

He-Ne 激光和紫外线对 PHB 产生菌的复合诱变效应*

张晓瑞 黄建新** 罗 莎

(西北大学生命科学学院, 西安 710069)

摘 要 采用紫外线、He-Ne 激光及紫外线与 He-Ne 激光复合作用的方法, 对本实验室的一株产 PHB 的细菌 G-Q7 进行诱变, 以提高其产量. 结果表明, 紫外线和 He-Ne 激光单独作用, 诱变效果不佳, 而二者的复合作用却能产生很好的效果. 用 He-Ne 激光辐照 20 min 再经紫外线照射 150 s, 正变菌株的细胞量为 11.5 g/L, PHB 含量为 65%, 并具有良好的遗传稳定性. 对诱变前后菌株积累的 PHB 产物的外观、热性质和¹³C-NMR 图谱进行分析, 结果表明该诱变使代谢途径中的某种酶发生了改变.

关键词 He-Ne 激光; 紫外线; 诱变; 细胞量; PHB 含量

中图分类号 Q465 **文献标识码** A

0 引言

PHAs(聚羟基链烷酯)是许多细菌在一定条件下积累的细胞内碳源和能源贮存物, PHB(聚β-羟基丁酸)是其中的一种. 它们既具有与目前普遍使用的化工合成塑料相似的性质, 又具有透氧率低、抗紫外线照射、无免疫性、生物可完全降解等独特的优点, 因此有望替代传统化工塑料, 广泛地应用于包装、医疗、食品、化妆品等行业. 但由于 PHAs 生产成本较高, 限制了其商品化生产, 目前人们正从选育高产菌株, 优化发酵条件及改善提取工艺入手, 提高生产率, 降低生产成本, 以实现工业化生产.

紫外线作为一种常用的物理诱变剂, 诱发突变作用强烈. He-Ne 激光是一种低功率的激光, 诱变效果好, 作用温和、成活率较高, 近年来也被广泛使用^[1,2]. 本试验用紫外线照射、He-Ne 激光辐照及紫外线与激光复合照射对一株 PHB 产生菌 G-Q7 进行了诱变, 以期选育出 PHB 产量高, 性能优的生产菌株.

1 材料和方法

1.1 菌种

G-Q7, 本实验室从活性污泥中分离.

1.2 激光器

采用西北大学光电厂制造的 He-Ne 激光器, 波长 632.8 nm, 辐照功率 9 mW, 光斑 1.5 mm, 辐照距离 15 cm^[3].

1.3 培养基

固体培养基: 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基.

发酵培养基: 蔗糖 20 g/L, KH₂PO₄ 2g/L,

Na₂HPO₄ 5 g/L, MgSO₄ 0.2 g/L, 酵母膏 7 g/L, 柠檬酸铁 60 mg/L, CaCl₂ 10 mg/L, PH 7.2.

1.4 方法

1.4.1 菌悬液的制备

将菌株 G-Q7 在固体培养基上活化, 再接入装有玻璃珠的液体培养基中, 30℃ 培养, 制成菌悬液.

1.4.2 紫外线照射

调整菌悬液浓度为 10⁶ 个/mL, 分别取 10 ml 放入灭菌的培养皿中(即每个培养皿中约 10⁷ 个细胞), 磁力搅拌, 置于 15 W 紫外灯下 30 cm 处进行照射, 照射时间分别为 60 s, 90 s, 120 s, 150 s, 180 s. 平行设立对照组, 避光培养 32 h^[4].

1.4.3 He-Ne 激光辐照

分别取浓度为 10⁸ 个/mL 的菌悬液 0.2 ml 于无菌玻璃试管中(即每个试管中约 10⁷ 个细胞), 从管壁外对其进行辐照, 辐照时间分别为 5 min, 10 min, 20 min, 30 min. 平行设立对照组, 分别培养 32 h.

1.4.4 He-Ne 激光和紫外线的复合作用

分别取 10⁸ 个/mL 的菌悬液 0.2 ml 于无菌玻璃试管中进行激光辐照, 同前. 再将辐照后菌悬液分别涂布于固体培养基平板上, 用紫外线照射 150 s. 平行设立对照组, 避光培养 32 h.

1.4.5 细胞计数方法

采用稀释平板计数法.

