

三孢布拉氏霉生物合成 β -胡萝卜素的研究

I. 三孢布拉氏霉负菌优良菌株 SCB201 的选育

任双喜 尹光琳

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海 200233)

摘要 采用紫外照射、亚硝基胍(NTG)和离子束综合诱变处理, 获得一株三孢布拉氏霉负菌优良菌株 SCB201。在优化了的培养条件下, 它与三孢布拉氏霉正菌 SCB200 接合培养产 β -胡萝卜素达到 2g/l, 较其亲株 0.2g/l 的水平提高了 10 倍。

关键词 三孢布拉氏霉, β -胡萝卜素, 诱变, 正交实验, anova / manova

分类号 Q936

β -胡萝卜素是类胡萝卜素家族的主要成员之一, 具有重要的生理意义。它不仅是维生素 A 的前体, 而且近年来的研究发现, 它可以保护机体组织免受氧自由基和自由射线的毒害作用^[1]。人类许多疾病均与体内氧自由基增高有关^[2], 如肿瘤、心血管病、白内障、光敏性疾病、老年痴呆等。 β -胡萝卜素被认为是预防这些疾病的有力武器^[3]。

许多绿色植物、某些藻类(如盐藻)、真菌、蓝细菌和光合细菌都能合成 β -胡萝卜素, 其中三孢布拉氏霉菌具有 β -胡萝卜素含量高, 易于培养, 便于遗传操作和实现工业化生产等优点。早在本世纪 60 年代, 国外许多公司和研究单位就分离到了能够产生 β -胡萝卜素的正、负菌株, 并对其生理代谢、遗传特征进行深入研究。由于三孢布拉氏霉菌主要以多核体的形式存在, 容易退化。因此, 选育遗传性状稳定的高产菌株具有重要意义。

对三孢布拉氏霉负菌, 在采用传统的诱变(紫外、亚硝基胍)处理的同时, 还采用了离子束注入诱变技术。离子束是一种物理诱变的手段, 它通过提供高能量对基因和染色体产生一定效应, 除了引起点突变以外, 还引起染色体的倒位、易位、缺损、重组和其它畸形变化。

1 材料与方法

1.1 菌株

将收集到的三孢布拉氏霉菌(*Blakeslea trispora*)菌株经比较实验, 选出生长迅速且稳定的菌株, 并经诱变改良得到正菌株 SCB200; 与之搭配能够产 β -胡萝卜素的三孢布拉氏霉菌作为负菌株 N-1; SCB201 为本研究所得的优良菌株。

1.2 培养基

PDA 培养基^[4]。

种子培养基(%): 黄豆粉 3, 玉米浆 0.2, KH_2PO_4 0.05, 维生素 B_1 2mg/l, $1 \times 10^5 \text{Pa}$ 灭菌 15min。

发酵培养基(%): 玉米粉 2, MnSO_4 0.02, 维生素 B_1 0.5mg/l, 异维生素 C 0.5, 其他成分采用本文优化配方, pH6.5, $0.55 \times 10^5 \text{Pa}$ 灭菌 30min。

1.3 菌种诱变程序

出发菌株 N-1 → 单孢分离 → 紫外处理 → NTG 处理 → 离子束处理 → 培养条件优化 → 优良菌株 SCB201。

1.4 发酵方法

表1 $L_{16}(4^1 \times 2^{12})$ 正交实验的因子及水平安排

水平	棉籽饼粉	棉籽油	豆油	葡萄糖	水平	棉籽饼粉	棉籽油	豆油	葡萄糖
	A(%)	B(%)	C(%)	D(%)		A(%)	B(%)	C(%)	D(%)
1	2	2	2	1	3	4	—	—	—
2	3	3	3	2	4	5	—	—	—

表2 $L_{16}(4^1 \times 2^{12})$ 正交实验的表头设计

列号	1'	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
因子	A	B	—	—	—	C	—	—	—	D	—	—	—

将正负菌株分别培养获得种子,然后以一定的比例接入发酵培养基,26℃振荡培养4~6d.

1.5 发酵条件的优化

首先确定三孢布拉氏霉正、负菌株结合培养的最适接种比例,再经正交实验法确定最佳培养条件.

在发酵培养基基本组成成分的基础上,采用正交实验进一步考察其他因素对β-胡萝卜素产量的影响.

为了在正交表 $L_{16}(2^{15})$ 中安排一个4水平的因子,对其进行如下改造,将1、2、3列按(1,1,1)→1、(2,2,2)→2、(2,1,2)→3、(2,2,1)→4合并为1'列,其他列保持不变,得到一张新的正交表 $L_{16}(4^1 \times 2^{12})$. 利用该正交表设计实验考察棉籽饼粉、棉籽油、豆油及葡萄糖四个因子和因子之间的交互作用对β-胡萝卜素产量的影响(表1、表2).

