研究论文

DOI:10.3969/j.issn. 1673–1689.2018.08.003

基于 ARTP 技术快速选育番茄红素高效合成突变株

罗　玮，周　雅，巩尊洋，杜　瑶，余晓斌

（江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：为了提高番茄红素的生物合成水平，本研究利用常压室温等离子体注入技术对番茄红素生产菌三孢布拉霉负菌（*Blakeslea trispora*(–)）进行诱变选育。首先建立了番茄红素含量分析的标准曲线和等离子体诱变致死率曲线。通过构建的“马鞍形”致死率曲线确定了合适的诱变处理时间，经过数轮肉眼初筛和摇瓶复筛，获得了一株产量为 0.85±0.04 g/L 的突变株 ARTP–3，比出发菌株番茄红素的产量提高 51.4%，且传代实验表明该菌株的番茄红素产量遗传稳定性较好。本研究不仅获得了一株具有较大经济价值的番茄红素高效合成突变株，建立的育种方法也可为其他工业微生物特别是丝状真菌的选育提供有益的参考。

关键词：常压室温等离子体；番茄红素；三孢布拉霉；高效合成突变株

中图分类号：Q 939.97　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2018)08—0802—05

Rapid Screening of High Efficient Lycopene–Producing Mutant by Atmospheric and Room Temperature Plasma Mutagenesis

LUO Wei，　*ZHOU Ya*，　*GONG Zunyang*，　*DU Yao*，　*YU Xiaobin*

（Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology，Ministry of Education，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：In order to improve the level of lycopene biosynthesis，this study use atmospheric and room temperature pressure plasma to mutate *Blakeslea trispora* negative bacteria for lycopene efficient production. The standard curve of lycopene content analysis and the lethal rate curve were established. By constructing the "saddle shaped" lethal rate curve，the suitable mutation treatment time was determined. After several rounds of screening，a mutant strain ARTP-3 was obtained with the lycopene production of 0.85±0.04 g/L，which was increased by 51.4% than that of the original strain. Furthermore，the subculture experiments showed that the ycopene production of ARTP-3 was much stable. In this study，we have not only obtained a high efficient lycopene producer with high economic value，but also can provide useful reference for the breeding of other industrial microorganisms，especially for of filamentous fungi.

Keywords：atmospheric and room temperature plasma （ARTP），lycopene，*Blakeslea trispora*，high efficient synthetic mutant

收稿日期：2015–12–29

基金项目：国家自然科学基金项目(21606105)；中国博士后科学基金项目(2018M630525)。

作者简介：罗　玮(1981—)，男，安徽合肥人，工学博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事微生物发酵和代谢工程研究。

E–mail：wluo@jiangnan.edu.cn

引用本文：罗玮，周雅，巩尊洋，等. 基于 ARTP 技术快速选育番茄红素高效合成突变株[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(08)：802–806.

番茄红素（lycopene）是一种重要的类胡萝卜素，具有极强的抗氧化和清除自由基能力，被广泛应用于食品、医药和化妆品领域[1]。目前番茄红素的生产方法主要包括天然提取法、化学合成法和微生物发酵法[2]。天然提取法获得的番茄红素产量不高，成本高且受制于原料来源；化学合成法存在安全隐患，而微生物发酵法具有工艺简单、生产效率高等优点，越来越受到关注[3]。三孢布拉霉（*Blakeslea trispora*）是一种丝状真菌，其番茄红素含量很高，是生产番茄红素的理想微生物[4]。但是其番茄红素发酵水平与大规模生产的要求仍然存在较大距离，因此获得优良菌种以提高番茄红素产量迫在眉睫。

常压室温等离子体（atmospheric and room temperature plasma，ARTP）生物诱变技术是最近十几年发展起来的一项新型的基于物理学原理的育种技术。常压室温等离子体是指在大气压条件下产生的温度在 25~35 ℃之间的、具有高活性、高浓度粒子（主要包括氦原子、氧原子、氮原子、OH 自由基等）的等离子体射流。ARTP 具有活性粒子种类多样且浓度高、诱变效率高、操作简单等优点，而且 ARTP 本身对环境也无污染和危害[5]。已有研究表明，ARTP 可以高效快捷地使细菌、微藻、真菌、酵母等微生物发生突变，并且能够获得丰富的突变表型[6-8]，为选育获得性能优良菌株提供了有效的方法。

本研究利用 ARTP 等离子体生物诱变系统处理三孢布拉霉负菌孢子，通过平板肉眼观察颜色变化初筛和摇瓶复筛快速获得番茄红素高产突变菌株，为工业化生产番茄红素奠定一定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

