

## *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>原生质体制备与再生条件研究

李巍<sup>1</sup>,吕圭源<sup>1</sup>,胡伟莲<sup>2</sup>,戴德慧<sup>1,2</sup>

(1.浙江中医药大学 药物研究所,杭州 310053;2.浙江科技学院 生物与化学工程学院,杭州 310023)

**摘要:**以 $\beta$ 胡萝卜素生产菌株 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>为研究对象,对其原生质体形成及再生条件进行了研究。得知最佳形成与再生条件为:以摇瓶方式培养菌丝体,培养菌龄为56 h,酶解温度为30℃,酶质量分数2.0%,混合酶组成为  $m(\text{蜗牛酶}):m(\text{纤维素酶})=6:4$ ,酶解时间为120 min,渗稳剂为0.6 mol/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。*Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>原生质体形成数为  $7.9 \times 10^6$  个/mL,再生率为3.9%。

**关键词:**三孢布拉氏霉 H<sub>1</sub><sup>-</sup>;原生质体;形成;再生

**中图分类号:** TS201.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1671-8798(2009)01-0023-05

## Study on formation and regeneration of protoplast from *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>

LI Wei<sup>1</sup>, LU Gui-yuan<sup>1</sup>, HU Wei-lian<sup>2</sup>, DAI De-hui<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Pharmacology, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China)

**Abstract:** The formation and regeneration of the protoplast from *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> were studied, which is a  $\beta$ -carotene producing strain. The results showed that the optimal conditions are as follows: shaking culture as the mycelium culture method, the mycelium cultured 56 h as operated material, 30℃ as hydrolysis temperature, 120 min as hydrolysis time, 2.0% mixed enzyme  $m(\text{snail enzyme}):m(\text{cellulose enzyme})=6:4$  enzyme system, 0.6 mol/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  as osmotic stabilizer. Under these conditions, the formation rate of the protoplast is up to  $7.9 \times 10^6$  /mL, and the generation rate is up to 3.9%.

**Key words:** *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>; protoplast; formation; regeneration

$\beta$ 胡萝卜素、番茄红素具有抑制细胞变异,抗癌、防癌、抗氧自由基、增强机体抵抗力,维护人体上皮组织的正常生理功能,以及促进儿童生长发育等

一系列重要作用<sup>[1-3]</sup>,被广泛应用于食品、医药、化妆品、饲料等行业。目前生产的主要方法为化学合成法、天然提取法及发酵法3种,其中利用微生物发酵

收稿日期:2008-11-18

基金项目:浙江省科技计划重点资助项目(2006C22050)

作者简介:李巍(1980—),女,陕西延安人,硕士研究生,研究方向为药物生物技术。

生产展现了良好的工业化应用前景。能生物合成  $\beta$  胡萝卜素及番茄红素的微生物主要有短杆菌、黏红酵母、杜氏盐藻、布拉克须霉和三孢布拉霉等。而以后 3 种菌种的产量较高,这三者中只有三孢布拉霉不需光照培养,可在黑暗下发酵,因此最具有工业化生产前途<sup>[4]</sup>。

提高  $\beta$  胡萝卜素、番茄红素的发酵效价,得到性能优良的高产菌株是大规模工业化生产  $\beta$  胡萝卜素、番茄红素的前提条件。原生质体诱变、融合、转化等原生质体技术是研究遗传特性及选育优良菌株行之有效的手段<sup>[5-7]</sup>。其基础是制备出高活力的原生质体。为此,本研究对三孢布拉氏霉菌的原生质体制备、再生条件进行了探讨,以期诱变育种及原生质体融合育种,获得高产  $\beta$  胡萝卜素、番茄红素等优良菌株创造条件。

