

紫外诱变选育出芽短梗霉高产普鲁兰糖 白化突变菌株

靳建忠¹, 王慧娟¹, 孔维甲¹, 葛海涛¹, 张 宁², 李炳学^{1,*}

(1.沈阳农业大学土地与环境学院, 辽宁 沈阳 110866; 2.沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要: 为了发酵获得无色普鲁兰糖, 对菌株 *Aureobasidium pullulans* NG 进行紫外诱变, 成功获得一株高产普鲁兰糖的白化突变株 UVMU3-1。将突变菌株与野生菌株比较发现, 其菌体生长能力和分化能力未发生显著改变。突变菌株产出的多糖经红外光谱鉴定为普鲁兰糖, 罐发酵实验表明突变菌株产糖能力强于野生菌株。在未经培养基和培养条件优化的情况下, 罐发酵的糖转化率可以达到 52.78%。突变株 UVMU3-1 可作为工业发酵普鲁兰糖的潜力菌株。

关键词: 紫外诱变; 出芽短梗霉; 普鲁兰糖

Breeding of a High Pullulan-producing Non-pigmented Mutant of *Aureobasidium pullulans* by UV-induced Mutagenesis

JIN Jian-zhong¹, WANG Hui-juan¹, KONG Wei-jia¹, GE Hai-tao¹, ZHANG Ning², LI Bing-xue^{1,*}

(1. College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2. College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: A non-pigmented mutant having enhanced ability to produce pullulan was successfully obtained using *Aureobasidium pullulans* NG as the original strain by UV-induced mutagenesis and was named as UVMU3-1. Compared with the original strain, the mutant strain UVMU3-1 displayed similar capability of growth and differentiation. The polysaccharide produced by the mutant strain was identified as pullulan by infrared spectroscopy. Tank fermentation experiments showed that the pullulan-producing capability of the mutant strain was higher than that of the original strain and that the 72 h cultivation of 200 mL of seed culture of the mutant in 5 L of YDA culture medium provided a glucose conversion of 52.78%. In conclusion, UVMU3-1 is a potential strain for pullulan production in industrial fermentation.

Key words: UV mutagenesis; *Aureobasidium pullulans*; pullulan

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)11-0187-05

普鲁兰糖是由 α -(1 \rightarrow 6) 糖苷键连接的麦芽三糖组成的直链状同型多聚糖, 是由真菌出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*) 分泌的一种黏性物质。普鲁兰糖这种独特的连接方式赋予了普鲁兰糖一些独特的物理性质, 包括黏合性、形成纤维的能力、成型性、强阻氧性等。普鲁兰糖又能通过化学衍生来改变它的水溶性或提供反应性基团。普鲁兰糖及其衍生物在食品、医药和电子学方面有广泛的潜在用途^[1-2]。特别是在保健和制药方面有很高的应用价值^[3]。因此, 最近几年有关普鲁兰糖的研究逐渐活跃起来。

我国在 2006 年正式将普鲁兰糖列为食品添加剂(中华人民共和国卫生部 2006 年 8 号公告), 普鲁兰糖还可以作为食品、果品等的包装材料, 起到绝佳的保鲜作用。普鲁兰糖作为药用空心胶囊制作材料在国际上已被广泛使用, 以取代猪、牛等动物骨骼为原料的明胶胶囊^[4]。近几年普鲁兰糖用于药物释放系统中也成为其新的研究热点, 如普鲁兰糖作为化学药物载体、多肽药物载体和基因载体等研究^[5-9]。

出芽短梗霉在发酵产普鲁兰糖的过程中会产生黑色素, 并且牢固黏附在普鲁兰糖上, 这不仅使普鲁兰糖

收稿日期: 2010-10-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000674); UNU-Kirin Fellowship Programme Follow-up Research(201101)

作者简介: 靳建忠(1984—), 男, 硕士研究生, 研究方向为微生物生理与遗传。E-mail: jinjianzhong2008@163.com

* 通信作者: 李炳学(1973—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为微生物生理与遗传。E-mail: libingxue@syau.edu.cn

