

土曲霉与红曲霉双灭活原生质体融合选育洛伐他汀高产菌株

李桂杭, 朱碧云, 李浩明*

(广东药学院 生命科学与生物制药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 研究原生质体融合技术选育洛伐他汀高产菌株的方法。土曲霉(*Aspergillus terreus*)和红曲霉(*Monascus anka*)用混合酶液(体积分数 0.5% 溶菌酶, 0.3% 纤维素酶, 0.3% 蜗牛酶)分别酶解 5.0 h 和 3.5 h 制备原生质体, 土曲霉原生质体和红曲霉原生质体在紫外线(20 W, 30 cm)下分别照射 5 min 和 4 min 灭活, 灭活后混合并用 PEG(体积分数 30% PEG, 0.05 mol/L CaCl_2 , 0.05 mol/L 甘氨酸)介导融合。在 187 株融合子中筛选得到 27 株洛伐他汀产量高于红曲霉出发菌株的融合子, 其中有 7 株的洛伐他汀产量是出发菌的 2 倍以上。双灭活原生质体融合方法成功选育出红曲霉洛伐他汀高产菌株。

关键词: 洛伐他汀; 红曲霉; 土曲霉; 原生质体融合

中图分类号: Q 78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)02-183-06

Studies on the Breeding of High Lovastatin-Producing Strains by Fusion of Inactivated Protoplasts from *Aspergillus terreus* and *Monascus anka*

LI Gui-hang, ZHU Bi-yun, LI Hao-ming*

(School of Life Science and Biopharmacology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In order to isolate a high lovastatin-producing *Monascus* strains, protoplast fusion technology was introduced in this manuscript. The protoplasts of *Aspergillus terreus* and *Monascus anka* was prepared under 5 hour and 3.5 hour enzymolysis, respectively, by mixed enzymes (0.5% lysozyme + 0.3% Cellulase + 0.3% snail enzyme) and then inactive by ultra-violet irradiation (20 W, 30 cm) for 5 min and 4 min, respectively and mixed with PEG (30% PEG, 0.05 mol/L CaCl_2 , 0.05 mol/L glycine). 27 high lovastatin-producing strains were obtained from 187 fusants. Seven of them exhibited more than twice the yield of the original *Monascus* strain.

Key words: lovastatin, *Monascus anka*, *Aspergillus terreus*, protoplast fusion

洛伐他汀(lovastatin)是一种来源于微生物的 HMG-CoA(羟甲基戊二酰辅酶 A)还原酶抑制

收稿日期: 2011-06-18

基金项目: 广州市科技计划项目(2010Y1-C811)。

* 通信作者: 李浩明(1962-), 男, 湖南永兴人, 理学硕士, 教授, 主要从事微生物次生代谢研究。E-mail: lihaoming@gdpu.edu.cn

剂^[1],用于治疗高胆固醇症,能阻止动脉硬化发展,减少心肌梗塞等发病的危险。洛伐他汀的主要产生菌为土曲霉(*Aspergillus terreus*)和红曲霉(*Monascus* spp.)。红曲霉不仅产生洛伐他汀,还产生 Monacolin J、L、X,这些物质都是 HMG-CoA 还原酶抑制剂,具有很强的降低胆固醇功能^[2]。红曲霉产生的红曲色素(包括红曲)作为一种天然色素,在我国广泛应用于黄酒、酱油、腐乳、豆酱、鱼、肉、糕点等食品的着色^[3]。土曲霉是洛伐他汀生产菌,它具有优良的发酵性能、较高的洛伐他汀产生能力和成熟的发酵工艺。

原生质体融合技术是现代微生物育种技术之一,且与一般基因重组方法不同,不需遗传标记,对改良生产菌株性能可能更有效^[4]。作者通过土曲霉和红曲霉灭活原生质体融合技术,将土曲霉生产菌优良的发酵性能、较高的洛伐他汀产生能力、成熟的发酵工艺和红曲霉他汀类化合物的结构多样性、色素产生能力以及长期实践证明的安全性结合起来,选育洛伐他汀高产菌株。

1 材料与方法

1.1 菌株

土曲霉(*Aspergillus terreus*) CCTCC AF93208; 中国典型培养物保藏中心; 安卡红曲霉(*Monascus anka*) CICC 5031; 中国工业微生物菌种保藏中心。

