

# 紫外线诱变原生质体选育核黄素高产菌株

程鲁榕 邓秀珍 江幼岷 葛忠良

(军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

**摘要** 以产核黄素生产用菌——阿舒假囊酵母 RS-89 为出发菌株,用对数期生长的菌丝体,经 0.5% 蜗牛酶+0.5% 纤维素酶作用 2h 可获得大量原生质体,其再生率为 6.1%。对经 UV 诱变的原生质体再生株进行初筛、发酵复筛,从中获得了菌落大、色素深、产量高于出发菌株 30% 的高产稳定株——UP-91。

**关键词** 阿舒假囊酵母菌;原生质体;诱变育种

利用完全脱去细胞壁的微生物细胞——原生质体进行诱变,用于改良微生物的菌种特性,提高产率这一技术,由于方法简便、效果好、易于推广而越来越受到重视<sup>[1-3]</sup>,是菌种选育的一条新途径。本实验对核黄素产生菌阿舒假囊酵母菌,进行了原生质体的制备并对其原生质体进行紫外线处理,观察了紫外线对原生质体的诱变作用以及经照射后原生质体的再生过程及形态变化,以期了解原生质体的某些特性并从再生突变株中获得高产株,提供生产使用。同时,为进行原生质体融合等研究工作打下基础。

## 材料和方法

### (一) 材料

1. 菌种: 阿舒假囊酵母 (*Eremothecium ashbyii*) RS-89。

2. 培养基(%)

(1) 固体培养基: 参照文献[4]。

(2) 再生培养基: 参照文献[5]。

(3) 发酵培养基: 参照文献[4]。

3. 试剂

(1) 0.2mol/L 磷酸缓冲液 (PB), 内含 0.6mol/LKCl, pH6.0。

(2) 0.5% 蜗牛酶 (中国科学院生物物理所)+0.5% 纤维素酶 (ONozuka R-10)-PB 溶液, 0.2 μm 滤膜过滤。

### (二) 方法

1. 原生质体及孢子的制备: 收集对数生长期的菌丝体,一部分制成菌悬液后,过滤收集孢子。另一部分放入盛有酶液的瓶皿中,28℃ 静止酶解 2h, 过脱脂棉漏斗进行分离,再过 G3 漏斗除去孢子, 2000r/min 离心 10min, 洗涤 2 次,收集纯化的原生质体,悬浮于 PB 液中,显微镜下计数(以 C 表示)、备用。

2. 原生质体的再生及再生频率的计算: 将纯化的原生质体悬液按以下两个步骤进行:

(1) 经 PB 液适当稀释后,涂布于再生培养基上,28℃ 培养 7d 后计菌落数(以 A 表示)。(2) 用无菌水适当稀释后,涂布于固体培养基上,28℃ 培养 5d 后计菌落数,此为未形成原生质

体的菌落数(以 B 表示)。

3. 紫外线诱变处理原生质体及孢子: 将制备好的原生质体和孢子悬液(5 × 10<sup>5</sup>/ml) 各取 4ml, 分别加入同等大的平皿中,置于 15W 紫外灯(波长 253.7nm) 下,距离 30cm, 照射 30—120s。不同时间取菌液分别涂布于再生和固体培养基上,28℃ 倒置培养。显微镜下观察不同时间的原生质体再生情况。

$$\text{再生率} = \frac{A - B}{C} \times 100\%$$

4. 发酵与核黄素单位测定方法: 初筛: 根据照射后在再生和固体培养基上生长的菌落颜色深浅、大小进行初筛。复筛: 单菌落选择后转斜面培养 7d, 再次分离、培养、挑选单菌落 100 株进行摇瓶发酵培养,从中筛选正突变株。发酵温度为 28—30℃, 振荡培养 5d。发酵液用 930 荧光光度计测定荧光强度、计算核黄素发酵单位(μg/ml)。

## 结果与讨论

### (一) 原生质体的形成与再生

比较了不同酶的配比在不同浓度时酶解菌丝体对原生质体形成的影响,结果表明,在同样条件下,以 0.5% 蜗牛酶 + 0.5% 纤维素酶对于对数生长期的菌丝体, 28℃ 酶解 2h 效果较好(表 1)。高浓度的酶(1%)可能对较早释放的原生质体膜有直接酶解作用。

表 1 不同酶条件对原生质体形成的影响

酶的种类	平均原生质体数(个/ml)	
	浓度 0.5%	浓度 1%
蜗牛酶(蜗)	1.4 × 10 <sup>7</sup>	5.6 × 10 <sup>6</sup>
纤维素酶(纤)	3.0 × 10 <sup>7</sup>	4.4 × 10 <sup>6</sup>
蜗+纤	1.9 × 10 <sup>7</sup>	9.6 × 10 <sup>6</sup>

酶解 2 小时

实验还比较了取材不同对获取原生质体数量的影响,结果表明,采用对数期的菌丝体酶解所得到的原生质体数远高于用孢子酶解所获得的原生质体数及原生质体膨大后长出再生菌丝(图版 I)。

