

重离子辐照柠檬酸菌株的诱变选育

胡伟^{1,2} 陈积红² 张珍¹ 刘敬² 王曙阳² 李文建²

¹ (甘肃农业大学食品科学与工程学院 兰州 730030)

² (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

摘要 应用不同剂量重离子束 $^{12}\text{C}^{+6}$ 对黑曲霉出发菌株 4 # 进行辐照选育, 选育出的高产酸菌株进行发酵试验, 应用酸碱中和法测定发酵液中柠檬酸的含量。结果表明: 当重离子 $^{12}\text{C}^{+6}$ 的辐照剂量为 60 Gy 时, 正突变率最大, 为 21%。诱变后的菌株通过酸斑法初筛、摇瓶复筛选育出 1 株菌株 H4002, 其发酵液中柠檬酸含量比出发菌株 4 # 提高了 18%。这说明利用重离子束 $^{12}\text{C}^{+6}$ 辐照处理黑曲霉产生菌可以得到高产柠檬酸突变菌株, 其诱变效果显著。

关键词 黑曲霉, 重离子束, 诱变, 选育

中图分类号 Q939.9, Q691.5, Q815

柠檬酸又名枸橼酸, 是一种重要的有机酸, 分子式为 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 。它广泛应用于食品、医药、化工等行业。柠檬酸最早是从柠檬中分离出来的有机酸, 后来科研人员发现它是黑曲霉和解脂假丝酵母等微生物利用糖质原料发酵产生的一种初级代谢产物^[1]。随着人们生活水平日益提高, 柠檬酸的需要量也在逐年增加, 仅国内年产量就达到了 120 万吨以上。全世界柠檬酸发酵工业主要依靠黑曲霉菌种进行深层液体发酵生产, 所以提高菌种的发酵产率具有十分重要的意义。

研究表明, 重离子诱变与传统诱变源相比, 除有能量沉积外, 还有动量传递、质量沉积及电荷交换等效应, 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, 具有损伤轻、突变率高和突变谱广等特点^[2]。从某种意义上讲, 重离子诱变相当于复合诱变, 其注入过程非常复杂。其机理如下: 从重离子注入到终点生物学效应, 需经历物理、化学和生物学 3 个阶段。辐照初期, 入射离子的能量较高, 主要同微生物菌体中的分子和原子发生非弹性碰撞, 使微生物体组成大分子发生电离或激发, 从而产生电离损伤; 随着离子能量的不断损失, 当能量小于 0.1 MeV/u 时, 主要表现为与原子核的弹性碰撞, 导致原子移位, 留下空位和断键; 随着入射离子在入射径迹中前进, 离子能量的传递、原子的电离及入射离子的沉积, 与靶分子所交换的能量急剧地被释放出来, 由此形成一个电离

密度相对较高的能量损失峰, 即 Bragg 峰。正因为离子能量突然能量损失, 随后离子迅速慢化、沉积下来, 与生物碱基、氨基酸以及生物体组织中的某些成分发生反应, 产生新的化合物; 同时还引发生物细胞表面的二次粒子和电子溅射, 造成细胞表面的穿孔效应, 有利于后续离子对细胞的直接刻蚀, 最终导致 DNA 损伤和生物体变异^[3]。

多年来, 众多学者对黑曲霉采用了多种不同传统诱变方法改良其遗传特性, 为提高柠檬酸产量做了大量研究。近年来, 国内外已有研究者通过氮离子注入诱变黑曲霉菌株, 成功获得了柠檬酸产能大幅度提高、遗传性稳定的菌株^[4-6]。但重离子束 $^{12}\text{C}^{+6}$ 能否诱导黑曲霉得到高产柠檬酸变异菌株未见研究报道。鉴于此, 本研究采用重离子束 $^{12}\text{C}^{+6}$ 对黑曲霉进行了诱变处理, 以期获得高产柠檬酸的突变菌株。

