

文章编号 :1009 - 038X(2002)04 - 0347 - 03

离子注入选育高产类胡萝卜素红酵母

张鑫, 王岁楼, 陈春涛, 卫军, 陈苏前
(郑州轻工业学院 食品与生物工程系, 河南 郑州 450002)

摘要:通过离子注入 N^+ 诱发基因突变, 从而获得高产类胡萝卜素红酵母菌株 RY-3-9, 其出产率较出发菌株 RY-3 提高 76.2%, 经复筛和传代实验表明, 该高产菌株遗传性能较为稳定, 3 代平均类胡萝卜素产量提高了 74.0%、质量浓度达 10.9 mg/L.

关键词:离子注入; 类胡萝卜素; 红酵母; 诱变育种

中图分类号: Q 562

文献标识码: A

Mutation Breeding of Carotenoid-Producing *Rhodotorula* by Ions Implantation

ZHANG Xin, WANG Sui-lou, CHEN Chun-tao, WEI Jun, CHEN Su-qian

(Department of Food and Biotechnology, Zhengzhou Institute of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: *Rhodotorula* strain RY-3-9 of high-yielding carotenoids was obtained by the technology of ion implantation. The carotenoids yield of this strain was increased by 76.2% compared with that of initial strain RY-3. Its genetic quality was proved stable by experiments. The average carotenoids yield of three generations could reached 10.9 mg/L, which was increased by 74.0%.

Key words: Ion implantation; carotenoids; *Rhodotorula*; mutation breeding

以 β -胡萝卜素为代表的类胡萝卜素是一类呈黄色、橙红色或红色的多烯类化合物, 在食品、化妆品以及保健品方面具有广泛的用途^[1]. 利用红酵母发酵生产类胡萝卜素具有培养要求简单、生产周期短等优点, 是一项很有开发前景的微生物技术. 但目前报道的红酵母类胡萝卜素发酵产率均较低, 需从菌种和工艺方面进行改良^[2]. 离子注入是 20 世纪 80 年代兴起的一种材料表面处理技术, 目前已被成功地应用于农作物和微生物菌种改良等方面. 在工业微生物育种领域, 一些研究者已通过离子束改良获得了糖化酶、利福霉素、麦角甾醇等高产菌株. 据报道, 离子注入引发的突变在低剂量注入、细

胞损伤较轻的情况下发生, 因而可获得较高的突变率和较宽的突变谱^[3~5]. 作者采用 10 Kev 能量的 N^+ 束, 首次对产类胡萝卜素的红酵母进行离子注入研究, 以期筛选出类胡萝卜素的高产菌株.

1 材料与方法

1.1 菌种

类胡萝卜素产生菌(主要产 β -胡萝卜素) RY-3 红酵母(*Rhodotorula*), 作者所在实验室分离筛选.

1.2 培养基

1.2.1 斜面活化培养基 葡萄糖 2%, 蛋白胨 2%,

收稿日期 2002-01-07; 修订日期 2002-04-26.

基金项目: 河南省自然科学基金项目(994012500) 河南省杰出青年科学基金项目(9902) 资助课题.

作者简介: 张鑫(1948-), 男, 河南南阳人, 教授.

酵母膏 1% ,琼脂 2% ,自然 pH 值 ,0.1 MPa 下湿热灭菌 30 min.

1.2.2 液体种子培养基 葡萄糖 4% ,蛋白胨 1% ,酵母膏 1% ,自然 pH 值 ,每支试管分装 5 mL ,0.1 MPa 下湿热灭菌 30 min.

1.2.3 摇瓶发酵培养基 葡萄糖 4% ,蛋白胨 0.5% ,酵母膏 0.5% ,pH 6.0 ,250 mL 的三角瓶中分装 50 mL ,0.1 MPa 下湿热灭菌 30 min.

1.3 培养方法

将保藏的斜面菌种移接到斜面活化培养基上 ,28 ℃ 培养 48 h ,接 2 环于种子培养基中 ,28 ℃ 振荡 (150 r/min) 培养 12 h ,然后按 10% 接种量 (即每支试管分装 5 mL) 接摇瓶发酵培养基 1 瓶 ,28 ℃ 下振荡 (150 r/min) 培养 72 h.

1.4 分析测定方法

1.4.1 细胞生物量测定 采用培养物离心后烘干称重的方法进行^[6].

