# 非对称灭活双亲原生质体融合法选育产果糖基转移酶的米曲霉新菌株的研究

何小妮[1]，蒋波[1]，王玉海[1]，张毅[1]，陈子健[2]
（1. 华南理工大学生物科学与工程学院，广东广州 510006）
（2. 量子高科（中国）生物股份有限公司，广东江门 539080）

**摘要：**本文以生产果糖基转移酶的米曲霉 SBB201（*Aspergillus oryzae* SBB201）为出发菌株，通过紫外联合氯化锂诱变获得产酶性能与生长性能各自优良的米曲霉菌株 UV-A 与 UV-B，采用非对称灭活法对这两株菌株的原生质体进行紫外以及热灭活双灭活，然后在 PEG 作为融合剂的介导下进行原生质体双亲融合，筛选出一株果糖基转移酶生产能力有较大提高的米曲霉新菌株，其酶活力达到了 172.95 U/g，比出发菌株提高了 64.57%。

**关键词：**米曲霉；果糖基转移酶；非对称灭活；原生质体融合
**文章篇号：**1673-9078(2013)5-993-997

# Breeding of a New *Aspergillus oryzae* Strain for Fructosyl-transferase Production by Protoplast Fusion of Asymmetric Inactivated Parents

**HE Xiao-ni[1], JIANG Bo[1], WANG Yu-hai[1], ZHANG Yi[1], CHEN Zi-jian[2]**
(1.School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)
(2.Quantum Hi-Tech (China) Biological Co., Ltd, Jiangmen 539080, China)

**Abstract:** Screening with enzyme activity and biomass of cell, two mutants (UV-A and UV-B) were obtained from *Aspergillus oryzae* sbb201 that have been treated with ultraviolet joint lithium chloride mutagenesis. These two parent protoplasts were inactivated with ultraviolet and thermal method respectively, and then fused by PEG induction. A mutant strain was finally obtained which has showed a higher activity of fructosyl-transferase. The enzyme activity reached 172.95 U/g, increased by 64.57% compared with that of the original strain.

**Key words:** *Aspergillus oryzae;* fructosyl-transferase; asymmetric inactivated; protoplast fusion

果糖基转移酶能催化蔗糖水解为葡萄糖和果糖，也可通过转果糖基作用在蔗糖的果糖基上连接 1~3 个果糖基形成低聚果糖。该酶广泛存在于高等植物和微生物中，能产生该酶的植物有洋葱、芦笋、大麦、香蕉、甜菜、莴苣、菊苣等；但工业化生产所用的果糖基转移酶大多来自于微生物。1982 年，Gupta 等纯化出 *Fusarium oxysporum* 的果糖基转移酶，并研究了低聚果糖的生物合成机制[1]。1989 年，Hirayama 等从 *Aspergillus niger* 纯化出果糖基转移酶，并研究了酶的特性[2]。1991 年，Balken 等从 *Aspergillus Phoenicis* 中获得高活性的果糖基转移酶，测得其低聚果糖产率为 60%[3]。

米曲霉虽然是工业生产果糖转移酶的重要来源之一，但是在生产实践中，米曲霉的生产能力往往欠佳，所以，人们为了改善这种状况作了大量工作，不断的探索新的高产酶系的米曲霉的选育方法[4]。原生质体融合技术起源于 20 世纪 60 年代、70 年代，它是通过两个遗传性状不同的亲株原生质体融合而达到杂交目的的基因重组技术[5]。原生质体融合就是，将两个不同亲本菌株的细胞壁经过酶解作用除去而得到原生质体，然后将两种不同的原生质体置于高渗溶液中，在促融剂如聚乙二醇等的作用下，促使两亲本细胞融合，进而导致基因重组[6]。自 1979 年，匈牙利的 Pesti 首先提出了融合育种提高青霉素产量的报告，这项技术已经越来越广泛的应用于实际工作中[7]。从育种的角度出发，考虑到多数营养缺陷型菌株都会影响代谢产物的产量，而采用原生质体双灭活作为遗传筛选标记不仅减轻了筛选的负荷，而且省去筛选营养缺陷型和带抗性标记的菌株的麻烦。一般认为热灭活的损伤在原生质体的蛋白质部位，而紫外对核酸部分有损伤，融合株可互补修复这种损伤，因而再生株即为有效融

