

利用高静水压技术提高黏红酵母生物合成 β -胡萝卜素的产量

王岁楼^{1,2}, 韩北忠¹, 孙君社¹, 吴晓宗³

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 中国药科大学食品科学与安全系, 江苏南京 2100092; 3. 郑州轻工业学院食品与生物工程系, 河南郑州 450002)

摘要:利用 100~500 MPa 的高静水压和 10~30 min 的保压时间对黏红酵母 (*Rh. glutinis* RG5) 进行处理, 发现处理 10 min 时的高压存活曲线呈现马鞍形, 说明高静水压处理的最终效应可能是多种生物学效应的累积。在 250 MPa 处理 10 min 所获得的高压突变株 RG5-3, 其生物量虽然比出发菌株 RG5 下降了 9.25%, 但目的产物 β -胡萝卜素的含量却比 RG5 提高了 68.60%。传代实验表明该诱变株遗传稳定性良好, 没有发生性状退化及回复突变。利用限制性片段长度多态性分析 (RFLP) 比较发现, 限制性内切酶 Hind III 和 BamH I 切割的 RG5 和 RG5-3 的 DNA 片段有明显不同, 初步证明高静水压使黏红酵母 RG5 在表面性状和 DNA 水平上都发生了改变。

关键词:高静水压; 黏红酵母; 突变; β -胡萝卜素

中图分类号: TQ920.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2007)05-0038-04

Increasing production of β -carotene from *rhodotorula glutinis* by high hydrostatic pressure

WANG Sui-lou^{1,2}, HAN Bei-zhong¹, SUN Jun-she¹, WU Xiao-zong³

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Department of Food Science and Safety, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

3. Department of Food Science and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: *Rh. glutinis* RG5 high-producing β -carotene was treated by ultra high pressure (UHP) of 100–500 MPa for 10–30 min. The shape of the survival curve was saddle after 10 minutes of treatment, which shows that the result of UHP treatment maybe a cumulation of many biological effects. The biomass of mutant RG5-3 (obtained by 250 MPa for 10 min) was decreased by 9.25% related to the untreated RG5, but its β -carotene content was increased by 68.60% compared to RG5, and its genetic quality was proved to be stable by experiments. The DNA fragments cut by Hind III and BamH I were different, and this result proved that UHP made *Rh. glutinis* RG5 both changed in exterior characters and in nucleic acid level.

Key words: high hydrostatic pressure treatment; *rhodotorula glutinis*; mutation; β -carotene

高静水压 (HHP) 又称超高压 (UHP) 处理, 是一种新的物理技术, 处理压力范围一般为 100~1 000 MPa, 其在生物学领域主要应用于深海生物、生物物化性质、嗜极菌蛋白质研究等方面, 并逐渐形成了一门新的学科——高压生物技术^[1]。在静水高压作用下, 大多数微生物能够产生压力诱导蛋白质 (PIPs)^[2], 或自适应调整细胞膜蛋白的种类和含量^[3], 甚至可以引起微生物遗传物质——核酸的改变, 如高静水压可导致啤酒酵母产生四倍体^[4], 可得酵母和大肠杆菌的 DNA 含量大幅度减少^[5], 这些都证明高静水压能影响 DNA 的复制^[6-7]。国内外学者对高压生物技术不断进行研究^[8-10], 笔者也曾

用 150 MPa 高静水压处理漆酶产生菌灵芝 (*G. lucidum* Karst), 结果发现酶活提高了 283%, 发酵时间也缩短了 1 天^[11]。利用红酵母发酵生产 β -胡萝卜素是一项很有发展前景的生物化工技术^[12], 但目前所研究和报道的菌株发酵产量普遍较低, 为了提高黏红酵母 RG5 生物合成 β -胡萝卜素的产量, 笔者对其进行了高静水压处理研究。

1 实验部分

1.1 主要实验材料

出发菌株为黏红酵母 (*Rh. glutinis* RG5), 系笔者所在实验室保藏菌种。

收稿日期: 2007-02-14

基金项目: 中国药科大学基金项目 (211082); 河南省自然科学基金项目 (2006550002)

