

## 蓝光诱导促进黑曲霉产糖化酶的研究

朱俊晨<sup>1,2</sup>, 王小菁<sup>1\*</sup>, 张 广<sup>3</sup>, 苏 捷<sup>2</sup>, 朱 明<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 华南师范大学生命科学院 广州 510641)

(<sup>2</sup> 深圳职业技术学院生物工程系 深圳 518055)

(<sup>3</sup> 清华大学深圳研究生院生命科学部 深圳 518055)

**摘 要** :考察了蓝光对黑曲霉产糖化酶的影响并采用扫描电镜观察蓝光下黑曲霉形态发育过程,结果表明,与黑暗对照组相比,蓝光处理使菌丝粗壮,孢囊增大,分生孢子发育提前,黑曲霉糖化酶活力增加,孢子发育和产糖化酶的进程有一定的对应性。黑曲霉在黑暗下生长至 36h 时,经蓝光诱导糖化酶产量提高更为明显,提示了黑曲霉存在一个对蓝光反应产生最适光感应的发育阶段,对于光调节黑曲霉产糖化酶来说,蓝光诱导的光强由弱到强,比持续蓝光培养或采用较高光强诱导效果更好,表明黑曲霉产糖化酶存在一种光适应机制,能够感应和适应光强度变化,调节其自身代谢。从抑制性扣除杂交实验和蓝光光强变化对差异基因表达的分析来看,糖化酶基因以及呼吸链中部分氧化还原酶基因在蓝光诱导下表达皆有增强,蓝光信号转导影响了核基因编码的线粒体呼吸链相关酶基因表达水平,交替氧化酶可能参与了蓝光信号途径,影响了黑曲霉产糖化酶和孢子发育。研究结果可为在现有水平上应用蓝光调节提高糖化酶产量找到新的技术突破口和提供新思路。

**关键词** :蓝光,黑曲霉,糖化酶

中图分类号 :Q936 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2006)05-0734-06

除了植物以外,光信号的感应现象还存在于很多非光合作用的生物中,其中蓝光作为重要的环境信号,能够调节包括真菌在内的很多生物的生长发育、代谢、向光性和生理节律变化在内的很多生命活动<sup>[1-5]</sup>。虽然目前很多研究表明不少发育和生理过程都受蓝光的影响,如调节其代谢、生长、有性和无性发育、色素形成、向光性等<sup>[6-8]</sup>,然而真菌对光应答的确切机制还有待于更进一步研究和阐明<sup>[9]</sup>,而深入了解光信号在真菌生长发育过程中的作用对于更好的开发利用真菌价值来说是又非常重要的,目前国际上在光调节真菌发育和生理方面,研究较多的主要是是须霉、脉孢菌和木霉,而对黑曲霉光反应现象的研究还未见报道。

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。因此,研究黑曲霉在蓝光下产糖化酶和形态发育的关系,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。我们选择了产糖化酶黑曲霉东酒 1 号为材料,研究蓝光作用下黑曲霉产糖化酶规律和光反应机制,以探索在现有水平上提高黑曲霉糖化酶产率的新途径,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** :40W 蓝色荧光灯由广州灯泡厂生产,将蓝色光源通过蓝色滤膜(#73 日本ケルデイコ株式会社生产的截止型滤膜)而获得较纯的蓝光(BL),蓝光最强波长为 450nm,半高宽为 50nm,光强调为 500(molm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>),温度控制为(28±2)°C。

**1.1.2 菌株和培养基** :黑曲霉(*Aspergillus niger*)东酒 1 号,由广东微生物研究所提供。采用查氏培养基并加以改进,添加 1% 可溶性淀粉,0.3% 大豆粉,1% 葡萄糖和 0.1% 酵母膏, pH6.0。

**1.1.3 主要试剂和仪器** :逆转录酶(AMV)为 Invitrogen 产品;常用限制性内切酶、连接酶、pUC-18-T-vector 为宝生物工程有限公司(大连)产品; *Taq*

基金项目 :国家自然科学基金(30170558)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-20-85216417 ;E-mail : sciencezjc@126.com

作者简介 :朱俊晨(1968-)男,江西人,教授,博士,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 : sciencezjc@126.com

