纤维素酶产生菌—木霉杂交育种试验初报

生物学系生化微生物专业 纤維素酶研究小组

选育粗生、快长、纤维素酶活高、稳定性好的木霉菌株，是纤维素酶能否广泛应用于生产实践，提高粗饲料营养价值的重要环节。

目前，生产上应用的菌株，凡粗生快长，长势好的一般酶活不高；而酶活稍高的则生长慢、长势差。例如，经多次强烈理化因素处理的绿色木霉E_{A3}——867，酶活较高，但菌种生活力下降、生长慢，孢子稀少，三级制曲开放培养较为困难，在生产上应用有一定局限性。这类菌株如再进一步诱变，酶活仍有提高，但长势越来越差。如通过杂交育种，使遗传物质重新改组，将双亲的优良性状集中结合到杂种个体中，就有可能加强生活力，提高酶活，解决两者之间的矛盾。据此，我们进行了以绿色木霉E_{A3}——867和自选酶活不高但较粗生快长的木霉为出发菌株，先进行诱变处理，提高酶活，再进行杂交，以便使纤维素酶能广泛应用于生产实践，进一步提高粗饲料的营养价值，为大力发展养猪事业作出贡献。

绿色木霉是以分生孢子进行无性繁殖，并具有准性生殖过程，具有与有性生殖一样的遗传重组现象，这是我们用于杂交的依据。但具有准性生殖的木霉，由于体细胞与生殖细胞无明显的区别，木霉两亲本是否已经结合，无法从形态上区别出来，同时由于结合的机率极小，很难从许多菌中挑出结合的菌株。所以，必须选出营养缺陷型才能进行杂交育种。即事先将杂交两亲株分别进行诱变处理，选出不同的营养缺陷型（都不能分别在基本培养基上生长），杂交时，在基本培养基上大量未能结合的两亲本由于不能生长而被淘汰了，只有结合了的细胞才能生长，挑出来后，进一步将异核体诱发成二倍体，再进行制曲、酶活测定，选出粗生快长、酶活高的新菌株。

对霉菌的杂交育种，工作还在进行，现就如何提高菌种酶活、筛选营养缺陷型等方面的工作初报如下。

材 料 与 方 法

甲、诱变部份：

一、菌种

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

试验所用的菌种：E_{A3}——867(由上海植生所提供)。

二、培养基

1、斜面培养基：纤维素粉或葡萄糖20g　琼脂20g
无机盐溶液1000ml　PH5.5

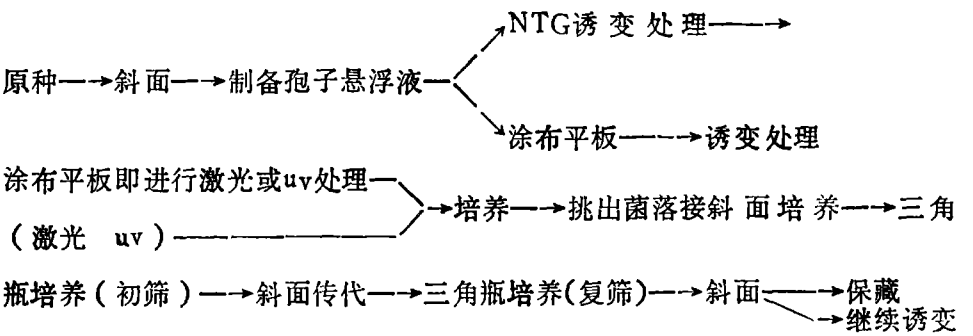
2、无机盐溶液：KH_2PO_4 2.0g　$(NH_4)_2SO_4$ 1.4g
尿素 0.3g　$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3g　$CaCl_2$ 0.3g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.0mg　$MnSO_4 \cdot H_2O$ 1.56mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.4mg　$CoCl_2$ 2.0mg

