

用 β -紫罗兰酮筛选虾青素高产菌株

伊文刚¹ 肖安凤^{1,2} 李利君^{1,2} 倪辉^{1,2} 蔡慧农^{1,2*}

(1. 集美大学生物工程学院 厦门 361021)

(2. 厦门市食品生物工程技术研究中心 厦门 361021)

摘要: 用 β -紫罗兰酮作为筛选剂选择性分离海洋红酵母虾青素高产突变菌株。实验结果表明, 在 β -紫罗兰酮存在的情况下, 由于类胡萝卜素合成受到抑制, 海洋红酵母的生物量和虾青素合成量都减少; 当平板培养基中 β -紫罗兰酮浓度达到 370 mg/L 时, 海洋红酵母的致死率为 92.3%; 在这种平板培养基上涂布经甲基磺酸乙酯诱变的海洋红酵母, 随机筛选 200 个菌落, 结果表明生物量、虾青素体积产率和细胞产率均有所提高的正突变株占 18%, 生物量、虾青素体积产率和细胞产率的单项指标有所提高的正突变株分别占 22.5%、45%和 46%。该实验结果表明在分离培养基中添加 β -紫罗兰酮可选择性地分离海洋红酵母虾青素高产菌株, 提高虾青素高产突变株的筛选效率。

关键词: 海洋红酵母, 虾青素, β -紫罗兰酮, 高产菌株, 筛选模型

Screening Astaxanthin-hyperproducing Strains with β -ionone

YI Wen-Gang¹ XIAO An-Feng^{1,2} LI Li-Jun^{1,2} NI Hui^{1,2} CAI Hui-Nong^{1,2*}

(1. School of Biotechnology Engineering, Jimei University, Xiamen 361021)

(2. Research Center of Food Biological Engineering Technology of Xiamen City, Xiamen 361021)

Abstract: The astaxanthin-hyperproducing mutants of oceanic red yeast were efficiently screened with β -ionone. As shown by the result, the biomass and astaxanthin content of oceanic red yeast was reduced due to the presence of β -ionone which inhibited the synthesis of carotenoids. The lethality rate of oceanic red yeast would attained 92.3% if 370 mg/L of the β -ionone concentration was contained in the plate medium. The oceanic red yeast mutated by ethyl methane sulfonate was cultured on plate medium containing 370 mg/L of the β -ionone. 200 mutants were randomly screened, positive mutants with increased the biomass, astaxanthin volumetric yield and astaxanthin specific yield accounted for 18% of the total strain, the mutants with higher biomass, astaxanthin volumetric yield and astaxanthin specific yield higher occupied 22.5%, 45% and 46%, respectively. The results indicated that the astaxanthin-hyperproducing strains of oceanic red yeast could be efficiently isolated on the selective medium containing β -ionone.

Keywords: Oceanic red yeast, Astaxanthin, β -ionone, Hyperproducing strain, Screening model

虾青素是一种具有强抗氧化作用的含氧类胡萝卜素^[1,2], 本实验室分离获得了一株能产生虾青素的

海洋红酵母菌株^[3]。为了提高该酵母菌的生产性能, 需要对其进行菌种选育, 而有效的筛选模型是提高

菌种筛选效率的必要条件, 如果缺乏筛选模型, 则很难筛选获得虾青素高产菌株。在筛选高产菌株方面, 国内外研究机构进行了长期的研究, 研究开发出了 2-脱氧葡萄糖、抗霉素A、二苯胺、单线态氧等多种筛选剂模型, 但没有筛选获得符合产业生产需求的高产菌株。因此, 开发有效的高产菌株筛选模型仍是虾青素高产育种的关键难题。

相关研究表明, β -紫罗兰酮是一种环状的 β -胡萝卜素类似物, 可以抑制类胡萝卜素的合成。如果在培养基中添加一定浓度的 β -紫罗兰酮, 由于类胡萝卜素的合成受到抑制, 野生及低产菌株的菌落会变为黄色或白色, 而高产菌株的菌落可能仍为红色或淡红色。这种机理已经成功地运用于其他类胡萝卜素产生菌的高产菌株的筛选^[4-6], 虾青素也是一种类胡萝卜素, 如果 β -紫罗兰酮对海洋红酵母的虾青素合成也具有抑制作用, 那么该方法也可用于海洋红酵母的高产育种, 提高其高产菌株的筛选效率。本文设计了摇瓶试验、平板试验、筛选试验等一系列试验, 验证了 β -紫罗兰酮对海洋红酵母虾青素合成具有抑制作用, 并利用筛选试验评估了该方法选择性分离虾青素高产菌株的效率。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 海洋红酵母, 本实验室自集美海滩涂分离的一株能产生虾青素的红酵母, 目前还未鉴定出确切的种属^[3]。