收稿日期 :2005-10-18 接受日期 :2005-11-03 修回日期 :2006-04-15

DNA 聚合酶、dNTPs、UNIQ-10 柱离心式质粒小量抽提试剂盒、UNIQ-5 柱式 DNA 胶回收试剂盒为上海生工生物技术有限公司产品。MJ-100 型 PCR 扩增仪(MJ 公司);低温高速离心机(Eppendorf);核酸蛋白质测定仪(Eppendorf);电泳系统(上海);凝胶成像系统(BIO-RAD);7700 Sequence Detector 分析仪(美国 ABI 公司生产);Philips-XL-300 电镜(荷兰)。

## 1.2 黑曲霉的培养与电镜形态观察

试管斜面菌种转接到新的试管斜面上,经培养,待长出孢子,做成孢子悬浮液(稀释至  $10^6$  个/mL)。将 25mL 上述高压灭菌后的液体培养基倒入培养皿内,接入孢子悬浮液 1mL,混和均匀后,黑暗下培养后再在蓝光下培养(光强根据需要调节),每隔 6h 取样,样品经前固定后用 pH7.4 磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,质量分数  $w = 1\%$  锇酸后固定 1h,双蒸水洗涤 3 次,单宁酸 + 戊二醛双导电染色,双蒸水洗涤 3 次,转入酒精梯度脱水,干燥,喷金膜,采用电镜扫描、观察并摄影。

## 1.3 糖化酶活力测定

取黑曲霉培养物于  $4^{\circ}\text{C}$ , 10000r/min 离心 5min, 取上清液用作测定胞外糖化酶活力,同时将菌丝收集并立即液氮研磨,溶于 pH5.6 磷酸缓冲液后再次离心,取上清液用作测定胞内糖化酶活力。糖化酶活力测定参照 Hayashida 等<sup>[10]</sup>的方法测定,以每小时催化分解可溶性淀粉产生 1mg 葡萄糖的量,定义为一个酶活力单位(U/mL)。每克菌丝总酶活力为胞外和胞内糖化酶活力总和。

## 1.4 生物量分析

参照文献 [11] 的方法进行操作。生物量(g/L) = 菌丝细胞干燥后的重量  $\times$  1000/所取发酵液体积

## 1.5 菌体的总 RNA 提取

以黑暗培养 36h 菌丝为材料,蓝光处理不同时间后的菌丝体为实验组,黑暗培养至同一时间段的菌丝为对照组。液氮研磨后,按照总 RNA 提取试剂盒 TRIZOL (GIBCOBRL) 的方法提取提取菌丝总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计(260nm/280nm)进行定性定量检测后  $-70^{\circ}\text{C}$  备用。

## 1.6 荧光定量 PCR 分析

参照荧光定量 PCR(FQ RT-PCR)引物与探针设计要求,设计糖化酶 G1、巯基氧化酶、交替氧化酶基因特异性较强的 cDNA 片段和 18S RNA 共 4 对引物与 4 条 TaqMan 荧光探针。分别提取对应时间段的黑曲霉菌丝 mRNA 进行 RT-PCR 反应,以调至同一浓度样品 cDNA 片段为目的基因,克隆于 pUC18 载

体上,抽提质粒后定量,作为标准品。每个样品取逆转录产物 cDNA  $5\mu\text{L}$ ,分别进行对应引物及其相应探针的 FQ RT-PCR 反应,每组设一个既无 cDNA 又无阳性标准品的阴性对照管。样品扩增的同时,将已经进行梯度稀释的阳性标准品从  $1 \times 10^1$  至  $1 \times 10^7$  各取  $5\mu\text{L}$  作模板,进行与样本同条件的 FQ RT-PCR,电脑自动绘制标准曲线,以和 18sRNA 拷贝数的相对值为报告数据。

