

# CO<sub>2</sub>激光辐照对酿酒酵母菌的诱变作用\*

胡卫红 陈有为 李绍兰 魏蓉城

(云南省微生物所 昆明 650091)

**摘要:** 应用红外 CO<sub>2</sub>激光对甘蔗糖蜜工业性生产用酿酒酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* AS2.1189 进行辐照处理,经酵母菌糖蜜酒精发酵试验,发现红外 CO<sub>2</sub>激光对酿酒酵母菌具有诱变作用,并初步筛选到产乙醇含量有较大变化的辐照变异菌株;同时,通过对这些辐照变异菌株的乙醇脱氢酶同工酶的比较分析,进一步证实了红外 CO<sub>2</sub>激光对酿酒酵母菌的诱变作用。从而为工业上利用红外 CO<sub>2</sub>激光对酿酒酵母菌进行诱变育种展现新的前景。

**关键词:** 红外 CO<sub>2</sub>激光,酿酒酵母菌,乙醇代谢,诱变作用,乙醇脱氢酶同工酶

**中图分类号:** Q393.44 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)-01-036-03

## A FUNCTION OF MUTAGENESIS ON *SACCHAROMYCES CEREISIAE* IRRADIATED BY CO<sub>2</sub> LASER

HU Wei-Hong CHEN You-Wei LI Shao-Lan WEI Rong-Cheng

(Yunnan Institute of microbiology Yunnan University, Kunming 650091)

**Abstract:** In this paper, by analyzing the ethanol produced by *Saccharomyces cerevisiae* irradiated by refrared CO<sub>2</sub> laser from molasses in Gas Chromatography, we have illustrated the results that CO<sub>2</sub> laser can give rise to a mutagenesis effect. Initially, we have screened several variation strains that produce ethanol abnormally. In the meantime, by the contrast of isozymes of alcohol dehydrogenase from the Yeast irradiated by CO<sub>2</sub> laser, we have a further evidence that CO<sub>2</sub> laser can cause mutagenesis effect on *Saacharomyces cereisiae*. This will present a new prospect for the mutagenesis breed by CO<sub>2</sub> laser in industry.

**Key words:** Infrared CO<sub>2</sub> laser, *Saacharomyces cereisiae*, Ethanol metabolism, Mutagenesis effect, Isozymes of ADH

激光是一种量子流,又称为光微粒。激光辐射可以通过产生光、热、压力和电磁效应的综合作用,直接或间接地影响生物有机体,引起细胞DNA或RNA改变,导致酶的激活或纯化,进而引起细胞分裂和细胞代谢活动的改变<sup>[1~2]</sup>。这为激光诱变育种提供了有利条件。激光技术在微

生物学的应用已取得了一些成果,然而应用激光

\* 国家自然科学基金资助项目 (No.39460025)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.39460025)

云南省应用基础研究基金资助项目 (No.39460036)

收稿日期:1998-09-21,修回日期:1999-01-04

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

对酵母菌进行诱变育种的研究则还少见<sup>[3~4]</sup>。本文应用 CO<sub>2</sub> 激光对酿酒酵母 *Saccharo myces cerevisiae* AS 2.1189 辐照所产生的诱变效应进行了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种: 酿酒酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* AS2.1189, 由云南大学省微生物研究所保藏。

培养基: 菌种斜面用 YPD; 酒精发酵用 12Be 的甘蔗糖蜜酒精发酵培养基。

激光器: CO<sub>2</sub> 激光, 输出电压 210V, 功率 10W;

国产 103 气相色谱仪, 填充柱为 2m 不锈钢 SE-30/Chromosorb W.80-100目, 检测器氢焰, 载气 N<sub>2</sub>。

1.2 方法

菌种的活化: 取 AS 2.1189 菌种一环, 接入新鲜培养基斜面内, 置 28℃ 培养 16~18h 后, 制成 1.5 × 10<sup>3</sup> 个细胞/mL 的菌悬液, 取 2mL 于安培管供照射用。

