

# 产核黄素阿舒假囊酵母的诱变效果及添加小米、肌醇的增产效果

李明南\* 唐月薇 周昭然 徐维东

(广州市微生物研究所, 广州)

**摘要** 用亚硝基胍和紫外线对产核黄素阿舒假囊酵母 2.1197 进行诱变处理, 其核黄素发酵单位从 3720  $\mu\text{g}/\text{ml}$  提高到 4660—6492  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 提高幅度为 25.3—74.5%; 用紫外线和氮激光处理, 提高 62.3%; 用红外线二氧化碳激光处理, 提高 39.7%。在该菌摇瓶发酵培养基中添加小米粉 1%, 发酵单位提高 9.78%, 添加 1% 小米粉和 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的肌醇, 发酵单位提高 16.84%。

**关键词** 阿舒假囊酵母; 诱变育种; 核黄素发酵

常规诱变育种方法是提高发酵法生产核黄素的有效途径之一。激光诱变育种技术在微生物诱变育种中的应用, 近年来也引起了人们的注意<sup>[1]</sup>。据报道, 小米和肌醇等对提高核黄素发酵单位有促进作用。本文报道用亚硝基胍、紫外线、氮激光、红外线二氧化碳激光对产核黄素阿舒假囊酵母 2.1197 进行诱变处理, 以及在该菌的摇瓶发酵培养基中添加小米粉和肌醇, 试验结果表明对提高核黄素发酵单位都有较明显的促进作用, 现将试验结果报告如下。

## 材料与方 法

### (一) 菌种

阿舒假囊酵母 (*Eremothecium ashbyii*) 2.1197。

### (二) 培养基组成(%)

#### 1. 基础培养基

M<sub>1</sub> 培养基: 麦芽糖 1, 葡萄糖 1, 蛋白胨 1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.015, NaCl 0.2, 琼脂 2.5, pH 6.7。

M<sub>2</sub> 培养基: 麦芽糖 4, 玉米浆 3, 骨胶 3, 糠油 5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1, CaCl<sub>2</sub> 0.1, NaCl 0.2, pH 6.7。

#### 2. 改良培养基

M<sub>3</sub> 培养基: M<sub>2</sub> 培养基加小米粉 1g 和肌醇 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

M<sub>4</sub> 培养基: M<sub>2</sub> 培养基加小米粉 1g。

M<sub>1</sub> 培养基用于试管斜面菌种培养和培养皿单菌落分离培养。M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> 培养基用于摇瓶振荡培养以测定核黄素发酵单位。灭菌条件均为 1.1kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 30 分钟。

### (三) 培养条件与核黄素发酵单位测定

培养温度均为 28—30℃。试管斜面菌种培养和摇瓶振荡培养时间均为 9 天; 培养皿单菌落分离培养时间为 4 天。摇瓶振荡培养(旋转式摇床转速为 200r/min, 偏心距为 2.8cm)的发酵液用氧化还原法测定其核黄素发酵单位( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。摇瓶为 500ml 三角瓶。

### (四) 诱变处理与诱变效果检测

1. 亚硝基胍和紫外线复合诱变处理: 按微生物诱变育种的常规方法进行<sup>[2]</sup> 先用 pH 6.8 磷酸盐缓冲液将培养成熟的试管斜面菌种洗下菌体, 制成孢子悬浮液(孢子密度约为 100 万/ml); 然后用亚硝基胍(2mg/ml 处理 60 分钟)和紫外线(功率为 15W, 波长为 2600 Å, 照射距离为 30cm, 照射时间为 20 秒钟)进行复合诱变处理; 最后用 pH 6.8 磷酸盐缓冲液稀释 20 倍以终止反应。

广州第六制药厂陈婉英、卢顺基参与激光诱变育种试验。

\* 现工作单位: 广州仲恺农业技术学院农产品加工系。

2. 紫外线氮激光诱变处理: 用无菌生理盐水将培养成熟的试管斜面菌体制成孢子悬浮液, 将滤纸片浸泡于孢子液中, 然后将吸饱于滤光纸片上的孢子用紫外线氮激光(由 NJ-1 型氮激光器发射, 功率为 400kw, 波长为 3371 Å, 脉冲为 13—15 次/秒, 电压为 10.5kv, 照射距离为 30 cm, 照射处理时间为 30 秒钟)进行处理后, 将其浸泡于无菌生理盐水中洗脱下来进行培养。

3. 红外线二氧化碳激光处理: 将上述的吸饱于滤纸片上的孢子用红外线二氧化碳激光(由 CO<sub>2</sub> 激光器发射, 辐射功率密度为 15W/cm<sup>2</sup>, 波长为 10600 Å, 照射距离为 28cm, 照射时间为 1 秒)进行处理后, 将其浸泡于无菌生理盐水中洗脱, 置平板培养基上培养。

