

## 高产 DHA 破囊壶菌 *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 诱变株的筛选

梁园梅 刘瑛 李晶晶 Maurycy Daroch 成家杨\*

(北京大学环境与能源学院 广东 深圳 518055)

**摘要:**【目的】对野生菌株 *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 诱变育种, 筛选高产 DHA 突变株。

【方法】采用 UV 诱变和化学药物胁迫筛选方式, 以菌株的生物量、油脂产量、DHA 产量作为筛选指标, 获得高产 DHA 突变株。【结果】经鉴定获得一株 DHA 高产突变株 PKU#PM003, 该菌株传代 4 次后仍保持较好的遗传稳定性。摇瓶发酵后, PKU#PM003 生物量产量高达 6.62 g/L, 比原始菌株 5.95 g/L 提高了 11.26%, 脂肪酸含量高达 4.01 g/L, 比原始菌株 3.18 g/L 提高了 26.1%, DHA 在脂肪酸中所占比例由 29.97% 增加到 33.43%, 产量提高了 41.01%, 油脂突变效果显著。

【结论】突变株 PKU#PM003 可作为性状优良的工业化发酵生产菌种, 并在 DHA 产量提升上仍具有巨大的空间。

**关键词:** 破囊壶菌, DHA, 紫外诱变, 化学药物

## Screening of high docosahexanoic acid yield mutants of *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7

LIANG Yuan-Mei LIU Ying LI Jing-Jing Maurycy Daroch Jay J. CHENG\*

(School of Environment and Energy, Peking University, Shenzhen, Guangdong 518055, China)

**Abstract:** [Objective] Mutants of *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 were screened for high docosahexanoic acid (DHA) yield. [Methods] UV mutagenesis and chemical stress screening were used to mutate *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7, with biomass production, lipid content and DHA yield as screening criteria to obtain mutant strains. [Results] Mutant PKU#PM003 presented stable high DHA yield in 4 generations. In lab fermentation the biomass of this strain reached 6.62 g/L, improved by 11.26% compared to that of the original wild strain; the lipid content of the mutant reached 4.01 g/L, improved by 26.1% compared to the original. The DHA content in total fatty acids also increased from 29.97% to 33.43% and the DHA yield of PKU#PM003 increased by 41.1%. [Conclusion] The mutant

**Foundation item:** State Oceanic Administration Special Research Fund (No. 201305022); Chinese Post-Doctoral Science Foundation (No. 2014M560855); Shenzhen Municipal Fund for Key Project in New Technology (No. JC201104210118A)

\*Corresponding author: Tel: 86-755-26611617; Fax: 86-755-26035332; E-mail: chengjy@pkusz.edu.cn

**Received:** March 23, 2015; **Accepted:** May 19, 2015; **Published online** (www.cnki.net): June 03, 2015

**基金项目:** 海洋公益性行业科研专项经费项目(No. 201305022); 中国博士后科学基金(No. 2014M560855); 深圳市新兴产业重点项目(No. JC201104210118A)

\*通讯作者: Tel: 86-755-26611617; Fax: 86-755-26035332; E-mail: chengjy@pkusz.edu.cn

**收稿日期:** 2015-03-23; **接受日期:** 2015-05-19; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-06-03

strain PKU# PM003 could be used as a potential strain for industrial fermentation.

**Keywords:** *Aurantiochytrium*, DHA, UV mutagenesis, Chemicals

破囊壶菌(*Thraustochytrids*)是一类异养的专性海生真菌类原生生物,近年来由于其富含多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acids, PUFAs),尤其是二十二碳六烯酸(Docosahexanoic acid, DHA)而备受关注。破囊壶菌具有很高的油脂含量,能够达到干重的50%以上,其中对人体有益的长链多聚不饱和脂肪酸(Long-chain polyunsaturated fatty acid, LC-PUFA)如DHA含量可高达总脂肪酸含量的50%以上<sup>[1-2]</sup>。多不饱和脂肪酸是保持人体健康不可缺少的营养成分之一,尤其是二十碳五烯酸(Eicosapentaenoic acid, EPA)和DHA具有非常重要的医药应用和营养价值。作为细胞膜磷脂的重要组成部分,DHA对细胞膜功能的维持具有重要作用。有研究表明,DHA可以促进大脑细胞发育、预防心血管疾病、改善视网膜功能等<sup>[3]</sup>。目前,在食品工业中,DHA已经添加至牛奶或奶粉中,用作功能性营养强化剂。富含DHA的鱼油也被开发为一种药物,用于降血脂等。20世纪80年代,DHA的唯一来源是鱼油,但鱼油的腥味、重金属污染等问题,促使人们探索生产DHA的其他途径。与鱼油相比,破囊壶菌具有DHA含量高、脂肪酸成分简单、可异养培养等优点,是极具潜力进行工业化生产DHA的微生物。为了提高破囊壶菌DHA产量,许多学者在菌种的分离筛选、营养需求以及培养方式上做了优化研究,收获了一些DHA产量比较高的菌种<sup>[4-6]</sup>。但由于菌株生长速度慢及生物量低等原因,整体上限制了DHA的产量。

