

头孢菌素 C 产生菌产黄顶孢霉菌 原生质体的分离和再生*

周琪文 张永昌 周玲贞 洪素琴 李蓉仙 刘颐屏

(上海第三制药厂抗生素研究所)

用 1% 拟康氏木霉 *Trichoderma pseudokoningii* Rifai 产生的纤维素酶, 不须硫醇类化合物预处理, 可直接裂解产黄顶孢霉菌菌丝体, 得到大量原生质体。

不同批号纤维素酶活力相差很大, 需比较采用。产黄顶孢霉菌菌丝体用玻璃纸平板培养法培养, 培养时间为 40—48h。

纯化后原生质体悬浮液用渗透压处理后分离计数, 可计算非原生质体形成的菌落数, 从而统计再生频率约为 0.7—2.5%。

在原生质体再生过程中, 观察到不同于孢子再生的生长延缓现象, 原生质体再生菌株仍保留亲株的菌落形态及合成头孢菌素 C 的生产能力。

关键词: 产黄顶孢霉菌; 原生质体; 分离; 再生。

关于产黄顶孢霉菌原生质体的研究工作国外已有报道^[1-3], 国内有关这方面工作尚无报道, 我们用 1% 国产纤维素酶直接酶解在玻璃纸固体培养基上培养 40—48h 的产黄顶孢霉菌菌丝体, 经 2—3h 后可得到大量原生质体。纯化后的原生质体分离于高渗透压的再生培养基上能再生成正常菌落, 再生频率为 0.7—2.5% 左右, 再生菌株仍保留了亲株的菌落形态和生产能力。

材料和方法

(一) 菌种和培养基

1. 菌种: 产黄顶孢霉菌 *Acremonium chrysogenum* C-_A。

2. 产菌丝体培养基 (PM) 组成 (%): 蔗糖 2, 葡萄糖 0.5, 酵母膏 0.2, 蛋白胨 0.3, 硝酸钾 0.1, 磷酸二氢钾 0.05, 无水硫酸镁 0.05, 氯化钠 0.05, 硫酸亚铁 0.001, 琼脂 2.0, 蒸馏水配制, pH6.4—6.7。

3. 再生培养基组成 (RM) 同产菌丝体培养基, 其中氯化钠浓度改为 4.68% (0.8M)。

(二) 菌丝体培养

为了制备适宜于释放原生质体的菌丝体, 采用梁平彦等^[4]报道的玻璃纸平板培养法培养菌丝体, 控制接种用孢子浓度为 1×10^7 个孢子/ml 左右, (镜检), 25℃ 培养 40—48h, 即可见薄絮状菌丝长出。

(三) 酶及无菌酶液的制备

1. 纤维素酶: 系拟康氏木霉 *Trichoderma pseudokoningii* Rifai 产生, 上海酒精二厂 1982 年产品, 不同批号的酶酶解能力相差较大, 须比较后择优使用。

2. 蜗牛酶: 系玛瑙螺 *Achatina fulica* 的消化液经冷冻制得干粉, 本研究所自制。

3. 酶液制备: 称取一定重量的酶, 溶解于 pH6.8 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液内, (加有 0.8M 氯化钠及 0.02M 无水硫酸镁,) 使成所需要的浓度。经石棉滤器真空抽吸过滤除菌后保存于 4℃, 此酶液在 4℃ 存放 9 天后仍有活性。

(四) DTT 预处理

DTT; 二巯基赤鲜醇 (Dithiothreitol); $C_4H_{10}O_2S_2$, 分子量 154.3, 纯度 98%。

本文于 1982 年 12 月 27 日收到

* 赵金梅、余培基同志测定效价, 胡树藩同志摄制照片。特此致谢。

按照 Patricia 描述的方法^[1], 将长好菌丝体用 DTT 预处理 1h, (处理温度 28℃)。

(五) 原生质体的分离及纯化

在无菌培养皿内放入按上法制备的一定浓度纤维素酶液 6ml, 用无菌镊子将培养 40—48h 菌丝体的玻璃纸倒复在酶液内, 轻轻抖动玻璃纸, 菌丝体即自行散落在酶液中, 然后弃去玻璃纸, 每 6ml 酶液内洗入 3 张玻璃纸的菌丝体, 接着将培养皿放入 28℃ 酶解, 间歇轻轻摇动培养皿, 按时取样在相差显微镜下观察原生质体释放情况, 2—3h 后, 将培养皿内破碎菌丝体和原生质体混合液用吸管吹吸数次后, 通过 G-2 烧结玻璃漏斗过滤, 使原生质体与破碎菌丝体分开, 含有原生质体的滤液用液体 RM 离心 (2000 转/分 20 分) 洗涤三次, 以清除酶液, 然后用液体 RM 补充至一定体积即得纯化的原生质体悬浮液。