作者简介: 王岁楼 (1961-), 男, 博士生, 教授, 主要研究方向为食品工程与生物化工, cpuws1@126.com。

液体种子培养基:葡萄糖 2%,蛋白胨 1%,酵母膏 1%,自然 pH。

摇瓶发酵培养基:葡萄糖 4%,蛋白胨 0.5%,酵母膏 0.5%,pH 6.0。

完全培养基:葡萄糖 2%,蛋白胨 2%,酵母膏 1%,琼脂 2%,pH 6.0。

二苯胺初筛培养基:将二苯胺溶解后,分别以 50~500 mol/L 的不同浓度添加到完全培养基中,制成不同浓度的二苯胺平板。

1.2 实验方法

1.2.1 试样准备

取活化后的菌株两环接至盛有 50 mL 种子培养液的 250 mL 三角瓶中,28℃振荡(150 r/min)预培养 24 h,再分别取 0.5 mL 预培养种子液接种于 40 瓶盛 30 mL 种子培养液的 250 mL 三角瓶中。28℃振荡(150 r/min)培养,比浊法测定菌体浓度,使细胞数达到 $10^6 \sim 10^7$,生长处于对数生长期。将该种子液混合摇匀,取 1 000 mL 在 4 000 r/min 下离心,用无菌生理盐水洗涤,再次离心。将离心过的酵母细胞悬浮于 1 000 mL 浓度为 40 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中(pH 为 7.3),分装到高温灭菌过的聚丙烯袋中。

1.2.2 超高压处理

采用 800-15L 型超高压设备,其最高压力为 800 MPa,最大容积为 15 L,传压方式为外部加压,加压保压卸压均为自动控制。

按预定方案选取压力与保压时间做双因素全面试验,每个条件做 3 个平行,以分装好但未进行高压处理的出发菌株作为对照。将样品分装袋放入装水的聚丙烯袋内,封口后放入超高压处理设备内,进行

高静水压处理,其间恒温(25 ± 2)℃。

1.2.3 突变株筛选

将处理后的样品在完全培养基中培养 24 h 后离心,以无菌生理盐水稀释呈浓度梯度,涂布于二苯胺初筛培养基上,置于 28℃下培养 48 h,挑选生长并变红的菌落。

1.2.4 生物量测定及 β -胡萝卜素的抽提^[12]

1.2.5 β -胡萝卜素的 HPLC 测定

使用 Waters 600 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),其主要测定条件如下:色谱柱为 RP-CDS C₁₈ 分离柱(Hypersil 公司,250 mm × 4.6 mm),柱温 30℃,流动相为乙腈、二氯甲烷、甲醇体积比 80:10:10。 β -胡萝卜素丙酮抽提液 5 mL 在 N₂ 保护下吹干称重后,用甲醇、二氯甲烷体积比 1:1 溶解,定容 5 mL 进行测定。进样流速 0.8 mL/min,进样量 20 μ L,检测波长 450 nm,对照 β -胡萝卜素标准样以峰面积积分法定量。

1.2.6 限制性片段长度多态性分析(RFLP)

分别提取出发菌株 RG5 和 β -胡萝卜素产量最高的高压突变株 RG5-3 的 DNA^[13]。以纯化后 DNA 作为底物进行酶切处理,用 Hind III、Eor I、BamH I、Hae III(华美生物工程公司产品)分别处理,反应严格按照酶切说明书进行,0.01 g/mL 琼脂糖凝胶进行电泳,电压 70 V,电泳时间 1.5 h。溴化乙啶染色,拍照。

2 实验结果与分析

2.1 高静水压处理存活曲线

图 1 是 *Rh. glutinis* RG5 在 100~500 MPa 高静

(上接第 37 页)

