

耐促溶剂雷斯青霉菌株 N^+ 注入诱变选育

刘莎 毛淑红 胡晓杰 周瑶 路福平

(天津科技大学生物工程学院 天津 300457)

摘要 在甾体生物催化过程中, 向发酵液中添加亲水性有机溶剂, 是增加底物溶解进而提高转化效率的有效手段, 但有机溶剂对于菌体普遍具有毒性。为此采用 N^+ 注入诱变方法, 对出发菌株雷斯青霉 p-10-8 进行改良, 获得耐促溶剂菌株 60 A-5-8, 当投料量增大到 4% 时转化率达 82.61%。经过 5 次传代实验证明, 该菌株具有较高的遗传稳定性。

关键词 生物催化, 雷斯青霉, 离子注入

中图分类号 Q81, Q93, S603, Q68

孕二烯酮(化学名: 18,19-二去甲基孕甾-4,15-二烯-13-乙基-17 β -羟基-3-羰基-20-炔)是迄今为止孕激素活性最强的甾体激素药物, 因其具有口服吸收快速完全、副作用小等优势成为目前最为理想的口服避孕药。15 α -羟基左旋乙基甾烯双酮是孕二烯酮重要中间体, 目前主要通过化学合成获得, 因反应效率低, 不但其成本昂贵, 且对环境污染严重。因此, 人们开始研究应用生物催化方法生产 15 α -羟基左旋乙基甾烯双酮。生物催化方法是利用生物催化剂(主要是酶或微生物)来改变(通常是加快)化学反应速度。所用生物催化剂主要包括雷斯青霉(*Penicillium raistrickii*)^[1,2]、雪腐镰刀菌(*Fusarium nivale*)^[3]等完整细胞。但是, 由于目前该工艺存在着转化率低及能耗高等问题, 例如, 当以 3 g/L 的左旋乙基甾烯双酮为底物时, 通过雷斯青霉进行羟基化, 转化率仅为 66.5%^[4], 所以, 一直未实现工业化生产。

在甾体生物催化工艺中, 甾体底物溶解及传递是甾体生物催化过程中的关键技术^[5]。在实际生产过程中, 人们使用各种方法来降低底物溶解问题所带来的传质限制^[6]。其中较为有效的手段是在发酵液中加入亲水性有机溶剂以加快底物的溶解^[7]。但有机溶剂对菌体都有一定的毒性, 所以关键是要找到对有机溶剂具有较高耐性的微生物, 这些微生物所表达出的酶对有机溶剂也会有较高的耐性^[8], 因而可以提高转化效率。近年来耐有机溶剂的极端微

生物已成为该方向上的研究热点。采用低能重 N^+ 注入诱变方法筛选耐促溶剂的菌株, 以达到提高底物投料量进而提高转化效率的目的。

N^+ 注入是一种新的诱变方法, 它不仅可以影响细胞的生理生化功能还能引起细胞中遗传物质的改变, 具有突变率高和突变谱广等特点^[9-12]。 N^+ 注入诱变育种是集化学诱变、物理诱变为一体的综合诱变方法。它能够引起染色体的畸变, 导致 DNA 碱基的损伤、断裂, 从而使遗传物质在基因水平或分子水平上发生改变或缺失, 大幅度提高变异频率。目前工业进行甾体生物催化的微生物大多是霉菌, 而近几年利用 N^+ 注入育种获得霉菌高产菌株, 成果显著, 正突变率高、生产水平提高幅度大^[13]。如杨英歌等^[13]在研究 L(+)-乳酸生产菌(米根霉 *Rhizopus oryzae*; RLC41-6)诱变过程中, 发现 N^+ 注入米根霉可获得较 X 射线、 γ 射线及化学诱变剂等更高的正突变率和更大的变异幅度。这一方法为分离筛选所需的高产菌株提供了更大的机会。由于各种物理化学诱变所产生的诱变效应是随机的, 利用初筛培养基作为辅助筛选手段进行定向筛选, 可以降低工作量, 有效提高筛选效率。

本工作采用 N^+ 注入技术对雷斯青霉(*Penicillium raistrickii*) ATCC 10490 进行诱变处理, 以期得到适于工业生产的高转化率突变株, 并考察该技术在霉菌选育方面的应用价值。

