

# 黑曲霉原生质体诱变选育内切型菊粉酶生产菌株

李文利, 曹泽虹\*, 董玉玮, 孙会刚, 刘夕娟, 唐盼

(徐州工程学院食品(生物)工程学院, 江苏 徐州 221008)

**摘要:** 从徐州市沛县河口镇秦庄村牛蒡种植基地腐烂牛蒡根附近采集土壤, 经过初筛得到了3批菌株(包括从中国科学院购买菌株黑曲霉 AS3.316), 经过测定内切型菊粉酶酶活力(I)和外切型菊粉酶酶活力(S), 筛选出 I/S 值大于 10 的菌株, 共 17 株菌株。从 17 株黑曲霉菌株样本中, 再筛选出一株产菊粉酶酶活力最高的菌株 C122803, 其酶活力为 2.78U/mL。对菌株 C122803 进行原生质体制备及 LiCl 诱变后, 得到一株内切型菊粉酶酶活力最高的菌株 YY18, 其酶活力为 3.97U/mL, 比出发菌株的酶活力提高了 42.80%。

**关键词:** 黑曲霉; 菊粉酶; 原生质体; 诱变

## Screening and Protoplast Mutagenesis of *Aspergillus niger* for Enhanced Endoinulinase Activity

LI Wen-li, CAO Ze-hong\*, DONG Yu-wei, SUN Hui-gang, LIU Xi-juan, TANG Pan

(College of Food and Bioengineering, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221008, China)

**Abstract:** Soil was collected from the periphery of rotten burdock roots in the burdock planting base of Qinzhuang village, Hekou town, Pei county, Xuzhou municipality. Three batches of *Aspergillus niger* strains (including *Aspergillus niger* 3.316 strains) were isolated and 17 strains with an endoinulinase (I)-to-exoinulinase (S) activity ratio of higher than 10 were screened from them by secondary screening. Strain C122803 exhibited the highest I/S ratio (2.78 U/mL) among 17 screened strains. Strain YY18 with an endoinulinase activity of 3.97 U/mL was obtained from strain C122803 through protoplast preparation and LiCl mutagenesis. The activity obtained was 42.80% higher than that of the parent strain.

**Key words:** *Aspergillus niger*; inulase; protoplast; mutagenesis

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)09-0144-05

菊糖又称菊粉(inulin)是由多个果糖分子通过  $\beta$ -2,1- 果糖苷键连接成的多聚果糖, 其末端有一个葡萄糖残基以  $\alpha$ -1,2 键与之相连, 呈直链结构<sup>[1-2]</sup>。它是一种贮存性的多糖类物质, 广泛存在于一些菊科植物中, 如菊芋(*Helianthus tuberosus*, 亦称洋姜)、菊苣(*Cichorium endivia*)、大丽花(*Dahlia pinnata*)、牛蒡(*Arctium lappa*)等。

菊粉酶(inulinase)是一种催化水解菊粉中  $\beta$ -2,1- 呋喃果糖苷键的水解酶。根据对底物的作用方式可将其分为两类: 一类是外切型菊粉酶(exoinulinase), 多数微生物来源的菊粉酶属于此类; 它能从菊粉末端逐一切断下果糖, 产物为果糖及少量葡萄糖。另一类是内切型菊粉酶(endoinulinase), 常分离自真菌, 如无花果曲霉(*Aspergillus ficuum*)、粗褶金孢子菌(*Chrysosporium pannorum*)等。它从菊粉分子内部随机切断某个  $\beta$ -2,1- 糖苷键, 产物为低聚果糖及少量果糖。

