

# 核黄素产生菌阿舒假囊酵母(*Eremothecium ashbyii*) 抗反馈抑制突变株的选育

姜小山\* 孙国萍 王淑君 赖林翰

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

**摘要** 在调查阿舒假囊酵母(*Eremothecium ashbyii*)营养要求的基础上,设计了适合该菌生长的合成培养基,在合成培养基上诱变筛选得到了数株抗喋呤拮抗物 8-AG 的突变株。选择其中三株  $U_{95-1}$ 、 $U_{95-2}$  和  $U_{95-3}$  进行传代和摇瓶发酵试验,  $U_{95-3}$  的核黄素发酵单位低于出发菌,未经传代的  $U_{95-1}$ 、 $U_{95-2}$  比出发菌株的发酵水平分别提高 15.5% 和 9.8%, 经 5 ~ 10 代传接,其产核黄素的遗传性状稳定。该研究表明,从代谢控制角度通过减轻核黄素合成途径中重要调节酶的反馈抑制对提高 *E. ashbyii* 的核黄素产量和稳定性是可行的,为该菌的菌种改良提供了一条遗传育种途径。

**关键词** 阿舒假囊酵母, 核黄素, 反馈抑制, 突变株

阿舒假囊酵母(*Eremothecium ashbyii*)是我国生产核黄素( $VB_2$ )的重要菌种,但该菌产量偏低、遗传性状不稳定的问题一直困扰着核黄素发酵工业。几十年来,科学工作者在菌种选育方面作了大量工作,但选育的方法主要根据在外表形态方面所积累的经验进行诱变筛选,选择带有很大的盲目性,耗时耗力。根据微生物代谢调节的原理,如果筛选抗核黄素合成代谢物类似物(如喋呤)和核黄素类似物的突变株,减轻核黄素合成途径重要酶的反馈抑制,有可能会提高代谢终产物的积累<sup>[1]</sup>。尽管这种借助于诱变处理进行的代谢控制遗传育种技术已广泛应用于生产初级或次级代谢产物的菌种改良<sup>[2]</sup>,但到目前为止还未见用 *E. ashbyii* 进行这方面研究的报道,原因可能是该菌在无机盐培养基中不能生长,又难以找到适合该菌生长的合成培养基。为此,本文报道了适合该菌生长的合成培养基和在合成培养基上筛选抗喋呤类似物 8-AG 的研究结果,以期获得高产、稳产  $VB_2$  菌株提供一条育种途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

阿舒假囊酵母(*Eremothecium ashbyii*),购自广东省微生物研究所,本室保存。

### 1.2 培养基和有关试剂

1.2.1 培养基:查氏培养基<sup>[3]</sup>;酵母无机盐培养基(YMM)<sup>[4]</sup>;SD 合成培养基<sup>[5]</sup>;Bacto-

\* 现在工作单位:卫生部武汉生物制品研究所 430060  
本文于 1995 年 8 月 21 日收到。

酵母氮基 4g, 葡萄糖 12g, 琼脂 12g, H<sub>2</sub>O 600ml; Schopfer 基本培养液(SB)<sup>[6]</sup>: 葡萄糖 10.0g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5g, 天冬酰胺 1.0g, 生物素 2.5 μg, VB<sub>1</sub> 400.0 μg, 肌醇 40.0mg, H<sub>2</sub>O 1000 ml, 用磷酸缓冲液调节至所需 pH 值。基本培养基(M<sub>1</sub>)和发酵培养基(M<sub>2</sub>)<sup>[7]</sup>。

1.2.2 有关试剂: 10种必需氨基酸(每种氨基酸含量为 20 μg/ml): L-缬氨酸、DL-甲硫氨酸、L-组氨酸盐酸、L-精氨酸盐酸、L-赖氨酸盐酸、DL-异亮氨酸、DL-苏氨酸、L-色氨酸、DL-苯丙氨酸、DL-亮氨酸, 国内生产分析纯; 酵母氮基, Difco 产品; 8-氮鸟嘌呤(8-AG), Sigma 产品。

### 1.3 方法

1.3.1 VB<sub>2</sub>含量的测定方法: 参照文献[8]进行。

1.3.2 8-AG对出发菌株的抑菌作用: 在一定合成培养基中分别加入不同量的 8-AG, 使其浓度分别达到: 2.5 μg/ml、5 μg/ml、10 μg/ml、20 μg/ml 和 40 μg/ml。把洗净的孢子分别接在上述不同浓度 8-AG 的培养基上, 28 °C 倒置培养 3 ~ 5 d, 观察生长情况。

