

# 蓝光促进黑曲霉分生孢子发育和产糖化酶的研究

朱俊晨<sup>1,2</sup> 王小菁<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 深圳职业技术学院生物工程系 深圳 518055)

(<sup>2</sup> 华南师范大学生命科学院 广州 510641)

**摘 要:**以黑暗为对照,研究了不同光质对黑曲霉产糖化酶及生长发育的影响。持续蓝光作用下,孢子萌发后菌丝较粗,菌丝细胞顶端膨大显著,菌丝细胞膜的通透性增加,残糖消耗快,孢子和孢子穗增大。在 3(4d)时,蓝光下菌丝产糖化酶活力最高达 660(30U/mL),比黑暗高出了 154%,生物量增加了 49.48%,菌丝细胞可溶性蛋白含量提高了 100.56%,尤其是在开始产孢子的阶段,蓝光下黑曲霉产糖化酶活力、生物量有很大提高。研究表明,蓝光明显促进黑曲霉分生孢子发育和产孢阶段包括糖化酶在内的多种淀粉酶活力的迅速增加。

**关键词:**蓝光,信号转导,黑曲霉,糖化酶

中图分类号:Q55 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)02-0275-04

糖化酶,又称葡萄糖淀粉酶(Glucoamylase,EC 3.2.1.3),作为淀粉原料糖化的一种重要酶制剂广泛应用于酿酒业、制糖业、医药等行业,具有优良的节能前景,其价值已广泛被人们认识。黑曲霉(*Aspergillus niger*)既是糖化酶的重要生产菌,也是外源基因在丝状真菌的重要表达系统,有着重要的生产实践意义。现在的研究发现,蓝光能够调节很多真菌包括生长、向光性和生理节律变化在内的很多生命活动<sup>[1]</sup>,因此,研究黑曲霉在光下培养及其生长发育和产糖化酶的变化规律,既可为丝状真菌培养和工业化应用中引入光这一参数提供必要的理论依据,又可为在采用科学合理的工艺条件上提高糖化酶活力上找到新的技术突破口。虽然有关于蓝光对子囊菌属的粗糙链胞霉和须霉菌作用的光受体与信号方面的报道,然而,迄今为止,对于光调控黑曲霉生长代谢方面的研究尚未见报道。我们选择了产糖化酶黑曲霉东酒一号为材料,研究黑曲霉的生长发育、蛋白质合成和产淀粉酶等在蓝光作用下的变化规律,以探索在现有水平上提高黑曲霉糖化酶生产率的方法,也为光调控霉菌的生命周期、生长发育及其酶制剂的工业化应用奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 光源:**红色和蓝色荧光灯均为 40W,由广州

灯泡厂生产,分别将红色和蓝色光源通过红色滤膜(#22)和蓝色滤膜(#73)(日本ケールデイユ又株式会社生产的截止型滤膜)而获得较纯的红光(Red light,RL)和蓝光(Blue light,BL),红光最强波长为 660nm,半高宽为 20nm,蓝光最强波长为 450nm,半高宽为 50nm。各种光质的光强均为  $24\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。所有光源装置均放在遮光的控温室中,温度为  $(28\pm 2)^\circ\text{C}$ 。

**1.1.2 菌种和培养基:**黑曲霉(*Aspergillus niger*)东酒一号,由广东微生物研究所提供。马铃薯培养基:每升马铃薯汁中含 20g 葡萄糖,3g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,1.5g  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,pH6.0。

**1.1.3 主要仪器:**Olympus-CK400-F200 光学显微镜(No.9G10717,产自日本)。

### 1.2 黑曲霉的光培养和形态观察

转接斜面,待长出孢子后,做成孢子悬浮液(稀释至  $10^6$  个/mL)。将 25mL 马铃薯液体培养基倒入培养皿内,接入孢子悬浮液 1mL,混和均匀后,在持续的蓝光(BL)、红光(RL)以及黑暗(Darkness,D)下培养,每隔 24h 取样检测糖化酶活力等指标。定时镜检菌丝形态、拍照,通过 Motic Images Plus Version 2.0 软件系统处理图象进行测量和数据处理。

### 1.3 糖化酶活力测定

参照文献[2]测定,每小时催化分解可溶性淀粉

基金项目:国家自然科学基金(30170558)

\* 通讯作者。Tel:86-755-85216417;Fax:86-755-85212131;E-mail: wangxj@senu.edu.cn

作者简介:朱俊晨(1968-),男,江西人,副教授,博士研究生,主要从事食品生物工程方面的研究。Tel:86-755-26019267;Fax:86-755-26019262;E-mail: jectec@sina.com

