

阿舒假囊酵母过量合成 核黄素性能的改良

张星元 王 琴

(无锡轻工大学生物工程学院,无锡 214036)

摘要 以 ^{60}Co 的 γ 射线为诱变剂,核黄素合成途径的中间产物的结构类似物为“筛子”,筛选了阿舒假囊酵母 (*Eremothecium ashbyii*) 的四种抗性突变株:杀结核菌素抗性突变株 (Tub^r)、2-脱氧葡萄糖抗性突变株 (2-DG^r)、8-氮杂鸟嘌呤 (8-AG^r) 和抗残液突变株。杀结核菌素抗性突变株 T30 的摇瓶核黄素产量由出发菌的 $2.5\sim 2.8\text{ mg/L}$ 提高并稳定在 3.5 mg/L 以上,经初步优化(培养基配方)后,稳定在 5.4 g/L 以上。

关键词 阿舒假囊酵母;核黄素生物合成;抗性突变株;杀结核菌素

中图分类号 TQ467.2

0 前 言

核黄素是一种重要的维生素,很多种微生物能合成核黄素^[1],但目前具有经济价值的菌种仅阿舒假囊酵母 (*Eremothecium ashbyii*) 和棉病囊霉 (*Ashbya gossypii*) 等几种。

对 *E. ashbyii* 的菌种选育,国内外已进行了多年,但大多停留在直接从产量性状来筛选的水平上,工作量大而收效甚微。作者以核黄素合成途径的中间产物的结构类似物为“筛子”来选育 *E. ashbyii* 核黄素高产突变株,不但大大缩短了育种时间,而且为核黄素的高产菌种选育提供了一条新思路。

1 材料与方法

1.1 出发菌株

饲料用核黄素喷雾干燥产品中分离出来的一株阿舒假囊酵母 (*Eremothecium ashbyii*)

1.2 培养基

1) 固体完全培养基

收稿日期: 1997-01-20

第一作者: 张星元,男,1944年 5 月出生,工学硕士,副教授

葡萄糖 10.0 g/L	蛋白胨 10.0 g/L	麦芽汁* 10.0 ml/L
玉米浆 10.0 ml/L	NaCl 1.0 g/L	KH ₂ PO ₄ 2.0 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.15 g/L	琼脂 20 g/L	pH消前 6.8
* 麦芽汁的制备按协定糖化法 ^[1] 。		

2) 固体合成培养基

葡萄糖 20.0 g/L	酪蛋白水解物 10.0 g/L	KH ₂ PO ₄ 1.0 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g/L	CaCl ₂ 0.2 g/L	生物素 100.0 μg/L
硫胺素 80.0 mg/L	肌醇 280.0 mg/L	pH消前 6.8

3) 种子培养基

与固体完全培养基 (不加琼脂) 相同

4) 发酵培养基

葡萄糖 20.0 g/L	蛋白胨 15.0 g/L	骨胶 10.0 g/L
玉米浆 10.0 ml/L	NaCl 1.0 g/L	KH ₂ PO ₄ 2.0 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.15 g/L	豆油 30.0 ml/L	pH消前 6.8

1.3 培养条件

培养温度为 28~ 30℃。试管斜面菌种培养和摇瓶振荡培养时间均为 7 d; 培养皿单菌落分离时间为 4 d 摇瓶振荡培养条件为往复式摇床 100 r/min, 振幅 8~ 10 cm, 装液量为 500 ml 三角瓶内装液 50 ml

1.4 核黄素发酵单位测定

发酵液经适当稀释后用分光光度法^[3]测定核黄素发酵单位 (mg/L)