国家 863 项目(2011AA02A211)、天津市高等学校科技发展基金计划项目(20100601)、天津科技大学人才引进基金(20080436)资助

第一作者: 刘莎, 女, 1986 年 7 月出生, 2009 年毕业于山西农业大学, 现为天津科技大学生物工程学院 2009 级在读硕士研究生, 研究方向为微生物与生化药学

通讯作者: 路福平, Email: lfp@tust.edu.cn

收稿日期: 初稿 2011-08-30, 修回 2011-11-20

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 雷斯青霉 (*Penicillium raistrickii*) ATCC 10490, 美国菌种保藏中心。

1.1.2 仪器 低能 N^+ 注入机, 郑州大学物理工程学院; WS2-134-75 电热恒温培养箱, 天津实验仪器厂; HYG-II 性回旋式恒温调速摇床柜, 上海欣蕊自动化设备有限公司; 高效液相色谱, Agilent 科技有限公司; ODS-C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 10 μ m), 大连依利特科学仪器有限公司。

1.1.3 培养基及其组成 固体培养基 ($g \cdot L^{-1}$): 麦芽提取物 20, 葡萄糖 15, 蛋白胨 1, 琼脂粉 20, pH 值自然。

液体培养基 ($g \cdot L^{-1}$): 葡萄糖 30, 玉米浆 10, $NaNO_3$ 2, KH_2PO_4 1, K_2HPO_4 0.5, $MgSO_4$ 0.5, $FeSO_4$ 0.02, KCl 0.5, pH 7.0-7.5。

初筛培养基: 在液体培养基中加入 80 mL/L 1,2-丙二醇。

复筛培养基: 在液体培养基中加入 40 mL/L 1,2-丙二醇和 3g/L 左旋乙基甾烯双酮。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法 斜面培养: 将试验菌株接种于固体培养基斜面上, 28℃ 下活化培养 7 d, 然后将活化后的菌株转接于固体培养基斜面上 28℃ 下培养 7 d, 于 4℃ 保存备用。

1.2.2 摇瓶培养 取新鲜的雷斯青霉孢子斜面一支, 加入 10 mL 无菌水, 洗脱孢子, 置于含玻璃珠的三角瓶中震荡, 然后根据菌体的数量用无菌水对其进行稀释, 调整孢子浓度为 $10^{10}/mL$ 。取 2 mL 接于装有 50 mL 液体培养基的三角瓶 (250 mL) 中, 以 180 r/min 的恒温 (28℃) 摇床振荡培养。

1.2.3 诱变方法 取新鲜的雷斯青霉孢子斜面一支, 加入 10 mL 无菌水, 洗脱孢子, 置于含玻璃珠的三角瓶中震荡, 然后根据菌体的数量用无菌水对其进行稀释, 调整孢子浓度为 $10^{10}/mL$ 。取孢子悬浮液 0.1 mL 均匀涂布于直径 30 mm 的灭菌培养皿内, 培养皿露置于净化工作台上, 用无菌风将平板表面的水迹吹干。将上述制备好的样品放入低能加速器 (郑州大学离子注入机) 的靶室内 (真空度约 6 Pa), 用初始能量为 30 keV 的 N^+ 分别处理 3 个样品, 单次脉冲时间为 6 s, 单次注入离子剂量率为 $1 \times 10^{14}/cm^2 \cdot s$ 。 N^+ 注入后接入初筛培养基中培养。

1.2.4 筛选方法 (1) 出发菌株的筛选。对实验室保藏的 16 个雷斯青霉菌种进行液体摇瓶发酵, 每个菌种设 3 个重复。生长 36 h 后, 加入 3% 左旋乙基甾烯双酮进行转化, 测定转化率, 确定出发菌株。

(2) 初筛方法的确定。在摇瓶培养基中分别加入 2%、4%、6%、8%、10% 的 1,2-丙二醇, 测定 1,2-丙二醇对于出发菌株的致死浓度。设计初筛培养基时采用含致死浓度的 1,2-丙二醇液体培养基, 挑选在此培养基中能正常生长的菌株, 以备复筛之用。

(3) 复筛方法的确定。将已制备好的孢子悬液接入到发酵培养基中, 接种量为 $10^{10}/mL$, 培养温度为 28—32℃, 培养时间 30—36 h, 此时发酵液中已生成直径大小为 0.9—3.0 mm 的球状菌丝体, 然后加入 4% 的 1,2-丙二醇和 3% 左旋乙基甾烯双酮进行转化, 温度为 28℃, 摇床转速为 180 r/min, 转化时间 96 h, 检测转化率。

