

文章编号: 1007-4627(2013)04-0483-05

## 重离子束 $^{12}\text{C}^{6+}$ 累进辐照诱变柠檬酸菌株选育研究

陈积红<sup>1,2</sup>, 胡伟<sup>1,2</sup>, 李文建<sup>1,2</sup>, 刘敬<sup>1,2</sup>, 王曙阳<sup>1,2</sup>, 魏子昊<sup>1,2</sup>

(1. 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2. 甘肃省微生物资源开发利用重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

**摘要:** 应用大剂量重离子束  $^{12}\text{C}^{6+}$  对菌株 H3001 进行二次辐照选育, 对初选获得的高产柠檬酸菌株进行摇瓶发酵试验及 10~100 L 中试发酵罐试验, 采用酸碱中和法测定发酵液中柠檬酸的含量。结果表明: 当二次重离子  $^{12}\text{C}^{6+}$  剂量为 857.8 Gy 时, 致死率和正突变率达到最大值, 分别为 94.5% 和 8%。通过摇瓶发酵试验, 最终获得一株高产柠檬酸菌株 hw317, 控制该菌株发酵周期为 60 h, 柠檬酸酸度能达到  $19.2\pm 0.2\%$ 。

**关键词:** 重离子束; 诱变; 发酵试验; 柠檬酸含量

**中图分类号:** Q939.9; Q691.5; Q815 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.30.04.483

### 1 引言

柠檬酸又名枸橼酸(3-羟基-3-羧基戊二酸), 是世界范围内消耗量最大的有机酸之一。广泛应用于食品、医药和化学工业等行业<sup>[1]</sup>。柠檬酸最初是从柠檬中提取, 后来研究人员发现黑曲霉和某些酵母可以发酵糖类原料生产柠檬酸, 从此发酵法生产柠檬酸拉开了序幕。随着发酵技术的发展, 绝大多数柠檬酸生产企业是利用黑曲霉深层发酵生产柠檬酸<sup>[2]</sup>。由于柠檬酸用途很广, 柠檬酸全球消耗量已达  $1.2 \times 10^6$  t, 产能达到了  $1.6 \times 10^6$  t<sup>[3]</sup>, 所以如何提高其产量及降低生产成本是柠檬酸研究课题的重中之重。

在柠檬酸高产菌株选育的过程中, 科研人员过多地利用传统的物理、化学及两者复合手段对黑曲霉进行诱变<sup>[4-5]</sup>, 这使得黑曲霉菌株对这些传统诱变手段产生抗性, 诱变效果不佳, 突变率不高。而重离子诱变作为新型的诱变手段, 相比较传统诱变育种手段, 其优势在于具有高的传能线密度(LET)和相对生物学效应(RBE), 可以产生能量沉积、动量传递、质量沉积以及电荷交换等效应, 导致生物体DNA损伤, 激活生物体的修复机制, 有利于外源基因主动进入生物体

并与生物体损伤的DNA进行重组和整合, 易于突变体的形成, 最终使得生物体表现出突变率高和突变谱广等特点<sup>[6]</sup>。

基于重离子诱变手段的优势特点, 本文利用兰州重离子研究装置(HIRFL)提供的重离子束  $^{12}\text{C}^{6+}$  (C离子能量为 80 MeV/u, 剂量率平均为 40 Gy/min) 二次辐照黑曲霉(*Aspergillus niger*)H3001 菌种(第一次  $^{12}\text{C}^{6+}$  辐照后, 筛选得到的柠檬酸菌株, 其产酸能达到 15.00 g/100 mL), 使其遗传物质发生突变, 筛选出产柠檬酸能力更高的突变菌株, 同时采用平板培养法确定辐照后菌株 H3001 的致死率, 利用摇瓶发酵来确定辐照后菌株的正突变率; 然后对高产菌株进行 10~100 L 发酵罐的二级中试发酵试验并对影响发酵的两个重要因素进行考察; 最终得到适合高产柠檬酸突变菌株发酵的生产工艺。

### 2 材料与方 法

#### 2.1 菌种

黑曲霉 H3001: 经第一次重离子束  $^{12}\text{C}^{6+}$  辐照后筛选所得, 由中国科学院近代物理研究所生物物理研究室提供。

收稿日期: 2012-12-18; 修改日期: 2013-01-25

基金项目: 科技部农业科技成果转化项目(2012GB24910647)

作者简介: 陈积红(1965-), 男, 甘肃武威人, 高级工程师, 从事微生物诱变育种研究; E-mail: chjh@impcas.ac.cn.