诱变和筛选是微生物选育过程中比较重要的手段,可以快速使菌株朝着人类所需要的方向突变。UV诱变是一种操作简单、生物学效应强且成本较低的遗传育种方法。周玉娇等<sup>[7]</sup>用紫外诱变法获得了2个小球藻株系M37和M67。与野生株系对比,突变株油脂含量分别提高了24.58%和17.88%,油脂提升效果显著。目前在国内外研究中,

对裂殖壶菌属(*Schizochytrium*)菌株UV诱变育种研究相关报道比较多,而对*Aurantiochytrium*属菌株UV诱变育种则鲜有报道。化学药物胁迫筛选是使野生株定向突变的一种很好的办法。目前在国内外对于破囊壶菌进行化学药物胁迫筛选的研究鲜见报道,本研究采用两种化学药物喹禾灵和丙二酸对破囊壶菌进行胁迫。喹禾灵(Quizalofop-ethyl)是一种芳氧苯氧基丙酸酯类除草剂,主要作用于乙酰CoA羧化酶,抑制脂肪酸合成第一步<sup>[8]</sup>。丙二酸能够抑制琥珀酸脱氢酶活性,从而使细胞线粒体中的柠檬酸大量积累,在柠檬酸裂解酶的作用下生成乙酰CoA和草酰乙酸,为脂肪酸的合成提供更多的前体。在培养基中添加喹禾灵和丙二酸有利于胁迫破囊壶菌向高产DHA方向突变。

本文主要采用紫外线诱变与化学药物(喹禾灵、丙二酸)胁迫相结合的方法对野生菌株*Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7进行诱变筛选,经过传代稳定性实验后获得遗传性状稳定的高产DHA突变株,为投入到工业化发酵生产提供改良优良菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 菌株:**采用破囊壶菌菌株*Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7作为出发菌株,由北京大学环境与能源学院分离于深圳大鹏湾沿岸海水(22°31'32.632"N, 114°28'40.185"E),保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC 8575。

**1.1.2 培养基:**液体M4培养基(g/L)<sup>[9]</sup>:无水葡萄糖20,酵母浸出粉1,蛋白胨1.5,磷酸二氢钾0.25,过滤海水定容到1L。固体MV平板培养基(g/L)<sup>[9]</sup>:无水葡萄糖20,酵母浸出粉1,蛋白胨1.5,琼脂12,过滤海水定容到1L,1×10<sup>5</sup> Pa灭菌30 min。

**1.1.3 主要试剂:**脂肪酸甲酯标准品(纯度≥99%)为

美国 Sigma 公司产品; 喹禾灵, 丙二酸(分析纯), 为阿拉丁生物试剂。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 紫外线诱变:** 暗室中, 将多功能台式暗箱紫外操作仪开机, 大致预热 15 min 以稳定光波。将光密度  $OD_{660}$  约为 3–4 的菌液稀释 10 倍后, 吸取 3 mL 稀释液均匀平铺在直径为 7 cm 的培养皿上, 将培养皿放置于紫外操作仪中, 用 254 nm 紫外光(紫外暗箱功率 30 W, 灯管与培养皿距离 15 cm)分别处理 0、15、30、45、60、75 s, 将 0 s 设置为对照组。将处理后的菌液再稀释 100 倍, 取 100  $\mu$ L 涂布在新鲜的 MV 平板上, 每个时间梯度设立 3 个平行样, 用锡箔纸包住, 28  $^{\circ}$ C 避光培养 36 h 左右, 统计培养皿中剩余菌落数, 绘制致死率曲线。致死率计算公式如下:

