

高产 γ -氨基丁酸霉菌菌株的筛选及诱变育种

边 鑫, 吴 非*

(东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: 以霉菌作为出发菌株, 将其接入大豆-水(3:5, m/V)的发酵培养基中进行发酵, 根据发酵过程中 γ -氨基丁酸(GABA)产量, 筛选出GABA的高产霉菌菌株, 然后利用紫外线对高产菌株进行诱变处理, 并通过抗性初筛获得长势较好的突变菌株, 再分别利用含有质量浓度为1g/100mL L-谷氨酸的PDA综合培养基和大豆水溶液的发酵培养基进行两次筛选, 得到稳定高产GABA突变菌株。结果表明, 通过对产GABA霉菌菌株的筛选, 得到米曲霉3.800为高产GABA霉菌, GABA产量达到0.674g/L。以米曲霉3.800作为原始菌株, 对其进行紫外诱变处理, 从而获得高产GABA突变菌株, 结果表明, 利用紫外线对米曲霉3.800进行处理的最佳照射时间为2min。在此照射时间下, 通过突变菌株在含有质量浓度为1g/100mL L-谷氨酸的PDA综合培养基和大豆-水溶液的发酵培养基进行两次筛选, 最终获得一株稳定的高产GABA突变菌株3.800-4, 其在含有质量浓度为1g/100mL谷氨酸的PDA综合培养基中的GABA产量为4.491g/L, 比原菌株的GABA产量提高了23.58%; 同时其在大豆-水的发酵培养基中的GABA产量为0.874g/L, 比原菌株的产量提高了29.67%。

关键词: γ -氨基丁酸; 霉菌; 筛选; 紫外诱变; 高产突变菌株

Screening and Mutation Breeding of a High-Yield γ -Aminobutyric Acid(GABA) Mould Strain

BIAN Xin, WU Fei*

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In this study, different species of moulds were analyzed for effectiveness in fermenting cooked soybeans suspended in water (3:5, m/V) to produce γ -aminobutyric acid (GABA). As a result, *Aspergillus oryzae* 3.800 was found to have the highest GABA producing ability. The strain was mutagenized by UV irradiation for 2 min. For secondary screening, the resulting mutant strains were cultured initially in PDA medium containing 1 g/100 mL L-glutamic acid and then in soybean suspension. A stable high-yield mutant named as 3.800-4 was obtained. The GABA yield of the mutant was 4.491 g/L during culture in PDA medium containing 1 g/100 mL L-glutamic acid and 0.874 g/L during culture in soybean suspension, which was increased by 23.58% and 29.67%, respectively, compared with the original strain.

Key words: γ -aminobutyric acid; mould; screening; UV-induced mutagenesis; high-yield mutant strain

中图分类号: TS214.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0213-04

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)又名氨酪酸、哌啶酸, 是一种广泛分布于动植物中的非蛋白质氨基酸^[1], 是哺乳动物脑内的抑制性递质。近年来, 随着学者们对GABA的研究不断深入, 其降血压^[2]、治疗癫痫^[3-4]和焦虑症^[5]等众多功效相继被发现。这也使得GABA受到了食品、医疗行业人士的广泛关注。因此, 在前人研究的基础上, 如何提高GABA的产量成为了目前国内外的研究热点。

目前, GABA主要是通过谷氨酸脱羧酶催化谷氨酸转化而成的^[6]。而乳酸菌^[7-9]、霉菌^[10-12]、酵母菌^[13-14]以

及其他微生物中含有这种酶, 因此, 可通过提取谷氨酸脱羧酶或通过微生物发酵来生产GABA。本研究从食用级霉菌着手, 以大豆-水(3:5, m/V)的发酵培养基进行发酵, 筛选出GABA的高产菌株, 然后利用紫外线对高产菌株进行诱变处理, 并通过抗性初筛获得长势较好的突变菌株, 再依次利用含有质量浓度为1g/100mL L-谷氨酸的PDA综合培养基和大豆-水溶液的发酵培养基进行两次筛选, 得到高产GABA突变菌株, 最后对其作传代培养和发酵, 以确定其遗传稳定性。

收稿日期: 2011-10-21

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(C200942)

作者简介: 边鑫(1986—), 男, 硕士, 研究方向为农产品加工与贮藏工程。E-mail: bianbian1225@163.com

*通信作者: 吴非(1968—), 女, 教授, 博士, 研究方向为农产品加工与贮藏工程。E-mail: wfneau@163.com

1 材料与方法

1.1 乳酸菌菌株

根霉3.866、黑曲霉3.4309、米曲霉3.5232、米曲霉3.800、黑曲霉3228及从东北传统大酱中分离出的3株霉菌,分别命名为黑曲霉A、黑曲霉B、米曲霉C。

