



论著 • Article

金花菌和红曲霉原生质体制备条件优化

陈凯烽 李滔滔 卢家成 龙承麒 刁宇罡 胡治远 余松林

(湖南城市学院 黑茶金花湖南省重点实验室 湖南 益阳 413000)

摘要 为了提高金花菌和红曲霉原生质体产量,本实验以红曲霉和金花菌作为研究试材,研究菌龄、混合酶系统、酶解温度和酶解时间对金花菌和红曲霉原生质体制备的影响。结果表明,选取菌龄为5天的金花菌,加入0.5 mL 0.5%纤维素酶和0.5 mL 0.5%蜗牛酶在30℃条件下酶解2 h时,金花菌原生质体制备产量最佳,得到的原生质体产量为 4.8×10^6 个·mL⁻¹;选取菌龄为4天的红曲霉,加入0.5 mL 0.5%溶菌酶和0.5 mL 0.5%纤维素酶在30℃条件下酶解2.5 h时,红曲霉原生质体制备产量最佳,得到的原生质体产量为 4.3×10^6 个·mL⁻¹。通过设计单因素实验,确定获得高产红曲霉原生质体和高产金花菌原生质体的最适条件,为金花菌与红曲霉原生质体的融合奠定了基础。

关键词 金花菌;红曲霉;原生质体制备;条件优化

文章编号 019-2024-0396

Optimized Protoplast Formation Conditions of *Eurotium Cristatum* and *Monascus*

Chen Kaifeng, Li Taotao, Lu Jia, Jackie Chan, Cheng Qi, Diao Yugang, Hu Zhiyuan, Yu Songlin

(Hunan Provincial Key Lab of Dark Tea and Jin-hua, Hunan City University, Yiyang 413000, China)

Abstract In order to improve the protoplast production of *Eurotium cristatum* and *Monascus*, we did a series of experiments. In this experiment, *Monascus* and *Eurotium cristatum* were used as research materials to study the preparation ability of *Monascus* and *Eurotium cristatum*, such as bacterial age, mixed enzyme system, enzymolysis temperature and enzymolysis time. The results showed that *Eurotium cristatum* (cell age was 5 days) protoplast were prepared with 0.5 mL 0.5% cellulase and 0.5 mL 0.5% snailase at 30℃ for 2 hours, its yield was 4.8×10^6 per mL. *Monascus*(cell age was 4 days) protoplast were prepared with 0.5 mL 0.5% lysozyme and 0.5 mL 0.5% cellulase at 30℃ for 2.5 hours, its yield was

收稿日期: 2024-05-21 录用日期: 2024-08-30

基金项目: 黑茶金花湖南省重点实验室(2016TP1022); 湖南省教育厅项目(22B0785, S202411527026, 23B0748); 益阳市科技局项目(2024RC8220)

通讯作者: 李滔滔; 单位: 湖南城市学院 黑茶金花湖南省重点实验室 湖南 益阳

引用格式: 陈凯烽, 李滔滔, 卢家成. 金花菌和红曲霉原生质体制备条件优化[J]. 现代精准农业快报, 2024, 2(1): 17-23.

$4.4 \times 10^6/\text{mL}$. By designing single-factor experiments, the optimal conditions for obtaining high-yield *Monascus* protoplasts and high-yield *Eurotium cristatum* protoplasts were determined, which laid the foundation for the Protoplast fusion of *Eurotium cristatum* and *Monascus*.

Keywords *Eurotium cristatum*; *Monascus*; Protoplast preparation; Condition optimization

金花菌, 又称“冠突散囊菌”, 由子囊果和菌丝组成。其适应性强, 对于营养的要求较低, 易于在茯砖茶中生长, 赋予了茯砖茶特殊的菌花香。金花菌在茯砖茶中表现为淡黄色闭囊壳, 在茶中的含量与品质是现阶段茯砖茶品质的重要评价指标之一^[1-2]。目前国内对金花菌的研究主要集中在形态结构、生理特性、代谢产物以及发花工艺等方面^[3]。金花菌在茯砖茶中的最适发酵条件分别是温度 25℃、pH 5.5、初始含水量 75%、接种量 105 CFU/g、发酵时间 7 d^[4]。大量研究表明, 金花菌具有降血脂、提高人体免疫力、抑菌、抗癌、抗氧化性等作用。