## 1 材 料

### 1.1 菌 种

三孢布拉氏霉  $H_1^-$  (*Blakeslea trispora*  $H_1^-$ ) 本实验室保藏。

### 1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 麦芽汁培养基:8 波美度麦芽汁,琼脂 2%, pH 6.0。

1.2.2 菌丝生长培养基 菌丝液体生长培养基:8 波美度麦芽汁;菌丝体固体生长培养基:8 波美度麦芽汁,琼脂 2%。

1.2.3 低渗再生培养基 8 波美度麦芽汁,0.05% 去氧胆酸钠,上层琼脂 0.8%,下层琼脂 2%。

1.2.4 高渗再生培养基 由 0.7 mol/L 的  $MgSO_4$  配制成 8 波美度麦芽汁,0.05% 的去氧胆酸钠,上层琼脂 0.8%,下层琼脂 2%。

1.2.5 主要试剂 蜗牛酶,北京百泰生化技术公司;纤维素酶,陕西省科学院酶制剂研究所;去氧胆酸钠,上海佰奥生物科技有限公司。

## 2 方 法

### 2.1 菌丝体培养

2.1.1 液体摇瓶培养菌丝 将斜面菌种活化后,取培养 5~6 d 的斜面菌种,用无菌生理盐水将斜面孢子洗入菌丝液体生长培养基中,30 °C 摇瓶培养 40~80 h。

2.1.2 玻璃纸培养菌丝 将斜面菌种活化后,取培养 5~6 d 的斜面菌种,用无菌水制成孢子悬浮液,

取 0.2 mL 涂布于覆盖玻璃纸的麦芽汁固体培养基上,30 °C 摇瓶培养 48 h。

### 2.2 原生质体制备及纯化

取菌丝体培养液于无菌离心管中离心收集菌丝体,用无菌生理盐水洗涤,然后再用 0.6 mol/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  配制的渗稳液洗涤 2 遍,离心后弃去上清液,无菌条件下称取 300 mg 菌丝体,加入 3 mL 由 0.6 mol/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  渗稳液配制并经微孔滤膜(0.2  $\mu m$ )过滤除菌的酶溶液,置于一定温度下恒温酶解,隔时摇动,使菌丝体悬浮,充分酶解,并每隔 20 min 用显微镜观察,酶解完成后,终止水浴。用无菌吸管猛烈吹吸几次,促使原生质体从残余菌丝体上释放,用血球计数板计数原生质体形成数。菌丝体酶解液经 4 层擦镜纸过滤即得到纯化的原生质体<sup>[8]</sup>。

### 2.3 原生质体的再生(双层平板法)

将纯化的原生质体分别用 0.6 mol/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  高渗溶液与无菌水梯度稀释后,各取 1 mL 加于表面干燥的再生固体培养基平板上,随后加入上层半固体培养基,迅速摇晃均匀,于 30 °C 恒温培养,观察再生情况并计算再生率。

原生质体再生率计算:

$$\text{原生质体再生率}(\%) = \frac{A-B}{C} \times 100\%$$

式中: A 为高渗再生培养基上的总菌落数; B 为在低渗培养基中菌落数; C 为血球计数板计得的原生质体数。

### 2.4 各因素对 *Blakeslea trispora* $H_1^-$ 原生质体形成和再生的影响

2.4.1 菌体培养方式的影响 分别取培养 48 h 液体摇瓶培养的菌丝及玻璃纸培养的菌丝置于由 0.7 mol/L 的  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  配制的 2.0% 蜗牛酶中,30 °C 酶解 90 min。计数原生质体形成数及再生率。

2.4.2 菌龄的影响 分别取液体培养基中培养 40,48,56,64,72 h 的菌丝体,加入由 0.7 mol/L 的  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  配制 2.0% 的蜗牛酶,酶解温度 30 °C,酶解 90 min,计算原生质体形成数及再生率。

2.4.3 酶系统的影响 分别用 2.0% 蜗牛酶,2.0% 纤维素酶及不同比例的 2.0% 混合酶[ $m$ (蜗牛酶): $m$ (纤维素酶)=7:3、6:4、5:5],30 °C 酶解菌龄 56 h *Blakeslea trispora*  $H_1^-$  的菌丝体,酶解 90 min 后,计算原生质体形成数及再生率。

