

重离子辐照对红酵母的诱变作用

李红玉¹ 李成华¹ 丁新春¹ 王菊芳² 周光明²

颜红梅² 李 强² 党秉荣² 温小琼² 李文建² 卫增泉²

1(兰州大学生命科学学院,兰州,730000)

2(中国科学院近代物理研究所,北京,100080)

摘 要 应用重离子加速器的 50 MeV/u¹²C⁶⁺ 重离子对胡萝卜素生产菌——红酵母(*Rhodotorula* RY Strain)进行辐照处理,经酵母发酵实验,发现 50 MeV/u¹²C⁶⁺ 重离子对胡萝卜素生产菌——红酵母具有诱变作用,并初步筛选到产胡萝卜素有较大变化的辐照变异菌株,为工业上利用重离子对胡萝卜素生产菌进行诱变育种展现新的前景。

关键词 重离子 红酵母 诱变作用

虽然基因工程已开始应用于工业微生物育种工作,但由于其操作复杂,要求条件高,所以目前我国绝大多数工业微生物的育种工作仍然采用常规的人工诱变育种方法。从自然界中得到的工业微生物菌种,由于其目标化合物产量和质量较低而很少直接用于工业生产,所以,一般都要经过人工诱变,以提高产量和品质。今天我们所用的工业微生物菌种中的绝大部分都经过了不止一次的人工诱变。

人工诱变育种的方式包括物理诱变、化学诱变和生物诱变。其中物理诱变因其简单实用、效果明显而得到了广泛的应用。人们目前普遍采用的物理诱变方法主要包括紫外线、X 射线和 γ 射线等,由于这些诱变源的反复使用,导致其诱导新突变的能力减弱,老的诱变源诱变产量的提高已到极限,若再想使工业微生物积累大量新的突变,必须寻找新的物理诱变源。

重离子辐射正是寻求新的物理诱变源的一种尝试。重离子和传统的物理诱变源——X、 γ 射线相比,具有许多独特的特性。例如,重离子辐射有能量沉积效应,有典型的 Bragg 峰,有较高的生物学效应和较小的氧增比等。利用它将有可能使一些其他方法很

难取得诱变效果的工业微生物发生有经济意义的突变,为工业微生物诱变育种开辟一条新的途径,因此,本课题组从 1998 年开始陆续开展了有关“工业微生物重离子辐射诱变育种”的研究工作^[1],本文是这一研究工作的延续,初步报道了重离子对胡萝卜素生产菌——红酵母(*Rhodotorula* RY Strain)的诱变作用。

1 材料与方法

1.1 出发菌株选育

野生型菌株的平板划线纯化培养(28℃, 3 d)→挑取单菌落进行种子液培养(28℃, 120 r/min, 24 h)→平板筛选培养基初筛(28℃, 3 d)→平板初筛所得菌株的种子液培养(28℃, 120 r/min, 24 h)→接 5% 的种子液于发酵培养基中培养(28℃, 120 r/min, 72 h)→色素产量测定,筛选出用于诱变育种的出发菌株。

1.2 重离子辐射诱变处理

1.2.1 重离子辐照前的准备

将培养好的工业微生物用无菌水稀释至 10^8 个/mL,然后用微量移液器将 100 μ L 菌液滴加在特制辐照盒中的滤纸上,加盖,然后将其安装在辐照盘上,将辐照盘置于辐照口

* 第一作者:博士,副教授。

收稿时间:2000-11-30, 改回时间:2001-02-25

的同步马达上备用。

1.2.2 重离子辐射诱变处理

将辐照盘的辐照盒依次对照辐照口,按照不同的辐照剂量对工业微生物进行辐照,辐照完毕后,取下辐照盘,将其中的滤纸取出,放入含无菌水的试管中,放入 4℃ 冰箱备用。

1.3 色素的测定

基本参照杨文的方法进行^[2]。

1.3.1 干细胞获得

将发酵后的红酵母悬浮液离心(4 000 r/min, 10 min), 去除上清液, 用蒸馏水洗涤沉淀部分 2~3 次, 最后将获得的细胞泥置于低温下干燥至恒重。