1.6 β-胡萝卜素的测定

β-胡萝卜素标准曲线的确定:以正己烷为溶剂,将β-胡萝卜素配制成0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0μg/ml的浓度梯度,测定450nm处OD值,并作线性回归.

β-胡萝卜素含量的测定:发酵液经离心或纱布过滤并去除水分得到三孢布拉氏霉菌丝体,研磨破细胞后用正己烷充分抽提,测定OD₄₅₀.

2 结果与讨论

2.1 三孢布拉氏霉负菌的诱变及筛选

2.1.1 突变菌株的筛选:三孢布拉氏霉菌在

PDA培养基上生长旺盛,菌丝体大量蔓延,给分离和筛选造成困难.我们在这方面进行了较为深入的研究,采用适当的培养方法,使三孢布拉氏霉菌形成单菌落,克服了菌种筛选和分离的困难,大大减少了工作量.

2.1.2 三孢布拉氏霉负菌的诱变:将负菌N-1于PDA斜面或平板26℃培养约7d后,收集孢子,用磷酸缓冲液制备孢子悬液(1×10^6 /ml).将孢子悬液经紫外照射处理0.5、1、2min,置暗处约1~2h,涂布平板.26℃培养6~14d,挑选深黄色的单菌落,得到了菌株I、II、III.

所得突变株II按上述方法制备 1×10^6 /ml的孢子悬液,加入NTG至20μg/ml,缓慢振荡处理15min.以无菌水洗涤三次,涂布平板,26℃培养6~14d,挑选深黄色的单菌落,得到菌株IV.

突变株IV孢子悬液经60KevN⁺离子束注入处理后,筛选得到能形成深黄色菌落的突变株三孢布拉氏霉负菌SCB201.

2.2 正负菌接种比例的确定

将三孢布拉氏霉正菌与负菌种子按1:5、1:10、1:20、1:40的比例混合,以5%~10%的接种量接入发酵培养基,26℃振荡培养4~6d.

表3 三孢布拉氏霉正、负菌株不同接种比例对β-胡萝卜素产量的影响

接种比例	β-胡萝卜素(g/l)
1:5	0.641
1:10	0.816
1:20	1.053
1:40	0.774

表4 培养基组分对 β -胡萝卜素产量的影响

实验号*	1	2	3	4	5	6	7	8
β -胡萝卜素(g/l)	0.885	0.675	0.465	1.028	1.864	1.091	1.227	1.062
实验号	9	10	11	12	13	14	15	16
β -胡萝卜素(g/l)	0.838	0.698	0.879	0.650	0.702	0.602	1.271	1.184

* 此处实验号与正交表的实验编号一致。

测定 β -胡萝卜素产量。

由表3可以看出,当正、负菌接种比例为1:20时, β -胡萝卜素发酵产量最高。接种比例过高或过低都不利于 β -胡萝卜素的生成。

2.3 发酵培养基配方的优化

利用 $L_{16}(4^1 \times 2^{12})$ 正交表设计实验,考察了棉籽饼粉、棉籽油、豆油、葡萄糖对 β -胡萝卜素产量的影响(表4)。

对上述实验结果进行F-检验(表5),由此确定影响 β -胡萝卜素的主要因素为棉籽饼粉、棉籽饼粉与棉籽油的交互作用、葡萄糖、棉籽饼粉与豆油的交互作用和豆油。

表5 培养基成分对 β -胡萝卜素影响的统计分析(F-检验)^[5]

方差来源	自由度	均方	自由度	均方	F
			(误差)	(误差)	
A	3	0.265	12	0.082	3.244
B	1	0.011	14	0.126	0.084
C	1	0.082	14	0.121	0.678
D	1	0.106	14	0.119	0.887
A×B	3	0.144	8	0.067	2.151
A×C	3	0.070	8	0.086	0.823

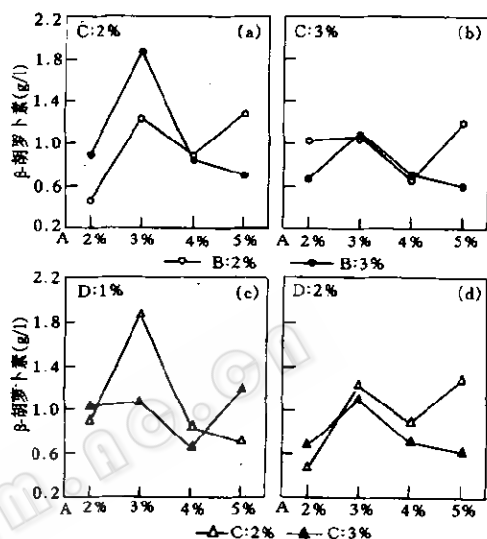
* A:棉籽饼粉, B:棉籽油, C:豆油, D:葡萄糖

为了确定最佳配比,采用ANOVA/MANOVA统计方法^[5]进一步分析棉籽饼粉、棉籽油、豆油、葡萄糖对 β -胡萝卜素产量的影响(图1:a~d)。

分析图1可知:三孢布拉氏霉正、负菌株接合培养合成 β -胡萝卜素的最佳发酵培养基为:棉籽饼粉3%、棉籽油3%、豆油2%、葡萄糖1%,玉米粉2%, $MnSO_4$ 0.02%,维生素 B_1 0.5mg/l,维生素C 0.5%。

