湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划

项　 目　 申　 报　 表

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 项目名称: 复合诱变黑曲霉高产β-葡萄糖苷酶菌株的选育 | | | | | | |
| 学校名称 | 中南林业科技大学 | | | | | |
| 学生姓名 | 学 号 | 专 业 | | 性 别 | 入 学 年 份 | |
| 仲心悦 | 20140398 | 生物工程 | | 女 | 2014 | |
| 周礼文 | 20140399 | 生物工程 | | 女 | 2014 | |
| 张倩倩 | 20140393 | 生物工程 | | 女 | 2014 | |
| 赵厶槿 | 20140397 | 生物工程 | | 女 | 2014 | |
| 指导教师 | 曾柏全 | | 职称 | 教授 | | |
| 项目所属  一级学科 | 生物学 | | 项目科类(理科/文科) | | | 理科 |
| 学生曾经参与科研的情况  于2016年10月进入食品学院食品科学与工程分子营养与健康实验室，跟随罗非君老师课题组的研究生学长学姐们学习分子生物学、细胞生物学实验。目前已熟练掌握动物组织RNA提取、蛋白质凝胶电泳、Western blot等一系列基本实验方法。 | | | | | | |
| 指导教师承担科研课题情况  承担了国家林业科学技术推广项目(项目编号：[2016] 50号)、湖南省科技计划重点项目（项目编号：2016NK2149）、国家林业局2016年野生植物保护项目、湖南省科学计划项目，湖南省教育厅重点项目、国家国际科技合作专项项目等十余项。 | | | | | | |
| 项目研究和实验的目的、内容和要解决的主要问题  1、项目研究和实验的目的  近年来，随着经济的飞速发展，不可再生的化石能源的日渐枯竭、二氧化碳等温室气体的排放导致全球变暖等能源和环保问题日益凸显，可持续再生能源的研究已经成为当今研究的热点。利用可再生的纤维素资源生产生物乙醇已成为克服能源危机的有效途径之一。在生物乙醇的生产流程中，纤维素酶水解木质纤维素是整个过程至关重要的一步。纤维素酶是一种多组分的复合酶系，根据其催化反应功能的不同可分为内切葡聚糖酶(简称EG)，外切葡聚糖酶(简称CBH)和β-葡萄糖苷酶(简称BG)，它们协同发挥作用降解纤维素产生纤维寡糖和二糖，最终水解为葡萄糖。其中β-葡萄糖苷酶将水解过程中释放的纤维二糖降解成葡萄糖，从而去除其对另外两种酶组分的阻遏作用，是水解过程中的最后一步，也是最关键的限制因素。  β-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21，简称BG)，属于水解酶类。来源不同的β-葡萄糖苷酶的相对分子质量可以从几十kDa到几百。β-葡萄糖苷酶是纤维素酶系中的一种十分重要的酶，利用纤维素酶水解纤维素的过程中，如果缺少β-葡萄糖苷酶就会造成纤维二糖的大量积累，而纤维二糖的大量积累又会对纤维素酶的酶解形成强烈的反馈抑制，增强纤维素酶体系β-葡萄糖苷酶的活力是提高纤维素水解效率和增加葡萄糖产量的关键，因此研究β-葡萄糖苷酶具有重要的理论和实用价值。  β-葡萄糖苷酶不仅在生物能源领域有极其重要的应用，而且在其他方面应用也非常广泛，有巨大的商业潜力。发酵水平低一直是β-葡萄糖苷酶未能工业化生产的主要原因。目前对于提高微生物产β-葡萄糖苷酶的手段主要通过发酵工艺优化和菌株改造等手段实现。  2、项目研究和实验的内容  2.1菌株诱变:  通过紫外线和硫酸二乙酯复合诱变技术对菌种进行了诱变选育，以提高菌种的产酶能力。  2.2 优化生产工艺：  对产β-葡萄糖苷酶的菌株液态发酵工艺进行优化，探寻出一条既经济又高效的产酶工艺。  2.3 探索水解最适条件：  对黑曲霉所产粗酶液的水解性能和最适水解条件进行了初步研究，为β-葡萄糖苷酶在纤维乙醇规模化生产中的应用奠定基础。  3、要解决的主要问题  能源短缺和环境污染是人类目前面临的重大问题，从长远发展及能源的可持续性、可再生性、清洁性来看，生物能源必将成为各国共同关注的热点，木质纤维素能源化利用更是热点中热点，发展生物能源可有效缓解能源危机和环境污染压力，实现社会经济的可持续发展。纤维乙醇具有的可再生性、清洁性和替代性特点，使其在缓解能源危机、治理大气污染、改善空气质量、减少雾霾，让社会的经济效益和环境效益、城市的宜居效益和百姓的健康效益真正实现多赢。  因此对β-葡萄糖苷酶液态发酵的研究与开发，具有重要的现实意义。加强这方面的研究，可以提高β-葡萄糖苷酶的产量和质量，为该酶的工业化生产提供保障，创造良好的社会效益和经济效益.本文通过复合诱变技术对黑曲霉菌株诱变选育，并通过工艺优化提高菌种所产β-葡萄糖苷酶的活力，以为其工业化生产提供借鉴作用。 | | | | | | |