1.5 诱变处理与诱变效果检测

将试管斜面菌种刮入无菌生理盐水, 用玻璃珠打碎后经 4 层纱布过滤, 所得的滤液用 ⁶⁰Co 的 γ 射线照射, 照射剂量 600~ 800 Gy

平板初筛: 平板上在药物纸片的抑菌圈内的菌落或药物平板上形成的菌落

摇瓶复筛: 将初筛所得的单菌落接入摇瓶, 进行核黄素产量性状的筛选

2 结 果

2.1 菌种筛选

2.1.1 抗残液突变株的筛选 残液是指在发酵培养基中发酵 7 d 的发酵液经过滤除去菌体所得的滤液。在含 90% 残液溶液配制的固体完全培养基上筛选出 44 株抗性突变株。仅 1 株菌比出发菌产量提高了 14%, 多数菌株与出发株水平相近, 少数菌株产量下降较多。说明在实验条件下从抗残液突变株中获得高产菌株的希望不大。

2.1.2 2-脱氧葡萄糖抗性突变株 (简称 2-DG^r 突变株) 的筛选 在固体完全培养基 (不含葡萄糖) 平板上涂布经诱变处理的菌液后, 贴上含 2-脱氧葡萄糖的纸片 (纸片直径 8 mm, 内含 2-脱氧葡萄糖 6 mg) 于 28℃ 恒温箱倒置培养 7 d 可以见到有明显的抑菌圈 (如图 1)

挑选在抑菌圈内形成的 2-DG^r 突变株 51 株, 结果比出发株产量提高 50% 左右的有 4 株, 占菌株总数的 11.8%; 与原种产量水平相当的有 24 株, 占菌株总数的 47.1%; 比出发株产量明显下降的有 17 株, 占菌株总数的 33.3%。见表 1

由此可见, 用 2-脱氧葡萄糖作为“筛子”来筛选核黄素高产菌株是可行的

2.1.3 8-氮杂鸟嘌呤抗性突变株 (简称 8-AG^r 突变株) 的筛选 挑选在含 8-氮杂鸟嘌呤 5 mg/L, 25 mg/L 的合成培养基上生长而形成的菌落 55 个, 摇瓶发酵, 测定核黄素产量。结果没有一株菌的产量比原种提高 10% 以上, 27% 的菌株的核黄素产量比出发株降低了 30% 以上。说明 8-氮杂鸟嘌呤在实验条件下, 对于出发菌来说, 并不是一个好“筛子”。

2.1.4 杀结核菌素抗性突变株 (简称 Tub^r 突变株) 的筛选 在合成培养基平板上涂布经诱变处理的诱变液后, 贴上含杀结核菌素纸片 (纸片直径 8 mm, 内含杀结核菌素 1 mg), 于 28℃ 恒温箱倒置培养 5 d 后, 可以见到有明显的抑菌圈出现 (见图 2)。