1.2 试剂

GABA标准品 美国Sigma公司;四硼酸钠(硼砂)天津市光复精细化工研究所;次氯酸 天津富宇精细化工有限公司;苯酚 沈阳东兴试剂厂;乙醇 天津市海滨科迪化学试剂有限公司。

1.3 培养基

PDA综合培养基:取去皮马铃薯200g,切成小块,加水1.0L,煮沸30min,滤去马铃薯块,将滤液补至1.0L。取马铃薯浸取液1.0L加入葡萄糖20.0g、 KH_2PO_4 3.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g、 VB_1 微量(固体培养基中加琼脂15.0g),调pH值为6.0。分装后121℃灭菌20min备用。

察氏培养基:硝酸钠3g、磷酸氢二钾1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、氯化钾0.5g、硫酸亚铁0.01g、蔗糖30g,蒸馏水1000mL,加热溶解,分装后121℃灭菌20min备用。

霉菌发酵基质:取大豆加水浸泡6~8h,沥干后置于锅内煮熟,将煮熟的大豆冷却后碾碎并加入适量的水,使大豆和水的比例为3:5,混匀后备用。

1.4 仪器与设备

巴士杀菌机 上虞华丰食品机械有限公司;高压湿热灭菌锅 上海博讯实业有限公司医疗器械厂;722可见分光光度计 上海菁华科技仪器有限公司;振荡培养箱 常州国华电器有限公司;超净台 苏州净化设备有限公司。

1.5 方法

1.5.1 霉菌菌种的活化

用接种环从接有不同霉菌菌株的试管斜面上各挑取一环孢子分别接入50mL PDA液体培养基和察氏培养基中,在28℃条件下活化培养72h,然后分别从50mL PDA液体培养基和察氏培养基中吸取7.5mL菌液于250mL PDA液体培养基和察氏培养基中,于28℃振荡培养72h后备用。

1.5.2 Berthelot比色法^[15]测定GABA

1.5.2.1 比色法标准曲线的绘制

准确称量 γ -氨基丁酸500.000mg于500mL容量瓶中用蒸馏水溶解、定容为1mg/mL标准溶液,使用时准确配制0、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00mg/mL的GABA标准溶液系列。分别从配制好的GABA标准溶液中取出1mL,再依次加入0.01mol/L四硼酸钠缓冲液1mL,6g/100mL苯酚溶液1mL,7.5g/100mL次氯酸钠溶液2.5mL,混匀,沸水浴10min,立即冰浴5min,待溶液出现蓝绿色后,加

入60%乙醇溶液2mL后于645nm波长处测定吸光度。以吸光度(y)为纵坐标,各标准溶液质量浓度为横坐标(x,mg/mL)作图得标准曲线,并建立回归方程: $y = 0.8781x - 0.0469 (R^2 = 0.9914)$ 。

1.5.2.2 样品中GABA含量的测定

将样品于5000r/min离心20min,然后取上清液1mL于试管中,加入0.01mol/L四硼酸钠缓冲液1mL,6g/100mL苯酚溶液1mL,7.5g/100mL次氯酸钠溶液1mL,混匀,沸水浴10min,立即冰浴5min,待溶液出现蓝绿色后,加入60%乙醇溶液2.0mL后于645nm测定吸光度并记录数据。将吸光度带入标准曲线进而求出相应的GABA含量。

1.5.3 高产GABA霉菌菌株筛选

将5株不同的霉菌和从大酱中分离出的3株霉菌分别接种于察氏液体培养基和PDA综合培养基中振荡培养72h。取8个三角瓶分别倒入等量的霉菌发酵基质,并用封口膜封好进行巴氏杀菌,杀菌后取其中一个三角瓶直接测其GABA含量,然后以3%的接种量分别接入到剩下瓶中。在28℃条件下振荡发酵72h,发酵期间每隔6h取样一次,用比色法对GABA产量进行测定,通过GABA产量的比较获得高产霉菌菌株。