1.3.2 酸-热处理

用 3 mol/L 的盐酸浸泡干细胞, 一定时间后于沸水中放置 4 min, 迅速冷却, 再离心, 洗涤沉淀部分, 除去上清液, 即得细胞碎片。

1.3.3 色素浸提

在上述细胞碎片中加入适量的丙酮溶液, 搅拌、振荡后离心(4 000 r/min, 20 min), 上清液即为色素浸提液。

1.3.4 胡萝卜素含量的计算

色素浸提液于波长 475 nm 下测得其吸光度, 按下列公式计算胡萝卜素的含量:

$$\text{色素含量}(\mu\text{g/g 干细胞}) = \frac{A_{\lambda_{\max}} \cdot D \cdot V}{0.16 \times W}$$

式中,

$A_{\lambda_{\max}}$: 最大吸收波长 475 nm 下的吸光度

D : 浸提液稀释倍数

V : 浸提所用的有机溶剂的总体积/mL

W : 干细胞重量/g

0.16: 胡萝卜素的消光系数

1.4 突变体的筛选测定方法

根据平板筛选培养基上菌落的大小、形状、颜色进行筛选。

2 实验结果

2.1 50 MeV/u¹²C⁶⁺ 重离子辐照对工业微生

物的存活率和致死率

一般而言, 存活率小于 10% 的照射剂量, 常用作诱变育种的参考剂量^[4]。从表 1 可以看出, 辐照剂量在 4.70~235.05 Gy 的范围内, 红酵母的存活率小于 10%, 因此, 突变菌株的筛选应主要在 4.70~235.05 Gy 照射剂量范围内筛选。但令人出乎意料的是, 在存活率大于 10% 的重离子辐照的红酵母中, 同样存在较多的诱变菌株(见表 2), 这一特性似乎显示重离子辐照的诱变效果可能要高于其他物理辐照形式。

表 1 不同剂量 50 MeV/u¹²C⁶⁺ 重离子辐照工业微生物后的存活率

辐照剂量/Gy	菌落数	存活率/%	致死率/%
0	640	100	0
0.23	520	81.25	18.75
2.35	169	26.41	73.59
4.70	39	6.09	93.91
23.51	30	4.79	95.21
235.05	20	3.13	96.87

2.2 突变菌株的初步筛选

辐照后的菌株经培养后, 使每个培养皿中红酵母的菌落数量约为 50 个左右, 每个剂量有 3 个培养皿, 共计菌落数量约为 150 个左右, 然后根据培养基上菌落的大小、形状、颜色进行筛选从中挑选 6 个差异性较大的菌落, 然后分别培养, 连续传代 3 代后测定其胡萝卜素的含量, 并观察其形态变异情况, 具体的数据请看表 2。

从表 2 可以看出, 在 50 MeV/u¹²C⁶⁺ 的各个辐照剂量区都存在变异菌株。无论是在形态上, 还是在胡萝卜素产量上, 辐照菌株都发生了很大的变异。表现在菌落形态上的变化主要是其形状由圆形变成不规则形; 在菌落颜色上的变化有 2 种, 一种是由对照的粉红色向深红色变化, 一种是由对照的粉红色向浅红色直至白色; 经重离子辐照的酵母菌菌落大小无显著的增大现象, 有一些菌落却明显反而缩小。胡萝卜素含量的变化很大, 尤其是 B3-4、B3-5、B3-6 3 个菌株, 其胡萝卜素的含量较对照增加近 2 倍, 但是, 在颜

色变至白色的菌落中,其其胡萝卜素的含量较对下降了近70%。在50MeV/ $u^{12}C^{6+}$ 辐照的高剂量区中,负突变明显高于正突变。因此,要从重离子辐照菌株中筛选出一个各个方面都适合要求的突变菌株也是不容易的,不能照搬过去的老经验。