参考文献

- [1] Doujes D, Greenick G. Toughening behavior of rubber-modified thermoplastic polymers in poly(vinyl chloride)/methyl-methacrylate-butadiene styrene graft copolymer blends[J]. Polym, 1994, 35: 22-31.
- [2] 王士财. 原位悬浮聚合 PVC/纳米 CaCO₃ 的制备及其性能[J]. 合成树脂及塑料, 2005, 22(3): 26-29.
- [3] 王士财. 改性石油树脂增容 PVC/HDPE 共混体系的研究[J]. 石油化工高等学校学报, 2004, 17(6): 30-33.
- [4] Zarraga A, Pena J J, Munoz M E, et al. Thermorheological analysis of PVC blends[J]. Polymer Science, 2000, 38(3): 469-477.
- [5] 王士财, 李宝霞. 耐老化 ABS/PVC 共混塑料的研制[J]. 合成树脂及塑料, 2004, 21(3): 55-58.
- [6] 王士财, 李宝霞. 改性石油树脂的合成及其增容 PVC/PE 共混物的研究[J]. 塑料工业, 2004, 32(7): 44-47.
- [7] Demjen Z, Pukanszky B, Nagy J. Evaluation of interfacial interaction in polypropylene/surface treated CaCO₃ composites[J]. Composites Part A, 1998, 29(3): 323-329.
- [8] 欧玉春. 刚性粒子填充聚合物的增强增韧与界面相结构[J]. 高分子材料科学与工程, 1998, 14(2): 12-15.
- [9] Emphet P R, Horanont P. Influence of stearic acid treatment of filler particles on the structure and properties of ternary-phase polypropylene composites[J]. Applied Polymer Science, 1999, 74(14): 3445-3454.
- [10] 容敏智, 章明秋, 郑永祥, 等. 纳米 SiO₂ 增韧增强聚丙烯的界面效应与逾渗行为[J]. 复合材料学报, 2002, 19(1): 1-4.
- [11] 王士财, 李宝霞. 聚氯乙烯/氯乙烯-丙烯酸丁酯共聚物/高密度聚乙烯合金的制备及其性能研究[J]. 现代化工, 2004, 24(1): 31-33. ■

水压下分别处理 10、20、30 min 时的存活曲线。从该图可以发现,超高压处理 10 min 时的结果与一般诱变剂的有一些不同,存活曲线呈马鞍形。

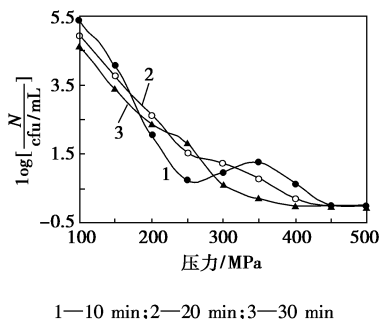


图 1 高静水压处理黏红酵母 RG5 的存活曲线

大量的研究结果证明^[14-16],存活曲线呈马鞍型的低能离子注入诱变对微生物细胞的损伤是非正常损伤,即其诱变效应是多种生物效应如质量沉积、溅射刻蚀、电荷交换等效应的累积。因此超高压诱变是否也为多种生物效应的累积,值得进一步探索。

Y. Elke 等^[17]对细菌在高压均质和高静水压下的失活进行了研究,发现 *E. coli* LMM1010 突变株在高压均质处理过程中存活时间只有 1 s,而在高静水压下存活时间长达 15 min。其原因可能是高压均质的压力作用目标是细胞壁,微生物细胞受到的主要是诸如压力突然变化、剪切、碰撞、空穴、湍流等一些物理效应,而在高静水压下压力分散作用于多个目标,一些生物效应得到充分的积累和释放,只有在一定数量的作用目标失活后,细胞才会死亡。但超高压作用于黏红酵母后究竟产生哪些生物效应还有待研究。

2.2 突变株的筛选及遗传稳定性检验

根据二苯胺培养基上菌落的大小、颜色深浅,挑选出同一处理条件下 2~5 个菌落较大、颜色较红者,进行发酵培养,测定生物量及 β -胡萝卜素产量。不同诱变条件下产量最高的 5 株突变菌的发酵实验结果见表 1,从表中可知 RG5-4 生物量比出发菌株 RG5 提高了 13.13%,RG5-8 生物量也有一定提高但幅度不大。RG5-1、RG5-3、RG5-8、RG5-9 的 β -胡萝卜素含量和产量都比出发菌株有一定的提高,但各菌株提高幅度差别较大,其中 RG5-3 提高幅度最大(β -胡萝卜素含量和产量分别提高了 68.60% 和 53.00%),再次是 RG5-9(β -胡萝卜素含量和产量分别提高了 22.34% 和 18.84%)。