1.3.3 诱变处理: 取 5ml 孢子悬液(10<sup>6</sup>个/ml)放在 Φ 9cm 培养皿内, 用 15W 紫外杀菌灯(254 nm)照射。距离 25cm, 并不断摇动, 不同时间取样, 经一系列稀释后涂布在 M<sub>1</sub> 培养基上遮光培养 3 ~ 5 d。计算孢子诱变后的存活率或在涂布于合成培养基上筛选抗性菌落。

1.3.4 突变株的检出: 在加有 10 μg/ml 8-AG 合成培养基上生长的抗性菌落连续转接, 仍然生长良好的菌落确认为抗性菌落。

1.3.5 发酵试验: 挑取在 M<sub>1</sub> 平板上生长 3 ~ 5 d 的单菌落直接接种至装有 30ml 发酵培养基的 500ml 三角瓶中, 置于转速为 200 ~ 250 r/min 的旋转式恒温摇床振荡培养。5 ~ 7 d 后测 VB<sub>2</sub> 产量。

## 2 结果

### 2.1 适合 *E. ashbyii* 生长的合成培养基

为试验 *E. ashbyii* 正常生长的营养要求, 试验了与其生长特性、分类地位接近的霉菌、酵母生长用无机盐或无氨基酸培养基(查氏培养基、YMM、SD)、SB 培养基及 SB 培养基添加一些生长因子后对该菌生长的影响, 同时以 SD 培养基作为对照, 试验这些生长因子的促进作用, SB 培养基最先是 Schopfer 在研究 *E. ashbyii* 时使用的一种仅用天冬酰胺(ASn)作为有机氮源的合成培养基<sup>[6]</sup>, SD 培养基作为酵母遗传实验选择用, 它含有盐、微量元素、氮源(Bacto-酵母氮基)和葡萄糖但不含氨基酸氮源的合成培养基。实验结果列于表 1。

上述结果表明: *E. ashbyii* 在无机盐或无氨基酸的培养中不生长; SB 培养基不能完全支持该菌生长, 在组份未变, 调节至不同的 pH 值, *E. ashbyii* 的生长无明显变化, 这与文献[1]报道 pH5.8 ~ 6.2 是 SB 培养基支持该菌生长的重要因素不一致, 可能是因为不同的实验室的 *E. ashbyii* 生长特性存在差异, 所以 *E. ashbyii* 的正常生长需要补加其它生长因子; SB 培养基中补加 10 种必需氨基酸或补加其中的甲硫氨酸和组氨酸两种

表1 *E. ashbyii* 正常生长所需生长因子  
Table 1 Growth factors requiring for *E. ashbyii*

培养基 Medium	培养基成份 Components of medium	生长状况* Growth
无机盐或无氮 氨基酸培养基 Mineral medium or medium containing no amino acid	查氏培养基 C. medium YMM YMM + 0.01% inositol + VB <sub>1</sub> + biotin SD SD + 0.01% inositol + VB <sub>1</sub> + biotin	- - - - -
SB(不同 pH 值) SB(various pH value)	pH 5.0 ~ 5.4 pH 5.4 ~ 5.8 pH 5.8 ~ 6.0	+ + +
SB + 生长因子 SB + growth factors (amino acid, inositol, VB <sub>1</sub> , biotin) pH 5.8 ~ 6.2	SB + essential amino acid SB + Met SB + His SB + Met + His SB + Met + His + 0.005% inositol SB + Met + His + 0.01% inositol SB + Met + His - (VB <sub>1</sub> + biotin) SB + Met + His + 0.005%(VB <sub>1</sub> + biotin) SB + Met + His + 0.01%(VB <sub>1</sub> + biotin) SB + 0.01%(VB <sub>1</sub> + biotin) SB + Met + His + 0.01% inositol - (VB <sub>1</sub> + biotin)	++ + + ++ +++ ++++ ++ ++ ++ + ++++
SD + 生长因子 SD + growth factors pH 5.8 ~ 6.2	SD + ASn + essential amino acid SD + ASn SD + ASn + Met + His SD + ASn + 0.01% inositol SD + ASn + Met + His + 0.01% inositol	++ + ++ +++ ++++

\* “-” 无任何生长; “+” 生长微弱; “++” 生长一般; “+++” 生长较好, 但菌落不规则; “++++” 生长正常。

“-” No growth; “+” Poor; “++” Fair; “+++” Good; “++++” excellent.