## 2 结果和分析

### 2.1 持续蓝光作用下黑曲霉产糖化酶和孢子发育的时间关系

采用扫描电镜观察黑曲霉在蓝光和黑暗下菌丝分生孢子发育的动态变化,由结果图 1 发现,在持续黑暗下生长 36h 的菌丝,顶端膨大,顶囊初步形成,而持续蓝光作用下菌丝增粗,菌丝顶囊已形成并具有密集的初生孢子梗,且分生孢子柄粗短(图 1-A, D);蓝光下培养 48h 后形成的孢子穗成串排列,已完全成熟,且孢子穗大而结实(图 1-B, C),相比之下持续黑暗培养形成的孢子穗较小,成熟慢,产孢率低(图 1-E, F),在接近 60h 时孢子才完全成熟。表明蓝光对黑曲霉的生长包括菌丝体粗细、孢子囊大小、顶囊大小、产孢率等有一定的促进作用。

与孢子形态发育相对应的 60 h 时间段内,在持续的蓝光(光强  $500(\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1})$ )下单位菌丝产糖化酶活力始终高于黑暗对照组,以 48h 较为明显(图 2-B),虽然 48h 前蓝光对黑曲霉的生物量有微弱的抑制作用,但却促进孢子发育(图 2-A, B)和糖化酶产量的提高,而此阶段菌丝正逐渐分化形成孢子(图 2-A)。而 48h 开始,蓝光下孢子发育成熟(图 2-A),生物量开始高于对照组(图 2-C)。进一步提示了蓝光可能是通过调节黑曲霉分生孢子发育而导致糖化酶产量的提高。

### 2.2 黑曲霉不同生长阶段对蓝光诱导的反应

Berocal-Tito 等<sup>[12]</sup>曾报道木霉的菌丝从分化到孢子发育受光诱导,而这种光反应却受生长阶段的限制,只有在培养 48h 后,光诱导效应才明显。为了考察黑曲霉在产糖化酶过程中是否存在这种光反应期,分别取黑暗下培养不同时间段的黑曲霉进行光培养后测定菌丝总糖化酶活力,结果图 3 表明,黑曲霉糖化酶的产量随产孢而阶段性增加,其中以暗培养至 36h 的菌丝受蓝光作用较为明显,而此阶段的菌丝顶端膨大,为分化成孢子囊作准备。

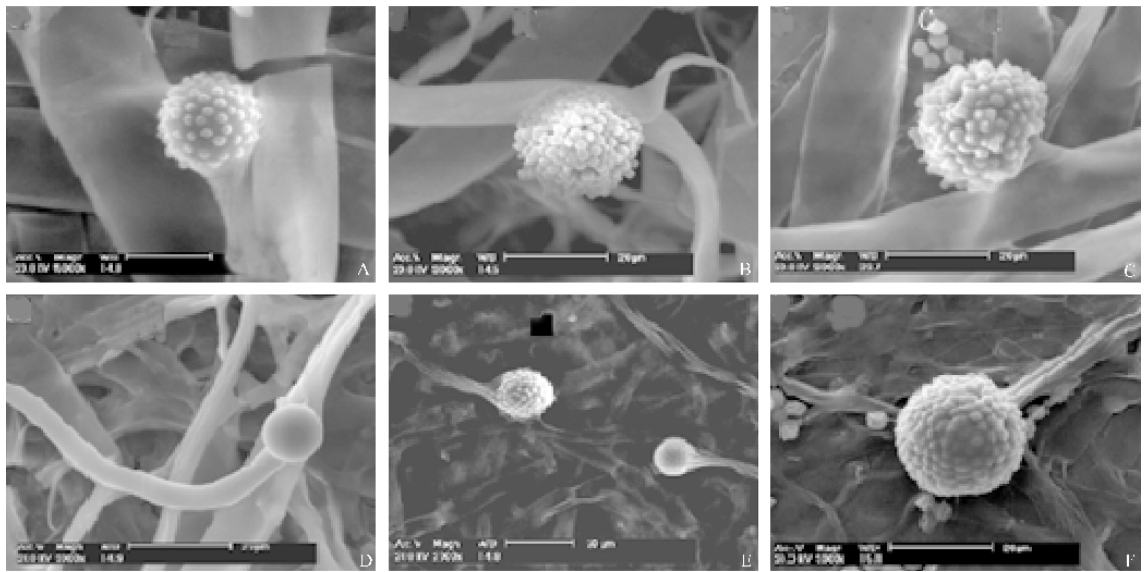


图1 蓝光影响黑曲霉菌丝生长和分生孢子形成的扫描电镜观察(3000×)

Fig.1 Morphological changes during conidiophore formation in *A. niger* (3000×). Electron micrographs showing conidiophore formation under continuous blue light illumination at the time of 36h (A), 48h (B) and 60h (C) are contrasted with that in total darkness at corresponding time (D to F) respectively. Under blue light illumination, more erroneous mycelium and primary sporangiophore formed at 36h, then conidia (B) developed in advance to mature conidiophores bearing chains of conidia (C). Whereas in total darkness, early vesicle just developed from the tip of the stalk at 36h and conidia vesicle developed afterwards (E to F).

