

曲酸生产菌的复合诱变选育*

沈卫荣 沈 俭 韩丽萍 江 莹 万 一 陈 锐

(陕西省微生物研究所 西安 710043)

摘要:以黄曲霉(*Aspergillus flavus*.)为出发菌株,经3次紫外线、1次⁶⁰Co、3次亚硝基胍多重复合诱变处理,选育获得曲酸生产菌UCN₇-17,配以最佳培养条件,发酵7d,曲酸产量由原来的0.926%,提高到6.3%。实验证明采用多因子复合诱变,能有效改变菌株对诱变因素敏感性,提高变异率,逐步提高突变株的产酸水平。

关键词:曲酸,复合诱变,突变株

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2003)04-0060-05

COMPOUND MUTATION BREEDING OF KOJIC ACID PRODUCTION STAIN

SHEN Wei-Rong SHEN Jian HAN Li-Ping JIANG Ying WAN Yi CHEN Rui

(Shanxi Microbiology Research Institute, Xi'an 710043)

Abstract: mutant (UCN₇-17) of producing high-yield Kojic acid was screened from *Aspergillus flavus* after treated with UV three times, γ -ray of ⁶⁰Co one time and NTG four times, under optimal conditions, the Kojic acid production level reached up to 6.3% after 7 days, compared with original strain's 0.926%. The experiments showed that compound mutation using various mutagenic agents can alter the original strain's sensitivity to mutagenic agents, increase mutation frequency and raise Kojic acid yield.

Key words: Kojic acid, Compound mutation, Mutant

曲酸(Kojic acid),化学名称 α -羟甲基-5-羟基- γ -吡喃酮,是与葡萄糖分子结构相似的弱酸性化合物,可由微生物利用淀粉糖好氧发酵产生^[1]。曲酸及衍生物目前在国外已广泛用于食品的抗菌防腐剂;果蔬、鲜切花、菇类、肉制品、水产品抗氧化护色剂;美白化妆品的增白祛斑功能基料。此外,曲酸也是生产头孢类抗生素的中间体;生产对人畜无毒,无公害农药杀虫剂的原料;用作铁分析试剂;胶片去斑剂等^[2,3]。故在食品、化妆品、医药、农业、化工等行业有较广泛的应用前景。

20世纪90年代以来,国内外曲酸发酵生产研究日趋增多,并取得了一定进展^[4-6]。本文介绍了运用紫外线(UV),⁶⁰Co,亚硝基胍(NTG)复合诱变育种技术,选育获得曲酸生产菌UCN₇-17,该突变株配以优化发酵培养条件,发酵7d,曲酸产量由原来的0.926%达到6.3%,该突变株遗传特性稳定,发酵液不含黄曲霉毒素。

1 材料与方法

1.1 菌株

黄曲霉(*Aspergillus flavus*),由本所菌保中心提供,编号C-527。

* 陕西省重大攻关课题资助项目(No.9704101)

收稿日期:2002-09-13,修回日期:2002-11-15

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基: 葡萄糖 30g, 硝酸钠 2g, 磷酸氢二钾 1g, 氯化钾 0.5g, 硫酸镁 0.5g, 硫酸亚铁 0.01g, 酵母膏 1g, 琼脂 20g, 定容至 1L, pH 6.0。

1.2.2 鉴别培养基: 斜面培养基 1.2.1 中另加去氧胆酸钠 0.3g, 三氯化铁 1g。

1.2.3 发酵培养基: 培养基 1.2.1, 改葡萄糖加量 120g ~ 130g, 磷酸调 pH 至 3.0, 不加琼脂。

1.3 摇瓶发酵实验

500 mL 三角瓶, 培养基 1.2.3 装量 100mL, 接种 1 接种环培养 5d 测试菌孢子, 往复式摇床摇瓶培养, 振幅 6cm, 频率 70 次/min, 发酵温度 31℃。

