



新一代糖化酶高产菌株的选育及其工业应用

张天瑞^{1,2}, 赵秋伟², 李正华³, 李寅², 张延平^{2*}

¹中国科学院天津工业生物技术研究所, 工业酶国家工程实验室, 天津 300308

²中国科学院微生物研究所, 中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101

³中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

摘要:【目的】建立对糖化酶生产菌种黑曲霉随机突变文库进行筛选的方法, 以获得糖化酶酶活提高的突变菌株。【方法】以一株可产糖化酶的黑曲霉菌株 *Aspergillus niger* X1 为出发菌株, 经硫酸二乙酯诱变获得突变文库, 采用葡萄糖的结构类似物——2-脱氧葡萄糖进行筛选, 并在筛选过程中逐渐提高 2-脱氧葡萄糖浓度, 定向选育具有 2-脱氧葡萄糖抗性、高产糖化酶的突变株。【结果】获得的高产突变菌株 DG36 摇瓶发酵糖化酶产量比出发菌株 *A. niger* X1 提高 22.2%–33.8%, 经工业水平 50 m³ 罐发酵测试, 突变株 DG36 发酵 128 h 糖化酶活可达 49094 U/mL, 在相同发酵时间内, 其酶活较出发菌株 *A. niger* X1 提高 32.8%, 发酵时间缩短 16.9%。【结论】本研究开发了一种以 2-脱氧葡萄糖为抗性标记选育高产糖化酶突变株的方法, 所得突变株 DG36 遗传性状稳定, 与出发菌相比具有菌丝粗壮、产酶期提前、糖化酶活高、发酵时间短、有利于发酵后处理的优点。

关键词: 黑曲霉, 糖化酶, 2-脱氧葡萄糖, 诱变, 硫酸二乙酯, 工业应用

糖化酶(Glucoamylase, EC3.2.1.3)全称为葡萄糖糖淀粉酶, 作为淀粉原料糖化的一种重要酶制剂, 广泛应用于食品、制药等工业领域, 用于生产酒精、白酒、黄酒、有机酸及氨基酸等。黑曲霉(*Aspergillus niger*)、红曲霉(*Monascus* sp.)和根霉(*Rhizopus* sp.)等丝状真菌是糖化酶主要生产菌株。早在 20 世纪 50 年代, 张树政院士就比较了不同曲霉的淀粉酶系组成, 证明了黑曲霉的优越性, 为我国酒精工业选用黑曲霉作为糖化酶来源提

供了理论依据^[1]。随后开展了大量诱变育种工作^[2], 1979 年报道经多年选育出的黑曲霉菌株 UV-11 (AS3.4309)在 1.2 t 罐上进行糖化酶发酵, 最高酶活为 5616 U/mL, 达到了当时国际先进水平^[3-4]。1982 年, 张树政院士在国际刊物上报道了中国在酶工程方面的进展, 向世界介绍了生产糖化酶的优良菌株及糖化酶固定化方面的成果^[5]。作为使用量巨大的酶制剂, 生产菌 UV-11 及进一步诱变所得的 UV-11-48^[6]被广泛应用于发酵生产企

*通信作者。Tel/Fax: +86-10-64807351; E-mail: zhangyp@im.ac.cn

收稿日期: 2017-03-31; 修回日期: 2017-05-22; 网络出版日期: 2017-06-26

业,在当时产生了巨大的经济和社会效益^[7],1985年,该研究获得国家科技进步一等奖。

随着科技的发展,基因工程技术被应用于糖化酶生产菌的改造中^[8-9],但时至今日,仍然是诱变育种改造所得菌株的糖化酶酶活和产量较高^[8]。同时,转基因产物的食品安全性仍备受争议,传统的诱变育种作为经典的育种方法所选育出的生产菌株可被大众接受。但是目前传统诱变选育糖化酶生产菌株常用随机筛选的方式,选出高产糖化酶突变株的几率低,工作量大。调研发现,葡萄糖的结构类似物——2-脱氧葡萄糖(2-DG)能被己糖激酶和 6-磷酸果糖激酶磷酸化而积累 2-脱氧葡萄糖-6-磷酸,但不能继续代谢,从而抑制糖酵解,具有 2-DG 抗性的突变株可能会因激活其他糖代谢途径而增强糖代谢能力^[10]。2-DG 作为抗性筛选标记已被用于提高柠檬酸、葡萄糖氧化酶、 β -呋喃果糖苷酶、木聚糖酶的产量^[10-14]。因此,本研究拟针对生产糖化酶的黑曲霉菌株,用化学诱变剂诱变,定向筛选具有 2-DG 抗性的菌株。研究发现,以 2-脱氧葡萄糖为抗性标记可定向选育高产糖化酶突变株。利用该筛选方法,本文获得了遗传稳定的高产突变株 DG36,用于工业生产时表现出产酶期提前、糖化酶活高、发酵时间短、有利于发酵后处理等优点。