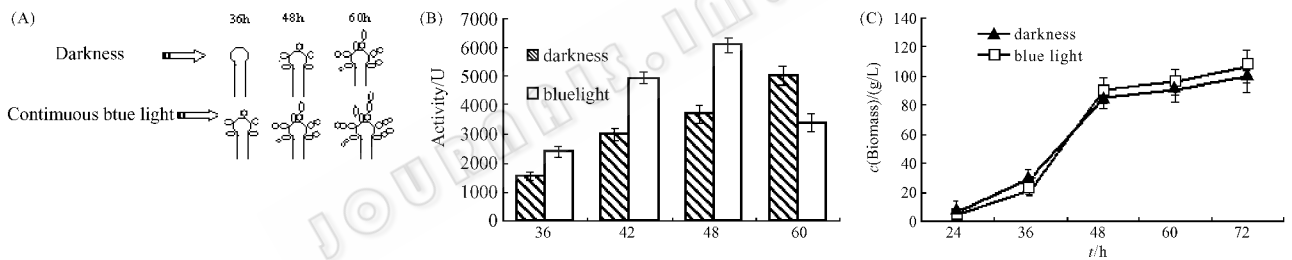


图2 蓝光下黑曲霉产糖化酶和孢子发育的时间进程(蓝光光强为  $500\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )

Fig.2 Comparison of stage of conidia development and glucoamylase production in *A. niger* under blue light and darkness. Total glucoamylase activity per gram of mycelium (B) and biomass (C) were showed corresponding to conidia developing stage (A).

### 2.3 诱导光强度的变化对黑曲霉产糖化酶影响

为了考察黑曲霉对光强变化的感应,将黑曲霉黑暗培养至 36h 后再逐渐增加蓝光强度或置于同一光强 ( $500\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ ) 下处理不同时间,之后进行暗培养至 12h,以持续暗培养为对照,由结果图 4 可知,一开始就处于高光强 ( $500\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ ) 诱导,对黑曲霉的糖化酶产量增势并不明显(图 4-A),只有在经过一段时间适应后,酶活力才逐渐增加,处理 4h 后糖化酶活力又渐渐下降。经光强从  $150\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  逐渐增至  $550\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  的处理后(图 4-B),糖化酶活力明显增加,比黑暗对照组要高出 50% 左右,在处理 6h 后才呈下降趋势。此外,梯度增加光强至  $500\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  以上或高光强下长时间处理对于黑曲霉产糖化酶并没有促进作用。提示了黑曲霉可能具

有光适应机制,能感应和适应光强的变化。

### 2.4 蓝光诱导基因的光应答分析

为了研究蓝光对黑曲霉调节作用的分子机理,在前期工作中,已经采用了抑制性扣除杂交技术 (SSH) 构建了蓝光诱导的黑曲霉消减 cDNA 文库,并通过文库筛选和测序获得了包括糖化酶在内的 11 个已知基因和 2 个功能未知基因。这些基因中除了大部分核糖体和线粒体小核糖体亚基的部分序列外,主要是糖化酶 (G1)、巯基氧化酶 (sox) 和交替氧化酶 (aox) 基因片段。将暗培养至 36h 的菌丝经不同光强的蓝光诱导,以黑曲霉 18S 核糖体基因设为内置对照,荧光定量 PCR 分析上述基因的表达情况所取的差异表达基因 cDNA 片段均受蓝光诱导,相比于持续黑暗培养的对照组而言,上述基因表达均