低聚果糖(fructooligosaccharides)是在蔗糖分子的果糖残基上以  $\beta$ -1,2- 键结合 1~3 个果糖的低聚糖。它是一种良好的双歧因子和水溶性膳食纤维, 低聚果糖甜度高, 易溶解, 能避免由蔗糖、葡萄糖引起的龋齿。其发热量少, 是功能性食品原料之一<sup>[2]</sup>。工业上生产低聚果糖有两种方法: 一种是由蔗糖经  $\beta$ - 果糖转移酶( $\beta$ -fructosyl transferase)或转化酶(invertase)的转果糖基反应而生成的蔗果糖类, 其产品中副产物葡萄糖和蔗糖多, 反应不易控制; 另一种是由内切型菊粉酶水解菊粉而成, 产物仅为低聚果糖和少量果糖, 与传统的以蔗糖作为原料生产低聚果糖的工艺相比, 具有工艺简单、生产成本低、低聚果糖含量高(70%~90%)等优点。微生物产生的菊粉酶是低聚果糖工业化生产的主要酶制剂。霉菌所产菊粉酶的最适温度高, 热稳定性好, 适宜偏酸性的环境, 对于菊粉酶用于低聚果糖工业化生产及防止生产中的污染十分有利。

收稿日期: 2011-09-01

基金项目: 江苏省高校自然科学研究计划项目(07KJD550202); 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划项目(201116); 徐州工程学院校级培育项目(XKY2011109)

作者简介: 李文利(1988—), 女, 本科生, 研究方向为食品微生物学。E-mail: 1067349333@qq.com

\* 通信作者: 曹泽虹(1963—), 女, 副教授, 学士, 研究方向为食品生物技术与酶工程。E-mail: czh001001@163.com

我国对菊粉酶的研究始于20世纪90年代,主要集中在菌株筛选和酶学性质方面。目前仍停留在实验室研究阶段,原因在于筛选出来的菌株酶活力低,稳定性差<sup>[3-5]</sup>。利用原生质体制备和诱变技术对真菌进行菌种选育是近年来微生物育种常用的方法,可以使菌株的一些生物指标得到较大的提高<sup>[6]</sup>。

本实验从实验室所保存的17株黑曲霉菌株样本中,筛选出一株酶活力最高的内切型菊粉酶菌株,以此菌株作为出发菌株,进行原生质体制备及LiCl诱变研究,以期提高菊粉酶生产菌株的酶活力,旨在为牛蒡的开发利用和低聚果糖的工业化生产提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

从牛蒡种植基地土壤中筛选出的菌株和从中国科学院购买菌株黑曲霉AS3.316作为出发菌株。

牛蒡购自徐州市百惠佳美超市。

菊糖 美国Sigma公司;纤维素酶 天津市诺奥科技发展有限公司;蜗牛酶 福建金田生物科技有限公司;溶菌酶 广东微生物研究所。

### 1.2 仪器与设备

HYG-II回旋式恒温调速摇瓶柜 上海欣蕊自动化设备有限公司;250D恒温光照培养箱 常州国华电器有限公司;SW-CJ-IF无菌操作台 苏州安泰空气技术有限公司;BCD-211KA冰箱 青岛海尔股份有限公司;7230G型可见分光光度计、FA2104N电子天平 上海精密科学仪器有限公司;PC-1000数显式电热恒温水浴锅、GZX-DH-600电热恒温干燥箱 上海跃进医疗器械厂;DL-5低速大容量离心机 上海安亭科学仪器厂;KS-767沙冰机 广州祁和电器有限公司;YXQ-SG41-280手提式压力蒸汽灭菌器 上海医用核子仪器厂。

### 1.3 培养基的配制

查氏培养基:硝酸钠2g、磷酸氢二钾1g、硫酸镁0.5g、氯化钾0.5g、硫酸亚铁0.01g、蔗糖30g、琼脂20g,蒸馏水1000mL,pH自然,用于菌种的保藏;初筛培养基:1mg/mL牛蒡汁3mL,蛋白胨1g、酵母膏1g、琼脂2g,pH5,定容至100mL,用于菌株的初筛;诱导培养基:1mg/mL牛蒡汁10mL,酵母膏2.5g、磷酸氢二钾1.5g,琼脂2g,pH5,定容至100mL,用于菌株的诱导培养;发酵培养基:1mg/mL牛蒡汁7mL,牛肉膏1.6g、磷酸氢二钾0.5g、磷酸氢二铵1.6g、氯化钠0.5g,定容至100mL,用于菌株的发酵培养;再生培养基:硝酸钠2g、磷酸氢二钾1g、硫酸镁0.5g、氯化钾0.5g、硫酸亚铁0.01g、蔗糖30g、氯化钠35.1g、琼脂20g,蒸馏水1000mL,pH自然,用于原生质体的再生培养;诱变培养基:在再生培养基基础上配制0.1、0.3、0.5、0.7g/100mL LiCl的诱变培养基,用于