1.2 培养基与培养条件

1.2.1 土曲霉培养基 斜面培养和平板培养用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基; 摇瓶培养基: 葡萄糖 50 g/L, 酵母膏 10 g/L, 番茄酱 20 g/L, CaCO_3 1 g/L, pH 7.2~7.5; 再生培养基: 用 0.6 mol/L NaCl 渗透压稳定剂配制 PDA 培养基。

1.2.2 红曲霉培养基 斜面培养和平板培养用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基; 摇瓶培养基: 葡萄糖 100 g/L, 牛肉浸膏 5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g/L, 番茄酱 5 g/L, CaCO_3 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 6.5; 再生培养基: 用 0.6 mol/L NaCl 渗透压稳定剂配制 PDA 培养基。

1.2.3 融合子培养基 与红曲霉培养基相同。

1.2.4 平板培养 将在 4℃ 冰箱保存的斜面种子接种于平板培养基里培养 3 d, 直至长出良好的单菌落。

1.2.5 摇瓶培养 分别取土曲霉、红曲霉或融合子在平板培养基上生长良好的单菌落接种到含 40 mL 培养基的 250 mL 锥形瓶, 30℃、150 r/min 摇瓶培养。

1.3 HPLC 法测定洛伐他汀含量

洛伐他汀标准品: 中国药品生物制品检定所提供; 甲醇, 磷酸: 色谱纯。Waters2695/2996 液相色谱仪: waters2695 分离单元, waters2996 检测器, Empower 工作站。色谱柱: Dikma Diamonsil C18 (4.6 mm × 250 mm; 5 μm), 流动相: 18 mmol/L H_3PO_4 -甲醇混合溶液($V_{\text{H}_3\text{PO}_4} : V_{\text{甲醇}} = 20 : 80$), 检测波长: 237 nm, 进样量: 10 μL, 柱温: 30℃, 流量: 1.0 mL/min。取 1.0 mL 发酵液, 加 4.0 mL 无水甲醇, 30℃、150 r/min 振荡提取 3 h, 5 000 g 离心 15 min, 取上清, 用 0.22 μm 的有机滤膜过滤后进行 HPLC 测定^[5, 6]。

1.4 红曲霉色价测定

发酵液 5 000 g 离心 10 min, 上清以体积分数 70% 乙醇稀释, 测其 $A_{505 \text{ nm}}$; 菌体称重、磨碎, 加体积分数 70% 乙醇室温振荡 2 h, 离心取上清, 测其 $A_{505 \text{ nm}}$; 根据公式计算^[7]:

色价 = (发酵液上清 $A_{505 \text{ nm}}$ + 菌体 $A_{505 \text{ nm}}$) × 稀释倍数 / 菌体湿重(g)

1.5 原生质体的制备、灭活与再生

1.5.1 试剂 渗透压稳定剂: 0.6 mol/L NaCl, 用 0.2 mol/L pH 5.8 磷酸缓冲液配制; 原生质体制备用酶: 蜗牛酶, 上海源聚生物科技有限公司提供; 纤维素酶 R-10: 广州威佳科技有限公司提供; 溶菌酶: MBCHEM 公司产品; 混合酶比例: 质量分数 0.5% 溶菌酶 + 0.3% 纤维素酶 + 0.3% 蜗牛酶, 用 PBS 缓冲液配制。体积分数 30% PEG 6 000: 用 0.05 mol/L CaCl_2 配制, 另加甘氨酸至 0.05 mol/L。

1.5.2 原生质体形成与再生条件的确定 不同酶解时间对原生质体形成与再生的影响: 分别取等量菌龄为 3 d 的菌丝体, 加混合酶液于 30℃, 酶解不同时间, 显微计数原生质体形成数。取重悬于渗透压稳定剂的原生质体, 作适当稀释后分别涂布于再生培养基和普通培养基。30℃ 培养 3 d, 观察菌落数并计算再生率(%) = (再生平板上菌落数 - 普通平板上菌落数) × 100 / 显微计数原生质体数^[8]。

1.5.3 原生质体紫外线灭活时间的确定 取 1 mL 一定浓度的原生质体, 置于 20 W 紫外灯下, 距离 30

cm,照射时间设为 1、2、3、4、5 min,稀释后分别取 100 μL 涂布于原生质体再生培养平板上。30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d,观察菌落数并计算不同处理时间的致死率。

