

琥珀酸产生菌的诱变与选育

林 剑, 孙 莹, 刘晓艳, 徐世艾*
(烟台大学化工制造省级重点实验室, 山东 烟台 264005)

摘 要: 对琥珀酸产生菌 S-1 进行紫外线亚硝基胍的复合诱变后, 筛选出琥珀酸产量高, 遗传性状稳定的菌株 S-57, 并对其进行激光诱变, 筛选出菌株 SH-24, 相同发酵条件下琥珀酸产量达到 21.25g/L, 相对于未诱变菌株产量提高了 343 倍。

关键词: 琥珀酸; 紫外线; 亚硝基胍; 激光; 诱变

Mutagenesis and Screening of Succinic-producing Strain

LIN Jian, SUN Ying, LIU Xiao-yan, XU Shi-ai*
(Provincial Key Laboratory of Chemical Industry Manufacture, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: A high yield and stable succinic producing strain S-57 was obtained from the mutation of mucor S-1 treated with ultraviolet ray and nitrosoguanidine (NTG). After the strain S-57 was treated with He-Ne laser, a strain SH-24 was selected. The concentration of succinic acid is 21.25mg/ml in the fermentation broth of the same conditions of fermentation or that is 343 times the strain before mutagenesis.

Key words succinic acid; ultraviolet ray; nitrosoguanidine; laser; mutation

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0309-04

琥珀酸(丁二酸, succinic acid)及其衍生物由于广泛的使用于食品、医药、冶金、轻工、饲料生物燃料等各个领域, 因此琥珀酸的生产成为备受关注的研究课题^[1]。目前琥珀酸的生产主要是采用化学合成法^[2], 其化学制备相当复杂, 而且产品分离成本很高, 这就对琥珀酸的应用带来了一定的限制, 同时化学制备生产的琥珀酸也限制了它在食品、医药、饲料等行业的应用。开发发酵法生产琥珀酸的工艺以及发酵法生产琥珀酸的工业潜在在 20 世纪 80 年代初就已得到了世界性的共识, 科学家预计 21 世纪的第一个 10 年是实现发酵法生产琥珀酸的关键时期。最近几年, 随着人们对琥珀酸及其衍生物的生物学功能的进一步认识和应用领域的扩大, 使得琥珀酸的市场需求快速增加, 因此国外许多国家也加大了对发酵法生产琥珀酸的研究力度, 发酵法生产琥珀酸工艺中涉及到的许多研究方向诸如: 菌种的选育、发酵工艺的优化、产物分离等已成为有机酸发酵研究领域的一个热门课题, 而我国在这方面的研究报道很少^[3]。发酵法琥珀酸可以为现已存在的琥珀酸化学制品市场提供了一种经济、安全、绿色的琥珀酸来源。利用微生物菌种, 以农产品玉米、木薯为基本原料, 不仅可以得到安全的食品、医药级琥珀酸、生物燃料等同时还可以为农产品的深加工使其转化为高附加值产品提供一

条可行性的通道。

目前, 国外已报道分离出的琥珀酸产生菌都是从瘤胃中分离出来的专性厌氧或兼性厌氧细菌, 主要是典型的胃肠细菌例如: *Escherichia coli*、*Pectinatus* sp、*Bacteroides* sp. 和瘤胃细菌例如: *Puminocooccus flavefaciens*、*Actionbacillus*、*Succinogenes*、*Bacteroides amylolytica*、*Prevotella ruminicola*、*Succinimonas amylolytica*、*Succinivibrio dextrinissolvens*等^[3]。上述细菌性琥珀酸产生菌, 都是在厌氧的条件下进行的液体培养, 对发酵环境有着比较苛刻的要求, 甚至需要通入 CO₂ 气体, 另外琥珀酸作为酸性物质, 其在发酵液中的合成与积累必然造成发酵液 pH 值的下降, 而细菌性微生物的正常生长 pH 通常要求在 7.0 左右, 这就给琥珀酸的发酵带来更大的困难, 也是细菌性微生物琥珀酸发酵不可避免的需要解决的问题。针对上述情况, 考虑到中国传统发酵食品例如白酒、黄酒在其发酵过程中都有一定的琥珀酸生物合成这一事实, 本实验室现已成功地从其生产用曲中分离出能够在好氧条件下合成并积累琥珀酸的霉菌菌株 S-1。

