

产氢红杆菌类胡萝卜素突变株的诱变和筛选

赵 军 连建科 赵春贵 杨素萍*

(山西大学生命科学与技术学院 化学生物学与分子工程教育部重点实验室 太原 030006)

摘 要: 用紫外线照射和氯化锂夹层平板培养法对产氢红杆菌(*Rhodobacter* sp. R7)进行复合诱变, 分离获得了一株产氢效率提高的类胡萝卜素突变株 R726。该突变株在表观特征、光谱学特征、色谱特征、生长和产氢性能等方面与出发菌株有明显不同, 但 16S rDNA 序列一致。R726 菌株有 550 nm 类胡萝卜素特征性吸收峰, 类胡萝卜素组成上比出发菌株少一黄色类胡萝卜素组分, 生长和产氢性能均高于出发菌株, 产氢效率比出发菌株提高了 33.3%, 类胡萝卜素含量比出发株提高了 53.8%。

关键词: 光合细菌, 类胡萝卜素, 诱变

The Mutagenesis and Screening of Carotenoid Mutant in Hydrogen-producing Photosynthetic Bacteria

ZHAO Jun LIAN Jian-Ke ZHAO Chun-Gui YANG Su-Ping*

(School of Life Science and Technology, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract: Mutagenesis and screening of hydrogen-producing photosynthetic bacteria, *Rhodobacter* sp. R7 strain, was investigated by using the combination mutation of ultraviolet ray and LiCl and layer plating methods. A carotenoid mutant named R726 strain was obtained. The plate phenotype properties in carotenoid mutant were different from that of parent strains. Living cells spectra showed that absorption peak of 550 nm was appeared in carotenoid mutant, but not in parent strain. The absorption spectra of extraction of pigment further confirmed the difference of carotenoid composition between the mutant and parent strains. The result of TLC on silica gel plate showed that mutant has a lack of yellow carotenoid composition which occurs in parent strain. H₂ productivity and biomass in carotenoid mutant was higher than that of parent strain. These results revealed that mutant has a modified carotenoid biosynthesis pathway.

Keywords: Photosynthetic bacteria, Carotenoid, Mutagenesis

在不产氧光合细菌中, 类胡萝卜素存在于光合内膜的捕光色素蛋白复合体(LH₁)和反应中心色素蛋白复合体(LH₂-RC)中。但类胡萝卜素的种类及相对丰度因种而异, 在LH₁和LH₂-RC中也不相同。

近年来, 体外色素蛋白复合体重组以及对类胡萝卜素缺陷、突变或抑制菌株研究结果进一步揭示出类胡萝卜素组成与能量传递效率以及LH₁和LH₂-RC色素蛋白复合体功能发挥有密切关系^[1-4]。产氢

基金项目: 国家自然科学基金(No.30470044); 山西省自然科学基金(No.20041077)

* 通讯作者: Tel: 0351-7010599, 0351-7011224; ✉: yangsuping@sxu.edu.cn, ya@csuping220@hotmail.com
收稿日期: 2007-04-27; 接受日期: 2007-06-12

研究也表明, 类胡萝卜素组成和含量与光合放氢活性有关^[5], 但调控机制不十分清楚, 为此, 获得不同类型的类胡萝卜素突变株, 是阐明类胡萝卜素调控光合细菌产氢机制的关键所在。本实验室曾分别采用紫外照射法、硫酸二乙酯和EMS方法诱变产氢红杆菌(*Rhodobacter* sp. R7), 但诱变效果不理想, 只有 2 mg/mL硫酸二乙酯处理菌悬液 10 min 有一定的诱变效果, 而用紫外线照射处理后再用不同浓度氯化锂夹层平板培养(layer plating methods)获得了理想诱变结果。通过对突变株和出发株表型特征、类胡萝卜素组成和含量、产氢和生长性能以及 16S rDNA序列分析, 确定获得了一株产氢效率提高的类胡萝卜素突变株R726, 相关研究未见报道。对该突变株的深入研究不仅为类胡萝卜素调控光合细菌产氢机制的阐明提供了良好实验材料, 而且在绿色清洁能源-氢能的开发利用以及天然类胡萝卜素开发利用方面也具有重要应用价值。研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 出发菌株

产氢红杆菌R7 菌株 (*Rhodobacter* sp.), 本实验室分离保存^[5]。

1.2 培养基和培养条件^[5]