致死率(%)=(未经紫外诱变组菌落数–紫外诱变组菌落数)/未经紫外诱变组菌落数 $\times$ 100。

**1.2.2 喹禾灵、丙二酸胁迫筛选:** MV 培养基中喹禾灵终浓度为 0、20、40、60、80、100  $\mu$ mol/L, 每个浓度设置 3 个平行样, 将 0  $\mu$ mol/L 设置为对照组。同理, MV 培养基中丙二酸终浓度分别设定为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 g/L, 每个浓度设置 3 个平行样, 将 0 g/L 设置为对照组。将  $OD_{660}$  约为 3–4 的菌液稀释 1 000 倍, 每个平板均匀涂布 100  $\mu$ L, 待菌液吸干后, 28  $^{\circ}$ C 倒置培养 36 h, 统计平板中剩余菌落数, 绘制致死率曲线。致死率计算公式如下:

致死率(%)=(无喹禾灵/丙二酸平板的菌落数–有喹禾灵/丙二酸平板的菌落数)/无喹禾灵/丙二酸平板的菌落数 $\times$ 100。

**1.2.3 诱变和胁迫筛选:** 根据紫外诱变和化学诱变致死率的分析结果, 结合紫外诱变和化学诱变的方法, 选取: (1) UV 诱变 45 s 和 100  $\mu$ mol/L 喹禾灵; (2) UV 诱变 45 s 和 1.4 g/L 丙二酸; (3) UV 诱变 45 s 和 80  $\mu$ mol/L 喹禾灵、1.2 g/L 丙二酸的组合进行诱变筛选。将稀释 10 倍菌液经 UV 诱变 45 s 后

再稀释 100 倍, 取 100  $\mu$ L 分别涂布在空白 MV 固体培养基、100  $\mu$ mol/L 喹禾灵 MV 固体培养基、1.4 g/L 丙二酸 MV 固体培养基、80  $\mu$ mol/L 喹禾灵和 1.2 g/L 丙二酸 MV 固体培养基上, 每个诱变组设置 3 个平行, 锡箔纸包裹避光培养 36 h, 挑选平板上生长速度快的菌株, 培养收集生物量。

**1.2.4 生长量测定:** 接种液以 5% (体积比)的比例接种至 100 mL 新鲜的 M4 培养基(250 mL 锥形瓶), 28  $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 4 d, 菌株达到稳定期, 收集培养液, 4 000 r/min 离心 10 min, 倒掉上清液,  $-80^{\circ}$ C 冷冻 3 h, 置于冷冻干燥机中干燥 24 h 后, 称量离心管重量, 减去已称好的空离心管重量, 即为培养液中的生物量。

**1.2.5 脂肪酸甲酯的气相色谱分析:** 采用小型 Bligh-Dyer 法<sup>[10]</sup>提取破囊壶菌细胞内的油脂。经氯仿甲醇溶液萃取油脂, 以硫酸甲醇溶液进行甲酯化反应后, 以 1 mL 正己烷(色谱纯, Sigma, 美国)溶解脂肪酸甲酯, 过膜转移至 1.5 mL 的 GC 样品瓶中, 采用气相色谱分析仪(Agilent 7890A, 美国)检测脂肪酸。色谱柱型号: HP-INNOWAX (60 m $\times$ 320  $\mu$ m $\times$ 0.25  $\mu$ m); 升温程序: 160  $^{\circ}$ C 持续 6 min 后, 以 20  $^{\circ}$ C/min 的速度升温至 200  $^{\circ}$ C, 然后以 5  $^{\circ}$ C/min 的速度升温至 235  $^{\circ}$ C, 保持 20 min, 最后以 0.5  $^{\circ}$ C/min 的速度升温至 240  $^{\circ}$ C。进样口温度为 250  $^{\circ}$ C。检测器为 FID, 温度为 320  $^{\circ}$ C。载气为氦气。

**1.2.6 诱变优良突变株稳定性试验:** 挑取经筛选的高产 DHA 突变菌株进行传代培养, 连续传 4 代, 对每一代进行摇瓶发酵培养, 采用小型 Bligh-Dyer 法和气相色谱分析法对每一代菌株的 DHA 含量进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫外诱变最佳曝光时间的确定

以破囊壶菌在紫外灯下曝光时间为变量, 测定致死率。结果如图 1 所示。从图 1 可以看出致死率和曝光时间之间有明显的剂量效应关系。以 256 nm 紫外波长, 15 cm 照射距离处理菌液, 随着照射时

