

He-Ne 激光对红曲霉 M_{9x} 的原生质体诱变育种

戴德慧¹, 郭爱莲², 蒋家新¹

(1. 浙江科技学院生化系, 浙江 杭州 310012 2. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘 要: 采用 He-Ne 激光诱变红曲霉 M_{9x} 原生质体, 获得一株 Monacolin K 产量为 103.73 μg/ml 的诱变株 M_{9y}, 其产量约是出发菌株 M_{9x} 的 4.1 倍, 经酯酶同工酶分析, 其酶带条纹数、迁移率等均发生了明显变化。对诱变株进行传代稳定性试验, 结果表明: 经斜面传代八代以后, 诱变株 M_{9y} 的 Monacolin K 产量仍较稳定, 无明显的回复突变。

关键词: 红曲霉; He-Ne 激光; Monacolin K; 同工酶

He-Ne Laser Treatment of the Protoplast from *Monascus ruber* M_{9x}

DAI De-hui¹, GUO Ai-lian², JIANG Jia-xin¹

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310012, China 2. Life School of Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: A mutant strain called *Monascus ruber* M_{9y} was obtained by using irradiating protoplasts with He-Ne laser (632.8 nm). Its yield of Monacolin K increased as much as 4.1 times than that of the original strain, to reach 103.73 μg/ml. The esterase (EST) isoenzyme electrophoresis bands of the mutant strain *Monascus ruber* M_{9y} compared with that of the original strain changed dramatically. The stability test of *Monascus ruber* M_{9y} from generation to generation was studied. Results showed that the yield of monacolin K was stable, whose mutation was not restored apparently after eight generations.

Key words: *Monascus ruber*; He-Ne laser; Monacolin K; isoenzymes

中图分类号 TQ921

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)11-0075-04

收稿日期: 2004-11-23

作者简介: 戴德慧(1976-), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为应用微生物学。

粉的含量 89%~90%, 荔浦芋淀粉是由单一葡萄糖组成。

4.2 从显微观察显示: 荔浦芋淀粉的形状为不规则的多边形, 直径大约为 4.6~11.2 μm, 平均为 8.1 μm 比一些常见植物淀粉粒径要小的多, 因此, 荔浦芋淀粉的水溶液及淀粉乳不容易沉降。

4.3 从粘度曲线可以说明: 荔浦芋淀粉的糊化温度比较高, 起糊温度约为 88℃, 于 92℃到达峰值粘度, 从 95℃保温过程中, 糊粘度略有下降, 但幅度不大; 和从 95℃降温到 50℃以及 50℃保温过程中, 糊粘度反而上升, 最后生成固体凝胶。荔浦芋淀粉糊的热、冷稳定性比较高; 其冻融稳定性和绿豆淀粉相同。

参考文献:

- [1] 李雅臣, 李德玉, 吴寿金. 芋头化学成分的研究[J]. 中草药, 1995, 26(10): 5552.
- [2] 贺伟坤, 等. 食品检验与分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [3] 何照范, 谷物中直. 支链及总淀粉双波长测定法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1981, (1): 70-72.
- [4] 何照范. 植物淀粉及其利用[M]. 贵州: 贵州人民出版社, 1990.
- [5] Whistler roy L. 王雒文, 等译. 淀粉的化学与工艺学[M]. 北京: 中国食品出版社, 1981.
- [6] 高群玉. 绿豆淀粉颗粒性质的研究[J]. 食品工业科技, 1997, (5): 36-37.
- [7] 中国饲料成分及营养价值表: 中国饲料数据库[J]. 中国饲料, 1995, 22: 40-45.

原生质体是指微生物在一定酶的作用下,脱去细胞壁后所剩余的那部分结构。由于原生质体失去细胞壁的保护作用而成球形,只能在高渗透压培养基中存活,并在合适的培养基中恢复细胞壁而再生。对环境、诱变剂等更为敏感,因此用原生质体作为诱变材料,诱变效果较传统方法更为理想^[1]。

Monacolin K(洛伐他汀)为人体胆固醇合成中的关键酶羟戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶的抑制剂,因其疗效好,副作用低,是世界上最畅销的降血脂药物之一^[2]。目前国内生产主要是采用红曲霉发酵进行Monacolin K的药物生产,但在降血脂功能红曲霉生产中还普遍存在着产量偏低等问题,究其原因除了培养工艺方面不足之外,另一个重要原因就是缺少优良红曲霉高产菌株。为此,本研究利用原生质体激光育种技术对红曲霉进行育种,提高降脂活性物质产量。并用同工酶技术对出发菌株及诱变株的酯酶同工酶进行了分析,诱变株酯酶同工酶谱发生了显著的变化,证明了诱变株的基因型发生了改变。

