

# 高产洛伐他汀红曲霉复合诱变育种

游玟娟<sup>1</sup>, 温拥军<sup>1</sup>, 李 媛<sup>2</sup>

(1. 湖南化工职业技术学院, 湖南株洲 412004;

2. 中南大学化学化工学院, 湖南长沙 410083)

**摘要:** 为了提高洛伐他汀的产量, 对红曲霉进行了紫外线与硫酸二乙酯复合诱变处理, 并利用粗糙脉孢菌对洛伐他汀的敏感性进行初筛, 再通过HPLC法测定其发酵液中洛伐他汀的产量进行复筛。最终得到一株稳定高产的目的菌株, 命名为*Monascus sp.*UV-D-9。其洛伐他汀产量达到 $(0.289 \pm 0.02)$  mg/mL, 相对于出发菌株提高了82.9%。*Monascus sp.*UV-D-9是一株优良的洛伐他汀生产菌株, 有一定的应用价值。

**关键词:** 洛伐他汀, 红曲霉, 复合诱变, 紫外线, 硫酸二乙酯

## Screening of high lovastatin producing strains with compound mutagenesis by UV and DES

YOU Wen-juan<sup>1</sup>, WEN Yong-jun<sup>1</sup>, LI Yuan<sup>2</sup>

(1. Hunan Chemical Industry Vocational Technology Institute, Zhuzhou 412004, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China)

**Abstract:** In order to improve lovastatin yield of *Monascus sp.* 3.00567, the starting strains were mutagenized by UV and DES, which were primarily screened based on the sensitivity to lovastatin of *Neurospora crassa*. The secondary screening was made through determined lovastatin yield of fermentation liquid by HPLC. A high and stable yield mutant was obtained and named *Monascus sp.*UV-D-9. The lovastatin yield of *Monascus sp.*UV-D-9 was  $(0.289 \pm 0.02)$  mg/mL, which increased 82.9% compared with the original strain. *Monascus sp.*UV-D-9 had certain value as an excellent lovastatin producing strain.

**Key words:** lovastatin; *Monascus sp.*; compound mutagenesis; UV; DES

中图分类号: TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)22-0213-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.22.038

洛伐他汀 (lovastatin) 是目前临床上应用广泛的一类重要的降血脂、降胆固醇药物。它通过选择性抑制体内羟甲戊二酰辅酶A (HMG-CoA) 还原酶的活性, 减少内源性胆固醇的合成, 对动脉粥样硬化和冠心病等疾病起到积极的防治作用<sup>[1-3]</sup>。随着人们生活水平不断提高和饮食结构的改变, 近年来我国高血脂、动脉粥样硬化、高血压、冠心病等“富贵病”发病率逐年提高, 对洛伐他汀等他汀类药物的市场需求日益增大, 激起了广大研究人员的兴趣<sup>[4-6]</sup>。微生物发酵法生产洛伐他汀工业中, 优良的生产菌株是获得高产的前提。李滔滔等<sup>[7]</sup>利用氯化锂对红曲霉HW进行诱变, 筛选得到6株正突变菌株中, 洛伐他汀产量最高达到38.86 mg/L; 蔡晶晶等<sup>[8]</sup>用亚硝基胍诱变土曲霉, 获得一株诱变株, 使洛伐他汀产量提高了66%以上。李桂杭等<sup>[9]</sup>采用原生质体融合技术选育洛伐他汀高产菌株, 获得的融合子洛伐他汀产量是出发菌株的2倍以上。本实验通过紫外线 (UV) 与硫酸二乙

酯 (DES) 复合诱变处理红曲霉, 充分利用不同诱变剂间的协同效应, 进一步提高洛伐他汀产量, 为功能性红曲霉的进一步应用研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