仪器：恒温培养箱、可见光分光光度计、恒温摇床、pH 仪、ARTP 等离子体诱变系统（北京思清源生物科技有限公司）、离心机、抽滤机、高压蒸汽灭菌锅、旋转真空干燥器等。

试剂：番茄红素标准品购于 Sigma 公司，磷酸二氢钾、七水硫酸镁、棉籽油、稀盐酸、稀氢氧化钠、二甲基咪唑、石油醚、二氯甲烷、氢氧化钾溶液（1 mol/L）、体积分数 75%乙醇，均为分析纯。

1.2 菌种和培养基

三孢布拉霉菌（*B. trispora*）由本实验室保藏。

固体培养基：麦汁 4°，琼脂粉 20 g/L。

种子培养基：玉米粉 25 g/L，黄豆粉 50 g/L，KH_2PO_4 1.5 g/L，$MgSO_4·7H_2O$ 0.5 g/L，pH 6.3，121 ℃灭菌 20 min。

发酵培养基：玉米粉 50 g/L，黄豆粉 26 g/L，KH_2PO_4 1.5 g/L，$MgSO_4·7H_2O$ 0.5 g/L，pH 6.3，棉籽油 36 g/L，121 ℃灭菌 20 min。

1.3 ARTP 诱变处理方法

利用清华大学化工系自主研发的常压室温等离子体诱变系统（ARTP）对三孢布拉霉负菌孢子（溶于 0.5%的羧甲基纤维素钠）悬浮液进行诱变。ARTP 电源功率设置为 115 W，工作气流为 10 L/min，等离子体发射源与样品之间距离为 2 mm，样品量为 10 μL，操作温度 25~35 ℃，设置不同诱变处理时间。为了获得最适处理时间，须制备致死率曲线。预实验表明，200 s 以下的处理时间，致死率较低，难以获得大量突变株。因此处理时间设置为从 200 s 开始，逐渐增加到 960 s，然后对处理过的样品稀释适当倍数后涂布平板，通过菌落计数来计算致死率。致死率按如下公式计算：

$$致死率(\%)=(U-T)/U \times 100\%$$

其中，U 为未经过诱变的对照菌的总菌落数；T 为经诱变处理后对应的总菌落数。

1.4 筛选方法

初筛：将诱变后的孢子悬液适当稀释后涂布筛选平板，根据菌落颜色差异，挑选菌落颜色深黄或者红色的菌株。

复筛：将三孢布拉霉正菌和经过初筛的负菌按比例混合，接入发酵培养基，培养 120 h 后测定番茄红素的产量。

1.5 培养方法

种子培养：在无菌条件下，将三孢布拉霉正负孢子（正菌 10^4 个孢子/mL，负菌 10^5 个孢子/mL）分别接入种子培养基，在 25 ℃，180 r/min 的条件下，培养 48 h。

发酵培养：将生长旺盛的正负菌种子液按 1∶5 的比例在无菌的条件下混合，再以 20 %的接种量接入发酵培养基，在 25 ℃，180 r/min 的条件下，培养 120 h，在培养 48 h 时添加 0.1 g/L 2-甲基咪唑。

1.6 番茄红素的提取和测定方法

发酵 120 h 之后，收集菌丝体用蒸馏水洗涤后纱布过滤，40 ℃真空干燥过夜。干燥后加石英砂研磨破碎菌丝体，用石油醚抽提至菌体无色，合并抽

提液,适当稀释后于 502 nm 下测定吸光值,根据标准曲线计算番茄红素含量。

2 结果与分析

2.1 番茄红素标准曲线的建立

准确称量经过真空干燥的番茄红素标准品 2.0 mg,倒入 100 mL 容量瓶,然后用 2.0 mL 二氯甲烷溶解番茄红素,再用石油醚定容至 100 mL。番茄红素的光稳定性和热稳定性较差,所以应迅速将该番茄红素标准液稀释成不同浓度,然后分别在 502 nm 处测定其吸光度,制作番茄红素标准曲线如图 1 所示。获得的标准曲线方程为 $y=3.25x-0.075$,$R^2=0.998$。