1.4 测定方法

曲酸含量测定: 参考 Ronald Bentley 方法^[7]。

红糖测定: 采用费林滴定法测还原糖。

1.5 诱变条件与方法

1.5.1 孢子悬液制备: 培养 5d 的斜面菌种, 用 pH 6.2, 0.2mol/L 磷酸缓冲液或生理盐水洗下孢子, 经玻璃珠打散, 镜头纸 8 层过滤, 制成含孢子 10^6 /mL 孢子悬液。

1.5.2 紫外线诱变: 取 10mL 孢子悬液于 9cm 平皿中, 磁力搅拌, 15W 紫外灯 30cm 处照射 5 ~ 20min。

1.5.3 ^{60}Co 诱变: 10mL 孢子悬液于无菌试管中, 分别以 4 万, 6 万伦琴进行 ^{60}Co 照射处理。

1.5.4 亚硝基胍 (NTG) 诱变: 用 pH 6.2、0.2mol/L 磷酸缓冲液分别制成的孢子悬液于同样磷酸缓冲液的 NTG 液等量混合。分别以 0.25, 0.5, 1.0mg/mL NTG 浓度, 30℃ 温度 20min 处理, 稀释法终止反应。

1.5.5 突变株分离: 上述各诱变处理的菌悬液, 取 0.1 mL 涂布于鉴别培养基平板上 30℃ 培养 3d (紫外线诱变平板避光培养), 挑取显红色单菌落于斜面培养基上, 培养 4d 后, 摇瓶发酵筛选。

1.6 黄曲霉毒素检测

黄曲霉毒素 B_1 测定, 委托陕西省卫生防疫站检测。

2 结果与讨论

2.1 曲酸生产菌出发菌株的选择性分离筛选

据文献报道, 曲霉属中某些种能利用葡萄糖好氧发酵产生曲酸。选用本所保藏的各类曲霉 41 株, 中国工业微生物菌种保藏中心曲霉 4 株, 利用 Fe^{3+} 离子与曲酸络合反应可生成红色物质的特性在鉴别培养基上进行初筛, 选出显色快、色斑大的菌株进行摇床发酵筛选。并测其曲酸含量。最终选出产酸 0.926% 的 C-527 (*Aspergillus flavus*) 为出发菌株。

2.2 曲酸生产菌的诱变选育

2.2.1 紫外线对曲酸生产菌的诱变效应: 以 C-527 作出发菌株, 以 5 ~ 20min 不同剂量进行第 1 轮照射, 共挑取菌 156 株, 经摇瓶复筛后, 获得产曲酸在 2% 以上的菌株 37 株, 其中 15min 剂量组的 U_1 -3 产酸达 2.81%, 以 U_1 -3 为出发菌, 用 16min 剂量进行第 2

轮紫外线照射诱变处理, 同样操作, 挑菌 130 株, 后经初复筛, 获得高于此轮出发菌产酸水平的突变株 16 株, 其中 U_2-99 产酸达 3, 31%。以该突变株为出发菌进行第 3 轮紫外线诱变, 获得初筛菌 143 株, 其中高于 U_2-99 产曲酸水平的 20 株, 编号为 U_3-68 的菌株产酸达 3.41% (表 1)。

表 1 曲酸生产菌紫外线诱变结果

诱变代数	出发菌	诱变时间 (min)	致死率 (%)	挑菌数 (株)	正变率 (%)	代表株	产酸 (g/100mL)
第 1 轮	C-527	5	89.0	60	35.0	U_1-13	2.76
						U_1-16	2.53
						U_1-17	2.53
						U_1-22	2.52
		10	96.0	42	37.5	U_1-29	2.87
						U_1-36	2.75
						U_1-41	2.79
						U_1-44	2.80
		15	99.0	34	46.7	U_1-3	2.81
						U_1-7	2.65
						U_1-8	2.63
						U_1-6	2.73
		20	99.6	45.8	5	U_1-47	2.65
						U_1-50	2.05
						U_1-51	2.45
						U_1-52	2.40
第 2 轮	U_1-3	16	99.1	130	12.3	U_2-99	3.31
						U_2-50	3.30
						U_2-50	3.29
						U_2-85	3.25
第 3 轮	U_2-99	15	99.0	143	14.0	U_3-63	3.36
						U_3-64	3.36
						U_3-42	3.32
						U_3-68	3.41