3、平板分离培养基：脱氧胆酸钠0.2%　其余均同斜面培养基。

4、三角瓶培养基(每瓶用量)：稻草粉　6g　统糠　4g　$(NH_4)_2SO_4$ 0·2g　过磷酸钙浸出液(含量0.5g/ml)　0.2ml　MgSO4　0.005g
水量1.3～1.5倍，　要求混匀后PH　5.0～5.5

三、实验方法

1、方法程序：



2、诱变处理：试验所用的诱变剂有N_2激光、CO_2激光、亚硝基胍(NTG)和紫外线(uv)。各诱变剂除单一处理外，还进行了复合处理。

① N_2激光处理。波长为3371埃。先用无机盐溶液制备10^6的孢子悬浮液，然后将13×3.5mm滤纸条浸于悬浮液中，再取出置于含1%琼脂的平板上，距光源30cm处进行照射，光斑面积为13×3.5mm。激光器的工作气体全部用纯N_2，照射剂量：单脉冲照射10次、30次、50次、70次；重复照射(脉冲重复频率3—4次/秒)1分钟、3分钟、5分钟。激光照射的平均功率为：33～44毫瓦/厘米^2。

② CO_2激光处理。波长10.6微米。方法同N_2激光处理，但放入的滤纸是园片(直径4mm)。照射距离为30cm。光斑面积：直径4mm。照射剂量：2秒、4秒、6秒。照射功率5瓦。

③ 亚硝基胍(NTG)处理。在18×180mm试管中注入9ml分生孢子悬浮液，再加入1mg/ml的亚硝基胍溶液1ml，34°C水浴保温1小时。稀释20倍解毒。

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

④ 亚硝基胍和紫外线复合处理。将孢子悬浮液进行NTG处理后〔剂量及操作同③〕，再将经解毒后的孢子悬浮液涂布在分离平板上，进行不同时间的照射（1分钟、1分半钟、2分钟），光距30cm，温度20°C左右，15瓦紫外灯，处理后的操作均在红光下进行。

⑤ 亚硝基胍和N_2激光复合处理。按③法进行NTG处理并解毒后，再依①法进行N_2激光处理。

3、纤维素酶活力测定：酶液的提取与测定均依照1975年酶解途径全国科研协作会议《关于暂行操作规程和测定方法》进行。

CMC酶活(酶液稀释400倍)

滤纸酶活(酶液稀释100倍)

乙、杂交部份：

一、菌种

1、白$_{24}$号：为EA_3—867经N_2激光、CO_2激光、NTG诱变所得白色变异株。

2、3.2941：绿色木霉，北京微生物研究所提供。

3、东木：我们在东莞县咸水草上分离的野生绿色木霉菌株。

4、EA_3～867：上海植生所提供。

二、诱变剂及缓冲液

1、亚硝基胍

2、磷酸缓冲液(PH6.0)

三、培养基

1、完全培养基：5～6波美度麦芽曲汁，0.5%旦白胨 0.5%酵母膏脱氧胆酸钠0.3% 琼脂2% PH5.5

2、基本培养基：无机盐溶液(配方见甲、培养基部份) 葡萄糖2% 洗涤琼脂2%脱氧胆酸钠0.2% PH5.5

3、液体基本培养基：除不加琼脂和脱氧胆酸钠外，其余成份均同上。

4、三角瓶培养基：配方同诱变部份三角瓶培养基。

四、实验方法

1、筛选营养缺陷型方法程序：菌种→斜面培养→制备孢子悬浮液→亚硝基胍处理→离心→置摇床上饥饿培养→转接于液体基本培养基中置摇床培养$\xrightarrow{\text{加制霉菌素使成100单位/ml}}$→划线接种于完全培养基平板或茄子瓶，经培养后，逐个挑菌落，分别相应接入完全和基本培养基平板上→将基本培养基上不长的对应完全培养基上菌落接斜面→重新逐个检定一次→斜面传代→鉴定属何缺陷→保藏→杂交