1.5.4 霉菌紫外诱变及抗性初筛和复筛

取培养好的高产GABA霉菌斜面,向斜面中加入10mL生理盐水,振荡,洗下孢子,然后将孢子倒入盛有玻璃珠的三角瓶中,摇床振荡30min。取振荡后的菌液进行血球板计数,然后调整活菌数为 10^5 。开启紫外灯(18W,距离24cm)预热30min,然后开启搅拌器,打开皿盖用紫外灯垂直照射0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5min,每个诱变做3个,然后取照射菌液0.5mL分别稀释到 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 涂布于含有适当质量浓度代谢产物GABA的PDA平板上,每个稀释度涂3只平板,倒置于28℃恒温培养箱中培养96h进行抗性初筛。根据平板中菌落的长势情况,挑选出菌落长势较好的平板,对其菌落数及致死率进行统计,取致死率在85%以上且长势较好,形态饱满的单菌落移入PDA斜面培养72h,用接种环挑取菌丝一针接入含有质量浓度为1g/100mL L-谷氨酸的PDA综合培养基中培养96h后测定GABA产量进行复筛并计算正突变率。

1.5.5 高产GABA突变菌株的二次复筛

取GABA产量较高的正突变菌株分别以3%的接种量接入霉菌发酵基质中,在28℃恒温条件下发酵72h,根据发酵过程中GABA最大含量进行复筛,最终得高产GABA霉菌突变菌株。

1.5.6 高产GABA突变菌株遗传稳定性分析

将经过筛选得到的高产菌株连续传代8次,每2代取一次菌液进行发酵,测定发酵液中GABA产量,以确定重组菌株的遗传稳定性。

1.5.7 统计分析

本实验的数据通过Microsoft Excel 2003进行处理。

2 结果与分析

2.1 霉菌在发酵过程中GABA积累量随发酵时间的变化情况

为了筛选出高产GABA霉菌菌株, 本实验将8株霉菌菌株培养至稳定期后进行接菌发酵, 通过发酵过程中GABA积累量的最大值对霉菌菌株进行筛选, 表1为8株霉菌菌株的GABA积累量随发酵时间的变化情况。发酵培养基本身就含有GABA, 含量为0.801g/L。同时发现8株霉菌菌株在发酵4h左右开始生产GABA, 当发酵36h时黑曲霉B的GABA产量首先到达最大, 为0.346g/L; 当发酵40h时, 米曲霉3.5232、黑曲霉A和米曲霉C的GABA产量达到最大, 分别为0.282、0.601g/L和0.382g/L; 当发酵44h左右时, 根霉3.866、黑曲霉3.4309和黑曲霉3228的GABA产量达到最大, 分别为0.382、0.482g/L和0.401g/L; 而当发酵到48h左右时, 米曲霉3.800的GABA产量才达到最大, 为0.674g/L。通过几个最大GABA产量的比较, 可见米曲霉3.800的GABA产量最大, 因此, 通过筛选得出, 米曲霉3.800为高产GABA乳酸菌, GABA产量为0.674g/L。

2.2 米曲霉3.800紫外诱变时间的选择

由于不同菌种对紫外线敏感程度不同, 本实验通过紫外线不同照射时间对米曲霉3.800的致死率和正突变率的双重影响来确定最佳紫外照射时间, 结果如图1所示。

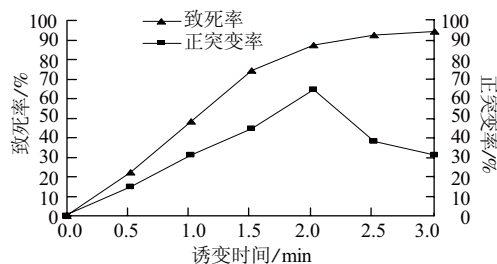


图1 紫外线照射时间对米曲霉3.800致死率与正突变率的影响
Fig.1 Effect of UV irradiation time on the death rate and positive mutation rate of *Aspergillus oryzae* 3.800

由图1可知, 随着紫外线照射时间的增加, 米曲霉3.800的致死率也逐渐增加, 0~2min时随着紫外线照射时间的增加, 菌株的突变率也随之增加; 2~3.5min时菌株的突变率有所下降。当紫外照射时间达到2min时, 米曲霉3.800的致死率为86%, 这时其正突变率最大, 达到63.3%, 因此确定紫外线最佳照射时间为2min。

2.3 米曲霉3.800紫外诱变的初筛和复筛及遗传稳定性

表2 紫外诱变后得到的正突变菌株
Table 2 GABA yields of positive mutant strains from *Aspergillus oryzae* 3.800