1 材料和方法

1.1 菌株

A. niger X1 为工业生产菌株, *A. niger* A58、*A. niger* A82、*A. niger* A04、*A. niger* A27 及 *A. niger* A28 为本实验室保藏菌种。

1.2 培养基

查氏培养基(g/L): NaNO_3 3.00, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

1.00, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, KCl 0.50, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50, 蔗糖 20.00, 琼脂 20.00, pH 6.0–6.5, 120 °C 灭菌 15 min。

药物筛选培养基: 查氏培养基(无蔗糖)添加过滤除菌的 2-脱氧葡萄糖(2-DG)。

摇瓶发酵培养基 1 (g/L): 葡萄糖 100, 豆饼粉 30, 玉米浆 30 mL, pH 5.5, 装液量 30 mL/250 mL, 115 °C 灭菌 20 min。

摇瓶发酵培养基 2 (g/L): 玉米粉 100, 豆饼粉 40, 麸皮 10^[15], pH 自然, 装液量 30 mL/250 mL, 121 °C 灭菌 20 min。

种子罐培养基(g/L): 玉米粉 60, 豆饼粉 20, 玉米浆 10 mL, pH 5.5, 120 °C 灭菌 30 min。

发酵罐培养基(g/L): 葡萄糖 50, 玉米粉 150, 豆饼粉 40, 玉米浆 20 mL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4, pH 5.5, 120 °C 灭菌 30 min。

1.3 硫酸二乙酯(DES)诱变及筛选

使用 pH 7.0 的磷酸缓冲液制备孢子悬浮液, 加入终浓度为 1% 的 DES, 34 °C 诱变处理不同时间, 加入 25% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液终止反应, 将诱变后的孢子使用 pH 7.0 磷酸缓冲液离心洗涤 2–3 次, 梯度稀释涂布药物筛选培养基, 34 °C 培养, 待菌落长出后, 随机挑选单菌落进行发酵并测试酶活。

1.4 发酵

1.4.1 摇瓶发酵: 挑取单菌落接种发酵培养基中, 34 °C、180 r/min 培养 7 d, 取发酵液测定酶活。

1.4.2 发酵罐发酵: 取 250 mL 茄子瓶斜面 4 个, 加入无菌水洗下菌落制成悬浮液, 接入 1 m³ 一级种子罐, 装料系数 0.6, 控制 pH 4.4, 温度 34 °C, 罐压 6×10^4 Pa, 通风量 50 m³/h, 培养 48 h 后接入

5 m³ 二级种子罐, 装料系数 0.6, 接种量 7% (V/V), 控制 pH 4.4, 温度 34 °C, 罐压 6×10⁴ Pa, 通风量 800 m³/h, 培养 60 h 后接入 50 m³ 发酵罐, 装料系数 0.5, 接种量 5% (V/V), 控制 pH 4.4, 温度 34 °C, 罐压 5×10⁴ Pa, 通风量 1200 m³/h, 培养 160 h, 定时取样测定酶活。

1.5 糖化酶酶活测定

取一定体积的发酵液, 用滤布除去菌丝球, 得粗酶液, 用于测定糖化酶活力。

酶活力定义: 1 mL 粗酶液在 40 °C、pH 4.6 的条件下, 每小时分解可溶性淀粉产生 1 mg 葡萄糖的量为 1 个酶活单位(U/mL), 葡萄糖量采用 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS 法)测定。