1.4.6 诱变株初筛

以表型变化为初筛依据. 分别进行苏丹黑染色后镜检, 与原菌株对照, 菌体膨大、黑色 PHB 颗粒多的为优良菌株.

1.4.7 诱变株复筛

在相同条件下, 与原菌株对比, 以细胞量和 PHB 含量的变化为指标. 将原菌株和经过初筛的优良菌株分别接入 50 ml 液体培养基中, 30℃ 摇床

*国家“863”计划新材料领域资助项目(715-004-0160)

** Tel: 029-88302043

收稿日期: 2005-01-06

(220 rpm)培养 32 h 后,3200 rpm 离心 8 min,水洗再离心. 然后将所得菌体置于 90 ~ 100°C 干燥箱中烘至恒重,测定细胞量. 将干细胞用 4 倍体积的氯仿抽提 20 min,吸出溶液于平皿中,室温下氯仿挥发后 PHB 呈膜状,称得 PHB 的量.

$$\text{PHB 含量} = (\text{PHB 的量} / \text{细胞量}) \times 100\%$$

1.4.8 稳定性检测

诱变菌株连续传 8 代,测定每一代的细胞量和 PHB 含量,比较其变化.

1.5 PHB 聚合物的理化性质分析

1.5.1 热性质分析

采用 PERKIN-ELMER DSC7 热分析器,以差示扫描分析 PHB 聚合物在加热过程中发生的热量变化,扫描速度为 10.0°C/min,标准物铟校准基线.

1.5.2 ^{13}C -NMR 分析

采用日本电子:JNM - FX90Q,傅立叶变换核磁共振仪,以 CDCl_3 为溶剂,25°C,脉冲时间 3 s.

2 结果与讨论

2.1 G-Q7 菌的生长规律

采用发酵培养基摇瓶培养,每 2h 取样,测定细胞量和 PHB 的量,重复三次取平均值,制作 G-Q7 菌株的生长曲线(见图 1).

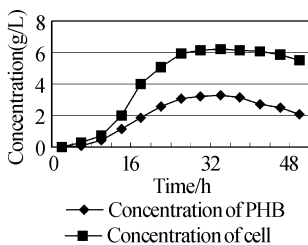


图 1 G-Q7 的生长曲线

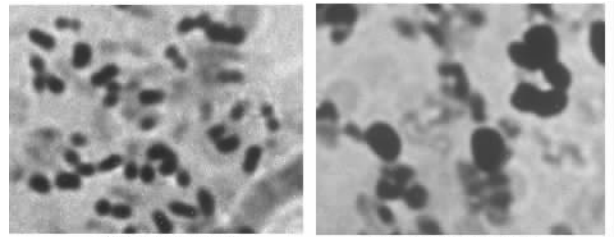
Fig. 1 Growth curve of the strain G-Q7

结果表明,该菌株在 4 h 前处于延迟期,4 h 后进入生长对数期,同时 PHB 开始积累,稳定期细胞量和 PHB 积累为最大,即该菌的 PHB 积累与菌体细胞的生长是同步的,属于一步发酵类型. 32 h 时, G-Q7 的细胞量为 6.2 g/L, PHB 的量为 3.2 g/L, PHB 含量为 51.6%.

2.2 紫外线的诱变作用

将照射后的菌悬液分别稀释,涂布于固体培养基平板上进行培养,发现紫外线照射的致死率随照射时间的增加而增加,照射 150 s 时,致死率达到 99%. 从照射时间不同的平板上分别随机挑取 50 个菌落与原菌株同时染色,于 10 × 100 倍显微镜下观察,有 15 株与原菌株相比,黑色 PHB 颗粒多,细胞膨大. 进一步以产量为诱变指标复筛,控制培养发酵条件恒定,细胞量高于 9 g/L、PHB 含量高于 56% 的为正突变株. 其中,照射 150 s 后存活的菌

株 UV-23(见图 2)产量最高,细胞量为 9.5 g/L, PHB 含量为 58%,符合正突变指标.



(a)The strain G-Q7

(b)The mutant UV-23

图 2 显微镜观察结果

Fig. 2 The observation result of microscope

对诱变菌株 UV-23 进行稳定性检验,随传代数的增加,该菌的细胞量和 PHB 含量明显下降,五代以后几乎与原菌株一致. 经紫外线再次照射,结果相似.