收稿日期:2004-07-18,修回日期:2004-09-30

产生 10mg 的葡萄糖, 定义为一个酶活力单位(U)。

#### 1.4 可溶性蛋白质的测定

以 Folin-酚法<sup>[3]</sup>测定黑曲霉菌丝细胞中可溶性蛋白质的含量。

#### 1.5 发酵液残糖的测定

参照文献[4]的方法测定。

#### 1.6 菌丝细胞质膜透性的测定

参照文献[5]的方法加以改进, 取过滤洗净的菌丝体, 吸干附水, 每次处理样品的重量要求一致, 放入盛有 5mL 蒸馏水的三角瓶中, 盖好瓶塞。在恒温箱中 20℃ 浸提 24h, 并定时摇动, 然后测其电导率; 再将样品沸水浴 30min, 冷却至室温, 测其总电导率。以相对电导率表示菌丝细胞质膜的通透性。

相对电导率(%) = (浸提液电导率/总电导率)

× 100%

#### 1.7 生物量的测定

参照文献[6]的方法测定。生物量(g/L) = 菌丝细胞干燥后的重量 × 1000/所取发酵液体积。

## 2 结果

### 2.1 不同光质对黑曲霉产糖化酶及生长的影响

以黑暗为对照, 研究蓝光、红光对黑曲霉产糖化酶活力、生物量及蛋白质合成的影响, 实验结果表明(图1)与黑暗相比, 在光照的 1~5d 的时间段内红光、蓝光对黑曲霉产糖化酶活力、生物量和蛋白质合成均有促进作用。在培养至 3~4d 时, 蓝光处理的菌丝产糖化酶活力最高达 660.30U/mL, 比黑暗高出 154%, 红光达 443.10U/mL, 比黑暗处理的高出 70%, 同样, 在光照的第 3 天, 蓝光下培养的黑曲霉生物量增加了 49.48%, 4d 时蓝光处理的菌丝细胞可溶性蛋白含量提高了 100.56%, 红光下菌丝细胞可溶性蛋白含量增加 61.11%, 而 3~4d 正是菌丝分生孢子形成的阶段(图4、5), 提示了尤其是在开始产孢子的阶段, 蓝光下黑曲霉产糖化酶活力、生物量有很大提高, 以蓝光作用最为显著, 红光次之。

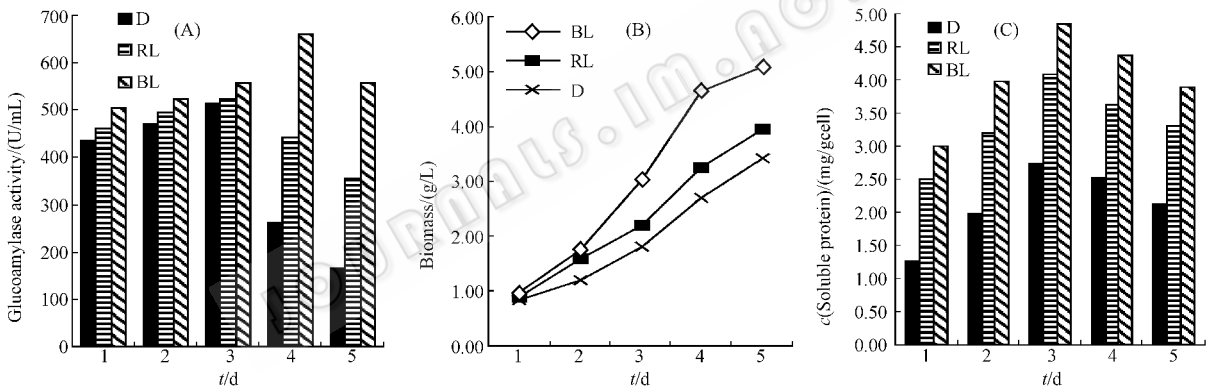


图1 (A)光对黑曲霉糖化酶活力的影响 (B)光对黑曲霉生长的影响 (C)光对黑曲霉菌丝细胞可溶性蛋白含量的影响

Fig.1 (A) Effect of light on the glucoamylase activity in *Aspergillus niger*; (B) Effect of light on biomass of *Aspergillus niger*;

(C) Effect of light on soluble protein content of mycelium

BL: Blue light; RL: Red light; D: Darkness.