氨基酸(每种氨基酸的浓度为 20 μg/ml), *E. ashbyii* 的生长得到改善, 但菌落生长不规则; 肌醇、维生素 B<sub>1</sub> 和生物素三种生长因子对 *E. ashbyii* 生长的促进作用已有很多报道<sup>[10]</sup>。本实验结果表明, *E. ashbyii* 仅需要高浓度的肌醇作为生长因子。肌醇对该菌的生长有明显的促进作用, 当浓度提高至 0.01% 时, 出现最大生长量, 菌落生长规则; 而 VB<sub>1</sub> 和生物素是否存在和浓度高低对该菌生长无明显影响, 表明 VB<sub>1</sub> 和生物素既不是该菌的必需生长因子, 也不是辅助生长因子。在 SD 培养基的对照实验中, 同时证实了上述结论。因此, 在未加 VB<sub>1</sub> 和生物素的 SB 培养基中添加甲硫氨酸和组氨酸两种氨基

酸并提高肌醇的浓度至 0.01%，可完全支持 *E. ashbyii* 的生长，用作进一步实验的合成培养基。

## 2.2 抗代谢类似物 8-AG 突变株的筛选

2.2.1 紫外线处理的致死曲线：选择不同剂量和不同时间处理 *E. ashbyii* 孢子发现，其

它微生物常用的化学诱变剂 NTG 对该菌无明显致死效应，但对紫外线很敏感。孢子悬浮液经紫外线处理后得到的致死曲线如图 1，当诱变时间为 13s 时，致死率接近 100%。

2.2.2 突变株的 VB<sub>2</sub> 产量和稳定性：

在所述合成培养基中，嘌呤拮抗物 8-AG 完全抑制 *E. ashbyii* 生长的最低剂量为 10 μg/ml。出发菌株孢子经紫外线诱变处理，最后得到数株能在 50 μg/ml 8-AG 合成培养基上生长的突变株。选取其中 3 株颜色深黄，直径中等大小的突变株 U<sub>95-1</sub>、U<sub>95-2</sub> 和 U<sub>95-3</sub>，以出发菌株 U<sub>95-0</sub> 作为对照，在

完全培养基上连续转接 10 代的过程中分离单菌落，并进行摇瓶发酵试验，测定其 VB<sub>2</sub> 产量和稳定性(表 2)。

图 1 紫外线处理的致死曲线

Fig. 1 The lethal curve of *E. ashbyii* treated with UV light

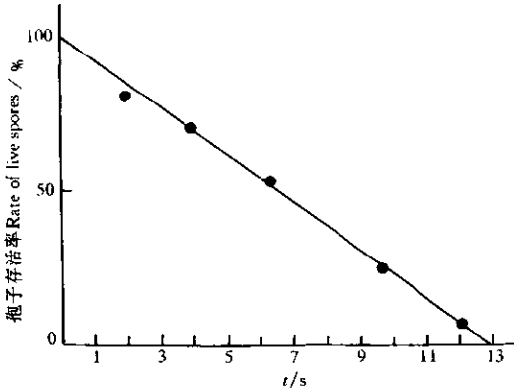


表 2 *E. ashbyii* 出发菌和突变株的产量及稳定性

Table 2 The yields of VB<sub>2</sub> and stability of the original strain and its mutants of *E. ashbyii*

传代数 Number of inoculation	平均产量 / μg · ml <sup>-1</sup> Average yields				相对产量 / % Relative yields ( $\bar{X} \pm SD$ )				平均增产率 / % Rate of average increase			
	U <sub>95-0</sub>	U <sub>95-1</sub>	U <sub>95-2</sub>	U <sub>95-3</sub>	U <sub>95-0</sub>	U <sub>95-1</sub>	U <sub>95-2</sub>	U <sub>95-3</sub>	U <sub>95-0</sub>	U <sub>95-1</sub>	U <sub>95-2</sub>	U <sub>95-3</sub>
0	3550	4100	3900	3210	100	100	100	100	0	15.5	9.8	-9.5
5	3400	4200	3800	3100	95.8	102.4	97.5	96.6	0	23.5	11.7	-8.8
					±2.1	±1.8	±0.7	±4.3				
10	3340	4180	3850	3000	94.1	102	103.8	93.8	0	25.1	15.2	-10.1
					±3.4	±1.1	±0.9	±4.6				