红曲霉 (*Monascus sp.* 3.00567)、粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa* 3.01604) 购于中国微生物菌种保藏中心, 由本院生物制药国家重点实训基地保藏; PDA培养基 马铃薯(去皮) 20%, 葡萄糖: 2%, 琼脂: 2%; 发酵培养基 PD培养基 马铃薯(去皮) 20%, 葡萄糖: 2%; 柠檬酸三钠、硫酸二乙酯 国药集团化学试剂有限公司, 分析纯; 硫代硫酸钠、乙酸乙酯 天津市恒兴化学试剂制造有限公司, 分析纯; 甲醇 天津科密欧试剂有限公司, 色谱纯; 洛伐他汀标准品 上海永叶生物科技有限公司, HPLC  $\geq 98\%$ 。

超净工作台CBV-1500A 上海瑞仰净化装备有限公司; 生化培养箱 HPS-250 哈尔滨东明医疗仪器厂; 恒温培养摇床 QYC.2102 上海福玛实验设备有限公司; 磁力搅拌器HJ-1 江苏省金坛市医疗仪器厂; 高效液相色谱仪 配有可变波长紫外检测器和Chromleon色谱工作站, 美国DIONEX公司。

收稿日期: 2014-02-12

作者简介: 游玟娟(1981-), 女, 本科, 讲师, 研究方向: 微生物育种技术。

基金项目: 湖南化工职业技术学院课题(HNHY2013002)。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 UV诱变** 取红曲霉孢子2环接种于装有无菌玻璃珠的250mL摇瓶(内装100mL无菌水),然后置于32℃、200r/min的摇床上振荡30min,配成孢子悬液。在超净工作台上吸取5mL红曲霉孢子悬液移入7个无菌培养皿中,置于距30W紫外灯30cm处的磁力搅拌器上,分别照射0(空白对照用)、30、60、90、120、150、180s。在暗光条件下,分别取经紫外线诱变的孢子悬液0.1mL涂布于固体平板培养基上,每个诱变时间点的孢子悬液均涂3个平板做平行实验,然后倒置于32℃恒温培养箱中避光培养3d,计算致死率,以确定最佳诱变时间。

致死率(%)=(对照组平板菌落数-处理后平板菌落数)/对照组平板菌落数×100。

取实验确定的最佳紫外诱变时间处理后平板上分离得到的单菌落,采用管碟法<sup>[10]</sup>在粗糙脉孢菌孢子液的PDA培养基平板上进行抑菌实验,测量抑菌圈直径,对突变株进行初筛。将初筛选出来的诱变效果好的突变株接种至摇瓶中,置于转速为200r/min,温度为32℃的摇床上培养7d,发酵液经乙酸乙酯萃取并过滤,用高效液相色谱法(HPLC)测定洛伐他汀产量,确定UV诱变的目的菌株。以未经诱变处理的出发菌株做对照实验,比较诱变效果。

**1.2.2 DES诱变** 以UV诱变所得的洛伐他汀产量最高的菌株作为出发菌株,配成孢子悬液6份(每份5mL),分别加入0(空白对照用)、1%、2%、3%、4%、5%(v/v)的DES溶液5mL振荡处理10min,立即加入10mL的25%硫代硫酸钠中止反应。适当稀释后取0.1mL涂布于固体平板培养基上(各浓度均做3次平行实验),于32℃下培养3d,并计算致死率。DES诱变菌株初筛和复筛方法同1.2.1。

**1.2.3 目的菌株的遗传稳定性** 将筛选到的目的菌株进行斜面传代实验,连续传种5代,同时将每代菌株进行平板培养,观察菌落形态,并通过摇瓶发酵测定洛伐他汀的产量,考察菌株的遗传稳定性能。

**1.2.4 洛伐他汀产量测定** 采用HPLC法,测定条件为<sup>[11]</sup>:色谱柱:XDB C<sub>18</sub>柱;检测波长237nm,流动相:甲醇:水(体积比为70:30),柱温26℃,体积流量1.0mL/min,进样量20μL。