1.3 菌悬液制备

定时取样, 在 UV-2102PC 分光光度计上于 660 nm 处测定细胞悬液的吸光度值, 当 OD_{660} 为 1.2~1.4 时离心收集菌体细胞, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 洗涤 2 次, 制备的菌悬液放入装有玻璃珠的无菌三角瓶振荡均匀。

1.4 紫外线和氯化锂复合诱变

吸取 1.3 菌悬液 10 mL 于无菌平皿中, 设置照射距离为 5 cm、10 cm、15 cm 和 20 cm, 在 30 W 紫外灯下分别照射 5 min、10 min、15 min 和 20 min, 同时设置未经照射处理的对照组。取上述菌悬液进行梯度稀释, 取 10^{-6} ~ 10^{-9} 四个稀释度分别涂布含 0.1%、0.3%、0.6%、1.0%、1.2% 和 1.5% LiCl 的平板进行夹层培养。培养条件为 30°C~32°C, 光照强度为 2000 lx~3000 lx。待菌落长出后, 计算致死率。每个处理均作 3 次重复。

1.5 细胞生物量和类胡萝卜素特征性吸收峰测定

离心收集菌体, 用生理盐水洗涤后, 悬浮于 60% 的蔗糖溶液中, 于 UV-2102PC 分光光度计上扫描, 以波长 (nm) 为横坐标, 吸光度 (OD) 为纵坐标作

图, 确定类胡萝卜素特征性吸收峰, 并以 660 nm 的吸光度 (OD) 表示细胞生物量。

1.6 类胡萝卜素的提取纯化与分离

因研磨能加速细胞破碎有利于细胞中的物质进入提取液, 故菌体细胞在加入丙酮-甲醇 (V/V 7:2) 提取液后, 在冰浴下用组织匀浆器对菌体细胞进行了研磨处理(改进的方法)。取上清 60°C 减压蒸馏。将提取物按 1:5 (mg/mL) 加入乙醚溶解, 再加入等体积的 10% KOH-甲醇溶液充分振荡后加入 5% NaCl 促进分层, 反复萃取 3 次, 合并萃取液, 60°C 减压蒸馏, 得到的类胡萝卜素纯品。将之溶解乙醚进行硅胶 G 薄板层析。

1.7 类胡萝卜素含量分析^[6]

1.8 产氢装置和氢含量的测定^[5,7]

2 结果

2.1 紫外线-氯化锂复合诱变

当紫外线照射距离为 10 cm、15 cm 和 20 cm 时, 诱变致死率很低, 只有 5 cm 有明显致死效应, 故选定照射距离为 5 cm 进行了不同照射时间的处理。结果表明, 照射时间为 20 min 时致死作用明显。将紫外线处理后的菌悬液进行梯度稀释, 涂布在含有不同浓度的氯化锂平板中进行夹层培养。结果表明, 氯化锂浓度为 1% 时诱变效果最好, 致死率为 78.2%, 复合诱变平板上长出不同颜色的菌落。

2.2 突变株表型特征

紫外线-氯化锂复合诱变平板上出现血红色、粉色、暗红色、黄绿色四种颜色的菌落。分别挑取不同颜色的单菌落划平板, 并转入液体培养基光照厌氧培养。结果只有暗红色菌落的菌株(编号 R726)在固体平板上和液体培养基中都能够旺盛生长, 而其它颜色菌落的菌株生长很缓慢。R726 菌株细胞形态大小与出发株基本一致, 单细胞卵圆形, $0.8 \mu\text{m} \times 1.1 \mu\text{m}$ 。但菌落特征与出发株不同, R726 菌株菌落直径约 2~3 mm、暗红色、光滑湿润、粘稠、边缘整齐、易挑取、圆形凸起; 而出发株直径约 0.1 mm、土红色、干燥、不易挑取、质地均匀、圆形凸起。光合细菌中, 菌体细胞所呈现的颜色主要是由类胡萝卜素的含量和组分所决定, 突变株和出发株菌落有明显不同, 初步认为 R726 菌株是色素突变株。

2.3 突变株和出发菌株生长和产氢性能比较

从图 1 可以看出, 当接种起始 OD_{660} 相同时, R726 菌株比出发株生长潜伏期短, 菌体细胞得率也高。图 2 结果表明, 与出发菌株相比, R726 突变株