2 结果和分析

2.1 出发菌株的选择

将 *A. niger* X1 等 6 株出发菌株的孢子悬液分别涂布于查氏培养基上, 34 °C 培养 2–4 d, 挑取菌落分别接种至发酵培养基 1 和发酵培养基 2 中, 摇瓶发酵测定糖化酶的产量。6 株黑曲霉在查氏培养基上的菌落形态如图 1 所示, 其糖化酶产量结果见表 1, 从测试结果可以看到 *A. niger* X1 在两种发酵培养基中的糖化酶酶活均高于其他菌株, 在发酵培养基 1 中糖化酶产量可达 6497 U/mL, 所以决定以 *A. niger* X1 为出发菌株进行糖化酶高产突变株的筛选, 以发酵培养基 1 为测定糖化酶酶活的发酵培养基。

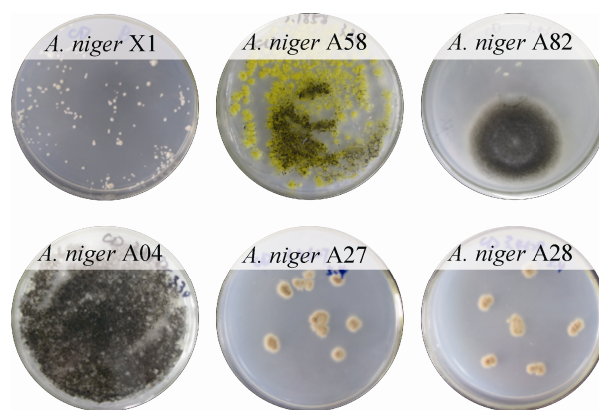


图 1. 不同黑曲霉菌株的菌落形态比较

Figure 1. Comparison of colony morphology of *A. niger* strains.

2.2 诱变条件的选择

使用 DES 对 *A. niger* X1 的孢子进行诱变, 得到的致死率曲线如图 2, 由于突变是随机发生, 高或低的致死率都有可能产生优良的突变株, 所以分别选择诱变 15 min 和 30 min 时的处理液进行突变株的筛选, 这 2 个时刻的致死率分别为 16.2% 和 84.4%。

2.3 高产糖化酶突变株的选育

2.3.1 出发菌株对 2-DG 抗性临界浓度的测定:

将 *A. niger* X1 的孢子悬浮液涂布于含有不同浓度 2-DG 的药物筛选培养基上, 经培养后发现菌株在含有 1 g/L 2-DG 的培养基上不能生长(表 2), 由此可确定出发菌株对 2-DG 的抗性临界浓度。

2.3.2 突变株的筛选: 将诱变处理后的 *A. niger*

X1 菌液, 涂布于添加有 1 g/L 2-DG 的培养基上,

表 1. 不同黑曲霉菌株的糖化酶活力比较

Table 1. Comparison of glucoamylase activity (U/mL) of different strains

Media	<i>A. niger</i> X1	<i>A. niger</i> A58	<i>A. niger</i> A82	<i>A. niger</i> A04	<i>A. niger</i> A27	<i>A. niger</i> A28
Fermentation media 1	6497	111	353	984	5709	5808
Fermentation media 2	6132	217	88	810	4513	3890

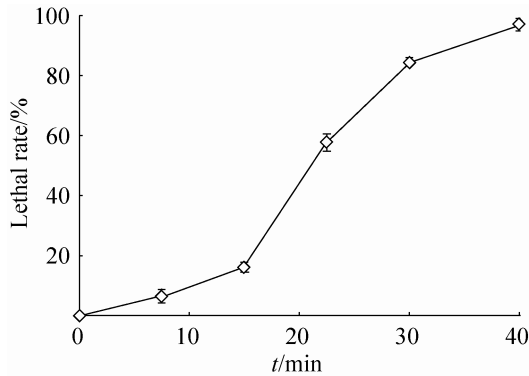


图 2. DES 致死率曲线

Figure 2. DES lethal curve.

表 2. 2-DG 对 *A. niger* X1 生长的影响

Table 2. Effects of 2-DG on the growth of *A. niger* X1

Concentration of 2-DG/(g/L)	Growth of <i>A. niger</i> X1
0	+
0.5	+
1.0	-

+/- stands for the strain *A. niger* X1 can/cannot grow on the media.