1.1.2 培养基: 斜面培养基、平板培养基、摇瓶培养基见文献^[3]。

1.1.3 试剂: β -紫罗兰酮、丙酮、二甲基亚砷等分析纯, 甲醇为液相色谱纯, 虾青素标准样品购自Sigma公司。

1.1.4 仪器: Waters1525型高效液相色谱(美国Waters公司)、UV-2006型紫外可见分光光度计(尤尼科上海仪器有限公司)、FA2004型电子天平(上海精科天平仪器厂)、ZHWHY-2102型双层全温度恒温摇床(厦门德维科技有限公司)、TDL-40B型普通台式离心机(上海安亭科学仪器厂)、5415D型高速离心机(Eppendorf Co. Ltd.)、HH-4型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)、SW-CJ-2FD型单人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司)、CL-40L型高压灭菌锅(ALP.Co.Ltd)。

1.2 方法

1.2.1 培养方法: 斜面培养: 保藏菌种转接于斜面培养基, 22°C培养3 d, 4°C保存; 平板培养: 吸取稀释一定浓度的海洋红酵母菌悬液 100 μ L 加到每个制好的平板上, 涂布均匀, 22°C培养3 d; 摇瓶培养^[7]: 用接种环在斜面培养基上取一环新活化的菌苔接种于灭菌好的液体培养基中, 22°C, 160 r/min培养48 h, 将所得种子液以4%的接种量接入装有液体培养基的三角瓶中, 22°C, 160 r/min摇床培养4 d。

1.2.2 诱变方法: 培养好的菌种 \rightarrow 取5 mL于3500 r/min离心5 min \rightarrow 去上清, 沉淀用磷酸缓冲液(pH 7.2)洗涤3次 \rightarrow 用5 mL磷酸缓冲液(pH 7.2)重悬菌体 \rightarrow 加150 μ L甲基磺酸乙酯(EMS)^[8], 振荡30 min \rightarrow 3500 r/min离心5 min \rightarrow 沉淀用磷酸缓冲液(pH 7.2)洗涤3次 \rightarrow 沉淀重悬于5 mL磷酸缓冲液(pH 7.2), 备用。

1.2.3 分离方法: 取诱变后重悬菌液稀释到适当浓度, 涂布在含 β -紫罗兰酮^[9,10]浓度为370 mg/L的平板培养基中培养, 挑取单菌落摇瓶发酵培养测定其虾青素产量, 并与出发菌株对比。

1.2.4 筛选方法: 对分离出的单菌落进行筛选, 根据筛选结果评价高产菌株的分离效率。每个菌落接种一个摇瓶, 培养结束后测定其虾青素体积产率、生物量、虾青素细胞产率, 根据这几个参数的大小淘汰掉大量的负突变株; 为了验证初筛结果的正确性, 从初筛出的菌株挑选出一些菌株进行复筛, 每菌株接种4个摇瓶, 培养结束后测定培养物中的生物量、虾青素体积产率和细胞产率。

1.2.5 分析测定方法: (1)生物量测定: 干重法^[11]。(2)类胡萝卜素及虾青素的提取: 二甲亚砷法^[12-14]。取发酵液7 mL于3500 r/min离心5 min, 去上清, 洗涤3次后加入75°C的二甲亚砷2 mL, 振荡摇匀, 加入5 mL丙酮振荡均匀, 3500 r/min离心5 min取上清液, 丙酮定容至10 mL, 冷冻保存待测。(3)类胡萝卜素含量测定^[14]。配置一定梯度浓度的虾青素标准样品, 测定474 nm处的吸光度, 以虾青素质量浓度为横坐标吸光度为纵坐标做图, 根据回归曲线方程计算类胡萝卜素的含量。(4)虾青素含量测定: 高效液相色谱法^[14], 使用Waters公司的1525型高效液相色谱仪, Waters公司Novapad C₁₈反相色谱柱(3.9 mm \times 150 mm, 4 μ m)进行色素的分离与定性分析, 其液相方法如表1所示。

