

## 技术与方法

用抗性筛选法选育  $\gamma$ -亚麻酸 (GLA) 高产菌株

陈波 张玲 贺新生 李代发 王熙

(西南科技大学生命科学与工程学院 绵阳 621000)

**摘要:** 以深黄被孢霉 (*Mortierella isabellina*) 为出发菌株, 经紫外线诱变处理, 采用抗性筛选法, 直接在梯度平板上挑取抗脂肪酸脱氢酶抑制物抑芽丹 (maleic hydrazide) 的菌株进行初筛, 然后经摇瓶发酵法测定相关性能指标进行复筛, 获得一株生产性能比出发菌株显著提高的突变株  $M_{80}$ , 其菌体收率达 25.10g/L、油脂产率达 12.35g/L、 $\gamma$ -亚麻酸 (GLA) 产率达 771.88mg/L。

**关键词:** 深黄被孢霉, 紫外线诱变, 抗性筛选, 突变株

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0053-04

## SCREENING OF MUTANT OVERPRODUCING GLA WITH RESISTANCE METHOD

CHEN Bo ZHANG Ling HE Xin-Sheng LI Dai-Fa WANG Xi

(College of Life Science, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000)

**Abstract:** Using *Mortierella isabellina* as starting strain, mutagenized with UV, screened by selecting mutants resisting maleic hydrazide, a fatty acid dehydrogenase inhibitor, directly on gradient plate, a mutant  $M_{80}$  overproducing Gamma-Linolenic Acid (GLA) was obtained, which has much higher productive qualities than its parental strain. Its dry cell weight reaches 25.10g/L, lipid yield 12.35g/L, and GLA yield 771.88mg/L.

**Key words:** *Mortierella isabellina*, UV mutagenesis, Resistance screen, Mutant

$\gamma$ -亚麻酸 (Gamma-Linolenic Acid, GLA) 即全顺-6, 9, 12-十八碳三烯酸, 是人体必需脂肪酸之一, 它既是人体生物膜组织及人脑的重要组成成分, 又是具有一系列强烈生理效应的前列腺素的前驱物质, 因此对人体具有十分重要的作用<sup>[1]</sup>。微生物发酵法是获取  $\gamma$ -亚麻酸的重要途径, 现多采用深黄被孢霉 (*Mortierella isabellina*) 为发酵菌株。野生菌株产生的  $\gamma$ -亚麻酸通常只是满足自身的生理需要而不能过量积累, 因而产量很低, 不能直接用于工业化生产, 需要通过诱变等措施以打破其正常的调控机制来提高其产量。 $\gamma$ -亚麻酸是由不同的脂肪酸脱氢酶催化油酸、亚油酸等一系列脂肪酸的脱饱和而产生的, 且脱氢酶受某些物质的抑制<sup>[2,3]</sup>, 因此, 采取抗性筛选法, 选择抗脱氢酶抑制物抑芽丹 (maleic hydrazide) 的菌株, 该菌株就有可能因为解除了脱氢酶的抑制机制而过量产生  $\gamma$ -亚麻酸, 从而获得  $\gamma$ -亚麻酸的高产突变株。

## 1 材料与方法

## 1.1 菌种

深黄被孢霉, 西南科技大学生命科学与工程学院生物技术实验中心保存。

收稿日期: 2001-12-04, 修回日期: 2002-03-06

## 1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基: PDA。

1.2.2 摇瓶发酵培养基<sup>[4]</sup>: 葡萄糖 10g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.3g, NaAc 0.5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03g, NaCl 0.01g, 酵母膏 0.02g, 蛋白胨 0.01g, 水 100mL, pH 自然,  $0.7 \times 10^5$  Pa 灭菌 30min。

1.2.3 平板诱变培养基<sup>[4]</sup>: 葡萄糖 10g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.3g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03g, 琼脂 2g, 水 100mL, pH 自然,  $0.7 \times 10^5$  Pa 灭菌 30min。作梯度平板时另加适当浓度脂肪酸脱氢酶抑制物抑芽丹。

## 1.3 抑芽丹抑制浓度的确定

在平板诱变培养基里加入不同浓度的脂肪酸脱氢酶抑制物抑芽丹, 确定其对深黄被孢霉菌株生长的抑制浓度。

## 1.4 紫外线诱变

1.4.1 单孢子悬浮液的制备: 用无菌水洗下出发菌株的斜面孢子, 作成适当孢子浓度 ( $10^6 \sim 10^8$  个/mL) 的单孢子悬浮液。

1.4.2 紫外线杀菌曲线的制作: 于超净工作台内, 将适量单孢子悬浮液装于带搅拌棒的培养皿内, 置磁力搅拌器上, 调整培养皿至紫外灯距离为 30cm。盖上皿盖, 打开紫外灯预热 20min, 然后在黑暗条件下, 打开皿盖, 边搅拌边用紫外线分别照射不同时间。每一照射时间取 1mL 作适当稀释, 然后吸 0.2mL 涂平板, 用黑布包好, 于 28℃ 避光培养 3d 计菌落数, 计算杀菌率。以照射时间为横坐标, 杀菌率为纵坐标作图。