原生质体的诱变培养。

以上培养基配制好后,在121℃条件下高压灭菌30min。

### 1.4 酶解液的配制

取1/15mol/L的磷酸氢二钠和1/15mol/L的磷酸二氢钾按照体积比1:9配制成pH5.91的PBA高渗缓冲液,其中NaCl浓度为0.6mol/L。

再用PBA高渗缓冲液配制酶解液<sup>[7]</sup>。1g/100mL酶解液的组成为:纤维素酶0.7g/100mL、蜗牛酶0.2g/100mL、溶菌酶0.1g/100mL。

### 1.5 牛蒡汁的制备

鲜牛蒡洗净、去皮、切片,称取湿质量100g,加入80mL 100℃水煮沸灭酶15min后转入沙冰机(功率较大,组织捣碎效果好,代替组织捣碎机)中打浆,用双层100目滤布过滤,滤渣加适量热水(加入水的量要控制在最后的滤液为100mL),重复压滤,混合滤汁定容至100mL(即1g/mL牛蒡汁),pH自然,121℃灭菌30min后备用。

### 1.6 菌种的筛选

#### 1.6.1 内切型菊粉酶生产菌株的初筛

从徐州市沛县河口镇秦庄村牛蒡种植基地腐烂牛蒡根附近采集土壤,称取25g土样,将土样置于加有250mL无菌水和玻璃珠的三角瓶中,充分振荡,使样品充分分散,再用无菌水稀释到 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ 稀释度,取一定量的稀释液加入到初筛培养基上,每个稀释度的溶液接入两个平皿作为对比。于30℃培养箱培养2d,挑取透明圈较大,长势较好的单个菌落接入斜面,30℃视生长情况培养2~6d<sup>[2,5]</sup>。

用划线法将上述接入斜面分离出的菌株进行纯化,挑取单菌落接入斜面,30℃培养2~6d。

将上述纯化后长出的茂密孢子接入初筛培养基,30℃恒温培养2~3d,随时观察其长势,待其长出孢子后,挑选菌落周围透明圈直径与菌落直径之比较大的菌体,接入诱导培养基,30℃恒温培养2~3d,直至长出较好的菌落。

将经过诱导培养得到的菌株接入到装有一定量发酵培养基的250mL三角瓶中,在30℃、150r/min的条件下进行摇瓶培养48h,发酵液经过过滤制备成粗酶液,5000r/min离心5min,取上清液进行酶活力测定。将筛出的菌株接种于查氏培养基试管中,保藏于冰箱里<sup>[5]</sup>。

#### 1.6.2 内切型菊粉酶生产菌株的复筛

菌种活化:将实验室保藏在查氏培养基试管中的菌株接种于初筛培养基试管中,于28℃培养2d,活化2代;再将菌株接种于诱导培养基培养皿中进行诱导培养。

扩大培养:将经过诱导培养好的菌株进行种子扩大培养,从培养皿中刮3环黑曲霉孢子接入装有80mL发

酵培养基的 250mL 三角瓶中, 于 30℃、150r/min 摇床培养 24h。

发酵培养: 经种子扩大培养 24h 后, 从中取 8mL, 加入到装有 72mL 发酵培养基的 250mL 三角瓶中, 于 30℃、150r/min 摇床培养 24h 后测定其发酵酶活力, 从中筛选酶活力高的菌株。

## 1.7 菊粉酶活力的测定

### 1.7.1 葡萄糖标准曲线的制备

分别取葡萄糖标准溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6mL 于 25mL 容量瓶中, 补水至 2.0mL, 然后往各容量瓶中分别加入 DNS 溶液 2.0mL, 摇匀, 沸水浴 5min, 迅速以流水冷却, 定容至刻度, 然后在 540nm 波长处测其吸光度( $A_{540nm}$ ), 以葡萄糖溶液质量浓度为横坐标( $\rho$ ,  $\mu\text{g/mL}$ ), 以吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线为:  $A_{540nm}=0.0143\rho-0.0014(R^2=0.9996)$ 。说明在 8~64  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度范围内, 线性关系好, 相对误差小。