红曲霉产品是一种良好的着色剂, 用途广泛。主要应用于酿酒和食品生产中, 对于食品有一个良好的保鲜作用。其在医药方面表现出降血脂、降血压、降胆固醇、提高人体免疫力等功效^[5-6]。红曲霉菌主要代谢产物有红曲色素、洛伐他汀类^[7]和桔霉素^[8]。红曲霉菌代谢产物的产量受多种条件的影响^[9], 如培养基(氮源、碳源、pH 值、金属离子等)和培养条件(光照、温度、溶氧等)。

1892 年, Klercker 首次采用机械法用利刃切割发生质壁分离的细胞, 获得了少量原生质体。随后, 1960 年英国诺丁汉大学的植物生理学家 Cocking 教授第一次证实了酶解法获得大量原生质体。1968 年, Table 采用离析酶和果胶酶混合处理组织获得原生质体。自 1994 年胡瑞卿等人对红曲霉原生质体的形成与再生条件进行了探讨, 2003 年至 2009 年之间, 每年都有学者对红曲霉原生质体进行了研究, 主要

研究内容大多集中在通过诱变育种和原生质体融合等方式获得高产洛伐他汀、红曲色素以及低产桔霉素^[10-11]。2011 年, 易凤英等人对冠突散囊菌进行了物理破壁处理获得了冠突散囊菌的原生质体^[12]。

原生质体制备条件优化, 其主要目的是为后续的原生质体融合提供一个良好条件, 提高原生质体的融合率。而原生质体融合技术广泛应用于植物、动物、以及真菌细胞中, 是研究遗传育种的一种重要技术^[13-14]。原生质体融合技术用途广泛, 具有防病治病、基因调控等多种功能。金花菌原生质体与高产洛伐他汀的红曲霉原生质体进行融合, 得到新型高产洛伐他汀菌株, 提高了金花菌菌株的洛伐他汀产量, 将获得的新型金花菌菌株接种到黑毛茶中发酵培养, 可以有效提高茯砖茶降“三高”等功能、减肥、增强自身免疫力等多种功效。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 从红曲米(红曲米由福建省古田县帝源红曲厂生产)中筛选获得、金花菌(湖南城市学院黑茶研究所保存菌种)

1.1.2 主要试剂 溶壁酶(Lysozyme)、纤维素酶(Cellulase)、蜗牛酶(Snailase)等试剂购于生工生物工程上海股份有限公司, pH 为 6.6 的 PB 缓冲溶液, 0.6 mol/L KCl 稳渗溶液, 蔗糖, 蛋白胨、琼脂(Solarbio 公司); 培养基: 固体培养基(蔗糖 5%、蛋白胨 2%、琼脂 2%)、液体培养基(蔗糖 5%、蛋白胨 2%)

1.2 实验方法

1.2.1 金花菌和红曲霉菌丝液体培养条件 取固体培养基上生长旺盛的菌丝，接种到装有 100 mL 液体培养基的培养瓶中，在 30℃、160 r/min 条件下培养 4 d。

1.2.2 红曲霉和金花菌原生质体的制备 取培养 3~4 天的菌丝于 10 mL 灭菌的离心管中，用无菌水冲洗 2 次后再用 0.6 mol·L⁻¹ KCl 稳渗液冲洗 2 次后，吸干水分。称取一定质量菌丝转至 1.5 mL 离心管中，加入 1 mL 的混合酶液，充分摇匀恒温酶解一定时间。酶解结束后，除去残留菌丝。得到的溶液以 5000 r·min⁻¹ 在 4℃ 下离心 10 min 收集原生质体，所得沉淀用 0.6 mol·L⁻¹ KCl 稳渗液冲洗 2 次后，溶于 0.6 mol·L⁻¹ KCl 稳渗液中制成原生质体悬浮液，每个处理重复 3 次。用血球计数板计数。

1.2.3 原生质体制备条件优化 主要优化菌龄、混合酶用量、酶解温度以及酶解时间。在 1.2.3 实验的基础上，分别单独改变菌龄为：3、4、5、6、7 d；酶用量为：混合酶系统：0.5 mL R + 0.5 mL W，0.5 mL R + 0.5 mL S，0.5 mL W + 0.5 mL S，0.5 mL R + 0.25 mL X + 0.25 mL

