

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20231205002

# 解淀粉芽孢杆菌 BA-2 原生质体的制备及 纤维素酶高产突变菌株筛选

温冬灼<sup>1,2</sup>, 张智<sup>1\*</sup>, 张晓彤<sup>1</sup>

(1. 东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040; 2. 长春金赛药业有限责任公司, 长春 130012)

**摘要:** **目的** 确认解淀粉芽孢杆菌 BA-2 (*Bacillus amyloliquefaciens* BA-2) 原生质体制备的最佳条件, 并对其菌株进行复合诱变筛选获得耐高温性状产纤维素酶菌株。**方法** 通过探究菌龄、溶菌酶浓度、酶解时间、酶解温度、渗透压稳定剂的 pH、再生培养基类型和培养方式等考察原生质体制备与再生条件的影响因素, 确定其最优条件。并用紫外线对原生质体进行诱变, 获得的再生突变菌株作为出发菌株进行后续诱变处理, 采用化学诱变剂硫酸二乙酯处理菌株, 设置培养温度梯度筛选菌株。**结果** 解淀粉芽孢杆菌 BA-2 原生质体制备的最优条件为菌龄 8 h, 溶菌酶质量浓度 1.5 mg/mL, 酶解时间 65 min, 酶解温度 37°C, 渗透压稳定剂 pH 6.5。在此条件下, 解淀粉芽孢杆菌原生质体的形成率为 98.85%±0.26%, 再生率为 57.39%±0.76%。经过复合诱变获得突变菌株 BA-DES4 在培养温度 55°C 下酶活达到(76.58±1.19) U/mL, 滤纸酶活较出发菌株 BA-2 提高 24.5%。**结论** 本研究获得了解淀粉芽孢杆菌 BA-2 原生质体制备的最佳条件, 并通过复合诱变筛选获得耐高温性状产纤维素酶菌株 BA-DES4, 该菌株稳定性强、适应性好, 具有开发成为工业化生产纤维素酶的微生物潜力, 突变菌株产酶条件有待进一步研究, 以满足于工业化生产的需求。

**关键词:** 解淀粉芽孢杆菌; 原生质体; 诱变; 纤维素酶

## Protoplast mutagenesis was used to select and breed mutant strains with high yield of cellulase

WEN Dong-Zhuo<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhi<sup>1\*</sup>, ZHANG Xiao-Tong<sup>1</sup>

[1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;  
2. Changchun GeneScience Pharmaceutical Co., Ltd. (GenSci), Changchun 130012, China]

**ABSTRACT: Objective** To identify the optimum conditions of plasmid preparation of *Bacillus amyloliquefaciens* BA-2, and to select its strains by complex mutagenesis to obtain cellulase resistant strains. **Methods** The influencing factors of the conditions in the preparation and regeneration of protoplasts were examined by exploring the age of the bacteria, lysozyme concentration, enzyme digestion time, enzyme digestion temperature, pH of the osmotic pressure stabilizer, regeneration medium type and cultivation method to determine the optimal conditions.

基金项目: 黑龙江省“揭榜挂帅”科技攻关项目(2021ZXJ03B05-4)

Fund: Supported by the Heilongjiang Province Science and Technology Research Project (2021ZXJ03B05-4)

\*通信作者: 张智, 博士(后), 教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品发酵, 植物生物转化, 功能食品等研究。E-mail: Idzhangzhi@163.com

\*Corresponding author: ZHANG Zhi, Post Doctor, Professor, College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China. E-mail: Idzhangzhi@163.com

And the protoplasts were mutagenized with ultraviolet light, and the regenerated mutant strains obtained were used as the starting strains for the subsequent mutagenesis treatment, and the strains were treated with the chemical mutagen diethyl sulfate, and the culture temperature gradient was set to screen the strains. **Results** The optimal conditions for the preparation of *Bacillus amyloliquefaciens* protoplasts were 8 h of bacterial age, lysozyme concentration of 1.5 mg/mL, enzyme digestion time of 65 min, enzyme digestion temperature of 37°C, and osmolality stabilizer pH 7.0. Under these conditions, the formation rate of *Bacillus amyloliquefaciens* protoplasts was 98.85%±0.26%, and the regeneration rate was 57.39%±0.76%. The mutant strain BA-DES4 was obtained after compound mutagenesis to reach an enzyme activity of (76.58±1.19) U/mL at an incubation temperature of 55°C, and the filter paper enzyme activity was increased by 24.5% compared with that of the departure strain BA-2. **Conclusion** In this study, the optimal conditions for the preparation of the protoplasmic system of *Bacillus amyloliquefaciens* BA-2, and the high-temperature-resistant trait cellulase-producing strain BA-DES4 through compound mutagenesis screening are obtained, which is stable and well-adapted, and has the potential to be developed into a microorganism for the industrial production of cellulase, and the conditions for the production of enzyme by mutant strains need to be further investigated to satisfy the needs of the industrialization of the production.

**KEY WORDS:** *Bacillus amyloliquefaciens*; protoplasts; mutagenesis; cellulase

## 0 引言

纤维素酶广泛存在于天然的微生物中,天然微生物主要为中性细菌、真菌和少数的放线菌。自然界中产纤维素酶的菌株较多,但这些野生菌株的产量并不高。仅仅依靠分离筛选很难获得高产纤维素酶菌株,如罗奉奉等<sup>[1]</sup>采用确定唯一碳源的方法,通过对分离筛选出的菌株 HJC-79 进行产酶条件优化,其滤纸酶活仅为 1.53 U/mL,这些菌株直接应用于实际生产,经济效益较差。纤维素酶高产菌株通常需要定向培养才能获得。紫外(ultraviolet, UV)诱变和硫酸二乙酯(diethyl sulfate, DES)诱变是选择纤维素酶高产菌株并获得优良性状的常用诱变方法,可有效改善突变菌株目标代谢产物的产量<sup>[2-3]</sup>。此外,通过复合诱变和进一步探讨原生质体再生构建突变体是可行的,也是选育高产纤维素酶菌株的有效技术。张亚青等<sup>[3]</sup>通过紫外诱变原生质体方式选育高产  $\gamma$ -氨基丁酸菌株,结果表明,3 株突变菌株高产  $\gamma$ -氨基丁酸含量较出发菌株均有大幅度增加。谢定刚等<sup>[4]</sup>探究原生质体紫外诱变方式选育高产抗菌脂肽,研究结果表明,突变株 mutHS-539 发酵上清液对金黄色葡萄球菌抑菌直径较出发菌株明显增大,并且提取获得的抗菌脂肽产量较出发菌株提高了 40%。

由于生物学特性差异,不同细菌的原生质体的制备与再生条件也有所不同,合适的制备条件有利于提高原生质体的形成率,从而提高转化效率<sup>[5-7]</sup>,目前有关本试验筛选获得的解淀粉芽孢杆菌原生质体制备与再生的最适条件,尚未明确。因此,本研究利用原生质体无细胞壁、易接受外界物理化学因素影响,从而增加它们对外部环境的敏感性,这也导致更高的诱变率,并有利于突变菌株的筛选。将筛选获得的产纤维素酶的解淀粉芽孢杆菌