2.4 负菌突变株产 β -胡萝卜素能力比较

在优化条件下,三孢布拉氏霉负菌亲本株

图1 棉籽饼粉、棉籽油、豆油、葡萄糖对 β -胡萝卜素产量的影响

A:棉籽饼粉, B:棉籽油, C:豆油, D:葡萄糖; a, b: 棉籽油、棉籽饼粉和豆油及三者交互作用对 β -胡萝卜素产量的影响; c, d: 葡萄糖、棉籽饼粉和棉籽油及三者交互作用对 β -胡萝卜素产量的影响。

N-1, 突变株 I, II, III, IV 及 SCB201 与正菌 SCB200 以 20:1 的接种比例接合培养 4d, 测定 β -胡萝卜素产量。

表6 负菌突变株产 β -胡萝卜素能力比较

实验组别	β -胡萝卜素(g/l)
N-1	0.205
I	0.673
II	0.825
III	0.582
IV	1.744
SCB201	2.150

三孢布拉氏霉菌两性菌株生长迅速, β -胡萝卜素含量高,但该方法发酵过程复杂,成本较高,限制其进一步的推广和应用。因此,

国内外有关研究人员在高产菌株的选育及发酵培养基的优化等方面做了大量的工作以提高 β -胡萝卜素产量,降低成本。据报道,三孢布拉氏霉菌经亚硝基胍诱变处理, β -胡萝卜素产量提高3~6倍^[6]。在发酵培养基中加入合适的表面活性剂, β -胡萝卜素产量可提高14倍^[7]。另外,新高产菌株的筛选也有报道^[8]。微生物发酵法生产 β -胡萝卜素的研究在我国尚处于研究阶段^[9,10],距工业化生产还有相当距离。

研究中发现,利用诱变方法提高 β -胡萝卜素产量是相当困难的。一方面是因为缺乏有效的筛选手段,到目前为止,我们主要是通过观察菌丝体颜色的变化进行筛选;另一方面,我们发现深黄色的正向突变株较少,更多的是白色或淡黄色突变株,还有一些红色突变株,与文献报道一致^[6]。

三孢布拉氏霉正负菌株接合培养生产 β -胡萝卜素受多种因素交互作用的影响,因此,我们采用正交实验设计法以优化发酵培养基。采用优化后的发酵培养基,三孢布拉氏霉正菌SCB200与负菌突变株SCB201经接合培养, β -胡萝卜素产量达到2g/l,比原始菌株提高10倍。

致谢 在本工作的开展过程中,中国科学院微生物研究所郑儒永教授对菌株的培养提供了许多有益的建议;瑞士 Sino-Info 中心的 U. Gloor 博士提供有关 β -胡萝卜素的测定、分离及其他资料;中国科学院上海冶金研究所协助进行离子束注入诱变;华东理工大学实习生居敏敏参加部分工作,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Halliwell Barry. Nutrition Reviews, 1994, 52(8): 253~265.
- [2] Cerutti Peter A. The Lancet, 1994, 344:862~863.
- [3] Schroeder J Donna. The Annals of Pharmacotherapy, 1994, 28:471.
- [4] 白毓谦, 方善康, 高东等. 微生物实验技术, 济南: 山东大学出版社, 1987, 459.
- [5] StatSoft, Inc. STATISTICA 5.0 for Windows, 1995.
- [6] Mehta B J, Cerda O E. Appl Microbiol Biotechnol, 42(6):836~838, 1995.
- [7] Kim S W, Seo W T, Park Y H Biotechnol Lett 19(6):561~562, 1997.
- [8] 俄国专利: RU 2053301
- [9] 张博润, 寇运同, 刘玉方. 微生物学通报, 1995, 22(4): 212~214.
- [10] 张建法, 黄为一, 吴江等. 微生物学通报, 1996, 23(1): 12~14.

STUDIES ON THE PRODUCTION OF β - CAROTENE BY *BLAKESLEA TRISPORA*

1. SCREENING THE β - CAROTENE HIGH - YIELD MUTANT—*B. TRISPORA* SCB201

Ren Shuangxi Yin Guanglin

(Shanghai Research Centre of Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

Abstract A deep - yellow mutant, *Blakeslea trispora* SCB201(-), was isolated after treatment of wild - type spores with ultraviolet, NTG and ion beam. In addition, the fermentation medium was optimized by orthogonal experimental design. In the optimized fermentation medium, β - carotene yield would be 2g / l by mated culture of *Blakeslea trispora* SCB200(+) with SCB201(-).

Key words β - carotene, *Blakeslea trispora*, Orthogonal experimental design, Mutation, Anova/manova