通信作者: 李文建, E-mail: wjli@impcas.ac.cn

<http://www.npr.ac.cn>

## 2.2 培养基及培养条件

固体平板的培养温度为 $(36 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。

斜面培养基: PDA 培养基。

筛选培养基: PDA 培养基, 溴甲酚绿。

摇瓶培养基及最佳培养条件: 25% 玉米粉(张掖昆仑公司 201203018p) 经  $\alpha$ -淀粉酶(山东隆大生物工程有限公司 201110016p) 液化后调整糖浓度为 18%, 用自来水配制, 摇床转速 300 r/min, 温度  $37^\circ\text{C}$ , 湿度控制为 45% ~ 50%。

发酵罐培养基及最佳培养条件: 25% 玉米粉经  $\alpha$ -淀粉酶液化后调整到所需的糖浓度, pH 自然, 用自来水配制, 发酵罐转速 400 r/min, 温度  $37^\circ\text{C}$ , 通气量为 18 L/min。

## 2.3 诱变及筛选方法

(1) 黑曲霉 H3001 孢子悬液的制备及  $^{12}\text{C}^{6+}$  离子束辐照诱变

取  $(36 \pm 0.5)^\circ\text{C}$  培养箱培养 6 d 的黑曲霉 H3001 斜面 10 支, 每只斜面加 5 mL 无菌生理盐水, 用接种针刮下孢子, 移入装有玻璃珠的无菌三角瓶中, 快速放入摇床中振荡 10 min, 然后用三层无菌纱布过滤。分别取过滤后的孢子悬液 2 mL 置培养皿中, 利用 HIRFL 提供的重离子束  $^{12}\text{C}^{6+}$ , 按照 0, 272.9, 467.9, 662.9, 857.8 和 1052.9 Gy 的辐照剂量对黑曲霉 H3001 菌种孢子悬浮液分别进行辐照处理。

### (2) 致死率和正突变率的测定

将不同剂量辐照后的孢子悬液梯度稀释后, 取  $10^{-4}$  ~  $10^{-5}$  稀释梯度下 0.1 mL 孢子悬液涂布在加溴甲酚绿固体平板培养基上<sup>[7]</sup> (每个处理进行 3 个重复), 于  $(36 \pm 0.5)^\circ\text{C}$  培养箱中倒置培养 36 ~ 40 h, 确定致死率。同时选取 40 株酸斑直径与菌斑直径比值大的突变菌株传接斜面, 进行摇瓶发酵, 并确定正突变率。其计算公式如下:

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

$$\text{正突变率} = \frac{\text{筛选菌株的摇瓶发酵度} - \text{初始菌株的发酵酸度}}{\text{初始菌株的发酵酸度}} \geq 5\%.$$

### (3) 摇瓶发酵复筛

将初筛的菌株转入发酵培养基逐个进行摇瓶发酵试验, 测定酸度。

## 2.4 100 L 中试发酵

发酵关键点的控制及中试发酵稳定性试验是制约菌株能否工业化应用的前提。

(1) 考察中试发酵过程中的温度和通气量对最终发酵酸度的影响

用 10 L 种子罐培养好的种子转接到已调配好的发酵培养基中, 选择发酵温度为 36, 37 和  $38^\circ\text{C}$ , 通气量为 18 L/min 的条件下进行培养, 发酵 60 h 后测定不同的温度条件下发酵液中柠檬酸的含量, 从而确定最终适合菌株 hw317 发酵生产柠檬酸的最适温度。同时也考察了通气量 10, 15 和 18 L/min 对最终发酵酸度的影响, 最终确定最佳的通气量。

### (2) 中试发酵的稳定性试验

通过 5 批连续性发酵中试试验, 来确定菌株 hw317 的发酵稳定性。

## 2.5 发酵柠檬酸酸度的测定

取发酵液 5 mL, 4000 r/min 离心 5 min 并过滤。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 mol/L 的氢氧化钠溶液滴定, 每消耗 1 mL NaOH 为 1% 酸度<sup>[8]</sup>。

计算公式如下:

实际酸度  $A(\%)$  计算:  $A = V$ , 其中,  $V$  是碱液滴定体积数。

## 3 结果与分析

### 3.1 二次重离子辐照后黑曲霉的致死率和正突变率的统计

由图 1 可以看出, 菌株 H3001 经过二次重离子辐照后, 正突变率随着辐照剂量的增加而明显上升, 当剂量在 857.8 Gy 时, 正突变率最大为 8%; 致死率在剂量为 0 ~ 272.9 Gy 变化剧烈, 即随着剂量的增加, 致死率呈快速上升; 剂量在 272.9 ~ 1052.9 Gy 之间时, 致死率变化相对较缓, 呈缓慢增加的趋势。

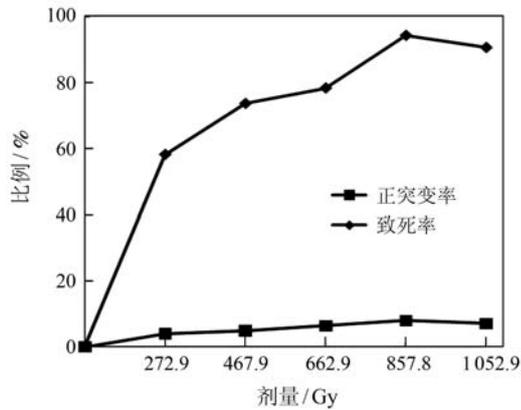


图1 二次重离子辐照后黑曲霉的致死率和正突变率

### 3.2 二次重离子辐照后黑曲霉的摇瓶发酵试验

受辐照后的黑曲霉菌株在平板固体筛选培养基上, 形成了黄色酸斑, 通过酸斑直径和菌苔直径的比值大小, 可以初筛获得40株比值较大的菌株。由于酸斑法筛选本身的局限性, 使得筛选结果有较大误差, 故利用摇瓶发酵进行了复筛试验, 获取了3株产酸有明显提高的菌株(酸度大于16 g/100 mL), 其中一株产酸高达17 g/100 mL, 命名为hw317(表1)。32株产酸在14.7~15.5 g/100 mL, 5株产酸在15.5~16 g/100 mL。通过复筛实验结果可知, 某些酸斑直径和菌苔直径比值大的菌株, 实际产酸却低于出发菌株。这说明, 平板筛选法筛选得到的高产菌株与其发酵特性之间具有一定的误差, 可能的原因是, 菌株产生的柠檬酸在固体筛选平板中扩散不均, 产生的酸斑直径过大, 从而导致最终酸斑直径和菌苔直径之比过大, 影响了酸斑直径筛选法的准确性。但考虑到筛选高产菌株的人工工作量, 平板筛选法仍然是筛选柠檬酸高产菌株不可或缺的手段之一, 同时搭配摇瓶发酵复筛实验, 可以很好地弥补其在准确性上的劣势, 提高柠檬酸高产菌株的筛选效率。

表1 二次重离子辐照后黑曲霉的初筛结果

| 菌株编号  | 发酵周期/h | 酸度/(g/100 mL) |
|-------|--------|---------------|
| H3001 | 90     | 15.00         |
| hw317 | 90     | 17.51         |
| hw128 | 90     | 16.11         |
| hw106 | 90     | 16.32         |

### 3.3 菌株hw317的摇瓶发酵稳定性试验

根据初筛结果, 选择菌株hw317进行遗传稳定性

试验, 通过连续5次的摇瓶发酵, 控制发酵周期为90 h, 摇床转速为300 r/min, 湿度控制在45%~50%, 最终结果表现为通过筛选得到的菌株具有稳定的产酸能力(表2)。

表2 菌株hw317遗传稳定性试验结果

| 重复次数 | 酸度/(g/100 mL) | 重复次数 | 酸度/(g/100 mL) |
|------|---------------|------|---------------|
| 1    | 17.41         | 4    | 17.30         |
| 2    | 17.50         | 5    | 17.42         |
| 3    | 17.55         |      |               |

### 3.4 发酵温度和通气量对发酵罐发酵酸度的影响

黑曲霉高产柠檬酸的特性不仅由其遗传特性决定, 也受其所处的环境条件影响, 可以说是一个多条件协调平衡的综合体。本文从大生产的角度出发, 考察了发酵温度、通气量对最终发酵酸度的影响, 当控制温度为37 °C时, 发酵周期为60 h, 发酵罐转速为400 r/min; 通气量18 L/min时, 此时酸度为最大, 即19.00 g/100 mL(表3), 这说明菌株hw317在该温度下, 更合适其生长, 利用外界环境中糖类物质的酶类活性更高; 黑曲霉发酵生产柠檬酸是需氧的, 通气量过低(<15 L/min), 影响发酵时所需的菌体浓度, 最终表现为产酸慢; 通气量过高时, 会促使菌体过快生长以及发酵液过度蒸发, 表现出耗糖快和产酸慢等特点; 本实验控制通气量为18 L/min时, 菌株hw317表现出较高的产酸能力, 酸度达19.42 g/100 mL(表4)。