BA-2 作为出发菌株,对解淀粉芽孢杆菌的原生质体制备和再生条件及诱变进行了研究,建立高效的解淀粉芽孢杆菌原生质体制备和再生体系。用紫外线对原生质体进行诱变,获得的再生突变菌株作为出发菌株进行后续诱变处理,采用化学诱变剂 DES 处理菌株,设置培养温度梯度筛选菌株,以达到获得耐高温性状产纤维素酶菌株的目的。探索菌株研究潜力,为后续开发成为工业化生产纤维素酶的微生物潜力,纤维素酶的生产利于其在工业水平应用研究提供理论基础,实现基因组重组技术筛选优良性状菌株提供试验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 材料

解淀粉芽孢杆菌 BA-2 (*Bacillus amyloliquefaciens* BA-2),由东北林业大学发酵实验室筛选保藏,纤维素酶活力为 61.5 U/mL。

#### 1.1.2 试剂

蛋白胨、酵母粉、牛肉膏(生物试剂,北京奥博星生物技术有限公司);硫酸镁、氯化钠、柠檬酸、柠檬酸钠、蔗糖、磷酸二氢钾、氯化钙、氯化镁、L-色氨酸、甘露醇(分析纯)、DNS 试剂(生物试剂)(天津市天力试剂有限公司);溶菌酶、顺丁烯二酸、聚乙二醇(PEG-6000)(分析纯,上海麦克林试剂公司)。

### 1.2 仪器与设备

JA2003 分析天平(感量 0.1 mg,上海良平仪器仪表有限公司);BS 124 S 电子天平(感量 0.01 g,沈阳龙腾电子仪器有限公司);DHG-9240 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限

公司); SJ-3 F pH 计(上海圣科仪器设备有限公司); TGL-16 G 台式离心机(上海科雳仪器设备有限公司); DK-98-II A 电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司); RT-6000 酶标仪(深圳雷杜生命科学有限公司); KQ-300 DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); UV-5500 PC 紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司)。

### 1.3 培养基种类及配方

#### 1.3.1 发酵产酶培养基

分别称量蛋白胨 3 g, 酵母粉 0.5 g, 硫酸铵 2.0 g, 磷酸二氢钾 4 g, 氯化钠 0.3 g, 硫酸镁 0.3 g, 羧甲基纤维素钠 20 g, 量取蒸馏水 1000 mL 搅拌溶解, 121°C 灭菌 20 min。

#### 1.3.2 再生培养基 1

分别称量牛肉膏 0.5 g, 酵母膏 0.5 g, 蛋白胨 1.0 g, 氯化钠 0.5 g, 葡萄糖 1.0 g, 蔗糖 0.05 g, 氯化镁 0.02 g, 琼脂 2.0 g, 量取蒸馏水 100 mL 搅拌溶解, pH 7.0。

#### 1.3.3 再生培养基 2

分别称量蛋白胨 1.0 g, 酵母浸粉 0.5 g, 牛肉膏 0.5 g, 氯化钠 0.5 g, 氯化镁 0.4 g, 顺丁烯二酸 0.23 g, 甘露醇 9.11 g, 氯化钙 0.03 g, L-色氨酸 0.2 g, 琼脂粉 2.0 g, 量取蒸馏水 100 mL 搅拌溶解。

#### 1.3.4 再生培养基 3

分别称量酵母膏 0.5 g, 胰蛋白胨 1.0 g, 氯化钠 0.5 g, 琼脂 2.0 g, 量取蒸馏水 100 mL 搅拌溶解, pH 7.0。

#### 1.3.5 试剂配制

制备原生质体稳定液<sup>[8]</sup>(名为 SMM 液): 分别配制蔗糖 0.5 mol/L, 0.02 mol/L 氯化镁, 0.02 mol/L 氯化钙, 顺丁烯二酸 0.02 mol/L, 充分溶解后调整 pH 6.0; 高渗磷酸缓冲液: 配制浓度为 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液, 调整 pH 为 7.0; 配制 0.7 mol/L 甘露醇(名为 P 液); 溶菌酶: 用稳定液将称量的 0.05 g 溶菌酶慢慢溶解, 定容于 10 mL, 用规格为 0.22 μm 的无菌过滤器, 达到过滤除菌的目的, 分装成小份, 用于后续试验。

## 1.4 原生质体制备与再生

### 1.4.1 菌悬液制备

取 0.9% 的生理盐水 10 mL, 加入到经过培养温度 50°C 条件下活化 48 h 的出发菌株的菌液中, 缓慢旋转数次混合悬浮液, 使其悬液混匀, 250 mL 锥形瓶(需要内置玻璃珠)中装入无菌生理盐水 30 mL, 将均匀的悬浮液加入锥形瓶中, 报纸在锥形瓶口盖封, 50°C, 160 r/min 摇床振荡 30 min, 得到均匀的悬液, 即细菌菌悬液<sup>[9]</sup>。

### 1.4.2 菌株生长曲线

将菌株 BA-2 接种于 200 mL 液体发酵培养基中进行活化, 报纸与纱布盖封瓶口, 50°C, 160 r/min 培养 3 d, 每 6 h 测定菌株生长情况, 采用分光光度法(OD<sub>540 nm</sub>)测定不同培养时间菌株的酶活性。每个时间点平行测定 3 次, 取平均值。

### 1.4.3 原生质体的制备

吸取对数生长期的菌液 5 mL, 转速为 5000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用无菌生理盐水, 对离心后的菌体进行洗涤, 加入适量 P 液将菌体重新悬浮。加入溶菌酶, 轻轻缓慢的旋转几次, 使其与菌体更好的接触, 达到更好的酶解效果, 放入恒温水浴锅中持续酶解, 需要定期取样。显微镜观察原生质体形成状态, 若观察到绝大部分细胞呈椭圆或球状时, 此时应当终止反应。待酶解结束后, 5000 r/min 离心 10 min 去除反应液, 将得到的原生质体收集保存, 为了达到去除酶溶液的效果, 避免酶解过于完全, 选用 P 液洗涤 2 次。最后, 重新悬浮时需要加入等量的 P 液, 储存备用用于后续实验<sup>[10]</sup>。用 SMM 溶液进行系列稀释后涂布到再生培养基中, 记录菌落数, 原生质体的形成率<sup>[11]</sup>计算如公式(1)。

$$\text{形成率}/\% = \frac{\text{总菌落数} - \text{酶处理后菌落数}}{\text{酶处理后菌落数}} \times 100\% \quad (1)$$