的纯化工艺更加复杂,而且在经过多道纯化工艺后普鲁兰糖也会损失一部分。另外,由于出芽短梗霉野生菌株本身产糖能力普遍不高,使生产成本增加。目前,许多研究者通过分离纯化或通过诱变得到一些高产普鲁兰糖菌株或色素弱化菌株^[10-13],但是大都没有提及糖转化率或转化率不高。由于出芽短梗霉基因组没有被测序,普鲁兰糖的合成机理还不清楚,因此利用基因工程培育高产普鲁兰糖工程菌还无法实现。本实验通过紫外诱变选育普鲁兰糖产量高、同时糖利用率高的菌株,旨在为工业发酵普鲁兰糖提供新菌株资源。

1 材料与方法

1.1 菌种、培养基与试剂

出芽短梗霉菌株 *Aureobasidium pullulans* NG 由沈阳农业大学土地与环境学院微生物生理与遗传研究组分离于草莓果实^[14]。

种子培养基(YND): 葡萄糖 20.0g/L、NaNO₃ 6.4g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5g/L、酵母提取物 0.2g/L、KH₂PO₄ 1.0g/L, pH(6.0±0.5); 培养基 1(YAD): 葡萄糖 20.0g/L、(NH₄)₂SO₄ 5.0g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5g/L、酵母提取物 0.2g/L、KH₂PO₄ 1.0g/L, pH(6.0±0.5); 培养基 2(YPD): 葡萄糖 20.0g/L、蛋白胨 20.0g/L、pH(6.0±0.5); PDA 培养基: 葡萄糖 20.0g/L、土豆汁 200.0g/L, pH(6.0±0.5), 固体培养基加 20.0g/L 琼脂。

普鲁兰糖标准品 美国 Sigma 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

722E 可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司; SHC-A 恒温振荡器 常州国华电器有限公司; PHS-25 酸度计 上海理达仪器厂; IR200 傅里叶红外光谱仪 美国 Thermo Electron 公司; AUTOBIO2000 型双联 10L 发酵罐 镇江东方生物工程设备技术公司; SCR20BC 离心机 日本株式会社日立制作社; JA2003A 电子天平 上海精天电子仪器有限公司; DHG-9070 型电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司; LD2X-40C 型蒸汽灭菌器 上海三申医疗器械有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种种子液培养

接种菌株于 YND 培养基中, 28℃、180r/min 摇床振荡培养 24h。

1.3.2 紫外诱变存活率检测

取 5mL 含酵母状细胞的 YND 培养菌液(OD_{560nm}=0.2)放入 75mm 培养皿中, 加入灭菌的磁棒, 在 15W 紫外灯下, 照射距离 30cm, 分别照射 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0min。取诱变处理的菌液 50μL 加入 50mL

无菌水稀释混匀。取 0.1mL 涂布于 PDA 培养基平板上, 每个处理涂两个平板。28℃避光培养 72h, 统计菌落数, 计算平均值。

$$\text{存活率}/\% = \frac{\text{诱变后活菌浓度}}{\text{诱变前活菌浓度}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.3 诱变选育高产普鲁兰糖白化菌株

15W 紫外灯下距离 30cm 照射 2.0min 诱变, 按照 1.3.2 节步骤操作。28℃避光培养 72h, 以 PDA 培养基平板上胞外多糖分泌量高、菌落湿润黏稠、无色素合成的白化突变株作为目标菌株。选出的目标菌株接种于 PDA 固体培养基平板上 28℃倒置培养 7d, 传代培养 3 次, 观察突变菌株突变性状是否稳定。

1.3.4 白化突变菌株与野生菌株菌落形态和细胞形态比较

接种白化突变菌株 UVMU3-1 和野生菌株 NG 于 PDA 培养基平板上, 28℃倒置培养 5d。观察菌落形态并照相, 镜检各自细胞形态并照相。

1.3.5 白化突变菌株与野生菌株生长能力和细胞分化性质比较

按 1:100 的接种量接种白化突变菌株 UVMU3-1 和野生菌株 NG 的种子液(OD_{560nm}=3.0)到 50mL 的 PDA 和 YND 液体培养基中, 于 180r/min、28℃水浴摇床培养 96h。在此期间每隔 8h 或 6h 取样测其在波长 560nm 处的吸光度。

用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液作为溶剂配制 YPD 培养基, 灭菌前后 pH 值均为 4.5, 接入等量的 NG 和 UVMU3-1, 在 28℃、180r/min 摇瓶培养, 每隔 24h 取 2mL 菌液做镜检, 记录膨大细胞占细胞总数的百分比和此时培养基 pH 值。