### 2.2 蓝光下黑曲霉培养过程 pH 值、残糖、相对电导率的变化

实验结果(图2)表明, 与黑暗处理相比, 蓝光下黑曲霉培养液 pH 值明显下降, 同时糖类物质的消耗较快, 残糖在 1~3d 内随着菌丝蛋白质含量和产糖化酶活力的增加而迅速下降, 表明这时黑曲霉大量合成自身所需营养物质, 同化作用占优势。而且与黑暗处理相比, 在菌丝培养的 24~48h 时间段内, 蓝光下菌丝细胞相对电导率增加, 菌丝外渗电解质增多, 提示了在培养的起始阶段蓝光刺激能提高黑曲霉细胞质膜的通透性。

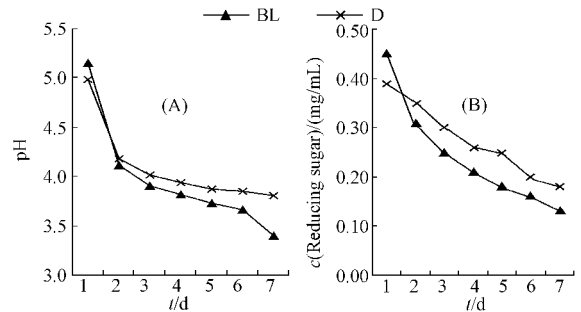


图2 (A)蓝光下黑曲霉培养液 pH 变化 (B)蓝光下黑曲霉培养液残糖变化

Fig.2 (A) pH value variation in *Aspergillus niger* culture under BL; (B) Effect of BL on reducing sugar in culture

BL: Blue light; D: Darkness.

### 2.3 蓝光下黑曲霉分生孢子发育形态的变化

将黑曲霉孢子培养液分别至于黑暗和蓝光下培养,从图 3(A、B)图 4(A、B)和表 1 看出,相比于黑暗条件下,蓝光下孢子萌发后 1~2d 菌丝较粗,菌丝细胞顶端膨大显著,在培养到 2d 时开始形成初生孢子梗,分生孢子柄较大,显微测量的直径达  $8.35\mu\text{m} \pm 0.41\mu\text{m}$ ,而黑暗条件下分生孢子柄直径只有  $3.3\mu\text{m} \pm 0.18\mu\text{m}$ 。3d 后蓝光下黑曲霉孢子和孢子穗增大。此外,由表 2、表 3 及图 3(C、D)图 4(C、D)看出,蓝光下黑曲霉孢子和孢子穗直径比黑暗增加较为显著,在 4d 后蓝光下孢子继续形成,5d 后孢子穗继续明显增大。进一步提示了蓝光能促进黑曲霉菌丝生长和分生孢子发育。同时,与蓝光下产孢子高峰期对应,黑曲霉产糖化酶活力也显著增加(图 1-A)。

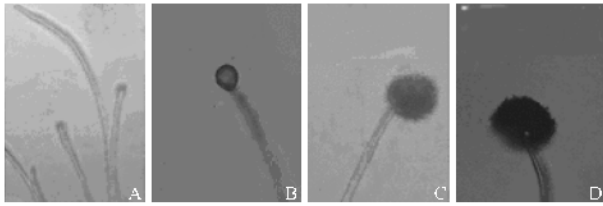


图 3 黑暗下孢子萌发后黑曲霉菌丝生长和分生孢子形态(400×)

Fig.3 Morphological stage of *Aspergillus niger* during conidiation under darkness(400×)

A Stage 1, Vegetative hypha after 24h; B: Stage 2, Apical cell swelling a little after 48h; C: Stage 3, Microsporangiophore formation and conidium formation after 72h; D: Stage 4, Sporangium growing after 96h.

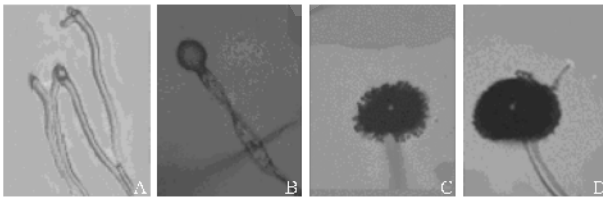


图 4 蓝光下孢子萌发后黑曲霉菌丝生长和分生孢子发生的形态变化过程(400×)

Fig.4 Morphological stage of *Aspergillus niger* during conidiation under blue light(400×)

A: Stage 1, Vegetative hypha after 24h; B: Stage 2, Apical cell swelling greatly after 48h; C: Stage 3, Formation of macrosporangiophore and conidium after 72h; D: Stage 4, Continuous formation of macrosporangium after 96h.