1 材料与方法

1.1 菌种 红曲霉 M_{9x}, 本实验室保存。

1.2 主要培养基

1.2.1 斜面培养基

麦芽汁 12~14°BX、琼脂 1.8%~2.0%、pH5.0。

1.2.2 菌丝生长培养基 豆芽汁培养基。

1.2.3 再生培养基 采用双层平板法

麦芽汁 12~14°BX、上层琼脂 0.8%、下层琼脂 2%、均用 0.6mol/L 的 MgSO₄ 配制。

1.2.4 液体种子培养基(%)

葡萄糖 7、蛋白胨 7.5、豆粉 0.5、MgSO₄·7H₂O 0.1、NaNO₃ 0.2、pH6.0。

1.2.5 液体发酵培养基(%)

甘油 7、葡萄糖 3、牛肉膏 3、蛋白胨 0.8、NaNO₃ 0.2、MgSO₄·7H₂O 0.1、pH6.0。

1.3 主要试剂

Monacolin K 对照品 美国Sigma公司 蜗牛酶 北京鼎国生物制品有限公司; 纤维素酶 陕西科学院酶制剂研究所; 薄层层析硅胶 GF254 青岛海洋化工有限公司; 丙烯酸胺、甲叉双丙烯酸胺 北京鼎国生物制品有限公司。

1.4 主要仪器

He-Ne 激光发生器 西北大学光电厂; DYY-III 5 型电泳仪 北京市六一仪器厂; ZFQ81-1 型旋转蒸发器 上海医械专机厂; 高速冷冻离心机 日本 Hitachi R22G; ZX-1 型旋片式真空泵 沈阳市真空泵厂。

1.5 方法

1.5.1 原生质体制备与再生

以豆芽汁培养液为菌丝培养基,采用 60h 菌龄的菌丝体,以 0.6mol/L MgSO₄ 作为渗稳剂,用 1.5% 混合酶(蜗牛酶:纤维素酶=7:3)在 30℃ 处理 2h。

1.5.2 He-Ne 激光照射时间对原生质体相对再生率的影响

用制备的原生质体稀释成约 10⁵ 个/ml 的菌悬液,用 He-Ne 激光(λ=632.5nm)进行照射,输出功率 9mW,光束光斑直径 2.5mm,照射距离 30cm,照射不同的时间,计数再生平板菌落数,并计算相对再生率。

1.5.3 He-Ne 激光诱变原生质体

选取激光最佳照射剂量,经诱变后,将原生质体悬液梯度稀释涂布麦芽汁再生平板,培养后,挑出形态、大小、颜色等发生变化的单菌落,斜面保藏备用。

1.5.4 He-Ne 激光诱变 Monacolin K 高产诱变株的筛选

对激光诱变后的菌株摇瓶发酵后,进行 TLC 法初筛和 HPLC 法复筛^[3],筛选出一支 Monacolin K 产量最高的诱变株,保藏备用。

1.5.5 原始出发菌株 M_{9x} 与诱变株 M_{9y} 酯酶同工酶谱分析^[4,5]

将红曲霉 M_{9x} 及诱变株 M_{9y} 在麦芽汁斜面上活化后,斜面培养 5d,制成孢子悬液(10⁷ 个/ml)接种麦芽汁培养液,30℃ 摇床培养 7d,抽虑收集菌丝,用蒸馏水及 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.8)分别洗涤后离心,取 300mg 菌体 -20℃ 冷冻 24h 备用,加 1.5ml 样品缓冲液(0.012mol/L Tris-Citric Acid) pH8.3 用时加 0.5mol/L 蔗糖,再加 100mg 石英砂,冰浴研磨 15min,15000r/min 4℃ 离心 20min,取上清液直接用于电泳。