分析这一结果,认为可能是由于该菌细胞生长与 PHB 积累同步进行,紫外线照射时细胞内已经积累了 PHB. 由于紫外线穿透性差,细胞中的 PHB 对紫外线形成遮挡,致使其对菌体细胞中 DNA 分子的作用大大减弱了. 即使细胞发生了变异,也因为 DNA 的损伤小而易于恢复.

2.3 He-Ne 激光的诱变作用

将 He-Ne 激光辐照后的菌悬液分别稀释,涂布于固体培养基平板上. 当稀释度均为 10^{-5} 时,未辐照的菌悬液长出 221 个菌落,辐照了 5 min 的菌悬液长出 255 个菌落,说明小剂量激光对菌株 G-Q7 无影响. 但随辐照时间延长,致死率增大,当辐照 30 min 时致死率为 61%. 从激光辐照时间不同的平板上分别随机挑取 50 个菌落,染色后镜检,发现它们的细胞形态及 PHB 颗粒量与原菌株的相似,没有明显的变化. 挑选出较好的 9 株进行复筛,经过辐照的菌株比原菌株生长快. 同时培养 32 h,辐照后菌株的细胞量较多,为 8 ~ 9.5 g,但是 PHB 含量为 50% ~ 53%,变化不大. 可能是低功率的 He-Ne 激光对细胞具有刺激作用^[5],能提高初级代谢中酶的作用效率,使该菌的初级代谢旺盛,加快了细胞增殖速率,但它未能促进合成 PHB 的次级代谢.

2.4 He-Ne 激光和紫外线的复合诱变作用

由于分别用紫外线和 He-Ne 激光对 G-Q7 菌进行诱变的效果均不理想,故本试验采用先 He-Ne 激光辐照,再紫外线照射 150 s 的方法进行诱变. 其致死率明显提高,并随激光辐照时间的增加而增加. 从激光辐照时间不同的平板上分别随机挑取 50 个菌落,经过初筛、复筛,结果见表 1.

激光辐照 20 min 后,再经紫外线照射 150 s,正变率最高,诱变效果最好. 达到正突变指标的 14 株菌中,菌株 $L_{20}U-3$ 的 PHB 颗粒较多,细胞较大,并有不规则的、石块状的细胞出现(见图 3),其产量最

大:细胞量为 11.5 g/L, PHB 含量为 65%. 而且从

表 1 激光和紫外线的复合诱变对 G-Q7 的影响

	激光照射时间/min				
	0	5	10	20	30
致死率(%)	99.0	99.5	99.83	99.91	99.96
菌株数	50	50	50	50	50
正变数	1	0	4	7	2
正变率(%)	2	0	8	14	4

菌株 L₂₀U-3 抽提出的 PHB 产物颜色较白,比未诱变前的柔软,更有韧性.

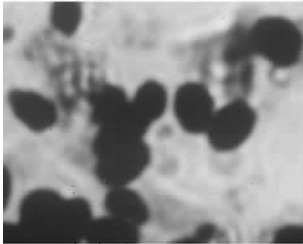


图 3 正突变株 L₂₀U-3 的细胞形态

Fig. 3 Form of the mutant L₂₀U-3

对菌株 L₂₀U-3 进行传代培养,重复三次取平均值,结果见表 2.

表 2 菌株 L₂₀U-3 的遗传稳定性

	传代次数							
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
细胞量(g/L)	11.5	11.8	11.6	11.5	11.5	11.3	11.9	11.6
PHB 含量(%)	65	66	64	65	66	64	65	66

结果说明,先 He-Ne 激光后紫外线的复合作用使菌株 G-Q7 发生了代谢水平上的稳定性突变. 这可能是由于:(1)激光可产生光、热、压力、电磁场等多种效应,并且具有一定击穿作用^[5],可使被辐照样的内部或表面产生裂隙或损伤. 因此激光能使细胞内已积累的 PHB 发生变化,降低了其对紫外线的阻挡能力.(2)当激光作用于微生物细胞时,生物分子吸收光子或在其电磁场作用下发生能级跃迁^[6],能量的增加可使生物分子活跃. 细胞处于敏感状态下受到紫外线的照射,更易于发生突变.