有增强(图5,图6)。

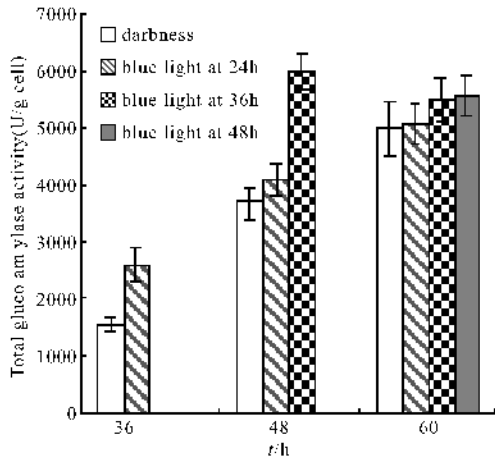


图3 黑曲霉不同生长阶段对蓝光的感应

Fig.3 Determination of the critical period for *A. niger* light responsiveness. Cultures grown under total darkness for the indicated times (24h, 36h, 48h respectively) were exposed to blue light for subsequent 12h of incubation as indicated. The total glucoamylase activity per gram of mycelium was determined. Bars indicate SD.

在持续较高光强(500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ )作用下,与黑暗处理的对照组相比,在蓝光诱导初期,交替氧化酶基因即开始表达,黑暗对照组在光诱导初期没有表达,直到6h后才有表达(图5-A);糖化酶G1和巯基氧化酶基因一开始的表达量呈下降之势,1h后才开始增强,在光诱导2h后表达又呈下降趋势(图5-B, C)。而在连续梯度增加蓝光光强处理的初始阶段,与持续较高光强(500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ )处理情况相似,交替氧化酶基因的表达在初期即成增强之势,而黑暗对照组在对应时间段内 *aox* 基因未见有表达,提示了交替氧化酶可能参与了蓝光信号途径(图6-A);G1

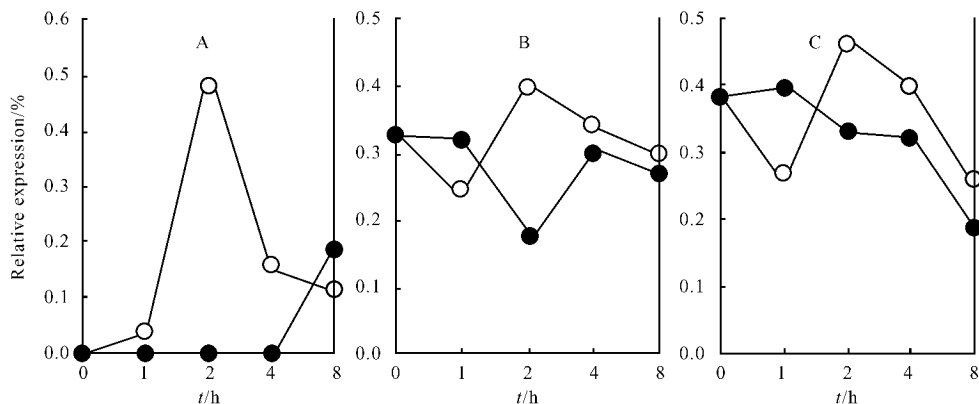


图5 持续光强的蓝光处理时间对黑曲霉部分差异基因表达的影响

Fig.5 Analysis of constant blue light on differential gene response to constant blue light in *A. niger* culture was exposed to blue light of 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  for different times. After light induction for the indicated time points mycelia were harvested at for analysis of gene expression by real-time PCR; (A) glucoamylase G1 genes; (B) gene of sulfhydryl oxidase gene; (C) gene of alternative oxidase;  $\circ$ —blue light,  $\bullet$ —dark control.

基因和 *sox* 基因在初期的表达也呈增强之势,且高于持续高光强的处理组,2h后才逐渐减弱,与糖化酶活力变化一定的相对对应性(图6-B, C),这也进一步提示了黑曲霉的光适应现象。