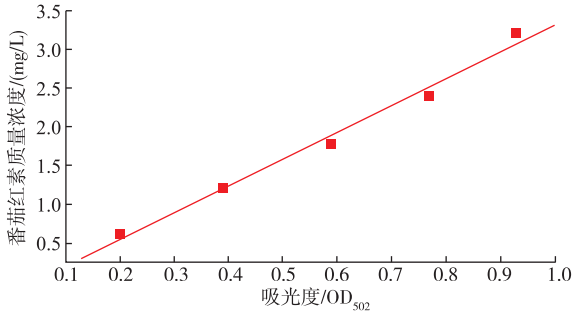


图 1 番茄红素质量浓度-吸光度标准曲线

Fig. 1 Standard curve of lycopene between its concentration and absorbance

2.2 ARTP 诱变致死率曲线

从图 2 可以看出,随着时间的增加,致死率迅速增加,在 240~400 s 时间范围内致死率在 93%上下波动;处理时间从 400 s 进一步增加到 440 s 时致死率急剧下降,440 s 之后致死率逐渐回升,当诱变时间增加到 720 s 以上时,致死率接近 100%并且曲线趋于平稳。本实验选择处理时间为 600 s 左右,以期获得突变位点丰富的突变株。

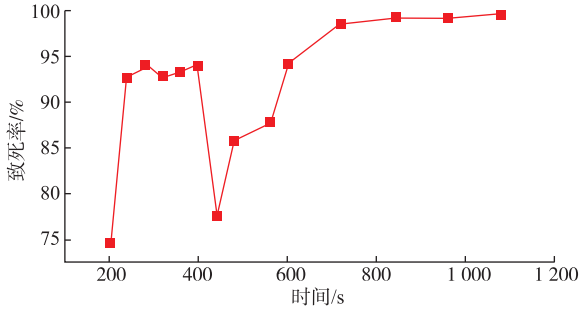


图 2 ARTP 处理三孢布拉霉负菌的致死率曲线

Fig. 2 Lethality rate of *B. trispora* induced by ARTP with different treating time

2.3 突变株的初筛

经 ARTP 诱变系统处理后,将孢子悬液涂布于筛选平板中,肉眼观察菌落颜色差异,三孢布拉霉的菌落的颜色深浅与其产量呈正相关性,因此可以根据单菌落颜色深浅快速筛选潜在高产菌株。如图 3 所示,已有多株菌落颜色较深,因此能初步判断通过 ARTP 处理后其发生了正突变,挑选多株颜色较深的菌株在摇瓶中进行发酵以确定其番茄红素产量。目前的研究表明 ARTP 诱变技术可以成功应用于多种微生物的育种过程,且正突变率均较高(正突变率可达到 10%~65%)[8]。

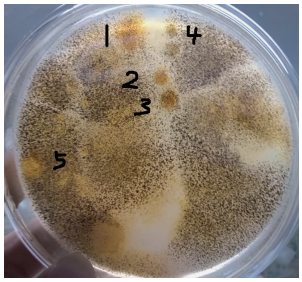


图 3 三孢布拉霉经诱变处理后在平板生长的菌落

Fig. 3 Colony of *B. trispora* in growth plate after mutation treatment

2.4 突变株的复筛

将所筛选到的高产菌株和亲代菌株分别进行发酵培养,考察不同菌株番茄红素产量,结果如图 4 所示。诱变后的菌株的番茄红素产量与亲代相比,均有明显提高,突变株 ARTP-3 的番茄红素产量比亲代提高了 51.4%,可见 ARTP 对三孢布拉霉有很好的诱变效果。三孢布拉霉雌雄异株,负菌是类胡萝卜素的主要合成者,正菌与负菌共培养可相互作用产生一种性激素三孢酸,三孢酸能促进负菌类胡萝卜素结构基因表达和关键酶的酶活[9-11]。因此,正负菌共培养能极大促进负菌的番茄红素产量,从而使突变株累积番茄红素的表型凸现出来。

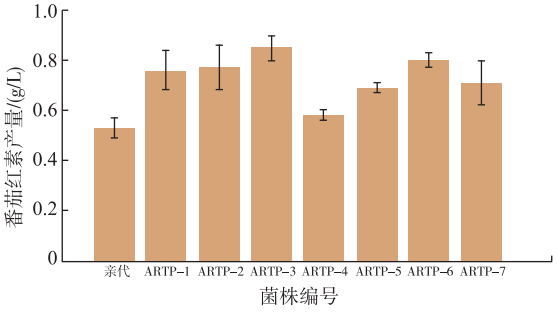


图 4 不同突变菌株番茄红素产量

Fig. 4 Lycopene production in different mutants

2.5 突变株的遗传稳定性

三孢布拉霉呈多核体，一般孢子囊中平均有 4~5 个孢子，这样对于隐性突变体的筛选和遗传稳定性有很大的影响[12-13]。而且，在生产过程中，该菌经多次传代后，菌体生长速度降低，菌丝变细且易断裂，使得番茄红素产量不断下降。对于筛选到的高产菌株，为确保产量的稳定性，需要对其遗传稳定性进行测定。本实验对菌株 ARTP-3 进行了连续 7 代的传代实验和番茄红素产量测定。由表 1 可见，该菌株在第 7 代时仍保持较高的番茄红素合成水平，这体现了该高产菌株良好的遗传稳定性。