### 1.4.4 紫外诱变原生质体

在避光的超净工作台中, 将原生质体悬浮液放置在培养皿中, 15 W 紫外灯管应当提前预热 15 min, 距离紫外线灯管保持 30 cm 对原生质体悬浮液进行不同照射时间的辐射处理, 用 SMM 进行系列稀释, 稀释后涂布到高渗再生培养基平板上, 光照结束后, 立即放入避光培养箱中<sup>[12-13]</sup>, 倒置培养 3~5 d 直到再生菌株生长出来<sup>[14-16]</sup>。对照组为未经紫外诱变处理的原生质体再生的菌落数, 经稀释后并对涂布到产酶培养基平板上的菌落进行计数。致死率计算如公式(2)。

$$\text{致死率}/\% = \frac{\text{对照菌落数} - \text{处理菌落数}}{\text{对照菌落数}} \times 100\% \quad (2)$$

### 1.4.5 原生质体再生

分别用 SMM 和蒸馏水进行梯度稀释经纯化过的原生质体, 涂布于再生培养基上(为达到培养基去除水分的效果, 将再生培养基提前一天倒置放置)恒温培养, 对再生培养基上的菌落进行计数并计算再生率<sup>[17-18]</sup>, 计算如公式(3)。

$$\text{再生率}/\% = \frac{\text{再生菌落数} - \text{酶处理后菌落数}}{\text{总菌落数} - \text{酶处理后菌落数}} \times 100\% \quad (3)$$

## 1.5 不同因素对原生质体形成与再生的影响

探讨不同的因素对原生质体形成与再生的影响, 选取不同菌龄的菌株、酶解时间、酶解温度、溶菌酶的浓度、渗透压稳定剂的 pH 的条件下, 制备解淀粉芽孢杆菌原生质体。探究 3 种组分不同的再生培养基对原生质体再生效果的影响<sup>[19-20]</sup>。

## 1.6 诱变菌株筛选

### 1.6.1 诱变原生质体再生菌株筛选

采用兼性厌氧的培养方式, 设置培养温度条件(42、44、46、48、50°C), 观察菌株生长情况, 挑取刚果红透明

圈较大的再生菌株,进行纯化后接种到斜面保存培养基中,通过对再生菌株进行液体培养后进行纤维素酶活力测定,从而获得在 50℃培养条件下存活并产纤维素酶的菌株。

### 1.6.2 硫酸二乙酯诱变

以经过紫外诱变原生质体筛选获得的再生菌株作为最终出发株,分别采用两组方式不同诱变处理确定 DES 诱变剂浓度及诱变的所用时间。不同时间的诱变菌株进行培养:吸取菌悬液 5 mL,缓慢向其中加入磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0),加入终质量浓度为 2 mg/mL 的 DES 诱变剂,恒温条件下培养,菌株要经过不同时间的振荡处理(设置时间为 0、30、60、90、120 min),最后加入 25% 的硫代硫酸钠标准溶液,即可终止该反应<sup>[21-23]</sup>;不同浓度下的诱变处理:分别设定 DES 质量浓度(1、2、3、4 mg/mL)处理时间为 30 min。其他操作同上(经多次试验以在 55℃条件下存活并产纤维素酶的菌株)<sup>[24]</sup>。

### 1.6.3 硫酸二乙酯诱变菌株筛选

采用兼性厌氧的培养方式进行培养,设置培养条件(51、52、53、54、55℃),挑取刚果红平板 D/d 值较大的菌株,采用发酵产酶培养基液体培养 48 h,滤纸酶活法测定纤维素酶活力复筛目的菌株<sup>[25-27]</sup>。

### 1.6.4 遗传稳定性

将诱变后筛选出的突变菌株接种于发酵产酶培养基中,经 3 组平行试验,分别在 55℃下培养 48 h,测试产酶能力。连续传代及产酶试验 8 批次,以确定该突变菌株的遗传性能是否稳定。

### 1.6.5 酶活力的测定

通常由滤纸酶活力(filter paper activity, FPA)来反映纤维素酶的总活力<sup>[28-29]</sup>。吸取 0.5 mL 粗酶液来测定纤维素酶活力,以滤纸 50 mg 作为底物,取 4 支 20 mL 具塞试管,分别加入酶液 0.5 mL 和 pH 为 4.8 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 1.5 mL。在其中一个试管内加入 1.5 mL 3,5-二硝基水杨酸(DNS 试剂)作为对照组。将 4 支试管分别放入到 50℃的水浴锅中,预处理 10 min 后,加入滤纸 50 mg,并于该温度下反应 60 min,取出样品后在每个样品内立即加入 2.0 mL DNS 试剂,进行沸水浴 5 min,取出后立即将其冷却至室温,补充蒸馏水定容至 15 mL,并通过分光光度计测出每个样品的吸光度。每个样品平行测 3 次,取平均值。测得的 OD 值,通过绘制的葡萄糖标准曲线进行对比,换算成葡萄糖浓度。每小时底物产生 1 μmol 葡萄糖所需酶量为一个酶活力单位(U),FPA 计算如公式(4):

$$FPA = \frac{M \times V \times 5.56}{A \times B \times T} \quad (4)$$

式中:  $M$ : 葡萄糖含量(mg);  $V$ : 定容体积(mL);  $T$ : 反应时间(h);  $A$ : 加酶量(mL);  $B$ : 底物质量(mg); 5.56 为 1 mg 葡萄糖底物物质的量(μmol)。

## 1.7 数据处理

试验中的数据均平行测定 3 次,以平均值±标准偏差表示,基础数据统计采用 Excel 2019 软件,作图采用 Origin 8.5 软件,显著性分析采用 SPSS 19.0 软件完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的生长曲线

由图 1 可知,菌株经活化后,大约培养 12 h 进入对数生长期,24 h 菌体生长较快,培养时间持续达到 24 h 后,菌体生长速度变慢趋于平稳时,酶活性才开始迅速升高,但两者不是同时达到最大值。菌株培养时间达到 48 h 时,OD 值开始呈现缓慢降低趋势,酶活力达到峰值,酶活最高达到(61.43±1.37) U/mL。酶的产生和 OD 值的升高相比较具有滞后性,因此,菌株发酵时间选取应优先考虑在其对数生长稳定期末,衰亡期初。

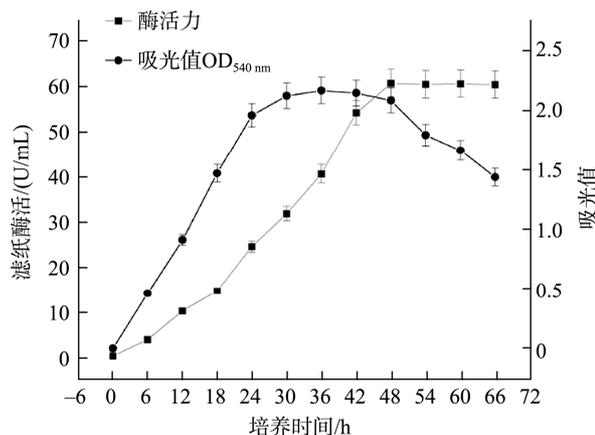


图1 菌株生长曲线及酶活力曲线  
Fig.1 Strain growth curves and enzyme activity curves

### 2.2 原生质体制备

酶解液对菌丝酶解时间的长短会影响细胞壁被裂解的程度,从而使原生质体制备的有效性受到极大影响,最终原生质体的转化效率会降低。所以需要采用不同的酶解时间,来观察菌丝的形态。从图 2 可以看出,在酶分解的早期,原生质体通过细菌的一端缓慢地被释放,在酶分解的过程中,菌丝明显缩短,部分细胞被酶解而分离开,少数呈游离状,部分细胞仍相连聚集状;在酶解后期时,此时的原生质体呈现中部透亮,大小更均匀、圆润,出现单个的原生质体状态。