表 1 液相色谱操作条件

Table 1 Operation parameters of high performance liquid chromatography

时间 Time (min)	流速 Velocity (mL/min)	甲醇 Methanol (%)	超纯水 Ultrapure water(%)
1	0	80.0	20.0
2	2.00	80.0	20.0
3	3.00	100.0	0.0
4	10.00	100.0	0.0
5	11.00	80.0	20.0

Note: $\lambda=474$ nm; Pump mode: gradient; High pressure limit: 3000

2 结果和讨论

2.1 β -紫罗兰酮对海洋红酵母的生长及虾青素的合成具有抑制作用

图 1 是不同浓度的 β -紫罗兰酮存在时, 摇瓶培养海洋红酵母的实验结果。由图 1 可知, 海洋红酵母的生物量、类胡萝卜素体积产率和细胞产率、虾

青素的体积产率和细胞产率都随着 β -紫罗兰酮浓度的升高而降低。

这说明 β -紫罗兰酮不但抑制海洋红酵母的生长, 而且抑制虾青素及其他类胡萝卜素的合成。相关研究表明, 虾青素及其他类胡萝卜素能防止微生物受自由基的伤害, 在 β -紫罗兰酮存在时, 海洋红酵母的虾青素合成受到抑制, 海洋红酵母很容易受到自由基和单线态氧等有害物质的攻击。在这种情况下, 虾青素低产突变株及出发菌株由于不能抵抗自由基和单线态氧等有害物质的攻击而死亡。因此, 如果虾青素对海洋红酵母的作用也是保护其免受自由基的侵害, 就可以用加入 β -紫罗兰酮的平板分离培养基来筛选虾青素高产菌株。在这种平板上, 只有虾青素高产的突变株才能生长而形成菌落, 低产突变株及出发菌株由于虾青素的合成受到抑制而不能存活, 平板上长出的菌落很可能就是虾青素高产菌株。

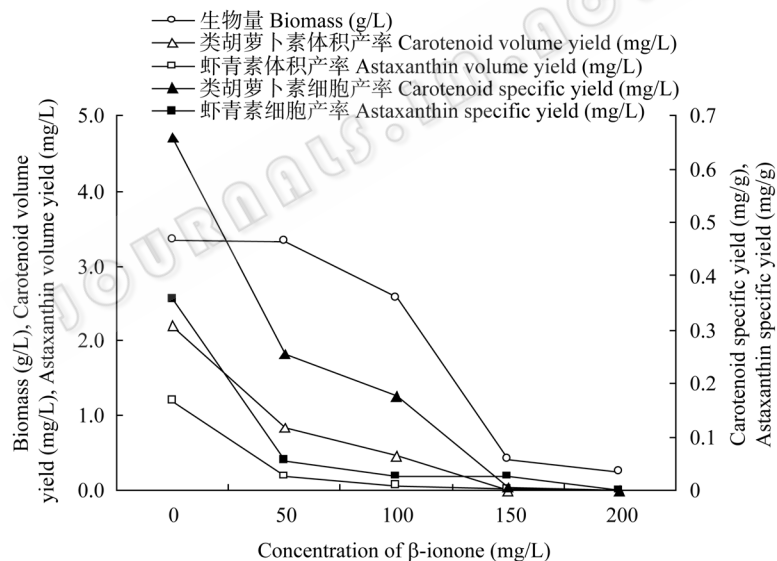


图 1 β -紫罗兰酮对摇瓶发酵的影响

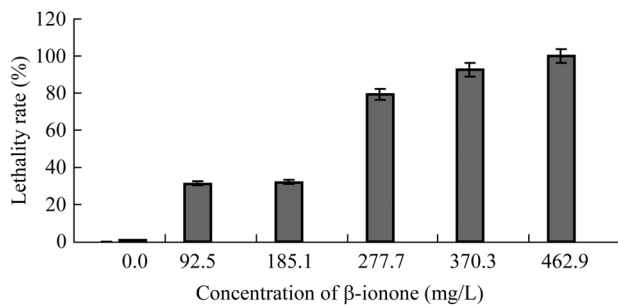
Fig. 1 The effect of β -ionone on flask fermentation

Note : Aastaxanthin volume yield = Astaxanthin content per 1 liter fermentation broth(mg/L); Aataxanthin specific yield = Astaxanthin content per 1 gram dry cell(mg/g); Carotenoid volume yield = Carotenoid content per 1 liter fermentation broth(mg/L); Carotenoid specific yield = Carotenoid content per 1 gram dry cell(mg/g)