CO<sub>2</sub> 激光照射: 激光扩束光斑直径为 0.4 cm, 照射距离为 23cm, 照射时间为 15s。

辐照菌培养: 将照射菌悬液用生理盐水稀释成 10<sup>-1</sup>~10<sup>-6</sup> 浓度, 取 0.2mL 涂皿, 每个稀释度 3 个平皿。28℃ 培养 72h 后, 挑出形态大小不同的单菌落纯培养。

乙醇发酵: 辐照菌株于 YPD 培养基活化 16~18h, 转入甘蔗糖蜜酒精发酵液内, 28℃ 发酵培养 72h; 取发酵液 10mL 离心 (3, 500~4, 000r/min) 弃除菌体后, 供气相色谱乙醇分析。

乙醇含量分析: 色谱仪汽化室温度 170℃, 柱温 150℃。N<sub>2</sub> 20ml/min, H<sub>2</sub> 60ml/min, O<sub>2</sub> 300ml/min。进样量 1μL, 内标物为甲乙酮。

乙醇脱氢酶(ADH)同工酶分析见文献 [5]。

2 结果与讨论

2.1 CO<sub>2</sub> 激光对酵母菌乙醇代谢的影响

将 CO<sub>2</sub> 激光辐照菌株连续传代 3 代后的乙

醇发酵试验表明, CO<sub>2</sub> 激光可以使酿酒酵母菌的乙醇产量发生变化。经过 CO<sub>2</sub> 激光照射后的辐照菌, 在甘蔗糖蜜基质中的乙醇产量表现出不同程度的提高或降低(见表 1)。同出发菌株比较, B41 和 D46 菌株乙醇产量分别提高了 8% 和 11%, 另一方面, CO<sub>2</sub> 激光影响乙醇产量下降的幅度高达 13%~33%。

表1 CO<sub>2</sub>激光辐照对酵母乙醇产量的影响

| 辐照菌<br>(株) | 乙醇含量<br>(%) | 提高/下降<br>(%) | T 值<br>(T <sub>0.05</sub> =4.97) |
|------------|-------------|--------------|----------------------------------|
| D46        | 8.93        | +11.63       | 0.3837                           |
| B41        | 8.67        | +8.83        | 2.2693                           |
| B25        | 7.20        | -10.00       | 5.1210                           |
| B7         | 6.94        | -13.25       | 5.2624                           |
| C73        | 6.01        | -24.86       | 1.7816                           |
| D10        | 5.73        | -28.38       | 3.3844                           |
| C40        | 5.46        | -31.75       | 4.1413                           |
| A21        | 5.39        | -32.63       | 2.7150                           |
| A107       | 5.33        | -33.38       | 7.6691                           |
| AS2.1189   | 8.00        | 0.00         | —                                |

2.2 CO<sub>2</sub> 激光诱变酵母菌

在 CO<sub>2</sub> 激光照射过的 639 株酿酒酵母辐照菌中, 经过乙醇发酵分析, 筛选出能稳定遗传的变异菌 3 株, 占辐照菌总数的 0.47%。

上述实验结果表明, CO<sub>2</sub> 激光对酵母菌生理乙醇代谢的改变有着不同程度的作用。换言之, 可能是激光与酵母菌 DNA 或 RNA 的光化作用而引起乙醇代谢中有关的酶变化; 进而也就说明了 CO<sub>2</sub> 激光存在着诱变作用。

为了验证这一结论, 作者对酵母菌乙醇发酵代谢中的重要酶-乙醇脱氢酶, 进行了乙醇脱氢酶同工酶分析。

2.3 辐照菌乙醇脱氢酶同工酶分析

对照菌株 *Saccharomyces cerevisiae* AS 2.1189 的 ADH 同工酶 具有与文献 [6~8] 报道相同的 ADH 同工酶, 其聚丙烯酰胺凝胶电泳酶谱见图 1。

当菌体在普通 YEPD 中生长进入稳定期之后, ADH 的 3 个同工酶全部出现, 电泳迁移率最快, 近正极端的是 ADHII; 较慢的是 ADHI; 最慢的是近负极端的 mADH。

