

激光诱变青霉 PT95 原生质体选育类胡萝卜素高产菌株 *

韩建荣 董仙芳

(山西大学生命科学系 太原 030006)

摘要: 采用激光对青霉 PT95 菌株的原生质体进行了诱变处理, 选育到一株菌核生物量和类胡萝卜素含量均有显著提高的突变菌株 L05。与出发菌株相比, L05 菌株的菌核生物量提高了 98.6%, 菌核中的类胡萝卜素含量提高了 28.3%, 在查氏平板上的类胡萝卜素产率提高了 154.0%。所选育的 L05 菌株经 3 次传代培养, 菌落没有发生扇形变异, 菌核生物量和类胡萝卜素含量没有明显改变, 说明该菌株具有良好的遗传稳定性。

关键词: 青霉, 原生质体, 类胡萝卜素, 激光诱变

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 02-0031-04

SELECTION OF HIGH-YIELD CAROTENOID PRODUCING STRAIN BY LASER MUTAGENESIS OF PROTOPLAST OF *PENICILLIUM* SP. PT95

HAN Jian-Rong DONG Xian-Fang

(Department of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract: A mutant strain L05 was screened from its parent strain *Penicillium* sp. PT95 by laser irradiation of protoplast. When L05 strain was incubated in Czapek's agar plates for 20 d, both the sclerotia biomass and carotenoid content accumulated in sclerotia increased significantly compared with that of PT95 strain, and the increase rate reached respectively 98.6% and 28.3%. The carotenoid yield of L05 strain reached 381 μ g/plate, which was 2.54 times higher than that of PT95. The character of both sclerotia and carotenoid high productivity remained stable after three times of subculture. No sector colony appeared during subculture.

Key words: *Penicillium* sp., Protoplast, Carotenoid, Laser mutagenesis

在工业微生物领域, 获得高产菌株的主要途径是通过物理或化学手段诱变产生突变体。而在各种物理方法中, 又以紫外线辐射诱变最为常用。对于丝状真菌来说, 一般是选择孢子进行诱变。直接利用原生质体进行紫外线诱变也可得到较优良的菌株, 关于这方面的研究, 国内外已有许多报道^[1]。近年来, 激光诱变在微生物遗传育种上也有陆续报道^[2], 突变频率比紫外线诱变明显提高, 尤其是产量性状上, 诱变效果相当不错。但到目前为止, 主要是用来诱变孢子, 还未见用激光直接诱变原生质体的研究报道。由于原生质体对理化因素的敏感性比孢子和营养细胞更强, 所以从理论上讲, 用激光诱变原生质体其效果会更好, 是一个值得探索的新的研究领域。

我们从土壤中分离到一株能在菌核内积累大量 β -胡萝卜素的汤姆青霉 PT95 菌株, 并对该菌株的生物学特性和固态发酵方法进行了初步研究^[3,4]。从已经取得的研究结果看, 该菌株具有其它产 β -胡萝卜素微生物所没有的许多优点, 是唯一报道过的适合采

* 山西省自然科学基金资助项目 (No. 20001082)

收稿日期: 2001-01-13, 修回日期: 2001-04-29

用固态发酵工艺来进行类胡萝卜素发酵生产的菌株。但 PT95 菌株与其它著名的类胡萝卜素高产菌株相比,其类胡萝卜素产量明显偏低。目前国际上利用 *Blakeslea trispora* 进行液态发酵,其类胡萝卜素产量已经达到 $48\text{mg/L}^{[5]}$,而 PT95 菌株在固态发酵条件下的类胡萝卜素产量只有 $5.26\text{mg}/100\text{g}$ (干料) $^{[4]}$ 。鉴于这种情况,有必要对 PT95 菌株进行诱变选育以进一步提高其类胡萝卜素产量。本文报道对 PT95 菌株的原生质体进行激光诱变处理选育高产突变株的初步结果。