待菌落长出后, 随机挑选 22 个单菌落进行摇瓶发酵测定糖化酶酶活, 得到酶活较高的突变株 XB1, 酶活为 6920 U/mL, 相对于出发菌株提高 6.5%。将 XB1 再次诱变处理, 涂布于含有 3 或 4 g/L 的 2-DG 培养基上培养, 后者无单菌落生长, 仅在含有 3 g/L 2-DG 的培养基上有单菌落长出, 筛选后

得到 9 株酶活力提高的突变株, 经摇瓶发酵验证, 糖化酶活力与出发菌株 *A. niger* X1 相比提高幅度在 13.0%–28.4%之间, 详见图 3, 其中突变株 DG36 明显提高 28.4%。

在筛选的过程中观察到菌丝球的直径和糖化酶活的关系如表 3 所示, 发酵到达第 5 天时, 每个突变株在摇瓶内培养时可形成大小均一的菌丝球, 菌丝球直径与糖化酶活呈负相关, 形成的菌丝球越大, 其糖化酶活力越低, 如菌丝球的平均直径大于 1.8 mm, 其酶活会小于 4000 U/mL, 形成的菌丝球越小, 如直径小于 0.9 mm, 其酶活越高, 大于 7000 U/mL。将直径小于 0.9 mm 和大于 1.8 mm 的菌丝球分别制备压片进行显微镜观察, 结果如图 4, 小直径菌丝球的菌丝短粗且分叉多, 而大直径菌丝球的菌丝细长且分叉较少。菌丝球的形成对于糖化酶的生成是必需的^[16], 菌丝球的直径与菌丝的形态有关^[17], 当菌丝短粗时形成的菌丝球较小, 增大了同培养基内氧气的接触面积, 能更有效地利用氧气, 酶活得到提高; 反之, 大菌丝球同培养基内氧气接触面小, 且由于菌丝球大会限制中心供氧, 容易导致菌丝裂解, 酶活就会低^[16,18]。

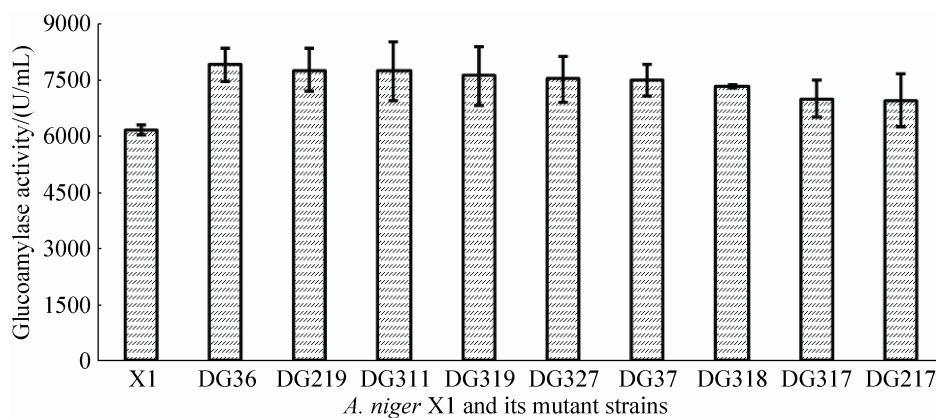




图 3. 摇瓶发酵测试突变株的糖化酶酶活

Figure 3. Glucoamylase activities of *A. niger* X1 and its mutants in shaking flask fermentation.

表 3. 不同产量突变株菌丝球比较

Table 3. Comparison of mycelial pellets morphology of *A. niger* mutants

Morphology of mycelial pellets			
Diameter/mm	<0.9	1.2–1.5	>1.8
Enzyme activity/(U/mL)	>7000	6000–5000	<4000

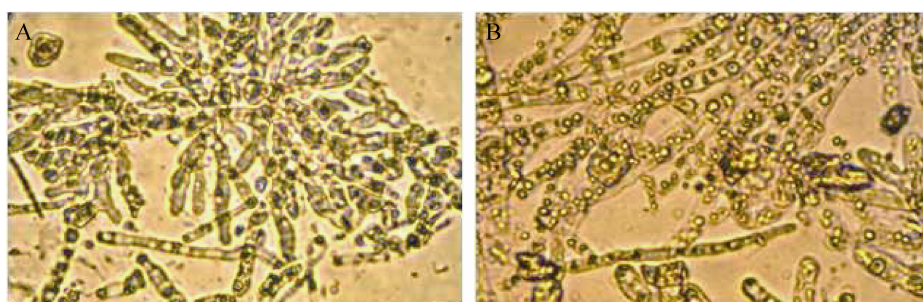


图 4. 菌丝的显微镜观察

Figure 4. Microscopic observation of mycelium. A: Diameter of mycelial pellets <0.9 mm; B: Diameter of mycelial pellets >1.8 mm.