对 RG5-3 和 RG5-9 连续传 5 代,并测定其第 3、第 5 代 β -胡萝卜素产量,结果见表 2。从表 2 可知,

这 2 株突变株的遗传稳定性良好,没有发生性状退化及回复突变。这说明高静水压处理作为一种菌种诱变的新方法是可行的。

表 1 突变株的 β -胡萝卜素产量

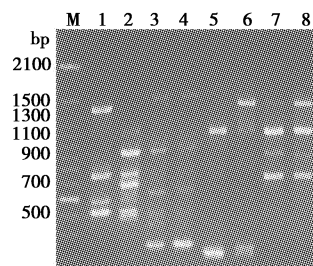
| 菌株 | 处理条件 | | 生物量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 每克细胞中 β -胡萝卜素 含量/g | β -胡萝卜素 产量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|-------|------------|------------|--------------------------------------|--------------------------------|--|
| | 压力/ MPa | 时间/ min | | | |
| RG5 | 0 | 0 | 19.272 | 326.888 | 6.300 |
| RG5-1 | 100 | 30 | 17.886 | 365.700 | 6.541 |
| RG5-3 | 250 | 10 | 17.490 | 551.138 | 9.639 |
| RG5-4 | 150 | 30 | 21.802 | 313.375 | 6.832 |
| RG5-8 | 300 | 10 | 19.382 | 351.325 | 6.809 |
| RG5-9 | 300 | 30 | 18.722 | 399.913 | 7.487 |

表 2 突变株传代后第 3、第 5 代的 β -胡萝卜素产量

| 菌株 | 传代数 | 生物量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 每克细胞中 β -胡萝卜素含量/g | β -胡萝卜素产量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|-------|-----|--------------------------------------|----------------------------|---|
| RG5-3 | 0 | 17.490 | 551.138 | 9.639 |
| RG5-3 | 3 | 17.422 | 550.253 | 9.587 |
| RG5-3 | 5 | 17.431 | 549.832 | 9.584 |
| RG5-9 | 0 | 18.722 | 399.913 | 7.487 |
| RG5-9 | 3 | 18.720 | 398.787 | 7.465 |
| RG5-9 | 5 | 18.712 | 397.955 | 7.447 |

2.3 RFLP 实验结果

为了从核酸水平上证实 *Rh. glutinis* RG5 经超高压处理后发生变异,利用 4 种核酸内切酶对 RG5、RG5-3 的 DNA 进行酶切处理,结果见图 2。从图 2 可以看出,用 Hind III 处理后,突变株的 DNA 片段比对照要多出 3 段;用 BamH I 处理后,突变株 DNA 比对照的明显多出 1 个片段。这说明超高压处理 *Rh. glutinis* RG5,不仅使其菌落颜色、 β -胡萝卜素产量等表面性状发生变化,其 DNA 分子也发生了改变,初步证实了超高压诱导黏红酵母变异的可行性。



1—Hind III 处理 RG5;2—Hind III 处理 RG5-3;3—EoR I 处理 RG5;
4—EoR I 处理 RG3;5—BamHI 处理 RG5;6—BamHI 处理 RG3;
7—Hae III 处理 RG5;8—Hae III 处理 RG3

图 2 凝胶电泳图谱

文献[18-19]认为,高压能抑制微生物的生长发育,破坏其细胞膜、细胞器等显微结构,扰乱生物的新陈代谢,是微生物正常生长条件的一种逆境胁迫,能够使不适应高压环境的微生物停止生长、甚至死亡,但在高压条件下仍有部分微生物能抵抗压力的胁迫,因逐渐适应此环境而存活下来,经过胁迫筛选所存留的微生物,抗压性及其他抗性会明显提高。

3 讨论

以黏红酵母 RG-5 为材料,通过超高压处理,获得了 β -胡萝卜素产量明显提高的耐高压突变株 RG-5-3,提取其 DNA 进行限制性片段长度多态性分析,表明这种变异是由于遗传物质 DNA 的改变所引起的,而且具有很高的遗传稳定性。

在超高压下,微生物细胞的受压环境相当重要,其中压力的影响至为关键。在较低压力条件下,细胞仅仅是被迫激活膜物质合成基因以克服细胞膜结构受到的影响;而较高的压力还诱导一些未知的基因和酶产生,这些诱导物主要消除高压所造成的更为不利的影响,如降解变性蛋白质等。因此在一定程度上,可以认为超高压的生物效应就是微生物细胞对自身在该条件下的修复响应。

其次为温度,在研究超高压对微生物的影响时,必须将其纳入压力-温度体系进行考察研究。压力和温度这两个重要的物理参数,在某些热力学特性上非常相似。因此当对压力影响机制不太了解的情况下,可让压力套用温度模型,再反过来验证修改压力模型。