## 2 结果与分析

### 2.1 UV诱变致死曲线

UV诱变致死曲线如图1所示。从图1可知,红曲

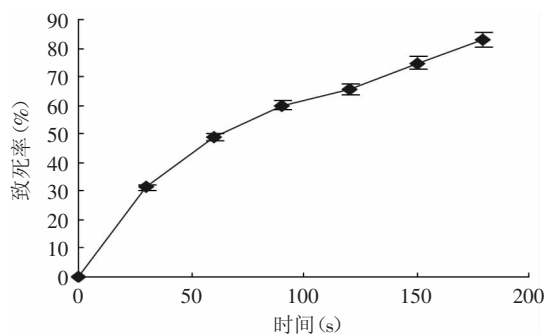


图1 UV诱变致死曲线

Fig.1 Death curve of UV mutagenesis

霉出发菌株对UV较敏感,随UV照射时间增加,致死率也升高。当UV照射时间为从30s增加至150s时,致死率31.4%上升至74.8%。一般认为,当致死率为70%~80%时得到的突变株能满足筛选的需要<sup>[12]</sup>。故UV诱变时间宜选150s。

### 2.2 DES诱变致死曲线

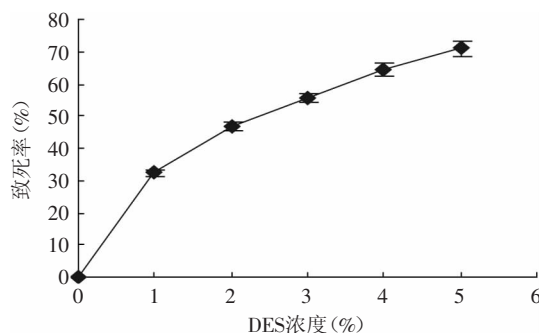


图2 DES诱变致死曲线

Fig.2 Death curve of DES mutagenesis

对UV诱变所得到的正突变株UV-12进行DES诱变处理,得到致死曲线如图2所示。由图2可知,UV-12的致死率与DES剂量呈正相关。在考察范围内,致死率随DES浓度增加而升高,当DES浓度5%时,致死率为70.9%。因此,DES诱变浓度应选5%较为合适。

### 2.3 UV诱变结果

对UV诱变处理后分离得到的单菌落进行抑菌实验,初筛得到抑菌圈直径D较出发菌株(D=1.53cm)大的突变株12株,然后将该12株突变株于32℃下进行摇瓶发酵7d,测洛伐他汀的产量。所得结果见表1。

由表1可知,12株对粗糙脉孢菌抑菌圈直径D≥

表1 UV诱变后菌株的抑菌圈直径与洛伐他汀产量

Table 1 The antibacterial circle diameter and lovastatin yield after UV mutagenesis

| 菌株名称 | 抑菌圈直径D(cm) | 洛伐他汀产量(mg/mL) | 菌株名称     | 抑菌圈直径D(cm) | 洛伐他汀产量(mg/mL) |
|------|------------|---------------|----------|------------|---------------|
| UV-1 | 1.55       | 0.133±0.01    | UV-8     | 2.12       | 0.204±0.02    |
| UV-2 | 1.58       | 0.132±0.01    | UV-9     | 2.14       | 0.135±0.04    |
| UV-3 | 1.69       | 0.136±0.03    | UV-10    | 2.25       | 0.231±0.03    |
| UV-4 | 1.73       | 0.138±0.02    | UV-11    | 2.44       | 0.230±0.02    |
| UV-5 | 1.73       | 0.186±0.04    | UV-12    | 2.58       | 0.249±0.03    |
| UV-6 | 1.88       | 0.192±0.02    | 出发菌株(CK) | 1.53       | 0.158±0.02    |
| UV-7 | 1.95       | 0.246±0.04    |          |            |               |

1.55cm的红曲霉突变株中,少部分菌株发生了负突变,如:UV-1、UV-3等,大部分菌株发生正突变,如:UV-7、UV-11、UV-12等。从抑菌圈与洛伐他汀产量关系来看,两者存在一定的正相关,即抑菌圈大的菌株一般洛伐他汀产量也高,但也存在例外情况,UV-9菌株抑菌圈直径为2.14cm,但洛伐他汀产量仅为 $(0.135\pm 0.04)$ mg/mL( $n=3$ )。原因是除洛伐他汀外,微生物生长过程中产生的有机酸等物质也可能产生抑菌圈效果,同时测量抑菌圈和测定洛伐他汀产量时培养方式也有差异<sup>[13-14]</sup>,因此抑菌圈只能作为初筛指标,必须通过摇瓶发酵复筛才能准确判断菌株性能。在12株突变株中,UV-7、UV-12菌株洛伐他汀产量分别为 $(0.246\pm 0.04)$ 、 $(0.249\pm 0.03)$ mg/mL( $n=3$ ),较出发菌株(CK)分别提高了55.6%、57.6%,因此以此两菌株为DES诱变的出发菌株。

