

# 快中子辐射诱变对绿色木霉产纤维素酶的影响\*

陈光, 徐杨, 孙阳, 刘洁心, 王香琪

吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118

**摘要:** 利用快中子对绿色木霉 AS3.3711 进行辐照, 采用辐照剂量为 0.6~4.8Gy, 研究了不同剂量快中子对绿色木霉孢子致死率和遗传稳定性的影响, 得到了提高纤维素酶活性的菌株。结果表明: 辐照剂量在 1.2~4.8Gy 范围内绿色木霉的致死率呈逐渐上升趋势, 辐照剂量为 1.2 Gy 时, 绿色木霉的致死率达到 80.0%, 此突变株的羧甲基纤维素酶活(CMC 酶活)可达 914.4 U/mL, 比出发菌株提高了 30 倍, 滤纸酶活(FPA 酶活)为 633.63 U/mL, 比出发菌株提高了 4 倍。

**关键词:** 绿色木霉; 纤维素酶; 快中子

中图分类号: Q933

文献标识码: A

文章编号: 1000-5684(2011)

DOI:

网络出版地址:

## Effect of Fast Neutron Irradiation on Production of Cellulase from *Trichoderma viride*

CHEN Guang, XU Yang, SUN Yang, LIU Jie-xin, WANG Xiang-qi

College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

**Abstract:** The effect of deuterium ion bombardment majority targeted to produce 14Mev fast neutron irradiation, with dosage 0.6—4.8Gy, on production of cellulase from *Trichoderma viride* AS3.3711 was studied. The death rate was in a rising trend when irradiation dosage was 1.2—4.8 Gy. The results indicated the death rate of spores reached 80.0% when radiation dosage was 1.2 Gy. It was shown that one positive mutant had significant difference compared to the original with paired samples test (t-test). The filter paper activity of cellulase of strain Fn10-1 reached 633.63 U/mL, with 4 times enhanced, compared with the initial strain. And the CMC activity of cellulase of strain Fn10-1 reached 914.4 U/mL, with 30 times enhanced, compared with the initial strain.

**Key words:** *Trichoderma viride*; cellulase; fast neutron

纤维素广泛存在于自然界中, 是世界上数量庞大且最为廉价的可再生资源[1], 但其分解利用的水平较低。为了有效利用纤维素, 纤维素酶高产菌株的选育和纤维素酶活力的提高成为研究的热点, 国内外专家学者对纤维素酶进行了广泛的研究[2]。中子辐照属于电离辐射的一种, 快中子辐照电离密度大, 能量高, 并能引起较高密度的次级电离, 被广泛用于植物育种研究。虽然中子辐照在微生物育种方面的应用较受重视, 但鲜见报道[3]。笔者利用不同剂量的快中子对绿色木霉 AS3.3711 进行辐照诱变, 选育出稳定高产菌株, 为进一步将中子辐照技术应用于微生物品种改良提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种和中子源 绿色木霉 (*Trichoderma viride*) AS3.3711 购自中科院微生物研究所; 中子源是利用离子源产生氘离子, 经过加速后轰击氘靶产生的 14 Mev 快中子, 由东北师大辐射技术研究所提供的。

1.1.2 试剂 DNS 试剂, pH5.0 柠檬酸缓冲液, 1%羧甲基纤维素钠溶液, 新华定性滤纸。

1.1.3 培养基 斜面培养基(PDA 培养基): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 15 g, 蒸馏水 1000 mL, 自然

\* 基金项目: 吉林省科技厅发展计划重点项目基金(20100226)

作者简介: 陈光, 女, 博士, 教授, 研究方向为酶工程。

收稿日期: 2010-11-17

网络出版时间:

pH值; 液体发酵培养基[4]:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.4 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3 g,  $\text{CaCl}_2$  0.3 g, CMC-Na 10 g(或微晶纤维素 10 g), 蛋白胨 0.5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1.6 mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.7 mg,  $\text{CoCl}_2$  2 mg, 吐温-80 2 mL, 蒸馏水 1000 mL, pH值自然; 刚果红筛选培养基[5-6]:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 g, 琼脂粉 15 g, 羧甲基纤维素钠 5 g, 刚果红 0.2 g, 蒸馏水 1000 mL。

### 1.2 菌体培养方法

1.2.1 菌种的活化 取保藏的绿色木霉 AS3.3711 在 PDA 斜面培养基上活化 2 代。

1.2.2 种子培养 取经 2 次活化的菌体于 PDA 液体培养基中, 250 mL 的三角瓶中装量 50 mL, 放入 28℃ 摇床, 210 r/min 振荡培养 48h。