### 1.7.2 酶活力测定

一般认为  $I/S$  值是区分内切酶和外切酶的重要标准 ( $I$  指以菊糖为底物测定的酶活性,  $S$  指以蔗糖为底物测定的酶活性), 若  $I/S > 10$ , 则为内切酶。

内切型菊粉酶活力单位定义为: pH5、50℃条件下, 每分钟水解菊糖生成 1  $\mu\text{mol}$  还原糖所需的酶量为一个酶活力单位<sup>[8-10]</sup>。

$I$  值测定: 发酵液经过 6000r/min 离心 10min, 取一定浓度的酶液 1.0mL, 加 4.0mL 的菊糖溶液, 50℃条件下反应 10min, 用 3,5-二硝基水杨酸法测定产生还原糖的量, 即向各管中加入 3,5-二硝基水杨酸 1.5mL, 混匀, 放入沸水浴中加热 5min, 取出立即用自来水冷却至室温, 加蒸馏水稀释至 25mL, 充分混匀, 在 540nm 波长处测定各管的吸光度, 在以葡萄糖的标准曲线上查出糖含量, 从而计算出酶活力( $I$ )。

$S$  值测定: 与以上测定方法相同, 只是将底物换成蔗糖测定出的酶活力为  $S$ 。

## 1.8 原生质体与再生率的测定

### 1.8.1 菌丝体与原生质体的制备

液体摇瓶培养法: 从初筛培养基上刮 3 环孢子, 置于装有 80mL 发酵培养基的 250mL 锥形瓶中, 于 30℃、150r/min 进行菌丝体培养, 24h 后取一瓶发酵液, 过滤, 收集沉淀, 无菌水洗涤两次, 在无菌滤纸上吸干水分, 称菌丝体湿质量。

取 1g 菌丝体放入装有 20mL 1g/100mL 酶解液的 100mL 锥形瓶中, 在 30℃水浴、100r/min 振荡器中振荡 3h, 用冰浴终止酶解, 趁冷经无菌镜头纸过滤, 滤液以 500r/min 离心 10min, 无菌过滤后用 PBA 溶液冲洗沉淀, 在沉淀中加入 200mL PBA 溶液<sup>[11-12]</sup>。此溶液用于原生质体和再生率的计算之外, 作为原生质体的诱变之用。

### 1.8.2 原生质体与再生率的计算

取 1mL 原生质体菌液用血球计数板对原生质体计数。

$$\text{原生质体菌落数}/(\text{CFU/mL}) = \frac{A}{80} \times 400 \times 10^4 \times n \quad (1)$$

式中:  $A$  为 80 小格内原生质体菌落数  $/(\text{CFU/mL})$ ;  $n$  为稀释倍数。

取 0.1mL 原生质体菌液分别涂布于初筛培养基和再生培养基上, 28℃培养 48h, 然后进行菌落计数计算再生率。

$$\text{原生质体再生率}/\% = 10 \times n \times \frac{B-A}{C} \times 100 \quad (2)$$

式中:  $A$  为初筛培养基上的菌落数  $/(\text{CFU/mL})$ ;  $B$  为再生培养基上的菌落数  $/(\text{CFU/mL})$ ;  $C$  为纯化后每毫升的原生质体数  $/(\text{CFU/mL})$ ;  $n$  为稀释倍数。

### 1.9 原生质体的诱变研究

1) 取 0.1mL 原生质体菌液, 分别加入到质量浓度 0.1、0.3、0.5、0.7g/100mL LiCl 的再生培养基中, 同时用 3 个不加 LiCl 的再生培养基做空白对照, 加入 LiCl 的培养基每个质量浓度做 3 个, 倒置 28℃培养 48h<sup>[13-15]</sup>。按照式(3)计算致死率。

$$\text{致死率}/\% = \frac{B-D}{B} \times 100 \quad (3)$$

式中:  $B$  为再生培养基上的菌落数  $/(\text{CFU/mL})$ ;  $D$  为诱变处理后再生培养基上的菌落数  $/(\text{CFU/mL})$ 。