2.4.4 酶质量分数的影响 分别采用 1.0%,

1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0% 的混合酶 [ $m$ (蜗牛酶) :  $m$ (纤维素酶) = 6 : 4], 30 °C 酶解 56 h *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 的菌丝体, 酶解 90 min, 计算原生质体形成数及再生率。

**2.4.5 酶解时间的影响** 取培养 56 h 的 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 菌丝体。分别加入由浓度为 0.7 mol/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 配制的 2.0% 的混合酶, 酶解温度 30 °C, 每隔 30, 60, 90, 120, 150 min, 计算原生质体形成数并涂平板计算再生率。

**2.4.6 酶解温度的影响** 用 2.0% 的混合酶在 28, 30, 32, 34 °C 酶解菌龄 56 h *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 的菌丝体, 酶解 120 min, 计算原生质体形成数及再生率。

**2.4.7 渗稳剂的影响** 取培养 56 h 的 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 菌丝体。分别加入由浓度为 0.7 mol/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、蔗糖、NaCl、KCl、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 等渗稳液配制的 2.0% 的混合酶, 30 °C, 酶解 120 min, 计算原生质体形成数及再生率。

**2.4.8 渗稳剂浓度的影响** 以不同的浓度 (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mol/L) MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 作渗稳剂, 30 °C 酶解菌龄 56 h *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 菌丝体, 酶解 120 min, 计算原生质体形成数及再生率。

### 3 结果与分析

#### 3.1 菌体培养方式对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成与再生的影响

2 种不同的菌体培养方式对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成与再生的影响结果见图 1。由图 1 可以看出, 不同的菌丝培养方式对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 的原生质体制备有较大的影响, 玻璃纸固体菌丝法有利于原生质体的形成, 但不利于原生质的再生, 为了获得最大量的原生质体再生菌落数 (即绝对数), 菌丝体培养方式选择为摇瓶培养。

#### 3.2 菌龄对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成与再生的影响

不同的菌龄对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成与再生的影响结果见图 2。从中可见菌株的菌龄对原生质体的形成和再生均有很大的影响, 菌龄太长的菌丝壁易老化增厚, 不利于原生质体的释放, 并且菌体本身的活性较差, 也导致难于再生。菌龄太短, 菌丝体易破裂, 原生质体释放量减少。不同时期的菌丝对酶的敏感度不同, 只有在其生长的某个特定阶段对酶液最为敏感, 在此阶段酶解较易获

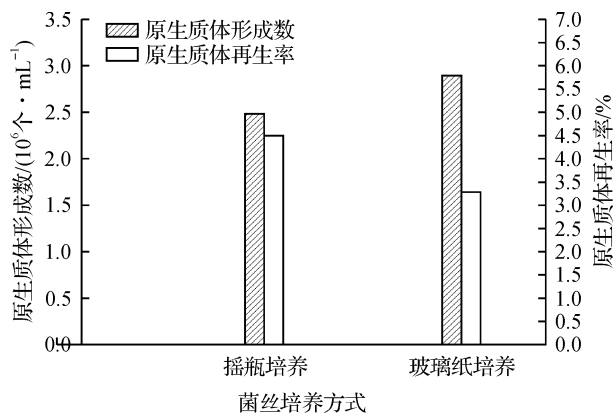


图 1 菌丝培养方式对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成与再生的影响

Fig.1 The effects of different mycelium culture methods on the formation and regeneration of the protoplast from *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>

得大量均一的原生质体, 过早、过晚均不利于酶解<sup>[9]</sup>。由于处于对数生长期的菌体代谢活性高而稳定、细胞壁对酶的作用较为敏感, 生长适应能力强, 原生质体再生能力强, 故选取菌龄 56 h 的菌丝体制备原生质体。