1 实验材料与方法

1.1 菌种

黑曲霉 (*Aspergillus niger* strain), 由中国科学院近代物理研究所生物物理室提供。

1.2 培养基及培养条件

斜面培养基: PDA 培养基。平板筛选培养基: PDA 培养基, 溴甲酚绿。麸皮培养基: 麸皮, 用自来水配制。发酵培养基: 玉米淀粉, 全玉米粉, 豆

中国科学院科技支甘项目 (KJZG-2011-002) 资助

第一作者: 胡伟, 男, 1988 年 1 月出生, 2012 年 7 月于甘肃农业大学获硕士学位, 研究方向为微生物诱变育种

通讯作者: 陈积红, Email: chjh@impcas.ac.cn

收稿日期: 初稿 2011-06-27, 修回 2011-08-29

饼粉, 麸皮, α -淀粉酶, pH 自然, 用自来水配制。培养条件: 温度 36℃、转速 300 r/min、湿度 45%–50%、培养时间 90 h。

1.3 诱变及筛选方法

1.3.1 辐照前孢子悬液的制备 取 34.5℃ 恒温恒湿培养 7 d 的黑曲霉菌株新鲜斜面, 加无菌生理盐水 40 mL, 刮下孢子, 移入装有玻璃珠的三角摇瓶中, 置摇床上振荡 10 min, 打散成单个孢子, 用三层脱脂纱布过滤。滤液用血球计数板计数, 调整孢子浓度至 10^6 个/mL 即成单孢子悬液。

1.3.2 辐照诱变及重离子束 $^{12}\text{C}^{+6}$ 的辐照参数 取上述制备的孢子悬液 3 mL 置辐照皿中, 用封口膜封好辐照皿, 然后放在中科院近代物理所自制的旋转机架, 利用兰州重离子加速器国家重点实验室提供的重离子束 $^{12}\text{C}^{+6}$, 按照 0 Gy、10 Gy、20 Gy、30 Gy、40 Gy、50 Gy、60 Gy 的辐照剂量对黑曲霉菌种孢子悬浮液分别进行辐照处理。重离子束 $^{12}\text{C}^{+6}$ 的辐射参数为: 80 MeV/u 的 $^{12}\text{C}^{+6}$ 经过 50 μm 的不锈钢窗, 20 μm 的 mylar 膜和 1.3 m 空气后能量为 76.37 MeV/u, 预计水中射程 16 mm, 峰位 15.5 mm。

1.3.3 致死率和正突变率的测定 将不同剂量辐照后的单孢子悬液梯度稀释后, 取 10^{-5} 稀释梯度的 0.1 mL 孢子悬液涂布在固体平板筛选培养基上(每个处理进行 3 个重复), 于 34.5℃ 培养箱中倒置培养 48 h, 确定致死率(%). 其计算公式如下:

$$\text{致死率} = 1 - \frac{\text{辐照组辐照后长出的菌落数}}{\text{对照组长出的菌落数}} \times 100\%$$

1.3.4 初筛 将经辐照后的孢子菌悬液按一定稀释梯度进行稀释, 取 10^{-5} 稀释梯度的 0.1 mL 涂布于筛选培养基。测定酸斑直径与菌苔直径之比, 进行正突变率的计算, 并把初筛得到的菌株转接到斜面培养基培养, 并进行下一步筛选。正突变率的计算如下:

正突变率是指筛选平板培养 48 h 的菌株酸斑和菌苔直径的比值比对照组提高 30% 的菌株数占总菌落数的百分比。

1.3.5 复筛 将初筛获得的菌株转入发酵培养基逐个发酵, 培养条件为: 温度 36℃、转速 300 r/min、湿度 45%–50%、培养时间 90 h, 然后进行酸度测定。

1.4 分析检测

1.4.1 酸度的测定 取发酵液 5 mL, 经离心机 4000 r/min、5 min 离心并过滤。吸取滤清液 1 mL, 置于装有 40 mL 蒸馏水的三角瓶中, 0.5% 的酚酞指示剂两滴, 用 0.1429–0.1430 mol/L 的氢氧化钠溶液

滴定, 计算公式如下:

$$\text{实际酸度 } A(\%) \text{ 计算: } A = KV$$

式中, $K=1-(\text{失水量}/50)$, 失水量按发酵瓶体积损失来计算; V 是碱液滴定体积数。

1.4.2 总糖测定 经 6 mol/L 盐酸水解后, 用斐林法测定^[7]。

1.4.3 还原糖测定 直接用斐林法测定^[7]。

1.4.4 pH 的测定 PHS-3C 型精密酸度计测定。

2 结果与分析

2.1 最适重离子辐照剂量的选择

由图 1 可以看出, 出发菌株 4 # 经过不同剂量的重离子束 $^{12}\text{C}^{+6}$ 辐照后, 其死亡率随着照射剂量的提高而明显升高。菌株经过各种辐照剂量处理后, 菌株正突变率随着辐照剂量的提高也逐步提高; 当在辐照剂量为 60 Gy 时, 正突变率最高, 为 21%(如图 2)。