(六) 原生质体的再生

将上述纯化后的原生质体用液体 RM 稀释后分离于固体 RM 上, 每个培养皿接种 0.5ml—1ml 稀释液, 用手摇动培养皿, 使其分布均匀, 静止 0.5h 后, 在 28℃ 培养 7 天, 10 天, 15 天后分别计算菌落数。

(七) 渗透压处理及再生频率计算

取纯化后原生质体悬浮液 1ml 加入 9ml 无菌水在室温中静置 0.5h 后, 分离于铺有固体 PM 培养皿上, 15 天后计算出菌落数, 即为非原生质体 (残存菌丝断片) 形成的菌落数。统计原生质体在 RM 上生长 15 天后的菌落数, 以及非原生质体在 PM 上生长 15 天的菌落数, 按下式计算可以得到较准确的再生频率:

再生频率 = (纯化后原生质体在 RM 上长出菌落数/ml - 非原生质体在 PM 上长出菌落数/ml) / (纯化后原生质体镜检数/ml) × 100%

结果和讨论

(一) 原生质体的分离

1. 裂解酶的筛选: 国外报道产黄顶孢霉菌菌丝体破壁用酶常用蜗牛酶^[2], 纤维素酶, 或葡聚糖苷酶, 几丁质酶, 蛋白酶, 脂肪酶等混合使用^[4], 也有用现成商品酶如

Cytophaga enzyme L₁ (BDH, Poale)^[4]。我们收集了蜗牛酶和上海酒精二厂生产的九个批号纤维素酶酶解产黄顶孢霉菌菌丝体, 结果如表 1 所示。

由表 1 可见, 在我们试验条件下蜗牛酶对产黄顶孢霉菌菌丝体的细胞壁作用激烈, 菌丝体进入酶液 5min 即迅速释放原生质体, 但 1h 后随着菌丝体继续酶解, 原生质体数目大为减少, 到 2h 后相差显微镜下进行连续观察看到多个原生质体颜色逐渐变淡, 最后破裂消失, 溶液中留下少量细胞内含物。因此, 上述蜗牛酶对本实验所用菌株不是一个理想的制备原生质体的酶。在表 1 中还可以见到九个批号的纤维素酶中, 大多数批号对产黄顶孢霉菌菌丝体的细胞壁均有作用, 但酶解作用不及蜗牛酶激烈, 一般在酶解 20—30min 才开始出现原生质体, 释放量随酶解时间增加而增加, 释放的原生质体较稳定, 不易破裂。因此, 我们从中挑取破壁效果较好的 4、6、8 批作为制备产黄顶孢霉菌原生质体用的酶。不同批号的纤维素酶酶解作用有如此大的差异, 可能因为此酶是拟康氏木霉经稻草粉固体发酵生产的粗酶, 不同批号固体发酵及提取得到的粗酶内各组份含量及比例均有差异, 因而影响了酶解效果。据报道^[7]此粗酶含有果胶酶、半纤维素酶、淀粉酶和蛋白酶。

2. 不同浓度纤维素酶的酶解效果: 在筛选酶解用酶的同时, 比较了不同浓度纤维素酶的酶解效果, 结果如表 2 所示。

由表 2 可见, 适当增加纤维素酶浓度, 如增至 1%, 酶解效应较好, 原生质体释放早, 酶解 3h 后即能得到大量原生质体。因此, 本实验中取 1% 浓度纤维素酶来酶解菌丝体。

(二) 菌丝体培养时间与释放原生质体的关系

表 1 不同种类及批号的裂解酶对分离产黄顶孢霉菌原生质体的效应

Table 1 Formation of protoplasts from *Acremonium chrysogenum* with lytic enzyme of different kinds and batches

酶的种类、批号、浓度 Kinds batches and concentrations of enzyme	原生质体释放情况 Release of protoplasts				
	出现时间 Appearance of protoplasts(min)	半小时 after 0.5h	1 小时 after 1h	2 小时 after 2h	3 小时 after 3h
蜗牛酶 1% Snail digestive juice 1%	5	++	±	—	—
纤维素酶 4 批 0.5% Cellulase No. 4 0.5%	30	±	+	++	++
同上 1 批 0.5% ditto No.1		—	—	—	—
同上 3 批 0.5% ditto No.3		—	—	—	—
同上 ditto 5 批 0.5% No.5 0.5%		—	±	±	
同上 ditto 6 批 0.5% No.6 0.5%	30	±	±	++	++
同上 ditto 7 批 0.5% No.7 0.5%		—	±	±	+
同上 ditto 8 批 0.5% No.8 0.5%	30	±	+	++	++
同上 ditto 13 批 0.5% No.13 0.5%		±	±	+	++
同上 ditto 40 批 0.5% No.40 0.5%		—	—	—	+