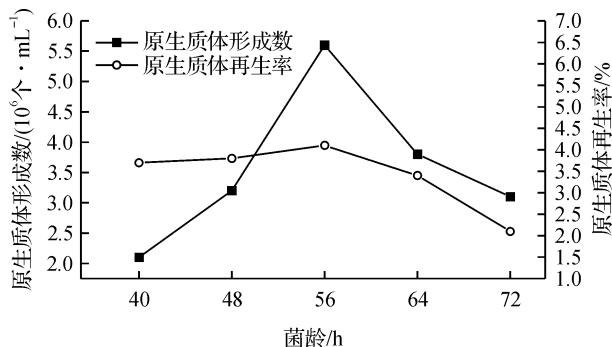


图 2 菌龄对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成与再生的影响

Fig.2 The effect of mycelium age on the formation and regeneration of the protoplast from *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>

#### 3.3 酶系统对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成与再生的影响

不同的酶系统对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成的影响结果见表 1。不同微生物的细胞壁成分与结构不同, 因此制备不同微生物的原生质体时需选用不同的酶。由表 1 可知, 当用  $m$ (蜗牛酶) :  $m$ (纤维素酶) = 6 : 4 混合使用时, 原生质体形成数高于与其他酶系统形成数, 故选该比例的混合酶做脱壁酶系统。

表 1 酶系统对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成与再生的影响

Table 1 The effects of different enzyme systems on the formation of the protoplast from *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>

| 酶系统组成   | 2.0% 蜗牛酶 | 2.0% 纤维素酶 | 2.0% 混合酶 [m(蜗牛酶) : m(纤维素酶)] |       |       |
|---|----------|-----------|-----------------------------|-------|-------|
|   |          |           | 7 : 3                       | 6 : 4 | 5 : 5 |
| 原生质体形成数 / (10 <sup>6</sup> 个 · mL <sup>-1</sup> ) | 5.6      | 2.3       | 6.1                         | 6.9   | 5.4   |
| 原生质体再生率 / %                                       | 4.1      | 2.7       | 3.2                         | 4.8   | 3.1   |

3.4 酶质量分数对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成与再生的影响

酶质量分数对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成与再生的影响结果见图 3。由图 3 可知,在一定范围内, *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 随着酶质量分数增加,原生质体的形成数及再生率不断增大,但超过一定范围,原生质体形成数及再生率不断下降。这主要因为蜗牛酶是一种混合酶,里面含有一些对原生质体有害的酶类,故酶质量分数的增加,这些不利于原生质体制备与再生的酶质量分数也相应增加,当达到一定浓度的阈值时,必然会严重影响原生质体的活性;同时酶质量分数过大会使细胞脱壁太彻底,使原生质体再生时合成细胞壁的引物失去,影响再生;并且酶量过大,也易使菌体凝聚,从而难于原生质体化。酶质量分数过高与过低,都会导致原生质体形成数与再生率的降低,因此酶质量分数选择为 2.0%。

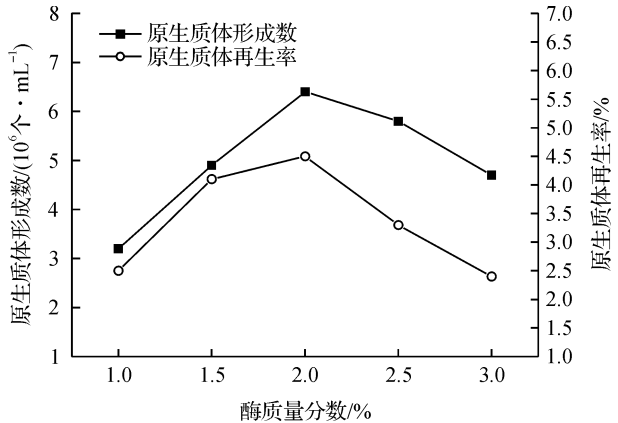


图 3 酶质量分数对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成与再生的影响

Fig.3 The effects of different enzyme concentrations on the formation and regeneration of the protoplast from *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>