### 2.3 不同因素对原生质体形成与再生的影响

#### 2.3.1 菌龄对原生质体形成与再生的影响

当菌体处于不同的阶段时,对环境的敏感性是完全不同的。分析图 3 可知,培养时间达到 8 h 时,形成率维持在 98.79%±0.46%以上,菌体培养 12、16 h 时,原生质体

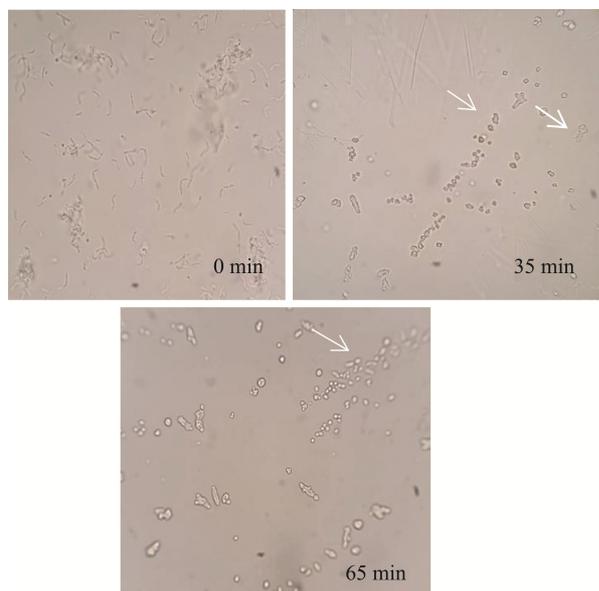


图2 不同酶解时间形态图( $\times 5000$ )

Fig.2 Morphological map of enzymolysis at different time ( $\times 5000$ )

再生率有所下降。菌体细胞在稳定期或后期阶段, 其细胞的形态、生理特性逐渐趋于稳定, 且细胞壁保持高度完好的状态, 酶解效率下降, 导致其形成率有所下降。由此可知, 菌龄不同的细胞, 其细胞壁的厚度和生理构造都有一定的差别, 而菌龄越短的细菌, 酶解虽方便但得到的细菌数量越少。菌龄时间过长的菌体细胞, 随着时间的增加其细胞壁厚度也在不断增加, 严重影响到原生质体产量。综上所述分析, 应采用培养至 8 h 的菌体用于后续试验。

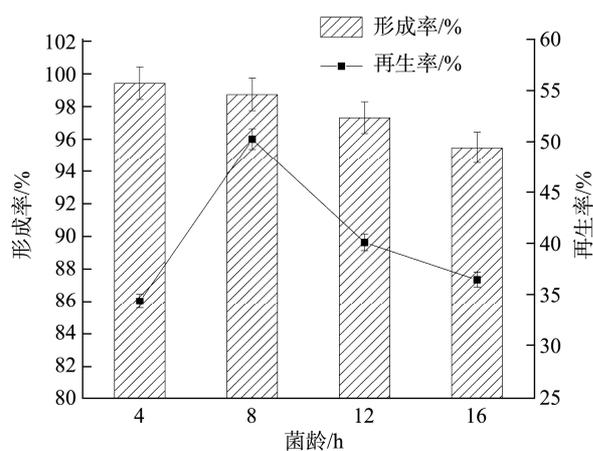


图3 不同菌龄的菌株对原生质体形成和再生的影响

Fig.3 Effects of different age strains on protoplast formation and regeneration of parental strains

### 2.3.2 酶解时间对原生质体形成与再生的影响

在 37°C 水浴条件下, 测试在溶菌酶质量浓度为 1.5 mg/mL 时, 不同酶解时间(35、45、55、65、75 min)下, 原生质体的形成率与再生率的变化差异。由图 4 可得, 在酶解的

前 65 min 内, 原生质体的形成率和再生率大幅度提高, 75 min 时再生率骤然下降到 32.59%±0.69%。该菌的再生效率明显降低, 分析导致其再生效果大幅度下降的原因, 主要是由于酶解的时间逐渐延长, 细胞脱壁面积较大、原生质体化程度较高, 使脱壁细胞在再生过程重新合成细胞壁难度加大, 进而部分细胞失去了再生的能力<sup>[19]</sup>。综上, 最优酶解时间应控制在 65 min。

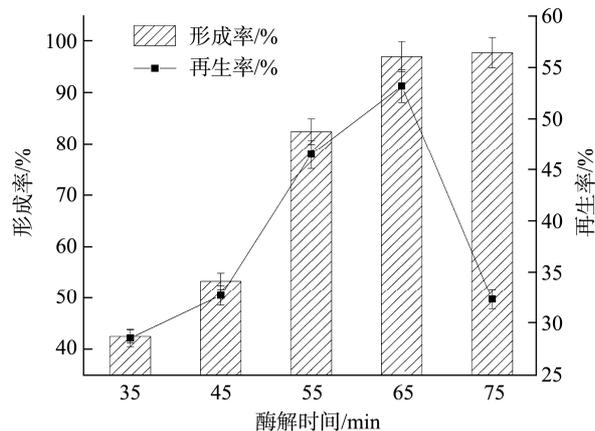


图4 酶解时间对原生质体形成与再生的影响

Fig.4 Effects of enzymatic digestion time on the formation and regeneration of protoplasts

### 2.3.3 酶解温度对原生质体形成与再生的影响

当溶菌酶终质量浓度为 1.5 mg/mL, 测试在不同酶解温度(27、32、37、42°C)下进行 65 min 酶解时形成率与再生率差异。分析图 5 可得, 温度达到 42°C 时, 形成率达到 99.38%±0.09%, 然而, 再生率出现急剧下降, 仅仅达到 26.57%±0.43%; 达到 37°C 时, 形成率与再生率却大幅增加, 再生率保持在较高水平(为 42°C 下的 2.14 倍)。综合分析, 37°C 作为酶解温度比较合适。任何一种酶都有它的最佳作用温度, 温度太高或太低, 都会使反应时间延长, 造成损伤, 使原生质体难以再生。