W，0.35 mL R + 0.35 mL S + 0.35 mL W。（R—0.5% 溶菌酶；W—0.5% 蜗牛酶；S—0.5% 纤维素酶）；酶解温度为：26℃、28℃、30℃、32℃、34℃；酶解时间为：1、1.5、2、2.5、3 h。再按上述方法计算原生质体数量。

2 结果与分析

从图 1 可观察到，金花菌和红曲霉原生质体呈现出多种形态，图中个别原生质体的外层膜有破裂现象，其原因可能是酶解过度、盖玻片压破。图中原生质体表现出多种不同形状，其原因可能是，取同一时期的菌，会存在生长程度不一样的菌。真菌细胞生理活性不一样，酶解作用效果存在差异，导致原生质体表现出多种不同形态。

2.1 单因素试验结果分析

2.1.1 菌龄 由图 2 可知，在相同条件处理下，随着菌丝菌龄的增长，原生质体制备的产量呈现先增加后降低的趋势。金花菌的原生质体制备的最佳菌龄在 5~6 天之间，得到的原生质体产量超过 2.2×10^6 个·mL⁻¹。当菌龄小于 5 天时，金花菌原生质体产量的变化趋势较大；当

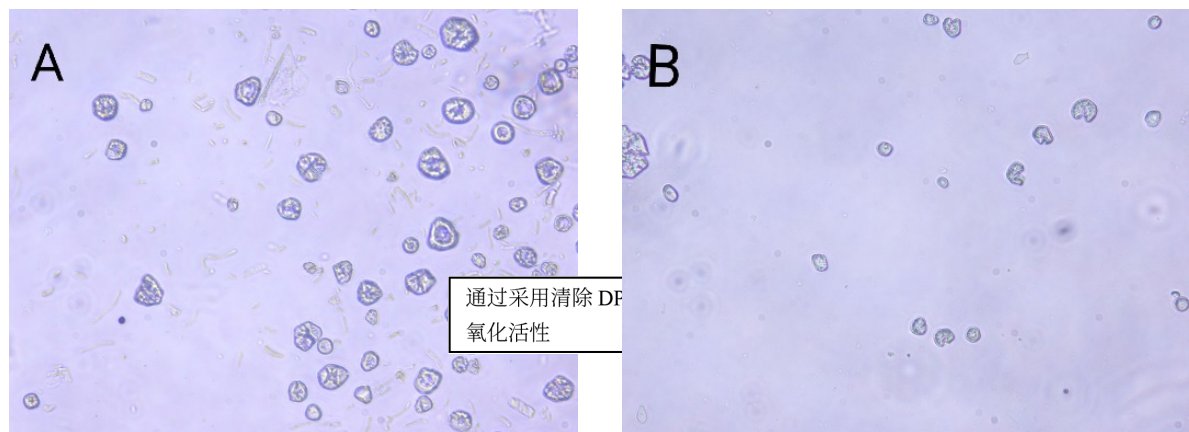


图 1 显微镜下的金花菌、红曲霉原生质体（A 表示金花菌、B 表示红曲霉）

Fig. 1 Microscopic observation of *Eurotium cristatum* and *Monascus purpureus* protoplasts (A: *Eurotium cristatum*; B: *Monascus*)

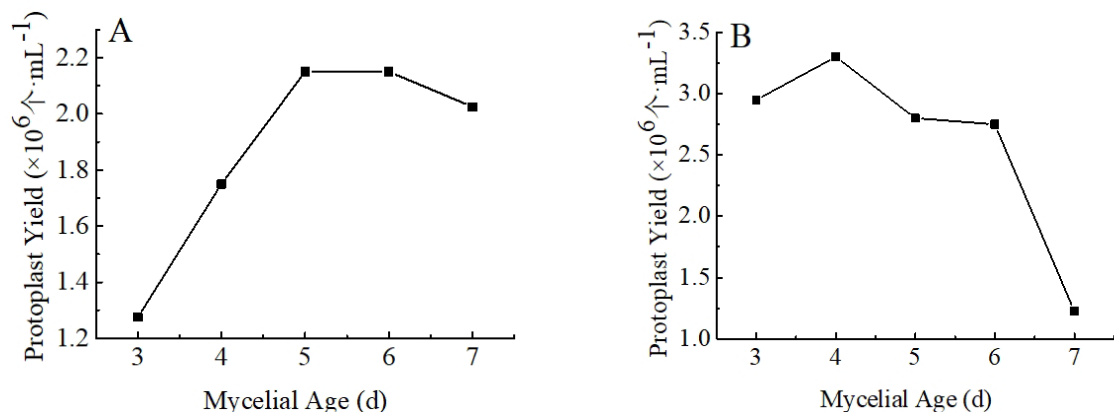


图 2 菌龄对金花菌和红曲霉原生质制备的影响（A 表示金花菌、B 表示红曲霉）
Fig. 2 Effect of Culture Age on Protoplast Preparation in *Eurotium cristatum* and *Monascus* (A: *Eurotium cristatum*; B: *Monascus*)