表 1 突变株 ARTP-3 的番茄红素产量遗传稳定性

Table 1 Lycopene concentration stability of the mutant ARTP-3 during generation

传代次数	1	2	3	4	5	6	7
番茄红素产量/(g/L)	0.76±0.04	0.75±0.09	0.75±0.02	0.74±0.07	0.66±0.08	0.67±0.06	0.63±0.03

3 讨 论

本研究基于常压室温等离子体诱变技术，快速选育番茄红素高效合成突变株。首先通过 ARTP 诱变处理孢子、平板计数法建立了 ARTP 处理致死率曲线，该致死率曲线与经其他一般理化诱变处理存在明显差异，这被认为是离子注入诱变所特有的效应[14]。出现这种现象的原因可能是因为在初始一段时间内，等离子体造成细胞表面和细胞骨架损伤使致死率增加，随着处理时间延长，染色体损伤加剧，细胞启动损伤修复机制(SOS)使致死率反而稍有降低[15]。SOS 修复是一种旁路系统，它允许新生的DNA 链越过胸腺嘧啶二聚体而延长，尽量使细胞存活，但其代价是保真度的极大降低，所以 SOS 修复可导致突变，致使突变位点丰富，易获得高产突变株[15-16]。随后诱变时间继续增加，细胞损伤已无法修复，致死率再次提升[17]。

对 ARTP 诱变技术的最早应用案例是选育阿维菌素高产菌株阿维链霉菌，研究者根据菌落形态表型变化快速筛选获得了阿维菌素产量提高 18% 的高产菌株，其中特异性组分阿维菌素 B1a 的产量增长了 40%[6]。随后，其他研究者也陆续开始采用该技术进行微生物菌株的选育。金丽华等[18]采用ARTP 诱变圆红冬孢酵母，筛选到了一些产油量比亲代明显提高的突变株，其产油量由初始 1.87%提高到 4.07%且生物量也比出发菌株提高 1.5 倍。杨颖等[19]利用 ARTP 诱变绿色糖单孢菌，筛选到木聚糖酶高产菌株。郑明英等[20]利用 ARTP 诱变嗜醋酸棒杆菌筛选得到高脯氨酸高产菌株。因此，作为一种快速高效的新型生物诱变育种方法，ARTP 技术已经开始应用于越来越多的微生物菌种选育过程。

经诱变处理后，在平板上初步筛选获得了菌落颜色较深的菌落。由于仅靠肉眼观察颜色深浅存在一定误差，本研究进一步将负菌与正菌进行混合发酵，放大了高产突变株与低产或负突变菌株的番茄红素产量差值。通过复筛，获得了一株 ARTP-3 突变株，其番茄红素产量比原始菌株提高了 51.4%，达到 0.85±0.04 g/L。目前已有多个研究小组对番茄红素合成的微生物菌株进行系统选育。王永生等[21]对三孢布拉霉进行了物理法和化学法相结合的诱变方法，使类胡萝卜素的产量大幅提高了 10 倍以上，其中番茄红素的产量达到 400 mg/L。任龙[22]以两次 Co-γ 辐射处理三孢布拉霉，选育出两株高产番茄红素的突变株，番茄红素的产量达 661.8 mg/L。王敏等[23]通过紫外诱变龟裂链霉菌，筛选到一株突变高产菌株，经发酵条件优化后产量达到 230 mg/L。本研究同时对该菌株进行遗传稳定性研究，连续传代至第 6 代时番茄红素产量仍然较高，表明其具有较高的遗传稳定性，可以满足应用于大规模生产的需要。

因此，本研究利用 ARTP 诱变系统对三孢布拉霉进行诱变，获得了番茄红素高产突变株，ARTP 等离子诱变系统比传统的诱变方法有更高的正向突变效应，该研究方法也为其他丝状真菌的诱变选育提供了参考。

参考文献：

[1] LI Hong，SUN Qingrui，ZHANG Lianfu. Study on the influence of temperature on the stability of high proportion of z-lycopene isomers[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2014，33(7)：715-720.(in Chinese)

[2] LIAO Chunli,YU Xiaobin,LIU Haili. Optimize the submerged fermentation media of β2 carotene by using response surface methodology[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2007,26(3):95-99.(in Chinese)

[3] BAO Youxia,CHEN Bixia,YAN Zhen,et al. Optimal control for the culture and production of lycopene of *Rhodopseudomonas palustris*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2009,28(5):693-698.(in Chinese)

[4] LIU Haili,YU Xiaobin. Influences of surfacants and antioxidant on β2 carotene synthesis by *Bla keslea* trispora [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2007,26(2):97-101.(in Chinese)

[5] WANG H,SUN W,LI H,et al. Discharge characteristics of atmospheric-pressure radio-frequency glow discharges with argon/nitrogen[J]. **Applied Physics Letters**,2006,89(16):161504-161504.