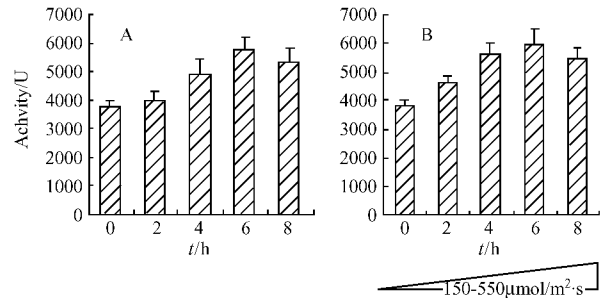


图4 黑曲霉产糖化酶过程中对蓝光强度变化的感应

Fig.4 Fluence-response curve of blue light in *A. niger*. Darkgrown mycelia of 36h old were exposed to blue light of 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  for different times (A) or illuminated with continuous gradient light gradually increased from 150 up to 550 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  after 8h (B); After treated with blue light cultures of *A. niger* were grown subsequently in the dark for additional time. Incubation period was up to total 12h included the time of light treatment and time of subsequent incubation in darkness. Total glucoamylase activity per gram of mycelia.

### 3 讨论

光照会导致丝状真菌引起胁迫应答反应<sup>[13]</sup>,能调节真菌形态发育、改变三羧酸循环途径中一些酶的活性和部分相关代谢产物的浓度<sup>[14,15]</sup>。本研究的实验结果表明,在蓝光作用下,黑曲霉能够调节自身的形态发育、生理生化和和有关基因的表达水平来适应环境的变化。

相比于黑暗培养条件而言,持续蓝光作用下黑曲霉产糖化酶高峰和分生孢子发育提前到来,且二

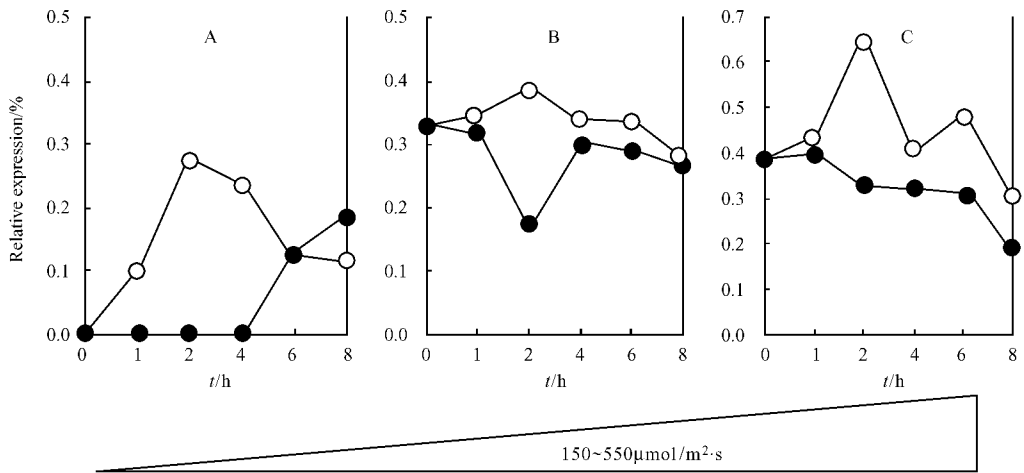


图6 光强连续梯度增加的蓝光处理时间对部分差异基因表达的影响

Fig.6 Analysis of continuous gradient blue light on differential gene response to blue light in *A. niger*. Illuminated with continuous gradient light gradually increased from 150 up to 550  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  after 8h. After light induction for the indicated time points mycelia were harvested at for analysis of gene expression by real-time PCR ;(A) glucoamylase G1 genes ;(B) gene of sulfhydryl oxidase gene ;(C) gene of alternative oxidase ;○—blue light ,—●—dark control.

者有一定的对应性。我们前期的研究<sup>[16]</sup>也表明,蓝光作用提高黑曲霉细胞质膜的通透性,有效地促进其同化过程和生物量的增加。在考察持续蓝光作用下黑曲霉 $\alpha$ -淀粉酶和总淀粉酶活力的变化过程还发现,与黑暗处理的对照样相比,从48h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。提示了蓝光作用下,黑曲霉因为产孢提前需要,促进同化作用而导致糖化酶活力增加,蓝光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。