1.5.6 原始出发菌株 M_{9x} 与诱变株 M_{9y} 二者在麦芽汁平板上形态特征

取二者点接于麦芽汁平板中央,30℃ 培养 90h,比较二者形态特征,并用相机拍下其菌落形态。

1.5.7 诱变株 M_{9y} 遗传稳定性分析

将诱变株 M_{9y} 斜面传代八次,分别接种发酵后,发酵液抽提后定量分析 Monacolin K 产量,并比较各者之间的差异。

2 结果与分析

2.1 红曲霉原生质体 M_{9x} 的原生质体制备结果

以豆芽汁培养液为菌丝培养基,采用 60h 菌龄的菌丝体,以 0.6mol/L MgSO₄ 作为渗稳剂,用 1.5% 混合酶(蜗牛酶:纤维素酶=7:3)在 30℃ 处理 2h。原生质体形成数可以达到 1.61 × 10⁷ 个/ml,再生率为 8.49%。

2.2 激光照射时间对诱变株 M_{9x} 原生质体相对再生率的影响

激光照射时间对诱变株 M_{9x} 原生质体相对再生率的关系见下图。

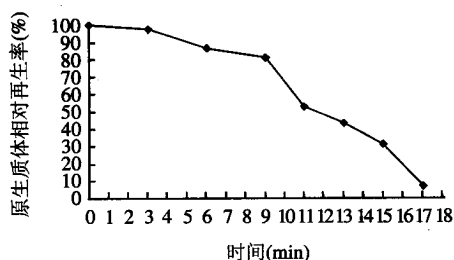


图1 不同的照射时间对原生质体相对再生率的影响

Fig.1 The effect of different irradiation time on relative regeneration rate of the protoplast

由图1中可见,随着激光照射时间的延长,原生质体的相对再生率逐步下降,在17min时,已有92.5%的原生质体致死。为了获得较大的突变率,故选用17min作为诱变时间。

2.3 激光对诱变株 M_{9x} 原生质体的诱变效果

经He-Ne激光照射原生质体,稀释后倒双层平板,挑取菌落形态发生变化再生菌落,斜面保存,摇瓶发酵后,测其Monacolin K产量,经反复筛选后,得到一株Monacolin K产量最高的红曲霉 M_{9y} ,产量高达103.73 μ g/ml,比 M_{9x} 菌株Monacolin K产量提高近4.1倍。

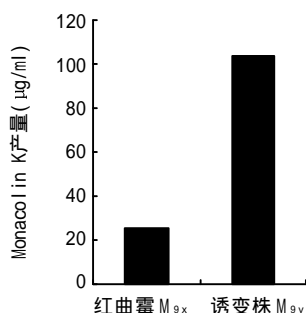


图2 红曲霉 M_{9x} 及诱变株 M_{9y} 两者的Monacolin K产量比较

Fig.2 The compare of Monacolin K between Monascus ruber M_{9x} and Monascus ruber M_{9y}

2.4 诱变株 M_{9y} 及原始出发菌株 M_{9x} 二者在麦芽汁平板生长形态特征的比较

由图3、图4可以看出,经激光诱变处理红曲霉菌株 M_{9y} 与出发菌株 M_{9x} 相比,在菌落形态上发生了明显的变化。诱变株 M_{9y} 菌落中心变为浅褐色,边缘为白色,菌落皱褶加深,生长速度增快。

2.5 诱变株 M_{9y} 及原始出发菌株 M_{9x} 二者酯酶同工酶谱比较

由图5可知,红曲霉 M_{9x} 、诱变株 M_{9y} 的酯酶同工酶谱较出发菌株均发生了明显的变化,由此可以证明诱变株 M_{9y} 发生基因型的改变。

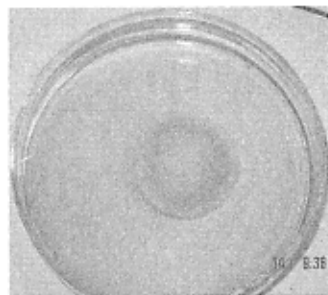


图3 红曲霉 M_{9x} 在麦芽汁平板上的菌落(正面)

Fig.3 The colonies of Monascus ruber M_{9x} on wort plate

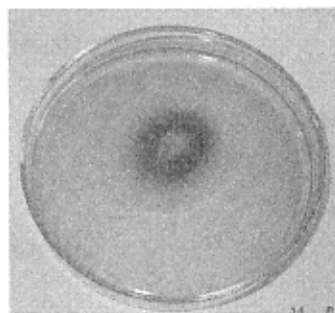


图4 诱变株 M_{9y} 在麦芽汁平板上的菌落(正面)