1.2.5 分析方法 取 500 μ L 发酵液于离心管中加入等体积乙酸乙酯萃取 30 min, $12000 r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液 100 μ L 挥干乙酸乙酯, 加入 1000 μ L 甲醇溶解用高效液相色谱法进行检测。高效液相色谱条件 C_{18} 柱 (4.6 mm×250 mm), 流动相为甲醇: 水 (80:20) 流速 1 mL·min⁻¹ 检测波长 241 nm。

2 结果和分析

2.1 出发菌株的选取

通过对实验室保藏的 16 个雷斯青霉菌种进行左旋乙基甾烯双酮转化的摇瓶初筛考察。选择转化率较高的菌株作为出发菌株, 经过复壮后, p-10 菌株的转化率达到 60.85%。将上述试验中转化率较高的菌株 p-10 进行分离纯化, p-10-8 的转化率为 63.33%, 比原菌株 p-10 提高了 3%—4%, 适合作为诱变的出发菌株。

2.2 不同浓度 1,2-丙二醇对出发菌株孢子生长的影响

在孢子数为 $1.56 \times 10^{10}/mL$ 的发酵培养基中分别加入 2%、4%、6%、8%、10% 的 1,2-丙二醇。从表 1 可以看出, 随着 1,2-丙二醇浓度的提高, 孢子的存活率随之下降。当 1,2-丙二醇浓度达到 80 mL/L 时, 孢子的致死率达到 100%。所以选择 80 mL/L 的 1,2-丙二醇浓度作为诱变后初筛培养基的促溶剂浓度。

Table 1 The relationship between the mortality of *Penicillium raistrickii* spore and the concentration of 1,2-propanediol

1,2-propanediol / mL · L ⁻¹	Lethal rate / %
0	0
20	28.6
40	42.9
60	69.85
80	100.00

2.3 离子注入诱变菌株的筛选结果

2.3.1 离子注入剂量的确定 本实验利用含有有机溶剂致死剂量的培养基作为初筛手段，极大降低筛选工作量。以菌株 p-10-8 为出发菌株，菌悬液样品

的注入剂量分别 8×10^{14} 、 10×10^{14} 、 30×10^{14} 、 40×10^{14} 、 50×10^{14} 、 60×10^{14} 、 80×10^{14} 、 $90\times10^{14}/\text{cm}^2$ ，每个注入剂量做一个真空对照。将 N⁺注入诱变后筛选出的耐有机溶剂的菌株与出发菌株对照计算突变率，其结果见表 2。从表 2 中的数据可以看出，随着注入剂量的增加，突变率也随之增加，但达到一定注入剂量后，突变率又随之下降。注入剂量在 40×10^{14} — $50\times10^{14}/\text{cm}^2$ 范围内时，菌株的突变率较高。与邱强等^[14]研究结果不同，本实验的结果表明发生其耐有机溶剂的突变率，即正突变率最高的注入剂量并不在马鞍形区域内。小注入剂量时，能够产生 DNA 双链断裂损伤的菌株数少，或者在每个菌株的 DNA 上产生的双链断裂位点少，修复后的变异率低；随着注入剂量的增大，产生的 DNA 双链断裂损伤增加，修复后的变异数量也随之增加。进一步增加注入剂量，则由于细胞修复能力所限，死亡率增大，突变率也减小^[15,16]。

Table 2 The interest mutation rate of *Penicillium raistrickii* at different N⁺ion implantation doses

Concentration of 1,2 propanediol in culture medium	Ion implantation dose / $10^{14} \cdot \text{cm}^{-2}$							
	8	10	30	40	50	60	80	90
Mutation rate of 8% 1,2 propanediol screening medium/%	19.6	22.7	30.6	56.2	68.3	52.7	43.7	26.9
Mutation rate of 10% 1,2 propanediol screening medium/%	14.5	18.2	24.3	47.1	52.3	43.1	33.2	20.8