收稿日期：2012-12-24
作者简介：何小妮（1987-），女，硕士，主要研究微生物方向
通讯作者：张毅（1964-），男，副教授

合。

1976 年，Ferenczy[8]等报道了曲霉(*Aspergillus*)的种间融合。近年来，利用灭活原生质体作为供体来进行融合已成为曲霉选育的重要方向。本试验首先从多个诱变菌株中筛选了 2 株优良的菌株，利用原生质体融合技术进行改造，得到了果糖转移酶生产能力有较大提高的米曲霉新菌株，对提高低聚果糖的产量具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验菌株

米曲霉 SBB201 (*Aspergillus oryzae* SBB201)，本实验中心筛选与保藏

#### 1.1.2 主要仪器

Centrifug e5810R，冷冻离心机，德国；全温振荡培养器，SUNK，上海苏坤；超净工作台，苏州；恒温水浴锅，江苏金坛；电热恒温培养箱，永生；waters1525 液相色谱仪；氨基柱（Sugar-D，4.6ID×250 mm），微量进样器

#### 1.1.3 培养基与主要试剂

斜面固体培养基：综合马铃薯培养基(PDA)；菌丝生长培养基（DPY 培养基）：葡萄糖 2%、蛋白胨 1%、酵母粉 0.5%、磷酸二氢钾 0.5%、硫酸镁 0.05%；固体培养基：综合马铃薯培养基(PDA)；高渗固体培养基:综合马铃薯培养基补加 0.6 M 的 NaCl；菌丝生长摇瓶发酵培养基：蔗糖 5%、豆粕粉 2%、玉米粉 0.3%；PBA 溶液：含 0.4 mol/L $NH_4Cl$ 的 0.2 mol/L 磷酸缓冲溶液，pH 为 6；渗稳剂：0.6 mol/L 的 NaCl 溶液；

混合酶液的配制：纤维素酶、溶菌酶、蜗牛酶以 1:1:1 的比例用 PBA 溶液配制，经 0.45 μL 微孔滤膜过滤除菌，保存于 4 ℃冰箱备用。

乙腈（色谱纯）、异丙醇（色谱纯）、PEG（6000）（分析纯）、无水氯化锂（分析纯）。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 紫外-氯化锂复合诱变[9]

将原始菌种转接至 PDA 斜面固体培养基上，待孢子生长成熟后，用无菌生理盐水洗脱孢子，调整孢子浓度为 $10^7$ 个/mL。取 1 mL 孢子悬液，用无菌生理盐水将孢子悬液浓度稀释至 $10^5$ 个/mL，加入氯化锂使稀释后孢子悬液中氯化锂的质量分数为 1%。取 8 个已灭菌的 0.2 mL 离心管，各加入 50 μL 稀释后的孢子悬液，在紫外灯 15 W，30 cm 处，分别照射 0 min、1 min、3 min、5 min、7 min、10 min、13 min、15 min 后取出，各加入 450 μL 高渗溶液，黑暗中静置 30 min 后涂布 PDA 固体平板，30 ℃黑暗中静置培养 24 h，计数算致死率。

致死率=（B-A）/B×100%

注：B 为没有经过紫外照射的孢子悬液涂布平板后长出的单菌落数，A 为紫外照射后的孢子悬液涂布平板后长出的单菌落数。

#### 1.2.2 原生质体的制备与再生[10]

将斜面上成熟的孢子洗脱下来，调整孢子浓度为 $10^7$ 个/mL，每瓶各接种 0.2 mL 孢子悬液于 50 mL DPY 液体培养基中，30 ℃下 150 r/min 摇床培养 20 h 后备用。

将培养好的菌丝体抽滤并用无菌生理盐水洗涤后，加入适量的混合酶液酶解，酶解完毕后，酶解液用 4 层无菌镜头纸过滤，除去菌丝体碎片，滤液 3000 r/min 离心 10 min，除去上清液，用渗透压稳定剂离心洗涤 2 次后重悬浮于适量渗透压稳定剂中，得到纯化的原生质体。用渗透压稳定剂对上述原生质体进行了稀释，使之达到一定的浓度，取 0.1 mL 接种于再生培养基上，30 ℃恒温培养 24 h，菌落计数。