表 1 蓝光下黑曲霉菌丝粗细的变化( $\mu\text{m}$ )

t/d	D	BL
1	$1.33 \pm 0.65$	$3.00 \pm 0.89$
2	$1.66 \pm 0.57$	$3.33 \pm 0.91$

D: Darkness; BL: Blue light.

表 2 蓝光下不同时间孢子穗的大小变化( $\mu\text{m}$ )

Table 2 Comparison of macro sporangium under BL and micro sporangium under D in *Aspergillus niger*( $\mu\text{m}$ )

t/d	D	BL
4	$19.41 \pm 0.83$	$23.82 \pm 0.54$
5	$32.85 \pm 0.62$	$33.86 \pm 0.21$
6	$39.00 \pm 0.43$	$40.80 \pm 0.29$
7	$46.00 \pm 0.26$	$56.20 \pm 0.47$
8	$48.05 \pm 0.52$	$87.10 \pm 0.87$

D: Darkness; BL: Blue light.

表 3 蓝光下黑曲霉孢子直径( $\mu\text{m}$ )

Table 3 Comparison of macro-conidium under BL and micro-conidium under darkness in *Aspergillus niger*( $\mu\text{m}$ )

t/d	D	BL
4	$0.92 \pm 0.15$	$1.11 \pm 0.11$
5	$1.47 \pm 0.19$	$1.78 \pm 0.13$

D: Darkness; BL: Blue light.

## 3 讨论

以上实验结果提示了蓝光作用能提高黑曲霉细胞质膜的通透性,有效地促进其同化过程,导致生物量的增加、菌丝蛋白质的量和糖化酶活力的提高,诱导并促进黑曲霉分生孢子的发育,虽然这可以解释为 Ling 等<sup>[7]</sup>的研究报道:光照会导致丝状真菌引起胁迫应答反应,但黑曲霉和 *Corrochano*<sup>[8]</sup>所报道的子囊菌属须霉一样也受蓝光刺激而促进其孢子的发育,至今未见报道。而蓝光是如何刺激黑曲霉分生孢子发育以及糖化酶活力的显著增加?蓝光对糖化酶活力提高的促进作用是直接的还是间接的?对此尚需进一步深入研究。

在进一步考察蓝光下黑曲霉  $\alpha$ -淀粉酶和总淀粉酶活力的变化过程(图表略)还发现,与黑暗处理的对照样相比,虽然在光培养的前 2d 内,蓝光处理的  $\alpha$ -淀粉酶和总淀粉酶活力增势并不明显,但从 3d 开始,蓝光下黑曲霉  $\alpha$ -淀粉酶和总淀粉酶活力却陡增至最高,和该时间段内糖化酶活力的增势表现出高度的一致性,而这一阶段正是蓝光下黑曲霉开始形成孢子的阶段。多细胞真核微生物的器官形成是一个复杂的过程,其中涉及到感应细胞外环境信号的多个途径,其生命周期的无性阶段一般是先形成多细胞分生孢子梗,然后再产生分生孢子,而其分生孢子的发生也是由基因决定的一个程序的过程,发生在其生命周期的一个精确的时间段内<sup>[9]</sup>,如须霉在生长到一定阶段后,就是由其蓝光受体调控表达的一系列基因参与<sup>[8]</sup>,才导致蓝光下孢子增大的现象。

这也进一步提示了蓝光可能是通过刺激黑曲霉分生孢子发育而导致相应阶段包括糖化酶在内的多种淀粉酶活力的迅速增加。

Lauter 等<sup>[10]</sup>曾报道子囊菌属的粗糙链胞霉有一些基因是在产孢阶段表达而受蓝光调控的,而 Cerda-Olmedo 等<sup>[11,12]</sup>的研究也表明,真菌发育过程基因的多效性变化影响了光的应答机制,真菌的光信号转导途径是随着生长发育过程中多个基因的表达及其相互作用而完成的。因此,黑曲霉有可能是通过其蓝光受体来调控产孢阶段一些基因的表达,促进其生长和孢子的发育,并导致产孢阶段包括糖化酶在内的相关淀粉酶活力的上升。有关蓝光下不同光强、光照时间、及营养和通气等条件协同促进黑曲霉产糖化酶的影响及蓝光下黑曲霉发育过程有关基因表达的研究正在进行中。本研究可以为如何利用孢子发育阶段的黑曲霉,并以蓝光调控作为一种技术手段来进一步提高黑曲霉产糖化酶活力提供了新的思路。

### 参 考 文 献

[ 1 ] He Q, Cheng P, Yang Y, *et al.* White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science*, 2002, **297**: 840 - 843.