Fig.4 The colonies of Monascus ruber M_{9y} on wort plate



注: 上图二条谱带依次为出发菌株 M_{9x} 与诱变株 M_{9y}

图5 红曲霉 M_{9x} 及诱变株 M_{9y} 两者酯酶同工酶凝胶电泳图谱

Fig.5 The esterase(EST) isoenzyme electrophoresis bands figure of Monascus ruber M_{9x} and Monascus ruber M_{9y}

2.6 诱变株 M_{9y} 斜面传代Monacolin K产量稳定性试验

诱变株 M_{9y} 斜面连续传代8次,其Monacolin K产量结果见表1。

由表1可知:斜面连续传代8次,Monacolin K产量平均值为102.36 μ g/ml,标准偏差为1.06,变异系数为1.03%,诱变株 M_{9y} 多次传代后Monacolin K产量仍较稳定。表明其具有稳定的遗传性,无明显的回复突变。

3 结论

3.1 采用He-Ne激光诱变红曲霉 M_{9x} 原生质体,获得

红凤菜中活性物质的提取及对超氧阴离子自由基的清除作用

杨秀娟¹, 赵晓燕^{2,*}, 马越², 吴秋波¹, 马荣山¹

(1. 沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110161; 2. 北京市蔬菜研究中心, 北京 100089)

摘 要: 本文研究了红凤菜不同溶剂提取物对超氧阴离子自由基的清除作用, 发现水提取物有较好的清除作用, 进一步采用正交实验设计确定水提取最佳工艺, 并就其抗氧化性与 VC、白菜、芹菜、青椒、紫甘蓝等进行了比较。实验结果表明: 红凤菜提取物对超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 有较强的清除作用, 在浓度为 $750 \mu\text{g/ml}$ 时, 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率即可达到 73.04%, 水提取最佳工艺为: 浸提温度 30°C 、固液比 1:40、浸提时间为 2h。

关键词: 红凤菜; 超氧阴离子自由基; 清除

Study on Extraction of Active Substance in Gynura bicolor DC and Its Scavenging Effects to Free Oxygen Radical

YANG Xiu-juan¹, ZHAO Xiao-yan^{2,*}, MA Yue², WU Qiu-bo¹, MA Rong-shan¹

(1. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

2. Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100089, China)

Abstract: In this study an active substance of Gynura bicolor DC, which could scavenge free oxygen radical, was extracted

收稿日期 2004-11-22

*通讯作者

作者简介: 杨秀娟(1978-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物抗氧化。

表1 红曲霉 M_{9y} 斜面传代 Monacolin K 产量变化

Table 1 The Monacolin K yield change of *Monascus ruber* M_{9y} from the generation to the generation

| 代次 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|
| Monacolin K 产量 ($\mu\text{g/ml}$) | 103.73 | 103.16 | 102.24 | 101.45 | 102.67 | 103.53 | 102.4 | 100.45 | 101.63 |
| 平均值 | | | | | 102.36 | | | | |
| 标准偏差 | | | | | 1.06 | | | | |
| 变异系数 | | | | | 1.03% | | | | |

一株 Monacolin K 产量为 $103.73 \mu\text{g/ml}$ 的诱变株 M_{9y} , 其产量约是出发菌株 M_{9x} 的 4.1 倍,

3.2 诱变株 M_{9y} 经酯酶同工酶分析, 其酶带条纹数、迁移率等均发生了明显变化。

3.3 对诱变株 M_{9y} 进行传代稳定性试验, 结果表明: 经斜面传代八代以后, 诱变株 M_{9y} 的 Monacolin K 产量仍较稳定, 无明显的回复突变。

参考文献:

- [1] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 北京: 科学出版社, 2003. 290-293.
- [2] 王立新, 莫海涛, 石红. 红曲霉固态发酵生产洛伐他汀的研究[J]. 中国抗生素杂志, 1999, 4(2): 96-99.
- [3] 马美荣, 樊游, 方京, 等. 降胆固醇红曲霉菌种的筛选[J]. 无锡轻工业大学学报, 1999, 9(3): 66-69.
- [4] 邢旺兴, 宓鹤鸣, 陈士景, 等. 中药红曲基原真菌的酯酶同工酶分析[J]. 微生物通报, 2000, (6): 437-439.
- [5] 李多伟, 尉亚辉, 王义潮, 等. 生物技术实验与仪器操作指南[M]. 西安: 西北大学出版社, 1996. 12-24.