1.3.6 白化突变菌株 UVMU3-1 产多糖性质鉴定

将普鲁兰糖标准品和 1.3.5 节摇瓶发酵突变菌株 UVMU3-1 获得的粗多糖采用溴化钾压片法制片, 用傅里叶红外光谱仪扫描获得图谱, 比较分析多糖特征峰。

1.3.7 白化突变菌株与野生菌株产糖能力比较

1.3.7.1 摇瓶实验

按 1:100 的接种量接种白化突变菌株 UVMU3-1 和野生菌株 NG 的种子液(OD_{560nm}=3.0)到 50mL 的 PDA、YPD 和 YAD 液体培养基中, 180r/min、28℃水浴摇床培养 96h。6000r/min 离心 10min, 转出上清液, 菌体于 60℃烘干至质量恒定, 得菌体干质量, 上清液加入 2 倍体积 100% 无水乙醇于 4℃沉淀 12h, 10000r/min 离心 10min 弃上清液, 沉淀用酒精洗一次, 60℃烘干至质量恒定, 得粗多糖。

$$\text{菌体粗多糖产量} = \frac{\text{粗多糖质量/g}}{\text{菌体干质量/g}} \quad (2)$$

$$\text{糖转化率/\%} = \frac{\text{粗多糖质量}}{\text{培养基中糖添加质量}} \times 100 \quad (3)$$

1.3.7.2 罐发酵实验

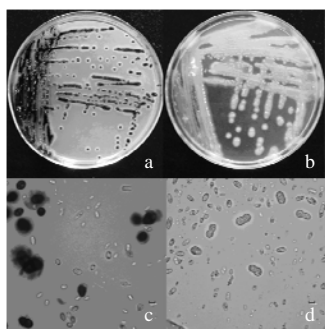
分别接种 200 mL 野生菌株 NG 和白化突变菌株 UVMU3-1 的种子液($OD_{560nm}=3.0$)于装有 5 L YAD 培养基的发酵罐中, 28℃、200 r/min 培养, 通气量 5 L/min。pH 值从 6.0 自然下降, 当达到 4.5 时调节 pH 值, 使其控制在 4.5, 培养 72 h, 取 1 L 发酵液测定菌体干质量、菌体粗多糖产量和糖转化率, 具体过程同摇瓶实验。

2 结果与分析

2.1 紫外诱变菌株存活率检测结果及分析

由表 1 可见, 在照射 0~2.0 min 时, 菌株的存活率逐渐降低。照射 1.0 min, 菌株存活率为 42.2%, 说明照射剂量不够, 筛选到目标突变菌株概率低; 照射 3.0 min, 菌株存活率仅有 16.7%, 在平板培养基上菌落较少, 不利于筛选白化突变菌株。在照射时间为 2.0 min 时, 菌株存活率为 29.4%。一般情况下, 在存活率约 30.0% 的诱变条件下, 诱变效果较好, 适于筛选突变菌株^[15]。因此, 后续实验的紫外诱变条件确定为 15 W 紫外灯下距离 30 cm 照射 2.0 min。

2.2 野生型菌株和突变菌株的菌落特征和个体形态特征



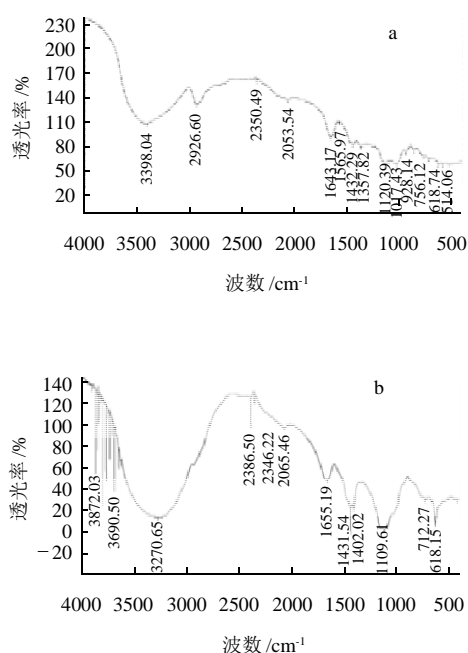
a、c. 野生菌株; b、d. 突变菌株。

图 1 野生菌株 NG 和白化突变菌株 UVMU3-1 在 PDA 平板培养基上培养 5 d 的菌落照片和显微照片(16 × 40, 比例尺为 10 μm)