2.3.2 N⁺注入诱变后耐促溶剂突变株的筛选结果 经 N⁺注入诱变后，在初筛培养基中共挑取诱变菌株 80 株至斜面培养。经复筛后得到 1 株转化率较高的菌株 60A-5-8，其转化率为 75.25%，(各菌株的转化率见图 1)。

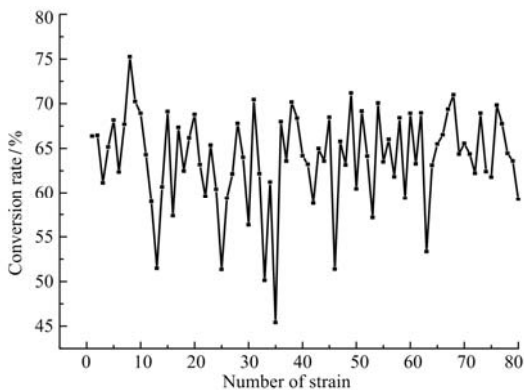


Fig.1 The conversion rate of 80 *Penicillium raistrickii* strains from the screening medium

2.3.3 菌株遗传稳定性考察 对以上诱变试验中筛选得到的高产突变株 60A-5-8 进行连续传代试验，

考察其遗传性状的稳定性。连续传代 5 代，每次传代后的菌株经培养以测定其转化率，传代至第 4 代和第 5 代时，其对左旋乙基甾烯双酮的转化率均维持在 75%左右，未出现衰退现象。这说明该突变株的遗传性能较为稳定。因此选择 60A-5-8 作为最终应用于生产上的菌株。

2.4 雷斯青霉菌株诱变前后菌球及菌丝形态的变化

经过诱变后的雷斯青霉菌株，其长出的菌丝比空白对照的菌丝稀疏，但其菌丝分支较空白对照菌株明显增多（见图 2）。由于菌丝分支多，在摇瓶培养时容易形成菌球但是其菌球直径明显减小（见图 3）。虽然诱变后的菌球与对照组相比，在形态上没有大的变化，都为圆形、白色，但由于菌球直径减小，比表面积增大，菌体生理代谢快，底物与菌丝接触面积也就越大，这些可能是诱变后的雷斯青霉菌株转化率提高的重要原因。

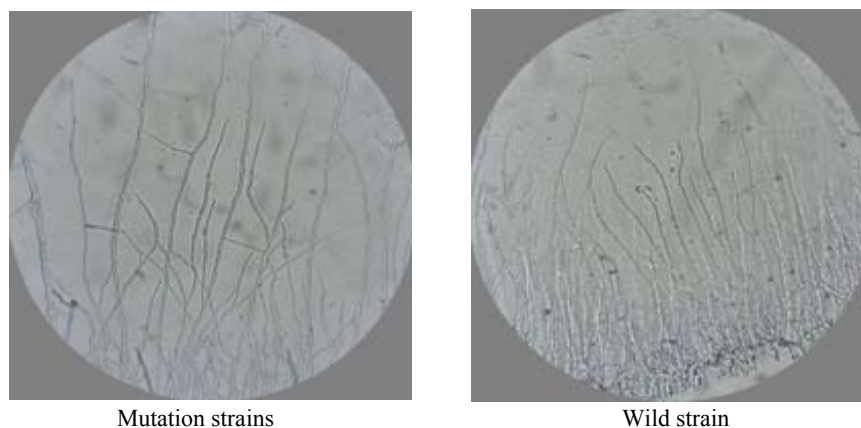


Fig.2 The branch of mycelium in mutagenesis increased due to ion implantation (Magnification 40×10 , incubation time in chamber culture: 36 h)

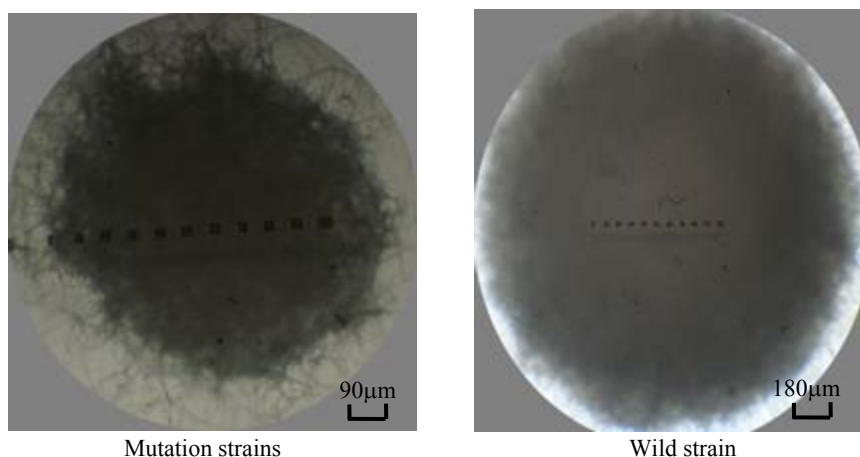


Fig.3 The diameter of pellet is reduced in mutagenesis induced by ion irradiation (Magnification 10×10 , incubation time in fermentation medium: 36 h)