2.3.3 高产糖化酶突变株遗传稳定性分析: 对突变株 DG36 和出发菌株 *A. niger* X1 分别在查氏斜面进行连续传代, 每次挑取一环菌, 进行摇瓶发酵测试糖化酶酶活, 共连续传代 5 次。结果如图 5, 每次测试得到的突变株 DG36 糖化酶酶活结果均高于出发菌株 *A. niger* X1, 提高率分别为 24.5%、22.2%、27.8%、33.8% 和 23.6%, 说明在连续传代过程中突变株的酶活产量较为稳定。

2.4 摇瓶发酵产酶过程比较

将突变株 DG36 与出发菌株 *A. niger* X1 进行摇瓶发酵, 比较产酶过程, 从发酵第 72 h 起每隔 48 h 取样测糖化酶活, 测定结果如图 6, 可以看到在 72 h 突变株 DG36 的酶活为 2496 U/mL, 而此时出发菌 *A. niger* X1 的酶活为 982 U/mL, 说明突

变株 DG36 比出发菌株更能较快进入产酶状态, 当到达 120 h 时, 出发菌株的酶活为 5997 U/mL, 此时突变株 DG36 的酶活为 7780 U/mL, 相比提高 29.7%, 突变株 DG36 酶活力在 168 h 达到最高值

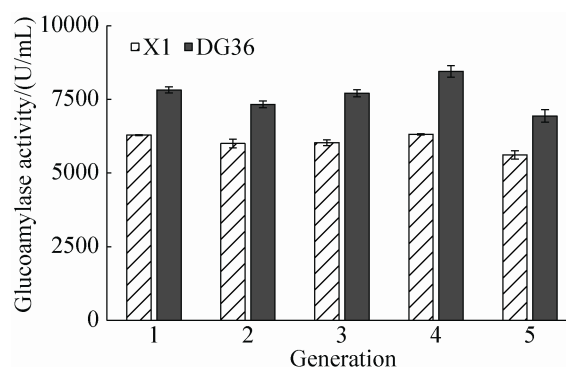


图 5. 传代次数对 DG36 糖化酶酶活力的影响

Figure 5. Glucoamylase activities of different generations of the strain *A. niger* DG36.

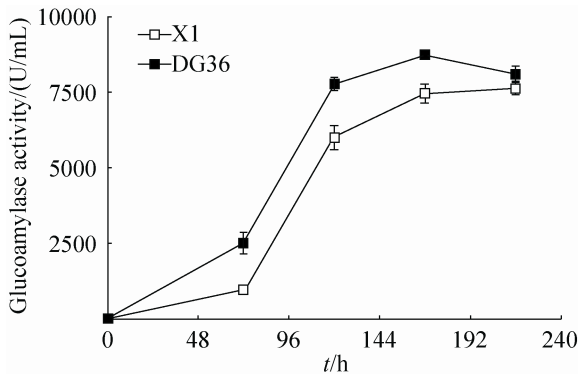


图6. 菌株 *A. niger* X1 和 DG36 在摇瓶中产酶过程曲线
Figure 6. Comparison of glucoamylase activities of *A. niger* X1 and DG36 in shake flask fermentation.

