

果胶酶生产菌原生质体再生及诱变育种

朱宝成 王俊刚 成亚利 杨天波 李庆余

(河北大学生物系, 保定 071002)

王 谦

(河北省微生物研究所, 保定 071051)

摘要 用 0.5% 蜗牛酶和 0.5% 纤维素酶的混合酶液水解 28℃ 下培养 20—28 小时的炭黑曲霉菌丝体, 原生质体形成数为 9.48×10^5 /ml 原生质体再生率为 0.26—0.82%。高能电子处理原生质体, 筛选出了高产变异株, 酶活提高了一倍。炭黑曲霉原生质体的红外吸收光谱显示了细胞内 DNA 分子的吸收特征, 与孢子的红外吸收特征略有差异。

关键词 炭黑曲霉, 原生质体, 再生, 诱变, 红外吸收光谱。

近年来, 微生物原生质体融合及诱变受到广泛重视, 其基本实验方法也比较成熟, 是一种有效的育种方法^[1]。由于原生质体融合存在遗传标记问题, 所以利用原生质体进行诱变, 方法简便, 能在较短的时间内较大幅度地提高菌种的生产能力^[2], 尤其是丝状菌, 在原生质体游离和再生过程中遗传变异较大, 易得到变异株^[3]。炭黑曲霉 (*Aspergillus carbonarius*) 3.396 是果胶酶生产菌株。本实验对该霉的原生质体的游离、再生、诱变选育高酶活菌株及原生质体的红外吸收特征进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

炭黑曲霉 (*Aspergillus carbonarius*) 3.396, 简称 Asp. 3.396, 果胶酶生产菌株。

1.2 培养基及试剂

霉菌生长培养基 (FG) 组成 (g/L)^[4]: 葡萄糖 10, 柠檬酸钠 3, KH_2PO_4 5, NH_4NO_3 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 酵母膏 0.25, 琼脂 20。

1992-11-05 收稿

霉菌再生培养基(FR):于FG培养基中加入0.45mol/L葡萄糖和0.05mol/L蔗糖,不加酵母膏。

原生质体洗涤液(PBA):0.2mol/L、pH6.0的磷酸缓冲液中加入0.4mol/L NH₄Cl。

酶液:纤维素酶(ONozUKAR-10,日本产)和蜗牛酶(中科院生物物理所制),用PBA液配制,G6漏斗过滤除菌。

1.3 实验方法

菌丝体培养:在FG培养基平板上覆一层无菌透性玻璃纸,将Asp.3.396孢子悬液(每支斜面菌种加5.0ml生理盐水制成孢子悬液)涂布在玻璃纸上,28℃培养。

原生质体制备与再生:将培养好的菌丝体连同玻璃纸一起用镊子揭下,放入酶液中,平皿用封口膜封口,28℃摇床(50r/min)振荡酶解。酶解一定时间后,用塞有脱脂棉的小漏斗滤去未酶解的菌丝。滤液离心,(2000r/min)10分钟,沉淀物用PBA液悬浮,离心洗涤两次。调整原生质体含量为(1-3)×10⁵/ml,涂布FR和FG培养基平板,28℃培养3-5天,计菌落数并计算再生率。

$$\text{再生率}(\%) = \frac{\text{FR上的菌落数}}{\text{FG平板上的原生质体数}} \times 100\%$$

原生质体诱变及突变体筛选:将制备好的原生质体悬液装于安瓿管内,用高能电子辐射,辐射剂量为5×10⁴Rad。处理后的原生质体涂布FR平板,28℃培养。待再生出菌落后,将单菌落转接于麦芽汁斜面上,孢子成熟后接2-3环于麦麸培养基上,28℃培养40小时后浸提酶液,并测定酶活力^[5]。