3.5 酶解时间对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成与再生的影响

酶解时间对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成与再生的影响结果见图 4。充足的酶解时间是微生物细胞原生质体化的必要条件,时间短产量低、再生率高,时间长则不利于再生。随着酶解时间的

延长,菌丝体去壁程度愈完全,表现为原生质体形成率逐渐上升,再生率也在不断提高。当酶解达到一定时间后,酶活力显著降低;同时时间过长,脱壁太彻底,使细胞壁再生的引物失去。因此,再进行酶解作用,酶便会进一步对原生质体发生作用而使细胞质膜受到损伤,造成大量原生质体破裂,从而使原生质体失活,表现为原生质体再生率急剧降低。为了获得最大量的原生质体再生菌落数(即绝对数),综合原生质体形成数与再生率,酶解时间选择为 120 min。

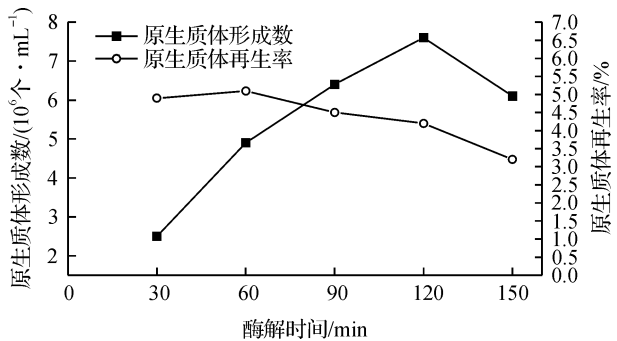


图 4 酶解时间对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成与再生的影响

Fig.4 The effects of different enzyme decomposing time on the formation and regeneration of the protoplast from *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>

3.6 酶解温度对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成与再生的影响

不同的酶解温度对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成与再生的影响结果见图 5。酶解温度是影响原生质制备的因素之一,不同的脱壁酶具有各自不同的最适温度,由图 5 可知,在酶解温度为 30 ℃ 时,原生质体形成数及再生率均高于其他温度,因此选择酶解温度为 30 ℃ 下制备原生质体。

3.7 渗稳剂对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成与再生的影响

不同的渗稳剂对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup> 原生质体形成与再生的影响结果见图 6。由图 6 可以看出,无机渗稳剂有利于原生质体的形成,而有机渗稳剂则有利于原生质体再生,综合原生质体的形成数与再生率,选择 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 作为渗透压稳定剂。

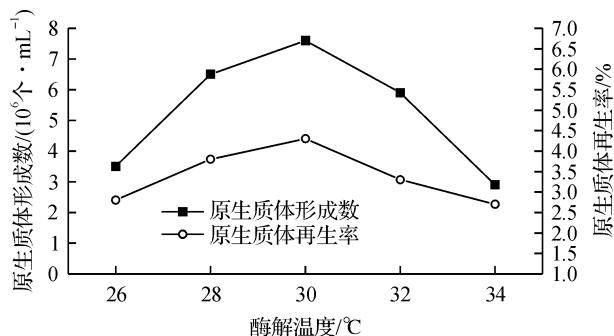


图5 酶解温度对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>原生质体形成与再生的影响

Fig.5 The effects of different temperatures on the formation and regeneration of the protoplast from *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>