1 材料与方法

1.1 菌株

Penicillium sp. PT95,从山西汾阳混交林土壤中分离得到。在本试验中作为激光诱变的出发菌株。

1.2 培养基

查氏琼脂培养基,用来保存菌种和检验突变株形成菌核、产生类胡萝卜素的能力。

查氏液体培养基,用来摇床培养得到菌丝球以制备原生质体。

原生质体再生培养基 $^{[6]}$: PDA + 0.6mol/L NaCl 溶液。

1.3 酶液配制

称取纤维素酶、蜗牛酶、溶壁酶各 0.05g ,用 10mL 0.6mol/L NaCl 溶液溶解,用 G-5 漏斗过滤除菌备用。

1.4 原生质体的制备

将 7d 菌龄的查氏平板上的 PT95 分生孢子接入装有 50mL 查氏液体培养基的三角瓶中, 28°C 摇床培养 (120r/min) 24h,然后收集菌丝球。再用无菌水和 0.7mol/L NaCl 高渗溶液离心洗涤菌丝球备用。在小试管中加入 1g 菌丝球和 2mL 酶液, 33°C 恒温水浴酶解 3 h,然后将酶解液 1000r/min 离心 2min 得到原生质体沉淀。再将所得原生质体沉淀用 0.7mol/L NaCl 高渗溶液离心 (4000r/min , 10min) 洗涤两次,然后将原生质体重悬于 0.7mol/L NaCl 高渗溶液中。

1.5 激光诱变

取 0.5mL 原生质体液 ($3 \times 10^6/\text{mL}$) 置小试管中,用 He-Ne 激光 (波长 632.8nm , 光功率 1mW) 分别照射 15 min、30 min、45 min。

1.6 筛选突变株

将激光照射过的原生质体液经过适当稀释后涂布接种到再生培养基上, 28°C 培养,以未照射过的原生质体液为对照。然后将与对照平板上的菌落差异明显的再生菌落转接到查氏平板上培养 20d,确定其能否形成菌核。将能形成菌核的初筛突变株再接到查氏平板上培养以进一步测定突变株形成菌核和积累类胡萝卜素的能力。

1.7 菌核生物量测定

待突变菌株在查氏平板上形成菌核并呈橙红色时,用自来水将平板上的菌核刮洗下来,充分冲洗干净,置 50°C 烘干称重。

1.8 类胡萝卜素的提取及含量测定

按文献 [3] 的方法提取菌核中类胡萝卜素,并按文献 [7] 的方法计算类胡萝卜素含量。

1.9 类胡萝卜素组分分离

按文献 [8] 的方法, 在硅胶 G 薄板 (青岛海洋化工厂产品) 上分别用浓缩后的类胡萝卜素氯仿浸提液和标准 β -胡萝卜素 (Merck 产品) 氯仿溶液点样, 以石油醚: 乙酸乙酯 = 9:1 为展开剂, 于暗处展开, 使各组分分离。

1.10 β -胡萝卜素的测定

按文献 [4] 的方法进行。

1.11 统计学处理

以上试验设 3 次重复。取 3 次试验的均值, 用 Duncan 多重比较法^[9]进行多个均数间两两比较的显著性检验。

2 结果与讨论

2.1 原生质体的再生

制备好的原生质体接种到再生培养基上, 其再生率为 1.60%。再生的单菌落形态均一, 无明显差异。当把再生的单菌落再接到查氏平板上培养 20d 后, 没有观察到菌核的形成。这说明用 PT95 菌株菌丝体制备的原生质体已经失去了形成菌核的能力, 更谈不上积累类胡萝卜素了。

将激光照射过的原生质体与未照射过的原生质体分别接到再生培养基上, 28℃ 黑暗培养, 计算再生率 (表 1)。结果表明, PT95 的原生质体经 He-Ne 激光照射后其再生率有明显下降; 照射时间越长, 再生率越低。

表 1 激光照射时间对原生质体再生率的影响

照射时间 (min)	15	30	45	对照
再生率 (%)	1.55ab*	1.47b	1.24c	1.60a

* 带不同字母的数据差异显著 ($P < 0.05$)

2.2 突变菌株的筛选和与出发菌株的比较

5d 后当单菌落长出时, 从各再生平板上共挑选出与对照菌落 (即在接种未照射过的原生质体的平板上长出的菌落) 有明显差异的单菌落 56 个, 再接种到查氏平板上培养。20d 后, 在 56 个单菌落培养物中分离到 5 个能形成菌核的突变株, 分别编号为 L01、L02、L03、L04 和 L05 菌株。