本实验对琥珀酸产生菌 S-1 菌株采用紫外亚硝基胍复合诱变并结合激光诱变, 以期筛选到产琥珀酸能力高的菌株, 为进一步研究琥珀酸的有氧发酵生产奠定了基础。

收稿日期 2006-10-31

*通讯作者

作者简介: 林剑(1963-), 男, 副教授, 学士, 主要从事微生物发酵的研究。

1 材料与方法

1.1 出发菌种

琥珀酸产生菌 S-1, 烟台大学生物工程实验室保存。

1.2 主要设备

液相色谱仪 Agilent 1100 安捷伦公司; He-Ne 激光发射器 北京市六一仪器厂。

1.3 培养基及培养条件

斜面培养基: 马铃薯培养基; 摇瓶筛选培养基: 液体马铃薯培养基; 筛选培养基: 查氏培养基, 加入 0.01% 溴甲酚绿。斜面培养: 温度 30℃, 时间 3d。筛选培养: 温度 30℃, 时间 3d。摇瓶培养: 温度 30℃, 时间 96h, 转速 200r/min。

1.4 诱变方法

诱变的过程: 紫外线剂量选择→紫外线亚硝基胍复合诱变→初筛→复筛→稳定性实验→激光剂量选择→激光诱变→初筛→复筛→稳定性实验

1.4.1 紫外亚硝基胍复合诱变

1.4.1.1 紫外线剂量选择

孢子悬液制备: 用马铃薯培养基将培养 3d 的新鲜孢子冲下, 置于摇床 200r/min, 30℃ 恒温培养 3h, 使其萌芽。用生理盐水离心洗涤, 并用两层擦镜纸过滤得到单孢子悬液, 浓度为 $10^6 \sim 10^7$ 个/ml。

10ml 菌悬液放入无菌培养皿中, 在磁力搅拌器上用紫外灯照射, 波长为 2537nm, 培养皿距离光源 20cm^[4], 照射时间分别为 2、3.5、5、6.5、8min。

紫外线照射前后的单孢子悬液同时稀释, 以适当浓度接种于固体培养基上, 于 30℃ 恒温避光培养 2d, 平板计数计算致死率, 选择合适的照射时间。

1.4.1.2 亚硝基胍(nitrosoguanidine, NTG)和紫外线复合诱变

根据上述选择的紫外线照射时间, 采用合适的 NTG 处理液 (300μg/ml) 进行紫外线与亚硝基胍的复合诱变^[5]。处理后菌悬液接种于加入初筛培养基中, 培养 2d, 根据变色圈与菌落直径之比, 与诱变前菌株比较, 初步筛选直径之比较大的菌株。筛选得到的菌株接种斜面培养, 进行摇瓶复筛, 挑选出发酵液中琥珀酸浓度高的菌株, 高产株进行稳定性研究。

1.4.2 激光诱变方法及筛选

1.4.2.1 照射时间选择

孢子悬液制备同 1.4.1, 0.1ml 孢子悬液放入无菌培养皿中, 用 He-Ne 激光照射, 波长为 632.5nm, 光斑直径 2.5mm^[6]。照射时间 10、20、30、40min。激光照射前后的单孢子悬液同时稀释, 涂布筛选培养基培养 2d, 平板计数计算死亡率, 选择合适的照射时间。

1.4.2.2 激光照射诱变

根据上述选择的激光照射时间进行诱变, 照射后的单孢子悬液涂布平板培养基, 培养 2d, 挑取变色圈与菌落直径之比较大的单个菌落接种斜面培养, 进行摇瓶复筛, 高产株进行稳定性研究。