8720 U/mL, 此后酶活力下降, 摇瓶中菌丝球减少, 可能菌体开始自溶, 而出发菌 *A. niger* X1 在 216 h 酶活到达最大值 7630 U/mL, 但与 168 h 时 7448 U/mL 的酶活相比提高幅度不大, 说明在 168 h 后, 出发菌株的产酶能力也在下降, 从摇瓶发酵的时间来看, 突变株在 168 h 达到最大酶活, 而出发菌株需要 216 h, 说明突变株的摇瓶发酵产酶周期短, 时间可缩短 22.2%。

2.5 50 m³ 罐发酵测试

在江苏一家酶制剂生产企业进行突变株 DG36 与出发菌 *A. niger* X1 分别进行 50 m³ 罐发酵测试, 比较在工业水平下获得的改造株的发酵性, 在 50 m³ 罐中典型的产酶曲线如图 7。由于在大罐中进行发酵时可以控制溶氧和 pH 等参数, 发酵条件比摇瓶发酵控制的要好, 无论是出发菌株还是突变株的发酵时间都有缩短, 产酶量可以成倍提高。从产酶曲线来看, 突变株 DG36 产酶速度更快, 在 128 h 酶活可达到最大值 49094 U/mL, 在相同发酵时间内出发菌株 *A. niger* X1 的酶活为 36975 U/mL, 相比之下 DG36 的酶活提高幅度达 32.8%, 出发菌株 *A. niger* X1 在 154 h 获得的最大酶活为 40600 U/mL, 突变株的最高酶活与之相比

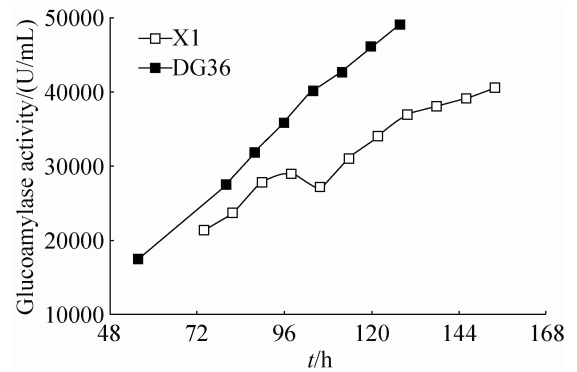


图7. 菌株 *A. niger* X1 与 DG36 在 50 m³ 罐产酶过程比较
Figure 7. Comparison of glucoamylase activities of *A. niger* X1 and DG36 in 50 m³ fermenter.

提高 20.9%, 从发酵时间上来看突变株 DG36 比出发菌株缩短 16.9%。

提高 20.9%, 从发酵时间上来看突变株 DG36 比出发菌株缩短 16.9%。

在发酵结束后进行板框过滤得粗酶液, 因突变株 DG36 与出发菌 *A. niger* X1 相比菌丝粗壮, 在发酵后期没有发生菌丝自溶现象, 发酵液后处理时板框滤渣较干, 更利于产品的回收, 提高收率 5%–8%。在多次测试中, 突变株 DG36 单罐的发酵时间在缩短 24 h 左右的情况下, 酶活还能比出发菌 *A. niger* X1 的单罐产量高或持平, 这使所消耗的糖浆和电费也相应减少, 达到减少原料消耗及节能的效果, 变相减少了生产成本。该厂年产糖化酶 2000 t, 使用改进后的菌株每罐可增产酶 23%, 年增加利润约 370 万元。

3 结论

国内使用传统诱变选育糖化酶生产菌株常用随机筛选的方式, 这会使科研人员的工作量大、效率低。在本研究中, 使用 2-DG 作为筛选药物, 增加优良菌株的筛出率, 成功定向选育出一株具有 2-DG 抗性标记的糖化酶高产菌 DG36, 遗传性状稳定, 经摇瓶发酵和 50 m³ 罐发酵测试, 突变株

DG36 与出发菌株 *A. niger* X1 相比均表现出产酶期提前、糖化酶酶活提高、发酵时间缩短的优点, 在工业中应用时可以达到增效、节能、降本的效果。2-DG 抗性菌株筛选技术已成功应用于提高黑曲霉生产柠檬酸、葡萄糖氧化酶、 β -呋喃果糖苷酶、木聚糖酶等的产量, 但在糖化酶生产菌株选育方面鲜有报道。