2) 移入初筛培养基中培养, 观察原生质体再生菌落的直径、颜色、透明圈的大小等菌落生长情况。

3) 选择致死率在 70%~80% 的菌株移入初筛培养基培养, 选择透明大的菌株进行分离, 接入初筛培养基中, 培养, 待孢子生长出来以后, 用接种环刮 3 环孢子于 80mL 发酵培养基的 250mL 三角瓶中进行种子扩大培养, 于 30℃、150r/min 条件摇床培养 24h, 从中取 8mL, 加入到装有 80mL 发酵培养基的 250mL 三角瓶中, 于 30℃、150r/min 条件摇床培养 24h 测酶活力。

4) 选取在上述实验中酶活力最高的菌株, 接入到初筛培养基中, 在 30℃条件下培养 3 代, 分别挑取一定量的孢子转入发酵培养基中, 放入摇瓶柜中, 在 30℃、150r/min、pH5.0 发酵 24h, 测定其菊粉酶的酶活力, 以观察诱变菌株的稳定性。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种的筛选

#### 2.1.1 内切型菊粉酶生产菌株的初筛

将采取的土样筛选了 3 批, 第一批共筛选出来了

39株菌株,第二批共筛选出来了33株,第三批共筛选出来了36株(包括从中国科学院购买菌株黑曲霉AS3.316经过筛选出来的20株菌株),筛选菌株的 $I/S$ 值如表1~3。

表1 第一批初筛菌株的酶活力比值比较  
Table 1  $I/S$  ratio of the first batch of isolated strains

| 菌株编号    | $I/S$ | 菌株编号    | $I/S$ |
|---------|-------|---------|-------|
| A111901 | 6.33  | C122810 | 4.42  |
| A111902 | 5.82  | C122811 | 6.62  |
| A111903 | 1.83  | C122812 | 5.56  |
| A111904 | 2.25  | C122813 | 8.31  |
| A111905 | 2.79  | C122814 | 4.15  |
| A111906 | 5.45  | C122815 | 3.01  |
| B12201  | 8.84  | D081501 | 2.01  |
| B12202  | 4.56  | D081502 | 6.54  |
| B12203  | 3.96  | D081503 | 5.56  |
| B12204  | 7.12  | D081504 | 3.23  |
| B12205  | 6.63  | D081505 | 4.88  |
| C122801 | 7.17  | D081506 | 12.81 |
| C122802 | 2.15  | D081507 | 8.22  |
| C122803 | 14.35 | D081508 | 3.51  |
| C122804 | 5.45  | D081509 | 2.23  |
| C122805 | 8.35  | D081510 | 3.25  |
| C122806 | 3.97  | D081511 | 6.18  |
| C122807 | 1.35  | D081512 | 2.75  |
| C122808 | 6.53  | D081513 | 13.48 |
| C122809 | 8.12  |         |       |

从表1可以看出,其中有3株菌株的 $I/S$ 值超过了10,分别为C122803( $I/S = 14.35$ )、D081506( $I/S = 12.81$ )和D081513( $I/S = 13.48$ )。

表2 第二批初筛菌株的酶活力比值比较  
Table 2  $I/S$  ratio of the second batch of isolated strains

| 菌株编号  | $I/S$ | 菌株编号  | $I/S$ |
|-------|-------|-------|-------|
| 08001 | 6.42  | 08018 | 5.72  |
| 08002 | 7.04  | 08019 | 9.88  |
| 08003 | 5.05  | 08020 | 9.24  |
| 08004 | 4.43  | 08021 | 5.45  |
| 08005 | 4.97  | 08022 | 4.81  |
| 08006 | 5.86  | 08023 | 6.87  |
| 08007 | 7.51  | 08024 | 4.93  |
| 08008 | 4.83  | 08025 | 8.42  |
| 08009 | 11.08 | 08026 | 9.19  |
| 08010 | 4.69  | 08027 | 3.05  |
| 08011 | 7.44  | 08028 | 8.46  |
| 08012 | 5.02  | 08029 | 4.54  |
| 08013 | 12.73 | 08030 | 7.95  |
| 08014 | 7.44  | 08031 | 6.01  |
| 08015 | 9.05  | 08032 | 10.36 |
| 08016 | 7.22  | 08033 | 8.58  |
| 08017 | 1.77  |       |       |