Fig.1 Colonial and cellular morphology of *Aureobasidium pullulans* NG and UVMU3-1 cultured for 5 days on PDA plates (16 × 40, scale: 10 μm)

分析菌落特征, 突变菌株不合成色素, 同时菌落比野生菌株更为黏稠(图 1a、1b); 在细胞形态方面, 突变菌株与野生菌株相同, 具有酵母状细胞、膨大细胞和厚垣孢子等各种细胞形态。突变菌株经过多次传代后性状稳定。前期研究结果表明, 野生型菌株 NG 的膨大细胞和厚垣孢子合成普鲁兰糖, 产生黑色素的厚垣孢子由膨大细胞分化形成^[16]。从图 1d 可见, 白化突变菌株生长仍然具有厚垣孢子阶段, 只是厚垣孢子丧失了合成黑色素的功能。

2.3 红外光谱鉴定突变菌株所产胞外多糖



a. 标准品普鲁兰糖; b. UVMU3-1 产胞外多糖。

图 2 KBr 压片法测定多糖样品红外光谱图

Fig.2 Fourier-transform infrared spectra of polysaccharide samples scanned on KBr discs

由图 2 可见, 白化突变菌株的红外光谱中有 3 个特征峰 1109.61、712.27、618.15 cm⁻¹。白化突变菌株 UVMU3-1 摇瓶发酵所产胞外多糖图谱与标准品图谱基本相同, 表明其所产胞外多糖为普鲁兰糖, 多糖性质没有改变。

表 1 紫外诱变菌株存活率检测结果

Table 1 Survival rate of *Aureobasidium pullulans* NG after UV radiation for different lengths of time

项目	照射时间/min						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
诱变后活菌浓度/(CFU/mL)	510 ± 70.71	280 ± 0.00	215 ± 35.35	185 ± 35.35	150 ± 70.71	160 ± 28.28	85 ± 21.21
菌株存活率/%	100	54.9	42.2	36.3	29.4	31.4	16.7

2.4 野生型菌株和突变菌株的生长及分化性质

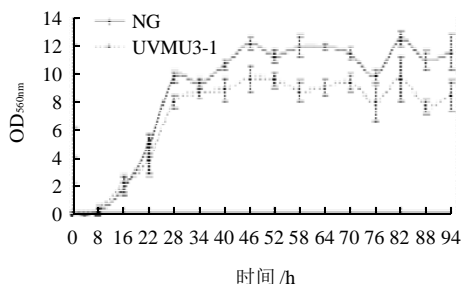


图3 野生型菌株NG和突变菌株UVMU3-1在PDA中培养的生长曲线
Fig.3 Growth curves of *Aureobasidium pullulans* NG and UVMU3-1 on PDA plates

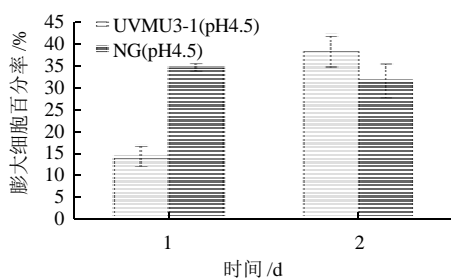


图4 野生菌株NG和突变菌株UVMU3-1酵母状细胞在酸性环境中细胞分化性质分析

Fig.4 Cell differentiation characteristics of *Aureobasidium pullulans* NG and UVMU3-1 in acidic environment

为验证突变菌株的生长繁殖能力是否改变,测定了野生型菌株和白化突变菌株在产糖的PDA培养基中的生长曲线。图3结果表明,突变菌株生长繁殖规律与野生型菌株基本一致。由图4可见,突变株在酸性条件下酵母状细胞分化出现延迟,在培养1d后膨大细胞占细胞总数的14%,野生型菌株可以达到34%。培养2d后,突变菌株酵母状细胞迅速分化成膨大细胞,占细胞总数的38%,野生型菌株维持在31%,对野生菌株和突变菌株在第2天的膨大细胞百分比进行比较,通过统计分析,发现突变菌株与野生菌株没有显著差异($P=0.2 > 0.05$)。前期结果表明,酵母状细胞不能合成普鲁兰糖^[16]。因此,酵母状细胞分化为合成普鲁兰糖的膨大细胞的性质对于突变菌株发酵生产普鲁兰糖是至关重要的。