产氢能力有明显提高, 产氢最大得率为 380 mL/g, 比出发菌株提高 33.3%。

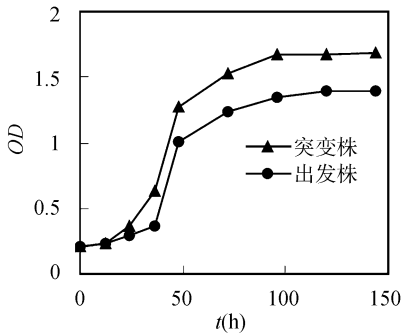


图 1 R726 菌株和出发株生长曲线

Fig. 1 Growth curve of R726 mutant and parent strain

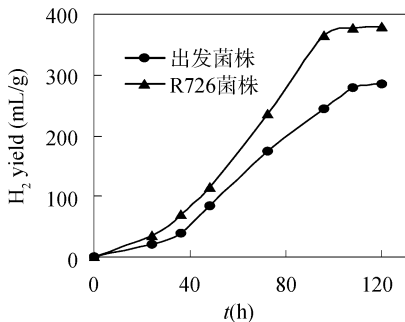


图 2 R726 菌株和出发株产氢曲线

Fig. 2 H₂ yield of R726 mutant and parent strain

2.4 突变株类胡萝卜素含量

取 5 g 菌体提取色素并根据公式 $C=10DVf/2500$ 计算, R726 菌株类胡萝卜素得率为 5.52 mg/g 湿菌体, 比出发株提高了 53.8%。

2.5 突变株类胡萝卜素定性

光吸收特性和色谱行为是类胡萝卜素定性的重要依据。比较 R726 菌株和出发株活细胞吸收光谱(图 3), 结果表明, 二者均含有 426 nm、456 nm 和 486 nm 类胡萝卜素特征性吸收峰, 但 R726 菌株还含有一个 550 nm 类胡萝卜素吸收峰, 而出发株则无。

光合色素提取液吸收光谱(图 4)进一步表明, R726 菌株和出发株在 550 nm 处类胡萝卜素吸收峰存在差异。

TLC 以快速、灵敏、简便、准确等特点被广泛应用于类胡萝卜素分离。硅胶 G 薄板层析结果表明(图 5), 出发菌株有 9 种组分, 自上而下顺序依次是黄色 橘红 红色 橘红 紫色 红色 紫色 蓝色 绿色。与出发株相比, R726 突变株明显缺乏第一条黄色带, 此外, 在出发株第 3 和第 4 条带之

间, 突变株比出发株多一条橘黄条带, 其余则相同。这表明 R726 菌株是类胡萝卜素途径发生改变的突变株。

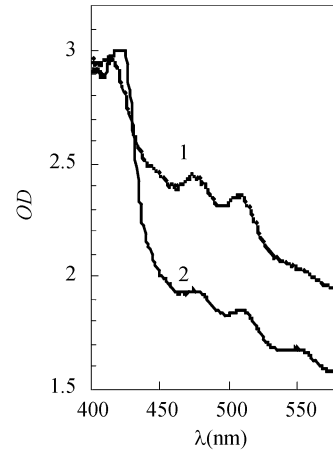


图 3 R726 菌株和出发株活细胞吸收光谱

Fig. 3 Living cells spectra of R726 and parent strain
1: parent strain ; 2: R726 mutant

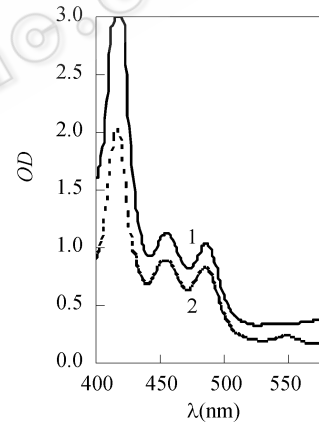


图 4 R726 菌株和出发株色素提取液吸收光谱

Fig. 4 Extraction spectra of R726 and parent strain
1: parent strain; 2: R726 mutant