从表2可以看出,其中有3株菌株的 $I/S$ 值超过了10,分别为08009( $I/S = 11.08$ )、08013( $I/S = 12.73$ )和08032( $I/S = 10.36$ )。

表3 第三批初筛菌株的酶活力比值比较  
Table 3  $I/S$  ratio of the third batch of isolated strains

| 菌株编号   | $I/S$ | 菌株编号         | $I/S$ |
|--------|-------|--------------|-------|
| 中科01   | 10.33 | 中科0109       | 5.36  |
| 中科02   | 6.28  | 中科0110       | 7.83  |
| 中科03   | 1.38  | E133131      | 11.42 |
| 中科04   | 4.25  | E133132      | 6.26  |
| 中科05   | 3.67  | E133133      | 5.65  |
| 中科06   | 8.89  | E133134      | 8.81  |
| 中科07   | 7.84  | E133135      | 6.15  |
| 中科08   | 5.64  | F144131      | 11.01 |
| 中科09   | 6.39  | F144132      | 9.01  |
| 中科10   | 9.12  | F144133      | 3.78  |
| 中科0101 | 6.63  | F144134      | 8.72  |
| 中科0102 | 8.41  | F144135      | 4.23  |
| 中科0103 | 2.18  | F144131(2)   | 10.88 |
| 中科0104 | 5.35  | 200508013    | 12.81 |
| 中科0105 | 11.45 | 200508013(A) | 8.22  |
| 中科0106 | 11.35 | 200508013(B) | 12.51 |
| 中科0107 | 10.02 | 01405        | 10.35 |
| 中科0108 | 12.35 | 01406        | 5.378 |

从表3可以看出,其中有11株菌株的 $I/S$ 值超过了10,分别为中科01( $I/S = 10.33$ )、中科0105( $I/S = 11.45$ )、中科0106( $I/S = 11.35$ )、中科0107( $I/S = 10.02$ )、中科0108( $I/S = 12.35$ )、E133131( $I/S = 11.42$ )、F144131( $I/S = 11.01$ )、F144131(2)( $I/S = 10.88$ )、200508013( $I/S = 12.81$ )、200508013(B)( $I/S = 12.51$ )和01405( $I/S = 10.35$ )。

## 2.1.2 内切型菊粉酶生产菌株的复筛

将表1~3中筛选的17株菌株进行活化、扩大培养及发酵培养,每个菌株测定3个平行样的酶活力,结果如表4所示。在17株菌株中,菌株C122803的酶活力最高,为2.78U/mL。因此选取菌株C122803作为出发菌株进行以下研究。

表4 复筛菌株及其酶活力  
Table 4 Endoinulinase activity of screened strains

| 菌株编号    | 酶活力/(U/mL) | 菌株编号         | 酶活力/(U/mL) |
|---------|------------|--------------|------------|
| 中科0108  | 2.40       | 200508013    | 1.68       |
| 08013   | 2.65       | 中科0105       | 2.08       |
| C122803 | 2.78       | F144131      | 1.47       |
| D081506 | 2.72       | 200508013(B) | 1.57       |
| D081513 | 1.95       | 中科01         | 0.16       |
| 08032   | 0.42       | 中科0107       | 0.04       |
| 01405   | 0.70       | F144131(2)   | 1.34       |
| 中科0106  | 1.63       | 08009        | 0.97       |
| E133131 | 1.05       |              |            |