菌龄大于 5 天时，变化趋势较小。红曲霉原生质制备的最佳条件为 4 天，此条件下得到的原生质体产量为 3.3×10^6 个·mL⁻¹。当菌龄小于 6 天时，菌龄对红曲霉原生质体制备影响较小；当菌龄大于 6 天时，菌龄对红曲霉原生质体制备的影响较大。

2.1.2 混合酶系统

由表 1 可知，相同的处理条件下，金花菌子囊果原生质体产量远高于金花菌菌丝体原生质体产量，当混合酶系统为 0.5 mL 0.5% 溶菌酶和 0.5 mL 0.5% 纤维素酶时，金花菌子

囊果获得的原生质体产量最高，达到 6.8×10^6 个·mL⁻¹；金花菌菌丝体原生质体制备的最佳混合酶系统条件为 0.5 mL 0.5% 纤维素酶和 0.5 mL 0.5% 蜗牛酶时，得到原生质体的产量为 4.7×10^6 个·mL⁻¹；当混合酶系统为 0.5% 溶菌酶和 0.5% 蜗牛酶各 0.5 mL 时，对金花菌菌丝体、子囊果的酶解效果都是最差的；不同酶液对金花菌的酶解效果表现为：纤维素酶>蜗牛酶>溶菌酶，对子囊果的酶解效果为：纤维素酶>溶菌酶>蜗牛酶。

由表 2 可知，当混合酶系统为 0.5% 溶菌

表 1 不同混合酶系统对金花菌原生质制备的影响
Table 1 Effect of different mixed enzyme systems on protoplast preparation in *Eurotium cristatum*

编号	0.5% 融菌酶 / (mL)	0.5% 纤 维 素 酶 / (mL)	0.5% 蜗牛酶 / (mL)	原生质体产量 / ($\times 10^6$ 个·mL ⁻¹)	
				菌丝体	子囊果
1	0.5	0.5	—	2.88	6.83
2	0.5	—	0.5	0.10	0.2
3	—	0.5	0.5	4.73	4.23
4	0.5	0.25	0.25	2.10	2.53
5	0.35	0.35	0.35	2.78	4.05

注：“—”表示未添加该种物质

表 2 不同混合酶系统对红曲霉原生质体制备的影响
Table 2 Effect of different mixed enzyme systems on protoplast preparation in *Monascus*

编号	0.5% 溶菌酶 / (mL)	0.5% 纤维素酶 / (mL)	0.5% 蜗牛酶 / (mL)	原生质体产量 / ($\times 10^6$ 个 $\cdot$ mL $^{-1}$)
1	0.5	0.5	—	4.15
2	0.5	—	0.5	0.25
3	—	0.5	0.5	4.05
4	0.5	0.25	0.25	3.30
5	0.35	0.35	0.35	2.15

注：“—”表示未添加该种物质

酶和 0.5% 纤维素酶各 0.5 mL 时，对红曲霉菌丝体的酶解效果最好，获得的原生质体产量为 4.15×10^6 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ ；当混合酶系统为 0.5% 溶菌酶和 0.5% 蜗牛酶各 0.5 mL 时，获得的原生质体产量最低，为 2.5×10^5 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ ；不同酶对红曲霉菌丝体的酶解效果为：纤维素酶>溶菌酶>蜗牛酶。通过对比表 3.1 和表 3.2 可知，同种酶液对不同菌种作用的效果不同，其原因可能是不同真菌的细胞壁成分有差异。