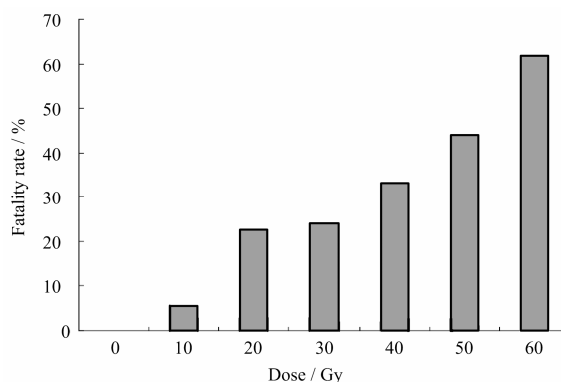


Fig.1 The fatality rate of original strain irradiated by the heavy ion beams

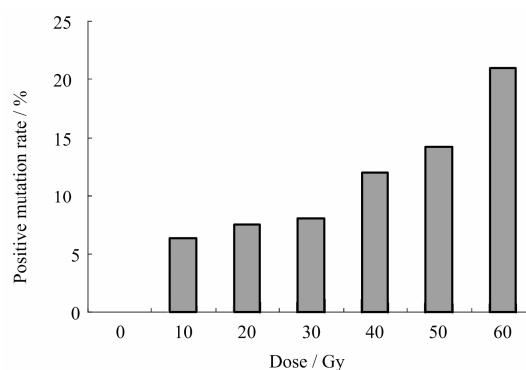


Fig.2 The positive mutation rate of original strain irradiated by the heavy ion beams

2.2 辐照处理后高产柠檬酸突变菌株的初筛

运用酸斑法对辐照后突变高产酸菌株进行初筛, 筛选出了 14 株酸斑直径和菌苔直径之比相对于

对照组 4 # 酸斑直径和菌苔直径之比提高了 30%以 菌苔直径之比为 3.28，具体数据见表 1。
上的菌株，其中对照组 4 # 菌株的平均酸斑直径和

Table 1 The preliminary screening results of the initial strain 4#

Strain number	Acid spot diameter/cm	Fungus moss diameter/cm	Ratio of acid spot diameter and fungus moss diameter	Increasing percentage of the ratio for mutant strain compared to initial strain 4 # /%
4 #	0.85	0.25	3.28	0
H6001	1.25	0.28	4.46	35.9
H6002	1.26	0.29	4.34	32.3
H6003	1.2	0.28	4.28	30.4
H6004	1.15	0.27	4.25	30
H6005	1.2	0.28	4.28	30.4
H6006	1.2	0.27	4.44	35.3
H6007	1.26	0.27	4.66	42
H5001	1.95	0.35	5.57	69.8
H5002	1.12	0.25	4.48	36.5
H4001	1.2	0.28	4.28	30.4
H4002	1.11	0.25	4.44	35.3
H4003	1.3	0.3	4.33	32
H3001	1.11	0.25	4.44	35.3
H3002	1.3	0.3	4.39	33.8

2.3 辐照处理后高产柠檬酸突变菌株摇瓶酸度的测定

通过对辐照后的突变菌株的初筛和摇瓶酸度测定，获得了 2 株产酸率较高的突变菌株 H4002、H5001(表 2)。这 2 株突变菌株在培养条件为 36℃、

培养时间 90 h、转速 300 r/min、湿度为 45%时，其产酸能力相比较出发菌株 4 # 菌株提高了 18%和 9.3%，其中突变株 H4002 的产酸率达到 14.4%。同时原料的转化率也有很大幅度提高，H4002 的具体发酵动力学^[8]参数见图 3。

Table 2 The comparing to acidity of strain and mutant strains in shake flask fermentation trials

Stain number	Initial sugar Concentration / g·100mL ⁻¹	Acidity after fermentation / %	Residual sugar concentra- tion / g·100mL ⁻¹	Conversion / %
4 #	16±0.2	12.2±0.2	3.8±0.1	76
H4002	16±0.2	14.4±0.1	1.3±0.1	90
H5001	16±0.2	13.3±0.15	3.0±0.1	83