因突变株 DG36 与出发菌株 *A. niger* X1 相比菌丝粗壮、多分枝, 形成的菌丝球较小, 菌丝在发酵罐中发酵后期不易自溶, 这使得在工业中应用时该菌的发酵液更有利于后处理回收酶液。黑曲霉在发酵过程中形成的菌丝球直径和菌丝状态一般和培养基成分、pH、搅拌、溶氧、温度等相关^[19], 已有报道在黑曲霉生产柠檬酸时, 菌丝球越小, 柠檬酸的产量越高^[18]。在本研究中, 突变株 DG36 发生了以上变化说明某些有关菌丝形态的基因发生了改变, 在以后的研究中可以通过蛋白质组学、基因组学进行分析, 找出差异, 为以后的选育菌株提供方向。

参 考 文 献

- [1] Zhang SZ. Global impacts of microbial diversity. *Bulletin of Biology*, 1995, 30(1): 1–2, 7. (in Chinese)
张树政. 微生物多样性的全球影响. 生物学通报, 1995, 30(1): 1–2, 7.
- [2] Research Group on Glucoamylase. Studies on the N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) induced mutation for the enhancement of glucoamylase production in *Aspergillus niger*. *Acta Microbiologica Sinica*, 1974, 14(1): 77–82. (in Chinese)
中国科学院微生物研究所糖化酶组. N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍诱变黑曲霉提高产葡萄糖淀粉酶能力的研究. 微生物学报, 1974, 14(1): 77–82.
- [3] Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Jiangsu Wuxi Enzyme Plant. Studies on the production of glucoamylase by *Aspergillus niger*. AS3.4309. *Jiangsu Food and Fermentation*, 1979, (4): 17–22. (in Chinese)
中国科学院微生物研究所, 江苏无锡酶制剂厂. 黑曲霉 AS3.4309 糖化酶酶制剂的研究. 江苏食品与发酵, 1979, (4): 17–22.
- [4] Research Group on Glucoamylase in Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. Studies on the production of glucoamylase by *Aspergillus niger*. mutant strain AS3.4309: II enzyme characteristics and saccharification conditions. *Microbiology China*, 1980, 7(4): 153–155, 152. (in Chinese)
中国科学院微生物研究所糖化酶组. 黑曲霉变异株 AS3.4309 产葡萄糖淀粉酶的研究——II 酶的性质和糖化条件的研究. 微生物学通报, 1980, 7(4): 153–155, 152.
- [5] Zhang SZ, Xu JL. Development of enzyme technology and enzyme engineering in China. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1982, 7(6): 417–430.
- [6] Kong XL, Chen BC, Wang JY, Tang GM, Jiang SY, Hu ZX, Fang YC, Li SY. Breeding of *Aspergillus niger* mutant UV-11-48 and studies on the production conditions of glucoamylase. *Microbiology China*, 1987, 14(2): 51–54. (in Chinese)
孔显良, 陈必成, 王俊英, 唐国敏, 蒋仕彦, 扈芝香, 方一澄, 李淑媛. 黑曲霉变异株 UV-11-48 的选育及产糖化酶条件的研究. 微生物学通报, 1987, 14(2): 51–54.
- [7] Sun WR. Review the development history of enzyme and enzyme technology as well as related industrials in China. *Microbiology China*, 2014, 41(3): 466–475. (in Chinese)
孙万儒. 我国酶与酶工程及其相关产业发展的回顾. 微生物学通报, 2014, 41(3): 466–475.
- [8] Yang LJ, Yu SW. The research methods on molecular of *Aspergillus niger* for high-yield glucoamylase. *Food Research and Development*, 2016, 37(8): 204–208. (in Chinese)
杨丽娟, 余少文. 黑曲霉高产糖化酶的分子水平研究方法概论. 食品研究与开发, 2016, 37(8): 204–208.
- [9] Meyer V, Wanka F, van Gent J, Arentshorst M, van den Hondel CAMJJ, Ram AFJ. Fungal gene expression on demand: an inducible, tunable, and metabolism-independent expression system for *Aspergillus niger*. *Applied and Environment Microbiology*, 2011, 77(9): 2975–2983.
- [10] Gao NF, Wang QZ, Yang F. Selection of *Aspergillus niger* mutant with high citric acid-product by selection of 2-deoxyglucose resistant. *Journal of Tianjin Institute of Light Industry*, 2000, (4): 36–39. (in Chinese)
高年发, 王庆昭, 杨枫. 2-脱氧葡萄糖抗性黑曲霉高产柠檬酸突变株的选育. 天津轻工业学院学报, 2000, (4): 36–39.
- [11] Kirimura K, Sarangbin S, Rugsaseel S, Usami S. Citric acid production by 2-deoxyglucose-resistant mutant strains of *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1992, 36(5): 573–577.
- [12] Khattab AA, Bazaraa WA. Screening, mutagenesis and protoplast fusion of *Aspergillus niger* for the enhancement of extracellular glucose oxidase production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2005, 32(7): 289–294.