再生率=（B/A）×100%

注：A 为原生质体总数，B 为长出的菌落数。

#### 1.2.3 原生质体灭活

取米曲霉原生质体溶液（浓度 $10^6$ 个/mL）适量于灭菌的培养皿中，15 W 紫外灯下 30 cm 处照射 7 min 后黑暗中静置 30 min，取出。取米曲霉原生质体溶液（浓度 $10^6$ 个/mL）适量于离心管中，65 ℃水浴锅中放置 5 min，取出。

#### 1.2.4 原生质体融合

将制备好的原生质体 UV-A 经紫外灭活，原生质体 UV-B 经热灭活后等量混合，加入适量 32 ℃预热的 PEG 溶液后置于 32 ℃条件下融合 5 min 后，离心并用 0.6 mol/L 的氯化钠溶液洗涤两次，重悬后涂布高渗 PDA 平板计数得融合率。

融合率（FI）=（A/B）×100%

注：平板 A 为 PEG 融合后接种的高渗平板；平板 B 为灭活前双亲等量混合后接种的高渗平板。

酶活的测定

以 10%蔗糖溶液为底物，加入适量产酶菌体，总体积为 100 mL，置于三角瓶中，在 45 ℃，150 r/min 的恒温回旋式摇床中反应 60 min，取出 100 ℃水浴 5 min 将菌丝体灭活，冷至室温，于 10000 r/min 台式离心机上离心 5 min，取上层清夜滤膜过滤，作为 HPLC 法测定蔗果三糖的试液。

根据酶活力的定义，在上述条件下，每分钟产生

1 μmol 蔗果三糖所需酶量为一个酶活力单位（U），按下式计算每克产酶菌丝体的酶活力 X，单位为 U/g。

$$X=\frac{10\times1000\times GF2}{0.504\times t\times m}$$

注：10 为 100 mL 蔗糖溶液中蔗糖含量；GF2 为蔗果三糖的百分含量，%；t 为反应时间，单位为分钟（min）；m 为反应菌丝体质量，单位为 g。

## 2 结果与讨论

### 2.1 紫外-氯化锂复合诱变

致死曲线如图 1 所示。

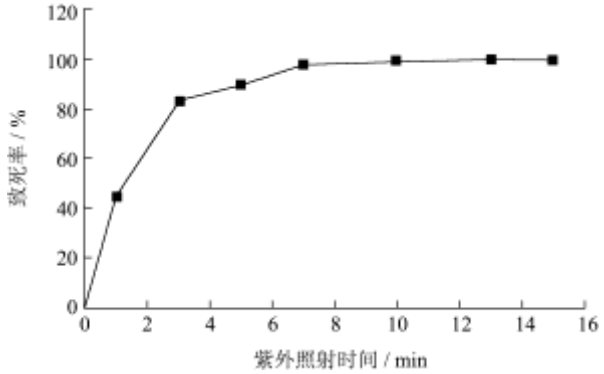



图 1 米曲霉孢子紫外灭活条件致死曲线

**Fig.1 Ultraviolet inactivated condition curve of *Aspergillus oryzae* spores**

表 1 诱变菌株果糖转移酶活力测定结果

**Table 1 The assay results of fructosyl-transferase activity of induced strains**

| 紫外诱变菌株 | 果糖转移酶活力/(U/g) |
|---|---|
| SBB201 | 105.09 |
| UV-A | 111.47 |
| UV-B | 113.43 |
| UV-D | 101.39 |
| UV-E | 109.82 |
| UV-F | 111.62 |
| UV-J | 101.39 |
| UV-L | 94.15 |
| UV-N | 108.62 |
| UV-P | 104.53 |
| UV-R | 107.65 |
| UV-T | 110.53 |
| UV-W | 81.72 |