25℃ 培养 40—48h 菌丝体, (酶解温度 25℃)

The mycelium was harvested after 40—48h in culation at 25℃,

产黄顶孢霉菌 C-A 菌株菌丝体经上述酶解而释放的原生质体在酶液内与菌丝断片混杂, 无法准确计数, 故以“+”, “++”等相对比较原生质体数量的多少。

“—”; 无原生质体/视野(物镜 40× 目镜 12.5, 相差显微镜下检查。)

Non protoplastr/field (The protoplasts were examined under a phase-contrast microscope)

“±”; 极少, 几个原生质体/视野

A few protoplasts/field

“+”; 10—20 个原生质体/视野

10—20 Protoplasts/field

“++”; 50—100 个原生质体/视野

50—100 Protoplasts/field

“+++”; >100 个原生质体/视野

>100 Protoplasts/field

表 2 不同浓度纤维素酶的酶解效应

Table 2 Lytic Effect of different Concentrations of Cellulase

酶浓度 Concentration of cellulase (%)	原生质体 释放 Protoplasts	出现时间 (min)	半小时 0.5h	1 小时 1h	2 小时 2h	3 小时 3h
0.5		30	±	+	++	++
1		20	±	+	++	+++

Patricia^[1] 报道从产黄顶孢霉菌菌丝体获得原生质体时,用摇瓶液体培养菌丝体,然后离心洗涤菌丝体,我们在固体平板上加玻璃纸培养菌丝体。影响菌丝体生长的因素有:斜面孢子新鲜程度,单孢子悬浮液浓度以及培养时间等。在采用新鲜斜面孢子和一定孢子接种量的条件下,不同年龄菌丝体释放原生质体情况如表 3 所示。

由表 3 可见,培养 24h 的菌丝体释放原生质体数量少,培养 40—48h,能释放大 量原生质体,培养时间延长至 66h,原生质体释放数量减少。与 Patricia^[1]报道结果相仿。由表 3 结果,本实验采用培养 40—48h 菌丝体作为制备原生质体材料,实验

证明,固体平板加玻璃纸培养菌丝体可以得到满意的结果,而且操作简单、方便。

(三) 菌丝体预处理与直接酶解比较

据报道,用硫醇类化合物预处理顶头孢霉菌菌丝体,可提高原生质体产量^[1,4]。我们比较了菌丝体经 0.01M DTT 预处理后再用 1% 纤维素酶酶解以及不经预处理,直接酶解的酶解效果,结果如表 4 所示。

由表 4 可见,本实验所用菌种采用 1% 纤维素酶酶解时,不须 DTT 预处理,可以直接酶解,得到大量原生质体。如经 DTT 预处理后再加入酶液,经相差显微镜检查,菌丝体迅速酶解,但原生质体数量很

表 3 不同年龄菌丝体释放原生质体情况
Table 3 Release of protoplasts at different stages of mycelial growth

菌丝体培养时间 (h) Incubation time of mycelium (h)	原生质体释放情况 Release of protoplast			
	半小时 0.5h	1 小时 1h	2 小时 2h	3 小时 3h
24	—	—	±	+
40	+	++	++	+++
48	+	++	++	+++
66	—	±	++	++

表 4 菌丝体预处理及不经预处理的酶解效果比较
Table 4 Effect of pretreatment of mycelium

实验次数 Experiment No.	预 处 理 Pretreatment	原生质体释放情况 Release of protoplasts			
		半小时 0.5h	1 小时 1h	2 小时 2h	3 小时 3h
1	+DTT	—	±	±	—
	—	±	++	+++	+++
2	+DTT	—	+	±	—
	—	+	++	+++	+++
3	+DTT	—	±	+	+
	—	±	+	++	+++
4	+DTT	—	±	+	+
	—	+	++	+++	+++

少。Anderson^[8] 认为硫醇类化合物的作用是使组成细胞壁上蛋白质的二硫键还原, 打开了蛋白质分子, 从而酶就容易进入细胞壁, 使细胞壁酶解。可能是因为不同的菌株对不同的裂解酶敏感性不同, 本实验所用菌株对纤维素酶敏感, 菌丝经 DTT 预处理后加酶, 在酶解细胞壁同时, 也酶解了与细胞壁内层紧密相连的细胞质膜, 以至溶液中原生质体数目反而较直接酶解的少, 因此, 在我们实验条件下, 预处理不能增加原生质体数量, 直接酶解方法可简化制备过程, 缩短实验时间, 减少污染机会。