原菌株和正突变菌株	GABA产量/(g/L)	正突变菌株	GABA产量/(g/L)
米曲霉3.800	3.634	3.800-16	3.962
3.800-2	3.689	3.800-17	4.044
3.800-3	3.734	3.800-19	3.862
3.800-4	3.835	3.800-21	3.780
3.800-5	4.491	3.800-22	3.953
3.800-7	3.679	3.800-24	3.665
3.800-10	3.926	3.800-25	3.880
3.800-11	4.190	3.800-26	3.752
3.800-13	3.807	3.800-28	3.652
3.800-14	3.545	3.800-29	3.716

表1 不同霉菌菌株在发酵过程中GABA积累量随发酵时间的变化情况

Table 1 GABA yields of different species of moulds

发酵时间/h	GABA产量/(g/L)							
	根霉3.866	黑曲霉3.4309	米曲霉3.5232	米曲霉3.800	黑曲霉3228	黑曲霉A	黑曲霉B	米曲霉C
0	0.801	0.801	0.801	0.801	0.801	0.801	0.801	0.801
4	0.819	0.819	0.810	0.855	0.810	0.828	0.810	0.837
8	0.828	0.892	0.837	0.910	0.828	0.883	0.837	0.919
12	0.846	0.937	0.865	0.956	0.865	0.937	0.865	0.974
16	0.883	0.983	0.892	1.120	0.919	1.029	0.928	1.020
20	0.937	1.065	0.846	1.183	0.947	1.101	0.828	1.047
24	0.819	1.120	0.819	1.010	1.019	0.974	0.855	0.892
28	0.892	1.019	0.919	1.174	0.901	1.147	0.992	1.010
32	0.965	1.074	0.956	1.256	0.983	1.229	1.111	1.083
36	1.010	1.165	1.038	1.329	1.074	1.256	1.147	1.138
40	1.065	1.229	1.083	1.393	1.138	1.402	1.120	1.183
44	1.183	1.283	1.047	1.420	1.202	1.347	1.074	1.147
48	1.092	1.220	1.019	1.475	1.074	1.311	0.974	1.156
52	0.983	1.074	0.956	1.393	0.974	1.220	1.111	1.101
56	1.019	1.202	0.992	1.156	1.029	1.284	1.083	1.129
60	0.956	1.156	0.974	1.274	1.010	1.202	1.047	1.092
64	0.910	1.129	0.947	1.229	0.983	1.174	1.029	1.065
68	0.865	1.110	0.901	1.147	0.965	1.156	1.001	1.047
72	0.837	1.101	0.883	1.092	0.937	1.147	0.983	1.038

将米曲霉3.800在紫外线下处理2min后稀释涂布于含有适当质量浓度代谢产物GABA的平板100个,培养96h后进行抗性初筛,根据平板中菌落的长势,选出30个长势较好的平板,挑取单菌落接入含有1g/100mL L-谷氨酸的PDA综合培养基中发酵,获得正突变菌株19株,正突变率为63.3%,正突变菌株的GABA产量见表2。有3株突变菌株的GABA产量相对较高,命名为3.800-5、3.800-11和3.800-17, GABA产量分别为4.491、4.190、4.044g/L,比原菌株分别提高了23.58%、15.30%、11.28%。

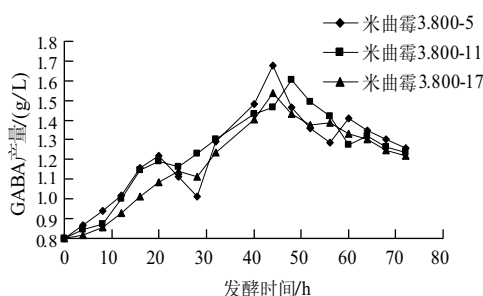


图2 正突变菌株在发酵过程中GABA积累量随时间变化情况
Fig.2 GABA accumulation by mutant strains 3.800-5, 3.800-11 and 3.800-17 during fermentation

将菌株3.800-5、3.800-11和3.800-17共3株高产GABA正突变菌株接入霉菌发酵培养基中发酵,每隔4h测定GABA产量1次,结果如图2所示。可以发现3.800-5和3.800-17发酵到44h时,产量达到最大,分别为0.874g/L和0.738g/L,而3.800-11发酵到48h时,产量达到最大,为0.802g/L。3株突变菌株比原菌株的GABA产量分别提高了29.67%、9.50%和18.99%。因此,再对3.800-5和3.800-11两株突变菌株进行遗传稳定性实验,结果见图3。