- [ 2 ] Hayashida S, Flor P Q. Raw starch-digestive glucoamylase productivity of protease-less mutant from *Aspergillus awamori* var *kawachi*. *Argic Biol Chem*, 1981, **45**( 12 ): 2675 - 2681.
- [ 3 ] 邓江明 蔡群英 潘瑞炽. 光质对水稻幼苗蛋白质、氨基酸含量的影响. *植物学通报*, 2000, **17**( 5 ): 419 - 423.
- [ 4 ] 曹孟德 秦东春 王君健, 等. 香荚兰细胞悬浮培养产生香兰素的研究. *华中理工大学学报*, 1998, **26**( 5 ): 8 - 10.
- [ 5 ] 安 宜 曾福礼. 铈对小麦根可溶性钙含量的影响. *中国稀土学报*, 1999, **3**( 17 ): 23 - 26.
- [ 6 ] 吴克刚, 柴向华, 杨连生. 植物激素对破囊壶菌生长与产 DHA 的影响. *微生物学报*, 2003, **43**( 1 ): 111 - 115.
- [ 7 ] Ling J, Wells D R, Tanguay R L. Heat shock protein HSP101 binds to the Fed-1 internal light regulatory element and mediates its high translational activity. *Plant Cell*, 2000, **12**: 1213 - 1227.
- [ 8 ] Corrochano L M. Photomorphogenesis in phycomyces: differential display of gene expression by PCR with arbitrary primers. *Mol Genet Genomics*, 2002, **267**: 424 - 428.
- [ 9 ] Cletus A, Bee Na Lee, Thomas H, *et al.* Characterization of the role of the FluG protein in asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 2001, **158**: 1027 - 1036.
- [ 10 ] Lauter F R, Russo V E. Blue light induction of conidiations peci. c genes in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**: 6883 - 6886.
- [ 11 ] Flores R, Cerda-Olmedo E, Corrochano L M. Separate sensory pathways for photomorphogenesis in Phycomyces. *Photochem Photobiol*, 1998, **67**: 467 - 472.
- [ 12 ] Cerda-Olmedo E, Corrochano L M. Phycomyces and the biology of light and color. *FEMS Microbiol Rev*, 2001, **25**: 503 - 512.

## Effect of blue light on conidiation development and glucoamylase enhancement in *Aspergillus niger*

ZHU Jun-chen<sup>1,2</sup> WANG Xiao-jing<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> Department of Applied Biological Engineering, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China)

(<sup>2</sup> College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510641, China)

**Abstract**: Pure blue (BL) or red light (RL) were obtained by filtering blue or red fluorescent lamp light through plastic filters. With the dark condition as control, the effect of BL and RL on the *Aspergillus niger* were studied including soluble protein content of mycelium, glucoamylase activity, the biomass as well as sporangiophore photomorphogenesis and vegetative spore development. Irradiation with BL and RL wholly promoted glucoamylase activity together with the rise of the soluble protein content and the mycelium growth. The glucoamylase activity of mycelia culture under blue light was enhanced 2.54 times than that of control. In the phases of developmental growth (young mycelia and sporangiophores), glucoamylase activity and relative conductivity ratio of mycelium were higher under blue light than under dark, the enhanced glucoamylase activity likely stemmed from development of macrosporangiohores of *Aspergillus niger* promoted by blue light. In addition, the increase of glucoamylase activity under blue light was highest at the stage of macrosporangiohores forming and conidiation, then declined owing to spores aging. As to young microsporangiohores under darkness the glucoamylase activity just relatively increased and declined rapidly with age. Different from control, irradiation with blue light at the time of 72h after inoculation was able to stimulate development of macrosporangiophere and conidium along with the rise of glucoamylase activity of *Aspergillus niger*.

**Key words**: Blue light, Signal transduction, *Aspergillus niger*, Glucoamylase

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (30170558)

\* Corresponding author. Tel: 86-755-85216417; Fax: 86-755-85212131; E-mail: wangxj@senu.edu.cn

First author. Tel: 86-755-26019267; Fax: 86-755-26019262; E-mail: zctec@sina.com

Received date: 07-18-2004