3 结果与讨论

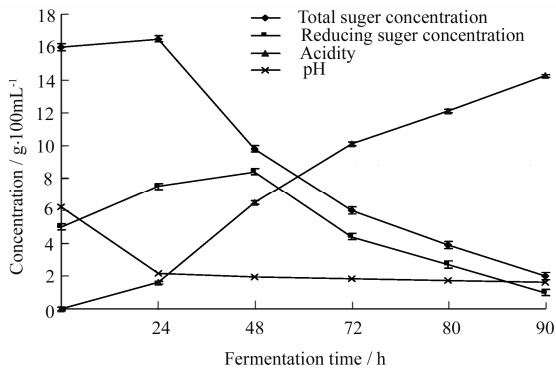


Fig.3 The fermentation parameters of mutant strain H4002

柠檬酸系三羧酸循环中重要的中间代谢产物，而且柠檬酸是黑曲霉的良好碳源。在正常生产情况下，柠檬酸在黑曲霉细胞内不会积累。柠檬酸积累是菌体代谢失调的结果^[9]，其过程需要多种酶系的参与，调控极其复杂。经典的随机诱变、定向筛选的方法依然是目前生产上应用的主要育种手段，尤其是对于遗传背景不清楚的菌株，诱变选育是最好的选择^[10]。为了选育到高产柠檬酸的黑曲霉菌株，本试验采用了兰州重离子加速器国家重点实验室提供的 ¹²C⁺⁶ 离子束对黑曲霉菌株进行诱变处理并取得了较好的结果，定向筛选选育出一株高产柠檬酸突变菌株 H4002，发酵 90h 后，柠檬酸的产率达到

了 14.4 g/100mL, 与出发菌株酸度值相比, 提高了 18%, 原料利用率也有较大幅度提高。突变菌株连续进行发酵 5 次, 最后产酸都能稳定在 14.2 g/100mL -14.43 g/100 mL。

突变菌株的高产特性不仅由其遗传性状决定, 也受其所处的环境条件影响。因此只有为菌株创造了产物合成的最佳培养条件, 才能使高产基因得以充分表达^[11]。为了使发酵酸度更进一步的提高, 还有待于研究发酵条件、培养基的碳氮比、外来添加物、微量元素^[12-13]与培养基 pH 值的变化等因素对发酵的影响。

诱变选育结果证明采用 $^{12}\text{C}^{+6}$ 重离子束辐照处理黑曲霉的高产菌株选育是行之有效的方法。同时, 重离子束 $^{12}\text{C}^{+6}$ 离子辐照作为新的诱变手段的出现, 相比较传统诱变手段育种, 其优势在于: 重离子束 $^{12}\text{C}^{+6}$ 离子与微生物细胞相互作用时, 在引起微生物体表面受损穿孔, 细胞膜透性和跨膜电位改变的同时, 导致受体 DNA 损伤, 激活受体细胞的修复机制, 有利于外源基因主动进入受体细胞并与受体 DNA 进行重组和整合, 以提高外源基因导入率, 克服转基因沉默并延长表达时间。

此外, 重离子参数多样, 采用不同质量数、电荷数和不同能量的重离子束, 对生物体系做不同方式处理, 可获得多种不同需求的突变体, 有利于拓宽突变谱, 提高突变率, 特别是在兰州重离子研究装置 (HIRFL) 的冷却储存环 (CSR) 建成以后, 可供选择的重离子及其能量的范围将更为广阔^[3]。

近年来, 由于基因工程的快速发展, 越来越多的微生物研究者把基因工程的一些手段运用于微生物遗传性状的改变, 同样取得了可观的研究成果。但对于那些遗传背景复杂、目的基因很难找到的微生物菌体来说, 人工的诱变手段依然是最直接、最可靠的选择。而 $^{12}\text{C}^{+6}$ 重离子在兰州重离子研究装置 (HIRFL) 上加速以后, 具有能量高、生物效应高等传统诱变手段不具备的独特优势。正基于此, 重离子辐照育种在以后的微生物菌种选育领域中会有广泛的应用价值。