## 2.4 DES诱变结果

对UV-7、UV-12进行DES诱变,初筛得到效果较好的突变株10株,通过摇瓶发酵后测洛伐他汀产量,得到结果见表2。

表2结果表明,在10株抑菌圈直径 $D\geq 2.33$ cm的突变株中,UV-D-9的洛伐他汀产量为 $(0.289\pm 0.02)$ mg/mL( $n=3$ ),较UV-7、UV-12提高了将近16%,说明UV与DES间存在着协同效应。其原因是二者的诱变机理和作用位点不相同,UV诱变位点主要是DNA中的胸腺嘧啶(T),能使形成TT二聚体,导致DNA复制过程中碱基发生错配<sup>[12]</sup>;而DES是一种烷化剂,通过与DNA中碱基发生化学反应,引起碱基结构发生变化,导致DNA复制过程中碱基配对的转换或颠换,从而引起引起突变<sup>[13]</sup>。UV-D-9的洛伐他汀产量较原始菌株提高82.9%,说明采用UV与DES复合诱变是提高红曲霉洛伐他汀产量的一种有效方法。

## 2.5 UV-D-9菌株的遗传稳定性

对UV-D-9菌株连续进行5次传代实验,得到的结果如表3所示。从表3中5次传代实验结果可以看出,UV-D-9菌株无论是菌落形态特征还是洛伐他汀产量均较稳定,说明其是一株稳定高产的优良突变株,有较高的应用价值。另外,从菌落形态特征和洛伐他汀产量之间的关系来看,红色素的产量和菌落有无皱褶,可能与洛伐他汀产量存在一定内在关系,其原因可能是二者均含有多环酮的结构,在细胞内生物合成途径中存在共同的前体物质,如乙酰CoA、丙酰CoA、丙二酰CoA和甲基丙二酰CoA等<sup>[15-16]</sup>,该部分内容需进一步研究。

## 3 结论

采用UV与DES对红曲霉复合诱变处理,通过抑菌圈法初筛与HPLC法复筛相结合,得到一株稳定高产的突变株*Monascus sp.*UV-D-9,其洛伐他汀的产量为 $(0.289\pm 0.02)$ mg/mL,相对于出发菌株提高了82.9%。5次传代实验中,*Monascus sp.*UV-D-9表现出良好的遗传稳定性。因此,复合诱变是微生物育种中一种简便、有效的方法。另外,实验中还发现,红曲霉的产红色素能力和菌落形态特征可能与其产洛伐他汀能力有一定内在联系,需进一步进行研究。

## 参考文献

- [1] MEKENNEY J M. Lovastatin: a new cholesterol-lowering agent[J]. Clinical Pharmacy, 1988, 7(1): 21-36.
- [2] 李梅, 台喜生, 冯佳丽, 等. 微生物来源的洛伐他汀的研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(8): 457-460.
- [3] Alberts A W, Chen J, Hunt V, et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethyl-glutaryl-coenzyme a reductase and cholesterol-lowering agent[J]. Proceed Nat Acad Sci, 1980, 77(7): 3957-3961.
- [4] 李尽哲, 王伟, 黄雅琴. 超高压对洛伐他汀生产菌株的诱变