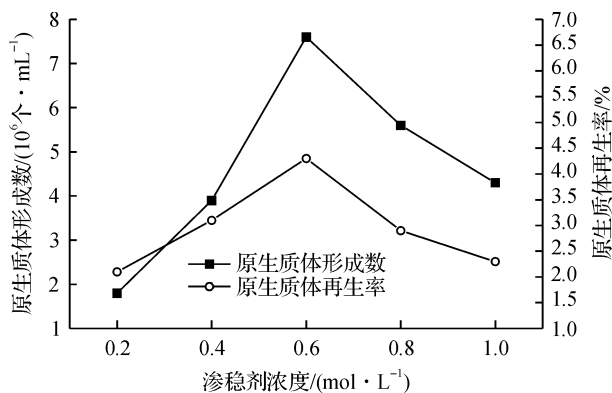


图7 渗透剂浓度对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>原生质体形成与再生的影响

Fig.7 The effects of different osmotic stabilizer concentrations on the formation and regeneration of the protoplast from *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>

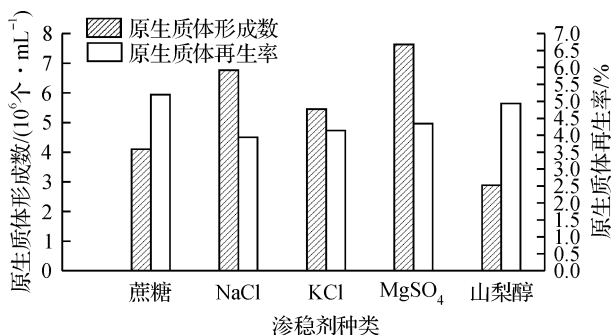


图6 渗透剂对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>原生质体形成与再生的影响

Fig.6 The effects of different osmotic stabilizers on the formation and regeneration of the protoplast from *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>

### 3.8 渗透剂浓度对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>原生质体形成与再生的影响

不同渗透剂浓度对 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>原生质体形成与再生的影响结果见图7。由图7可知,渗透液浓度的过高过低都会影响原生质体形成数和原生质体再生率,选择0.6 mol/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O溶液为渗透剂时,有较高的原生质体形成数和再生率。

### 3.9 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>原生质体制备与再生的最佳条件

综合以上实验,归纳出 *Blakeslea trispora* H<sub>1</sub><sup>-</sup>原生质体制备最佳条件为:以摇瓶方式培养菌丝体,菌龄为56 h,酶解温度为30℃,酶质量分数2.0%,混合酶组成:*m*(蜗牛酶):*m*(纤维素酶)=6:4,酶解时间为120 min,渗透剂为0.6 mol/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O。

## 4 讨论

在显微镜下观察三孢布拉氏霉菌丝体原生质体释放过程,其释放形式有2种:其一是从菌丝尖端释放,是三孢布拉氏霉菌原生质体主要形成方式,大多数原生质体通过这种方式形成;其二是通过菌丝体侧枝释放,但释放的频率较低。由此可以推断新生成的菌丝尤其菌丝体尖端细胞更易形成原生质体。在原生体制备时菌丝体应选择对数生长期的菌丝体。渗透压稳定剂的作用不仅能防止原生质体的破裂,而且对酶的活性提高与促进酶和底物结合都具有相当的优越性,MgSO<sub>4</sub>对于丝状真菌具有突出的优点,能够使菌丝在酶的作用下释放出很多的带有大液泡的原生质体,离心后由于液泡的存在而漂浮在上层,极易与其他残存的菌丝碎片分开。

在菌丝体酶解过程中,除原生质体外,三孢布拉霉菌丝体内的小油滴也会释放出来,在原生质体计数时应加以区别,若无法准确判断,可以添加苏丹染液加以区分。在原生质体再生过程中,三孢布拉霉菌蔓延生长无法计数,为方便计数,在再生培养基中添加了0.05%的去氧胆酸钠。去氧胆酸钠对三孢布拉霉菌的原生质体细胞壁的再生及生长有一定的抑制作用。因此,三孢布拉霉菌原生质体的实际再生率应高于实验值。

本研究通过对三孢布拉霉菌的原生质体制备及再生研究,得到其最佳条件,这一结果可作为今后三孢布拉霉菌原生质体育种的重要依据。

(下转第31页)