挑选在抑菌圈内形成的 Tub^r 突变株 44 株, 其中比出发株提高 10% 以上的菌株有 4 株, 占 9.1%。见表 2。

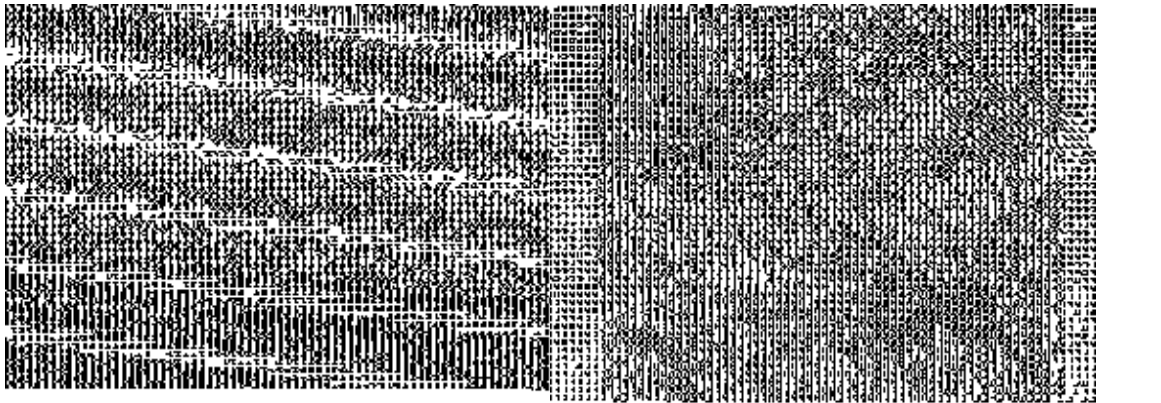


图 1 2-脱氧葡萄糖形成的抑菌圈

图 2 杀结核菌素形成的抑菌圈

2.2 高产菌株遗传稳定性的试验

D23 D32 D42 T30 菌株初筛出来, 产量都比出发株有大幅度提高, 但是将它们传代, 测其遗传稳定性, 发现 D23 D42 在两代后已恢复出发菌株的水平, T30 D32 的遗传稳定性较好, 尤其是 T30 菌。见表 3。

2.3 抗性突变株的某些性能的研究

2.3.1 D32 菌株对葡萄糖的耐受程度 出发菌株与 D32 菌株分别接种于葡萄糖含量不同的种子液中, 48 h 观察其生长情况, 结果如表 4。D32 菌株对葡萄糖的耐受程度明显高于出发菌株。因此, 可以通过筛选 2-DG^r 突变株来提高菌株对葡萄糖的耐受性。

表 2 部分 Tub^r 突变株的核黄素产量		
菌株编号	核黄素产量 / $\text{mg}^\circ \text{L}^{-1}$	突变株产量与对照产量比
对照 (原种)	2.647	100%
T3	3.097	117%
T30	5.780	218%
T32	3.331	126%
T43	3.248	123%

表 3 连续传代对 T30 菌产量的影响	
移值代数	核黄素产量 / $\text{mg}^\circ \text{L}^{-1}$
第一代	5.780
第二代	3.580
第三代	3.666
第四代	3.568
第五代	3.554

2.3.2 T30 菌对杀结核菌素、8-氮杂鸟嘌呤的抗性程度 将出发菌与 T30 菌分别接种于含不同浓度的杀结核菌素的合成培养基以及不同浓度的 8-氮杂鸟嘌呤的合成培养基,培养 7 d,观察其生长情况,结果如表 5 表 6 虽然 T30 菌是筛选出来的 Tub^r 突变株,但是它抗杀结核菌素、抗 8-氮杂鸟嘌呤的浓度均高于出发菌

表 4 出发菌株与 D32 菌株对葡萄糖的耐受性

葡萄糖质量分数	7%	10%	13%	13%	18%	20%
出发菌株	+++	有几个菌团	-	-	-	-
D32 菌	++++	++++	+++	+++	++	-

表 5 出发菌株与 T30 菌对杀结核菌素的耐受程度

杀结核菌素浓度 / $\text{mg}^\circ \text{L}^{-1}$	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7	3.0
出发菌株	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
T30 菌株	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

表 6 出发菌株与 T30 对 8-氮杂鸟嘌呤的耐受程度

8-氮杂鸟嘌呤浓度 / $\text{mg}^\circ \text{L}^{-1}$	5	10	20	30	40	50
出发菌株	+	-	-	-	-	-
T30 菌株	+	+	+	-	-	-

3 T30 菌株产核黄素发酵工艺条件的研究

由表 3 可知, T30 菌在第二代产量有所降低,但总的看来产量仍较高,因而将 T30 菌株用于摇瓶发酵条件试验。通过通风量、pH 值、接种量、碳源、油的种类等重要因子进行单因素实验,通过葡萄糖、骨胶、蛋白胨、玉米浆、豆油的五因素三水平正交试验,确定了较适合 T30 菌株发酵的工艺条件,使 T30 菌核黄素产量提高到并稳定在 5.4 mg /L 左右。