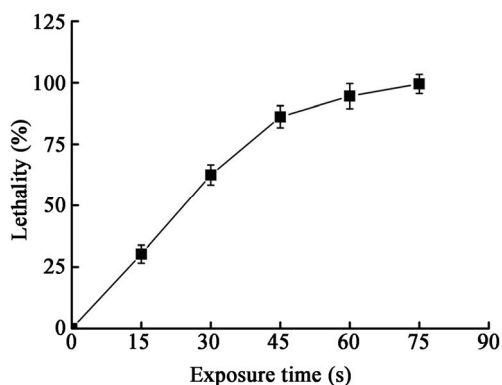


图1 UV对 *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 致死率  
Figure 1 The lethality of *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 treated by UV

间越长,致死率越高,在75 s时将近达到100%致死率。考虑到筛选平板的抑制剂对菌株也有一定的致死率,而且在2012年许永等<sup>[11]</sup>对裂殖壶菌诱变筛选研究中表明,致死率较高的剂量会使得存活的突变株中的负突变率上升,相对致死率较低的剂量会得到较高的正突变率,但其突变幅度会比较小,所以本文实验所采用的UV诱变时间为45 s,此时的致死率为87.6%。

## 2.2 最佳喹禾灵、丙二酸诱变浓度的确定

本文分别以破囊壶菌生长平板中喹禾灵浓度和丙二酸浓度为变量,测定致死率,结果如图2和图3所示。随着药物浓度的增加, *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 的致死率也随之升高,存在明显的剂量效应关系。菌体的死亡率随着喹禾灵浓度的提高而不断升高,基本呈线性关系;喹禾灵对 *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 的致死率与2012年Pora等<sup>[12]</sup>研究发现的喹禾灵对 *Schizochytrium* sp. 的致死率基本相符,说明菌株 *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 对喹禾灵也是有显著敏感性,不存在抗性。由于喹禾灵不溶于水,本研究采用二甲基亚砜(DMSO)作为溶解喹禾灵的溶剂。当喹禾灵在培养基里浓度超过120  $\mu\text{mol/L}$  时,DMSO在培养基里的浓度也较高(喹禾灵母液浓度是50 mmol/L,此时DMSO添加量是2.4 mL/L)。在Cohen等的研究中

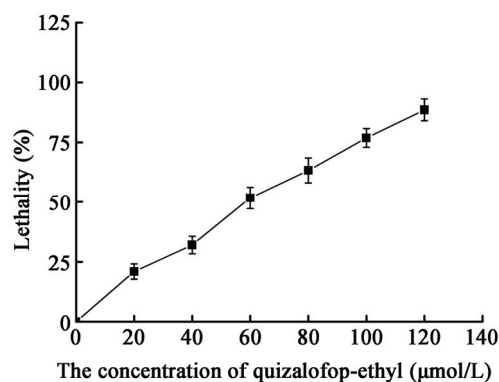


图2 喹禾灵对 *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 致死率  
Figure 2 The lethality of *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 treated by quizalofop-ethyl

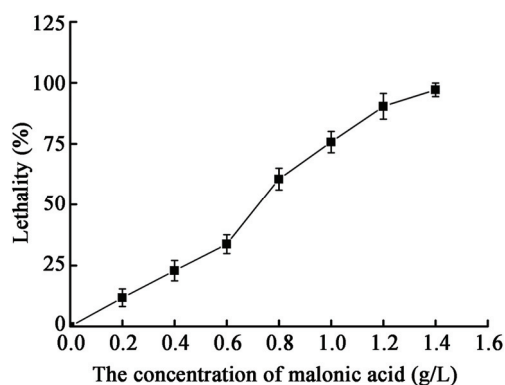


图3 丙二酸对 *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 致死率  
Figure 3 The lethality of *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 treated by malonic acid

表明,DMSO在培养基中的过高浓度会对微生物产生毒害,对实验结果存在显著影响<sup>[13]</sup>。在预实验中我们发现当DMSO培养基中添加量不高于2 mL/L时,对 *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 的致死率都低于5%。而DMSO培养基中添加量是2.4 mL/L时,造成致死率是11.3%,使实验数据存在较大的偏差。所以为了实验数据的准确性,本实验所采用的筛选培养基中喹禾灵的浓度为100  $\mu\text{mol/L}$ 。

菌体的死亡率随着丙二酸浓度的提高而不断升高,在0.6 g/L到0.8 g/L变化比较大,到达1.2 g/L和1.4 g/L左右时, *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 的致死率达到90%以上。本文筛选培养基中选用的丙二酸浓度为1.4 g/L。

