

新月弯孢霉原生质体制备及再生条件的研究

王 赓 杜连祥

(天津轻工业学院食品工程系 天津 300222)

摘要 以从自然界中筛选的新月弯孢霉 (*Curvularia lunata*) D-1 为出发菌株, 进行原生质体制备及再生条件的研究。将培养至 16h 的 D-1 菌丝体经 DTT 溶液处理 30min 后, 用溶壁酶和纤维素酶的混合酶液于 30℃ 下酶解 4h, 原生质体释放量达到 6.0×10^6 个 / mL, 原生质体再生率为 8.3%。

关键词 新月弯孢霉, 原生质体, 制备, 再生

分类号 Q939.93 **文献标识码** A **文章编号** ISSN-0253-2654(1999)-01-21-23

PREPARATION AND REGENERATION OF PROTOPLASTS OF *CURVULARIA LUNATA*

Wang Geng, Du Lianxiang

(Food Engineering Dept., Tianjin University of Light Industry, Tianjin 300222)

Abstract This paper studies the conditions of preparation and regeneration of *Curvularia lunata*. The mycelia were cultured for 16h and suspended in 0.6mol/L KCl, after dealing by DTT for a short time, then Lywallzyme (1%) and Cellulase (1%) were added. The forming number of protoplasts was 6.0×10^6 / mol and the regeneration frequency was 8.3%.

Key words *Curvularia lunata*, protoplasts, preparation, regeneration

新月弯孢霉 (*Curvularia lunata*) 作用于甾体化合物可生成多种羟基化产物, 其中 II β -羟基化产物——氢化可的松, 由于在肾上腺皮质功能减退症方面的治疗作用及对葡萄糖、血糖过多症的显著疗效, 而被广泛应用于临床。在国外, 新月弯孢霉作为氢化可的松生产菌被普遍采用。据报道, 该菌种的氢化可的松转化率已达 87%。目前, 我国采用蓝色梨头霉 (*Absidia elegans*) 作为氢化可的松生产菌。但由于该菌种羟化酶谱较宽, 副产物较多, 造成我国目前氢化可的松转化率仅为 70%。因此, 选育 II β -羟基化能力比蓝色梨头霉更高的新月弯孢霉菌株具有重要意义。本文以自然选育的新月弯孢霉为研究对象, 对其原生质体制备和再生条件进行了初步探讨, 以期诱变育种及分

子酶学研究创造条件。

1 材料和方法

1.1 菌种

供试菌株: 新月弯孢霉 (*Curvularia lunata*) D-1, 本研究室自然选育^[1]。

1.2 培养基

液体培养基: 葡萄糖 2%, 蛋白胨 0.5%, 酵母膏 0.5%, KH_2PO_4 0.5%, 麦芽汁 12° Brix 10%, pH 6.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20min。

再生培养基: 下层: 葡萄糖 1%, 酵母膏 0.4%, 0.6mol/L KCl, 琼脂 1.5%, 以 6° Brix 麦芽

汁配制, pH6.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20min; 上层: 琼脂粉 0.7%, 其余同上。

1.3 试剂

二硫苏糖醇(DTT)为美国 Promega Corporation 产品, 溶壁酶为广东微生物研究所产品, 纤维素酶购自上海伯奥生物技术公司, 蜗牛酶为上海东风生化试剂公司产品。以上酶的配制方法参见文献[2]。高渗溶液采用 0.6mol/L KCl。其余试剂均为国产分析纯或化学纯试剂。

1.4 原生质体的制备

将单孢子悬浮液接种于液体培养基中, 28℃, 180r/min 振荡培养一定时间后, 离心收集菌体 (3000r/min, 10min), 将洗涤后沉淀的菌丝体悬浮于经无菌过滤的中性缓冲液 (约 1g 湿菌体加入 25mL 中性缓冲液)^[3]中, 加入 DTT 5mmol/L, 于 30℃ 水浴振荡处理一定时间后, 用无菌水和高渗液离心洗涤, 将菌丝体悬浮于破壁酶及 pH6.5 高渗缓冲液混合液中 (约 1g 湿菌体加入 2mL 破壁酶液和 1mL 高渗缓冲液), 于 30℃ 水浴振荡一定时间, 镜检观察原生质体形成情况。如大部分菌丝变形且已释放原生质体, 则加入 5 倍体积的高渗液, 用 G3 砂心漏斗过滤除去残余菌丝碎片, 滤过的原生质体经离心洗涤, 悬浮于适当体积的高渗溶液中。原生质体释放量及再生率的计算方法参见文献[4]。