2.6 白化突变菌株UVMU 3-1和野生型菌株NG产糖性能比较

通过摇瓶液体发酵,测定了突变菌株和野生型菌株的发酵液胞外粗多糖产量、菌体粗多糖产量和糖转化率。比较野生菌株和突变菌株在3种培养基中的多糖产量,通过统计分析,发现突变菌株和野生菌株在同一种培养基中的产糖量没有显著差异(PDA: $P=1 > 0.05$, YPD: $P=0.93 > 0.05$, YAD: $P=0.11 > 0.05$),这表明

突变菌株和野生型菌株的产糖性能没有显著差异(表2)。因为摇瓶发酵的通气条件、环境pH值等对多糖发酵影响显著的因素不能达到最优,可能导致突变菌株合成普鲁兰糖的潜力不能表现出来。因此,进行了罐发酵实验,进一步比较突变菌株和野生型菌株的产糖性能。

表2 摇瓶液体发酵野生型菌株NG和突变菌株UVMU 3-1产糖性能比较

Table 2 Comparison of polysaccharides-producing capabilities of *Aureobasidium pullulans* NG and UVMU 3-1 cultured using PDA or YAD in shake flask

菌株	培养基	菌体干质量/g	发酵液粗多糖产量/(g/L)	菌体粗多糖产量/(g/g)	糖转化率/%
NG	PDA	16.54 ± 0.849	7.60 ± 1.075	0.459	—
	YPD	18.58 ± 0.453	23.20 ± 1.725	1.249	—
	YAD	8.84 ± 0.159	2.24 ± 0.088	0.253	11.20
UVMU 3-1	PDA	18.88 ± 0.594	7.60 ± 0.905	0.403	—
	YPD	19.34 ± 0.481	23.40 ± 1.188	1.209	—
	YAD	9.28 ± 0.283	1.95 ± 0.035	0.210	9.75

注:—,该培养基成分中糖添加量不明确,无法计算。

表3 摇瓶和罐发酵YAD培养野生型菌株和突变菌株产糖性能比较
Table 3 Comparison of polysaccharides-producing capability of *Aureobasidium pullulans* NG and UVMU 3-1 cultured in shake flask and fermentation tank using YAD

菌株	生物量/(g/L)	发酵液粗多糖产量/(g/L)	菌体粗多糖产量/(g/g)	糖转化率/%
NG 摇瓶	8.84 ± 0.159	2.24 ± 0.088	0.253	11.20
NG 发酵罐	8.31 ± 0.144	6.61 ± 0.108	0.796	33.07
UVMU 3-1 摇瓶	9.28 ± 0.283	1.95 ± 0.035	0.210	9.75
UVMU 3-1 发酵罐	7.67 ± 0.074	10.56 ± 0.481	1.377	52.78

由表3可见,发酵罐培养时突变菌株菌体粗多糖产量是野生型菌株的1.65倍,糖转化率比野生型提高59.6%。由于白化突变菌株细胞分化特征没有显著变化,在pH4.5时膨大细胞比例与野生型菌株基本持平。因为普鲁兰糖是膨大细胞合成的,因此推测突变菌株UVMU 3-1膨大细胞合成普鲁兰糖的效率提高。

罐发酵和摇瓶发酵培养条件的区别主要在于是否调节酸碱度和通气量,这两方面条件的改善使野生型菌株和突变菌株菌体粗多糖产量均大幅提高,分别为3.23倍和6.35倍。通气条件好,多糖产量升高是许多菌株的共同特性^[17-20]。调节酸碱度有利于野生型菌株NG的酵母状细胞分化为合成普鲁兰糖的膨大细胞,膨大细胞百分比增多,因此导致野生型菌株菌体粗多糖产量增加^[16]。