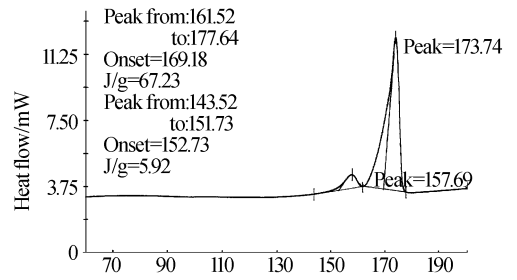
2.5 诱变菌株积累的 PHB 产物的理化性质分析

诱变菌株 L₂₀U-3 与原菌株 G-Q7 产生的 PHB 薄膜在色泽、韧性上均有差异,故对二者分别进行了热性质分析和碳元素组成分析.

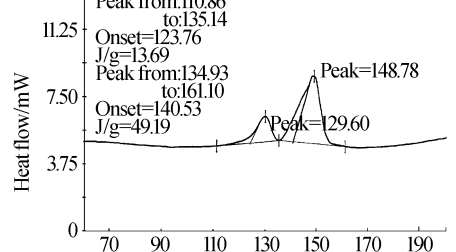
2.5.1 热化学性质分析(DSC)

分别对原菌株 G-Q7 和诱变菌株 L₂₀U-3 产生的 PHB 进行热性质分析,结果见图 4.

图 4 以温度为横坐标、热流为纵坐标. 可看出两种聚合物的出峰温度不同,诱变菌株产生的 PHB 的出峰温度较高. 峰的高低(即热流值)也不同,原菌株产生的 PHB 在最高峰(173.74℃)时,热流超过 11.25 mW,且两个峰高低相差大,而诱变菌株 L₂₀U-3 产生的 PHB 在最高峰(148.78℃)时,热流不足



(a)The PHB produced by the strain G-Q7



(b)The PHB produced by the mutant L₂₀U-3

图 4 两种 PHB 产物的热性质分析图

Fig. 4 The figure of the two PHB polymers"DSC

9.38 mW,且两个峰高低相差较小. 表明它们的熔点不同(见表 3),在加热过程中热量变化也不同.

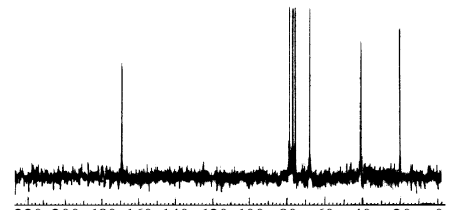
表 3 两种 PHB 聚合物的熔点和焓变的比较

	Tm(℃)	ΔH(J·g ⁻¹)
标准品	171-182	61.05-86.99
G-Q7 产生的 PHB	173.74	67.23
L ₂₀ U-3 产生的 PHB	148.78	49.19

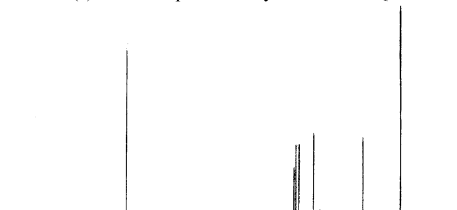
由表 3 可见:原菌株 G-Q7 产生的 PHB 熔点和焓变与 PHB 标准品的相似,而诱变菌株 L₂₀U-3 产生的 PHB 与之不同,即两种 PHB 聚合物有所差异.

2.5.2 核磁共振分析(NMR)

对原菌株 G-Q7 和诱变菌株 L₂₀U-3 产生的 PHB 分别进行¹³C-NMR 分析,结果见图 5.



(a)The PHB produced by the strain G-Q7



(b)The PHB produced by the mutant L₂₀U-3

图 5 ¹³C-NMR 图谱

Fig. 5 Figure of ¹³C-NMR

图5(a)除了溶剂峰外有4个峰(19.772、40.779、67.635 和 169.149 ppm),分别代表 β-羟基丁酸

(HB)分子中的4个不同的碳原子(CH_3 -、 CH_2 -、 CH - 和 $-\text{CO}-$ 基团的碳原子)。

诱变菌株 $L_{20}U-3$ 产生的 PHB 的图谱(图 5(b)) 中多出 3 个峰(22.438、42.372 和 64.254 ppm),其它基团的化学位移基本相同,而且 $-\text{CO}-$ 和 CH_3 - 的峰明显高于 a 图谱中相应峰,可能是相同基团的峰出现了叠加。因此,诱变菌株 $L_{20}U-3$ 产生的 PHB 聚合物中除了 HB 外,还有某种带 $-\text{CO}-$ 且含 5 个碳原子的物质,可能是羟基戊酸(HV),它们形成了 HB-CO-HV 的共聚物。HV 单体插入到 HB 主链中可以降低聚合物的熔点,增强其韧性^[7]。所以,诱变菌株 $L_{20}U-3$ 产生的 PHB 聚合物颜色较白,而且更柔韧。