再次为水环境,微生物细胞必须在水环境中才能均匀地受到压力作用,但水不只是充当介质和保护作用。水分子在压力下可以渗透到天然蛋白质分子内部并改变蛋白质的构象,使其折叠或展开,从而失去原来特有的三级结构,成为一种特殊的中间态。这种构象在压力诱导解链变性的 Arc 阻遏子中已得到了证实^[20]。

由于超高压对微生物的影响非常复杂^[7,21],其诱变机理及各种影响因素有待今后深入研究。

参考文献

- [1] Bartlett D H. Pressure effects on in vivo microbial processes[J]. Biochemical et Biophysical Acta, 2002, 1995: 367 - 381.
- [2] Van Bogelen R A, Neidhardt F C. Ribosome as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli* [J]. Proc Natl Acad Sc USA, 1990, 87: 5589 - 5593.
- [3] Chi E, Bartlett D H. Use of a reporter gene to follow high pressure signal transduction in the deep sea bacterium photo bacterium SS9[J]. Bacteriol, 1993, 175: 7533 - 7540.
- [4] Bartlett D H, Kato C, Horikoshi K. High pressure influences on gene and protein expression[J]. Res Microbiol, 1995, 146: 697 - 706.
- [5] Abe F, Horikoshi K. Tryptophan permeates gene TAT2 confers high-pressure growth in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20: 8098 - 8102.
- [6] 王岁楼, 吴晓宗, 郝莉花, 等. 超高压在工业微生物诱变育种中的应用初探[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(6): 7 - 9.
- [7] 王岁楼, 吴晓宗, 郝莉花, 等. (超)高压对微生物的影响及其诱变效应探讨[J]. 微生物学报, 2005, 45(6): 164 - 167.
- [8] 柯为. 嗜极生物中的嗜高压生物[J]. 生物工程学报, 2002, 18(4): 515.
- [9] 高翔, 李炯, 阮康成, 等. 高压力诱变的耐压大肠杆菌[J]. 生物化学与生物物理学报, 2001, 33(1): 77 - 81.
- [10] 李桂双, 白成科, 段俊, 等. 静水高压处理对水稻植株生理特性的影响[J]. 高压物理学报, 2003, 17(2): 122 - 128.
- [11] 王岁楼, 吴晓宗, 段旭昌, 等. 超高压对漆酶产生菌的诱变效应研究[J]. 工业微生物, 2006, 36(2): 31 - 35.
- [12] 王岁楼. 红酵母类胡萝卜素高产菌株筛选及其发酵生理学条件研究[J]. 工业微生物, 2001, 31(1): 19 - 22.
- [13] Barszczewski W, Robak M. Differentiation of contaminating yeasts in brewery by PCR-based techniques[J]. Food Microbiology, 2004, 21: 227 - 231.
- [14] 袁成凌, 余增亮. 低能重离子生物学研究进展[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2004, 22(1): 1 - 7.
- [15] Wu L, Yu Z L. Radiobiological effects of a low-energy ion beam on wheat[J]. Radiation and Environmental Biophysics, 2001, 40(7): 53 - 57.
- [16] 吕树娟, 王军, 姚建铭, 等. 离子注入氧化葡萄糖酸杆菌的诱变效应[J]. 激光生物学报, 2003, 12(5): 382 - 385.
- [17] Elke Y, Chris W. A study on the effects of high pressure and heat on *Bacillus subtilis* spores at low pH[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 64: 333 - 341.
- [18] Lellis F B, David L W. Structural change in lipid bilayers and biological membrane caused by hydrostatic pressure[J]. Biochemistry, 1986, 25: 7484 - 7488.
- [19] Amparo B, Georgia V, Maria C, et al. Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses[J]. Appl Environ Microb, 1999, 65(4): 1564 - 1569.
- [20] Pascale M, Gaston H B H. Effects of high hydrostatic pressures on living cells: A consequence of the properties of acromolecules and macromolecule-associated water[J]. International Review of Cytology, 2001, 201: 1 - 84.
- [21] Jan P P M, Johan C, Patrick C, et al. Physiological and mathematical aspects in setting criteria for decontamination of foods by physical means [J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 78: 57 - 77. ■