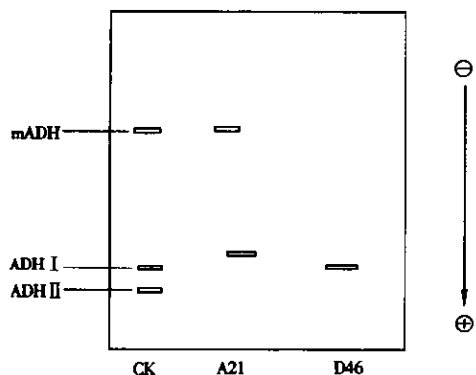


图1 辐照菌ADH同工酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳酶谱

CK: 对照菌株AS2.1189, A21和D46为辐照菌

辐照变异菌株ADH同工酶,由图1可见,辐照变异菌A21,只出现两条ADH同工酶带,即近正极端的ADHI和近负极端的mADH。与对照菌株相比,该辐照变异菌株缺少一条ADHII同工酶带,即相当于ADHII所处的位置,这说明经过CO<sub>2</sub>激光辐照的变异菌株没有合成ADHII或者说合成的ADHII无活性。另外,该辐照变异菌株的ADHI迁移率与对照菌株的正常ADHI迁移率也不完全一样,即其ADHI的迁移率要低。这说明了经过CO<sub>2</sub>激光辐照的变异菌株的ADHI结构发生了改变。同样,从图中还可发现,辐照变异菌株D46只在近正极端出现一条相当于ADHI的酶带,与对照菌株的ADH同工酶带相比,则缺少了相当于ADHII和mADH所表现的酶带。这说明该辐照菌株没有合成ADHII和mADH或者说所合成的ADHII和mADH没有活性。

从上述的CO<sub>2</sub>激光辐照菌乙醇脱氢酶同工酶电泳的结果及分析中可以看出,经CO<sub>2</sub>激光辐照的酿酒酵母变异菌株的乙醇脱氢酶同工酶酶谱与未经CO<sub>2</sub>激光辐照的对照菌相比,都有所不同,这就进一步证实了CO<sub>2</sub>激光确实对酿酒酵母有诱变作用;另外,这些变异菌株乙醇脱氢酶同工酶酶谱也各不相同,这又表明CO<sub>2</sub>激

光对酿酒酵母的诱变作用也不完全一致。

乙醇脱氢酶同工酶是酵母菌乙醇发酵中的重要酶,上面ADH酶谱的材料都是单倍体菌株细胞。因此,所表现的谱型不是一基因的等位基因的表达,而只能是不同座位上的基因的表达<sup>[9~10]</sup>。而且,这些菌株都经连续传代5代后依然是稳定的。乙醇脱氢酶的变化,也就反映了细胞合成控制乙醇脱氢酶这种蛋白质的遗传系统发生了改变。这就提示,应用红外CO<sub>2</sub>激光辐照酿酒酵母菌确实能够引起酵母菌的遗传系统发生改变,即引起酵母菌突变。这为CO<sub>2</sub>激光应用在酿酒酵母的诱变育种展现了新的前景。

在另一方面,CO<sub>2</sub>激光辐照引起酵母细胞中遗传系统改变,为进一步确证遗传改变的实质,有必要对辐照变异菌株的DNA进行测序,有关这方面的工作将另文发表。此外,CO<sub>2</sub>激光诱变酿酒酵母菌引起其遗传物质发生改变,这一过程是怎样进行的?即诱变的具体机制如何?这些都有待于进一步的研究。

## 参 考 文 献

- [1] Willis C. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 782:274~284.
- [2] Zakian V. Mol. Cel. Biol., 1981, 1:673~679.
- [3] 陈有为,李绍兰,杨丽源等. 激光生物学,1996,5(1):800~803.
- [4] Krertman M. Nature, 1983, 304.
- [5] 胡能书,万国贤. 同工酶技术及其应用. 湖南:湖南科学技术出版社,1985.
- [6] 周光宇. 植物生理学报,1983,(1):1~4.
- [7] 吴培培,陈士怡,邱鸿芳等. 遗传学报,1987,14(1):1~7.
- [8] Werth C R. Isozym Bull, 1990, 23:109.
- [9] Titus T A. Bioch. Syst. Eco., 1994, 22(5):477~489.
- [10] Ritland K, Soltis D S, Soltis P S. Heredity, 1990, 65(3):289~296.