

维生素 B₂ 产生菌原生质体诱变选育

李庆余 朱宝臣 李潞滨 安海谦* 王俊刚

(河北大学生物系,保定)

有关酵母原生质体融合的研究已有报道^[1,2],直接利用原生质体再生或诱变也可得到较优良的菌株^[3,4]。本试验的目的是以维生素 B₂ 产生菌——阿氏假囊酵母为材料,通过紫外线诱变原生质体,以期能得到维生素 B₂ 产量较高的菌株。由于阿氏假囊酵母原生质体在再生培养基上形成的菌落为金黄色,而且其颜色深浅与维生素 B₂ 产量有明显的相关性,这可作为一可靠的筛选指标。本试验通过高效液相色谱分析维生素 B₂ 产量,以期有效而又准确地选出维生素 B₂ 产量较高的菌株。

材料和方法

(一) 菌种

阿氏假囊酵母 (*Eremothecium oshbyii*)。

(二) 培养基和有关试剂

1. 液体生长培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 葡萄糖 10, NaCl 5, K₂HPO₄ 5, pH 7.1, 0.05 kg/cm² 灭菌 30 min。

2. 固体再生培养基: 于液体生长培养基内加入 0.45 mol/L 葡萄糖, 0.05 mol/L 蔗糖, 2% 琼脂, 1.05 kg/cm² 灭菌 30 min。

3. 原生质体洗涤液: 含 0.4 mol/L NH₄Cl 的 0.2 mol/L pH 6.0 磷酸缓冲液, 1.05 kg/cm² 灭菌 25 min。

4. 酶: 蜗牛酶 (中科院生物物理所), 纤维素酶 (ONOZUKA R-10)。原生质体酶解时以原生质洗涤液配制酶液, G6 漏斗过滤。

(三) 方法

1. 菌丝培养: 将斜面菌种的菌丝接种到液体生长培养基中, 摇床培养 (150 r/min, 28℃)。生长至形成疏松菌丝团时, 即可用于酶解制备原生质体。

2. 原生质体制备: 将培养好的菌体放入盛有酶液的平皿中, 28℃ 保温 1.5—2.0 h, 其间轻轻摇动 2—3 次, 然后以塞有脱脂棉的无菌小漏斗过滤, 滤液用 80—1 型离心机 (上海手术器械厂)

2000 r/min 离心 10 min, 用原生质体洗涤液离心洗涤一次。

3. 原生质体再生及 UV 诱变: 将制备好的原生质体洗涤液适当稀释, 涂布于固体再生培养基平板上。同时以水稀释原生质体悬液涂布于固体再生培养基上作为对照, 测定原生质体的再生率。把用于诱变的原生质体 (5×10^6 /ml) 置于紫外灯下照射, 然后洗涤一次, 涂布于固体再生培养基上, 28℃ 培养 5—7 天。

4. 突变株维生素 B₂ 的测定: 将挑选出的正突变株转代两次, 取生长一周的菌落接种到 70 ml 液体培养基中, 于摇床 (150 r/min, 28℃) 培养。不同时间取样, 用高效液相色谱 (HPLC) 测定维生素 B₂ 的含量。

5. 液相色谱分析条件: 岛津 C-R₃A 液相色谱仪, 岛津 SPO-6AV 型紫外检测器 (波长 254 nm), 岛津 LC-6A 型高压泵, C-18 键合柱, 流动相为 80% 甲醇, 流速 1.5 ml/min, 保留时间 1.987 min。

结果和讨论

(一) 原生质体的再生及诱变

1. 不同酶对比对原生质体制备的影响: 当以混合酶 (0.5% 蜗牛酶 + 0.5% 纤维素酶) 酶解时可得到 130 个原生质体 (400× 显微镜视野内), 而单一使用蜗牛酶时, 同样条件下仅得到 4 个原生质体。其结果表明, 混合酶 (蜗牛酶 + 纤维素酶) 酶解效果显著地较单一酶好。

2. 阿氏假囊酵母原生质体再生及诱变: 在固体再生培养基上进行菌落计数, 计算原生质体再生率。UV 照射后存活率和正突变率结果见表 1。

(二) 突变株维生素 B₂ 产量的测定

从诱变再生菌落中挑出三株正突变株进行发

本文于 1989 年 5 月 9 日收到。

* 安海谦同志现在河北省承德医学院。

表 1 原生质体再生率、存活率和突变率

处 理	原生质体再生率(%)	原生质体存活率(%)	正突变率(%)
对 照	6.67×10^{-4}		12.14
UV 照射 2min 15W 距离 30cm		19.04	14.29

酵试验,用高效液相色谱测定其维生素 B₂ 含量,结果见图 1。

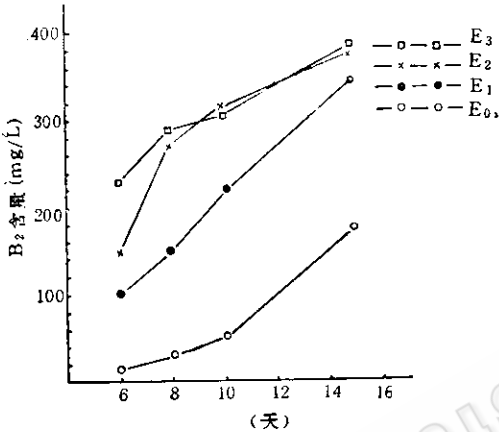


图 1 原生质体经 UV 照射后维生素 B₂ 产量变化

图 1 结果表明,阿氏假囊酵母原生质体经 UV 诱变所选出的 E₁、E₂ 和 E₃ 在发酵过程中,其

维生素 B₂ 产量均明显高于对照株 E₀。发酵至 15 天时,E₃ 菌株维生素 B₂ 产量为 382.87 μg/ml,而对照株 E₀ 仅为 176.90 μg/ml,E₃ 较 E₀ 提高 116.4%。

讨 论

阿氏假囊酵母原生质体制备以混合酶(0.5% 蜗牛酶 + 0.5% 纤维素酶)效果较好,原生质体经 UV 诱变后,用高效液相色谱分析维生素 B₂ 的产量,可快速而又较准确地筛选出产量较高的菌株,可作为筛选维生素 B₂ 高产菌株的有效方法。

参 考 文 献

[1] Klinner, U. et al.: J. Basic Microbiol., 25 (4): 233—241, 1985.
[2] 张博润等: 微生物学通报, 13 (2): 65—67, 1986。
[3] 杜还珠等: 生物工程学报, 1(4): 59—62, 1985。
[4] 杨天波等: 河北大学学报, 3: 71—76, 1989。

MUTAGENESIS OF VITAMIN B₂ PRODUCER BY USING PROTOPLASTS

Li Qingyu Zhu Baochen Li Lubin

An Haiqian Wang Jungang

(Department of Biology, Hebei University, Baoding)

Studies on preparation, regeneration and ultraviolet-mutagenesis of protoplasts of vitamin B₂ producer *Eremothecium aohyii* were reported. By using a complex enzyme system (0.5% snial digestase + 0.5% cellulase), a great number of protoplasts were obtained. Ultraviolet-mutagenesising positive mutation ratio is 14.29%. The HPLC analysis indicated that

a lot of mutants were screened by using ultraviolet-mutagenesising nutation of protoplasts, Vitamin B₂ produced by the mutant E₃ increased 116.4%.

Key words

Eremothecium aohyii; Protoplasts; Mutagenesis