细菌细胞中合成 PHAs 的途径并不专一,以乙酰 CoA 为前体可以合成 HB 单体,以丙酰 CoA 为前体可以合成 HV 单体,在发酵中添加丙酸或戊酸可以促进 HV 单体的合成。先 He-Ne 激光后紫外线的诱变作用使菌株 G-Q7 发生了突变,改变了细胞中的酶,可能使某代谢中间产物(如丙酮酸)转化为丙酰 CoA,从而激活以丙酰 CoA 为前体合成 HV 单体的途径,促进了 HV 的合成。不仅提高了 PHB 聚合物的产量,还优化了其性能。

3 结论

1)激光辐照可使菌株 G-Q7 克服细胞中的 PHB 对紫外线的阻挡作用,并使细胞处于敏感状态,故先 He-Ne 激光后紫外线的复合作用,有利于诱导其发生突变。

2)诱变菌株 $L_{20}U-3$ 在细胞量和积累 PHB 的量上均有显著提高,而且产生的 PHB 聚合物的理化性质也发生了变化,这种代谢水平上的突变具有较好的遗传稳定性。

参考文献

- 1 毛宁,陈必链.激光在工业微生物育种中的应用研究.应用激光,1997,17(1):27~29
Mao N, Chen B L. *Applied Laser*, 1997,17(1): 27~29
- 2 王卫卫,任鹏康,阎明,等. He-Ne 激光对 γ -亚麻酸产生菌少根根霉的诱变作用.光子学报,2002,31(2):157~161
Wang W W, Ren P K, Yan M, et al. *Acta Photonica Sinica*, 2002,31(2):157~161
- 3 黄建新,马艳玲,惠友权,等. He-Ne 激光对产 ALDC 地衣芽孢杆菌的诱变效应.光子学报,2001,30(6):680~683
Huang J X, Ma Y L, Xu Y Q, et al. *Acta Photonica Sinica*, 2001,30(6):680~683
- 4 郭爱莲,朱宏莉.紫外、氩氛激光等复合诱变产果胶酶细菌 ZH₁ 的研究.光子学报,2002,31(11):1335~1339
Guo A L, Zhu H L. *Acta Photonica Sinica*, 2002,31(11):1335~1339
- 5 刘晋和.物理因子的生物效应.北京:科学出版社,1992.279~280
Liu J H. *Biological Effect of Physical Factor*. Beijing: Science Press, 1992. 279~280
- 6 贺庆丽,徐延亮,徐蓉,等.弱激光调节血红蛋白活性的机理分析.光子学报,2003,32(6):646~648
He Q L, Xu Y L, Xu R, et al. *Acta Photonica Sinica*, 2003,32(6):646~648
- 7 Bauce A, Amsay, Kanda L, et al. Production of poly(β -Hydroxybutyrate-co- β -Hydroxyvalerate) acids. *Appl Environ Microbiol*,1990,56(7):2093~2098

The Mutagenic Effect on a Strain Producing PHB by Cooperation of UV and He-Ne Laser

Zhang Xiaorui, Huang Jianxin, Luo Sha

College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069

Received date:2005-01-06

Abstract The strain G-Q7 producing PHB was irradiated respectively by UV, He-Ne laser and both of them to increase PHB production. The results indicated that the coordinative effect of UV and He-Ne laser was better than using them individually. The cells were treated firstly by He-Ne laser for 20 minutes and then by UV for 150 seconds, which resulted in a final cell concentration of 11.5 g/L, PHB content of 65%. The mutant had better hereditary stability. The two PHB polymers obtained from the strains G-Q7 and the mutant were analysed by the method of DSC and NMR, the conclusion appears that the mutagenic effect makes some certain enzyme of metabolism change.

Keywords He-Ne laser; UV; Mutagenesis; Cell concentration; PHB content



Zhang Xiaorui was born in Xi'an, Shaanxi Province, P. R. China in April 1979. She graduated from College of Life Science in Northwest University, and she is a postgraduate in the same college now. Her major is microbiology.