红外光谱吸收测定:将Asp.3.396孢子、原生质体和DNA分别涂于溴化钾晶体片上,然后用红外分光光谱仪(Perkin-Elmer 938G)进行红外吸收测定。

2 结果与讨论

2.1 原生质体制备

2.1.1 菌龄对原生质体形成的影响:许多研究证明,菌龄明显影响原生质体的释放^[6]。一般来讲,处于对数生长期的细胞易于酶解。Asp.3.396在28℃下培养20-28小时较为适宜,超过最适培养时间,原生质体形成量明显下降,甚至为零(图1)。

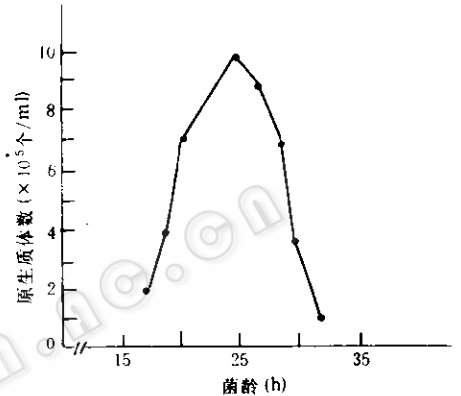


图1 原生质体形成量与菌龄的关系

2.1.2 不同酶组合对原生质体形成的影响:酶的种类和对比对原生质体形成有较大的影响,酶的选择应根据细胞壁的成份而定。培养24小时的Asp.3.396菌丝体用0.5%纤维素酶+0.5%蜗牛酶可以酶解得到大量原生质体,而用1.0%蜗牛酶原生质体形成量明显减少,单独使用纤维素酶时原生质体数量更少(表1)。

表1 不同酶液中的原生质体数量

	1.0%蜗牛酶	1.0%纤维素酶	0.5%蜗牛酶+0.5%纤维素酶
原生质体数 (10 ⁵ 个/ml)	1.78	1.31	9.48

2.1.3 酶解时间对原生质体的影响:酶对细胞壁的酶解需要一定的时间,随着酶作用时间的延长原生质体数增加;但酶作用时间过长,原生质体膜稳定性降低,导致原生质体破碎,即使原生质体不破碎,其活力下降,再生率降低。

对于 Asp. 3. 396 来说, 利用混合酶液 (0.5% 纤维素酶 + 0.5% 蜗牛酶) 酶解菌丝 3.0 小时, 原生质体数量最多, 作用时间再延长, 原生质体数明显减少 (表 2)。

表 2 不同酶解时间内的原生质体数量

酶解时间 (h)	1	2	3	4	5
原生质体数 ($10^5/\text{ml}$)	1.59	5.55	9.48	7.89	5.21

2.2 原生质体再生

经液体培养观察, Asp. 3. 396 原生质体再生过程如下: 原生质体伸长形成椭圆形, 然后细胞分裂成两个子细胞。一般情况下, 这两个子细胞一大一小, 少数为大小相等。子细胞之一 (多为小细胞) 继续分裂形成菌丝或放射状菌丝体。

经测定, Asp. 3. 396 原生质体再生率为 0.26—0.82%。原生质体制备时的酶解时间和菌龄对原生质体再生率均有较大影响, 随着酶解时间延长, 再生率下降。Asp. 3. 396 菌龄为 24 小时时再生率最高 (表 3)。

表 3 菌龄与再生率的关系

菌龄 (h)	原生质体数 ($\times 10^5$)	再生菌落数 (个)	再生率 (%)
20	4.66	1724	0.37
24	4.13	3386	0.82
30	4.45	2314	0.52
32	3.75	975	0.26

2.3 高酶活变异株的获得

利用 Asp. 3. 396 原生质体进行诱变处理, 于再生菌落中挑取生长快、产孢能力强的再生菌株进行酶活测定。由于初筛挑取变异株时注意到了再生菌株的生长速度和产孢能力等生产性状, 所以挑取的再生菌株产酶能力多比初发株强。在 80 多株再生菌株中复筛出了一高酶活菌株 Asp. H-36。该菌株在 45℃、pH 4.2 条件下酶活力为 3000u/ml, 而初发株的酶活小于 1500u/ml。变异株 H-36 的产酶高峰期和最适 pH 等与初发株相同或相近, 并表现出嗜柑桔果胶的特性。