1.2.3 发酵培养 于 250mL 的三角瓶中装量 50mL 液体发酵培养基, 将培养好的种子按 5% 的比例接种于液体发酵培养基中, 在 28℃、200 r/min 摇床振荡培养 3d。

### 1.3 菌悬液制备

用生理盐水洗脱生长于活化培养基斜面的绿色木霉孢子, 用无菌滤纸过滤, 得到无菌丝体的孢子悬液, 稀释 100 倍后, 将菌浓度保持在  $10^7 \sim 10^8$  个/mL, 将菌悬液在 28℃ 摇床进行复苏[7-9]。

### 1.4 辐照处理

剂量率为 0.002 Gy/s, 分别照射 10, 20, 30, 40 min, 即 1.2, 2.4, 3.6, 4.8 Gy 4 个剂量进行处理。照射之后的样品用灭菌的生理盐水洗涤, 将洗脱下来的菌液稀释到  $10^{-1} \sim 10^{-5}$ , 后取各个稀释倍数的菌液 0.2 mL 分别涂布于 PDA 培养基平板上。

### 1.5 筛选方法

1.5.1 菌种初筛 选取在平板上生长旺盛的单菌落接种在刚果红-羧甲基纤维素琼脂培养基上, 挑选水解透明圈比原始菌株大的单菌落接种在 PDA 培养基, 以备复筛。

1.5.2 菌种复筛 将斜面培养基上的试验菌株, 接种于 PDA 液体培养基, 28℃ 摇床振荡培养 48 h, 按一定比例接入液体发酵培养基中, 28℃ 摇床振荡培养 72 h, 测其 CMC 酶活和 FPA 酶活。将选取的突变株命名为 FnX-Y, X 为辐照时间, Y 为菌株序号。

### 1.6 突变菌株的产酶稳定性

将高产突变株连续在斜面培养基上传代 6 代, 将各子代斜面保存的菌株分别接入发酵培养基中, 28℃、200 r/min 培养 72h 后, 离心, 取上清测定纤维素酶活性, 确定各突变株经多次传代后产纤维素酶能力的稳定性, 以防止回复突变或遗失。

### 1.7 分析方法

1.7.1 粗酶液的制备 取培养液用 4 层纱布过滤, 过滤液在 7000r/min、4℃ 条件下离心 10min, 取上清液即为粗酶液。

1.7.2 酶活力的测定 葡萄糖标准曲线的绘制: 取 1mg/mL 葡萄糖标准液 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6 mL 于 9 个试管中, 用蒸馏水调至 2 mL, 然后向各管中加入 1.5 mL 的 DNS 溶液, 摇匀后沸水浴 5 min, 然后立即用冷水冷却至室温, 加蒸馏水定容到 25 mL, 充分摇匀, 在 520 nm 波长下测定 OD 值并记录, 以葡萄糖含量为横坐标, 以 OD 值为纵坐标, 绘制标准曲线。

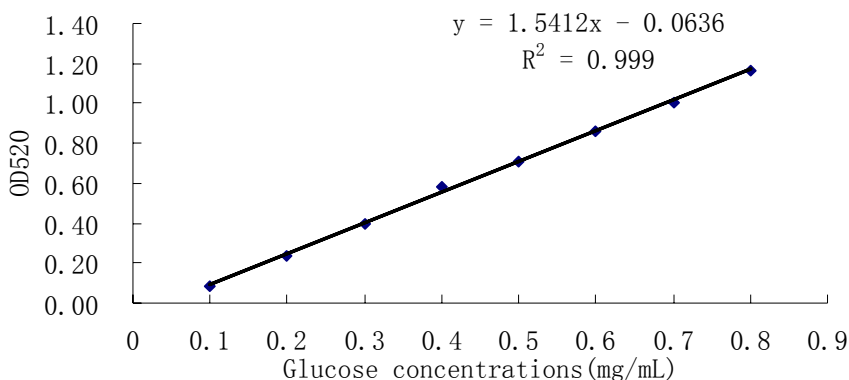


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig.1. The standard curve of glucose

羧甲基纤维素酶活(CMC酶活): 向刻度试管(25 mL)中加入适当稀释的酶液 0.5 mL和用 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液配制的 1%的羧甲基纤维素悬浮液 2 mL, 置于 50℃ 恒温水浴中保温 30min后立即加入 3mL

