

$^{60}\text{Co}\gamma$ 射线对辅酶 Q_{10} 产生菌 三孢布拉氏霉的诱变选育

吴品芳¹, 陆茂林²

(1 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036; 2 江苏省微生物研究所, 江苏 无锡 214063)

[摘要] 采用不同剂量的 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线对辅酶 Q_{10} 产生菌——三孢布拉氏霉JSF4菌株的孢子进行处理。结果表明, 诱变剂量1.5 kGy对孢子的致死率为85%, 具有较好的诱变效果。经复筛, 分离得到了1株F4-3菌株, 其发酵平均单位达24 766 mg/L, 较出发菌株提高了76%, 且该菌株遗传性状稳定。

[关键词] $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线; 辅酶 Q_{10} ; 三孢布拉氏霉

[中图分类号] Q 933; TQ 464.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)04-0073-03

辅酶 Q_{10} (coenzyme Q_{10} , CoQ_{10}) 别名泛醌, 为脂溶性醌类化合物, 在动植物和微生物细胞内可与线粒体内膜相结合, 是呼吸链中重要的递氢体^[1], 具有重要的生理和药理作用, 可用于治疗心脏疾病、坏血病、高血压、十二指肠溃疡、胃溃疡、坏死性牙周炎及病毒性肝炎等^[2]。

制备辅酶 Q_{10} 多采用生物提取法、微生物发酵法及化学合成法等^[3], 其中微生物发酵法在近几年发展较快, 该法具有原料来源丰富、反应条件温和、产品生物活性好等优点, 是最具发展潜力的生产方法。目前, 国内采用发酵法生产辅酶 Q_{10} 的产量普遍较低, 其原因在于菌种发酵能力较弱, 因此高产菌的选育是发酵法生产辅酶 Q_{10} 面临的首要问题。采用三孢布拉氏霉发酵制备辅酶 Q_{10} 的研究在国内外尚未见报道, 本研究采用 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线诱变三孢布拉氏霉JSF4, 以期获得能提高辅酶 Q_{10} 产量的新菌种。

1 材料与方法

1.1 菌种

三孢布拉氏霉*B. lakeslea trispora* JSF4, 由江苏省微生物研究所提供。

1.2 培养基

1.2.1 孢子斜面和平皿分离培养基 PDA 培养基。

1.2.2 种子培养基 内含淀粉40 g/L, 葡萄糖20 g/L, 玉米浆50 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 0.1$

g/L, VB_1 0.01 g/L, pH 6.4。

1.2.3 发酵培养基 淀粉20 g/L, 黄豆饼粉40 g/L, 玉米浆30 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 0.1$ g/L, VB_1 0.01 g/L, 大豆油2.5 g/L, pH 6.7。

1.3 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线诱变方法

1.3.1 单孢子悬液的制备 将三孢布拉氏霉接种于PDA斜面上, 27℃培养5 d, 待孢子成熟后, 用pH 6.0的磷酸缓冲液洗下孢子, 移入装有无菌玻璃珠的三角瓶中, 振荡30 min, 使孢子分散活化。用灭菌脱脂棉过滤, 制备单孢子悬液, 并稀释至 10^6 /mL。

1.3.2 诱变处理 将制备好的单孢子悬液5 mL放入试管中, 用 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线(钴源为无锡市锡城辐照科技有限公司提供)照射, 剂量分别为0.8, 1.5和2.5 kGy。将诱变完毕的孢子悬液作一定梯度的稀释, 然后分别涂布于平皿分离培养基上, 于27℃下培养4~5 d后, 进行单菌落的突变株筛选。

1.4 突变株筛选

1.4.1 摇瓶初筛 将诱变后分离出的单菌落传代于斜面培养基上进行扩大培养, 再分别接入种子培养基(装液量200 mL/L), 于27℃和210 r/min条件下振荡培养42 h, 以体积分数15%的接种量转入发酵培养基(装液量80 mL/L)中, 再于27℃和220 r/min条件下振荡培养72 h, 以发酵菌体中辅酶 Q_{10} 的产量作为筛选标准。

1.4.2 复筛 挑选一定量的初筛最佳菌种, 接种于摇瓶中进行复筛, 复筛条件及方法同初筛。

* [收稿日期] 2005-10-24

[基金项目] 江苏省“十五”科技攻关(工业)项目(BE2004031)

[作者简介] 吴品芳(1980-), 女, 江苏苏州人, 在读硕士, 主要从事微生物与生化药学研究。

1.5 菌体中辅酶Q₁₀的分离测定

从发酵液中过滤出菌丝体,将其移入250 mL 平底烧瓶中,加入抗氧化剂 甲醇和少量蒸馏水混匀,90 ℃ 回流 30 min^[4],迅速冷却,用石油醚萃取3次,合并萃取液进行减压浓缩。采用薄层层析分离浓缩液中的辅酶Q₁₀,并用紫外分光光度法^[5]测定辅酶Q₁₀的含量。