由于通常认为当孢子的致死率在 90%左右时，比较容易得到正突变株，因此本实验选取紫外照射 5 min 进行紫外联合氯化锂进行诱变，将经紫外照射后涂布平板长出的米曲霉单菌落挑取转接至 PDA 斜面培养基上，测定诱变菌株果糖转移酶活力如表 1 所示，筛选得到两株果糖转移酶活性有提高的正突变株米曲霉 UV-A 与 UV-B，作为后期原生质体融合的亲本菌株。

### 2.2 原生质体的灭活

灭活的目的是为了标记融合子，即让亲本菌株原生质体全部致死，而经过融合后所生长的即为融合二倍体，所以灭活率需达到 100%。

灭活率=处理后高渗平板上的菌落数/对照高渗平板上的菌落数×100%

紫外线对微生物营养细胞的杀灭作用主要与细胞内核酸的光化学变化有关，其灭活的机制主要包括产生嘧啶二聚体以及 DNA 的解螺旋[12]，从而影响细胞的生理功能产生致死作用。而热灭活原生质体的作用主要在细胞质中，使核糖体或核糖体 RNA 受到损伤，结果使细胞内的功能蛋白或酶蛋白的合成受到影响而使其变性失活，产生致死作用[4]。灭活曲线如图 2 所示。

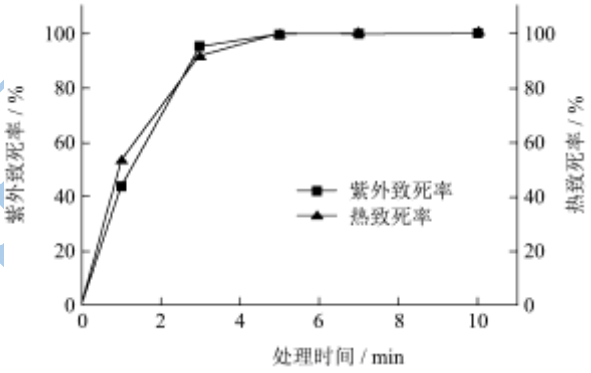



图 2 原生质体的紫外灭活与热灭活条件致死曲线

**Fig.2 Ultraviolet inactivated condition and heat inactivated condition curve of protoplast**

### 2.3 原生质体的融合[13]

#### 2.3.1 PEG 浓度的选择

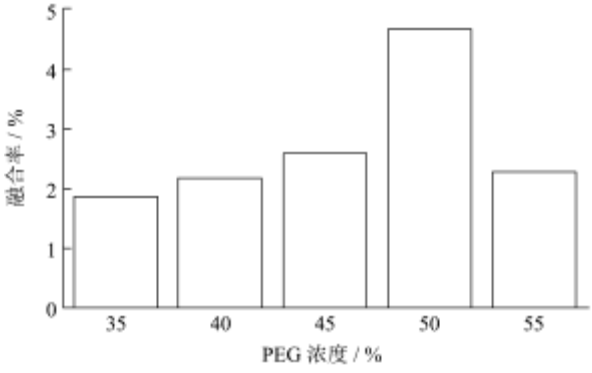



图 3 PEG 百分比浓度对原生质体融合的影响

**Fig.3 Effect of PEG percentage concentration on protoplast fusion**

PEG 的浓度对原生质体融合有着至关重要的影响。浓度太低，渗透压也会较低，导致原生质体破裂，不利于原生质体相互靠近融合；浓度过高，会引起原

生质体皱缩，还会产生中毒现象[14]。本实验配制 PEG 百分比浓度分别为为 35%、40%、45%、50%、55% 对原生质体进行融合。如图 3 所示，选取 50% PEG 作为最佳浓度。

2.3.2 融合时间的选择

融合时间的长短对原生质体融合非常重要。时间过短，原生质体刚开始靠近发生融合，参与融合的原生质体数目不多，而且不稳定，用缓冲液稀释由于外力作用，使得刚开始融合的原生质体被分开，降低融合率；时间过长，PEG 作用对原生质体产生毒害作用，不利于原生质体的再生，从而导致融合率下降[15]。分别选取 5 min、10 min、15 min、20 min 来进行融合，测定融合率如图 4 所示，融合时间为 5 min 时，有最大融合率。