2.2 选择适于平板分离虾青素高产菌株的 β -紫罗兰酮浓度

图 2 是 β -紫罗兰酮对平板培养海洋红酵母抑制的试验结果, 由图 2 可知, 随着 β -紫罗兰酮浓度的升高, 海洋红酵母的致死率也不断升高, 当 β -紫

罗兰酮的浓度达到 370.4 mg/L 时, 对海洋红酵母的致死率为 92.3%, 当浓度为 463 mg/L 时, 其致死率为 100%。如果淘汰率需要保持在 92%时, 平板培养基中 β -紫罗兰酮的浓度应该不低于 370 mg/L, 而如果需要保持更高的淘汰率, 则平板中 β -紫罗兰酮的浓

图2 β -紫罗兰酮浓度与致死率的关系Fig. 2 The relationship between the concentration of β -ionone and lethality rate

度也需要更高。

2.3 用 β -紫罗兰酮可选择性分离虾青素高产菌株

经过甲基磺酸乙酯(EMS)诱变处理, 以 β -紫罗兰酮作为筛选剂培养处理, 挑取到 200 株菌进行筛选。初筛结果表明, 生物量、虾青素体积产率和虾青素细胞产率均有所提高的菌株有 36 株, 正突变率为 18%。其中生物量、虾青素体积产率和细胞产率

的单项指标高于出发菌株的突变株数量分别为 45、90 和 92 株, 正突变率分别为: 22.5%、45%和 46%。

为了验证初筛结果, 从初筛所获得的生物量、虾青素体积产率和虾青素细胞产率均有所提高的 36 株突变菌株中随机挑选 9 株突变株进行复筛, 试验结果如表 2 所示。由表 2 可知, 所试验的 9 株菌的虾青素体积产率和细胞产率均高于出发菌株; 除编号为 B079 的菌株生物量有明显降低外, 其它 8 株生物量均没有降低。B079 菌株的生物量虽然低于出发菌株, 但是其虾青素细胞产率和体积产率分别为 1.01 mg/g 和 3.71 mg/L, 较出发菌株分别提高了 62.90%和 35.90%。这说明, 初筛结果中虾青素产量是正确的, 而生物量虽然有一些偏差, 但大部分结果也是可信的。筛选结果表明, 用 β -紫罗兰酮作为筛选剂选择性分离虾青素高产突变株, 筛选效率得到大大提高。

表 2 以 β -紫罗兰酮为筛选剂获得的正突变菌株
Table 2 Positive mutant strains with β -ionone as a screening agent

编号 Number	生物量 Biomass		虾青素体积产率 Astaxanthin volume yield		虾青素细胞产率 Astaxanthin specific yield	
	测量值 Measured value (g/L)	增产率 Increasing rate (%)	测量值 Measured value (mg/L)	增产率 Increasing rate (%)	测量值 Measured value (mg/g)	增产率 Increasing rate (%)
B025	4.43 ^c	0.22	3.27 ^c	19.78	0.73 ^b	17.74
B079	3.67 ^d	-16.97	3.71 ^a	35.90	1.01 ^a	62.90
B118	4.44 ^c	0.45	3.53 ^b	29.30	0.79 ^b	27.42
B137	4.86 ^a	9.95	3.51 ^b	28.57	0.72 ^b	16.13
B139	4.66 ^b	5.43	3.57 ^b	30.77	0.77 ^b	24.19
B148	4.43 ^c	0.22	3.22 ^c	17.95	0.73 ^b	17.74
B150	4.51 ^b	2.04	3.51 ^b	28.57	0.78 ^b	25.81
B161	4.51 ^b	2.04	3.27 ^c	19.78	0.73 ^b	17.74
B185	4.67 ^b	5.43	3.44 ^b	26.01	0.74 ^b	19.35
Original strain	4.42 ^c		2.73 ^d		0.62 ^c	

注: 表格中的数值是 4 次平等试验的平均值, 数据后上标的不同字母表示 5%显著水平不同值

Note: Each digital value is expressed as a mean value of four replicates. Means with different superscript letters within the same column are significantly different ($P < 0.05$)

3 结论

β -紫罗兰酮对海洋红酵母虾青素的合成具有抑制作用。在 β -紫罗兰酮存在的情况下, 合成虾青素能力弱的菌株由于虾青素受抑制不足以保护酵母细

胞免受自由基和单线态氧的攻击而死亡, 只有高产菌株才能存活。 β -紫罗兰酮可以使海洋红酵母的生长与虾青素产量相偶联, 在分离培养基中加入一定量的 β -紫罗兰酮, 可以淘汰低产菌株从而提高高产菌株的筛选效率。