1.6 分析方法

发酵液中琥珀酸含量的测定: 反相高效液相色谱法^[7]。

2 结果与分析

2.1 紫外线亚硝基胍复合诱变

2.1.1 紫外线剂量选择

孢子悬液经紫外线照射不同时间后, 适当浓度涂布培养, 通过平板计数得到不同照射时间对死亡率、正突变率、负突变率的影响, 见图 1。

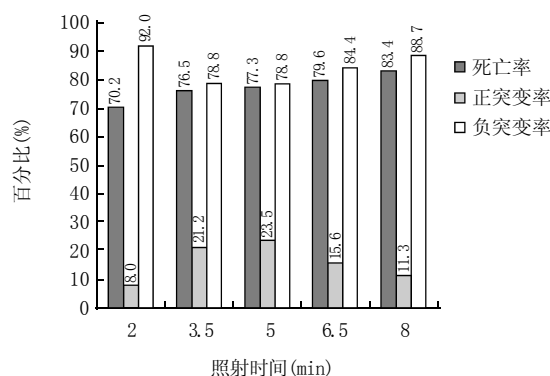


图1 紫外线照射时间对死亡率等的影响
Fig.1 Affections of mutagenic time of ultraviolet rays on mortality etc.

$$\text{死亡率} = \frac{\text{诱变前活菌数} - \text{诱变后活菌数}}{\text{诱变前活菌数}}$$

正突变率 = 诱变后变色圈直径与菌落直径之比大于诱变前变色圈直径与菌落直径之比的活菌数 / 诱变后活菌数

负突变率 = 诱变后变色圈直径与菌落直径之比小于诱变前变色圈直径与菌落直径之比的活菌数 / 诱变后活菌数

由图 1 可以看出, 照射时间小于 5min 时, 正突变率随照射时间的增加而增大, 照射时间超过 5min 后, 正突变率随照射时间的增加而减小, 考虑到正突变率是影响诱变效果的主要因素, 确定复合诱变紫外照射时间为 5min。

2.1.2 紫外线亚硝基胍复合诱变

根据上述实验选择紫外线照射时间 5min, 亚硝基胍处理液浓度 300μg/ml, 处理时间 30min, 对菌株进行复合诱变。

选取经过紫外与亚硝基胍复合诱变后初筛得到的12株高产菌株,在摇床水平上进行复筛,复筛结果见表1。

表1 摇瓶复筛结果
Table 1 Results of shaking-flask repeated screening

菌号	产量(g/L)	提高倍数	菌株号	产量(g/L)	提高倍数
S-2	3.30	53.24	S-18	3.98	64.14
S-6	2.39	38.54	S-19	3.18	51.35
S-8	2.24	36.17	S-27	3.98	64.12
S-12	3.07	49.47	S-31	4.68	75.43
S-14	1.81	29.20	S-32	6.22	100.26
S-15	3.50	56.40	S-35	6.91	111.26
S-16	4.10	66.234	S-53	6.26	100.97
S-17	1.40	22.59	S-57	16.30	262.92

注:原始出发菌株S-1在相同条件下发酵,发酵液的琥珀酸产量为0.062g/L。

从复合诱变结果看出紫外亚硝基胍复合诱变可以较大幅度提高菌株产琥珀酸能力。选取琥珀酸产量高的5株菌株S-31、S-32、S-35、S-53、S-57进行稳定性研究。对于上述5株高产菌株进行了五代稳定性实验,其结果见表2。

表2 传代数对琥珀酸产量的影响(g/L)

Table 2	Affections of trainer time on succinic acid yield (g/L)				
传代数	S-31	S-32	S-35	S-53	S-57
1	3.56	6.11	6.91	6.06	16.31
2	4.74	6.54	7.05	5.99	15.64
3	4.32	5.32	6.85	4.13	16.24
4	3.2	5.69	7.12	5.45	16.45
5	3.54	4.35	7.23	5.76	16.63