1.4.2 类胡萝卜素质量浓度测定 采用二甲基亚砷法.按预实验摸索的条件,取 2 mL 发酵液加 1 mL 二甲基亚砷于室温下破壁约 20 min ,然后加入 5 mL 丙酮萃取 30 min ,以 3 000 r/min 离心 10 min ,测定波长为 475 nm 处吸光度,按下式计算发酵液的类胡萝卜素质量浓度^[8]:

类胡萝卜素质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$) = $A_{475} V_a / 0.16 V_b$
式中, A 为 475 nm 处吸光度, V_a 为萃取液体积 (mL), 0.16 为 β -胡萝卜素摩尔消光系数, V_b 为取样发酵液体积 (mL).

1.4.3 细胞类胡萝卜素质量分数测定 先测定细胞生物量和类胡萝卜素质量浓度,然后按下式换算^[7]:

细胞类胡萝卜素质量分数($\mu\text{g}/\text{g}$) = 类胡萝卜素质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$) / 细胞生物量(g/mL)

1.4.4 残糖测定 采用 3,5-二硝基水杨酸比色法 (DNS 法)^[9].

1.5 离子注入方法

把待处理的菌株细胞均匀涂布在平板培养皿上,用无菌空气风干制成菌膜.采用能量 10 KeV、脉冲剂量 $1 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 的 N^+ 束注入红酵母 RY-3,每次连续注入 5 s,间隔 50~90 s,总剂量为 (对照)~ $7 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$,注入靶室的真空度为 $1 \times 10^{-3} \text{ Pa}$.

1.6 存活率曲线的测定

测定各剂量处理后酵母菌的存活率,绘制成存活率—剂量曲线,结果见图 1.

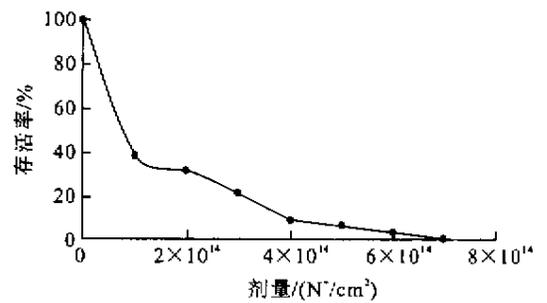


图 1 RY-3 菌株离子注入后存活曲线

Fig.1 The effect of ions implantation on strain RY-3

1.7 菌株筛选方法

将经过离子注入处理后生长良好的平板单个菌落,分别移接到斜面,28 ℃ 培养 48 h 后,挑一环接入种子培养管中,在摇床上培养 12 h,按 10% 接种量接到摇瓶发酵培养基中,于 28 ℃ 摇床 (150 r/min) 培养 72 h,测发酵液中类胡萝卜素质量浓度.筛选出产量较高的菌株,连续传 3 代发酵,选出产量高且稳定性好的菌株.

2 结果与讨论

2.1 存活率曲线

由对照平板和各剂量注入处理后的平板,在相同条件下培养后进行菌落计数绘成存活率曲线 (图 1).可以看出,菌体存活率与注入离子剂量有关,随着 N^+ 注入剂量的增大,菌株存活率降低,当注入剂量超过 $7 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 时,存活率降为零.

2.2 诱变效应统计

对各诱变剂量处理后的存活菌株进行初筛,测定类胡萝卜素质量浓度,统计突变率和正诱变率,结果见表 1 (与对照菌株相比,产物质量浓度变化在 10% 以内的菌株视为未发生突变).

表 1 N^+ 注入 RY-3 红酵母后的诱变效应

Tab.1 The mutation of RY-3 implanted by nitrogen ions

注入剂量/ (N^+/cm^2)	存活率/ %	突变率/ %	正突变率/ %
0	100	0	0
1.0×10^{14}	39	81	32
2.0×10^{14}	32	76	20
3.0×10^{14}	21	68	16
4.0×10^{14}	9	40	10
5.0×10^{14}	6	20	4
6.0×10^{14}	2	12	0
7.0×10^{14}	0	0	0

从表 1 可知,当注入剂量为 $1.0 \times 10^{14} \sim 3.0 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 时,菌种有较高的存活率、突变率及正突变率,尤以剂量 $1 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 时为高,因此,进一步诱变选用此剂量。

2.3 高产菌株的筛选

经再次离子注入诱变处理及发酵条件初步优化,最终筛选到高产类胡萝卜素的红酵母突变株 RY-3-9,结果见表 2。通过复筛及连续 3 代传代实验,表明该高产菌株的遗传性能较为稳定,结果见表 3。