2.1.3 酶解温度 由图 3 可知，在相同的条件处理下，随着酶解温度的升高，金花菌与红曲

霉原生质体的产量表现为先增加后低的趋势，分析其原因可能是温度过低或者过高都会影响酶的活性。金花菌、红曲霉菌丝体最适的酶解时间都为 30℃，在该温度下获得的原生质体产量分别为 3.3×10^6 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ 、 3.1×10^6 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ ；金花菌子囊果的最适温度是 28℃，在该温度下获得的原生质体产量为 2.6×10^6 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ 。

2.1.4 酶解时间 由图 4 可知，不同酶解时间对金花菌和红曲霉原生质体的制备有很大影响。在相同处理条件下，随着菌龄的增长，其原生质体的产量先增加后降低。酶解时间较短时，

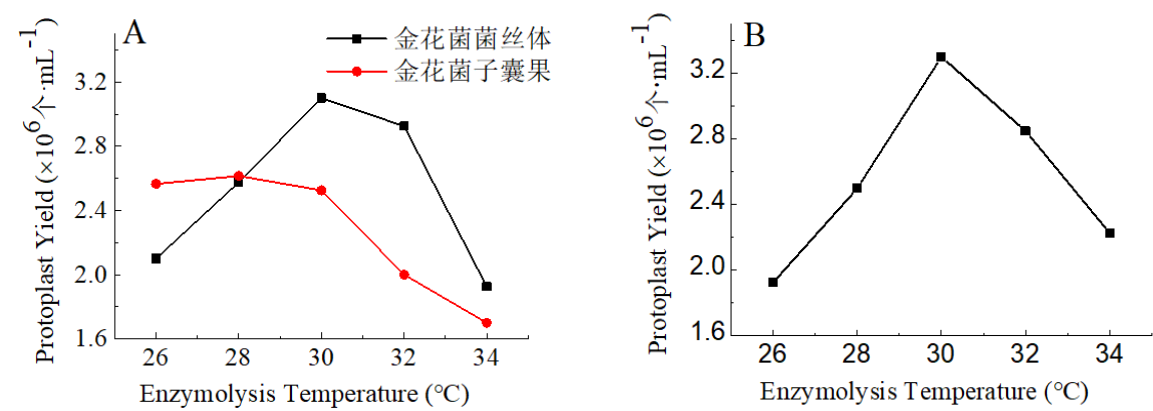


图 3 酶解温度对金花菌和红曲霉原生质体制备的影响（A 表示金花菌、B 表示红曲霉）

Fig. 3 Effect of enzymatic digestion temperature on protoplast preparation in *Eurotium cristatum* and *Monascus purpureus* (A: *Eurotium cristatum*; B: *Monascus*)

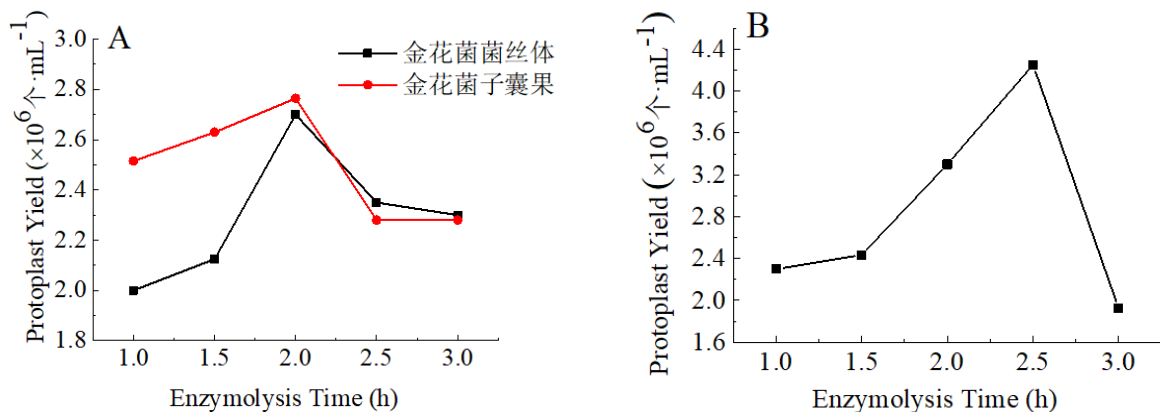


图 4 酶解时间对金花菌和红曲霉原生质体制备的影响 (A 表示金花菌、B 表示红曲霉)

Fig. 4 Effect of enzymatic digestion time on protoplast preparation in *Eurotium cristatum* and *Monascus purpureus* (A: *Eurotium cristatum*; B: *Monascus*)