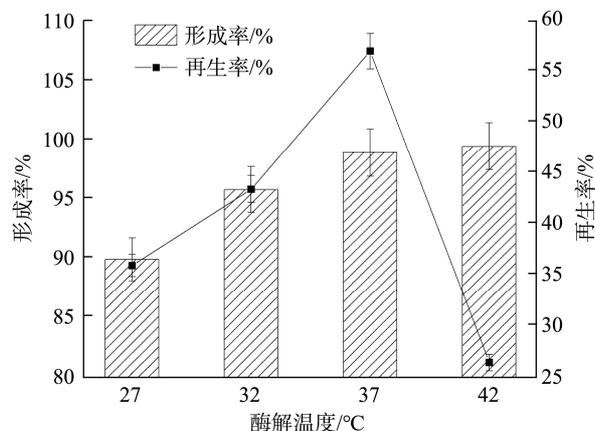


图5 酶解温度对原生质体形成与再生的影响

Fig.5 Effects of enzymatic digestion temperature on the formation and regeneration of protoplasts

### 2.3.4 溶菌酶质量浓度对原生质体形成与再生的影响

分析图 6 可知,当溶菌酶质量浓度达到 4.5 mg/mL 时,形成率随浓度的增加逐渐增大,即解淀粉芽孢杆菌原生质体形成率达到最高,为  $98.07\% \pm 0.12\%$ ,但再生率下降显著,仅为  $27.06\% \pm 0.35\%$ ,分析其原因,可能是由于酶的浓度太高,使细胞壁处于完全破裂的状态,此时细胞难以重新生成细胞壁,同时也会对细胞造成损伤。相比之下,质量浓度达到 1.5 mg/mL 时,再生率为  $53.68\% \pm 0.21\%$  是质量浓度为 4.5 mg/mL 时的 1.98 倍。综合考虑,选取溶菌酶质量浓度为 1.5 mg/mL 进行解淀粉芽孢杆菌酶解。

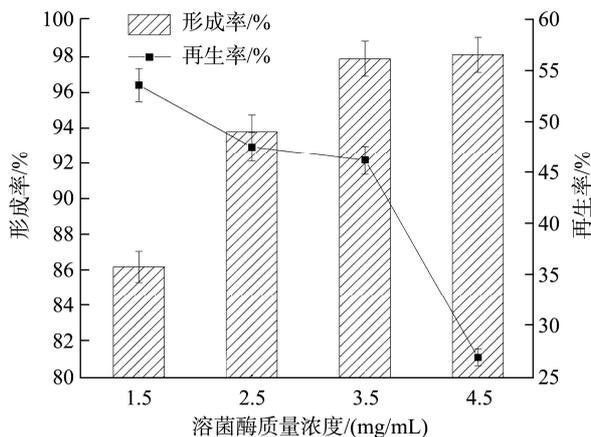


图6 溶菌酶质量浓度对原生质体形成与再生的影响

Fig.6 Effects of lysozyme mass concentration on the formation and regeneration of protoplasts

### 2.3.5 pH 对原生质体形成和再生的影响

在最佳酶浓度、酶解时间、酶解温度一致的条件下,同样的试验材料,测试经不同 pH 的酶液处理后,其菌株原生质体形成与再生变化差异。分析图 7 可知,当 pH 为 6.5 时,解淀粉芽孢杆菌在偏酸的酶解环境下原生质体形成与再生较为合适,均达到峰值,分别为  $98.62\% \pm 0.24\%$  和  $55.61\% \pm 0.47\%$ 。因此,原生质体制备的最适酶液的 pH 为 6.5。

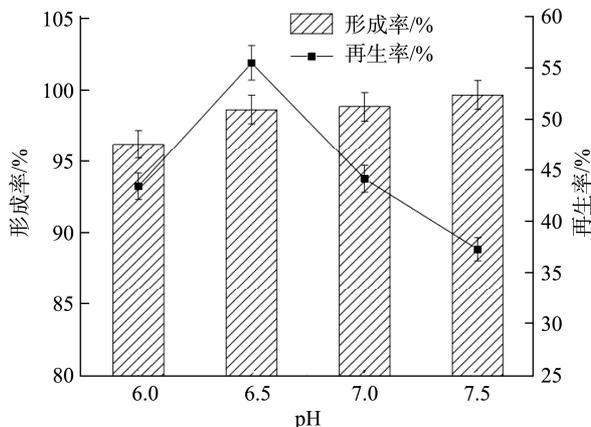


图7 pH对原生质体形成与再生的影响

Fig.7 Effects of pH on protoplast formation and regeneration

### 2.3.6 渗透压稳定剂质量浓度对原生质体形成与再生的影响

适宜的渗透稳定剂浓度可以达到保护原生质体的效果。如果质量浓度过高,原生质体的体积就会减少,再生会受到抑制。如果浓度过低,将导致原生质体的体积较大,并可能受到破坏。如图 8 所示,0.7 mol/L 甘露醇原生质体再生率高于其他质量浓度,达到  $53.19\% \pm 0.52\%$ 。因此,确定 0.7 mol/L 浓度的甘露醇作为渗透稳定剂。

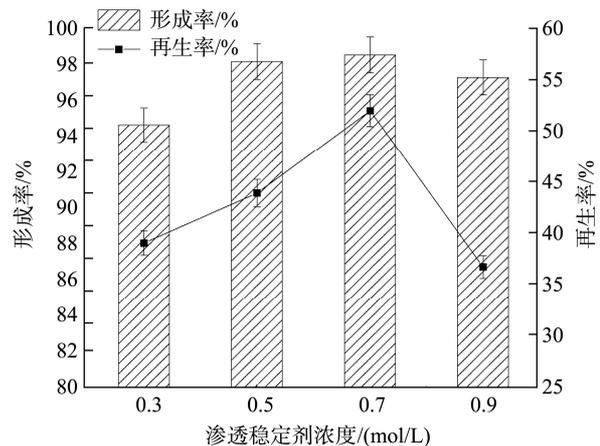


图8 渗透压稳定剂浓度对原生质体形成与再生的影响

Fig.8 Effects of osmolarity stabilizer concentration on the formation and regeneration of protoplasts

### 2.3.7 再生培养基组分对原生质体再生的影响

研究 3 种不同组分的培养基对再生效果的影响。分析可知,在再生培养基 2 中经过 48 h 培养,解淀粉芽孢杆菌原生质体释放量较多,其再生率  $54.86\% \pm 0.36\%$ ,为其他两种再生培养基的 1.91 倍和 2.79 倍,与二者差异性较为显著。分析其原因,可能是再生培养基 2 中营养成分较为多样,所提供的营养较为丰富全面,可以满足原生质体再生时所需要的养分。

### 2.3.8 原生质体形成率与再生率

确定原生质体最佳工艺条件为:菌龄 8 h,溶菌酶质量浓度 1.5 mg/mL,酶解时间 65 min,酶解温度 37°C, pH 6.5。在此条件下,菌株原生质体的形成率达到  $98.85\% \pm 0.26\%$ 、再生率达到  $57.39\% \pm 0.76\%$ 。