选取优良菌落的目测指标: 金黄色较深, 菌落较厚, 菌落边缘较整齐, 表面较光滑, 皱折较少等特征。单菌落选择后转接斜面培养, 进行发酵培养液复筛, 取其中发酵单位最高者作为优良菌株的最后筛选指标。优良菌株再重复进行诱变选育。

## 结果与讨论

### (一) 亚硝基胍和紫外线的诱变效果

在本试验中, 出发菌株 2.1197 经亚硝基胍和紫外线复合诱变处理后, 其突变菌株的第一代至第五代(每经一次试管斜面菌种培养→培养皿单菌落分离与挑选优良菌落→摇瓶振荡培养与核黄素发酵单位测定等过程为一代)的核黄素发酵单位从 3720 单位提高到 4660—6492 单位, 提高幅度为 25.3—74.5%(表 1)。试验结果表明突变菌株的发酵单位提高幅度较大而且逐代不断上升, 高产性状比较稳定, 这表明亚硝基胍和紫外线对该菌的复合诱变处理可出现协同效应, 因而可提高诱变效果。

### (二) 激光的诱变效果

在本试验中, 出发菌株 2.1197 经紫外线氮激光照射处理后, 其突变菌株的核黄素发酵单位从 3822 单位提高到 6204 单位, 提高幅度为 62.3%(表 2); 经红外线二氧化碳激光处理后,

表1 亚硝基胍和紫外线对2.1197菌株的诱变效果

突变菌株	核黄素发酵单位	
	发酵单位数 (μg/ml)	提高百分率 (%)
第一代突变株 Nu 103	4660	25.3
第二代突变株 Nu 202	5620	51.1
第三代突变株 Nu 301	5760	54.8
第四代突变株 Nu 401	5660	52.2
第五代突变株 Nu 501	6492	74.5

出发菌株发酵单位为 3720 μg/ml

表2 激光对2.1197菌株的诱变效果

诱变剂 \ 突变菌株		核黄素发酵单位	
		发酵单位数 (μg/ml)	提高百分率 (%)
紫外线氮激光	Ln 101	6204	62.3
	Ln 104	5340	39.7
	Ln 103	5064	32.5
红外线二氧化碳激光	Lc 101	5340	39.7
	Lc 105	5340	39.7
	Lc 103	5271	37.9
亚硝基胍和紫外线氮激光	NLn 103	4002	4.7
	NLn 107	3354	
	NLn 102	3006	
亚硝基胍和红外线二氧化碳激光	NLc 102	3570	
	NLc 104	3282	
	NLc 101	3075	

出发菌株发酵单位为 3822 μg/ml

其核黄素发酵单位从 3822 单位提高到 5340 单位, 提高幅度为 39.7%(表 2)。试验结果表明, 紫外线氮激光及红外线二氧化碳激光对该菌的诱变效果比较显著。经亚硝基胍(2mg/ml 处理 60 分钟)和紫外线氮激光(照射处理 5 分钟)的诱变处理, 以及经亚硝基胍(2mg/ml 处理 60 分钟)和红外线二氧化碳激光(照射处理 3 秒钟)的诱变处理, 其突变菌株的核黄素发酵单位多低于出发菌株(表 2)。试验结果表明, 诱变处理剂量过大, 会使细胞染色体畸变或基因突变可能过于剧烈, 因此突变菌株多为负变型。

### (三) 添加小米粉和肌醇的增产效果

在本试验中, 采用 M<sub>1</sub> 培养基, 其核黄素发

表 3 添加小米粉和肌醇的增产效果

发 酵 结 果 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	批次	I	II	III
$M_2(\text{CK})$		4080	5173	4340
$M_4$		4767	5873	4807
比 $M_2$ 提高(%)		16.8	13.5	10.8
$M_2(\text{CK})$		5110	4700	5300
$M_1$		5610	5000	5620
比 $M_2$ 提高(%)		9.8	6.4	6.04

每批次均选出 3 株最高发酵单位平均值

酵单位可提高 10.76—16.84%；采用  $M_1$  培养基,其发酵单位可提高 6.04—9.78%(表 3)。试验结果表明,小米及肌醇对产核黄素阿舒假囊酵母 2.1197 的核黄素生物合成有较明显的促进作用,增产效果明显,这在核黄素发酵生产中有实用意义。

### 参 考 文 献

- [1] M. L. 沃尔巴什特: 激光在医学和生物学中的应用,刘普和译,科学出版社,北京,1975年。
- [2] 中国科学院微生物研究所《微生物诱变育种》编写组: 微生物诱变育种,科学出版社,北京,1973 年。