1.6 双灭活原生质体融合

取 2 mL 红曲霉原生质体(浓度为 106 个/mL),置于 20 W 紫外灯下,距离 30 cm,照射 4 min 灭活。取 2 mL 等浓度土曲霉原生质体(浓度为 10⁶ 个/mL),置于 20 W 紫外灯下,距离 30 cm,照射 5 min 灭活。将灭活红曲霉原生质体与土曲霉原生质体混合,2 000 r/min 离心 5 min,收集原生质体,加入 1.5 mL 融合剂(体积分数 30% PEG 6 000,0.05 mol/L CaCl_2 ,0.05 mol/L 甘氨酸),30 $^{\circ}\text{C}$ 保温 15 min,用渗透压稳定剂作适当稀释后取 100 μL 涂布

在再生培养基上,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d。

1.7 融合子筛选

挑取融合平板上的融合子,摇瓶 15 d,测定发酵液洛伐他汀含量,筛选洛伐他汀产量高于红曲霉出发菌株的融合子,进行生长特性、色素产生情况及洛伐他汀产生曲线等研究。

2 结果与分析

2.1 红曲霉/土曲霉原生质体制备与再生条件

选择对数生长期或生长中后期的菌体进行酶处理,对数生长期的细菌壁中肽聚糖含量低,细胞壁对酶的作用最敏感,对数生长早期的菌相对较为脆弱,受酶的过度作用会影响原生质体的再生。

表 1 酶解时间对红曲霉和土曲霉原生质体形成和再生的影响

Tab.1 Effect enzymolysis time on formation rate and regeneration rate of protoplast from *Monascus anka* and *Aspergillus terreus*

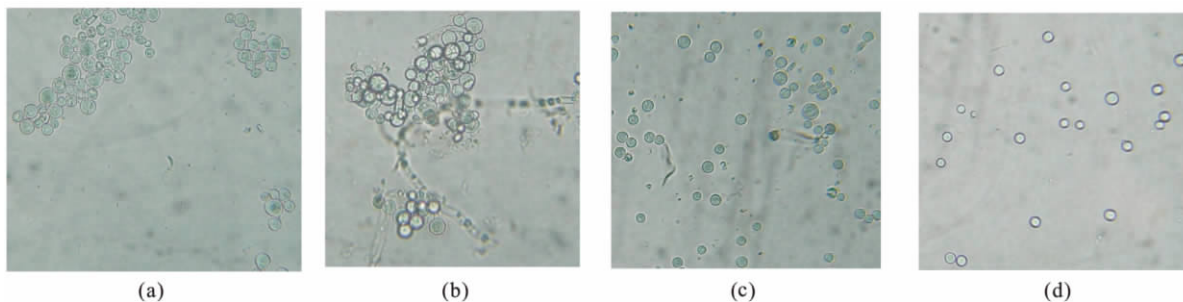
红 曲 霉			土 曲 霉		
酶解时间/h	形成数/(个/mL)	再生率/%	酶解时间/h	形成数/(个/mL)	再生率/%
1.76	1.04×10^6	1.83		3	2.5×10^5
1.83	1.28×10^6	1.63		4	6.0×10^5
1.62	1.36×10^6	1.51		5	7.5×10^6
1.53	1.88×10^6	1.15		6	6.5×10^6

从表 1 可以看出,随着酶解时间的延长,土曲霉的原生质体形成数明显上升,最高是 5 h 后为 7.5×10^6 个/mL。红曲霉的原生质体形成数也随酶解时间的延长逐渐上升,但再生率逐渐降低。综合考虑原生质体的形成与再生,红曲霉原生质体制备酶解时间选用 3.5 h,土曲霉原生质体制备酶解时间选用 5.0 h。

影响原生质体制备的因素主要有菌龄、酶系和酶浓度、酶解时间、温度等。作者采用对数生长后期的细胞进行原生质体制备。结果表明,酶解时间

越长,原生质体形成数增多,但酶解时间过长会影响原生质体的再生,有研究表明,在一定范围内,酶作用的时间,酶的浓度都与原生质体的形成率呈正相关,而与再生率呈负相关^[9],通常取再生率与形成数乘积最大的时间点作为最佳酶解时间。