2.5 N^+ 注入诱变对雷斯青霉菌株耐受 1,2-丙二醇的影响

由图 4 可知,野生菌株在 40mL/L 的 1,2-丙二醇浓度下,投料量 3%时转化率为 65.05%,但当 1,2-丙二醇浓度增加到 80mL/L 时,野生菌株已经不能存活。诱变后的菌株在 1,2-丙二醇浓度为 80 mL/L 时仍然能够存活,在 1,2-丙二醇浓度为 60 mL/L,投料量 3%时转化率最高为 79.32%,但是当继续加大 1,2-丙二醇的浓度为 100mL/L 时,转化率又有所下降,这说明对于诱变后的菌株 1,2-丙二醇的最适添加量为 60 mL/L。经过诱变后,雷斯青霉菌株对 1,2-丙二醇的耐受性有所提高。试验证明对细胞产生毒性的因素是有机溶剂在细胞膜内积累的浓度,而不是溶剂的化学结构^[17]。有机溶剂的作用基本位点是细胞膜,通过破坏脂双层,危害细胞。注入离子诱变后,一方面菌株的细胞膜磷脂双分子层的结构和组成可能发生了变化,进而影响细胞膜的流动性,能将对细胞有毒性的有机溶剂分子包裹到细胞的囊泡内,通过囊泡外排的形式,把有机溶剂分子

排出细胞外,从而消除或者降低有机溶剂对细胞的毒害作用^[18];另一方面, N^+ 注入可能诱导新的修复机制产生,以及菌体本身修复酶的激活,使得菌体所受促溶剂的伤害得以较快修复。这些综合作用使得诱变菌体受促溶剂的毒害作用有所减小,以利于其能够耐受更高浓度的促溶剂^[19]。

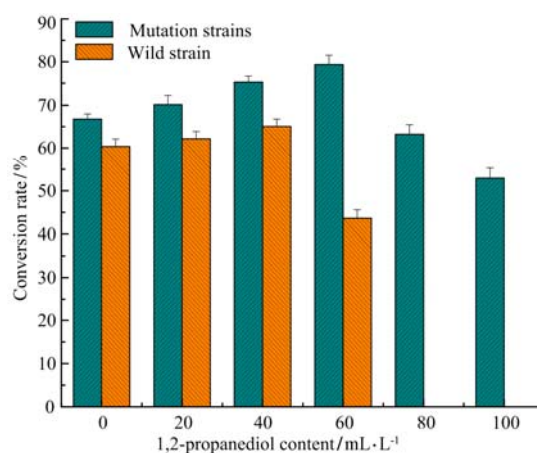


Fig.4 Effect of concentration of 1,2-propanediol on conversion rate of mutagenesis induced by ion irradiation and wild strains

2.6 N^+ 注入诱变对雷斯青霉菌株转化率的影响

将诱变后的菌株和对照菌株在 1,2-丙二醇浓度为 60 mL/L, 投料量为 1‰—5‰ 的范围内测其转化率(见图 5), 发现无论是野生菌株还是诱变后的菌株均在底物投料量为 4‰ 时转化率最高, 但诱变后的菌株转化率要高于野生菌株。这说明通过 N^+ 注入诱变使菌体细胞表面的通透性及结构产生变化。这些变化在提高有机溶剂耐受性的同时, 对把底物运输到细胞内部可能产生积极作用。