初筛到的 5 个突变株与出发菌株在查氏平板上进行了菌核生物量和类胡萝卜素产量的比较。结果 (表 2) 表明, 5 个突变株中, L04 菌株的菌核生物量与 PT95 相比略有降低, L01 则明显降低, 而 L02、L03、L05 却明显增加 ($P < 0.05$), L05 菌株的菌核生物量增加幅度最大, 达 98.6%; 除了 L03 菌株外, 类胡萝卜素含量均有提高, 提高幅度最大的是 L05 菌株, 达 28.3%。如果从类胡萝卜素产率 (即菌核生物量与类胡萝卜素含量的乘积) 来考虑, L05 的增加幅度可达 154.0%。

表 2 突变菌株和出发菌株在查氏平板上的菌核生物量、类胡萝卜素产量

菌株	菌核干重 (mg/平板)	类胡萝卜素含量 ($\mu\text{g/g}$ 干菌核)	类胡萝卜素产量 ($\mu\text{g}/\text{平板}$)	β -胡萝卜素含量 (%)
L01	593a	269b	160a	68.4ab
L02	732c	253ab	185b	70.5b
L03	701c	221a	155a	71.3b
L04	637b	246ab	157a	69.6b
L05	1293d	295b	381c	67.9ab
PT95	651b	230a	150a	64.3a

我们在以前的研究中^[3]证明 PT95 菌株在查氏平板上培养得到的菌核中积累的类胡萝卜素由两种色素成分组成, 其中 β -胡萝卜素占色素总量的 64.3%。本试验薄层色谱分析表明, 5 个突变株菌核中积累的类胡萝卜素同样是由两种色素成分组成, 不过 β -胡萝卜素在类胡萝卜素总量中的百分含量提高幅度不大, L03 菌株提高最多, 达 10.9%。

2.3 L05 菌株的遗传稳定性

许多霉菌和酵母菌都容易发生扇形变异 (Sectoring)^[10], PT95 菌株也不例外。对于 PT95 这样的在菌核中积累色素的菌株来说, 扇形变异的发生, 特别是分生孢子扇形变异的发生, 一方面降低了菌核生物量, 另一方面对菌核的分离及色素的提取也是不利的。所以, L05 突变株在继代培养过程中是否容易发生扇形变异作为其遗传稳定性的一个方面必须予以考虑。将 L05 菌株在查氏斜面上每隔一个月转接一次, 然后将 3 次传代的斜面同时活化并在查氏平板上培养观察。结果 (表 3) 表明 L05 菌株不仅菌核生物量和类胡萝卜素含量仍保持原有的高水平, 而且也没有发生分生孢子扇形变异, 只是在菌落边缘有窄的分生孢子条带。这说明 L05 菌株具有比 PT95 菌株更好的遗传稳定性。

表 3 传代后的 L05 菌株的培养特征

传代次数	扇形变异	菌核干重 (mg/平板)	类胡萝卜素含量 ($\mu\text{g/g}$ 干菌核)
1	无	1207a	298a
2	无	1285a	286a
3	无	1237a	290a

上述试验证明激光诱变原生质体是一种行之有效的获得高产突变株的手段, L05 菌株是比 PT95 菌株具有更多优良性状的突变株。在本试验基础上如果进一步研究适合 L05 菌株进行类胡萝卜素生产的固态发酵方法和工艺条件, L05 菌株的菌核生物量和类胡萝卜素产量可能会进一步提高。

致谢 本工作得到山西大学物理系光学实验室武绍文高级工程师的帮助, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 李庆余, 朱宝臣, 李璐滨, 等. 微生物学报, 1990, 30 (4): 312~313.
- [2] 李永泉, 贺筱蓉. 生物工程学报, 1998, 14 (4): 445~448.
- [3] 韩建荣, 王肖娟, 原香娥. 微生物学通报, 1998, 25 (6): 319~321.
- [4] 韩建荣, 徐 军. 微生物学报, 1999, 39 (2): 148~153.
- [5] Kim S W, Seo W T, Park Y H. Biotechnol Lett, 1996, 18 (11): 1287~1290.
- [6] 邢来君, 张 军, 孙 光, 等. 真菌学报, 1987, 6 (4): 242~247.
- [7] 王业勤, 李勤生. 天然类胡萝卜素研究进展, 生产, 应用. 北京: 中国医药科技出版社, 1997.
- [8] An G H, Schuman D B, Johnson E A. Appl Environ Microbiol, 1989, 55: 116~124.
- [9] 杜荣寿. 生物统计学. 北京: 高等教育出版社, 1985.
- [10] Abdalla M H. Mycopathologia, 1975, 56: 39~40.