表2 初步筛选出来的突变菌株的形态
特制及其各突变菌株的胡萝卜素产量/ $mg \cdot L^{-1}$

编号	剂量 /Gy	形状	颜色	大小 /mm	胡萝卜 素含量 / $mg \cdot L^{-1}$
B0	0	圆形	粉红色(+++)	3	0.65
B1-1	0.23	圆形	++++	3	0.72
B1-2		圆形	++++	3	0.77
B1-3		圆形	++++	3	0.62
B1-4		圆形	++++	3	0.85
B1-5		圆形	++++	3	0.86
B1-6		圆形	++++	3	0.85
B2-1	2.35	圆形	+	4	0.23
B2-2		圆形	++++	3	0.71
B2-3		圆形	++++	3	0.74
B2-4		圆形	++++	3	0.79
B2-5		圆形	++++	3	0.82
B2-6		圆形	++++	3	0.86
B3-1	4.70	圆形	++++	2	0.76
B3-2		圆形	+++	3	0.56
B3-3		圆形	++++	4	0.76
B3-4		不规则形	+++++	1	2.15
B3-5		不规则形	+++++	1	1.94
B3-6		不规则形	+++++	1	1.98
B4-1	23.51	圆形	+++	3	0.72
B4-2		圆形	++	4	0.42
B4-3		圆形	+	4	0.19
B4-4		圆形	+	4	0.27
B4-5		圆形	++	4	0.39
B4-6		圆形	+++	3	0.64
B5-1	235.05	圆形	+++	3	0.64
B5-2		圆形	++	3	0.46
B5-3		圆形	++	4	0.39
B5-4		圆形	++	2	0.45
B5-5		圆形	+	1	0.25
B5-6		圆形	+++	3	0.71

3 讨论

类胡萝卜素是一类有广泛应用价值的天然色素。细菌、霉菌和酵母菌形成类胡萝卜素都有报道,但其中以酵母菌生产类胡萝卜素有许多其他工业微生物无法比拟的优点,它不但发酵周期短,产量高;并且菌体含有丰富的蛋白质、氨基酸和维生素等,色素提取后,其菌体下脚料还可作为饵料、饲料加以综合利用。因此,许多国家都在竞相开发研究。酵母菌形成类胡萝卜素的种类、产量随菌种种类的变化有很大差异,因此,挖掘优良菌种资源对于类胡萝卜素的开发研究很有意义^[5]。

将重离子辐照应用于工业微生物诱变育种,为我们筛选优质高产的工业微生物提供了一条新的途径。我们的实验显示,50 MeV/ $u^{12}C^{6+}$ 辐照产生胡萝卜素的红酵母后,在其各个辐照剂量区都存在变异菌株,而其他物理诱变源所诱导的微生物变异则主要出现在存活率小于10%的照射剂量内,重离子诱变菌株的选择范围要远远高于其他物理诱变源。这不但为工业上利用重离子对胡萝卜素生产菌进行诱变育种展现出新的前景,而且也同样为工业上利用重离子对其他工业微生物进行诱变育种展现出新的前景。

参考文献

- 1 颜红梅,卫增泉,李文建. 中国抗生素杂志, 1998, 23: 462~463
- 2 杨文,古春明. 微生物学通报, 1995, 22: 58~59
- 3 F. 奥斯伯等. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖、王海林译,金冬雁校. 北京: 科学出版社, 1998, 483~484
- 4 彭仁旺,管考梅,黄秀梨. 微生物学通报, 1995, 22: 197~199
- 5 张晓君,白玲,马晓军. 微生物学通报, 1998, 25: 82~84

欢迎订阅《食品研究与开发》

《食品研究与开发》是全国公开发行的双月刊,统一刊号:CN12-1231/TS ISSN 1005-6521。内容包括:食品营养基础理论研究、食品营养科普知识、食品工艺研究、名特优新食品工艺介绍、食品机械、新产品开发、食品文摘和食品检测报告等。