在通过复合化学药物对破囊壶菌进行筛选时, 过高药物剂量产生的综合致死率会比较高, 且会使存活的突变株中正突变率下降; 而致死率较低的剂量会有较高的正突变率, 但此时突变幅度也相对较低, 因此折中喹禾灵和丙二酸剂量会获得较高正突变率和较大正突变幅度, 有利于菌株突变筛选。所以复合化学药物筛选中喹禾灵浓度 80  $\mu\text{mol/L}$ , 丙二酸浓度 1.2 g/L。

2.3 诱变选育

经过紫外照射和药物诱变后, 筛选到的破囊壶菌菌株的生长速度和脂质积累量呈现了一定的差异, 其中存在有一部分的负相变异, 且变异的方向都不相一致。以生物量、油脂含量、DHA 含量为筛选指标, 按照上述药物处理方法分别对破囊壶菌进行诱变, 筛选到的正相突变菌株有: P003、P004、M001、M006、PM002 和 PM003, 这 6 株突变株在第 4 天达到的细胞生物量、油脂含量和 DHA 含量如表 1 所示, 出发菌株 SW7 和 6 株突变株生物量都存在有显著差异。其中细胞生物量最高的是突变株 PM003, 达到 6.62 g/L, 相对于出发菌株 SW7 (5.95 g/L), 增幅为 11.26%; 最低的是 M006 和 PM002, 细胞生物量分别是 6.22 g/L 和 6.24 g/L, 增

幅量不大。由表 2 可知, 出发菌株 *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 的油脂成分相对比较简单, C22:6 (DHA)占油脂含量比例是 29.97%。经 Bligh-Dyer 法提取油脂和转酯化 GC 分析后, 表 1 中突变株 PM003 获得最高的油脂含量, 达到 4.01 g/L, 占细胞生物量的比例是 60.44%, 相比于出发菌株 SW7 提高了 12.91%, 差异显著。其中 DHA 含量是 1.34 g/L, 占油脂含量的比例是 33.43%, 相比于出发菌株 SW7 的 DHA 含量提高了 41.05%。从表 1 可以看出, M006 和 PM002 正向突变效果是不明显的, 除生物量外其他指标均与出发菌株不存在显著差异, 可以除去。突变株 P004 在生物量上有明显上升, 与出发菌株存在一定差异, 但是油脂所占比例却下降, 不适用于工业化生产。其它两株 P003 和 M001, 相比于出发菌株 SW7, 在生物量和油脂含量上都有显著变化, 但是 DHA 占油脂比例上升效果不如 PM003 显著。因此通过对 *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 进行诱变选育后, PM003 突变效果最为理想。

选取在喹禾灵和丙二酸共同胁迫作用下筛选的 PM003 作为诱变优良菌株, 经过 4 次传代后, 其 DHA 生产能力表现出极其稳定的特性, 维持了

表 1 野生株和突变株几个参数数据  
Table 1 Basic parameters of wild and mutant strains

菌株 Strain	生物量 Biomass (g/L)	油脂比例 Lipid proportion (%)	油脂 Lipid (g/L)	DHA 比例 DHA proportion (%)	DHA (g/L)
SW7	5.95±0.25*	53.53±1.33	3.18±0.22	29.97±0.88	0.95±0.13
P003	6.48±0.18	58.12±1.96	3.76±0.25*	29.84±1.86	1.12±0.18
P004	6.32±0.21	52.34±2.01	3.31±0.24	28.61±1.23	0.94±0.17
M001	6.53±0.16	57.11±2.33	3.73±0.24*	30.87±0.92	1.15±0.15
M006	6.22±0.12	51.62±3.23	3.21±0.28	30.22±0.64	0.97±0.14
PM002	6.24±0.09	58.88±1.58	3.57±0.15	31.05±1.01	1.14±0.08
PM003	6.62±0.11	60.44±1.89	4.01±0.18**	33.43±0.75**	1.34±0.10

注: 采用 Duncan's multiple range test 方法分析, \*: 该值与其他数值的显著性差异( $P<0.05$ ,  $n=3$ ); \*\*: 该值与其他数值的显著性差异( $P<0.01$ ,  $n=3$ ).

Note: Analyzed with Duncan's multiple range test, \*: The data is significantly different from others ( $P<0.05$ ,  $n=3$ ); \*\*: The data is significantly different from others ( $P<0.01$ ,  $n=3$ ).