## 2.4 原生质体紫外诱变及 DES 诱变

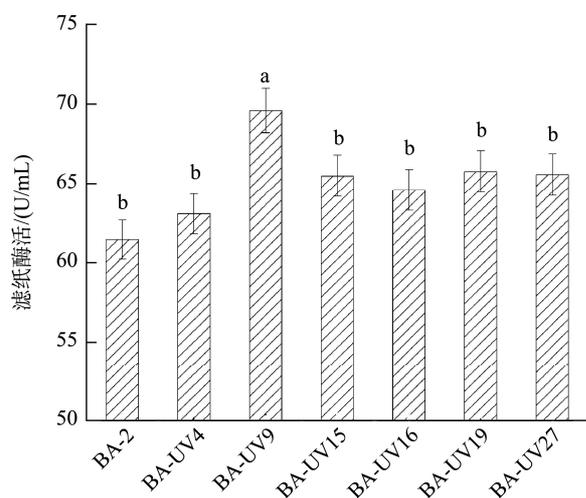
### 2.4.1 原生质体紫外诱变菌株的筛选

原生质体进行 UV 诱变,经多次试验,在培养过程中微量氧气量可以让菌株更好的生长,更好的适应环境。获得在培养温度为 50°C 条件下兼性厌氧的再生菌株,如图 9 所示,菌株 BA-UV9 的 FPA ( $69.78 \pm 1.27$ ) U/mL 达到最高。

### 2.4.2 处理时间对菌株致死率的影响

如图 10 所示,随着 UV 诱变持续时间的增加,菌株的致死率逐步增加,当正突变持续时间限定为 65 s 时,致死

率达到  $98.69\% \pm 0.12\%$ , 从而验证了紫外诱变处理具有较为明显的致死率。



菌株编号  
注: 不同字母表示组间具有显著性差异,  $P < 0.05$ 。

图9 紫外诱变下正突变菌株筛选结果

Fig.9 Screening results of positive mutants by UV mutagenesis

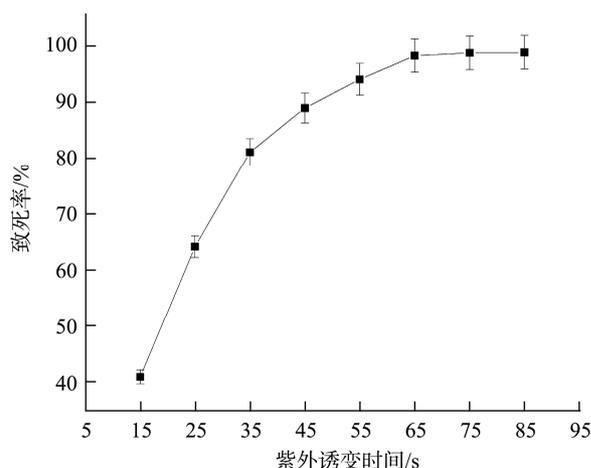


图10 UV诱变菌株BA-UV9的致死率曲线

Fig.10 Lethal rate curve of UV mutagenic strain BA-UV9

#### 2.4.3 硫酸二乙酯诱变

以 BA-UV9 为起始菌株, 以  $2 \text{ mg/mL}$  DES 为诱变剂, 进行 30 min 处理, 经多次试验, 获得在培养条件为  $55^\circ\text{C}$  下存活兼性厌氧的正突变菌株。结果如图 11 所示, 突变菌株 BA-DES4 滤纸酶活达到  $(76.58 \pm 1.19) \text{ U/mL}$ 。

#### 2.4.4 菌株遗传稳定性分析

将诱变后筛选出的突变菌株接种于发酵产酶培养基中, 经 3 组平行试验, 分别在  $55^\circ\text{C}$  下培养 48 h, 测定产酶能力。连续传代及产酶试验 8 批次, 测定该菌株的遗传稳定性, 结果如图 12 所示, 菌株滤纸酶活保持相对稳定, 菌株酶活范围在  $74.52 \sim 78.39 \text{ U/mL}$ 。

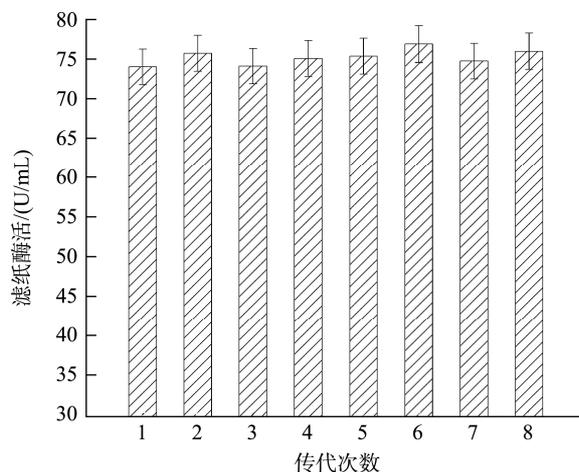


图11 DES诱变下正突变菌株筛选结果

Fig.11 Screening results of positive mutants induced by DES

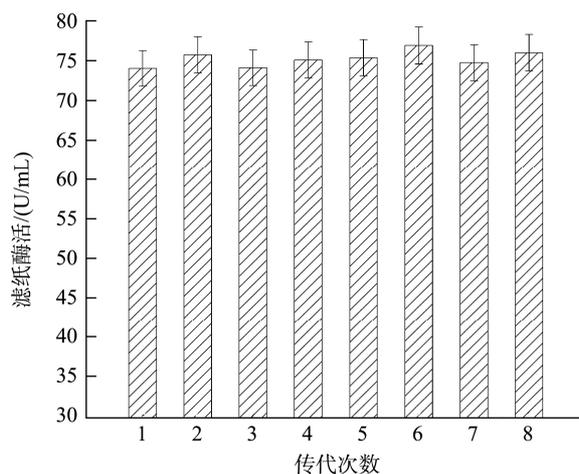


图12 菌株遗传稳定性结果

Fig.12 Genetic stability results of strain BA-DES4

### 3 讨论与结论

在微生物育种领域方面, 由于原生质体技术因其重组频率高、操作方便等一系列优点得到了迅速有效的发展, 并广泛应用于食品加工、环境污染、酶制剂制备等各个工业领域。原生质体的形成受多种因素的影响, 其形成的条件也不尽相同, 因为其生理结构及细胞壁的组成成分各有差异。首先, 必须将环绕着原生质体的细胞壁除去。不同菌龄的细胞, 其细胞壁的厚度和生理构造都有一定的差别, 而菌龄越短的细菌, 酶解虽方便但得到的细菌数量越少。菌龄时间过长的菌体细胞, 随着时间的推移其细胞壁厚度也在不断增加, 严重影响到原生质体产量。高浓度的溶菌酶会引起细菌的凝聚, 低浓度会引起酶解不完全, 从而降低原生质体的产率。酶解温度、渗透压稳定剂的 pH 都会直接影响到菌丝的生长状况和活性。菌龄越短, 其抗性较弱, 受到的不利因素干扰越多, 其再生效率就越低, 菌

