

# $\text{Nd}^{3+}$ : YAG激光对黑曲霉的诱变效应

杨胜利 赖素聪 杨棟 赖葆青 朱建忠 李如鹤

(厦门大学:福建厦门·361005)

**摘要** 本文采用  $\text{Nd}^{3+}$ : YAG 激光辐照柠檬酸生产菌黑曲霉孢子,辐照后进行培养和发酵试验,分析测定不同辐照时间黑曲霉孢子的存活率、黑曲霉菌丝体生长繁殖及代谢产酸的速度、主要代谢产物柠檬酸的产量及淀粉糖化酶活力等的变化。实验结果表明,  $\text{Nd}^{3+}$ : YAG 激光辐照后各实验组发生了不同程度的变化,说明该激光能诱发黑曲霉细胞的遗传变异,可用于诱变选育柠檬酸生产的优良高产菌株。

**关键词** 黑曲霉 激光辐照 诱变效应

## Mutagenic Effects of $\text{Nd}^{3+}$ : YAG Laser on *Aspergillus Niger*

Yang Shengli Lai Sucong Yang Dong Lai Baoqing Zhu Jiangchong Li Ruhe

(Xiamen University, Xiamen, 361005, P. R. China)

**Abstract** In this paper, a  $\text{Nd}^{3+}$ : YAG laser was used to irradiate spores of the *Aspergillus niger*, a citric acid-producing strain. The spores irradiated were then cultured and fermented. Variations in a survival rates of the spores, rates of growth, propagation, and the metabolic production acid of the hyphae, yield of the main metabolite citric acid and vitality of the saccharidase, etc. were determined and analysed. The experimental results show that the various experimental groups, irradiated by the  $\text{Nd}^{3+}$ : YAG laser, had changes in different degrees. This indicates that the laser can induce *Aspergillus niger* cells to mutate and may possibly be applied to selectively breed new good quality strains with high yield for production of the citric acid.

**Key words** *Aspergillus niger* laser irradiation mutagenic effect

本文采用  $\text{Nd}^{3+}$ : YAG 激光辐照柠檬酸生产菌种——黑曲霉的孢子,辐照后进行培养和发酵试验,分析测定不同时间辐照组黑曲霉孢子的存活率、黑曲霉菌丝体生长繁殖及代谢产酸的速度、主要代谢产物柠檬酸的产量及淀粉糖化酶的活力等变化。实验结果表明,  $\text{Nd}^{3+}$ : YAG 激光辐照后各实验组发生了不同程度的变化,说明该激光能诱发黑曲霉细胞的遗传变异,可用于诱变选育柠檬酸生产的优良高产菌株。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验微生物

采用糖蜜发酵生产柠檬酸的黑曲霉菌株,经固体斜面培养基活化培养五天后孢子成熟,用灭菌的生理盐水洗下新鲜孢子,制成一定浓度的孢子悬浮液,装于灭菌的三角瓶中,放在涡旋

混合器上振荡使孢子充分分散,备用。

## 1.2 激光辐照

采用 Nd<sup>3+</sup> YAG激光,波长 532nm 脉冲宽度 7 ns 脉冲能量 25mJ 脉冲频率 8Hz 光斑直径 4mm,辐照时间分为 2 4 6 8和 10分钟等五组。辐照时,采用灭菌的微量进样器吸取上述准备好的黑曲霉孢子悬浮液 2 $\mu$ l,滴于灭菌的平皿中照射(液滴直径约 2mm),并用上述相同浓度未辐照的等量孢子悬浮液作对照,进行对比发酵试验。

## 1.3 培养发酵及分析测定

各激光辐照组及对照组分别接种于一定糖度的甘蔗糖蜜培养液中,在 30 $^{\circ}$ C 恒温中进行培养和发酵试验,从接种后的第三天开始每天测定一次发酵液中的柠檬酸含量,六至七天结束发酵。用酸碱滴定法测定柠檬酸产量;碘量法测定淀粉糖化酶的活力;称重法测定黑曲霉菌丝体的重量;平板稀释培养法计算黑曲霉孢子的存活率。

# 2 结果与讨论

## 2.1 激光不同时间辐照组黑曲霉孢子的存活率

各实验组的孢子悬浮液经梯度稀释后,分别接种于固体平皿培养基上,涂布均匀,30 $^{\circ}$ C 恒温培养 4天,计算生长出的菌落数,与对照组比较,得出各辐照组黑曲霉孢子的存活率,绘曲线如图 1