2.4 红外吸收特征

用红外分析仪测定 Asp. 3. 396 菌体孢子, 原生质体和 DNA 的红外吸收光谱 (图 2)。

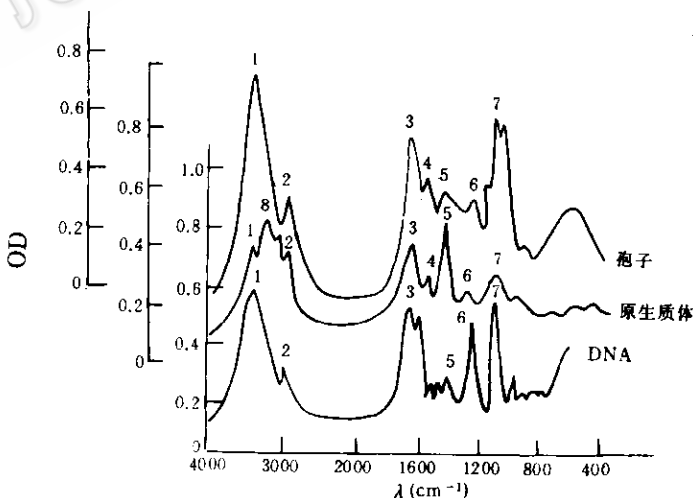


图 2 Asp. 3. 396 孢子、原生质体及 DNA 红外吸收光谱

由图2可以看出, Asp. 3.396孢子和原生质体红外光谱的主吸收区分别为 $895-1700\text{cm}^{-1}$, $1060-1640\text{cm}^{-1}$, DNA分子的主吸收区是 $800-1700\text{cm}^{-1}$, 三者有着十分相近的主吸收范围。进一步比较孢子和原生质体与DNA的特有吸收峰的位置也是一致的。因此可以认为, 孢子和原生质体的红外光谱吸收主要显示了细胞内DNA分子的吸收特征^[7]。原生质体与孢子的吸收光谱尽管十分相似, 但也存在一些差异, 如原生质体与孢子的吸收光谱相比, 1、2、3、7号吸收峰峰值降低, 5号吸收峰峰值增

大, 并且出现新的吸收峰(8号峰)。

参 考 文 献

- [1] 王翼一等. 生物工程进展. 1992, 12(4): 40-45.
- [2] 王弘等. 生物工程学报. 1990, 6(1): 32-38.
- [3] 李庆余等. 微生物学报. 1990, 30(4): 312-313.
- [4] Peberdy J F et al. J. Gen. Microbiol.. 1971, 69: 325-330.
- [5] 许坤一等. 食品与发酵工业. 1987, 1: 40.
- [6] 曹军卫等. 武汉大学学报. 1987, 4: 91-95.
- [7] 杨天波等. 河北大学学报. 1991, 4: 35-42.

REGENERATION AND MUTAGENESIS OF PROTOPLASTS FROM *ASPERGILLUS CARBONERIUS*

Zhu Baocheng Wang Jungang Cheng Yali Yang Tianbe Li Qingyu

(Department of Biology, Hebei University, Baoding 071002)

Wang Qian

(Microbiology Institute of Hebei Province, Baoding 071051)

Abstract A great number ($9.48 \times 10^5/\text{ml}$) of protoplasts from mycelia of *Aspergillus carbonerius* 3.396 incubated at 28°C for 20-28 h was released by snail digestase 0.5% and cellulase (ONOUZUK R-10) 0.5%. The regeneration frequencies of protoplasts were 0.26-0.82%. A mutant *Asp.* H36 with high activity of pectate lyase was obtained by high-electron irradiation on protoplasts of the strain 3.396. Its pectate lyase activity increased from 1500u/ml of the parent strain to 3000u/ml. IR spectrum of its protoplasts was similar to that of its DNA, but a little different from that of its spores.

Key words *Aspergillus carbonerius*, Protoplast, Regeneration, Mutagenesis, Infrared spectrum.