显微镜连续观察了原生质体在固体再生培养基中的再生情况。发现原生质体形成菌落的时间明显比孢子延缓2—3d或更长,其再生方式主要是直接由原生质体膨大后长出再生菌丝,原生质体再生率为6.1%。

## (二) 原生质体和孢子对紫外线的敏感性

原生质体和孢子分别经紫外线照射不同时间,其存活率如表2所示。

表2 紫外线照射对原生质体和孢子的致死效应

照射时间(s)	原生质体存活率(%) ( $\bar{x} \pm SD$ )	孢子存活率(%) ( $\bar{x} \pm SD$ )
0	100	100
30	53.5 ± 20.1	15.7 ± 0.7
60	10.6 ± 6.6	1.8 ± 0.3
90	2.0 ± 2.5	0.4 ± 0.0
120	1.4 ± 2.0	0.3 ± 0.1

表中可见,孢子和原生质体都随着照射时间的延长,活存数逐渐减少,存在着明显的剂量效应关系。但是,孢子比原生质体对紫外线更敏感,其原因可能是:在同等细胞数的照射条件下,呈镰刀形的孢子受照表面积比呈球形的原生质体受照表面积占整个自身总面积的比例要大的多;另外,原生质体容易积聚成串或堆,这样可能致使紫外线照射不均匀。另一原因可能是紫外线对于这两种处于不同的表面结构状态的作用机制不同。

## (三) 紫外线照射对原生质体和孢子的诱变效果

将照射的原生质体和孢子分别于再生培养基和固体培养基上培养数天后,进行初筛,挑取单菌落,转接至固体培养基上,培养7d后,进行孢子分离、培养、挑取单菌落于发酵摇瓶中进行培养,测定发酵单位。每批以出发菌株作为对照,从中挑选正突变率高于原株10%的菌株再行诱变,如此反复。

比较了在同一剂量照射下,原生质体和孢

子受紫外线诱变后,对其产核黄素的影响(图1)。以出发菌株的产量为100%,所得结果表明,照射后原生质体的正突变株数高于负突变株数,而且,其正突变株的产核黄素的幅度明显提高,其中有一高于出发菌株产量30%的高产菌株。

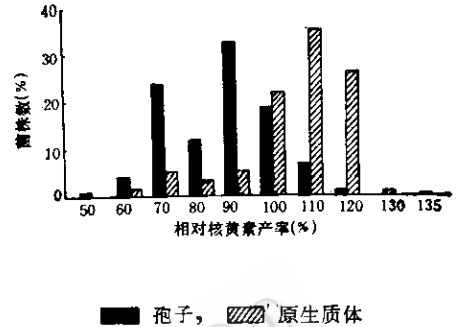


图1 经UV照射的孢子生长菌落和原生质体再生菌落的核黄素产量分布比较

## (四) 突变株遗传稳定性的初步观察

对突变株作连续摇瓶传代10次,检测其遗传稳定性,从发酵产量观察,其遗传性状是稳定的。在异地培养条件发生变化的情况下,连续摇瓶传代8次,仍然保持较好的遗传性状。

综上所述可见,利用原生质体进行诱变比用孢子直接诱变更易得到高产株,其原因可能是由于原生质体的特殊细胞结构,在其复杂的再生过程中,本身就是一种淘汰劣种的过程,加之紫外线的照射因素,更增加了再生过程的复杂性。另外,该方法较之原生质体融合的方法育种更为简便易行,周期更短,是一值得推广的有效育种方法之一。

## 参考文献

1. 王弘等: 生物工程学报,6(1): 32—38,1990.
2. 杜珠还等: 生物工程学报,1(4): 59—62,1985.
3. 朱建伟等: 生物工程学报,4(4): 304—309,1988.
4. 李明南等: 微生物学通报,15(4): 166—168,1988.
5. 唐孝宜等: 工业微生物,17(5): 23—29,1987.

(1992-2-20收稿)

## SELECTION HIGH-YIELD RIBOFLAVIN PRODUCING STRAIN OF PROTOPLASTS TREATED WITH UV

Cheng Lurong Deng Xiuzhen Jiang Youmin Ge Zhonglian

(*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing*)

In this paper, factors affecting protoplast formation, the microscopic observation of the process of protoplast formation and regeneration, the distribution of Riboflavins productivity among the protoplast regenerated clones treated with UV were investigated.

Protoplasts were obtained from mycelia of *Eremothecium ashbyii* by using a combined lytic enzyme system containing commercial cellulase and snail digestase. The frequency of the protoplast regeneration was 6.1%. The high-yield stable strain UP-91 was obtained by UV irradiation of protoplast and screening of the fermentation of many regenerative mutants. The productivity of the mutant was as 30% high as that of starting strain.

**Key words** *Eremothecium ashbyii*; Riboflavin-producing; Protoplast; Mutation breeding