由表2可以看出菌株经紫外亚硝基胍复合诱变后,菌株S-57产琥珀酸能力较其他菌株稳定,并且有提高的趋势,发酵液中琥珀酸浓度为16.63g/L。琥珀酸是三羧酸循环的中间体,推测通过紫外与亚硝基胍复合诱变,可能通过遗传基因发生突变使代谢过程中的琥珀酸脱氢酶合成受阻或活性减弱,存在丙酮酸羧化支路,琥珀酸得以累积并排到细胞膜外,其理论的明确解释还需要进一步研究。

2.2 He-Ne 激光诱变

2.2.1 照射时间的选择

用波长632.5nm的He-Ne激光对S-57菌悬液分别照射10、20、30、40min,适当浓度涂布培养,通过平板计数得到不同照射时间与致死率,正突变率,负突变率关系见图2。

致死率、正突变率、负突变率计算方法同2.1.1。

由图2看出,照射时间小于30min时,正突变率随照射时间的增加而增大,照射时间超过30min后,正突变率随照射时间的增加而减小,正突变率是衡量诱变效果的主要依据,确定激光对菌株S-57进行照射诱变的

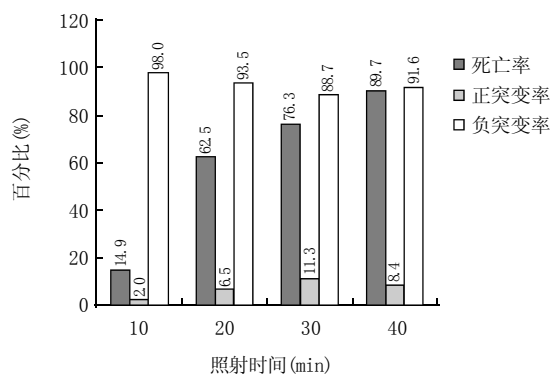


图2 激光照射时间对死亡率等的影响

Fig.2 Affections of mutagenic time of He-Ne laser on mortality etc.

时间为30min。

2.2.2 激光照射诱变

根据上述实验选择照射时间30min,对菌株S-57进行激光诱变,初筛得到的7株高产菌株,在摇床水平上进行复筛,复筛结果见表3。

表3 摇瓶复筛结果

Table 3 Results of shaking-flask repeated screening

菌号	SH-19	SH-20	SH-24	SH-25	SH-35	SH-36	SH-37
产量(g/L)	20.07	19.50	19.57	19.88	16.58	17.43	16.84
提高率(%)	23.12	19.62	20.06	21.97	1.71	6.91	3.30

从实验结果可以看出,S-57菌株经过He-Ne激光照射后琥珀酸产量提高幅度较小。选择琥珀酸产量较高的4株菌株SH-19、SH-20、SH-24、SH-25进行五代稳定性研究,实验结果见表4。

表4 传代数对琥珀酸产量的影响(g/L)

Table 4 Affections of trainer time on succinic acid yield (g/L)

传代数	SH-19	SH-20	SH-24	SH-25
1	22.08	19.32	20.35	21.26
2	22.06	20.03	20.01	20.56
3	19.35	19.56	20.81	20.15
4	20.65	20.56	21.36	19.56
5	18.32	20.54	21.25	16.03

由实验结果可以看出菌株SH-24产琥珀酸能力较稳定,发酵液中琥珀酸浓度达到21.25g/L。

菌种经过激光诱变虽然琥珀酸产量提高幅度不大,但是由液相色谱谱图看出发酵液中其他有机酸所占比重有较大幅度下降。

目前对激光照射诱变微生物的理论研究还不完善,并且未见对毛霉的激光诱变报道,对于激光照射诱变虽然没有较大幅度提高菌体的产琥珀酸能力,但是却降低

稀土元素镨、钕、铒对红菇多糖 深层发酵的影响

李增利

(江苏科技大学南徐学院食品与环境系, 江苏 镇江 212004)

