

激光诱变黑曲霉原生质体选育 高酶活生淀粉糖化菌的研究

李俊刚* 方善康

(山东大学微生物系, 济南 250100)

摘要 本研究对生淀粉糖化菌黑曲霉 S-1 原生质体制备与再生因素进行了探讨。该菌菌丝体酶解 2 小时后, 可制得 $2 \times 10^8/\text{ml}$ 原生质体, 其再生率达 13.3%。采用波长 ($\lambda_1 = 260\text{nm}$, $\lambda_2 = 266\text{nm}$) 能量 8mj 的激光直接照射该菌原生质体。结果表明: 激光对原生质体的致死率比孢子的致死率高; 激光对原生质体的诱变效应也较好, 其正突变率比孢子的正突变率高 34%; 与出发菌株相比生淀粉糖化酶活性平均提高 37.4%, 最高突变株酶活提高 91%。

关键词 黑曲霉原生质体; 生淀粉糖化酶; 激光诱变

选育分解生淀粉能力强的生淀粉糖化菌是生淀粉酒精发酵尽快应用于工业化生产的关键。但目前国内外拥有生淀粉糖化的优良菌种太少, 且复合酶系单一。以致发酵用曲量太高^[1], 生产成本低, 难以实现大规模工业化生产。本研究以黑曲霉 S-1 为出发菌株, 采用激光对该菌原生质体直接进行诱变处理, 旨在探讨激光对原生质体的诱变效应, 寻找最佳激光波段和辐照剂量, 最后选育出生淀粉糖化酶活力高, 复合酶系齐全的优良菌株。

材料与方法

(一) 材料

1. 菌种: 黑曲霉 (*Aspergillus niger* S-1)。由山大微生物系提供。

2. 培养基: 菌丝生长培养基: 土豆汁琼脂培养基。

再生培养基 (RM): 采用双层琼脂法。以 0.7mol/L NaCl 配制的土豆汁高渗培养基, 上层含 1% 的琼脂, 下层含 2% 的琼脂, 并加入 0.2% 的去氧胆酸钠作为抑制剂。

3. 主要仪器及试剂

YAG 泵浦染料激光器: 辐照光源可调谐染料激光器 (Datachrom-5000 型) 输出波长可调, 光斑 $\phi 7\text{mm}$ 左右。

纤维素酶: sigma 公司 (黑曲霉产生)。

蜗牛酶: 中国科学院生物物理研究所。

真菌溶壁酶 (Lywallzyme): 广东微生物研究所。

4. 酶液配制: 纤维素酶 0.5%、蜗牛酶 0.5%、真菌溶壁酶 0.5%, 用 0.7mol/L NaCl 稳定液配制, 用 G-5 漏斗过滤除菌, 4°C 冰箱保存备用。

5. 稳定剂: 0.7mol/L NaCl 溶液。

(二) 方法

1. 菌丝体的制备^[2]。

2. 原生质体制备: 将制备好的菌丝体, 置于 5ml 含有混合酶 (纤维素酶 0.5%、蜗牛酶 0.5%、真菌溶壁酶 0.5%) 的 0.7mol/L NaCl 稳定液中, 于 33°C 酶解 1—3 小时。用相差显微镜观察并计原生质体数。酶解液用 G-2 漏斗过滤, 滤液于 3000 r/min 离心 10 分钟, 收集原生质体, 所得原生质体沉淀用 $\text{pH } 6.0$ 的 0.7mol/L NaCl 稳定液洗涤离心两次。然后将原生质体重悬于上述稳定液中, 用相差显微镜观察计数。

3. 激光诱变: 将无菌圆形滤纸片 ($\phi 7\text{mm}$) 平铺于无菌平皿内, 每皿 15—20 片, 各片间保

持一定距离,然后用无菌吸管将纯化的原生质体悬液点种于滤纸片上。用波长 266nm 的 YAG 泵浦染料激光器分别照射各滤纸片不同时间,照射剂量分别为 5mj、8mj、16mj、28mj 等。最后用高渗溶液将滤纸片上的原生质体洗下。系列稀释后,每一稀释液倒双层再生平板,28℃ 恒温培养 3—5 天,计再生菌落数。挑取单菌落于土豆汁斜面上,测生淀粉糖化酶活性。

按上述方法用激光照射孢子悬液,作对照测定。

4. 酶活力测定^[3]

生淀粉糖化力测定:

(1) 麸曲制备:在 300ml 三角瓶中加 10g 麸皮,10ml 自来水拌匀后,1kg/cm² 灭菌 30 分钟。冷却接种,28℃ 培养 33—36h。

(2) 酶液的浸提:在上面成熟麸曲中加入 90ml 蒸馏水,40℃ 浸泡 1h 过滤,滤液即为酶的原液,待测。

(3) 酶活力测定:采用 Somogyi 定糖法^[4]。

生淀粉糖化酶活性表示方法:在上述条件下,1ml 酶液 1 hr 分解生玉米淀粉产生 1.0mg 葡萄糖定为一个活力单位。

结果与讨论

(一) 原生质体制备与再生的最佳条件

本实验结果表明:①点种用孢子悬液浓度必须在 1×10^7 /ml 以上。②采用纤维素酶、蜗牛酶、真菌溶壁酶各 0.5% 浓度的混合酶液及 0.7mol/L NaCl 稳定剂,原生质体数达 2×10^8 /ml。③培养菌丝的最适温度为 28℃,最适菌龄 18 小时。④酶解温度以 30—33℃ 为宜;酶解时间 1.5h;酶解液 pH6.5;酶解时需经常振荡。⑤上述条件对原生质体再生也很有利,土豆汁再生培养基最适宜,其再生率达 13.3%。