该刊2002年为大16开本,64页,每期定价6.50元,全年定价45元。欢迎订阅、投稿、洽谈广告业务。邮汇:天津市食品研究所(食品研究与开发)编辑部 地址:天津市南开区卫津南路36号 邮编:300381 电话:022-23944872 23015659 银行汇款:天津市河西区平山道天津市商业银行天马支行。 帐号:106301201090048704

Mutagenesis on *Rhodotorula* RY Strain Irradiated by Heavy Ion

Li Hongyu¹ Li Chenghua¹ Ding Xinchun¹
Wang Jufang² Zhou Guangming² Xie Hongmei²
Li Qiang² Dang Bingrong²
Wen Xiaoqiong² Li Wenjian² Wei Zengquan²

1(Dept. Biochemistry and Molecular Biology,

School of Life Science, Lanzhou University. Lanzhou, 730000)

2(Institute of Modern Physics, Academia Sinica, Beijing, 100080)

ABSTRACT The red yeast (*Rhodotorula* RY strain), carotene producing strain, was irradiated by 50 MeV/u¹²C⁶⁺ heavy ion from heavy ion accelerator. The results showed that 50 MeV/u¹²C⁶⁺ heavy ion can give raise to mutagenesis effect. Several mutants were screened that produced carotene abnormally. This will present a new project for the application of heavy ion mutagenesis in industrial microbiology breeding.

Key words heavy ion, *Rhodotorula*, mutagenesis effect

佳 著 赏

日本发明果蔬保鲜新方法

日本庆应大学白鸟世明教授等利用从竹子中提取的物质,开发了一种水果和蔬菜保鲜新方法。研究人员从竹子表皮提取出乙烯氧化酶,并使用脱乙酰壳多糖制成壳质凝胶,涂敷在发泡塑料膜上对蔬菜 and 水果进行保鲜。用这种方法制作出的新型保鲜膜已经投放市场。

据介绍,乙烯氧化酶是一种天然的植物性物质,因此安全性高。迄今为止的试验结果证明,使用这种物质,可使苹果的保鲜期延长到1个月以上,芹菜可达2周以上。据称,把乙烯氧化酶液加以稀释,直接涂抹在水果表面,也能够起到保鲜作用。

俄国开发出可杀菌吸水的食品袋

俄罗斯实用生物技术研究院最近开发出了可吸水杀菌并能多次使用的食品包装袋。据俄《科学与生活》杂志报道,为使奶酪、香肠等容易变质的食品能保存得时间长一些,俄专家在食品包装材料的聚合物中添加了脱水的酸化物质、多种矿物质和酶等物质。富含这些物质的包装袋内表面可吸收多余水分,杀灭细菌,从而改善了包装袋的内部环境。添加物中的酶还能调节食物的气味。

在研制上述包装袋的过程中,还必须解决一个重要问题,即防止包装材料中的添加物进入食物成分。俄专家运用多次冷冻和解冻的技术解决了这一问题。为使新型包装袋能够被反复使用,科研人员还向包装料中添加了胃蛋白酶。用这种材料制成的包装袋可以在一个特定工序中反复使用9次,从而减少了包装袋的耗费,降低了生产成本。

食品工业科技

月刊

全国中文核心期刊 轻工行业优秀期刊

《食品工业科技》杂志1979年创刊,是北京市食品工业研究所主办,国内外公开发行的综合性食品科技一级期刊。《食品工业科技》既是反映当前国内外食品工业技术水平的窗口,又是新技术应用推广的桥梁,面向科研、生产,满足各层次需求。《食品工业科技》杂志特点:影响大,范围广,技术新,内容实,信息快。

为了加速科技信息传递,满足广大读者的要求,《食品工业科技》2002年改为月刊。

大16开,180页;单价:8元,全年:96元; 刊号:ISSN1002-0306/CN11-1759/TS, 邮发代号:2-399;可通过邮局订阅,或直接汇款至本刊编辑部订阅。

地址:100075 北京市永外沙子口路70号

电话:010-67215557 转3026或3065

传真:010-87287944