表3 发酵温度对最终发酵酸度的影响

| 发酵温度/°C | 周期/h | 酸度/(g/100 mL) |
|---------|------|---------------|
| 36      | 60   | 17.49         |
| 37      | 60   | 19.00         |
| 38      | 60   | 18.23         |

表4 通气量对最终发酵酸度的影响

| 通气量/(L/min) | 周期/h | 酸度/(g/100 mL) |
|-------------|------|---------------|
| 10          | 60   | 17.37         |
| 15          | 60   | 18.10         |
| 18          | 60   | 19.42         |

### 3.5 菌株hw317的100 L中试发酵稳定性试验

利用100 L中试发酵罐对菌株hw317进行了中试发酵稳定性试验, 控制发酵温度为37 °C时, 发酵周期为60 h, 发酵罐转速为400 r/min, 通气量为18 L/min,

糖浓度控制在 20.0 ~ 21.0 g/100 mL, 菌株 hw317 具有较好的发酵稳定性, 酸度都高于 19.00 g/100 mL (表 5)。这说明, 通过二次重离子辐照后, 筛选得到的菌株 hw317 能够适应于高糖、高渗和高酸的环境下生长, 可能的解释是该菌株的遗传物质在辐照后, 某些生产柠檬酸的关键基因或调控序列发生了突变, 增强了该菌株产柠檬酸的能力, 这将有待于进一步的实验研究进行验证。

表 5 100 L 发酵罐中试试验结果

| 重复试验<br>批号 | 初始糖浓度<br>(g/100 mL) | 发酵<br>时间/h | 酸度<br>(g/100 mL) |
|------------|---------------------|------------|------------------|
| 1          | 21.0                | 60         | 19.50            |
| 2          | 20.0                | 60         | 19.00            |
| 3          | 20.3                | 60         | 19.14            |
| 4          | 20.6                | 60         | 19.33            |
| 5          | 20.1                | 60         | 19.03            |

## 4 结论

高效率的生产菌种是左右发酵行业发展的重要因素之一<sup>[9]</sup>。目前的研究表明, 高效率的菌株基本上是通过传统人工诱变和基因改造获得。对于遗传背景不清楚的菌株, 人工诱变选育依然是最好的选择<sup>[10]</sup>。黑曲霉是重要的发酵工业菌株, 可生产多种酶类以及有机酸, 因其遗传背景比较复杂, 科研人员多采用人工诱变手段筛选获得高效率的黑曲霉菌株。初始菌株 H3001 是利用 HIRFL 提供的重离子束  $^{12}\text{C}^{6+}$  辐照诱变后获得的。本研究对 H3001 进行了第二次辐照诱变。通过摇瓶筛选, 最终得到一株黑曲霉菌株 hw317, 控制发酵周期 90 h, 摇床转速 300 r/min, 湿度 45%~50%, 最终的酸度能达到 17.51 g/100 mL, 与出发菌株 H3001 的发酵酸度 (15 g/100 mL) 相比, 产酸提高了 16.6%。

诱变选育的突变菌株高产特性, 不仅由其遗传性状决定, 也由其所处的环境条件所决定<sup>[11]</sup>。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。为适应工业化生产, 本文以全玉米粉为原料, 对 hw317 进行了 10 ~ 100 L 发酵罐的中试研究; 结果发酵周期为 60 h, 发酵罐转速为 400 r/min, 通气量为 18 L/min, 发酵酸度大于 19 g/100 mL, 连续 5 批次中试发酵稳定性良好; 用重离子

束辐照后筛选获得的菌株 hw317 和 10 ~ 100 L 罐中试发酵工艺技术, 为柠檬酸的规模化生产提供了参考依据。本文诱变选育结果也证明, 采用重离子束  $^{12}\text{C}^{6+}$  离子诱变处理对于柠檬酸生产菌株——黑曲霉的高产菌株选育是行之有效的方法, 在微生物诱变领域方面具有潜在的应用前景。

