

# 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<sup>13</sup>C-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<sup>[1,2]</sup>.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<sup>[3]</sup>.

### 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, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g/L,

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.2 g/L, 酵母膏 7 g/L, 柠檬酸铁 60 mg/L, CaCl<sub>2</sub> 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10<sup>6</sup>个/mL,分别取10 ml放入灭菌的培养皿中(即每个培养皿中约10<sup>7</sup>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<sup>[4]</sup>.

#### 1.4.3 He-Ne激光辐照

分别取浓度为10<sup>8</sup>个/mL的菌悬液0.2 ml于无菌玻璃试管中(即每个试管中约10<sup>7</sup>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10<sup>8</sup>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℃ 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℃/min, 标准物钢校准基线.

#### 1.5.2 $^{13}\text{C}$ -NMR 分析

采用日本电子 JNM-FX90Q, 傅立叶变换核磁共振仪, 以  $\text{CDCl}_3$  为溶剂, 25℃, 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).

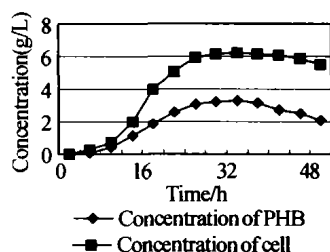


图 1 G-Q7 的生长曲线

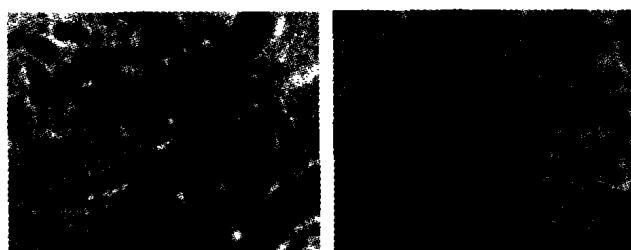
Fig. 1 Growth curve of the strain G-Q7

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<sup>[5]</sup>, 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<sub>20</sub>U-3 的 PHB 颗粒较多, 细胞较大, 并不规则的、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 L<sub>20</sub>U-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 L<sub>20</sub>U-3 的细胞形态  
Fig. 3 Form of the mutant L<sub>20</sub>U-3

对菌株 L<sub>20</sub>U-3 进行传代培养, 重复三次取平均值, 结果见表 2.

表 2 菌株 L<sub>20</sub>U-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<sup>[5]</sup>, 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<sup>[6]</sup>, 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 L<sub>20</sub>U-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 L<sub>20</sub>U-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 L<sub>20</sub>U-3 产生的 PHB 在最高峰(148.78℃)时, 热流不足

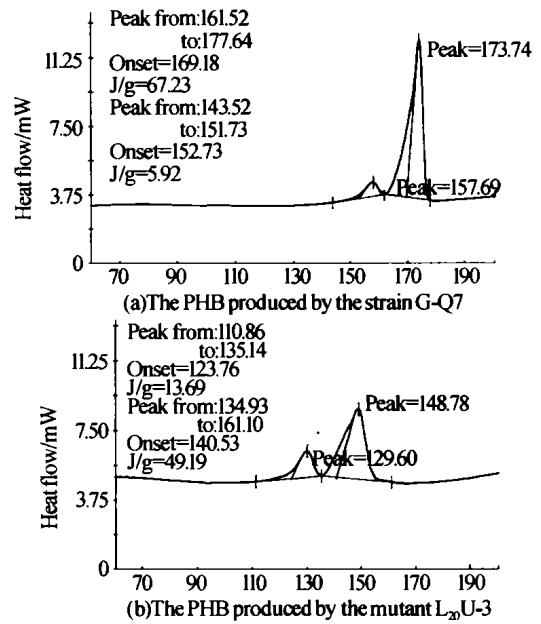


图 4 两种 PHB 产物的热性质分析图  
Fig. 4 The figure of the two PHB polymers'DSC

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(°C)	ΔH(J·g <sup>-1</sup> )
标准品	171-182	61.05-86.99
G-Q7 产生的 PHB	173.74	67.23
L <sub>20</sub> 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 L<sub>20</sub>U-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 L<sub>20</sub>U-3 产生的 PHB 分别进行<sup>13</sup>C-NMR 分析, 结果见图 5.

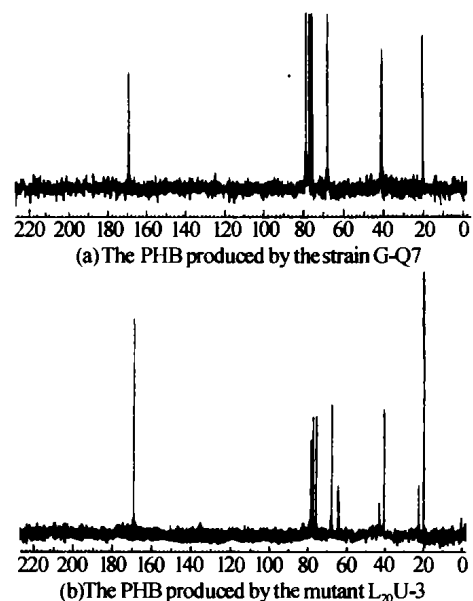


图 5 <sup>13</sup>C-NMR 图谱  
Fig. 5 Figure of <sup>13</sup>C-NMR

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( $\text{CH}_3$  -、 $\text{CH}_2$  -、 $\text{CH}$  - 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  $\text{CH}_3$  - 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<sup>[7]</sup>。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  $\gamma$ -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、氩氟激光等复合诱变产果胶酶细菌 ZH<sub>1</sub> 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( $\beta$ -Hydroxybutyrate-co- $\beta$ -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.

