

等离子体-紫外线复合诱变选育高产谷胱甘肽酵母菌

庞德钦, 周蓬蓬, 鲁明波, 余龙江*

(华中科技大学 生命科学与技术学院, 中国湖北 武汉 430074)

摘要: 以产还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 的啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) SC-20 为出发菌株, 采用氩气等离子体射线、紫外照射及两者的复合诱变处理, 获得一株高产 GSH 的酿酒酵母优良菌株 (*S. cerevisiae*) DU-20。结果表明该菌株具有稳定的遗传性能, GSH 含量与产量分别比出发菌株提高了 78.33% 和 118.4%。

关键词: 氩气; 离子束; 复合诱变; 谷胱甘肽; 酿酒酵母

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2007)03-0238-04

Breeding of High Glutathione Producing Strain by Plasma-UV Complex Mutagenesis

PANG De-qin, ZHOU Peng-peng, LU Ming-bo, YU Long-jiang*

(College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei, China)

Abstract: A strain of glutathione producing yeast, *Saccharomyces cerevisiae* SC-20, was isolated. The strain was then mutagenized by plasma, ultraviolet (UV) and plasma-UV, and a higher glutathione-producing mutant strain was obtained. The highest-yield mutant was named as *Saccharomyces cerevisiae* DU-20. Its higher glutathione-producing ability could be inherited after several subcultures. The intracellular content and yield of GSH were increased by 78.33% and 118.4% over the original strain, respectively.

Key words: argon; plasma; complex mutagenesis; glutathione; *Saccharomyces cerevisiae*

(Life Science Research, 2007, 11(3):238~241)

还原型谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 是由 L-谷氨酸、L-半胱氨酸和甘氨酸缩合而成的一种同时含有 γ -谷氨酸和巯基的生物活性三肽化合物, GSH 在生物体内具有多种重要的生理功能, 特别是对于维持生物体内适宜的氧化还原环境起着至关重要的作用^[1]。自 1921 年 Hopkins^[2] 首先发现谷胱甘肽的存在以来, GSH 不仅作为试剂广泛用于生物化学、医学、生物学和化学的研究测定中, 而且已成为一种重要的生化药物。随着 GSH 更多的功能和性质被发现, 人们在食品添加剂、临床医学和运动营养学上对它的兴趣在日益增长, 其需

求量不断增加。

高产 GSH 菌种的选育是国内研究的热点。目前报道的菌种选育方法^[3-5] 主要是传统的化学诱变方法 (亚硝基胍、硫酸二乙酯、甲基磺酸乙酯等) 和物理诱变方法 (紫外线和 X 射线) 相结合, 这样的诱变方法, 效率较低, 产量提高的幅度也不大。本研究以产 GSH 的啤酒酵母菌株 SC-20 为出发菌株, 通过等离子体和紫外线的复合诱变, 经 $HgCl_2$ 和 $ZnCl_2$ 抗性交替筛选, 并采用高通量筛选方法, 得到一株 GSH 含量与产量分别比出发菌株提高了 78.33% 和 118.4% 的突变株。本研究结果为该

收稿日期: 2007-03-17; 修回日期: 2007-05-27

作者简介: 庞德钦 (1978-), 女, 河南南阳人, 硕士研究生, 主要从事微生物发酵研究, Tel: 027-63304076, E-mail: pangdeqin_hnau@tom.com; 余龙江 (1966-), 男, 湖北黄梅人, 华中科技大学教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事资源生物学的研究, E-mail: yulongjiang@hust.edu.cn.

菌种的选育以及进一步的工业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) SC-20, 本实验室保藏。

1.2 培养基

1.2.1 YEPD 培养基(斜面培养及平板纯化用)(g/L)

葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母膏 10, 琼脂 20, pH 自然。

1.2.2 摇瓶筛选培养基(g/L)

葡萄糖 50, 酵母粉 5, Na_2HPO_4 1, KH_2PO_4 3, MgSO_4 0.5, pH 自然。

1.3 主要仪器

低能离子注入机, 本校电气与电子工程学院脉冲功率中心提供; Anke TGL-16G 型超低温离心机, 上海安亭科学仪器厂; 722S 分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; 岛津 UV-2550 紫外-可见光光度计, 日本产。

1.4 主要试剂

标准谷胱甘肽、5, 5'-二硫代双(二硝基苯甲酸) [5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), DTNB] 为 Sigma 公司产品。其他试剂均为国产分析纯。