因此,验证突变菌株的产糖效率需要在适宜的发酵条件下进行,摇瓶液体发酵初筛会掩盖突变菌株合成胞外多糖的真实性质,漏掉某些高产突变菌株。

3 结 论

通过紫外诱变获得了一株高产普鲁兰糖白化突变菌

株 UVMU 3-1, 该菌株在葡萄糖质量浓度为 20.0g/L 的罐发酵实验中获得粗多糖产量为 10.56g/L, 糖转化率为 52.78%, 多糖经红外光谱鉴定为普鲁兰糖。该菌株具有工业生产普鲁兰糖的潜质, 后续实验将会对该突变菌株的培养基和培养条件进行优化, 并深入研究其高产普鲁兰糖的机理。

参考文献:

- [1] DESHPANDE M S, RALE V B, LYNCH J M. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: a status report[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1992, 14(7): 514-527.
- [2] POLLOCK T J, THORNE L, ARMENTROUT R W. Isolation of new *Aureobasidium* strains that produce high-molecular-weight pullulan with reduced pigmentation[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(3): 877-883.
- [3] LEATHERS T D. Biotechnological production and applications of pullulan[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62(5/6): 468-473.
- [4] SHINGEL K I. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan[J]. *Carbohydr Res*, 2004, 339(3): 447-460.
- [5] 芦殿香, 樊渝江. 普鲁兰多糖在药物释放系统中的应用[J]. *化学研究与应用*, 2008, 20(12): 1540-1544.
- [6] NA K, LEE E S, BAE Y H. Self-organized nanogels responding to tumor extracellular pH: pH-dependent drug release and *in vitro* cytotoxicity against MCF-7 cells[J]. *Bioconjug Chem*, 2007, 18(5): 1568-1574.
- [7] MORIMOTO N, ENDO T, OHTOMI M, et al. Hybrid nanogels with physical and chemical cross-linking structures as nanocarriers[J]. *Macromol Biosci*, 2005, 5(8): 710-716.
- [8] JUAN A S, DUCROCA G, HLAWATY H, et al. Tubular cationized pullulan hydrogels as local reservoirs for plasmid DNA[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 83(3): 819-827.
- [9] GUPTA M, GUPTA A K. Hydrogel pullulan nanoparticles encapsulating pBUDLacZ plasmid as an efficient gene delivery carrier[J]. *Journal of Controlled Release*, 2004, 99(1): 157-166.
- [10] 张雯, 张盛贵. 复合诱变选育出芽短梗霉高产菌株[J]. *中国酿造*, 2008(9): 47-50.
- [11] 邓长江, 李长清, 朱希强, 等. 产普鲁兰糖出芽短梗霉菌株的初步筛选[J]. *食品与药品*, 2007, 9(2): 18-20.
- [12] 朱一晖, 张丽敏, 詹晓北. 出芽短梗霉产色素能力弱化菌株的筛选[J]. *无锡轻工业大学学报*, 2003, 22(1): 16-20.
- [13] 邵荣, 余晓红, 刘珊珊. 利用麦芽根、淀粉废水高产普鲁兰多糖短梗霉菌株选育的研究[J]. *食品科学*, 2008, 19(9): 355-357.
- [14] 李炳学, 李颖. 产黑色素酵母状真菌[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(11): 1791-1796.
- [15] 吴天祥, 陈岩. 复合诱变红曲霉选育高产壳聚糖菌株及培养及优化[J]. *中国酿造*, 2009(3): 43-46.
- [16] LI Bingxue, LI Ying. Production of pigment-free pullulan by swollen cell in *Aureobasidium pullulans* NG which cell differentiation was affected by pH and nutrition[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84(2): 293-300.
- [17] 王浩, 王普, 张晓军. 普鲁兰多糖的研究进展[J]. *精细与专用化学品*, 2006, 14(5): 4-7.
- [18] 池振明, 叶芳, 赵双枝. 高产酵母菌株(*Rhodotorula bacarum*)产普鲁兰多糖过程中搅拌和通气条件的优化[J]. *食品与发酵工业*, 2005(2): 1-5.
- [19] 段效辉. 普鲁兰多糖高产菌株 Y68 多糖发酵生产及其机理初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- [20] ROUKAS T, MANTZOURIDOU F. Effect of the aeration rate on pullulan production and fermentation broth rheological properties in an airlift reactor[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2001, 76(4): 371-376.