从表 1 可看出, 在第 1 轮紫外线诱变的不同剂量中, 均有较为理想的诱变效果, 产酸提高率较高。其中 10min 组 U_1-29 达 2.87%, 15min 剂量组的 U_1-3 产酸达 2.81%。分别比出发菌 C-527 提高了 210%、203%。而在后两轮的紫外诱变比其出发菌分别提高了 17.8% 和 3.02%, 虽然 U_3-68 的产酸水平较 C-527 已提高了 268.3%, 但后两轮的诱变效果明显降低, 原因可能是经数次诱变后, 突变株对紫外线的敏感性降低, 故应考虑采用其它诱变因子, 以进一步提高诱变效应。

2.2.2 ^{60}Co 诱变对曲酸生产菌的诱变效应: 用紫外线诱变突变株 U_3-68 为出发菌, 以 4 万伦琴、6 万伦琴 ^{60}Co 剂量照射处理, 摇瓶初复筛, 获得正突变株 51 株, 其中 UC_4-48 突变株产曲酸为 3.5%, 曲酸产量增加不多 (表 2), 分析其原因, 可能是经过多次紫外诱变处理的菌株对辐射物质的物理诱变敏感性降低和 ^{60}Co 剂量偏低。

2.2.3 亚硝基胍 (NTG) 对曲酸生产菌的诱变效应: 以突变株 UC_4-48 为出发菌株, 用不同剂量的 NTG 进行第 1 轮诱变处理, 经初复筛 选出产曲酸 3.5% 以上突变株 79 株 (表 3)。从表 3 可看出, NTG 作为一种较强的化学诱变剂, 对经 UV、 ^{60}Co 多重诱变处理

表 2 曲酸生产菌⁶⁰Co 诱变结果

出发菌 (编号)	剂量 (伦琴)	致死率 (%)	挑菌数 (株)	正变率 (%)	代表株	曲酸 (g/100mL)
U ₃ -68	4 万	88.23	279	3.94	UC ₄ -124	3.44
					UC ₄ -191	3.48
					UC ₄ -200	3.46
					UC ₄ -48	3.50
U ₃ -68	6 万	95.04	243	16.46	UC ₄ -269	3.48
					UC ₄ -279	3.47

的突变株来说, 在 0.5 ~ 1.0mg/mL 剂量范围可取得理想的诱变效果, 选择 0.5mg/mL NTG 诱变剂量继续下两轮的诱变选育, 最终选出 UCN₇-17 和 UCN₇-12, 发酵产曲酸分别达 6.133%、6.01%, 进一步对 UCN₇-17 菌株进行摇瓶发酵条件试验, 该菌株在 13% 的葡萄糖, 31℃条件下, 摇瓶培养 7d, 产曲酸达 6.3%。

表 3 NTG 诱变突变株产曲酸结果

诱变轮数	出发菌	剂量 (mg/mL)	致死率 (%)	挑菌数 (株)	正变率 (%)	代表株	产酸 (g/100mL)
第 1 轮	UC ₄ -48	0.25	98.0	83	30.12	UCN ₅ -14	4.4
						UCN ₅ -21	3.73
						UCN ₅ -29	3.91
		0.5	98.5	80	51.25	UCN ₅ -84	4.47
						UCN ₅ -104	4.25
						UCN ₅ -116	4.35
		1.0	99.7	37	35.14	UCN ₅ -171	4.16
						UCN ₅ -180	4.03
						UCN ₅ -192	3.94
第 2 轮	UCN ₅ -84	0.5	98.9	50		UCN ₆ -2	5.26
第 3 轮	UCN ₆ -2	0.33	98.7	70		UCN ₆ -10	5.18
						UCN ₇ -17	6.133
						UCN ₇ -12	6.01