DNS溶液, 在沸水浴煮沸 10 min, 冷却至室温后, 加水 25 mL, 充分摇匀后于 520nm下测定光密度(OD值)<sup>[10]</sup>。

滤纸酶活 (FPA 酶活)：取新华定量滤纸 50mg(1×60cm)放入到带刻度试管(25mL)中,加入适当稀释的酶液 0.5mL 和 0.05mol/L 的柠檬酸缓冲液 2mL,置于 50℃恒温水浴中保温 1h 后立即加入 3mL 的 DNS 溶液,在沸水浴煮沸 10min,冷却至室温后,加水定容至 25mL,充分摇匀后于 520nm 下测定 OD 值。

酶活力单位定义：以 1mL 酶液 1min 分解底物生成 1ug 葡萄糖的酶量定义为 1 个酶活单位(U)。

$$\text{酶活力 (U)} = \frac{M \times D \times 1000}{T \times V}$$

式中 *M*: 还原糖浓度(mg/mL); *D*: 稀释倍数; *T*: 反应时间(min); *V*: 酶液体积(mL); 1000: 将葡萄糖由 mg 换算成 μg 的倍数。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同辐照剂量对绿色木霉致死率的影响

用 14MeV 的快中子,选择 5 个不同辐照剂量对绿色木霉进行诱变,对其在各个剂量下的致死率情况进行比较,结果如图 2。图 2 表明辐照剂量在 0.6~4.8Gy 范围内快中子辐照对绿色木霉的致死率逐渐增加;在 1.2~2.4Gy,绿色木霉致死率为 70.0%~80.0%; >4.8Gy

时,致死率接近于 100%。可以看出绿色木霉对于快中子较为敏感,在较低的辐照剂量下,其致死率就已经很高。

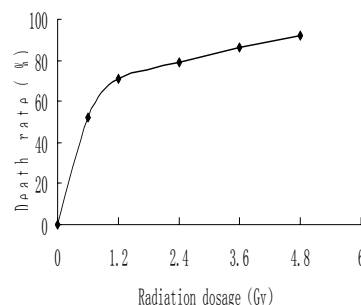


图 2 快中子辐照绿色木霉致死率

Fig.2. The death rate of fast neutron irradiation

### 2.2 中子诱变突变株的筛选

采用快中子不同剂量对绿色木霉 AS3.3711 进行诱变,每个辐照剂量选取 3 个突变株共 12 株进行液体发酵培养,分别测定突变菌株的 CMC 酶活和 FPA 酶活,以原始菌株为对照组,以原始菌株的酶活为 100%,如图 3~4 所示。