龄时间较长的菌体细胞,其生理活性明显降低,越难以实现细胞壁的再生。过高的酶浓度会使细胞壁完全破裂,从而使细胞壁难以再生,此外,这种酶对细胞也有一定的破坏作用,研究表明,某些细菌在酶解之前,必须先加入青霉素、甘氨酸,通过抑制细胞壁的合成,提高其对溶菌酶的敏感性,从而大大缩短了反应时间,从而得到了大量的原生质体;本研究通过对解淀粉芽孢杆菌原生质体制备的条件进行优化,可使形成率在 98%左右。再生培养基一方面维持原生质体渗透压的稳定,防止原生质体造成大部分的裂解完全死亡;另一方面,再生培养基中含有一定浓度合成细胞壁的前体物质,比如维生素 B<sub>1</sub>和甘露醇等营养成分,能够促进再生速率的提高,与于平等<sup>[30]</sup>研究结果相同。本研究最终获得具有耐高温性状兼性厌氧的菌株 BA-DES4,在培养温度 55°C下酶活达到(76.58±1.19) U/mL,明显高于刘婉等<sup>[31]</sup>以筛选获得的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)为出发菌株,采用离子束诱变方式,其突变菌株 308 较出发菌株酶活提高了 84.4%。钱娟娟等<sup>[32]</sup>通过 UV 诱变处理短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*),筛选后得到酶活提高 237%的菌株 B-7(酶活为 28.9 U/mL),通过对解淀粉芽孢杆菌原生质体制备与再生条件进行研究,并通过诱变育种,使菌株具有耐高温性状,但菌株酶活提高不明显,分析其原因,可能是高温条件下菌株生长所需的营养成分有所改变,后续应当进一步探究菌株的发酵产酶培养基配比及发酵产酶条件。

本研究结果表明,原生质体制备最佳条件:溶菌酶浓度 1.5 mg/mL,酶解时间 65 min,酶解温度 37°C, pH 6.5,在此条件下,菌株原生质体的形成率为 98.85%±0.26%,再生率为 57.39%±0.76%;经 UV 诱变和 DES 诱变均能提高其 FPA。对菌株 BA-2 制备的原生质体进行 UV 诱变,获得菌株 BA-UV9 在培养温度 50°C下纤维素酶活力达到(69.78±1.27) U/mL;将 BA-UV9 作为出发菌株进行后续诱变处理,采用化学诱变 DES 对菌株进行振荡处理,获得突变菌株 BA-DES4 在培养温度 55°C下酶活达到(76.58±1.19) U/mL,滤纸酶活较出发菌株 BA-2 提高 24.5%。对诱变菌株 BA-DES4 进行连续传代培养 8 次并测定酶活,酶活力相对稳定。为纤维素酶的工业化生产提供理论依据,为解淀粉芽孢杆菌的基础和应用研究,为实现基因组改组技术筛选优良性状菌株提供试验基础。

## 参考文献

- 罗奉奉,付跃,黄秀艳,等.一株纤维素酶真菌的筛选鉴定及产酶条件优化[J].中国酿造,2021,40(2):133-139.  
LUO FF, FU Y, HUANG XY, et al. Screening and identification of a cellulase fungus and optimization of enzyme production conditions [J]. China Brew, 2021, 40(2): 133-139.
- 涂媛,金显,蔡俊.复合诱变选育虾青素高产菌株及发酵条件优化[J].中国酿造,2023,(5):91-96.  
TU Y, JIN X, CAI J. Breeding of high-yield astaxanthin strain by compound mutation and fermentation condition optimization [J]. China Brew, 2023, (5): 91-96.
- 张亚青,张羨,付佳伟,等.原生质体紫外诱变法选育高产  $\gamma$ -氨基丁酸秀珍菇菌株[J].浙江科技学院学报,2019,31(3):198-205.  
ZHANG YQ, ZHANG X, FU JW, et al. Breeding of GABA-rich *Pleurotus geesteranus* strains through an ultraviolet ray-mediated protoplast mutagenesis method [J]. J Zhejiang Univ Sci, 2019, 31(3): 198-205.
- 谢定刚,丛丽娜,李若凡,等.原生质体紫外诱变选育高产抗菌脂肽菌株及其活性物质的研究[J].工业微生物,2020,50(1):1-7.  
XIE DG, CONG LN, LI RF, et al. Screening of high-yielding antibacterial lipopeptides by protoplast UV mutagenesis and its inhibitory effects on *Aspergillus flavus* [J]. Ind Microbiol, 2020, 50(1): 1-7.
- ZHANG C, CHEN X, TOO HP. Microbial astaxanthin biosynthesis: Recent achievements, challenges, and commercialization outlook [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(13): 5725-5737.
- NUTAKOR C, KANWUGU ON, KOVALEVA EG, et al. Enhancing astaxanthin yield in *Phaffia rhodozyma*: Current trends and potential of phytohormones [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2022, 106(9-10): 3531-3538.
- 鲁云凤,王丰园.基于诱变和基因组重排选育木质素酶高产菌株的研究[J].饲料研究,2023,(21):76-83.  
LU YF, WANG FY. Study on the breeding of high-yield lignin enzyme strains based on mutagenesis and genome rearrangement [J]. Feed Res, 2023, (21): 76-83.
- 陈德刚,张萍,丁亚莲,等.利用原生质体融合选育米尔贝霉素高产菌株[J].生物资源,2022,(3):316-321.  
CHEN DG, ZHANG P, DING YL, et al. Breeding of high-yield strain of milbemycin by protoplast fusion [J]. Biotic Res, 2022, (3): 316-321.
- BASTIAN I. Whole genome sequencing for the m tuberculosis resistome [J]. Pathology, 2022, 54: S27-S28.
- 张晶.黄酒麦曲中产阿魏酸功能菌群解析及 *Penicillium oxalicum* M1816 在黄酒中的强化应用[D].无锡:江南大学,2021.  
ZHANG J. Analysis of functional microbiota for ferulic acid production in huangjiu wheat Qu and bioaugmentation of *Penicillium oxalicum* M1816 in Huangjiu [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- 张智,温冬灼,冯丽荣,等.耐热解淀粉芽孢杆菌 BA-DES4 产纤维素酶的分离纯化及酶学性质[J].食品工业科技,2023,44(11):136-143.  
ZHANG Z, WEN DZ, FENG LR, et al. Research on separation, purification and enzymatic property of cellulase produced by thermostable *Bacillus amyloliquefaciens* BA-DES4 [J]. Sci Technol Food Ind, 2023, 44(11): 136-143.
- BRUZNICAN S, EECKHAUT T, VAN HJ, et al. An asymmetric protoplast fusion and screening method for generating celeriac hybrids [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 1-12.
- ZHANG YH, ZENG T, CHEN L, et al. Determining protein-protein functional associations by functional rules based on gene ontology and KEGG pathway [J]. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom, 2021, 1869(6): 140621.
- JETTI KD, GNS RR, GARLAPATI D, et al. Improved ethanol productivity and ethanol tolerance through genome shuffling of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipiti* [J]. Int Microbiol, 2019, 22(2): 247-254.