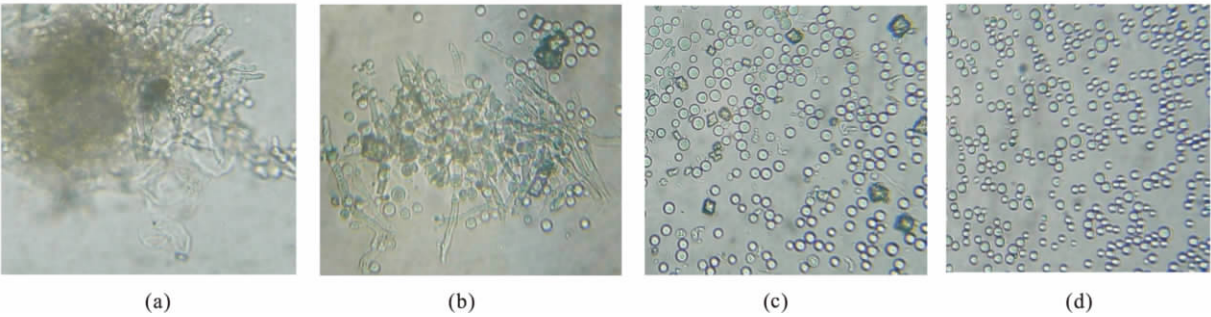
图 1 表明,酶解 1.5 h,红曲霉菌丝球已经解体,被裂解为菌丝片段,开始释放出较少量的原生质体。酶解 2.5 h,原生质体数量明显增加。酶解 3.5 h 后,菌丝已基本裂解,过滤去除菌丝片段、纯化原生质体。



a. 酶解 1.5 h; b. 酶解 2.5 h; c. 酶解 3.5 h; d. 纯化后

图 1 红曲霉原生质体形成过程(40 $\times$)

Fig.1 Formation process of *Monascus* protoplasts



a. 酶解 1 h; b. 酶解 3 h; c. 酶解 5 h; d. 纯化后

图 2 土曲霉原生质体形成过程 (40×)

Fig. 2 Formation process of *Aspergillus terreus* protoplasts

从图 2 可以看出,土曲霉酶解的 1 h,仅有极少量的原生质体形成。酶解 3 h 后,菌丝开始裂解,原生质体形成数量增加。酶解 5 h,菌丝基本裂解完全,原生质体比较分散。纯化后的原生质体未见有菌丝片段。

2.2 红曲霉/土曲霉原生质体灭活条件

原生质体灭活的方法有热灭活、紫外线灭活和化学药剂灭活等。选用紫外线灭活方法,既能灭活原生质体,也可对土曲霉和红曲霉的原生质体起到诱变作用。

由表 2 可以看出,红曲霉照射 4 min,土曲霉照射 5 min,其灭活率达 100%,满足灭活原生质体法筛选融合子的要求。

紫外灭活的土曲霉和红曲霉原生质体,分别于再生培养基上培养时不能再生,而灭活的红曲霉和土曲霉的原生质体在体积分数 30%PEG 融合剂下融合 15 min,稀释涂板在再生培养基平板上有菌落长出,从这些再生菌落中筛选融合子。

表 2 紫外线照射时间与致死率的关系

Tab. 2 Relation between ultraviolet irradiation time and fatality

时间/ min	致死率/%	
	红曲霉	土曲霉
1	99.77	97.44
2	99.93	98.51
3	99.99	99.32
4	100	99.73
5	100	100

2.3 灭活原生质体融合与融合子筛选

原生质体制备、灭活后,仅将原生质体混合在一起融合频率并不高,一般可通过 PEG 结合高 Ca^{2+} 诱导法,电融合或激光诱导融合,作者选取 PEG 法诱导融合。

挑取了 187 个融合子(编号 F01-F187),通过摇瓶初筛得到 34 株洛伐他汀产量超过出发菌株红曲霉的融合子,经传代 3 代后仍有 27 株洛伐他汀产量超过出发菌株红曲霉,其中有 7 株产量升高一倍以上。结果如表 3 所示。