(四) 原生质体的释放过程及形态观察

菌丝体进入含有 1% 纤维素酶的高渗缓冲液中, 15—20min 后, 菌丝顶部首先膨大, 形成一个小球状体(图 1), 球状体借一孔道与菌丝顶部连接, 菌丝内原生质体通过孔道不断流向球状体, 使球状体逐渐增大, 当球状体增大到一定程度, 纤细的孔道支持不住, 球状体开始晃动, 最后从孔道上脱落(图 2)。成为游离在溶液中的原生质体, 在原生质体刚脱落时, 从孔道裂口处相继释放几个一十几个较原生质体小得多的大小不等颗粒状物质, 随即分散在溶液中。有时, 一个原生质体刚刚自菌丝顶部脱落, 后面紧接着又形成一个同样大小的原生质体, 这种“匆匆形成”的原生质体很脆弱, 脱落到溶液中很快就破裂, 原生质体内含物流失在溶液中。在菌丝尖端慢慢膨大脱落的原生质体则较稳定。有时, 在菌丝中部也可同菌丝顶部同样方式释放原生质体(图 2)。

脱落的原生质体大小不一, 直径自 2.0 μm 至 1.0 μm 左右呈连续性分布(图 3)。

(五) 原生质体纯化效果观察

为了观察原生质体悬浮液经 G-2 烧



图 1 菌丝尖端开始膨大

Fig. 1 Swelling of hyphal tips ($\times 1200$)

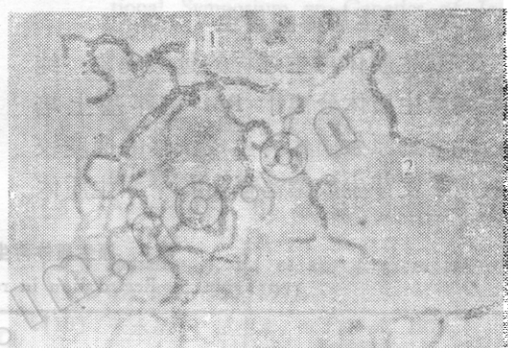


图 2 球状原生质体即将自菌丝上脱落(箭头 1)
菌丝中部形成的原生质体(箭头 2)

Fig. 2 Release of protoplasts from hyphal tips and laterals ($\times 1200$)

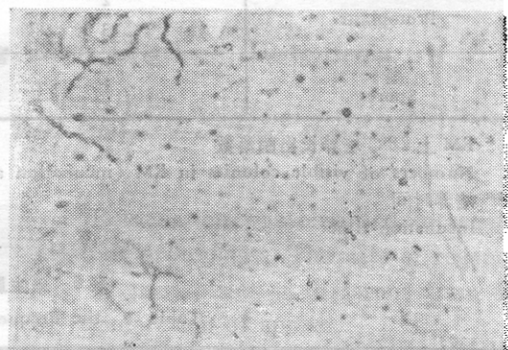


图 3 产黄顶孢霉菌原生质体, 颗粒状物质及菌丝断片

Fig. 3 The resulting mixture of harvested protoplasts, fragments of mycelium and cell inclusions in RM solution.
($\times 1200$)

结漏斗过滤及高渗透压 RM 液体三次离心洗涤后的纯化效果, 我们取部份纯化后的

原生质体悬浮液进行渗透压处理, 经过渗透压处理, 原生质体破裂, 留下未被酶解的残存菌丝断片(图 3), 它们能在 RM 培养基上形成菌落, 从而可以准确统计原生质体悬浮液中原生质体数和完整的非原生质体(菌丝断片)数。

原生质体悬浮液经过纯化和经渗透压处理后测得非原生质体形成的菌落频率为 0.10—0.51% 左右, 可认为原生质体悬浮液用本实验方法纯化后可基本上除去残留菌丝断片。

(六) 原生质体的再生

1. 原生质体再生过程的延缓现象: 纯化后的原生质体分离于 RM 培养基上培养, 观察到原生质体再生成菌落的速度较一般孢子发芽生成菌落慢, 各个原生质体

再生速度也不同, 有生长延缓现象, 观察结果如表 5 所示。

2. 原生质体再生频率:

纯化后的原生质体悬浮于高渗溶液中, 经适当稀释分离在 RM 培养基上, 25℃ 培养 15 天, 计算长出菌落数, 按上述方法统计再生频率, 结果如表 6 所示。