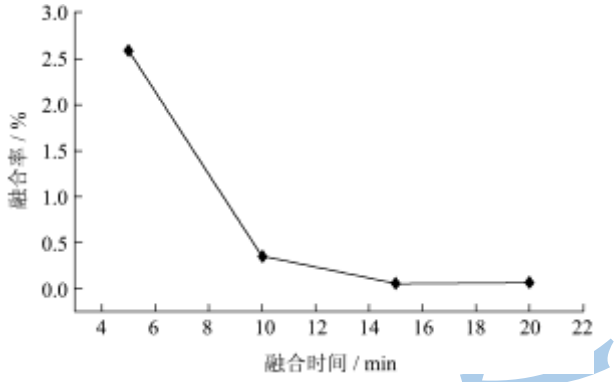



图 4 融合时间对原生质体融合的影响

**Fig.4 Effect of fusion time on protoplast fusion**

2.3.3 PEG 溶液 pH 的选择

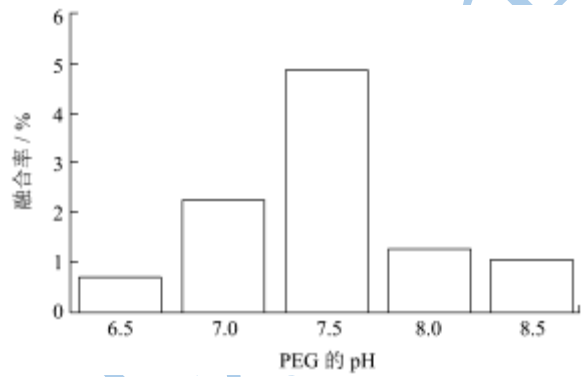



图 5 PEG 溶液 pH 对原生质体融合的影响

**Fig.5 Effect of PEG solution pH on protoplast fusion**

关于融合时 pH 值的选择，人们发现在有 $Ca^{2+}$存在的条件下，pH 为碱性条件能刺激产生最大的融合率，这是因为融合时的 pH 能够改变体系的电性状态，进而影响原生质体的融合，故而实验选中选取了 pH 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 这几个梯度进行融合，由图可 5 知，在 pH 为 7.5 时，融合率最高。

2.4 融合子酶活测定

表 2 融合菌株果糖转移酶活力测定结果

**Table 2 The assay results of fructosyl-transferase activity of fusion mutants**

| 菌株 | 果糖转移酶活力/(U/g) |
|---|---|
| SBB201 | 105.09 |
| UV-A | 114.44 |
| UV-B | 111.94 |
| R-50 | 172.95 |
| R-51 | 110.68 |
| R-52 | 126.03 |
| R-53 | 128.77 |
| R-54 | 107.80 |
| R-55 | 106.35 |
| R-56 | 117.53 |
| R-57 | 122.78 |
| R-58 | 110.05 |
| R-59 | 117.03 |
| R-60 | 116.63 |
| R-61 | 104.50 |
| R-62 | 122.12 |
| R-63 | 119.61 |
| R-64 | 116.17 |
| R-65 | 121.89 |
| R-66 | 118.42 |
| R-67 | 127.55 |
| R-68 | 114.52 |
| R-69 | 112.73 |
| R-70 | 116.34 |
| R-71 | 113.96 |
| R-72 | 121.46 |
| R-73 | 117.96 |
| R-74 | 119.01 |
| R-75 | 118.68 |
| R-76 | 109.49 |
| R-77 | 121.39 |

原生质体的融合主要是通过种间双亲菌株或同源菌株经不同诱变剂处理后得到的不同诱变菌株来实现。经过聚乙二醇的助融，发生两套基因组之间的接触、交换，从而发生基因组的遗传重组并产生新的遗传基因。实验对诱变菌株 UV-A 与 UV-B 制得原生质体并进行非对称灭活后再融合，将融合菌挑取后通过菌丝生长发酵摇瓶培养基培养得到菌丝体后，用液相色谱测定融合菌株的酶活，经过多次重复实验，测得各融合菌的果糖转移酶活力，其中某一批融合菌编号为 R(1)-50~R(1)-76 果糖转移酶活力测定结果如下表所示。