表 3 融合子洛伐他汀产量及色价

Tab. 3 Lovastatin production and the colour value of fusants

编号	洛伐他汀/ (mg/L)	相对红曲霉 提高/%	总色价	编号	洛伐他汀/ (mg/L)	相对红曲霉 提高/%	总色价
F36	665.16	180.23	4.25	F73	313.18	31.94	7.59
F75	651.62	174.53	4.53	F16	301.44	27.00	9.74
F58	635.38	167.69	4.10	F07	299.64	26.24	7.77
F28	594.77	150.58	3.95	F55	294.22	23.96	7.34
F52	564.98	138.03	4.26	F01	289.71	22.06	9.91
F37	523.47	120.54	3.49	F17	284.30	19.78	6.75

续表 3

编号	洛伐他汀/ (mg/L)	相对红曲霉 提高/%	总色价	编号	洛伐他汀/ (mg/L)	相对红曲霉 提高/%	总色价
F20	494.58	108.37	4.82	F27	282.49	19.01	8.76
F31	379.06	59.70	6.32	F34	278.88	17.49	7.20
F41	361.91	52.47	12.93	F02	277.08	16.73	7.30
F82	353.79	49.05	7.00	F26	274.37	15.59	8.07
F23	344.77	45.25	5.75	F45	273.47	15.21	11.38
F12	321.30	35.36	11.29	F14	264.25	11.33	5.07
F59	321.30	35.36	8.40	F08	253.54	6.82	6.99
F61	319.49	34.60	8.31	红曲霉	237.36	-	19.86
F64	314.98	32.70	8.49	土曲霉	830.14	-	-

2.4 融合子的洛伐他汀和色素产生

为研究融合子生长特性,选取一株洛伐他汀产量升高不明显(提高幅度为 15.59%)的融合子 F26 和一株产量升高明显(提高幅度为 150.58%)的融合子 F28 与出发菌株红曲霉进行比较。

从图 3、图 4 可以看出,融合子 F26 与 F28 色素产生比红曲霉少,尤其是 F28;而洛伐他汀的产生则正好相反,F28 的产量始终高于红曲霉与 F26。

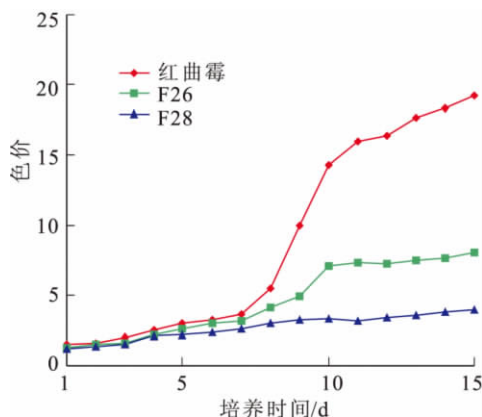


图 3 红曲霉与融合子 F26、F28 色素产生量的比较

Fig. 3 Pigment production of *Monascus*, F26, and F28

试验中观察到洛伐他汀产量高的菌株则色价相对较低,这与高嘉安等得出的结论相同^[9,10]。这可能是红曲霉洛伐他汀的生物合成路线与色素的生物合成在起始部分有相当一段处于同一代谢途径,与两者共同竞争反应底物有关(两者生物合成的起始底物均为乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A)。另外,也有与上述现象相悖的情况,如融合子 F41,其

洛伐他汀产量较之出发菌株提高 52.47%,色价亦提高了 15%;而色价仅为 5.07 的 F14 其洛伐他汀产量才提高了 11.33%,这可能是这些融合子因基因重组、或突变,影响了洛伐他汀和色素的生物合成及其调控,这也说明洛伐他汀的生物合成及其调控的复杂性,其机理有待进一步的研究。