1.6 遗传稳定性试验

将复筛得到的菌株连续传代4次,每代均经摇瓶发酵后测定辅酶Q₁₀的产量,重复3次。

2 结果与分析

2.1 ⁶⁰Co γ射线对三孢布拉氏霉孢子的致死效应

用不同剂量的⁶⁰Co γ射线处理三孢布拉氏霉孢子,其致死率随诱变剂量的加大而升高,当诱变剂量分别为0,0.8,1.5和2.5 kGy时,对三孢布拉氏霉孢子的致死率分别为0,68%,85%和95%。

2.2 ⁶⁰Co γ射线对诱变菌株辅酶Q₁₀产量的影响

将不同剂量⁶⁰Co γ射线辐射处理过的孢子稀释成不同浓度,分别涂布于平皿分离培养基上,于27

培养4~5 d后观察平板分离结果可知,绝大部分单菌落的形态无明显变化,有少部分出现颜色深浅不同及菌丝较出发菌株更稠密或更疏松的现象。从各处理组合中分别挑取一定数量的单菌落进行摇瓶初筛,以出发菌株JSF4的辅酶Q₁₀产量作对照,统计不同剂量的诱变菌株对辅酶Q₁₀的合成能力,制成辅酶Q₁₀产量提高分布图(图1)。由图1可以看出,用1.5 kGy剂量的⁶⁰Co γ射线处理时,诱变菌株的辅酶Q₁₀平均产量提高幅度明显高于其他剂量处理,表明用该剂量诱变三孢布拉氏霉的正突变率最高。

从各诱变组合中挑辅酶Q₁₀产量较高的菌株,经多次摇瓶复筛确认,其产量高于对照菌株50%的突变菌株见表1。由表1可知,F4-3菌株的辅酶Q₁₀产量最高,达到24 766 mg/L,较出发菌株JSF4的产量14 048 mg/L提高了76.30%。

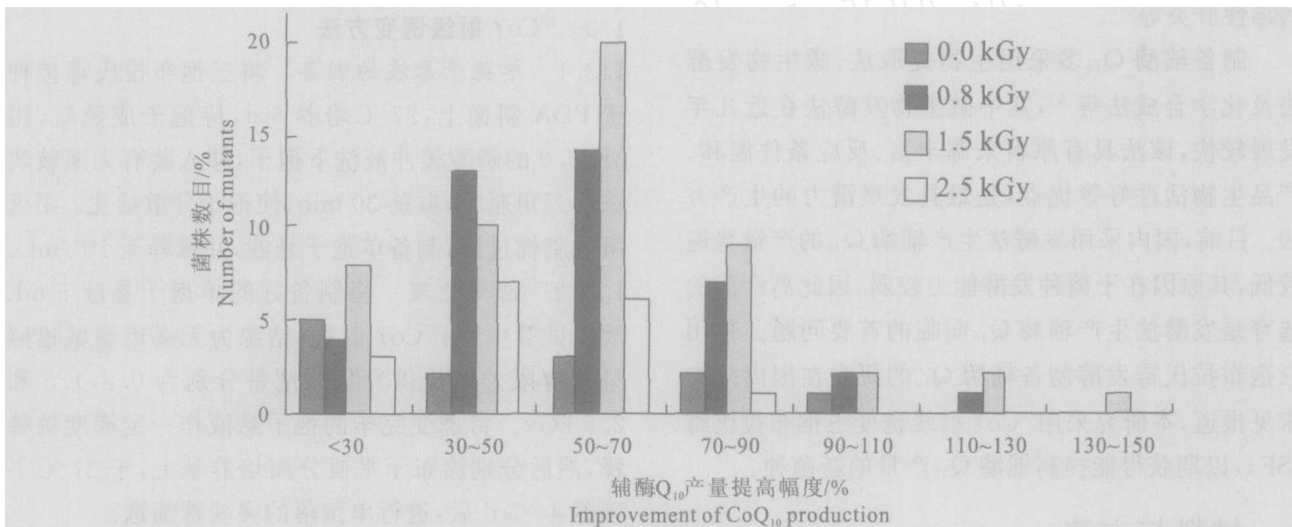


图1 经⁶⁰Co γ射线诱变的三孢布拉氏霉菌株辅酶Q₁₀产量的提高幅度分布

Fig. 1 Distribution of the improvement of *B. lakeslea trispora* mutants' CoQ₁₀ production by ⁶⁰Co γ radiation