## 2.2 原生质体的制备与再生

菌株C122803在初筛培养基上的菌落数为21CFU/mL,再生培养基菌落数为166CFU/mL,计算出原生质体的再生率为19.33%。

表6 诱变后菌株酶活力、菌落直径和透明圈大小

Table 6 Endoinulinase activity, colony diameter and transparent ring diameter of mutant strains

| 菌株编号         | YY01 | YY02 | YY03 | YY04 | YY05 | YY06 | YY07 | YY08 | YY09 | YY10 | YY11 | YY12 | YY13 | YY14 | YY15 |
|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 酶活力/(U/mL)   | 3.02 | 2.70 | 2.81 | 3.65 | 2.83 | 2.68 | 2.81 | 3.20 | 2.78 | 3.04 | 2.63 | 2.65 | 3.33 | 2.85 | 2.78 |
| 菌落直径/cm      | 1.5  | 0.9  | 1.2  | 1.7  | 1.3  | 0.9  | 1.0  | 1.5  | 1.2  | 1.5  | 0.8  | 1.0  | 1.6  | 1.3  | 1.1  |
| 透明圈直径/cm     | 1.8  | 1.2  | 1.5  | 2.1  | 1.6  | 1.1  | 1.3  | 1.8  | 1.5  | 1.8  | 1.0  | 1.3  | 2.0  | 1.6  | 1.4  |
| 透明圈直径/菌落直径比值 | 1.20 | 1.33 | 1.25 | 1.24 | 1.23 | 1.22 | 1.30 | 1.20 | 1.25 | 1.20 | 1.25 | 1.30 | 1.25 | 1.23 | 1.27 |
| 菌株编号         | YY16 | YY17 | YY18 | YY19 | YY20 | YY21 | YY22 | YY23 | YY24 | YY25 | YY26 | YY27 | YY28 | YY29 | YY30 |
| 酶活力/(U/mL)   | 2.76 | 2.61 | 3.97 | 3.82 | 3.12 | 2.98 | 2.87 | 3.27 | 2.70 | 3.87 | 3.95 | 3.26 | 2.83 | 2.77 | 3.34 |
| 菌落直径/cm      | 1.2  | 0.8  | 2.1  | 1.8  | 1.4  | 1.3  | 1.3  | 1.6  | 1.4  | 1.7  | 1.8  | 1.6  | 0.8  | 1.3  | 1.7  |
| 透明圈直径/cm     | 1.5  | 1.0  | 2.6  | 2.3  | 1.8  | 1.7  | 1.6  | 2.0  | 1.8  | 2.2  | 2.3  | 2.0  | 1.1  | 1.6  | 2.1  |
| 透明圈直径/菌落直径比值 | 1.25 | 1.25 | 1.24 | 1.28 | 1.29 | 1.31 | 1.23 | 1.25 | 1.29 | 1.29 | 1.28 | 1.25 | 1.38 | 1.23 | 1.24 |

### 2.3 原生质体的诱变研究

表5 原生质体诱变菌落数

Table 5 Colony counts of regenerated protoplasts

| 培养基              | 再生培养基 | LiCl 质量浓度/(g/100mL) |       |       |       |
|------------------|-------|---------------------|-------|-------|-------|
|                  |       | 0.1                 | 0.3   | 0.5   | 0.7   |
| 原本质体菌落数/(CFU/mL) | 166   | 75                  | 34    | 24    | 18    |
| 致死率/%            |       | 54.82               | 79.52 | 85.54 | 89.16 |

根据微生物诱变育种的一般规律,致死率在70%~80%之间的诱变菌株,其诱变频率较高、诱变幅度较大,更易得到高突变率的诱变菌株<sup>[16]</sup>。由表5可知,菌株在0.3g/100mL LiCl 诱变培养基中的诱变致死率为79.52%,因此选择0.3g/100mL LiCl 诱变条件做以下实验。

从0.3g/100mL LiCl 诱变培养基中接出菌株培养,选出30株菌落观察菌落生长情况并测定酶活力,结果如表6。在30个菌株中,YY18菌株的酶活力最高,为3.97U/mL,比出发菌株的酶活力(2.78U/mL)提高了1.19U/mL,即42.80%。

### 2.4 诱变菌株的稳定性实验

将YY18号菌株接种于初筛培养基上生长,刮3环孢子于发酵培养基中进行种子扩大培养,再移入发酵培养基中进行发酵培养,连续培养3代,测得酶活力在3.91~3.98U/mL之间,说明YY18菌株经过3代的培养后酶活力浮动较小,表示诱变菌株遗传性能稳定。