表2 DES诱变后菌株的抑菌圈直径与洛伐他汀产量

Table 2 The antibacterial circle diameter and lovastatin yield after DES mutagenesis

| 菌株名称   | 抑菌圈直径D(cm) | 洛伐他汀产量(mg/mL) | 菌株名称    | 抑菌圈直径D(cm) | 洛伐他汀产量(mg/mL) |
|--------|------------|---------------|---------|------------|---------------|
| UV-7   | 1.95       | 0.246±0.03    | UV-D-5  | 2.56       | 0.234±0.01    |
| UV-12  | 2.58       | 0.249±0.02    | UV-D-6  | 2.59       | 0.202±0.04    |
| UV-D-1 | 2.33       | 0.238±0.04    | UV-D-7  | 2.62       | 0.274±0.03    |
| UV-D-2 | 2.39       | 0.253±0.04    | UV-D-8  | 2.68       | 0.283±0.01    |
| UV-D-3 | 2.44       | 0.259±0.02    | UV-D-9  | 2.69       | 0.289±0.02    |
| UV-D-4 | 2.48       | 0.252±0.01    | UV-D-10 | 2.75       | 0.270±0.02    |

表3 UV-D-9遗传稳定性与菌落形态

Table 3 The genetic stability and colony morphologies of UV-D-9

| 传代次数 | 菌落特征(培养4d) |             |                   | 洛伐他汀产量(mg/mL) |
|------|------------|-------------|-------------------|---------------|
|      | 直径         | 颜色          | 形态                |               |
| 1    | 12.5       | 红色          | 绒毛状菌丝浓密, 表面无皱褶    | 0.295±0.04    |
| 2    | 11.7       | 浅红色, 边缘部分黄色 | 绒毛状菌丝较稀疏, 表面少量皱褶  | 0.281±0.03    |
| 3    | 12.0       | 红色          | 大量绒毛状菌丝, 表面少量皱褶   | 0.285±0.01    |
| 4    | 12.6       | 浅红色         | 大量绒毛状菌丝, 表面少量皱褶   | 0.288±0.03    |
| 5    | 13.8       | 中心呈深红色      | 大量绒毛状菌丝, 无皱褶向四周渐浅 | 0.293±0.02    |

(下转第225页)

complex and *in vitro* anticancer activity[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, 115: 22–28.

[2] Mohanty R K, Thennarasu S, Mandal A B. Resveratrol stabilized gold nanoparticles enable surface loading of doxorubicin and anticancer activity[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, 114: 138–143.

[3] Chan M M. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin[J]. Biochemical Pharmacology, 2002, 63(2): 99–104.

[4] Kasiotis K M, Pratsinis H, Kletsas D, *et al.* Resveratrol and related stilbenes: Their anti-aging and anti-angiogenic properties [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 61: 112–120.

[5] Pace-Asciak C R, Hahn S, Diamandis E P, *et al.* The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease[J]. Clinica Chimica Acta, 1995, 235(2): 207–219.

[6] Wang B, Sun J, Li X, *et al.* Resveratrol prevents suppression of regulatory T-cell production, oxidative stress, and inflammation of mice prone or resistant to high-fat diet-induced obesity[J]. Nutrition Research, 2013, 33(11): 971–981.

[7] Clouser C L, Chauhan J, Bess M A, *et al.* Anti-HIV-1 activity of resveratrol derivatives and synergistic inhibition of HIV-1 by the combination of resveratrol and decitabine[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, 22(21): 6642–6646.

[8] Frombaum M, Le Clanche S, Bonnefont-Rousselot D, *et al.* Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and NO bioavailability: Potential benefits to cardiovascular diseases[J]. Biochimie, 2012, 94(2): 269–276.

[9] Dolinsky V W, Dyck J R B. Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Molecular Basis of Disease, 2011, 1812(11): 1477–1489.

[10] Lee Y, Park I, Lee Y, *et al.* Resveratrol contributes to chemosensitivity of malignant mesothelioma cells with activation of p53[J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 63: 153–160.

[11] Kim T H, Shin Y J, Won A J, *et al.* Resveratrol enhances chemosensitivity of doxorubicin in multidrug-resistant human breast cancer cells via increased cellular influx of doxorubicin[J].

Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–General Subjects, 2014, 1840(1): 615–625.