1.5 方法

1.5.1 生物量的测定

取 5 mL 发酵液, 室温下 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 去离子水洗涤菌体两次后, 85 烘干至恒重后称重。

1.5.2 GSH 提取液制备

利用热水抽提法^[6]。

1.5.3 GSH 产量测定

采用 DTNB 显色法^[7]。

1.5.4 诱变处理

1.5.4.1 UV 诱变

取对数生长期菌液 5 mL, 离心并以无菌生理盐水洗两次, 还原至原体积, 转入直径 9 cm 的培养皿中, 磁力搅拌。紫外灯(功率 15 W, 照射距离 35 cm)照射一定时间。通过改变照射时间控制致死率。

1.5.4.2 等离子诱变

等离子体射线杀菌曲线的制作: 取适量啤酒酵母菌悬液进行氩气等离子体射线辐照处理, 辐照时间分别为 0、10、20、30、40、50、60 s。氩气等离子体照射条件: 工作电压: 5 kV; 频率: 20 kHz;

放电间隙: 8.5 mm; 处理物距电极距离: 2.5 cm; 注入气体: 氩气; 温度: 16.7 °C; 湿度: 69%。将经过不同辐照时间处理的菌液适当稀释涂平板, 培养 72 h。根据处理前后的活菌数计算致死率。以照射时间为横坐标, 致死率为纵坐标作图。

1.5.4.3 等离子和 UV 复合诱变

经等离子处理过的菌体直接进行紫外诱变即可。通过改变照射时间控制致死率。

诱变后的菌体以 10 倍梯度稀释涂布于 YEPD 完全培养基, 与稀释度相同但未经诱变的菌体对比计算致死率。上述 3 种诱变方式均将致死率控制在 60%~80%。

1.5.5 抗性筛选物浓度的确定

经诱变处理稀释后的菌液分别涂布于不同质量浓度的 ZnCl_2 和 HgCl_2 抗性培养基上培养 72 h^[8], 与相同稀释度诱变处理后的菌体比较计算致死率。若致死率为 60%~70%, 则选定此质量浓度进行筛选。

1.5.6 初筛

将诱变处理的菌悬液经梯度稀释后涂布在抗性平板上, 待其长出菌落后, 经氯仿熏蒸破壁, 喷上 DTNB 显色剂, 选取显色圈的较大、颜色较深、显色时间较长的诱变菌株作为复筛的出发菌株。

1.5.7 复筛

将初筛到的菌株从斜面接至种子培养基, 培养 12 h 后, 以 10% 的接种量将菌株接至摇瓶培养基, 每株 3 瓶, 培养 48 h 后测各菌株的 GSH 含量, 根据单位体积发酵液的 GSH 含量确定高产菌株。

2 结果与讨论

2.1 等离子体诱变选育

2.1.1 等离子体射线诱变剂量的确定

等离子体辐射是直接在生物分子上沉积能量, 引起基因突变, 从而达到诱变育种的目的。采用该方法诱变具有突变频率高、突变谱广、生理损伤小等优点^[9]。由等离子体射线杀菌致死率(见图 1)结果可以看出, 等离子体射线对实验菌株的致死率之间存在着明显的剂量效应关系, 当等离子体射线照射时间为 30 s 时, 啤酒酵母的致死率就达到了 76.5%, 但随着时间的增加存活率下降有所缓和, 并有一短时上升后又下降的过程, 当等离子体射线辐照时间为 60 s 时, 致死率为 98.5%。这可能是由于离子注入到一定程度激活

了菌体的修复机制,但当注入时间继续增加细胞损伤无法修复.本文选择 30 s 的辐照剂量作为诱

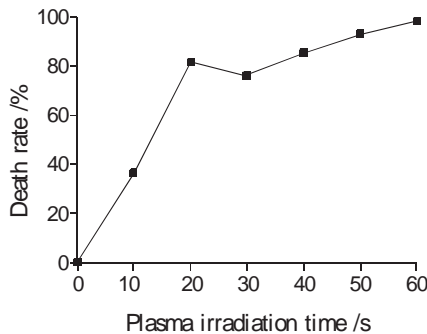


图1 等离子体照射菌体致死率曲线
Fig.1 Plasma irradiated cell death rate curve

变指标.