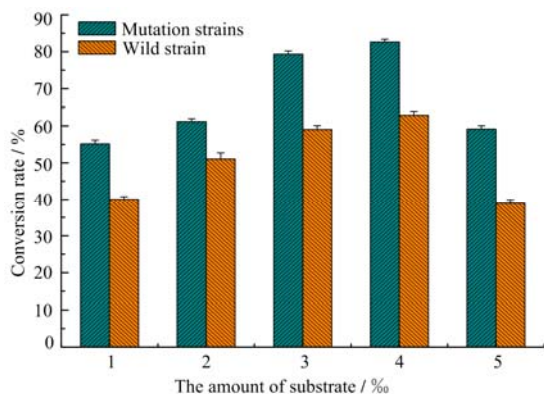


Fig.5 Effect of substrate concentration on the conversion rate of wild strains and mutation strains

3 结论

本试验结果表明, N^+ 注入诱变具有正突变率高, 突变株稳定性好等优点, 可以认为低能氮 N^+ 注入对雷斯青霉 (*Penicillium raistrickii*) 是一种比较理想的诱变技术。本次试验经过 N^+ 注入, 在含有 80 mL/L 1,2-丙二醇的液体初筛培养基中挑选出 80 株正常生长的菌株, 经含有 40 mL/L 1,2-丙二醇和 3 g/L 左旋乙基甾烯双酮的摇瓶复筛最终得到一株耐促溶剂高转化率菌株, 经摇瓶发酵, 在促溶剂添加量为 60 mL/L, 投料量 4‰ 时转化率最高可达 80% 以上, 相对于原始出发菌株, 投料量有所增加且转化率提高了 1.35 倍。

参考文献

- Schlosser D, Irrgang S, Schmauder H P. Steroid hydroxylation with free and immobilized cells of *Penicillium raistrickii* in the presence of β -cyclodextrin. *Appl Microbiol Biot*, 1993, **39**(1): 16-20
- Irrgang S, Schlosser D, Fritscher W. Involvement of cytochrome P-450 in the 15[α]-hydroxylation of 13-ethyl-gon-4-ene-3, 17-dione by *Penicillium raistrickii*. *J Steroid Biochem*, 1997, **60**(5-6): 339-346
- Fernandes P, Cruz A, Angelova B, *et al.* Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme Microb Tech*, 2003, **32**(6): 688-705
- 李骏, 耿旭, 翁亮, 等. *Penicillium raistrickii* 15 α 羟基化左旋乙基甾烯双酮工艺研究. *微生物学通报*, 2005, **32**(5): 87-91
- LI Jun, GENG Xu, WENG Liang, *et al.* Study on fermentation condition of steroid 15 α -hydroxylation by *Penicillium raistrickii*. *Microbiology*, 2005, **32**(5): 87-91
- 程茂基, 陈丽娟, 蔡克周, 等. N^+ 注入选育黑曲霉益生菌及其突变菌株产酶条件的研究. *微生物学报*, 2005, **45**(4): 534-538
- CHENG Maoji, CHEN Lijuan, CAI Kezhou, *et al.* Study on breeding of probiotic *Aspergillus niger* by N^+ implantation and fermentation condition of its mutant. *Acta Microbiol*, 2005, **45**(4): 534-538
- Goetschel R, Bar R. Formation of mixed crystals in microbial conversion of sterols and steroids. *Enzyme Microb Technol*, 1992, **14**(6): 462-469
- Smith M, Zahnley J, Pfeifer D, *et al.* Growth and cholesterol oxidation by mycobacterium species in tween 80 medium. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(5): 1425-1429
- Li S, He B F, Bai Z Z, *et al.* A novel organic solvent-stable alkaline protease from organic solvent-tolerant *Bacillus licheniformis* YP1A. *J Mol Catal*, 2009, **56**(2-3): 85-88
- 庞锐, 潘丽军, 姜绍通, 等. N^+ 注入诱变选育混合糖发酵 L-乳酸高产菌株. *食品科学*, 2010, **31**(21): 248-253
- PANG Rui, PAN Lijun, JIANG Shaotong, *et al.* Breeding of high-yield L-Lactic acid strains for co-fermentation of glucose and xylose by N^+ implantation. *Food Sci*, 2010, **31**(21): 248-253
- 赵南, 吴冬兰, 唐洪啟, 等. 氮离子注入井冈霉素产生菌诱变高产菌株的研究. *江西农业学报*, 2010, **22**(4): 122-123
- ZHAO Nan, WU Donglan, TANG Hongqi, *et al.* Study on mutation of high-yielding strain by injecting nitrogen ion into validamycin-producing strain. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2010, **22**(4): 122-123
- 丁丽霞, 黎继烈, 钟海雁. N^+ 注入诱变黑曲霉选育单宁酶生产菌株. *中南林业科技大学学报*, 2010, **30**(9): 141-144
- DING Lixia, LI Jilie, ZHONG Haiyan. Breeding of high-yield tannase strain from *Aspergillus niger* by N^+ implantation. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2010, **30**(9): 141-144
- 王陶, 李文, 陈宏伟, 等. 低能离子束生物工程及其应用研究进展. *徐州工程学院学报(自然科学版)*, 2009,