(二) 激光对原生质体和孢子的诱变作用

1. 不同波长和能量的激光对原生质体和孢子的致死作用:鉴于细胞 DNA 的光谱吸收曲线峰值,我们采用紫外区段 ($\lambda_1 = 260\text{nm}$ 、 $\lambda_2 = 266\text{nm}$) 两种波长以及 335nm、488nm、514.5nm 和 532nm 等波长的激光照射原生质

体 60 秒。结果表明,用相同功率(5mj)的激光照射原生质体时,致死率与辐照波长有密切关系。上述 6 种波长激光照射,原生质体致死率分别为 80.6%、84.6%、74.8%、41.3%、36.7% 和 21.2%。很明显,紫外波段的激光对原生质体有明显的致死率。这和细胞 DNA 的光谱吸收曲线峰值在 265nm 左右相吻合,这一波段的激光容易透过和被 DNA 吸收。因此,它引起的光效应、压力效应、热效应和电磁场效应的综合作用也最强烈,从而导致原生质体的死亡率也增高^[5]。而 266nm 的激光对原生质体的致死率高于 260nm 的致死率。

用同一波长 ($\lambda = 266\text{nm}$) 的激光辐照原生质体和孢子,其致死率都随激光能量和辐照时间的增加而增高。原生质体对激光比孢子更为敏感。在同一波长时,随着辐射能量的增加原生质体的致死率也增高。照射时间为 60 秒时,37、28、16、8、5、2、0.15mj 的致死率分别为 98.78%、90.6%、85.2%、70.6%、67.1%、42.1%、13.2%。照射能量太低,致死率也低。

2. 不同波长和能量的激光对原生质体和孢子的诱变效应:以上述 6 种波长,能量 8mj 的激光分别照射原生质体和孢子 40 秒,然后分别挑取单菌落,制麸曲,测生淀粉糖化酶活力。并规定酶活比出发菌株提高 10% 为正突变株。

表 1 不同波长的激光对原生质体和孢子的诱变效应

波长 (nm)	正突变率(%)	
	原生质体(298株)	孢子(186株)
260	65.8	46.6
266	70.0	50.4
335	58.6	31.2
488	8.6	3.8
514.5	4.6	1.8
532	3.1	1.2

表 1 可见,不同波长的激光对原生质体和孢子有着不同的诱变效应。在同一波长下,对原生质体的诱变效应比孢子的诱变效应大。试验结果表明以 266nm 波长的激光诱变效应最佳,其它几种波长诱变效应较差。这可能和 DNA 吸收峰倍有关。在紫外波段的激光对生物

具有刺激和激发作用^[5-8]，因而能引起的变异率也较高。

表 2 不同能量的激光对原生质体和孢子的诱变效应

照射剂量 (mj)	正突变率(%)	
	原生质体(210 株)	孢子(120 株)
0.15	1.4	0.8
2	28.2	15.3
5	65.4	46.8
8	69.4	43.4
16	15.3	8.9
28	3.1	0.54

(照射时间 40 秒, 波长 266nm)

表 2 表明, 激光能量和诱变效应也有密切关系。在 8mj 时诱变效应最高, 并且对原生质体的诱变效应比对孢子的诱变效应高。因此, 对该菌原生质体直接进行诱变, 以波长 266nm, 能量 5—8mj 的激光较合适。

3. 激光对原生质体的诱变效果: 采用波长 266nm, 能量 8mj 的激光照射原生质体, 然后挑取再生菌落, 测定淀粉糖化力, 从 890 株正变菌株中, 经反复筛选后得到 5 株较优良的变异菌株, 与出发株 S-1 进行生淀粉糖化力比较。结果酶活性平均提高 38%, 最高达 91%。

激光诱变实验, 特别是激光对原生质体的直接诱变作用, 由于研究工作极少, 对辐照参数等没有先例参考。我们只有从头开始摸索。首先从小剂量开始, 在确证激光对原生质体没有反作用或其它副作用后, 才逐渐增加辐照剂量。

表 3 激光对原生质体的诱变效果

菌 种	生淀粉糖化酶活力	
	活性单位(U/ml)	提高(%)
出发菌株 S-1	39	0
141 [#]	48	23
A27 [#]	74.5	91
521 [#]	50.5	30
543 [#]	52	33
762 [#]	44	13

* : 表示变异菌株

通过上面的实验, 可以得出结论, 波长 266nm, 能量 8mj 的激光直接诱变黑曲霉 S-1 原生质体效果较好。激光作为一种新型诱变剂应用于原生质体诱变育种是切实可行的, 它为选育微生物优良菌种展示了广阔的应用前景。

参 考 文 献

1. 方善康: 食品与发酵工业, 2: 13—20, 1988.
2. 梁平彦等: 植物生理学报, 7 (1): 1—10, 1981.
3. 福井作藏著: 《还原糖的定量》, 9—12, 学会出版センター, 1969.
4. 方善康等: 中国激光, 15 (7): 447—448, 1988.
5. Levy H B: Science, 152: 1274—1276, 1966.
6. Karu T I: Laser in life Sciences, 2 (1): 53, 1988.
7. Tedoseyeva, G E et al: Laser in life Sciences, 2 (2): 137, 1988.
8. Karu T I IEEE: Journal of Quantum Electronics, Q1—23 (10): 1703, 1987.

(1992-07-20 收稿)