表 2 破囊壶菌 PKU#SW7 和 PKU#PM003 主要脂肪酸组成  
Table 2 The fatty acid composition of *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 and PKU#PM003

脂肪酸 Fatty acid	总脂肪酸组成比例 Fatty acid proportion (%)	
	<i>Aurantiochytrium</i> sp. PKU#SW7	<i>Aurantiochytrium</i> sp. PKU#PM003
C12:0	0	0
C14:0	4.524±0.060	4.126±0.030
C15:0	2.113±0.080	2.362±0.050
C16:0 (棕榈酸, Hexadecanoic acid)	51.234±2.320	48.413±1.560
C17:0	0.611±0.020	0.459±0.090
C18:0	1.187±0.030	1.237±0.250
C18:1	0	0
C20:0	0.110±0.010	0.479±0.180
C22:6 (DHA)	29.973±1.020	33.430±0.750

单位遗传的稳定(图 4)。可以选取菌株 PM003 开展进一步的后续研究。

### 3 讨论

紫外线是一种非电离辐射,对原核生物而言是一种比较好的诱变因素,紫外诱变最适波长为 254 nm (此为核酸的吸收高峰)。紫外辐射可以引起碱基转换、颠换、移码突变或缺失,导致生物发生基因突变。由于紫外照射诱变操作简单、经济实惠、诱变频率高、不回复突变且出现正突变的几率较

高,紫外辐射已经成为了微生物育种中最常用和有效的诱变剂之一,广泛用于对酵母<sup>[14]</sup>、真菌<sup>[15]</sup>、纤维素分解菌<sup>[16]</sup>、裂殖壶菌<sup>[17]</sup>等微生物的诱变选育。本文采取紫外线对破囊壶菌进行诱变,效果是非常显著的。

脂肪酸合成是在多种酶的共同作用下碳链延伸和耗能的过程。乙酰 CoA 羧化酶(ACCCase)是生物体脂肪酸合成的关键酶,在细胞质中持续产生乙酰 CoA 羧化酶是油脂积累的前提条件之一,它催化乙酰 CoA 生成丙二酰 CoA,开启 DHA 合成途径(此反应制约着脂肪酸合成第一阶段的速度)。喹禾灵(Quizalofop-ethyl)是乙酰 CoA 羧化酶的有效抑制剂,可以阻碍生物体内脂肪酸的合成,进而影响生物体正常的生长、发育和代谢的作用,因此被广泛用于双子叶农作物和一些谷物农田中杂草的控制。近年来随着进一步的研究,在微藻选育领域,喹禾灵也已用于硅藻和微拟球藻诱变育种<sup>[18-19]</sup>的研究。喹禾灵对硅藻作用主要是促进了 EPA 增加,而对微拟球藻主要促进总脂含量,但对生物量无明显变化。本研究选用在紫外线诱变下,用喹禾灵单独胁迫筛选突变株破囊壶菌,突变株 P003 生物量提升到 6.48 g/L,油脂含量提升到 3.76 g/L,对于 DHA 产量的提升也是非常可喜的,但从 DHA 占油脂比

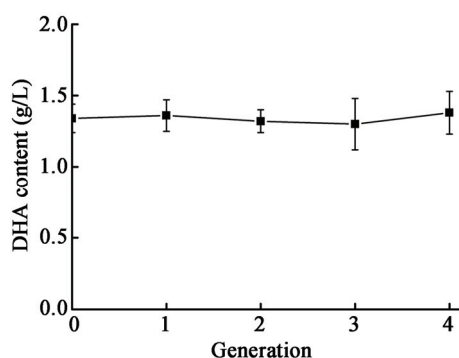


图 4 *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 的传代代数

Figure 4 Generation of *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7

注: 采用 Duncan's multiple range test 方法分析, 5 组数据不存在显著差异。

Note: Analysis with Duncan's multiple range test indicates that five sets of data do not have significant differences.



例可以看出喹禾灵筛选破囊壶菌高产 DHA 还是有很大提升空间, 后续可在喹禾灵胁迫浓度优化上进行深层次研究。

丙二酸能够抑制琥珀酸脱氢酶活性, 从而使细胞线粒体中的柠檬酸大量积累, 在柠檬酸裂解酶的作用下生成乙酰 CoA 和草酰乙酸, 为脂肪酸的合成提供更多的前体。本研究中采用紫外诱变后, 用丙二酸单独胁迫筛选破囊壶菌, 突变株经摇瓶发酵后, 生物量、油脂量、DHA 占油脂比例分别为 6.53 g/L、3.73 g/L、30.87%, 相比于出发菌株都有显著提升。2013 年王申强<sup>[17]</sup>分别利用常压室温等离子体(ARTP)诱变、紫外(UV)诱变和 ARTP-UV 复合诱变来诱变 *Schizochytrium limacinum* SR21, 以碘乙酸、丙二酸、15 °C 的低温作为筛选因子, 并以菌株的油脂产量和 DHA 产量作为筛选指标, 获得一株高产菌株 AU-1。经 5 L 发酵罐发酵后, 生物量、油脂产量和 DHA 产量分别为 50.71、35.65 和 15.43 g/L。推测利用丙二酸筛选高产 DHA 的破囊壶菌的研究仍有很大进步空间, 下一步可以在改变诱变方式、结合低温筛选、丙二酸筛选浓度上进行深入研究。