[12] Casas L, Mantell C, Rodríguez M, *et al.* Extraction of resveratrol from the pomace of Palomino fino grapes by supercritical carbon dioxide [J]. Journal of Food Engineering, 2010, 96(2): 304–308.

[13] González-Barrio R, Vidal-Guevara M L, Tomás-Barberán F A, *et al.* Preparation of a resveratrol-enriched grape juice based on ultraviolet C-treated berries[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2009, 10(3): 374–382.

[14] Hasan M M, Yun H, Kwak E, *et al.* Preparation of resveratrol-enriched grape juice from ultrasonication treated grape fruits[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2014, 21(2): 729–734.

[15] Li B, Wang C, Chen X, *et al.* Highly specific separation for antitumor Spiroreussione A from endophytic fungal [*Preussia sp.*] fermentation broth by one-step macroporous resins AB-8 treatment [J]. Journal of Chromatography B, 2013, 938: 1–7.

[16] Xiong Q, Zhang Q, Zhang D, *et al.* Preliminary separation and purification of resveratrol from extract of peanut (*Arachis hypogaea*) sprouts by macroporous adsorption resins[J]. Food Chemistry, 2014, 145: 1–7.

[17] Yang J, Zhang L, Zhu G, *et al.* Separation and enrichment of major quinolizidine type alkaloids from *Sophora alopecuroides* using macroporous resins[J]. Journal of Chromatography B, 2014, 945–946: 17–22.

[18] Zhao Z, Zhang J, Chen X, *et al.* Separation of tungsten and molybdenum using macroporous resin: Equilibrium adsorption for single and binary systems[J]. Hydrometallurgy, 2013, 140: 120–127.

[19] 钱时权, 石亚中, 伍亚华, 等. 纤维素酶-超声波辅助有机溶剂提取山葡萄渣中白藜芦醇的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(3): 210–213.

[20] 李春美, 钟朝辉, 窦宏亮, 等. 大孔树脂分离纯化柚皮黄酮的研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22(3): 153–157.

[21] 孟宪军, 李颖畅, 宣景宏, 等. AB-8大孔树脂对蓝莓花色苷的动态吸附与解吸特性研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(12): 94–96.

[22] 张素华, 王正云. 大孔树脂纯化芦笋黄酮工艺的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 182–186.

(上接第215页)

研究[J]. 中国酿造, 2011(4): 58–61.

[5] 刘守强, 张宏周, 牛金刚, 等. 洛伐他汀高产菌株的筛选[J]. 发酵科技通讯, 2011, 40(4): 33–34.

[6] 李亚莉, 黑利生, 秘鸣, 等. 1株紫色红曲菌(MPT13)产洛伐他汀发酵条件的优化[J]. 食品工业, 2013, 34(8): 70–72.

[7] 李滔滔, 李小龙, 张凤琴. 高产洛伐他汀红曲菌株的诱变选育[J]. 食品工业科技, 2012, 33(24): 246–248.

[8] 蔡晶晶, 李季伦. 土曲霉(*Aspergillus terreus*)产生洛伐他汀(lovastatin)的研究[J]. 微生物学杂志, 2000, 20(4): 1–4.

[9] 李桂杭, 朱碧云, 李浩明. 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[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(2): 183–188.

[10] 吕燕妮, 李平兰, 江志杰. 乳酸菌31-1菌株产细菌素的初

步研究[J]. 中国食品学报, 2003(增刊): 130–133.

[11] 张凤琴, 李小龙, 刘飞, 等. HPLC法检测红曲霉菌HNLI发酵液中洛伐他汀含量[J]. 湖南工业大学学报, 2009, 23(5): 26–28.

[12] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 212–217.

[13] 张克旭, 陈宁, 张蓓, 等. 代谢控制发酵[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2004: 56–57.

[14] 吕燕妮. 戊糖乳杆菌3-菌株产细菌素研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.

[15] 朱雷, 常慧萍, 韦兵, 等. 红曲色素合成机理的初步探讨[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 77–79.

[16] 江利香, 葛锋, 刘畅. 红曲洛伐他汀的高产策略[J]. 中草药, 2011, 42(7): 1446–1452.