将表 2 所示结果与出发菌株在同样条件下所测得的果糖转移酶活力对比可知，虽然有部分融合菌的酶活有所降低，但是大部分融合菌株的果糖转移酶活力都有一定的提高，尤其是菌株 R-50 的酶活比出发菌株提高了 64.57%，说明通过原生质体融合筛选具有高酶活的新菌株的可行性。

## 3 结论

原生质体融合技术是细胞工程的一个重要方面，具有重组频率高，遗传物质完善，容易获得性状优良和生产量高的融合菌等优点，已被广泛应用于各种研究工作中。本实验通过利用双亲非对称灭活技术作为筛选标记进行原生质体融合，大大减轻了背景干扰，提高了菌种筛选效率。既摆脱了传统的诱变筛选营养缺陷型所造成的菌株性能退化，又避免了通过基因工程手段给亲本增添抗性基因带来食品安全隐患。通过融合筛选出一株果糖转移酶活性比原始菌株有较大提高的米曲霉菌株，证明了利用原生质体融合进行菌株选育的可行性，同时进行多亲本菌株融合，进一步提高微生物的利用蔗糖作为底物生产其他工业产品的能力是大有潜力的。但是本实验中也存在一些问题，由于原生质体融合中，原生质体的制备也是一个重要的影响因素，而原生质体的制备主要受菌龄，培养基成分，酶种类，酶浓度，酶解液 pH 值，酶解时间等因素的限制[16]，因此实验也需要对原生质体的制备条件进行一定的探索。同时，实验中也发现筛选到的融合菌株的生理特征具有不稳定性，需要对融合菌株进行进一步的研究，并探讨其最佳培养条件和发酵条件，以最终能将其应用于生产，发挥经济效益。

## 参考文献


[1] GUPTA A K, NAGPAL B, KAUR N. Glucofructosan biosynthesis in Fusarium oxysporum: regulation and substrate specificity of fructosyl transferase and invertase [J]. Phytochemistry, 1982, 21: 1249-1253

[2] HIRAYAMAM, SUMI N, HIDAKA H, et al. Purification properties of a fructoolig osaccharides-producing β-fructofuranosidase from Aspergillus nigerATCC20611 [J]. Agricultural and biological chemistry, 1989, 53: 667-673

[3] VAN BALKEN JAM, VAN DOOREN TH JGM, VAN DEN TWEEL WJJ, et al. Production of lkestose with intact mycelium of Aspergillus phoenicis containing sucrose-1-fructosyltransferase [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1991, 35; 216-221

[4] 王燕.热-紫外灭活双亲原生质体融合选育米曲霉新菌株的研究[J].中国酿造,2008,190(13):42-44

[5] 施巧琴,吴松刚.工业微生物育种学[M].北京:科学出版社,2005

[6] 聂明,李怀波,万佳蓉,等.工业微生物遗传育种的研究进展[J],现代食品科技,2005,21(3):184-187

[7] 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

[8] L Ferenczy, F Kevei, M Szegedi, et al. Factors affecting high-frequency fungal protoplast fusion [J]. Experimentia, 1976, 32: 1156- 1158

[9] 胡杰,潘力,罗立新,等.米曲霉孢子原生质体复合诱变及高活力蛋白酶菌株选育[J].食品工业科技,2007, 28 (5): 116-122

[10] 辛明秀,蒋亚平.米曲霉原生质体融合及杂合二倍体的形成[J].微生物学通报,1994,21(3):143-147

[11] 杨惠英,吴志丹,叶舟,等.黑曲霉原生质体的形成、分离与再生的研究[J].遗传,1992,14(1):31-34

[12] 杨汝德,朱文生.双灭活原生质体融合法选育耐高温高产酒精酵母的研究[J].工业微生物,1993, 23(1):9-13

[13] 辛明秀,马玉娥.微生物的原生质体融合及应用[J].微生物学通报,1995,22(6):365-370

[14] 徐新丽.原生质体融合技术选育纤维素发酵产油菌株[J].武夷学院学报,2011,30(2):27-31

[15] 江力,黄健威,慈凌坤,等.茶树菇与鸡腿菇原生质体融合及再生[J].食品科学,2011,30(1):141-144

[16] 谭文辉,李燕萍,许杨.微生物原生质体制备及再生的影响因素[J].现代食品科技,2006,22(3):263-265