Taoka 等<sup>[20]</sup>、Song 等<sup>[21]</sup>对破囊壶菌的研究表明, 除了 C16:0 (棕榈酸)、C22:6 (DHA)外, 破囊壶菌细胞内还有较高含量的 C22:3 和 C22:5 等物质, 脂质成分较为复杂。而表 2 中破囊壶菌 *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 脂肪酸主要包括 C16:0 和 C22:6, 分别占总脂含量的 51.23%和 29.97%, 相对而言脂肪酸组分简单, 有利于 DHA 的提取纯化; 突变株 PKU#PM003 脂肪酸成分分析显示了 C22:6 占总脂含量 33.43%, 存在显著提高, 而对于其他成分合成影响不大; 目前国内外同时采取物理和化学诱变对破囊壶菌(*Aurantiochytrium*)进行诱变选育的方法鲜见报道。2012 年许永<sup>[22]</sup>利用紫外线诱变和喹禾灵筛选方法对裂殖壶菌(*Schizochytrium limacinum*)进行诱变选育, 裂殖壶菌突变菌株 OUC007 生物量(7.04 g/L)和 DHA 含量

(17.33%), 比对照菌株分别提高 11.57%和 28.75%。吴克刚等<sup>[23]</sup>利用添加植物激素对 *T. roseum* MF2 进行培育诱变, 发现植物激素主要是显著促进 *T. roseum* MF2 的生长, 从而获得更高的 DHA 量, 但在脂质含量和 DHA 在脂质占比率上都不存在明显变化。本实验所采用的紫外线和药物双重诱变胁迫破囊壶菌 *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7, 在生物量、脂质含量和 DHA 在脂质占比率上都有显著性提高, 特别是 DHA 在脂质占比率提高了 11.54%, 整体 DHA 含量提高了 41.01%。相对许永和吴克刚的研究, 突变株 PKU#PM003 都存在显著优越性。经过 4 次传代后, UV 和药物结合诱变选育对 *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 遗传单位形成的突变可以稳定遗传, 突变株 PKU#PM003 DHA 生产能力仍旧维持稳定。因此突变株 PKU#PM003 有望成为下一步工业化 DHA 发酵生产的优良菌种。今后, 可在培养基优化(如利用廉价碳源)、优化培养条件等方面进一步提高突变株生物量, 降低突变株 PKU#PM003 发酵生产 DHA 生产成本, 以获得更多的商业价值。

## 参 考 文 献

- [1] Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation[J]. *Annals of Internal Medicine*, 1999, 130(6): 461-470
- [2] Michielsen HJ, de Vries J, van Heck GL, et al. Examination of the dimensionality of fatigue: the construction of the Fatigue Assessment Scale (FAS)[J]. *European Journal of Psychological Assessment*, 2004, 20(1): 39-48
- [3] Fukuda Y, Hayakawa T, Ichihara E, et al. Evidence for oscillation of atmospheric neutrinos[J]. *Physical Review Letters*, 1998, 81(8): 1562-1567
- [4] Cirpus P, Bauer J, Heinz E, et al. Method for producing polyunsaturated fatty acids in transgenic organisms: U. S. Patent, US20080076166A1[P]. 2005-12-21. <http://www.google.com/patents/US20080076166>
- [5] Singh A, Ward OP. Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum* ATCC 28210[J]. *Journal of Industrial Microbiology*, 1996, 16(6): 370-373
- [6] Burja AM, Radianingtyas H, Windust A, et al. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(6): 1161-1169
- [7] Zhou YJ, Li YJ, Fei XW, et al. UV-irradiation of *Chlorella vulgaris* and screening of petroliiferous strains[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2011, 31(12): 2124-2129 (in Chinese) 周玉娇, 李亚军, 费小雯, 等. 小球藻紫外线诱变及高含油