## 3 结 论

3.1 从沛县河口镇秦庄村牛蒡种植基地腐烂牛蒡根附近采集土壤,经过初筛、复筛及发酵培养,共筛选出17株I/S大于10的菌株,接种于斜面查氏培养基试管中保藏于冰箱中备用。

3.2 将实验室保藏的17个菌株经过活化、种子扩大培养和发酵培养后测酶活力,得到酶活力最高的菌株为C122803,其酶活力为2.78U/mL。

3.3 将黑曲霉经原生质体制备、再生及诱变后,得到再生率为19.33%,0.3g/100mL LiCl 诱变效果最好,致死率为79.52%。

3.4 选择0.3g/100mL LiCl 诱变下的菌株进行培养,然后选择30株透明圈直径最大的菌株测酶活力,测得酶活力最高为YY18菌株,酶活力为3.97U/mL,比诱变前提高了1.19U/mL,即比出发菌株的酶活力提高了42.80%。

3.5 对YY18菌株进行稳定性实验,经过3代的培养后酶活力浮动较小,表示诱变菌株遗传性能稳定。

### 参考文献:

- [1] 王琳,刘兆普,赵耕毛,等.产菊粉酶菌株的筛选及其产酶条件的优化[J].南京农业大学学报,2007,30(2):73-77.
- [2] 祝彦忠,贾英民,桑亚新,等.黑曲霉U $\gamma$ -2菊粉酶发酵条件的研究[J].中国食品学报,2006(8):58-60.
- [3] 曹泽虹,董玉玮,苗敬芝,等.黑曲霉细胞诱变产菊粉酶菌株选育的研究[J].粮油加工,2010(10):166-169.
- [4] 韦红群,邓建珍,曹建华,等.黑曲霉产菊粉酶发酵条件的研究[J].食品工业科技,2008(11):171-175.
- [5] 罗耀辉,王昭晶.利用牛蒡多糖筛选产菊糖酶菌株的研究[J].福建师范大学学报:自然科学版,2006,22(4):88-91.
- [6] MARUTA Y, KAWABATA J, NIKIR. Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of burdock (*Arctium lappa* L.)[J]. J Agri Food Chem, 1995, 43(10): 2592-2595.
- [7] HAMLYN P F, BRADSHAW R E, MELLON F M, et al. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes[J]. Enzyme Microbial Tech, 1981, 3(4): 321-325.
- [8] 梁艳晖,吴光旭.产菊糖酶菌株的选育及特性研究[J].农产品加工:学刊,2007(6):19-23.
- [9] 唐艳斌,许波,唐湘华,等.产菊粉酶曲霉菌株的筛选和发酵条件的优化[J].饲料研究,2008(7):32-35.
- [10] WANG Zhaojing, LUO Dianhui, LIANG Zhongyan. Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Herichium erinaceus* Pers[J]. Carbohydrate Polymer, 2004, 57(3): 241-247.
- [11] 李荷迪,金志华,张海光,等.纳他霉素产生菌原生质体的制备、再生及紫外诱变[J].工业微生物,2008(6):43-46.
- [12] 张文学,刘春莉,蒋宏.利用原生质体融合和诱变育种技术选育高酶活菌株[J].四川大学学报:工程科学版,2003,35(6):66-70.
- [13] 周礼红,李国琴,王正详,等.红曲霉原生质体的制备、再生及其遗传转化系[J].遗传,2005,27(3):423-428.
- [14] EMERSON S, EMERSON M R. Production, reproduction and reversion of protoplastlike structure in the osmotic strain of *Neurospora crassa*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1958, 44(7): 668-671.
- [15] WERNARS K, GOOSEN T, WENNEKES B N, et al. Cotransformation of *Aspergillus nidulans*: a tool for replacing fungal genes[J]. Mol Genet, 1987, 209(1): 71-77.
- [16] 施巧琴,吴松刚.工业微生物育种学[M].2版.北京:科学出版社,2003:137-146.