2、杂交方法程序：

①测定营养缺陷型回复突变率：营养缺陷型经纯化1～2次后，制成10^5～10^6浓

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

度的孢子悬浮液，涂布基本培养基，以平板上长出的菌落数除以孢子数再乘以100%，得回复突变率%。回变率高的菌株，不宜用于杂交。

②营养缺陷型之间的亲和力测定：将两个营养要求不同的缺陷型用衔接法接种于基本培养基斜面上，如在衔接处形成异核体菌丛(称互养丛)，则表示这两个配对的缺陷型菌株具有杂交亲和力，可以进行杂交，反之则不能杂交。

③杂种的形成与分离：把具有杂交亲和力的两个不同的营养缺陷型，以混合接种法涂布完全培养基（或基本培养基）平板上，待刚长菌丝时用樟脑蒸汽熏（诱发杂合二倍体），待孢子成熟后，用无菌水洗下，洗去沾附的营养并适当稀释，涂布基本培养基平板，长出的菌落数应大于杂交两亲株自发回复突变率的总和，否则不能认为是杂交的结果。

将长出的菌落接斜面，转接三角瓶，进行生长观察和酶活力测定。

选择一些菌株再在基本培养基上进行若干次纯化，排除分离子和不稳定菌株，以获得稳定的二倍体杂种。

结　果　与　讨　论

一、关于酶活提高情况

我们首先将出发菌株 E_{A3}—867分别用四种因素进行了 物理化学诱变，获得绿色变异株D_{31}和白色变异株白$_{24}$，其选育系谱简述如下：

$$E_{A3}\text{—}867 \xrightarrow[N_2\text{激光}]{} N_1$$

$$\begin{cases} \xrightarrow{NTG} A^{19} \xrightarrow{NTG\ uV} D_{31}\text{（绿色）} \\ \xrightarrow{CO_2\text{激光}} C_{20} \xrightarrow{NTG} \text{白}_{24}\text{（白色）} \end{cases}$$

酶活提高情况见表1、表2、表3。

表　1　　酶活单位：　mg/g干曲

时間 / 测定 / 菌种	4 6 小 时		5 8 小 时	
	CMC酶活 稀400倍	泸紙酶活 稀100倍	CMC酶活(PP) 稀400倍	泸紙酶活(FF) 稀100倍
$E_{A3}\sim_{867}$	400	94.1	407	108
A_{19}	338	98.1	412	128
D_{31}	364	112	408	133
C_{20}	393.2	99	424	130
白$_{24}$	404	98	448	136

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

通过表1可以看出：

①制曲培养58小时比46小时酶活有所提高，说明我们诱变的变异株生长缓慢，产酶高峰期推迟

②激光具有能量高度集中，单色性、方向性好等特点，辐射时能产生光、热、电磁场、次生冲击波等，因而激光应用于生物体具有诱发变异的遗传效应。我们利用近紫外（波长3371Å）的N_2激光和红外（波长10.6μ）的CO_2激光对绿色木霉进行诱变处理，取得了一定的诱变效果，酶活比出发菌株有所提高，但由于对诱变剂量及操作技术还未很好掌握，效果不甚明显。然而我们仍认为激光对微生物育种具有它的广阔前景。

③在几次复筛中经常发现有酶活无规则变化的情况，有的初筛时酶活相对较高，而复测几次酶活反而低了，有的初筛相对低些，复筛几次反而高了，通过以后诱变缺陷型的启示，我们认识到酶活提高不大可能是由于菌落不纯、酶活高低混杂，与营养缺陷型的分离原理相同，因为突变往往发生在DNA双链之一单链上（参见下节：4、营养缺陷型的分离），因此在诱变后，必须将所测得酶活高于867的菌株再进行多次平板单菌分离，淘汰酶活低的菌株，才能真正从中筛出高酶活的菌株。