图 1说明: Nd YAG激光对新鲜的黑曲霉孢子具有较强的杀伤效应,随着激光辐照时间的延长,黑曲霉孢子的存活率逐级明显下降。

## 2.2 Nd YAG激光对黑曲霉产生柠檬酸量的影响

采用含总糖(包括非发酵性糖)12%左右的甘蔗糖蜜培养液进行实验组的黑曲霉柠檬酸发酵试验,七天后结束发酵并测定发酵液中柠檬酸的产量,其平均结果见表 1

表 1 激光不同时间辐照的柠檬酸产量

辐照时间 (min)	CK	2	4	6	8	10
产酸量 (g/100ml)	9.80	10.10	10.45	10.76	10.18	9.50
相对产酸率 (%)	100.0	103.6	106.6	109.8	103.9	97.0

在本实验条件下,2-8分钟的激光辐照组,黑曲霉菌丝体的柠檬酸产量均比对照组有所增加,其中以 6分钟的激光辐照组提高产量较显著,比对照组相对增产近 10%,10分钟的激光辐照组,其产酸量比对照组有所下降,这可能是因为激光辐照时间太长对黑曲霉孢子的杀伤太大,激光剂量过大也增加了黑曲霉细胞的负诱变作用。

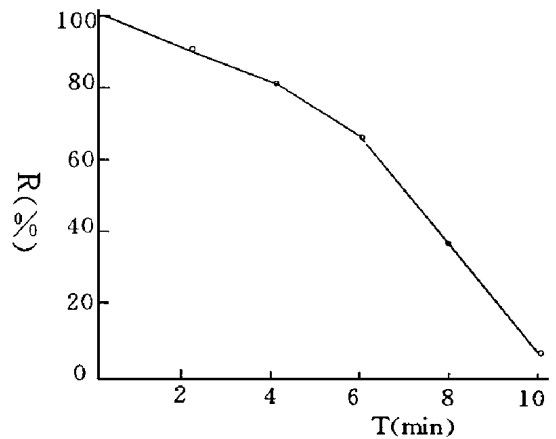


图 1 激光不同时间辐照组孢子的存活率  
T: 激光辐照时间 (min); R: 孢子存活率 (%)

### 2.3 Nd: YAG 激光对淀粉糖化酶活力的影响

黑曲霉能产生  $\alpha$ - 淀粉糖化酶, 所以能直接利用淀粉或甘蔗糖蜜原料发酵生产柠檬酸。本实验测定各实验组发酵液中的  $\alpha$ - 糖化酶的活力, 平均结果见表 2。

表 2 激光不同时间辐照组糖化酶活力的变化

辐照时间 (min)	CK	2	4	6	8	10
糖化酶活力 ( $\mu$ / ml <sup>h</sup> hr)	25.8	27.1	28.5	29.6	27.2	25.4
相对酶活 (%)	100.0	105.0	110.5	114.8	105.4	98.4

本实验从 2 分钟至 8 分钟的激光辐照组, 黑曲霉菌体产生的  $\alpha$ - 淀粉糖化酶的活力均高于对照组, 其中 6 分钟辐照组的酶活比对照组提高近 15%。淀粉糖化酶活力的提高有利于提高黑曲霉菌体细胞对发酵原材料的利用效率, 从而提高柠檬酸产量和降低生产成本。

### 2.4 Nd: YAG 激光对黑曲霉菌体生长繁殖的影响

采用表面发酵法培养黑曲霉菌丝体, 六天后滤去培养液, 取出菌丝体置 105<sup>o</sup>C 烘箱中干燥后称重, 结果见表 3。

表 3 激光不同时间辐照组黑曲霉菌体重量的变化

辐照时间 (min)	CK	2	4	6	8	10
菌体干重 (g / 100ml)	5.51	5.65	5.80	6.00	5.71	5.44
相对重量 (%)	100.0	102.5	105.3	108.9	103.6	98.7

虽然激光辐照杀伤了黑曲霉的孢子, 而且辐照时间越长孢子的死亡率越高, 但经过一段时间的培养适应后, 激光辐照组黑曲霉菌体细胞的增殖速度却大大地超过了对照组。培养六天后, 8 分钟以下的各辐照组其菌丝体的重量均比对照组增加, 其中 6 分钟辐照组比对照组增重 9%。可见, Nd<sup>3+</sup>: YAG 激光对黑曲霉细胞的生长繁殖有一定的刺激作用。

上述实验结果表明, Nd<sup>3+</sup>: YAG 激光辐照能使柠檬酸生产菌种黑曲霉产生多种生物学效应, 能诱发菌体细胞生理和遗传特性的变异。控制合适的激光辐照剂量, 可促进黑曲霉菌体的生长繁殖, 提高酶活力, 加速代谢合成, 从而提高柠檬酸发酵产量, 降低生产成本, 诱变选育出具有优良遗传特性的高产新菌株。

### 参考文献

- [1] 天津工业微生物研究所, 柠檬酸生产基本知识, 轻工业出版社, 1978, 129- 134
- [2] 天津轻工业学院等, 工业发酵分析, 轻工业出版社, 1986, 20- 21
- [3] 范秀容等, 微生物学实验, 高等教育出版社, 1984, 40- 53