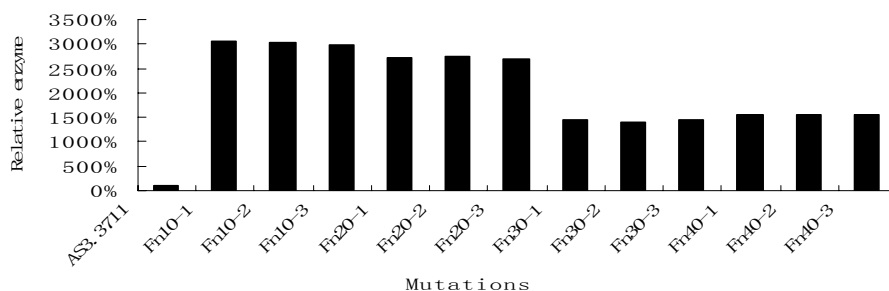


图 3 快中子辐照突变株 CMC 酶活

Fig.3. The CMC activity of cellulase of fast neutron irradiation

如图 3 所示利用快中子辐照的突变株,经过液体发酵产生的 CMC 酶活都有了显著的提高,提高幅度都在 10 倍以上,其中以辐照剂量为 1.2Gy 的突变株

的酶活最高,是原始菌株酶活的 30 倍。说明快中子辐照对绿色木霉产 CMC 酶活有显著提高。

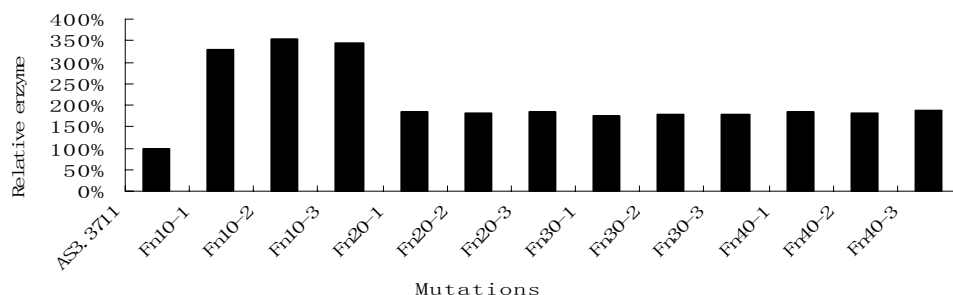


图 4 快中子辐照突变株 FPA 酶活

Fig. 4. The FPA activity of cellulase of fast neutron irradiation

如图4所示,利用快中子辐照的突变株,经过发酵培养产生的FPA酶活都有提高,但是提高的幅度没有CMC酶活显著,提高幅度在2倍以上。在1.2Gy时的突变株的酶活力提高较为明显,为原始菌株的4倍。

### 2.3 辐照处理对绿色木霉产纤维素酶稳定性的影响

表1 连续传代各代结果 CMC 酶活力

菌株编号 Spawn number	Table 1. Cellulose of each generation							U/mL
	F <sub>0</sub>	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>	
Fn10-1	914.4	913.4	913.4	914.4	914.4	913.4	914.4	
Fn10-2	914.4	914.4	914.4	914.3	914.4	914.5	914.4	
Fn10-3	915.5	914.4	915.5	915.5	915.5	915.5	914.4	
Fn20-1	825.8	814.9	814.9	814.9	814.9	812.8	812.6	
Fn20-2	825.8	825.8	825.8	825.8	825.8	825.8	814.9	
Fn20-3	814.9	814.9	814.9	814.9	812.8	812.8	812.7	

## 3 结论

本次试验中,在快中子辐照剂量0.6~4.8Gy范围内绿色木霉的致死率逐渐增加,在1.2~2.4Gy,绿色木霉致死率就达到70.0%~80.0%,>4.8Gy时,致死率接近于100%。因为快中子的电离密度大,能量较高,在生物体内能产生较高密度的次级电离,电离辐射对细胞核最重要的作用是使遗传因子脱氧核糖核酸(DNA)合成延迟,细胞分裂受阻,并产生染色体畸变和基因突变,对遗传物质产生更直接的作用。

经选择性刚果红培养基初筛,液体发酵复筛,获得了一株正突变株,其中菌株Fn10-1产纤维素酶的CMC酶活为914.4 U/mL, FPA酶活为633.63 U/mL,比出发菌株分别提高了30倍和4倍。经过连续6代的稳定性试验,突变菌株的酶活性无较大变化,能稳定遗传。试验表明快中子诱变能突破原有基因库的限制,诱发新基因或新的基因组合,形成有现实或潜在利用价值的新种质资源,是微生物育种的一个较好的物理诱变因素。

### 参考文献:

[1] 杨友坤,朱凤香,王卫平,等. 纤维素酶及其应用现状[J]. 安徽农学通报, 2009,(13) 59-62.

对选取的12个突变株中酶活力提高最显著的6个菌株进行遗传稳定性试验,结果见表1。经低剂量快中子辐照的突变株,在连续传代6代后,酶活力都较为稳定,只是在2.4 Gy照射的突变株,其后几代活力下降,产生了负突变。

- [2] 林建国,王常高,王伟平等. 不同诱变方法提高绿色木霉产纤维素酶的研究[J]. 安徽农学通报, 2008,(14) 134-136
- [3] 胡江朝,唐掌雄. 14MeV 快中子相对生物学效应的研究[J]. 核农学报, 1991,12(5):239-241.
- [4] Martin Schüle. Protein engineering of cellulases[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1543:239-252.
- [5] 陈晓明,张良,张建国,等. 枯草芽孢杆菌淀粉酶高产菌株的辐射诱变研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2008,(03)177-182.
- [6] 宋安东,苏丽娟,谢慧,等.  $\gamma$ 射线对斜卧青霉的诱变筛选及产酶条件优化[J]. 核农学报, 2008,22(3)280-285.
- [7] 刘德海,王红云,安明理,等. 纤维素酶高产菌株的选育及其生物学性状的研究[J]. 饲料工业, 2005,26(18):24-26.
- [8] 邱雁临,孙宪迅,蔡俊,等. 纤维素酶耐高温高产菌株的选育[J]. 中国酿造, 2004(2):15-17.
- [9] 董志扬,祝令香,于巍,等. 纤维素酶高产菌株的诱变选育及产酶条件研究[J]. 核农学报, 2001,15(1)26-31.
- [10] 高鸿健. 纤维素降解菌青霉 DS-04 的筛选、产酶条件优化及其 CMC 酶性质研究[D]. 长春: 东北师范大学, 200