其酶解不够充分, 随着时间的延长, 酶解获得的原生质体增多; 当酶解到一定程度时, 会导致原生质体过度酶解破裂, 减少原生质体产量。对比金花菌菌丝体和金花菌子囊果。当酶解时间小于 2 h 时, 金花菌子囊果原生质体的产量大于金花菌菌丝体原生质体的产量; 当酶解时间大于 2 h 时, 金花菌子囊果原生质体产量与金花菌菌丝体产量无明显差异; 当酶解时间为 2 h 时, 金花菌菌丝体和金花菌子囊果原生质体的产量均达到最大值, 产量分别为 2.7×10^6 个·mL⁻¹ 和 2.8×10^6 个·mL⁻¹; 当酶解时间为 2.5 h 时红曲霉菌丝体原生质体的产量达到最大值 4.3×10^6 个·mL⁻¹。

3 讨论与结论

菌龄、酶解温度、酶解时间对原生质体制备的影响都呈现出先升高后降低的趋势。菌龄对原生质体的影响是由于细胞活性和代谢产物决定的; 酶解温度对原生质体制备的影响是由于温度影响酶的活性, 从而进一步影响酶解效果; 酶解时间对原生质体的影响是由于酶解时间过长, 会造成酶解过度, 导致原生质体破裂,

从而影响原生质体的产量。实验结果表明: 金花菌原生质体制备的最适条件是选择菌龄为 5 d 的菌丝, 加入 0.5 mL 0.5% 纤维素酶和 0.5 mL 0.5% 蜗牛酶, 30℃下酶解 2 h, 得到的金花菌原生质体产量为 4.8×10^6 个·mL⁻¹。红曲霉原生质体制备的最适条件是选择菌龄为 4 d 的菌丝, 加入 0.5 mL 0.5% 溶菌酶和 0.5 mL 0.5% 纤维素酶, 30℃下酶解 2.5 h, 得到的红曲霉原生质体产量为 4.4×10^6 个·mL⁻¹。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1] 吕嘉桢, 杨柳青, 孟雁南. 茯砖茶中金花菌群的研究进展 [J]. 食品科学, 2020, 41(09): 316-322.
- [2] 王亚丽, 秦俊哲, 黄亚亚, 等. 冠突散囊菌对茯砖茶品质形成的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(04): 194-197.
- [3] 黄彦, 石瑞, 苏二正. 冠突散囊菌的研究与应用进展 [J]. 生物加工过程, 2017, 15(01): 49-56.
- [4] 张六六, 王亚, 吴燕. 冠突散囊菌发酵夏秋茶工艺优化研究 [J]. 安徽农业科学, 2020, 48(09): 174-176+196.
- [5] 杨洋, 陈冬, 达文燕, 等. 红曲、红曲霉和红曲色素

- [J]. 生物学通报, 2017, 52(07): 1-3.
- [6] 侯敏, 周端瑛, 王艳新, 等. 红曲霉的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(11): 3382-3384.
- [7] 李亮. 高产洛伐他汀红曲菌株的选育及发酵条件研究 [D]. 福州: 福州大学, 2016.
- [8] 庄晓晓, 王钰, 李阔阔, 等. 低产桔霉素红曲霉复合诱变育种 [J]. 生物学杂志, 2018, 35(01): 104-106+124.
- [9] 黄娟, 姚若一, 黄邵培, 等. 红曲霉产色素和桔霉素影响因素的研究进展 [J]. 酿酒科技, 2018(02): 109-112.
- [10] 林文. 洛伐他汀高产融合子的筛选及其发酵条件的优化 [D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- [11] 谭文辉. 橙色红曲菌 AS3.4384 产孢及原生质体制备和再生条件的优化 [D]. 南昌: 南昌大学, 2006.
- [12] 易凤英, 刘素纯, 袁潇, 等. 冠突散囊菌子囊孢子破壁方法的研究 [J]. 食品与机械, 2011, 27(03): 137-139.
- [13] 孔维丽, 崔筱, 刘芹, 等. 响应面法优化平菇单核原生质体的制备及再生技术 [J]. 天津农业科学, 2019, 25(12): 5-10+14.
- [14] 王瑶. 原生质体融合在微生物育种的应用与研究进展 [J]. 农村经济与科技, 2016, 27(12): 276.