## 参考文献(References):

- [1] JIN Qirong. Fermentation Techniques of Organic Acid[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1989: 20–30. (in Chinese)  
(金其荣. 有机酸发酵工艺学[M]. 北京: 轻工业出版社, 1989: 20–30.)
- [2] ZHOU Jianxin, PENG Xueji, YAO Minglan, *et al.* Food Science, 2008, **29**(9): 370. (in Chinese)  
(周建新, 彭雪霁, 姚明兰, 等. 食品科学, 2008, **29**(9): 370.)
- [3] SUN Rong, WANG Yan, YANG Pingping. China Condiment, 2011, **30**(1): 90. (in Chinese)  
(孙荣, 王燕, 杨平平. 中国调味品, 2011, **30**(1): 90.)
- [4] HONG Housheng, LIU Chen, XUE Yeming, *et al.* Food and Fermentation Industries, 2002, **29**(1): 41. (in Chinese)  
(洪厚胜, 刘辰, 薛业敏, 等. 食品与发酵工业, 2002, **29**(1): 41.)
- [5] REN Xiaoli, ZHAO Lin, YANG Baoqiang, *et al.* Journal of Tianjin University, 2010, **43**(6): 553. (in Chinese)  
(任晓莉, 赵林, 杨宝强, 等. 天津大学学报, 2010, **43**(6): 553.)
- [6] LI Renmin, WANG Jufang, LI Wenjian. Nuclear Physics Review, 2007, **24**(3): 234. (in Chinese)  
(李仁民, 王菊芳, 李文建. 原子核物理评论, 2007, **24**(3): 234.)
- [7] HU Wei, CHEN Jihong, ZHANG Zhen, *et al.* Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2012, **30**(1): 54. (in Chinese)  
(胡伟, 陈积红, 张珍, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2012, **30**(1): 54)
- [8] PAN Shenglong. Journal of Anhui Agriculture Science, 2010, **38**(29): 16700. (in Chinese)  
(潘声龙. 安徽农业科学, 2010, **38**(29): 16700)
- [9] HUANG Xuchu. Study on the mutation breeding of *Aspergillus niger* fermented production citric Acid[D]. Urumqi: Xinjiang University, 2006: 13. (in Chinese)  
黄旭初. 柠檬酸发酵菌黑曲霉的诱变育种研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2006: 13.
- [10] CHEN Jihong, WANG Shuyang, LIU Jing, *et al.* Journal of Gansu Agriculture University, 2010, (3): 102. (in Chinese)  
(陈积红, 王曙阳, 刘敬, 等. 甘肃农业大学学报, 2010, (3): 102.)
- [11] CHEN Jihong, LIU Jing, HU Wei, *et al.* Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2011, (3): 38. (in Chinese)  
(陈积红, 刘敬, 胡伟, 等. 中兽医医药杂志, 2011, (3): 38.)

## Breeding Study of Hyper Citric Acid Strain by Progressive Heavy Ion Irradiation

CHEN Jihong<sup>1, 2</sup>, HU Wei<sup>1, 2</sup>, LI Wenjian<sup>1, 2</sup>, LIU Jing<sup>1, 2</sup>, WANG Shuyang<sup>1, 2</sup>, WEI Zihao<sup>1, 2</sup>

(1. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2. Key Laboratory of Microbial Resources Exploitation and Application, Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** Heavy  $^{12}\text{C}^{6+}$  ion beams in various high doses were employed to irradiate H3001 strain for screening *Aspergillus niger* strain for hyper citric acid production. Three high-yield strains were obtained after shaker fermentation test. Among the three strains, the strain hw317 was implemented shaker fermentation for stability test and 10 ~ 100 L pilot fermentation tank for citric acid productive maximization. Acid-base neutralization method was applied to determine the content of citric acid in fermented liquid. The results showed that: when the secondary heavy ion  $^{12}\text{C}^{6+}$  dose was 857.8 Gy, both of the fatality rate (94.5%) and the positive mutation rate (8%) were highest. Through the shaker fermentation tests and 10 ~ 100 L pilot fermentation test, one strain hw317 was screened and obtained for hyper citric acid production. Consequently, the final citric acid acidity can reach up to  $19.2 \pm 0.2\%$  with controlling fermentation cycle for 60 h.

**Key words:** heavy ion beam; irradiation; fermentation experiment; citric acid concentration

Received date: 18 Dec. 2012; Revised date: 25 Jan. 2013

Foundation item: Agriculture Science Technology Achievement Transformation Project(2012GB24910647)

Corresponding author: LI Wenjian, E-mail: wjli@impcas.ac.cn

<http://www.npr.ac.cn>