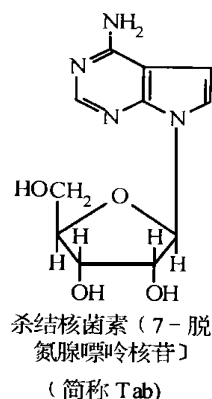
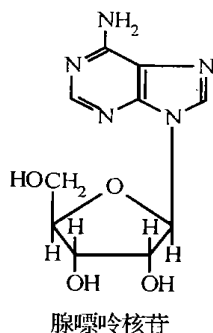
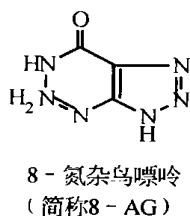
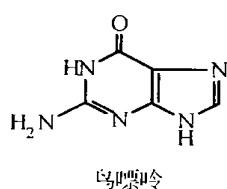
4 讨 论

核黄素是初级代谢产物中合成途径最长的产物之一, Demain^[4]称之为“准次级代谢产物”。作者筛选了 *E. ashbyii* 的四种抗性突变株。抗残液突变株及 8-氮杂鸟嘌呤抗性突变株中设没分离到核黄素产量大幅度提高的突变株,而 2-脱氧葡萄糖抗性突变株和杀结核菌素抗性突变株中出现核黄素产量大幅度提高的菌株的机率较高。

2-脱氧葡萄糖是葡萄糖的结构类似物,其对代谢的调节作用与葡萄糖相似,但代谢性能不同。2-DG^r 突变能提高菌株耐受葡萄糖能力的原因可能是: DNA 突变增强了对葡萄糖吸收和降解的能力。2-DG^r 突变株高产核黄素的原因可能是突变株的 DNA 上发生了与乙醛

酸支路的两个酶(异柠檬酸裂合酶和苹果酸合成酶)的诱导合成有关的调节突变(实为调节突变株)。进一步的研究和育种工作正在进行。

8氮杂鸟嘌呤和杀结核菌素均为嘌呤的结构类似物,但是它们的突变株在提高核黄素产量方面却出现明显的不同(见本文结果部分)。

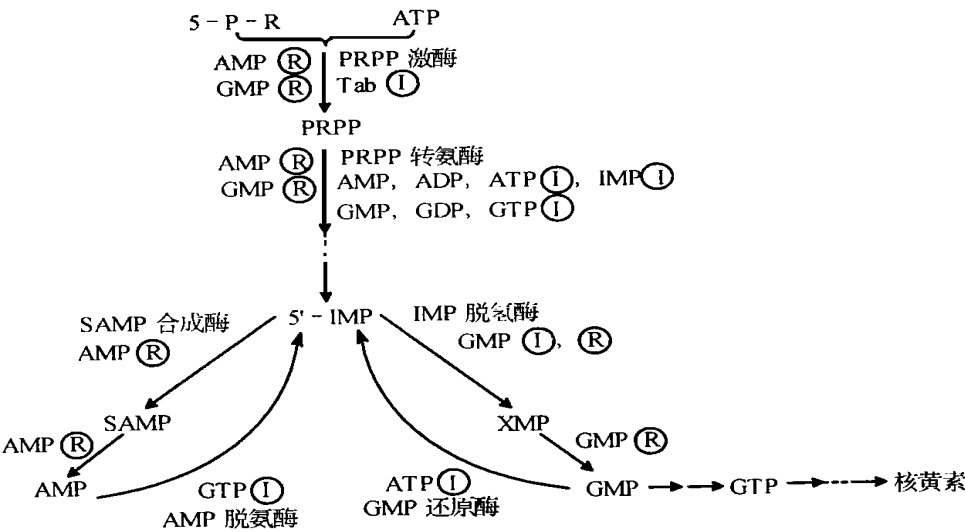


从以上分子式的比较可以看出: 8-AG⁺是鸟嘌呤的结构类似物,推测它在细胞中形成鸟苷酸的结构类似物 8-氮杂鸟苷酸; Tub⁺是腺嘌呤核苷的结构类似物,推测它在细胞内形成腺苷酸的结构类似物 7-脱氮腺嘌呤核苷酸。