表 2 RY-3-9 的筛选结果

Tab.2 The screening results of mutant RY-3-9

菌种	产量/(mg/L)	对比/%
RY-3(出发菌株)	6.0	100
RY-3-9	10.6	176.2

表 3 RY-3-9 变株的遗传稳定性实验

Tab.3 The genetic property of mutant RY-3-9

菌种	产量/(mg/L)	对比/%
RY-3(出发菌株)	6.3	100
RY-3-9 F ₁	11.2	177.8
RY-3-9 F ₂	10.9	173.0
RY-3-9 F ₃	10.8	171.4
平均	10.9	174.0

2.4 N⁺注入对红酵母生物量和类胡萝卜素质量分数的影响

从表 4 可知,N⁺注入对红酵母 RY-3 生物量无明显影响,但对菌体类胡萝卜素质量分数有明显提高作用,是发酵液中类胡萝卜素质量浓度提高的原因。

表 4 N⁺注入对 RY-3 红酵母生物量及类胡萝卜素质量分数的影响

Tab.4 The effects of nitrogen ions implantation on the cells mass and carotene content of strain RY-3

菌种	生物量/(g/L)	类胡萝卜素质量分数/(μg/g)
RY-3(出发菌株)	15.8	386.1
RY-3-9	16.2	654.3

2.5 菌株的发酵动力学规律分析

从图 2 可见,高产诱变株 RY-3-9 与出发菌株 RY-3 的发酵过程特性无差异,两菌株的糖耗与产色速度均保持平衡,只是诱变菌的耗糖速度稍慢,但产物形成更迅速,说明诱变菌株具有更强的类胡萝卜素合成能力。

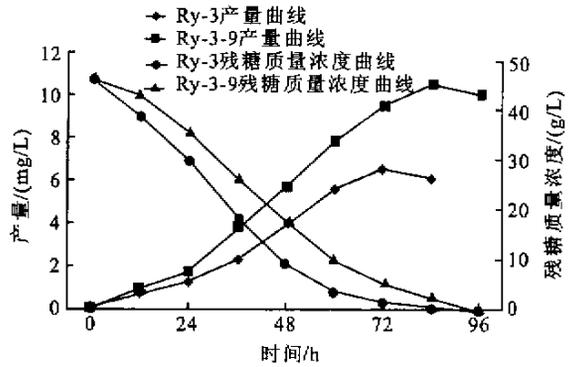


图 2 RY-3-9 和 RY-3 菌株发酵曲线

Fig.2 The fementation course of RY-3-9 and RY-3

3 结 论

采用 10 Kev 低能 N⁺注入产类胡萝卜素红酵母,经筛选获得高产菌株 RY-3-9,其产率较出发菌株 RY-3 提高 76.2%,且传代性能稳定。这表明,低能 N⁺注入对产类胡萝卜素的红酵母菌株具有良好的诱变效果,可使其发生可遗传的变异。

参考文献:

[1] 姜文侯,单志萍,孟好等.β-胡萝卜素的应用、市场和天然型产品的发酵法生产[J]. 食品与发酵工业,1994(3):65-71.
 [2] 王岁楼.利用红酵母发酵生产β-胡萝卜素的研究进展[J]. 微生物学杂志,2000,20(2):41-43.
 [3] 蒋海波,王纪,姚建铭等.离子注入麦角甾醇酵母选育研究[J]. 工业微生物,2000,30(2):1-3.
 [4] 陈祖华,叶晴,尹光琳.N⁺离子注入热带假丝酵母对长链二元酸产量的影响[J]. 微生物学通报,2000,27(3):174-177.
 [5] 许安,姚建铭,余增亮.离子注入改良Vc₂步发酵混合菌研究[J]. 工业微生物,1998,28(4):21-24.
 [6] 王岁楼,卫军,陈春涛等.红酵母类胡萝卜素发酵研究[J]. 郑州轻工业学院学报,2000,15(2):3-7.
 [7] 王岁楼,张鑫,张平之.红酵母类胡萝卜素提取方法研究[J]. 食品与机械,2000(6):30-31.
 [8] DAVIES B H. Carotenoid[A]. GOODWIN T W. Chemistry and biochemistry of plant pigments[C]. New York: Academic Press, 1996. 116-117.
 [9] 钱铭镛. 发酵工程最优化控制[M]. 南京:江苏科技出版社,1998. 306-307.