由表 6 可见, 原生质体再生频率约为 0.7—2.5% 左右, 不能再生的原生质体可能由于缺乏细胞核或也可能因在操作过程细胞壁渗漏而失去活力所致。

(七) 原生质体再生菌株的生产力测定

原生质体再生形成的菌落, 其菌落形态与亲株相同, 我们随机挑取同一批的再生菌落 8 株, 测定头孢菌素 C 生产能力并

表 5 原生质体再生过程的延缓现象

Table 5 Retardation in regeneration of protoplasts

接种材料 Inoculation material	实验次数 Experiment No.	长出菌落* Visible colonies(%)			
		7 天** 7 days	10 天 10 days	15 天 15 days	18 天 18 days
原生质体 Protoplast	1	68	100	100	100
	2	49.5	84	100	100
	3	80.4	100	100	100
孢子 Spores	1	100	100	100	100

* RM 上 28℃ 培养长出菌落数

Numbers of visible colonies in RM (incubation at 28℃)

** 培养时间

Incubation time

表 6 原生质体再生频率

Table 6 the Frequency of protoplasts

实验次数 Experiment No.	镜检原生质体数/ml Numbers of protoplast/ml	形成再生菌落数/ml Number of protoplast colonies	非原生质体形成菌落数 N. p. F. u.	再生频率 Frequency(%)
1	0.97×10^5	2500	0	2.5
2	1.50×10^5	3480	16	2.31
3	1.80×10^5	4220	26	2.33
4	2.77×10^5	1925	0	0.70
5	1.90×10^5	2960	3	1.55

表 7 原生质体再生菌株与亲株头孢菌素 C 生产能力的比例

Table 7 Comparison of the cephalosporin C production by protoplasts regenerated strains and parent strains

再生菌株号 Regenerated strains	1	2	3	4	5	6	7	8	亲株 Parent
发酵 5 天效价 Fermentation potency after 5 days (%)	98.0	94.2	99.4	102.0	115.0	99.0	101.0	99.4	100

发酵条件见前报道^[10]Fermentation Condition as described previously^[10]

与亲株比较,结果如表 7 所示。

由表 7 可见,产黄顶孢霉菌菌丝体释放的原生质体形成再生菌株其产量遗传性状不改变,保持了原种的生产能力。

参 考 文 献

- [1] Patricia, A., et al.: *J. Gen. Microbial.*, 79: 293—309, 1973.
- [2] Anne, J., et al.: *Arch. Microbial.*, 98: 159—160 1974.
- [3] Peberdy, J. F., *Enzyme Microb. Technol.*, 2: 23—29 1980.
- [4] Christopher, Ball. et al.: U K Patent Application GB 2021640 A 25 Apr 1979.
- [5] Hamlyn, P. F., C. Ball., In Third International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms, American Society for Microbiology Washington, D. C. 188—191, 1979.
- [6] 梁平彦等: 植物生理学报, 7(1)1—9, 1981.
- [7] 中国科学院上海植物生理研究所纤维素酶组等: 微生物学报, 18(1)27—37, 1978.
- [8] Anderson, F. B., et al.: *Biochem J.*, 99: 682—687, 1966.
- [9] Peberdy, J. F., et al.: *J. Gen. Microbial.*, 69: 325—330, 1971.
- [10] 张永昌等: 抗生素, 4(3)4—6, 1979.

STUDIES ON THE ISOLATION AND REGENERATION OF *ACREMONIUM CHRYSOGENUM* PROTOPLASTS

Zhou Qiwen Zhang Yongchang Zhou Lingzhen Hong Suqin
Li Rongxian Liu Yiping

(Institute of Antibiotic Research, The Third Pharmaceutical Plant, Shanghai)

Protoplasts can be isolated from *Acremonium chrysogenum* quite readily after treatment of mycelium with 1% cellulase obtained from *Trichoderma pseudokoningii* Rifui. *Acremonium chrysogenum* protoplasts were obtained from 40—48 h cultures grown on a cellophane agar plate at 25°C.

The cellulase released more *Acremonium chrysogenum* protoplasts after 1 to 3 h from non-pretreated mycelium than that pretreated with DTT.

Retardation was observed in regeneration of protoplasts. The rate of regeneration of protoplasts is different from that of regeneration of spores.

Reversion frequency of protoplasts is about 0.7—2.5%. The yield of cephalosporin C and morphology of colonies regenerated strains from protoplasts are the same with the parent strain.

Key words

Acremonium chrysogenum; protoplast; isolation; regeneration