- [15] DU J, ZHANG H, LI W, *et al.* Optimization of protoplast preparation system from leaves and establishment of a transient transformation system in *Apium graveolens* [J]. *Agronomy*, 2023, 13(8): 382–387.
- [16] 林路成, 徐志伟, 张建泽, 等. 原生质体融合结合基因编辑技术显著提高酿酒酵母 2-苯乙醇产量[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(5): 18–24.  
LIN LC, XU ZW, ZHANG JZ, *et al.* Protoplast fusion combined with gene editing technology significantly improves the ability of *Saccharomyces cerevisiae* to produce 2-phenylethanol [J]. *Food Ferment Ind*, 2023, 49(5): 18–24.
- [17] 贾啸静, 马静, 胡紫薇, 等. 原生质体诱变及高通量筛选选育链霉素高产菌株[J]. *中国抗生素杂志*, 2020, 45(9): 878–882.  
JIA XJ, MA J, HU ZW, *et al.* Protoplast mutagenesis and high-throughput screening for high-yield streptomycin-producing strains [J]. *China J Antibiot*, 2020, 45(9): 878–882.
- [18] 江雪莲, 杨婷婷, 孔珮雯, 等. 海带盐渍加工尾水处理菌株筛选及生物处理工艺研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(6): 2368–2376.  
JIANG XL, YANG TT, KONG PW, *et al.* Screening of kelp salted processing tail water treatment strains and study on biological treatment technology [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(6): 2368–2376.
- [19] ZHU X, KONG J, YANG H, *et al.* Strain improvement by combined UV mutagenesis and ribosome engineering and subsequent fermentation optimization for enhanced 6'-deoxy-bleomycin Z production [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(4): 1651–1661.
- [20] PATANKAR S, DUDHANE A, PARADH AD, *et al.* Improved bioethanol production using genome-shuffled *Clostridium ragsdalei* (DSM 15248) strains through syngas fermentation [J]. *Biofuels*, 2021, 12(1): 81–89.
- [21] JETTI KD, GNS RR, GARLAPATI D, *et al.* Improved ethanol productivity and ethanol tolerance through genome shuffling of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* [J]. *Int Microbiol*, 2019, 22(2): 247–254.
- [22] 邹彰毅, 邓百万. 姬松茸原生质体制备及再生条件优化[J]. *北方园艺*, 2020, (3): 128–137.  
ZOU ZY, DENG BW. Optimization of protoplast preparation and regeneration conditions of *Agaricus blazei* [J]. *North Hortic*, 2020, (3): 128–137.
- [23] 潘旭耀. 芽孢杆菌种间原生质体融合选育高产脂肽新菌株[D]. 广州: 华南农业大学, 2019.  
PAN XY. Breeding of a new strain of high-yield antibacterial lipopeptide by *Bacillus* interspecies protoplast fusion [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2019.
- [24] 李雅华, 张启航, 王姣, 等. 产 IAA 菌株的 UV 和 DES 诱变筛选及培养条件优化[J]. *核农学报*, 2020, 34(9): 1873–1880.  
LI YH, ZHANG QH, WANG J, *et al.* Screening of IAA-producing strains by UV and DES mutagenesis and optimization of culture conditions [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2020, 34(9): 1873–1880.
- [25] ZHU LH, WANG JH, XU S, *et al.* Improved aromatic alcohol production by strengthening the shikimate pathway in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Process Biochem*, 2021, 103: 18–30.
- [26] 孙士健, 王丽娟, 秦邴, 等. 复合诱变筛选高产柠檬酸黑曲霉及其发酵研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, (17): 194–200.  
SUN SJ, WANG LJ, QIN L, *et al.* Compound mutation and screening *Aspergillus niger* with high yield of citric acid and its fermentation research [J]. *Food Res Dev*, 2019, (17): 194–200.
- [27] 袁超, 袁丹丹, 赵建刚, 等. 硫酸二乙酯与紫外线复合诱变选育糖化酶高产菌株的研究[J]. *食品与药品*, 2018, 20(3): 219–223.  
YUAN C, YUAN DD, ZHAO JG, *et al.* Breeding of glucoamylase high-yield strains using compound mutagenesis induced by diethyl sulfate and ultraviolet rays [J]. *Food Drug*, 2018, 20(3): 219–223.
- [28] 温冬灼, 张智, 魏罡, 等. 纤维素降解芽孢杆菌筛选及产酶条件优化[J]. *中南林业科技大学学报*, 2022, 42(2): 169–180.  
WEN DZ, ZHANG Z, WEI G, *et al.* Screening of cellulose-degrading bacillus and optimization of enzyme production conditions [J]. *J Centr South Univ Forest Technol*, 2022, 42(2): 169–180.
- [29] JUN RY, CUI QY, LUO JX, *et al.* Protoplast preparation for algal single-cell omics sequencing [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(2): 538–538.
- [30] 于平, 徐超超, 朱鹏志. 产碱性果胶酶的枯草芽孢杆菌 ZGL14 原生质体制备与再生条件[J]. *应用与环境生物学报*, 2018, 24(2): 357–361.  
YU P, XU CC, ZHU PZ. Protoplast preparation and regeneration conditions of *Bacillus subtilis* ZGL14 producing alkaline pectinase [J]. *China J Appl Environ*, 2018, 24(2): 357–361.
- [31] 刘婉, 赵珊珊, 焦焱, 等. 产纤维素酶菌株的筛选及离子束诱变[J]. *生物技术通报*, 2018, 34(6): 149–154.  
LIU W, ZHAO SS, JIAO Z, *et al.* Screening cellulase-producing strains and ion beam mutagenesis on them [J]. *Biotechnol Bull*, 2018, 34(6): 149–154.
- [32] 钱娟娟, 王克芬, 刘胜利, 等. 产碱性纤维素酶菌株 WS-135 的筛选及酶学性质研究[J]. *食品与发酵科技*, 2020, 56(5): 60–63, 71.  
QIAN JJ, WANG KF, LIU SL, *et al.* Screening of alkaline cellulase producing strain WS-135 and study on its enzymatic characterization [J]. *Food Ferment Sci Technol*, 2020, 56(5): 60–63, 71.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

## 作者简介



温冬灼, 硕士研究生, 主要研究方向为食品发酵, 功能食品等研究。

E-mail: wendongzhuo@126.com



张智, 博士(后), 教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品发酵, 植物生物转化, 功能食品等研究。

E-mail: Idzhangzhi@163.com