2.2.4 各代表突变株与亲株间产曲酸比较: 在曲酸生产菌诱变选育中, 采用紫外线、⁶⁰Co, 亚硝基胍复合诱变处理技术, 选育的高产菌 UCN₇-17 较曲酸出发菌 C527 提高约 5.5 倍 (表 4)。在微生物诱变育种中, 经常存在着突变株对单一诱变剂钝化的情形, 所以突变株产量的提高, 不但要靠多代诱发突变, 而且需使用多种诱变因子诱变处理, 才能在改变突变株对诱变剂敏感性的基础上, 经逐渐积累, 选育出高产的突变菌株。

2.3 曲酸生产菌突变株的遗传稳定性

为了观察曲酸生产菌 UCN₇-17 的遗传稳定性, 进行了菌种传代产酸性能试验。结果证明 UCN₇-17 在选定的摇瓶发酵培养条件下, 经传 5 代产酸均在 6.3% 左右, 其性能稳定, 可以在中试生产上应用。

2.4 曲酸样品分子结构分析

由 UCN₇-17 菌株发酵液提取得曲酸精制样品, 经西北大学化学系用 EQUINOX55 型傅立叶红外光谱仪, 进行 KBr 压片分子结构分析, 其分子结构与日本产标准曲酸完全一致。

2.5 黄曲霉毒素检测

出发菌株 C527 和选育的曲酸生产菌 UCN₇-17 菌株的发酵液, 经陕西省卫生防疫站检测, 均不含黄曲霉毒素。

表4 曲酸生产菌诱变选育系谱与曲酸产量比较

菌号	诱变因素	代数	曲酸产量 (g/100mL)	提高率 (%)
CS27		亲代	0.926	
U ₁ -3	UV	I	2.81	203.46
U ₂ -99	UV	II	3.31	257.45
U ₃ -68	UV	III	3.41	268.25
UC ₄ -48	⁶⁰ Co	IV	3.5	277.97
UCN ₅ -84	NTG	V	4.47	
UCN ₅ -84	条件培养	V	4.97	436.72
UCN ₆ -2	NTG	VI	5.26	468.03
UCN ₇ -17	NTG	VII	6.133	
UCN ₇ -17	条件培养	VII	6.30	580.35

3 结论

本研究以黄曲霉 C-527 为出发菌, 采用 UV、⁶⁰Co、NTG 复合诱变育种技术, 选育的曲酸发酵高产菌株 UCN₇-17, 其产曲酸水平比出发菌有大幅度提高, 说明常规诱变育种仍是有效可行的微生物育种手段, 然而单因子诱变筛选突变株效果不甚理想, 通过多因子, 不同剂量

复合诱变, 可改变菌株对诱变剂的敏感性, 提高变异率。如果再适时地调整优化发酵培养条件, 使突变株获得最佳的营养与环境条件, 能有效的减少常规诱变育种工作量, 提高选育效果。

参考文献

- [1] 陈陶声. 有机酸发酵生产技术. 北京: 化学工业出版社, 1991. 232 ~ 236.
- [2] 特开昭: 平 1-132502; 特开昭: 平 2-4001; 特开昭: 昭 62-224267; 特开昭: 昭 61-38466.
- [3] 陶文沂, 孙 微, 许正宏, 等. 中国食品添加剂, 2000, 2: 26 ~ 31.
- [4] 邓铁霞, 涂提坤, 黄登禹, 等. 天津微生物, 1995, 2: 1 ~ 6.
- [5] 裴疆森. 食品与发酵工业, 1997, 23 (1): 11 ~ 14.
- [6] 孙 微, 陶文沂. 微生物学通报, 1997, 24 (5): 274 ~ 277.
- [7] Bentle R. Methods in Enzymology (Vol. III), S.P.Colowick and N.O.Kaplan ed, 1937, 238 ~ 241.