真菌的发育是一个感应细胞外部环境的多途径的复杂过程,其中涉及到基因表达的时空调节,细胞分化、细胞间信息交流等<sup>[17,18]</sup>,黑曲霉在黑暗下生长至36h时,经蓝光诱导糖化酶产量提高更为明显。表明黑曲霉存在一个对蓝光反应产生最适光感应的发育阶段,此时菌丝体在经过一定阶段的成熟后,受蓝光作用而积累代谢产物,事实上抑制性扣除杂交实验和部分基因表达分析的结果也说明交替氧化酶参与了蓝光的光反应,推测呼吸链中电子传递(氧化还原)途径因蓝光作用而发生改变。Lauter等<sup>[19]</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。黑曲霉只有在菌丝顶端膨大即将分化形成初生孢子梗时,才对蓝光作用较为敏感,说明这一阶段菌丝中已表达出一系列与蓝光信号调控有关的基因,参与蓝光信号途径并影响了线粒体及其呼吸链产能相关酶的变化。对于光调节黑曲霉产糖化酶来说,培养至36h时间段的菌丝经过光强由弱到强的蓝光诱导后,比持续蓝光培养或

采用较高光强诱导效果更好,蓝光调节过程中糖化酶基因(G1)的mRNA水平变化也在一定程度上验证了这一点。提示了黑曲霉能够感应和适应光强度变化,调节其自身代谢,黑曲霉产糖化酶存在一种光适应机制,同时,由此也提出了蓝光调节黑曲霉产糖化酶的一种新的光诱导模式。

在植物和真菌生物细胞的线粒体中有两条互补的呼吸链途径,分别以细胞色素氧化酶和交替氧化酶作为电子传递的末端氧化酶<sup>[20]</sup>,通常情况下当细胞色素呼吸链的电子传递受阻,交替氧化酶才参与呼吸链电子传递末端氧化作用。需要指出的是,从蓝光光强变化对交替氧化酶mRNA水平影响实验结果来看,与蓝光作用于糖化酶基因表达不同,无论是直接用较高光强还是梯度增加光强处理,交替氧化酶(*aox*)mRNA水平在1h内瞬时增加,而在黑暗条件下同时间段未见表达,在孢子成熟阶段才逐渐表达。Gary等<sup>[21]</sup>的研究也表明,正常生长条件下脉孢菌中几乎没有*aox*的mRNA,但在氯霉素作用下(使线粒体蛋白合成受阻)或无细胞色素氧化酶的突变体中,脉孢菌中*aox*却大量表达。由此推测蓝光作用影响了黑曲霉呼吸链基因表达,线粒体和细胞核之间存在一个蓝光信号转导机制,影响了核基因编码的线粒体呼吸链相关酶基因表达水平,进而促进黑曲霉产糖化酶和孢子发育。

利用蓝光能调节黑曲霉的形态发育和糖化酶的产量,本研究结果可为应用蓝光调节提高糖化酶产量提供新思路 and 作为理论研究的参考。而进一步深入阐明黑曲霉在蓝光下的生命活动规律也将有助于设计提高霉菌代谢产物的新途径。