- 24(1): 6-10
WANG Tao, LI Wen, CHEN Hongwei, *et al.* A research of the progress in Low-energy Ion beam bioengineering and its applications. Chin J Xuzh Inst Tech (Natural Sciences Edition), 2009, 24(1): 6-10
- 13 杨英歌, 李文, 柳丹, 等. 氮离子注入选育高效发酵木糖生产 L(+)-乳酸的米根霉. 辐射研究与辐射工艺学报, 2007, 25(2): 80-84
YANG Yingge, LI Wen, LIU Dan, *et al.* Breeding L(+)-lactic acid high productive mutant from xylose by nitrogen ions. J Radiat Res Radiat Process, 2007, 25(2): 80-84
- 14 邱强, 杜连祥. N⁺离子注入选育高转化 15 α -羟基左旋乙基甾烯双酮雷斯青霉菌株的研究. 化学与生物工程, 2010, 27(9): 57-60
QIU Qiang, DU Lianxiang. Studies on breeding of high 15 α -Hydroxyl-13-ethyl-gon-4-en-3, 17-dione transforming strain *Penicillium Raistrickii* by N⁺ Ion Implantation. Chemistry & Bioengineering, 2010, 27(9): 57-60
- 15 刘少友, 金湘, 曾宪贤, 等. 离子注入微生物的生物效应研究. 新疆大学学报(自然科学版), 2003, 20(3): 277-279
LIU Shaoyou, JIN Xiang, ZENG Xianxian, *et al.* Study on the biological effect of microorganisms by ion beam implantation. J Xinjiang Univ (Nucl Sci), 2003, 20(3): 277-279
- 16 张宁, 虞龙. 低能 N⁺诱变 *B.trispora*(-)菌存活率-注量效应模型的构建. 辐射研究与辐射工艺学报, 2010, 28(2): 83-86
ZHANG Ning, YU Long. The construction of survival-dose effect model of *B.trispora* (-) implanted by low energy N⁺. J Radiat Res Radiat Process, 2010, 28(2): 83-86
- 17 Kieboom J, Dennis J J, Zylstra G J, *et al.* Active efflux of organic solvents by *Pseudomonas putida* S12 is induced by solvents. J Bacteriol, 1998, 180(24): 6769-6772
- 18 江欢, 舒正玉, 吴继光, 等. 耐有机溶剂极端微生物的耐受机制及应用. 微生物学通报, 2009, 36(11): 1744-1749
JIANG Huan, SHU Zhengyu, WU Jiguang, *et al.* Mechanisms for solvent tolerance and application of extremophile with organic solvent tolerance. Microbiology, 2009, 36(11): 1744-1749
- 19 XIE Chuanxiao, GUO Jinhua, CHENG Beijiu, *et al.* Preliminary studies on base substitutions and repair of DNA mismatch damage stimulated by low energy N⁺ beam implantation in *Escherichia coli*. Plasma Science Technology (in China), 2003, 5(1): 1677-1682

Screening of organic solvent tolerant *Penicillium raistrickii* induced by ion irradiation

LIU Sha MAO Shuhong HU Xiaojie ZHOU Yao LU Fuping

(The College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

ABSTRACT In the steroid biocatalytic process, adding hydrophilic organic solvent to the fermentation medium is an effective method to increase the substrate solubility and the conversion efficiency, but organic solvents are often toxic to mycelium. To solve this problem, the *Penicillium raistrickii* p-10-8 was mutated by N⁺ ion implantation, and an organic solvent tolerant strain named 60 A-5-8 was obtained, of which the conversion rate reached 82.61% when the amount of substrate increase 4%. In addition, the mutant strain shows high genetic stability even after 5 generations of cultivation.

KEYWORDS Biocatalysis, *Penicillium raistrickii*, Ion implantation

CLC Q81, Q93, S603, Q68