / % Change of enzyme activity	第五代酶活 Fifth mutant strain enzyme activity	酶活力变化 / % Change of enzyme activity
B6	254.0 ± 12.3d	100	260.0 ± 15.1d	100
Z7	399.4 ± 14.2c	157	397.8 ± 9.8c	153
Z84	25.1 ± 9.1bc	167	432.5 ± 20.3bc	166
Z12	448.3 ± 12.9b	176	457.0 ± 7.6b	176
H1	450.9 ± 10.1b	178	448.1 ± 9.7b	172
H26	422.2 ± 5.2bc	166	422.0 ± 11.2bc	162
H29	447.0 ± 8.9b	176	452.7 ± 11.3b	174
F12	491.8 ± 18.2a	194	485.0 ± 10.8a	187
F21	420.3 ± 20.2bc	165	412.4 ± 17.8bc	159
F33	433.3 ± 11.4b	171	442.7 ± 24.3b	170
F57	443.6 ± 15.4b	175	453.1 ± 16.9b	174

本研究采用紫外诱变、DES 诱变及复合诱变的方法对产纤维素酶枯草芽孢杆菌 B6 的原生质体进行了诱变处理,结果发现,紫外诱变处理的 84 个再生菌株中,有 3 株 H/C 值大于 1.30,分别为 Z7、Z8、Z12;化学诱变处理的 100 个再生菌株中有 3 株 H/C 值大于 1.30,分别为 H1、H26、H29;复合诱变处理的 158 个再生株中,H/C 值大于 1.30 有 8 株,其中 4 株的 H/C 值大于 1.40,分别为 F12、F21、F33、F57。发酵培养结果表明,再生株 Z7、Z8、Z12、H1、H26、H29、F12、F21、F33、F57 的酶活分别为 399.4, 425.1, 448.3, 450.9, 422.2, 447.0, 491.8, 420.3, 433.3, 443.6 U/mL,都显著高于原始菌株的 254.0 U/mL,其中 F12 酶活最高,接近原始菌株 B6 的 2 倍,说明对枯草芽孢杆菌的原生质进行诱变,可以提高菌株产纤维素酶的能力,而原生质体的复合诱变可大大提高诱变效应。

参考文献:

[1] 刁治民,张雄伟,熊亚,等.微生物纤维素酶在饲料工业中的生产现状及应用[J].青海草业,2006,15(3):15-20.
[2] 祝小,耿秀蓉,潘康成,等.枯草芽孢杆菌 PabO₂ 产纤维素酶活性的研究[J].酶制剂与微生态制剂,2007(1):61-63.

[3] 高凤菊,陈惠,吴琦,等.产纤维素酶芽孢杆菌 C-36 的分离筛选及其鉴定[J].四川农业大学学报,2006,24(2):175-177.
[4] 韩学易,陈惠,吴琦,等.产纤维素酶芽孢杆菌 C-36 的产酶条件研究[J].四川农业大学学报,2006,02:178-181.
[5] QB 2583-2003,纤维素酶制剂[S].
[6] 李素波.纤维素酶高产菌株选育及其发酵条件的优化[D].兰州:兰州大学,2007.
[7] 杜连祥,路福平.微生物学实验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2005:175.
[8] 张文治.新编食品微生物学[M].北京:高等教育出版社,1998:198-201.
[9] 卞小莹,吴文君,王群利,等.秦岭链霉菌的原生质体再生与诱变育种[J].微生物学通报,2008,35(6):929-933.
[10] 尹华,卢显妍,彭辉,等.复合诱变原生质体选育重金属去除菌[J].环境科学,2005,26(4):147-151.
[11] 肖怀秋,兰立新,李玉珍.亚硝酸与紫外线复合诱变原生质体选育产酶菌株[J].生物技术,2006,16(5):40-41.
[12] 王慕华,孙文敬,郭金权,等.紫外诱变原生质体选育 D-核糖生产菌株[J].工业微生物,2005,25(1):24-27.