突变株 U<sub>95-1</sub> 和 U<sub>95-2</sub> 比出发菌株 U<sub>95-0</sub> 的 VB<sub>2</sub> 产量有所提高，U<sub>95-3</sub> 的产量低于出发菌株。如果以出发菌的产量为 100%，未经传代突变株 U<sub>95-1</sub> 和 U<sub>95-2</sub> 发酵单位分别比出发菌株提高 15.5% 和 9.8%。随着传代代数的增加，与同代数的出发菌相比，这种增长率更高；在传代过程中，U<sub>95-1</sub> 和 U<sub>95-2</sub> VB<sub>2</sub> 发酵单位的相对产量保持比较稳定，说明这些突变株产核黄素的遗传性状稳定。初步显示了较出发菌株的优良性。

### 3 讨论

#### 3.1 适合本试验用 *E. ashbyii* 生长的合成培养基

该培养基所加氨基酸的种类是有限的,但需要添加高浓度的肌醇,在微生物代谢中,生长因子的浓度一般是极低的(低于  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ),对本菌所需肌醇的浓度高达  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  的原因还不清楚。调查该菌正常生长所需生长因子和设计适合该菌生长的合成培养基不仅为筛选抗代谢类似物突变株创造了条件,而且可以设想,在合成培养基上继续筛选其它氨基酸或碱基营养缺陷型,可作为其它育种方式(如原生质体融合或基因转化)的选择标志。

#### 3.2 突变株的筛选

由于  $\text{VB}_2$  的合成途径牵涉到多个反应步骤,受到多种代谢产物的调控,筛选得到的对代谢类似物 8-AG 不敏感突变株只是部分减轻了代谢产物抑制,因此得到的突变株  $\text{U}_{95-1}$  和  $\text{U}_{95-2}$  比出发菌株  $\text{VB}_2$  产量提高 9% 以上。在此基础上,可继续筛选抗其它类似物或代谢阻断型的突变株,有可能使  $\text{VB}_2$  产量得到进一步提高<sup>[1]</sup>。在工业生产中,可选择有较高产量  $\text{VB}_2$  的生产菌种作为出发菌株,结合这种育种方法,得到更高  $\text{VB}_2$  生产菌是有希望的。

### 参 考 文 献

- [1] 焦瑞身,沈永强.医药工业,1980,9:1~6.
- [2] 盛祖嘉,陈永清,微生物遗传学综述文集.上海:复旦大学出版社,1993.217.
- [3] 武汉大学,复旦大学.微生物学实验.北京:高等教育出版社,1980.261.
- [4] 白毓谦,方善康,高东.微生物学实验技术.济南:山东大学出版社,1986.478~479.
- [5] 陈士怡.酵母遗传学.北京:科学出版社,1989.
- [6] Schopfer W H. Helvetica Chim Acta, 1944, 27:1017~1032.
- [7] 程鲁榕,邓秀珍,张幼岷.微生物学通报,1993,20(1):19.
- [8] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国药典.1990年版二部.
- [9] Yaw K E. Mycologia, 1952, 44:307~317.
- [10] Demain A. Ann Rev Microbiol., 1972, 26:369~388.

## BREEDING OF FEEDBACK INHIBITION RESISTANT MUTANTS OF *EREMOTHECIUM ASHBYII* OVERPRODUCING RIBOFLAVIN

Jiang Xiaoshan   Sun Guoping   Wang Shujun   Lai Linhan

(Wuhan Institute of virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

**Abstract** *E. ashbyii* is an important filamentous fungus overproducing riboflavin. The synthetic medium in which *E. ashbyii* grows excellent was designed on the basis of the investigation of its nutrient requirement. Three mutants, U<sub>95-1</sub>, U<sub>95-2</sub> and U<sub>95-3</sub> obtained from original strain of *E. ashbyii* treated with U. V by selected on the synthetic medium containing 8-AG of analogue of guanine (50 $\mu$ g/ml), were selected to determine their productivity and stability in the procedure of continual inoculation by flask fermentation. Results showed that the productivity of mutants U<sub>95-1</sub> and U<sub>95-2</sub> increased 15.5% and 9.8% respectively compared with start strain and also showed good genetic stability after five to ten generations. A way to improve productivity and stability of *E. ashbyii* was provided.

**Key words** *E. ashbyii*, Riboflavin, Feedback inhibition, Mutant