表1 辅酶Q₁₀产量较高的三孢布拉氏霉诱变菌株的复筛结果

Table 1 Results of re-screening yield for *B. lakeslea trispora* mutants

菌株编号 Strain	复筛结果/(mg · L ⁻¹) Result of re-screening yield			平均/(mg · L ⁻¹) Average	较JSF4提高比例/% Improvement
	1	2	3		
F4-3	24 838	24 259	25 200	24 766	76.30
F4-9	23 967	23 878	24 532	24 127	71.74
F4-56	23 006	23 797	22 538	23 114	64.54
F4-8	21 692	21 120	22 321	21 711	54.55
F4-17	21 173	21 390	21 743	21 435	52.58
F4-16	21 440	20 923	21 679	21 347	51.96
JSF4	14 039	14 354	13 750	14 048	

2.3 F4-3 菌株的遗传稳定性试验

将F4-3 菌株接种于PDA 斜面并连续传代4 次, 每代分别摇瓶发酵后测定其辅酶Q₁₀产量, 结果见表2。

2. 表2 表明, F4-3 菌株各代的辅酶Q₁₀产量差别不很明显, 证明经⁶⁰Co γ射线诱变获得的突变菌株的性状能稳定遗传。

表2 F4-3 菌株的遗传稳定性试验结果

Table 2 Results of genetic stability of F4-3					mg/L
重复 Experiment	传代次数 Passage				
	1	2	3	4	
1	24 838	23 976	22 930	24 893	
2	24 259	24 210	23 896	23 755	
3	25 200	25 010	25 350	23 663	
平均 A verage	24 766	24 399	24 059	24 104	

3 讨 论

发酵法生产辅酶Q₁₀大都采用细菌(如脱氮副球菌、类球红细菌、放射型根瘤菌等)、酵母(如黄色隐球酵母、热带假丝酵母属等)或霉菌, 国内有关辅酶Q₁₀高产菌选育的研究报道较少。潘春梅等^[6]采用UV 和NTG 对放射型根瘤菌进行复合诱变, 其辅酶Q₁₀产量提高了37%; 刘克衫等^[7]用NTG 对根癌土壤杆菌进行诱变, 辅酶Q₁₀产量提高了26%, 达15.46 mg/L; 本研究采用⁶⁰Co γ射线对三孢布拉氏霉进行诱变, 筛选得到1 株突变菌株F4-3, 其辅酶Q₁₀产量较出发菌株提高了76%, 发酵平均单位达24 766 mg/L。

三孢布拉氏霉为单细胞多核丝状真菌, 每个孢子中含有4~ 5 个细胞核, 给高产菌种的筛选带来极大困难。本研究采用1.5 kGy 的⁶⁰Co γ射线进行诱变, 取得了较满意的诱变效果, 且突变株遗传性状稳定。这可能是高能量的⁶⁰Co γ射线诱变使三孢布拉氏霉的多核体细胞发生了单核化^[8], 因此提高了筛选几率。

本试验结果表明, 对丝状真菌来说, 菌丝稠密的单菌落具有较好的辅酶Q₁₀合成能力, 这方面的结果还未见报道, 其原因有待于进一步探讨。

[参考文献]

[1] Lenaz G. Coenzyme Q [M]. New York: John Wiley and Sons, 1985

[2] 赵美法. 重要的原料药辅酶Q₁₀[J]. 精细化工原料及中间体, 2003(3): 24-25

[3] 黄 伟, 徐建忠, 冯晓亮. 辅酶Q₁₀研究新进展[J]. 河南化工, 2003(2): 12-14

[4] 王根华, 钱 和, 肖 刚. 发酵菌体中辅酶Q₁₀的提取及其测定方法[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(2): 59-62

[5] 柴瑞震, 姜仕华, 蒋顺国, 等. 中国药品检验标准规范与药品质控工作法规全书[M]. 成都: 成都科技大学出版社, 1995: 620

[6] 潘春梅, 李 寅, 堵国成, 等. 利用广谱性和特异性组合诱变技术选育辅酶Q₁₀高产菌[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(3): 363-367.

[7] 刘克衫, 吴文芳, 韩斯琴, 等. 辅酶Q₁₀高产菌株的选育[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(1): 89-92

[8] 陆茂林, 单志萍, 孟 好. 多核丝状真菌的选育及遗传稳定性[J]. 生物技术, 2002, 12(2): 16-18

Studies on the screening of mutant of *B lakeslea trispora* on
CoQ₁₀ induced by ⁶⁰Co γ radiation

WU Pin-fang¹, LU Mao-lin²

(1 School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036, China;
2 Jiangsu Institute of Microbiology, Caid. Wuxi, Jiangsu 214063, China)

Abstract: The spore suspension of *B lakeslea trispora* was treated with different dosages of ⁶⁰Co irradiation. The study showed that when 1.5 kGy mutagenic dosage was provided, 85% of the spores died, resulting in a good mutagenic effect. By re-screening, a mutant F4-3 was obtained. Compared with the parent strain, its production of CoQ₁₀ reached 24 766 mg/L, and the increase rate was 76%, and its genetic character was stable.

Key words: ⁶⁰Co γ radiation; coenzyme Q₁₀; *B lakeslea trispora*