- 藻株筛选[J]. 热带作物学报, 2011, 31(12): 2124-2129
- [8] Gronwald JW. Lipid biosynthesis inhibitors[J]. Weed Science, 1991, 39(3): 435-449
- [9] Damare S, Raghukumar C, Raghukumar S. Fungi in deep-sea sediments of the Central Indian Basin[J]. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 2006, 53(1): 14-27
- [10] Armenta RE, Vinatoru M, Burja AM, et al. Transesterification of fish oil to produce fatty acid ethyl esters using ultrasonic energy[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2007, 84(11): 1045-1052
- [11] Xu Y, Zang XN, Xu T, et al. Mutation of *Schizochytrium limacinum* and screening of elite mutants[J]. Periodical of Ocean University of China, 2012, 42(12): 54-58 (in Chinese)  
许永, 臧晓南, 徐涤, 等. 裂殖壶菌诱变筛选的研究[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2012, 42(12): 54-58
- [12] Pora B, Zhou J, Defretin S, et al. Novel strain of microalga that produces squalene: U. S. Patent, US20140113015A1[P]. 2012-5-18. <http://www.google.com/patents/US20140113015>
- [13] Cohen Z, Norman HA, Heimer YM. Potential use of substituted pyridazinones for selecting polyunsaturated fatty acid overproducing cell lines of algae[J]. Phytochemistry, 1993, 32(2): 259-264
- [14] Pujari V, Chandra TS. Statistical optimization of medium components for enhanced riboflavin production by a UV-mutant of *Eremothecium ashbyii*[J]. Process Biochemistry, 2000, 36(1/2): 31-37
- [15] Bode HB, Walker M, Zeeck A. Structure and biosynthesis of mutolide, a novel macrolide from a UV mutant of the fungus F-24' 707[J]. European Journal of Organic Chemistry, 2000, 2000(8): 1451-1456
- [16] Jiao XF, Sheng XL, Shan JY, et al. Screening of a bacterium degrading cellulose and its mutation by UV irradiation[J]. Chemistry & Bioengineering, 2010, 27(1): 52-54 (in Chinese)  
焦秀凤, 盛晓莉, 单继阳, 等. 纤维素分解菌的筛选及其紫外诱变[J]. 化学与生物工程, 2010, 27(1): 52-54
- [17] Wang SQ. Study on DHA fermentation technology by *Schizochytrium limacinum* SR21 and breeding of high-producing strain[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2013 (in Chinese)  
王申强. 裂殖壶菌产 DHA 的发酵工艺研究及高产菌株选育[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2013
- [18] Cao XH, Li SY, Wang CL, et al. Potential use of the herbicide Quizalofop-*p*-ethyl for eicosapentaenoic acid overproduction by the diatom *Nitzschia laevis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2007, 23(5): 885-890 (in Chinese)  
曹小红, 李松耀, 王春玲, 等. 除草剂精喹禾灵用于硅藻过量产生二十碳五烯酸[J]. 生物工程学报, 2007, 23(5): 885-890
- [19] Qu XM, Mi WY, Zhu BH, et al. Applicability of Herbicide Quizalofop-*p*-ethyl to the screening of lipid rich *Nannochloropsis oceanica*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2013, 43(6): 25-28 (in Chinese)  
曲晓梅, 宓文义, 朱葆华, 等. 精喹禾灵筛选高脂微藻的有效性研究[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2013, 43(6): 25-28
- [20] Taoka Y, Nagano N, Okita Y, et al. Influences of culture temperature on the growth, lipid content and fatty acid composition of *Aurantiochytrium* sp. strain mh0186[J]. Marine Biotechnology, 2009, 11(3): 368-374
- [21] Song X, Tan Y, Liu Y, et al. Different impacts of short-chain fatty acids on saturated and polyunsaturated fatty acid biosynthesis in *Aurantiochytrium* sp. SD116[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(41): 9876-9881
- [22] Xu Y. Mutagenesis and breeding of *Schizochytrium limacinum* and effects of ecological conditions on the growth and DHA content[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2012 (in Chinese)  
许永. 海洋真菌裂殖壶菌诱变筛选及不同生态条件对突变菌株生长和 DHA 含量的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2012
- [23] Wu KG, Chai XH, Yang LS. Effects of phytohormones on growth and DHA production by *Thraustochytrium roseum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2003, 43(1): 111-115 (in Chinese)  
吴克刚, 柴向华, 杨连生. 植物激素对破囊壶菌生长与产 DHA 的影响[J]. 微生物学报, 2003, 43(1): 111-115