β -紫罗兰酮是一种良好的虾青素高产菌株筛选剂,用 β -紫罗兰酮做筛选剂从200株突变菌中筛选到生物量,虾青素体积产率和细胞产率都发生正突变的有36株,正突变率达到了18%,筛选效率大大提高。

参 考 文 献

- [1] Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl Chem*, 1991, **63**: 141-146.
- [2] Woodall AA, Britton G, Jackson MJ. Carotenoids and protections of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1336**(6): 578.
- [3] 杨秋明, 蔡慧农, 宋思扬, 等. 海洋红酵母产虾青素培养基优化的初步研究. *微生物学杂志*, 2007, **27**(1): 72-75.
- [4] Lewis MJ, Ragot N, Berlant MC, *et al.* Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *phaffia rhodozyma* with β -ionone. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, **56**(9): 2944-2945.
- [5] Fang TJ, Chiou TY. Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of the red yeast: *phaffia rhodozyma* NCHU-FS501. *Journal of Industrial Microbiology*, 1996, **16**(3): 175-181.
- [6] 田小群, 朱明军, 梁世中. 高产虾青素红发夫酵母的诱变和筛选方法分析. *武汉工业学院学报*, 2003, **22**(1): 8-10.
- [7] 朱明军, 梁世中. 红发夫酵母产虾青素培养参数的优化. *食品与发酵工业*, 2002, **29**(8): 19-22.
- [8] Calo P, Velázquez JB, Sieiro C, *et al.* Analysis of astaxanthin and other carotenoids from several *phaffia rhodozyma* mutants. *Agric Food Chem*, 1995, **43**(5): 1396-1399.
- [9] 田小群, 朱明军, 梁世中. 高产类胡萝卜素红发夫酵母的筛选. *食品和发酵工业*, 2002, **29**(6): 39-43.
- [10] 孙乃霞, 董庆霖, 赵学明. 高产虾青素红发夫酵母的选育及代谢通量分析. *食品加工过程*, 2006, **4**(1): 54-60.
- [11] 王 普, 裘萍娟, 郑裕国, 等. 高产虾青素的红发夫酵母的选育. *微生物学通报*, 2002, **29**(1): 15-19.
- [12] Johnson EA, Lewis MJ. Astaxanthin formation by the yeast *phaffia rhodozyma*. *Journal of General Microbiology*, 1979, **115**: 173-178.
- [13] 肖冬光, 李贤宇, 郝 玥. 高效液相色谱法检测红发夫酵母胞内虾青素. *天津科技大学报*, 2005, **20**(1): 9-12.
- [14] 倪 辉, 杨远帆, 杨秋明, 等. 发夫酵母类胡萝卜素的分析测定研究. *集美大学学报*, 2005, **10**(4): 318-323.

征订启事

2009年《腐植酸》杂志征订启事

《腐植酸》杂志于1979年创刊,由中国腐植酸工业协会主办,是全国唯一的腐植酸类专业科技期刊,面向国内外公开发行人。本刊为国际标准大16开,内设60页。《腐植酸》杂志为双月刊,国际刊号:ISSN1671-9212;国内刊号:CN11-4736/TQ。《腐植酸》杂志集学术性、专业性和实用性于一身,内容广泛、指导性强、信息量大,自1979年创刊以来,深受广大读者的关注与好评。主要栏目包括:“卷首语”“专题评述”“研究论文”“译文”“腐植酸文摘”“腐植酸专利简介”“腐植酸环保应用”“协会(专业)标准讨论”“腐植酸质量检测”“‘两会’动态”“信息传真”“‘乌金杯’采风”等。

在“腐植酸是关怀人类的新产业”主题思想的指引下,我国腐植酸产业呈现了蓬勃发展的大好形势。《腐植酸》杂志在2009年将把更新的内容、更高的质量、更优的服务展现给广大读者。欢迎各位新老读者及时订阅!如需要过刊,请直接与编辑部联系。

2009年《腐植酸》杂志每期定价15.00元(含邮费),全年6期,年定价90.00元(含邮费)。

《腐植酸》杂志订购时,请从邮局汇款至编辑部。

地址:北京市西城区六铺炕街1号《腐植酸》编辑部收 邮编:100011
 电话:010-82784950 传真:010-82784970
 邮箱:chaia@126.com 网址:www.chinaha.org