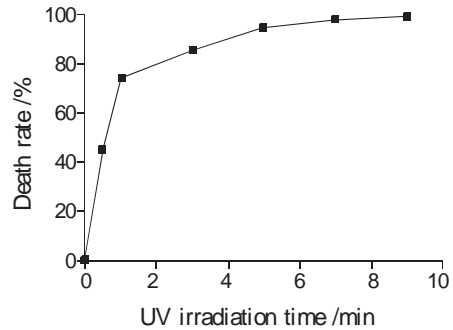


图2 紫外线照射菌体致死率曲线
Fig.2 UV irradiated cell death rate curve

2.1.2 菌株的等离子体射线诱变选育

对出发菌株啤酒酵母 SC-20 进行等离子体射线诱变处理 30 s (此时致死率为 76.5%), 将经诱变处理后的菌悬液梯度稀释, 然后涂布于 0.70 g/L ZnCl₂ 抗性培养基上, 培养 72 h 后, 经过上述方法的初筛和复筛, 选出产量较高的突变株, 结果见表 1.

表 1 等离子体诱变结果
Table 1 The results of plasma mutation

菌株编号 Number of strain	生物量 Biomass /(g·L ⁻¹)	GSH 产量 Yield /(mg·L ⁻¹)	GSH 含量 Content /(mg·g ⁻¹)
SC-20	7.80	34.56	4.43
D-1	8.22	49.02	4.43
D-2	7.95	38.79	5.96
D-3	8.02	37.67	4.88
D-4	8.12	45.96	4.50
D-5	8.20	50.64	6.18
D-6	8.50	50.70	5.96
D-7	7.90	48.85	6.18
D-8	8.05	46.75	5.81
D-9	7.90	39.77	5.03

从表 1 中可以看出, 经过等离子体射线诱变处理后, 其中 D-5 突变株 GSH 的产量为 50.64 mg/L, 胞内含量为 6.18 mg/g, 比出发菌株分别提高 46.53% 和 39.50%.

2.2 紫外线诱变选育

2.2.1 紫外线处理时间对菌体存活率的影响

用不同的照射时间对菌体进行紫外线处理, 实验结果见图 2. 由图 2 可以看出, 随着照射时间的延长, 致死率增加, 9 min 时全部致死, 由于紫外线有较强的杀菌能力和诱变能力, 较高的

致死率有利于筛选优良菌株, 但是如果处理时间太长, 一些高活性菌株也可能致死, 不利于筛选, 选取 45 s 为诱变处理时间.

2.2.2 菌株的紫外线诱变选育

对等离子诱变处理后的菌株 D-5 分别以不同照射时间进行 UV 诱变. 实验选取紫外照射时间为 45 s, 致死率为 63%. 使用质量浓度 0.01% 的氯化汞 (此时致死率为 67%) 抗性平板筛选, 获得 GSH 产量较高的突变株 U-9, 其 GSH 的产量为 58.08 mg/L.

2.3 等离子体和紫外复合诱变

对 U-9 进行等离子体和 UV 复合诱变^[10]. 先用等离子体照射, 后用紫外灯照射, 分别照射不同时间, 控制致死率. 实验选取等离子照射时间 15 s, 紫外线照射时间 20 s, 致死率为 75%. 使用的氯化汞抗性平板筛选, 得到胞内 GSH 含量较高的突变株 DU-20, 生物量为 9.56 g/L, GSH 产量为 75.48 mg/L, 菌体胞内 GSH 含量 7.90 mg/g, 整个诱变、筛选过程中的生产性状变化见表 2.

2.4 诱变株的遗传稳定性

由于诱变菌株的形状常常不稳定, 尤其是在连续传代培养时, 为了检测菌株形状是否稳定, 将诱变出的 DU-20 菌株在 YEPD 试管中连续传 10 代, 每代用摇瓶发酵培养检测谷胱甘肽的产量, 实验结果见表 3. 结果表明, 菌株 DU-20 斜面连续传 10 代, 谷胱甘肽产量下降 5.36%, 说明该突变株具有良好的遗传稳定性.