田中信男^[5]曾对嘌呤核苷酸生物合成系统和化学治疗剂的作用点进行了归纳,认为 ATP 的结构类似物可影响 ATP 参与的多种反应,但对嘌呤核苷酸生物合成系统的第一步反应,即 5-磷酸核糖与 ATP 在磷酸核糖苷焦磷酸激酶(简称 PRPP 激酶)的催化合成 PRPP 和 AMP 的反应,发生的抑制作用最强。

枯草杆菌嘌呤核苷酸生物合成的调节机制已有归纳性意见:在 AMP 生物合成中关键酶 PRPP 转氨酶受 AMP 的反馈抑制,IMP 生物合成酶系和 AMP 生物合成酶系为腺嘌呤系化合物所阻遏;GMP 合成中,关键酶 IMP 脱氢酶受 GMP 反馈抑制,IMP 生物合成酶系和 GMP 生物合成酶系为 GMP 所阻遏。由 IMP 合成 AMP、GMP 两种核苷酸,倾向于优先合成 GMP^[6]。

关于阿舒假囊酵母的嘌呤核苷酸生物合成的调节机制,至今未见报导。根据以往设计育种的经验假设阿舒假囊酵母细胞中具有与药物治疗试验中采用的细菌、与枯草杆菌嘌呤核苷酸合成类同的调节机制(见图 3),并设计了 Tub⁺和 8-AG⁺两种药物抗性的“筛子”,结果单用 Tub⁺药物抗性的筛子筛得了高产核黄素的突变株,事实证明这种假设有一定的合理性。高产核黄素的 Tub⁺突变株(如 T30 菌株)可能是 PRPP 激酶、PRPP 转氨酶的调节突变株,在这样的突变株中流经 IMP 途径的碳架物质能较畅通地流向 GTP、核黄素(见图 3)。单用 8-AG⁺药物抗性的筛子筛选高产株的作用似乎不大,可能是因为出发株原来就能过量合成核黄素,鸟苷酸作为核黄素合成的前体,在本实验条件下其胞内浓度不高,并没有对 IMP 脱氢酶等酶(酶系)发生明显的抑制或阻遏;即使用此筛子筛得了对应的调节突变株,在本实验条件下仍没有出现比出发株更多地累积核黄素的现象。



图中: $\textcircled{I}$ 表抑制作用; $\textcircled{R}$ 表阻遏作用; SAMP是指腺苷酸(基)琥珀酸
图 3 阿舒假囊酵母中嘌呤核苷酸生物合成调节机制的假设

参 考 文 献

1 褚志义主编. 生物合成药物学. 上海: 上海医科大学出版社, 1991
2 管郭仪主编. 啤酒工业手册(中册). 北京: 轻工业出版社, 1982
3 黄伟坤等编著. 食品检验与分析. 北京: 轻工业出版社, 1989
4 Demain A L. Ann Rev Microbiol. 1972, 26 369~ 388
5 田中信男著. 抗菌素的作用机制: 抗菌和抗癌作用的分子生物学. 北京: 科学出版社, 1977
6 氨基酶. 核酸集谈会编. 核酸发酵. 张克旭, 杜连祥译. 北京: 轻工业出版社, 1987

Studies on Making Improvements in Riboflavin
Overproduction of *Eremothecium ashbyii*

Zhang Xingyuan Wang Qin
(Wuxi University of Light Industry)

Abstract A strain of *Eremothecium ashbyii* isolated was used as initial strain. Four kinds of resistant strains including tubercidin resistant (Tub^r), 2-deoxy-D-glucose resistant (2-DG^r), 8-azoguanine resistant (8-AG^r), and depleted media resistant mutants, have been screened after ^{60}Co r-rays treatment. Among them, T30, a tubercidin resistant mutant, produced riboflavin to the concentration of 3.5 mg/L while the initial strain 2.5~2.8 mg/L both under the conditions suitable for the latter. Riboflavin-yield could be stable at the level of about 5.4 mg/L by means of primary optimization.

Key-words *Eremothecium ashbyii*, Riboflavin biosynthesis, Resistant mutant, Tubercidin

(责任编辑: 陈 娇)