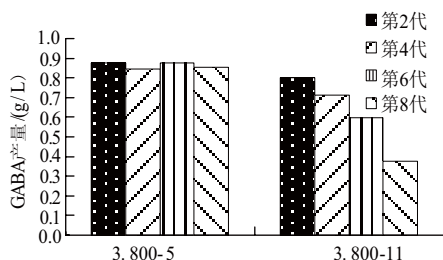


图3 紫外诱变筛选的突变菌株产GABA遗传稳定性
Fig.3 Genetic stability of mutant strains 3.800-5 and 3.800-11

由图3可知,突变菌株3.800-5在连续传代8次后,GABA产量比较稳定,而突变菌株3.800-11的GABA产量明显下降,说明3.800-5比3.800-11有更稳定的产GABA能力。因此,通过紫外诱变获得一株稳定的高产GABA突变菌株3.800-5,其GABA产量为0.874g/L,原菌株的产量提高了29.67%。

3 结论

3.1 以大豆-水(3:5, m/V)的发酵培养基为发酵基质,利用比色法测定其GABA含量,根据GABA的最大积累量对8株霉菌菌株进行筛选,结果表明:米曲霉3.800为高产GABA霉菌, GABA产量为0.674g/L。

3.2 以米曲霉3.800作为出发菌株,对其进行紫外诱变处理,从而获得高产GABA突变菌株,实验结果表明,利用紫外线对米曲霉3.800进行处理的最佳照射时间为2min。

3.3 在最佳的紫外照射时间下,最终筛选出一株稳定的高产GABA突变菌株3.800-5,其在含有1g/100mL L-谷氨酸的PDA综合培养基中的GABA产量为4.491g/L,比原菌株的GABA产量提高了23.58%;同时其在大豆-水(3:5)的发酵培养基中发酵的GABA产量为0.874g/L,原菌株的产量提高了29.67%。

参考文献:

- [1] 陈恒文,林健. 桑叶中 γ -氨基丁酸的研究概述[J]. 食品工业科技, 2008(8): 298-304.
- [2] GARCÍA M C, ADLER-GRASCHINSKY E, CELUCH S M. Role of CGRP and GABA in the hypotensive effect of intrathecally administered anandamide to anesthetized rats[J]. European Journal of Pharmacology, 2006, 532: 88-98.
- [3] JONES-DAVIS D M, MACDONALD R L. GABA(A) receptor function and pharmacology in epilepsy and status epilepticus[J]. Current Opinion in Pharmacology, 2003, 3(1): 12-18.
- [4] 于霞,史正刚,姬可平. GABA受体在儿童失神性癫痫发病机制中的作用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2004, 12(5): 10-11.
- [5] 李瑞芝,郭建友,李昌煜,等. 焦虑症 γ -氨基丁酸受体机制与药物干预研究进展[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(9): 1135-1138.
- [6] 叶惟伶. γ -氨基丁酸的发现史[J]. 生理科学进展, 1986, 17(2): 187-189.
- [7] YOKOYAMA S, HIRAMATSU J, HAYAKAWA K. Production of γ -aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO-12005[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 93(1): 95-97.
- [8] 李远宏,吕凤霞,邹晓葵. 新鲜奶中产 γ -氨基丁酸乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 198-202.
- [9] 李海星,江英英. 产 γ -氨基丁酸乳酸菌的筛选及初步鉴定[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(3): 455-510.
- [10] 蒋冬花,后家衡,李杰,等. 红腐乳中高产 γ -氨基丁酸红曲霉菌株的筛选[J]. 浙江师范大学学报:自然科学版, 2007, 30(4): 448-452.
- [11] 叶硯,蒋冬花,嵇豪. 响应面法优化红曲霉X27液态发酵产 γ -氨基丁酸工艺条件[J]. 中国粮油学报, 2010(9): 106-110.
- [12] SU Y C, WANG J J, LIN T T, et al. Production of the secondary metabolites γ -aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*[J]. Ind Microbiol Biotechnol, 2003, 30(1): 41-46.
- [13] 蒋冬花,李杰,后家衡. 水果表面高产 γ -氨基丁酸酵母菌株的筛选、鉴定和发酵条件优化[J]. 浙江农业学报, 2008, 20(6): 396-401.
- [14] 黄丽华,胡超,左斌,等. 高产 γ -氨基丁酸酵母菌株的亚硝基胍诱变选育[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(6): 1106-1109.
- [15] KITAOKA S, NAKANO Y. Colorimetric determination of ω -amino acids[J]. Journal of Biochemistry, 1969, 66(1): 87-94.