| 国内外研究现状和发展动态  1、自然选育  自然选育是利用微生物的自发突变进行的纯种分离方法，是一种简单易行的育种方法。李松等[1]采用七叶苷平板显色筛选法在碱性条件下从多个土壤样本和印染洗涤废水中筛选得到一株β-葡萄糖苷酶高产菌。Yeoh[2]等人筛选出了产β-葡萄糖苷酶的黑曲霉菌株，并对黑曲霉USDB0355产生的β-葡萄糖苷酶进行了纯化和动力学研究，结果表明该菌株产β-葡萄糖苷酶酶活较高。宋欣等[3]人用七叶苷平板筛选高产β-葡萄糖苷酶产生菌，筛选出的曲霉菌株培养48hβ-葡萄糖苷酶活为5.3U/mL。  2、诱变育种  诱变育种是用人工诱变方法诱发微生物基因突变，筛选出产量高、性能优良的突变体，具有速度快、收效大、方法简单等优点，时至今日，也是微生物育种上最重要、最有效的技术。诱变育种是提高菌株酶活的一种有效的方法。较为传统的方法有紫外线诱变法。  2.1 非电离辐射  张莉[4]采用紫外线诱变技术对菌株MQFSM-3进行处理,研究了紫外诱变条件对菌株致死率的影响,并对突变菌株酶活及酶学性质进行评价。结果表明,出发菌株在辐照剂量为3500μJ/cm2的紫外灯下照射9 min,致死率为81.09%;通过初筛、复筛及多次传代培养,突变菌株UV-45产酶稳定,酶活提高41.64%,该酶最适温度为50℃,在20~50℃热稳定性良好;最适pH为5.5,在pH4.0~6.5酶活力相对稳定。  2.2 化学诱变  陈娜等[5]采用硫酸二乙酯化学诱变法，以黑曲霉TJ02为出发菌，对其孢子进行诱变处理得到β-葡萄糖苷酶的高产菌株DES-7,其产酶能力可达28IU/ml，较出发菌株提高了30%。  2.3 复合诱变  任建伟[6]以黑曲霉H12为出发菌株，经紫外诱变后再进行N+注入诱变，获得突变株B135,酶活达12.66IU/mL，再进一步对B135菌株进行紫外线照射和N+离子注入复合诱变，最终获得一株β-葡萄糖苷酶高产菌株X06，发酵酶活力为16.12IU/mL，较出发菌株H12酶活提高了52.90%。  李敏霞[7]对出发菌株绿色木霉AS3.3711进行UV、DES、和NaNO2复合诱变后，通过筛选得到了酶活较高突变菌株U3D2Na22，其产β-葡萄糖苷酶的酶活为0.74IU/mL，是原始菌株AS3.3711的3.2倍。  潘艳[8]从常年堆积玉米秸秆的腐土中分离得到一株能生产β-葡萄糖苷酶的菌株zyb 5,此菌株具有较强的生长繁殖能力和产酶能力。对zyb 5进行紫外和化学诱变,得到菌株UV-4-DES6。在30℃,150 r/min摇床发酵4d后,产酶活力由出发菌株的0.821 U/mL上升到2.352 U/mL,提高了2.8倍。崔乐芳[9]通过对原始菌株C2’进行硫酸二乙酯和紫外线-氯化锂复合诱变,运用刚果红平板筛选出诱变菌株草酸青霉菌90182,其发酵5d产β-葡萄糖苷酶酶活为0.69IU/mL,是出发菌株的2.16倍。菌株90182液体发酵培养8d发酵液中β-葡萄糖苷酶酶活最高可达1.14IU/mL。  3、原生质体育种  原生质体诱变是以微生物原生质体为育种材料，采用物理或化学诱变剂处理，然后分离到再生培养基中再生，并从再生菌落中筛选高产突变菌株。王春丽[10]以黑曲霉3-3M为出发菌株,通过原生质体紫外诱变,筛选得到株β-葡萄糖苷酶活力为23.4 IU/ml,其酶活力提高23%。  4、基因工程育种  钟立霞等[11]通过基因敲出法获得尿嘧啶营养缺陷型菌株，改进的里氏木霉高产突变株遗传转化体系显著促进菌株改良,提高糖化应用效果，其酶活分别提高10.01倍和8.26倍。李沛华等[12]通过构建β-葡萄糖苷酶突变质粒，鉴定成功后接于表达载体，表达重组菌株。经IPTG诱导后,分离纯化并进行酶学性质分析,获得酶活力提高的两个突变位点，比原始酶活分别提高了43.1%和14.7%。  王馨莹[13]方法从嗜热细菌*Fervidobacterium pennivorans*基因组DNA中PCR扩增β-葡萄糖苷酶基因,插入原核表达载体pET-28a中,构建重组表达质粒,转化*E.coli BL21(DE3)Codon Plus*,筛选阳性重组菌,IPTG诱导表达。