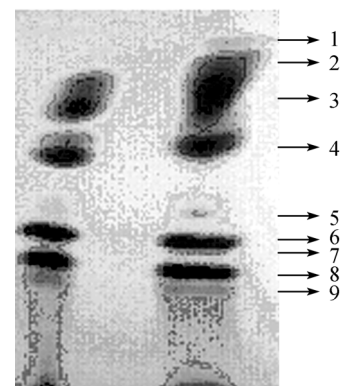


图 5 R726 菌株(左)和出发菌株(右)TCL

Fig. 5 TLC of R726 (left) and parent strain (right)

2.6 突变株 16S rDNA 序列分析

经形态学、菌落特征、光谱学和薄层层析分析, R726 菌株类胡萝卜素组成发生了明显变化。为进一步确定 R726 菌株是经出发株突变而来, 又进行了 16S rDNA 序列分析, 结果表明二者序列一致。

3 讨论

复合诱变被认为是一种较好诱变方法, 常呈现一定的协同效应。紫外线对原核生物而言是一种比较好的诱变剂, 它直接作用于DNA导致变异。氯化锂是一种碱金属卤化物, 它与紫外线在诱变过程中具有协同作用。Vasilyeva曾采用紫外诱变方法获得了产氢效率提高的*Rhodobacter sphaeroides*突变株, 产氢能力提高的原因是光捕获色素蛋白复合体比例发生了变化, 但详细突变机制未能阐明^[8]。为扩大突变范围, 本文采用紫外线照射处理—氯化锂夹层平板培养方法对产氢红杆菌进行了诱变, 获得了理想诱变结果。突变株R726和出发株在菌落特征有明显不同; 活细胞吸收光谱、光合色素提取液吸收光谱和TLC层析结果表明, R726 菌株类胡萝卜素合成代谢途径发生了变化, 比出发株缺少一黄色组分; 16S rDNA序列分析表明突变株和出发株序列一致, 由此可确定R726 菌株是产氢红杆菌(*Rhodobacter* sp.R7)突变株, 且是一株产氢能力提高且类胡萝卜素代谢途径发生改变的突变株。产氢效率的提高, 有可能是突变后的类胡萝卜素提高了能量传递效率,

进而提高了产氢效率, 其详细的突变位点和机制以及产氢效率提高机制有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Moskalenko AA, Makhneva ZK, Fiedor L, *et al.* Effects of carotenoid inhibition on the photosynthetic RC-LH1 complex in purple sulphur bacterium *Thiorhodospira sibirica*. *Photosynth Res*, 2005, **86** (1-2): 71-80.
- [2] Kakitani Y, Akahane J, Ishii H, *et al.* Conjugation-length dependence of the T1 lifetimes of carotenoids free in solution and incorporated into the LH2, LH1, RC, and RC-LH1 complexes: possible mechanisms of triplet-energy dissipation. *Biochemistry*, 2007, **46** (8): 2181-97.
- [3] 刘 源, 张 伟, 吴永强. LH2 中类胡萝卜素为链孢红素的类球红细菌绿色突变株(GM309)的获得及理化分析. *中国科学(C 辑)*, 2003, **33**(5): 385-340.
- [4] Guillermo GA, Helen PL, Richard JC, *et al.* Carotenoid diversity: a modular role for the phytoene desaturase step. *Trends in Plant Science*, 1998, **3** (11): 445-448.
- [5] 杨素萍, 赵春贵, 曲音波, 等. 铁和镍对光合细菌生长和产氢的影响. *微生物学报*, 2003, **43** (2): 257-263.
- [6] 王业勤, 李勤生编著. 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.
- [7] 杨素萍, 赵春贵, 曲音波, 等. 沼泽红假单胞菌乙酸光合放氢研究. *生物工程学报*, 2002, **18**(4): 486-491.
- [8] Vasilyeva L, Miyake M, Khatipov E, *et al.* Enhanced hydrogen production by a mutant of *Rhodobacter sphaeroides* having an altered light-harvesting system. *J Biosci Bioeng*, 1999, **87**(5): 619-624.

稿件规范化与标准化

高等院校教学论文的撰写要点

“高等院校教学”是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学栏目。该栏目是专门为高等院校教师开辟的教学交流、切磋、提高的园地, 栏目特色非常突出。因此, 要求作者撰写的内容必须有新意, 绝不是泛泛地谈体会和叙述教学安排与过程。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性, 做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进, 及时将国内外新的科技成果贯穿到教学始终, 只有这样才能真正起到教与学的互动, 提高高科技创新人才培养的水平。同时, 稿件的录用率也能得到提高。