参考文献

- 陈雪梅. 接种量和 C/N 对黑曲霉发酵产生柠檬酸的影响[J]. 食品与发酵工业, 2008(6): 44
CHEN Xuemei. The effects of inoculum size and C/N for citric acid fermentation by *Aspergillus niger* [J]. Food and Fermentation Industries, 2008(6): 44
- 袁成凌, 余增亮. 低能离子束在生物技术中的应用研究[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(4): 57-61
YUAN Chengling, YU Zengliang. The applications study of Low-energy ion beam in biotechnology [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2003, 23(4): 57-61
- 李仁民, 王菊芳, 李文建. 重离子束在微生物诱变育种及生物能源开发中的应用[J]. 原子核物理评论, 2007, 24(3): 234-236
LI Renmin, WANG Jufang, LI Wenjian. The breeding of microorganism by heavy ion beam and the application for microbial bio-energy development[J]. Nuclear Physics Review, 2007, 24(3): 234-236
- 陈晓琳, 唐欣昀, 周隆义. 枯草杆菌 SOD 高产菌株的诱变选育及产酶条件研究[J]. 激光生物学报, 2005, 14(3): 173-176
CHEN Xiaolin, TANG Xinyun, ZHOU Longyi. The breeding of *Bacillus subtilis* Strain for SOD and high production conditions of enzyme [J]. Laser Biology Journal, 2005, 14(3): 173-176
- 桑金隆, 竺莉红, 李孝辉, 等. 离子注入诱变选育之江菌素产生菌[J]. 科技通报, 2002, 18(1): 63-65
SANG Jinlong, ZHU Lihong, LI Xiaohui, et al. The Ion implantation for Breeding of zhi-jiangmycin producing strain [J]. Science and Technology Bulletin, 2002, 18(1): 63-65
- 颜红梅, 卫增权, 李文建, 等. 7 MeV/u O_6^{+} 离子对庆大霉素生产菌的初步研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 1995, 13(2): 99-101
XIE Hongmei, WEI Zengquan, LI Wenjian, et al. Preliminary studies of 7 MeV/u O_6^{+} ions for gentamicin production [J]. J Radiat Research Radiat Processing, 1995, 13(2): 99-101
- 上海市食品工业公司编. 柠檬酸生产技术知识, 1984
Food Industry Company of Shanghai: Citric acid production of technical knowledge, 1984
- Marcin Bizukojc, Stanislaw Ledakowicz, et al. The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and product formation by *Aspergillus niger* in citric acid fermentation[J]. Process Biochemistry, 2004: 2261-2268 (in China)
- 石鹤. 柠檬酸发酵残糖未转化原因分析[J]. 发酵科技通讯, 2007 (36): 4
SHI he. The analysis of residual sugar unconverted during Citric acid fermentation [J]. Fermentation Science and Technology, 2007 (36): 4
- 陈积红, 王曙阳, 刘敬. 重离子辐照阿维菌素产生菌的诱变选育[J]. 甘肃农业大学学报, 2010: 86-87
CHEN Jihong, WANG Shuyang, LI Jing, et al. The irra-

- diation breeding of avermectin producing strain by Heavy ion [J]. Gansu Agricultural University Journal, 2010, 45(3): 86-87
- 11 陈积红, 刘敬, 胡伟. 重离子束辐照吉它霉素菌种选育研究[J]. 中兽医医药杂志, 2011
- CHEN Jihong, LIU Jin, HU Wei. The breeding of *Streptomyces kitasatoensis* by Heavy ion beam irradiation [J]. Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2011
- 12 Lesniak W, Pietkiewicz J, Podgorski W, et al. Citric acid fermentation from starch and dextrose syrups by a trace metal resistant mutant of *Aspergillus-niger*[J]. Biotechnology Letters (in China), 2002: 1065-1067
- 13 Maria Papagianni. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus-niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling[J]. Biotechnology Advances (in China), 2007: 244-263

Mutation breeding of *Aspergillus niger* for producing citric acid by heavy ion beam

HU Wei^{1,2} CHEN Jihong² ZHANG Zhen¹ LIU Jing² WANG Shuyang² LI Wenjian²

¹(College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730030, China)

²(Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Science, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT In order to screen high-producing-citric acid strains, the original strain 4# was irradiated with different doses of heavy ion beams $^{12}\text{C}^{+6}$. The citric acid content in the fermentation broth was measured by acid-base neutralization. The results showed that the positive mutation rate reached the highest value of 21% as the heavy ion $^{12}\text{C}^{+6}$ irradiation dose was 60 Gy, and the high producing citric acid strain H4002 was obtained after screening. Compared with the original strain, its fermentation content of citric acid was improved by 18%. The results suggest that high-producing-citric acid strain could be obtained after it was irradiated by heavy ion beams and the mutation effect was remarkable.

KEYWORDS *Aspergillus niger*, Heavy ion beam, Mutation, Breeding

CLC Q939.9, Q691.5, Q815