3 讨论

等离子体和紫外线两种诱变剂的交替和复合

表2 诱变过程中的生产性状变化
Table 2 Character changes in the production process of mutation

菌株编号 Number of strain	生物量 Biomass /(g·L ⁻¹)	GSH 产量 Yield /(mg·L ⁻¹)	GSH 产量提高率 Increase rate of yield /(%)	GSH 含量 Content /(mg·g ⁻¹)	GSH 含量提高率 Increase rate of content /(%)
SC-20	7.80	34.56	-	4.43	-
D-5	8.20	50.64	46.53	6.18	39.50
U-9	8.95	58.08	68.06	6.49	46.49
DU-20	9.56	75.48	118.4	7.90	78.33

表3 DU-20 的遗传稳定性
Table 3 Stability of the mutagenic strain DU-20

传代数 Passage number	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GSH 产量 (Yield) /(mg·L ⁻¹)	75.48	75.68	75.52	74.46	74.00	73.61	73.87	73.03	72.12	71.72	71.43
GSH 产量下降比率 (Descent rate of yield) /(%)	-	-	-	1.35	1.96	2.48	2.13	3.24	4.45	4.98	5.36

使用,有效避免了使用单一诱变剂产生的诱变饱和和效应。HgCl₂ 和 ZnCl₂ 两种抗性筛选物交替使用,避免了菌体对同一种抗性物质产生的耐受性。通过复合诱变技术处理出发菌株 (*S.cerevisiae*) SC-20,选育出 GSH 高产菌株 (*S.cerevisiae*) DU-20,产量比出发菌株提高了 118.4%,并且从获得的诱变株的传代实验得出,诱变株 DU-20 有良好的遗传稳定性。实验结果与有关报道微生物复合诱变优于同一方法单独诱变的结论相一致。同时证明等离子体技术在微生物育种中切实可行,为人工诱变以改善微生物的生产能力提供了一条新途径。

参考文献 (References):

- [1] MEISTER A. Antioxidant functions of glutathione [J]. Life Chem Rep, 1994, 12(1): 23-27.
- [2] HOPKINS F G. On an autoxidisable constituent of the cell [J]. Biochem, 1921, 15: 286-305.
- [3] MURATA K, KIMURA A. Overproduction of glutathione and its derivatives by genetically engineered microbial cells [J]. Biotechnol Adv, 1990, 8(1): 59-96.
- [4] 詹谷宇, 田萍, 刘卫东, 等. 酵母菌生物合成谷胱甘肽[J]. 药理学报 (ZAN Gu-yu, TIAN Ping, LIU Wei-dong, et al. Biosynthesis of glutathione in yeasts [J]. Acta Pharmaceutica Sinica), 1990, 25(7): 494-499.
- [5] KIMURA A, MURATA K. Mutant Strain of *Escherichia coli* and its Use for the Preparation of Glutathione [P]. US, 4598046, 1986-07-01.
- [6] 范崇东, 王森, 徐榕榕. 热水提取酵母中谷胱甘肽的条件优化[J]. 食品工业科技 (FAN Chong-dong, WANG Miao, XU Rong-rong. Condition optimization for extracting glutathione in yeast by hot water [J]. Science and Technology of Food Industry), 2004, 41(2): 132-134.
- [7] 刘娟, 王雅琴, 刘刚, 等. 发酵液中还原型谷胱甘肽三种测定方法的改进及其比较[J]. 北京工业大学学报 (LIU Juan, WANG Ya-qin, LIU Gang, et al. Comparison of three methods for determination of glutathione [J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology), 2004, 31(3): 35-38.
- [8] 杜连祥. 工业微生物学实验技术 [M]. 天津: 天津科学技术出版社 (DU Lian-xiang. Experiment Technique of Industrial Microbiology [M]. Tianjin: Tianjin Science & Technology Press), 1992. 172-175.
- [9] 蒋世春, 吴建平, 白骅. 应用等离子体辐射技术选育柔红霉素产生菌—天兰淡红链霉菌 [J]. 辐射研究与辐射工艺学报 (JIANG Shi-chun, WU Jian-ping, BAI Hua. Selection of daunorubicin-producing strains *S. coeruleorubidus* by plasma radiation technology [J]. Journals Radiat Res Radiat Process), 2001, 19(2): 133-137.
- [10] 张丽萍, 程辉彩, 田连生, 等. 植酸酶高产菌株的紫外线-空气等离子体复合诱变选育 [J]. 中国饲料 (ZHANG Li-ping, CHENG Hui-cai, TIAN Lian-sheng, et al. Mutagenesis breeding of high-producing phytase strains by complication mutation of ultraviolet radiation and air-ion [J]. China Feed), 2006, 23(9): 13-15.