下面是白$_{24}$经多次分离、纯化后菌株酶活〔注1〕提高情况：

表2 稻草粉中培养〔注2〕 酶活单位：mg/g干曲

酶活 培养时间 测定项目 / 菌株	CMC酶活（酶液稀释7000倍）		FP酶活（酶液稀释350倍）	
	3天	5天	3天	5天
白$_{24}$	3045	4170	189	207
E_{A_2}—867	2800	2905	175	175

表3 蔗渣粉中培养5天〔注3〕 酶活单位：mg/g干曲

酶活 测定项目 / 菌株	CMC酶活（酶液稀释1400倍）	FP酶活（酶液稀释350倍）
白$_{24}$	1490	145
E_{A_2}—867	1141	135

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

从表2表3可看出，经多次分离、纯化的白$_{24}$菌株，酶活比初分离时又有较大提高，尤其在稻草粉中培养，白$_{24}$的CMC酶活比出发菌株 E_{43}—867提高42%，FP酶活提高18.2%。

〔注1〕 表2、表3酶活测定依照1976年《利用微生物提高粗飼料营养价值》全国科研协作会对木霉菌种纤維素酶活测定方法的建議。

〔注2〕 稻草粉培养基配方：稻草粉100%，硫铵水(1%)250%，PH(自然)6.5

〔注3〕 蔗渣粉培养基配方：蔗渣：麸皮=7:3，水190%，

KH_2PO_4 0.1%，　　$(NH_4)_2SO_4$ 2%，

$MgSO_4$ 0.05%　　PH 自然.

均于150ml三角瓶装干料5 g 于28℃培养3—5天，提酶测定。

二、营养缺陷型菌株的诱发、分离和测定

1、出发菌株的性状

为了进行杂交育种，我们选择了各自特点明显的菌株，共分为二类：

①酶活较高的：D_{31}（绿色菌株），白$_{24}$（白色菌株）

②粗生快长的：东木，3.2941

2、NTG诱变剂量

根据我们多次摸索，NTG作用浓度以1mg/ml为宜，此时致死率在95～99%之间，当NTG作用浓度增至3 mg/ml时，则致死率几乎达到百分之百而无法检出存活菌落。

3、制霉菌素用量

制霉菌素在液体三角瓶中作用浓度50～100单位/ml均可，能将非缺陷型萌发孢子杀死90%。

4、营养缺陷型的分离

在NTG诱变、制霉菌素处理涂平板长出菌落之后，必须将长出的菌落孢子重新进摇瓶进行第二次分离，加制霉菌素进行第二次处理，然后涂平板方能检出营养缺陷型，若不进行第二次分离则几乎不能检出缺陷型，这是因为绿色木霉虽是单核孢子，但其单倍体细胞核中的遗传物质DNA则是双链螺旋结构，当受到诱变时，往往是一条单链上某一碱基发生突变，而互补的另一条单链并未突变，随着细胞分离，DNA半保留复制必将导致菌丝中一部份核是变异了的而另一部份则未变异，在菌落上生长出的孢子也必将是缺陷型与非缺陷型混杂，因而在点种鉴定中，缺陷型被掩盖而无法表现出来，在第二次分离后这个问题便得到了解决，当然这并不否定DNA两条链同时发生营养缺陷型突变的可能性，但其出现的机率应是一条单链突变率的乘积。即假使一条DNA单链缺陷型突变率是10^{-2}，则两链同时发生突变

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的可能性就是10^{-4}，若在一万个菌落中去挑一个是非常困难的。

5、选用颜色变异株为出发菌株对诱发缺陷型的作用：出发菌株D_{31}（绿色）与白$_{24}$（白色）在同样条件诱变下，白$_{24}$产生42株营养缺陷型，而D_{31}才产生3株缺陷型。我们认为，白$_{24}$本身已是颜色变异株，变异明显。选择已有明显变异的菌株为出发菌株可能对诱发营养缺陷型突变比较敏感。

6、营养缺陷型菌株的营养鉴定：所诱出的营养缺陷型菌株，用基本培养基分别加核酸、旦白胨（高纯度）和维生素，测定核酸、氨基酸和维生素缺陷型，用氨基酸生长谱法分九组测定20种氨基酸缺陷型。用于杂交的16株缺陷型测得的营养需要如下表.