2 结果和讨论

2.1 菌龄的影响

比较不同生长时期的菌丝在恒定酶系下的原生质体形成情况发现: 16h 菌龄的菌丝释放的原生质体最多。菌龄过长, 菌丝细胞壁易发生老化增厚, 不易于释放原生质体; 过短则菌丝体易破裂, 释放原生质体数量较少^[5]。

2.2 菌丝预处理的影响

硫醇类化合物是巯基还原剂, 能使细胞壁中蛋白质成分的二硫键还原, 从而使细胞壁变的疏松, 并对破壁酶有激活作用。实验结果表明: 菌丝经 DTT 预处理与否, 其原生质体释放量差异较大。以 DTT 预处理 20~30min 效果最好。

2.3 酶液组成对原生质体形成的影响

由图 1 可以看出, 酶液 1 处理菌丝体 2h 即开始有原生质体释放, 至 4h 原生质体释放量达到最大值, 比其它两种酶液的破壁效果好。故破壁酶液组成为: 溶壁酶 1%+ 纤维素酶 1%; 最适酶处理时间为 4h。

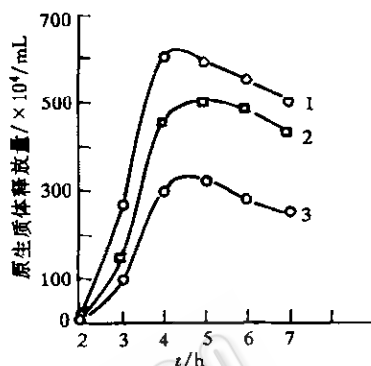


图1 酶液的组成对原生质体形成的影响

1. 溶壁酶 1%+纤维素酶 1%, 2. 溶壁酶 1%+蜗牛酶 1%,
3. 纤维素酶 1%+蜗牛酶 1%

2.4 缓冲液 pH 对原生质体形成的影响

以不同 pH 值的柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液与酶液混合, 于 30℃ 对菌丝体振荡酶解一定时间后, 发现在 pH<3.2 或 pH>7.2 的条件下生成原生质体的数量很少。在 pH 值为 5.6 时, 酶解 4h 原生质体释放量达到 6.0×10^6 /mL, 酶解效果最佳。

2.5 酶解温度对原生质体形成及再生的影响

分别于 24℃, 26℃, 28℃, 30℃, 32℃, 34℃ 进行酶解, 4h 后观察原生质体的形成。由图 2 可

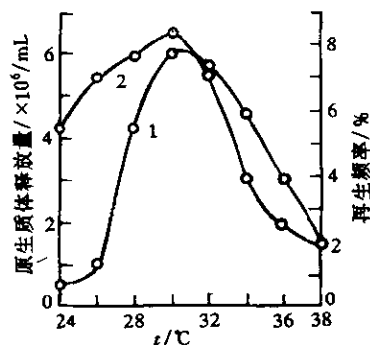


图2 温度对原生质体形成和再生的影响

1. 原生质体形成数, 2. 再生频率

知,较高的酶解温度会损伤原生质体,使其释放量及再生率降低。酶解温度为 30℃ 时效果最好。

2.6 其它因素对原生质体再生的影响

影响原生质体再生的因素主要包括:原生质体释放量,再生培养基的成分,渗透压,再生培养方法等。本文选取 KCl 为渗透压稳定剂,取不同浓度 KCl 溶液作原生质体再生试验。由表 1 可见,KCl 浓度为 0.6mol/L 时,再生率最高,为 8.3%。再生培养方法有涂布法和倾注法两种。涂布法对原生质体易造成机械损伤,不利于再生。本实验采用双层琼脂平板倾注法。尽管丝状真菌的细胞结构比原核生物复杂,不同的丝状真菌细胞结构也有一定的差异,但是,由于它们细胞壁的成分相差不多,采用溶壁酶及纤维素酶的混合酶液对一般丝状真菌破壁均有一定的效果。因此,通过上述实验,不难建立适合于新月弯孢霉菌株原生质体制备及再生的

最优条件。同时,该条件亦可为其它丝状真菌的原生质体制备和再生提供一些借鉴。

表1 渗透压稳定剂对原生质体再生的影响

KCl 浓度 (mol/L)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
再生率 (%)	0.4	3.5	8.3	6.4	4.3

参 考 文 献

- [1] 王 赓,王 敏,杜连祥. 微生物学杂志,1998,18(1): 23~26.
- [2] Fawcett PA, Loder PB, Duncan MJ. *et al.* J Gen Microbiol, 1973;79:293.
- [3] Chapman JL, Skatrud PL, Ingolia TD. *et al.* Dev Ind Microbiol, 1987, 27:165.
- [4] 朱建伟,何 雯,刘颐屏等. 中国医药工业杂志,1987, 18(3):108~111.
- [5] 韩 黎,陈世平,索继江. 微生物学通报, 1998, 25(1): 27~29.