摘 要: 研究了稀土元素镨、钕、铒对红菇深层发酵中红菇菌丝生物量、胞外多糖(EPS)、胞内多糖(IPS)、总多糖(TPS)、最终 pH 和多糖产率的影响。研究结果显示: 稀土元素显著影响着菌丝生物量、EPS、IPS、TPS、最终 pH 和多糖产率; 其影响水平受限于稀土元素的种类和稀土元素含量, 适当剂量的稀土元素镨、钕具有促进红菇菌丝体生长作用和代谢产物的积累, 而过高浓度的稀土元素则会造成对细胞生长和多糖产物抑制作用。在添加适宜的剂量稀土元素镨时能够获得较高的生物量、胞外多糖产量、胞内多糖产量、总多糖和胞外多糖产率, 其分别达到 $24.63 \pm 0.62\text{g/L}$ 、 $1.730 \pm 0.065\text{g/L}$ 、 $79.03 \pm 0.00\text{mg/g}$ 、 $3.511 \pm 0.028\text{g/L}$ 、 $7.60\% \pm 0.15\%$ 。

关键词: 红菇; 深层发酵; 多糖; 稀土元素; 镨; 钕; 铒

Effects of Rare Earth Elements of Praseodymium, Neodymium and Erbium on Production of Polysaccharide by Submerged Fermentation of *Russula* sp.

LIZeng-li

(Department of Food and Environment, Nanxu College, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212004, China)

Abstract: Rare earth elements(REE) of praseodymium, neodymium and erbium were added into the media to investigate their

收稿日期: 2007-08-12

作者简介: 李增利(1966-), 男, 副教授, 主要从事食品加工方面的研究。

其他有机酸副产物的原因, 可能经过诱变糖代谢的路径发生变化, 其具体原因还需进一步研究。

对琥珀酸产生菌进行紫外亚硝基胍复合诱变与激光照射诱变后, 筛选到的菌株 SH-24 发酵液中琥珀酸浓度达到 21.25g/L , 较诱变前提高了 343 倍。证明作为传统诱变方法, 复合诱变较之激光照射诱变能够大幅度提高琥珀酸产率, 仍然是微生物诱变育种的重要方法, 激光照射作为一种新型诱变剂, 其诱变机理尚未研究清楚, 但是操作方法简单, 与传统诱变方法相结合, 是提高诱变效果的好方法。

3 结 论

3.1 菌株 S-1 经紫外亚硝基胍复合诱变后, 筛选到一支菌株 S-57, 相同条件下摇瓶发酵液中琥珀酸浓度为 16.63g/L 。

3.2 菌株 S-57 经过 He-Ne 激光诱变后筛选到菌株 SH-

24, 相同条件下摇瓶发酵液中琥珀酸浓度为 21.25g/L , 产量较未诱变前提高 343 倍。

参考文献:

- [1] 王庆昭, 吴魏, 赵学明. 生物转化法制取琥珀酸及其衍生物的前景分析[J]. 化工进展, 2004, 23(7): 794-799.
- [2] 李春丽, 陈新志, 赵新丽. 丁二酸的制备及用途[J]. 青海大学学报: 自然科学版, 1999, 17(6): 21-25.
- [3] 詹晓北, 朱一晖, Wang Dong-hai. 琥珀酸发酵生产工艺及其产品市场[J]. 食品科技, 2003(2): 44-49.
- [4] 栾雨时, 包永明. 生物工程实验技术手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 131.
- [5] 王水顺, 林进哲, 张金玮, 等. 复合酶高产菌株选育的研究[J]. 药物生物技术, 2001, 8(6): 317-321.
- [6] 戴得慧, 郭爱莲, 蒋家新. He-Ne激光对红曲霉 M_{20} 的原生质体诱变育种[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 75-78.
- [7] AGARWAL L, ISAR J, SAXENA R K. Rapid screening procedures for identification of succinic acid producers[J]. Biochem Biophys Methods, 2005, 63: 24-32.