[6] WANG L Y,HUANG Z L,LI G,et al. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma[J]. **Journal of Applied Microbiology**,2010,108(3):851-858.

[7] XU F,WANG J,CHEN S,et al. Strain improvement for enhanced production of cellulase in *Trichoderma viride* [J]. **Applied Biochemistry And Microbiology**,2011,47(1):53-58.

[8] ZHANG Xue,ZHANG Xiaofei,WANG Liyan,et al. Recent progress on atmospheric and room temperature plasma mutation breeding technology and its applications [J]. **Journal of Chemical Industry and Engineering**,2014,65 (7):2676-2684.(in Chinese)

[9] SCHACHTSCHABEL D,MENZEL K D,KRAUTER G,et al. Production and derivate composition of trisporoids in extended fermentation of *Blakeslea trispora*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2010,88(1):241-249.

[10] SCHMIDT A D,HEINEKAMP T,MATUSCHEK M,et al. Analysis of mating-dependent transcription of *Blakeslea trispora* carotenoid biosynthesis genes carB and carRA by quantitative real-time PCR [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2005,67(4):549-555.

[11] VERESHCHAGINA O,MEMORSKAYA A,KOCHKINA G,et al. Trisporoids and carotenoids in *Blakeslea trispora* strains differing in capacity for zygote formation[J]. **Microbiology**,2012,81(5):517-525.

[12] MEHTA B,CERDA-OLMEDO E. Mutants of carotene production in *Blakeslea trispora* [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,1995,42(6):836-838.

[13] LIU Haili,Wang Bei,YU Xiaobin. A new method to select desired *Blakeslea trispora* with lovastatin [J]. **Food and Machinery**, 2006,21(5):10-11.(in Chinese)

[14] VILAITHONG T,YU L,ALISI C,et al. A study of low-energy ion beam effects on outer plant cell structure for exogenous macromolecule transferring[J]. **Surface and Coatings Technology**,2000,128:133-138.

[15] LI G,LI H P,WANG L Y,et al. Genetic effects of radio-frequency,atmospheric-pressure glow discharges with helium [J]. **Applied Physics Letters**,2008,92(22):221504-221510.

[16] O'CONNELL D,COX L,HYLAND W,et al. Cold atmospheric pressure plasma jet interactions with plasmid DNA [J]. **Applied Physics Letters**,2011,98(4):43701-43708.

[17] YU Zengliang,SHAO Chunlin,YAO Jianming,et al. A possible mechanism of dose related survival of microorganism implanted by N^+ ions[J]. **Nuclear Techniques**,1999,23(3):129-132.(in Chinese)

[18] JIN Lihua,FANG Mingyue,ZHANG Chong,et al. Operating conditions for the rapid mutation of the oleaginous yeast by atmospheric and room temperature plasmas and the characteristics of the mutants [J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2011,27(3):461-467.(in Chinese)

[19] YANG Ying,YU Wangning,JIN Yi,et al. Screening of mutants of xylanase high-producing strain of *Saccharomonospora viridis* by atmospheric and room temperature plasmas and its enzyme characterization[J]. **Microbiology**,2013,40(5):905-915.(in Chinese)

[20] ZHENG Mingying,CAI Youhua,LU Zuiqing,et al. Screening of high proline yield mutants by rapid mutation using atmospheric and room temperature plasmas[J]. **Food and Fermentation Industries**,2013,39(1):36-40.(in Chinese)

[21] WANG Yongsheng,WANG Jiandong,YUAN Qipeng,et al. The effect of mycelial morphology on lycopene fermentation [J]. **Microbiology China**,2003,30(6):47-51.(in Chinese)

[22] 任龙. *Blakeslea trispora* 产番茄红素菌株的选育及优化[D]. 武汉:华中农业大学,2007.

[23] WANG Min,YANG Hui,GAO Junlian,et al. Breeding of high-yield lycopene producing strains of *Streptomyces rimosus* and studies on its flask culture conditions[J]. **China Biotechnology**,2009,12:64-68.(in Chinese)