- [13] Ashokkumar B, Gunasekaran P. β -Fructofuranosidase production by 2-deoxyglucose resistant mutants of *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2002, 40(9): 1032–1037.
- [14] Zeng Y, Yang M, Xu YL. Mutagenicity screening of high-xylanase-producing strain with 2-deoxy-glucose resistance. *China Brewing*, 2007, 26(1): 31–34. (in Chinese)
曾莹, 杨明, 许跃龙. 2-脱氧葡萄糖抗性高产木聚糖酶突变株的选育. *中国酿造*, 2007, 26(1): 31–34.
- [15] Wu XZ, Xu WW, Xiu DG, Gu GX, Zhang YF, Mao XY. Studies on raising the activity of glucoamylase of *Aspergillus niger*-fermentative techniques. *Journal of the Wuxi Institute of Light Industry*, 1987, 6(4): 1–10, 124–125. (in Chinese)
邬显章, 徐维维, 修道高, 顾国贤, 张亚芬, 毛醒一. 提高黑曲糖化酶活力的研究——发酵技术. *无锡轻工业学院学报*, 1987, 6(4): 1–10, 124–125.
- [16] Papagianni M, Moo-Young M. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. *Process Biochemistry*, 2002, 37(11): 1271–1278.
- [17] Ryoo D. Fungal fractal morphology of pellet formation in *Aspergillus niger*. *Biotechnology Techniques*, 1999, 13(1): 33–36.
- [18] Haq IU, Ali S, Qadeer MA, Iqbal J. Stimulatory effect of alcohols (methanol and ethanol) on citric acid productivity by a 2-deoxy D-glucose resistant culture of *Aspergillus niger* GCB-47. *Bioresource Technology*, 2003, 86(3): 227–233.
- [19] Huang XJ, Diao NN, Zhang JG. Review on the formation of *Aspergillus niger* pellets and its application. *Food and Fermentation Industries*, 2014, 40(11): 171–176. (in Chinese)
黄勋娟, 刁宁宁, 张建国. 黑曲霉菌丝球的形成及应用研究综述. *食品与发酵工业*, 2014, 40(11): 171–176.

Screening of high-glucoamylase-producing strain of *Aspergillus niger* with 2-deoxyglucose resistance and the industrial application

Tianrui Zhang^{1,2}, Qiuwei Zhao², Zhenghua Li³, Yin Li², Yanping Zhang^{2*}

¹ National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

² CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

³ Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: [Objective] To obtain mutants of *Aspergillus niger* with high glucoamylase activity, we developed a screening method. [Methods] We mutagenized the starting strain *A. niger* X1 using diethyl sulfate, then cultured the mutant library on agar plate containing 2-deoxyglucose. By increasing the concentration of 2-deoxyglucose, we obtained mutants with high resistance to 2-deoxyglucose and then studied glucoamylase activities. [Results] In shake flask fermentation, glucoamylase activity of the mutant strain *A. niger* DG36 increased by 22.2% to 33.8%. In a 50 m³ fermenter, glucoamylase activity of the strain DG36 reached up to 49094 U/mL at 128 h, 32.8% higher than that of the starting strain *A. niger* X1. As a result, the fermentation period of the strain DG36 was reduced by 16.9% compared with *A. niger* X1. [Conclusion] Mutant strain DG36 exhibited higher glucoamylase activity, shorter fermentation period and more suitable for the purification treatment than the starting strain *A. niger* X1.

Keywords: *Aspergillus niger*, glucoamylase, 2-deoxyglucose, mutation, diethyl sulfate, industrial application

(本文责编: 李磊)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64807351; E-mail: zhangyp@im.ac.cn

Received: 31 March 2017; Revised: 22 May 2017; Published online: 26 June 2017