该重组酶能够高效催化对硝基苯-β-D-葡萄糖苷(pNPG)的水解,60℃条件下的比活力达124293.5 U/mg。  参考文献：  [1]李松，杨倩，范李龙等. 碱性β-葡萄糖苷酶产生菌株的筛选、鉴定及部分酶学性质研究[J].食品工业科，2016,37(2):180-188  [2]Yeoh HH,Tan TK,Chua SL,et a1.Properties of β-glucosidase purified from Aspergillus niger[J].MIRCEN Journal,1988,(4):425-430.  [3]宋欣.一种将七叶苷用于高产β-葡萄糖苷酶产生菌的平板筛选的方法[P].CN 101177699A.2008-05-14.  [4]张莉,王婧,杨婷,马腾臻,程超,祝霞,盛文军,韩舜愈. 产β-葡萄糖苷酶酿酒酵母菌株紫外诱变选育及酶学性质分析[J]. 食品工业科技,2015,(20):220-224.  [5]陈娜，付传颖，张玉新等.黑曲霉高产β-葡萄糖苷酶菌株的诱变、筛选及发酵条件优化[J].基因组学与应用生物学，2016,35(4):901-906.  [6]任建伟.β-葡萄糖苷酶高产菌株选育及发酵条件优化[D].浙江:浙江大学,2015:22-28.  [7]李敏霞.提高木霉属纤维素酶系中β-葡萄糖苷酶活性的研究[D].齐鲁工业大学,2014.  [8]潘艳,张益波,郭志敏,王诗雨,邢慧萌,林风,滕利荣,侯阿澧. β-葡萄糖苷酶高产菌株筛选、诱变及其发酵的研究[J].食品研究与开发,2012,(05):149-152.  [9]崔乐芳. 产β-葡萄糖苷酶菌株诱变选育及酶的分离纯化[D].大连理工大学,2013.  [10]王春丽.β-葡萄糖苷酶高产菌株的选育及玉米芯的诱导作用研究[D]. 北京: 北京化工大学,2010:33-40.  [11]钟立霞.里氏木霉QM9414尿嘧啶缺陷型转化体系改进和β-葡萄糖苷酶的过量表达[J].化工学报,2016,20,(6):11-25  [12]李沛华,郭雪睿,彭继燕等.定点突变技术提高β-葡萄糖苷酶活性[J]基因组学与应用生物学，2016,35(8):2083-2091  [13]王馨莹,冯丽,许春春,于珊珊. 嗜热β-葡萄糖苷酶的原核表达、纯化及其活性[J]. 中国生物制品学杂志,2014,(11):1404-1407. | | | | | | |
| 本项目学生有关的研究积累和已取得的成绩  1、在工业微生物课程实验中，从土壤中成功的筛选出一株营养缺陷型大肠杆菌。  2、在食品科学与工程学院罗非君课题组参与沈珺珺老师有关生育三烯酚抗炎论文的制作；参与课题纳米粒子对MAPK信号通路的影响相关分子生物学实验。 | | | | | | |
| 项目的创新点和特色  1、本实验采用了两种诱变方法进行复合诱变，为筛选出优良的突变株创造了更多的可能性。采用不同诱变方法进行复合诱变处理可以避免出现连续使用同一种诱变剂常会发生的平顶效应，即诱变效果会随着处理次数的增加而降低。  2、纤维素酶的生产菌株主要是木霉，其生产的酶系中含有较高的内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶酶活，但β-葡萄糖苷酶量却相对不足，降解效率较低。而黑曲霉*Aspergillus eager*具有较高的β-葡萄糖苷酶活力，将其添加到酶系中可以提高水解木质纤维素的效率。本实验中采取黑曲霉进行诱变育种，经发酵后获得酶活更高的β-葡萄糖苷酶。 | | | | | | |
| 项目的技术路线及预期成果  1、项目的技术路线：  2、预期成果：  2.1经过复合诱变获得产酶活更高的黑曲霉突变株，完成对突变株最适生长条件及最优培养基组成的探索。  2.2为解决能源暂缺问题，促进木质纤维素能源化利用，缓解能源危机和环境污染压力，如充分利用纤维素酶分解秸秆，提供理论实验的可行性。  2.3发表论文1篇。 | | | | | | |
| 年度目标和工作内容（分年度写）  2017年3月——2017年4月 实验材料的准备  2017年5月——2017年6月 菌种培养、紫外诱变处理，筛选出理想菌株  2017年7月——2017年8月 提取分离所产酶，进行酶活测定  2017年9月——2017年10月 对菌株进行硫酸二乙酯诱变，进行酶活测定  2017年11月——2018年1月 实验数据的整理与论文的写作  2018年4月——2018年5月 结题并发表相关论文 | | | | | | |
| 指导教师意见  签字： 日期： | | | | | | |