缺陷菌株	白缺3	白缺9	白缺19	白缺17	白缺25	白缺31	白缺20	白缺39
营养需要	甘氨酸	組氨酸	半胱氨酸	精氨酸	天門冬氨酸	丙氨酸	苯丙氨酸	亮氨酸
缺陷菌株	白缺33	白缺49	白缺45	白缺34	白缺43	白缺57	3—2192缺7.10.	东木缺1—9
营养需要	酪氨酸	天冬酰胺	脯氨酸	甲硫氨酸	結頡氨酸	谷氨酰胺	甲硫氨酸	AMP

三、杂 交

下面是一次杂交试验的结果：

1、营养缺陷型出发菌株的性状：亲株的性状见上节“1、出发菌株的性状。”粗生的菌株其缺陷型仍保持了粗生快长的特性，但原来酶活高的菌株D_{31}和白$_{24}$所诱变的缺陷型，其酶活都比亲株低，通过几批试验和参考灰黄霉素菌种的杂交育种经验分析，这种现象是营养缺陷型本身所造成，并不预示杂交后成为原养型杂种时酶活也低。因此不应以营养缺陷型酶活高低为尺度来选择杂交菌株，而应以亲株的酶活为准，在诱发大量缺陷型后杂交时，杂交双方缺陷型菌株应保持一定数量和尽可能多的组合，以免受杂交亲和力影响而得不到原养型杂种。

2、营养缺陷型之间亲和力的测定：我们选出25株营养缺陷型（20株高酶活的D_{31}、白$_{24}$缺陷型和5株粗生的东木，3.2941缺陷型）进行杂交亲和力的测定，共做100组互养丛试验，结果有10组明显互养，另有9组怀疑互养（待进一步测定证实）。

3、杂交途径及结果：我们试验了两条杂交途径，即在完全培养基(CM)上和在基本培养基上（MM）杂交。杂交的营养缺陷型株共12株，杂交组合42组。结果是在CM平板上杂交均长满菌落，经MM上分离，在白$_3$×东$_4$组合平板上长出原养型杂合二倍体菌落；在MM上杂交有7个组合长出少数异核体及杂合二倍体菌落，再

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

经MM分离4个组合长出原养型杂合二倍体菌落（白$_3$×东$_6$），回复突变要求均符合。可见这两条途径对杂交均适用，木霉的杂交育种也是可行的。

4、筛选杂合二倍体菌株的酶活（待测）。

小　结

一、诱变育种与营养缺陷型突变株的获得都应进行二次分离。

二、营养缺陷菌株的酶活比亲株低是正常现象，不影响杂交后原养型杂种的酶活。

三、选用颜色变异株对于提高酶活，诱发缺陷型及杂交育种都有较明显效果。

四、杂交用CM与MM两种途径均可。

五、杂交育种工作尚在进行，有关的一些问题尚不能深入讨论。经过实线，我们认为木霉杂交育种是可行的，但应尽可能使杂交缺陷型菌株与组合保持一定的数量。

参考资料

〔1〕盛祖嘉，微生物遺传学基础，上海科学技术出版社，　1963。
〔2〕微生物育种学术討論会文集，科学出版社，　1975。
〔3〕《工业技术資料汇編》第四辑，微生物的选种与育种，上海人民出版社，　1972。
〔4〕陈駒声　等譯，眞菌生理学，V.W.柯克兰，科学出版社，　1963。
〔5〕中国科学院微生物研究所，常見与常用眞菌，科学出版社，　1973。
〔6〕方宗熙，細胞遺传学，科学出版社，　1967.
〔7〕Advances in Applied Microbiology 9: 93—184　(1967)。
〔8〕Biotechnology and Bioengineering 15(6):11　(1973)。

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net