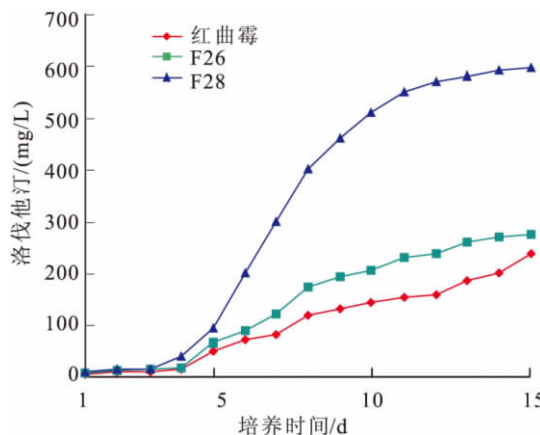


图 4 红曲霉与融合子 F26、F28 洛伐他汀产生量的比较

Fig. 4 Lovastatin production of *Monascus*, F26, and F28

作者采用灭活原生质体融合法进行育种,筛选出 7 株洛伐他汀产量提高一倍以上的融合子,融合子在 PDA 平板培养基上生长良好,但进行摇瓶筛选时,菌丝成球情况不佳,菌丝球远比出发菌株红曲霉的小,可能原因有:细胞制备成原生质体过程中,细胞壁被破坏;融合过程中 PEG 的毒性作用;原有发酵条件不适用于融合子生长等。今后将优化发酵条件或改用固态发酵方式等,以便形成有应用价值的生产工艺。

参考文献(References):

- [1] Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterogenesis produced by *Penicillium citrinum*[J]. *J Antibiot*, 1976,29(12):1346—1348.
- [2] Endo A, Hasumi K. *Dihydromonacolin L* and *Monacolin X*, new metabolites those inhibit cholesterol biosynthesis[J]. *J Antibiot*, 1985,38:321—327.
- [3] 衣珊珊,沈昌,韩永斌,等.红曲色素形成机理及提高其色价的途径[J].*食品科学*,2005,26(7):256—261.
YI Shan-shan, SHEN Chang, HAN Yong-bin, et al. Synthetic mechanism and approach to enhance the color value of monascus pigments[J]. *Food Science*, 2005,26(7):256—261. (in Chinese)
- [4] 姚婷婷,王正祥.黑曲霉原生质体的制备、再生及转化条件[J].*食品与生物技术学报*,2006,25(4):116—120.
YAO Ting-ting, WANG Zheng-xiang. Preparation, regeneration and transformation of *Aspergillus niger* protoplasts[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006,25(4):116—120. (in Chinese)
- [5] 陈蕴,陈晔,许赣荣.烘干和辐照对功能性红曲 *Monacolin K* 含量的影响[J].*食品与生物技术学报*,2008,27(4):16—19.
CHEN Yun, CHEN Ye, XU Gan-rong. The effect of dring and radiation on the *Monacolin K* content in functional monascus red rice[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008,27(4):16—19. (in Chinese)
- [6] 湛欣,赵静国.高效液相色谱法测定红曲米中 *Monacolin K*[J].*化学与生物工程*,2007,24(12):74—75,78.
CHEN Xin, ZHAO Jing-guo. Determination of *Monacolin K* in red yeast rice by HPLC[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2007,24(12):74—75,78. (in Chinese)
- [7] 童群义,欧仕益,高孔荣.液态深层发酵生产红曲色素的最佳培养条件[J].*湖南农业大学学报*,1998,24(3):226—230.
TONG Qun-yi, OU Shi-yi, GAO Kong-rong. On the optimal culture conditions of submerged culture to produce monascus pigment[J]. *Journal of Hunan Agricultural University*, 1998,24(3):226—230. (in Chinese)
- [8] 林晓波,李浩明.洛伐他汀产生菌的原生质体制备、灭活及融合条件研究[J].*广东药学院学报*,2007,23(1):63—67.
LIN Xiao-bo, LI Hao-ming. Studies on protoplast formation, inactivation and fusion in lovastatin-producing fungus[J]. *Journal of Guangdong College of Pharmacy*, 2007,23(1):63—67. (in Chinese)
- [9] 高嘉安,郭东,王德辉,等.产 *Monacolin K* 红曲霉菌的筛选及发酵条件的研究[J].*吉林农业大学学报*,1997,19(3):85—90.
GAO Jia-an, GUO Dong, WANG DE-hui. Screening monascus producing *Monacolin K* and studying on its fermentation condition[J]. *Journal of JiLin Agricultural University*, 1997,19(3):85—90. (in Chinese)
- [10] 沈平,伍军,李浩然,等.红曲固态发酵生产洛伐他汀的实验条件优化[J].*北京农学院学报*,2005,20(3):47—51.
SHEN Ping, WU Jun, LI Hao-ran, et al. Optimization of experimental conditions on lovastatin yield through monascus [J]. *Journal of Beijing Agricultural College*, 2005,20(3):47—51. (in Chinese)