## 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 ] Cerda'-Olmedo E, Corrochano L. Genetics of *Phycomyces* and its responses to light. *Amsterdam Elsevier* 2001, **1**: 589 – 620.
- [ 3 ] Flores R, Cerda'-Olmedo E, Corrochano LM. Separate sensory pathways for photomorphogenesis in *Phycomyces*. *Photochem Photobiol*, 1998, **67**: 467 – 472.
- [ 4 ] Galland P, Lebert M. Phototropism in *phycomyces*. *Photo-sciences*, 2001, **1**: 621 – 657.
- [ 5 ] Schwerdtfeger C, Linden H. VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J*, 2003, **22**: 4846 – 4855.
- [ 6 ] Lauter F. Molecular genetics of fungal photobiology. *J Genet*, 1996, **75**: 375 – 386.
- [ 7 ] Lauter F, Russo V. Blue light induction of conidiationspecific genes in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**: 6883 – 6886.
- [ 8 ] Lauter F, Yamashiro CT, Yanofsky C. Light stimulation of conidiation in *Neurospora crassa*: studies with the wild-type strain and mutants *wc-1*, *wc-2* and *acon-2*. *J Photochem Photobiol B*, 1997, **37**: 203 – 211.
- [ 9 ] Idnum A, Heitman J. Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biol* 2005 **3**(4):95.
- [ 10 ] Hayashida S, Flor PQ. Raw starch- digestive glucoamylase productivity of protease- less mutant from *Aspergillus awamori* var *kawachi*. *Argic Biol Chem*, 1981, **45**(12): 2675 – 2681.
- [ 11 ] Müller C, McIntyre M, Hansen K, *et al.* Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus oryzae* by altering chitin synthesis, *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(4): 1827 – 1836.
- [ 12 ] Berrocal-Tito G, Sametz-Baron L, Eichenberg K, *et al.* A rapid blue light regulation of a *Trichoderma harzianum* photolyase gene. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 14288 – 14294.
- [ 13 ] Ling J, Wells DR, Tanguay RL. 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.
- [ 14 ] Linden H, Ballario P, Macino G. Blue light regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol*, 1997, **22**: 141 – 150.
- [ 15 ] Rua J, Rodriguez-Aparicio LB. Effect of light on several metabolites of carbohydrate metabolism in *Phycomyces blakesleeana*. *J Bacteriol*, 1987, **169**: 904 – 907.
- [ 16 ] 朱俊晨, 王小菁. 蓝光促进黑曲霉分生孢子发育和产糖化酶的研究. *微生物学报*, 2005, **45**(2): 275 – 278.
- [ 17 ] Cletus A, Bee N, Thomas H. Characterization of the role of the FluG protein in asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 2001, **158**: 1027 – 1036.
- [ 18 ] Thomas H, Adams JK. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**(1): 35 – 54.
- [ 19 ] Ito YD, Saisho M, Nakazono NT, *et al.* Transcript levels of tandem-arranged alternative oxidase genes in rice are increased by low temperature. *Gene*, 1997, **203**: 121 – 129.
- [ 20 ] Kromer S. Respiration during photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, **46**: 45 – 70.
- [ 21 ] Li Q, Gary R, Lesley L, *et al.* Cloning and analysis of the alternative oxidase gene of *Neurospora crassa*. *Genetics*, 1996, **142**: 129 – 140.

Glucoamylase enhancement regulated by blue light in *Aspergillus niger*ZHU Jun-chen<sup>1,2</sup>, WANG Xiao-jing<sup>1\*</sup>, ZHANG Guang<sup>3</sup>, SU Jie<sup>2</sup>, ZHU Ming<sup>2</sup><sup>1</sup> College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510641, China )<sup>2</sup> Department of Applied Biological Engineering, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China )<sup>3</sup> Life Science Division Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China )

**Abstract**: Regulation of glucoamylase production in photoinduced *A. niger* under blue light were investigated. The results showed that continuous illumination of blue light was effective in promotion of conidiation, leading to more glucoamylase production due to the need of sporulation in *A. niger*. It was clear that 36h-old mycelium grown in dark was in the developmental stage of formation of conidiophore stalk and was most sensitive to BL. *A. niger* cultures exhibited some competence stage to respond to blue light over a period of 36 h when early conidiophore stalk formed in darkness, and photoinduction at this critical period resulted in relatively higher yield of glucoamylase. The fluence-response data generated with blue light indicated that the optimum fluence required for the photomorphogenetic response in *A. niger* was no less than 450 (mol/m<sup>2</sup>·s) to saturate the photoinduction system. The amount of glucoamylase gene (G1) transcripts accumulated during illumination with blue light was more than that in total darkness, whereas the threshold for G1 induction during illumination with increased gradient light was higher than that exposed directly to light of constant fluence, indicating the existence of a light adaptation mechanism for glucoamylase production in response to blue light. Nevertheless, both high and low light were able to promote glucoamylase producing. Furthermore, suppression subtractive hybridization experiment revealed that some respiratory chain redox enzymes in mitochondria including alternative oxidase as well as sulfhydryl oxidase participated the photoreponse in *A. niger* and consequently influenced the metabolism. The results support a possibility of designing strategies to improve glucoamylase yield by application of blue light.

**Keywords**: Blue light; *Aspergillus niger*; Glucoamylase

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(30170558)

\* Corresponding author. Tel/Fax 86-20-85216417; E-mail: sciencezc@126.com

Received: 18 October 2005/Accepted: 3 November 2006 /Revised: 15 April 2006