1.4.3 诱变处理: 在黑暗条件下, 打开紫外灯预热 20min, 然后将适当浓度的单孢子悬浮液在搅拌条件下照射适当时间, 单孢子悬浮液作适当稀释后吸 0.2mL 涂布于含有适当浓度脱氢酶抑制物的梯度平板上, 用黑布包好, 置恒温培养箱 28℃ 培养 3d。

## 1.5 筛选

采用抗性筛选方法在梯度平板上直接进行初步筛选, 选取梯度平板上抗 1.20mg/L 的脂肪酸脱氢酶抑制物抑芽丹的菌落至 PDA 斜面, 28℃ 培养 4d 后作进一步复筛。采用摇瓶发酵, 测定有关筛选指标进行复筛。将初筛保留的斜面用 10mL 无菌水洗入装有 100mL 发酵培养基的 500mL 三角瓶中, 30℃ 150r/min 培养 4d。收集菌体、测定菌体收率、油脂含量、油脂产率、GLA 含量及 GLA 产率。先淘汰油脂产率低于出发菌株的菌株, 油脂产率较高者其油脂甲酯化后作气相色谱分析, 测定油脂中 GLA 含量, 最后以 GLA 产率高低为复筛标准, 选择 GLA 产率较高者保留。

## 1.6 遗传稳定性试验

复筛出的突变株利用 PDA 斜面接种作传代试验, 传代 10 次后, 测定突变株的生产性能指标。分析传代前后生产性能指标的变化。

## 1.7 测定指标及方法

1.7.1 菌体收率 (g/L 发酵液): 每升发酵液所获干菌体重 (g)。

1.7.2 菌体油脂的测定: 菌体油脂含量 (%): 每 100g 干菌体中油脂克数, 索氏抽提法。油脂产率 (g/L 发酵液) = 菌体油脂含量 (%) × 菌体收率 (g/L 发酵液)。

1.7.3 油脂中 GLA 的测定<sup>[5,6]</sup>: 油脂的甲酯化: 采用三氟化硼甲醇法。取油酯 2 小滴, 加到 10mL 具塞刻度试管中, 加入 1mL 0.5N 氢氧化钾甲醇溶液, 加塞, 于 60℃ 水浴上加

热反应 10min, 取出, 冷却后加入 1mL 12.5% 的三氟化硼甲醇溶液, 加塞, 在沸水中反应 2min, 冷却, 加入 1.5mL 乙醚, 加塞振摇, 使脂肪酸甲酯转入醚层, 得脂肪酸甲酯的乙醚溶液作气相色谱分析。GLA 的气相色谱分析: 气相色谱仪: 日本 HITACHI163 型; 色谱柱: 2m × 4mm 20% DEGS 玻璃填充柱, 载体为硅烷化 101 白色担体; 检测器: 氢焰离子化检测器; 标样: GLA 甲酯标准品, 纯度 99%, 美国 Sigma 公司产品; 操作条件: 柱温 180℃, 气化室温度 230℃, 检测器温度 230℃, 载气 N<sub>2</sub> 流速 30mL/min, 燃气 H<sub>2</sub> 压力 1kgf/cm<sup>2</sup>, 助燃气空气压力 1kgf/cm<sup>2</sup>, 衰减 10 × 16, 纸速 2.5mm/min, 进样量 2μL。GLA 峰的定性用比较标样与样品保留时间及在样品中加入标样使峰增高的方法确定。分离得到的脂肪酸色谱图, 各峰面积由数据处理器处理。由于各脂肪酸的定量校正因子基本相等, GLA 含量用归一化法计算:

$$\text{GLA 含量 (\%)} = \text{GLA 峰面积} \times 100 / \text{各峰面积之和}$$

$$\text{GLA 产率 (mg/L 发酵液)} = \text{GLA 含量 (\%)} \times \text{油脂产率 (g/L)} \times 1,000$$

## 2 结果

### 2.1 不同浓度抑芽丹对出发菌株生长的抑制

野生菌株产生的微量的  $\gamma$ -亚麻酸通常只能满足自身的生理需要而没有多余的积累。 $\gamma$ -亚麻酸是由不同的脂肪酸脱氢酶催化油酸、亚油酸等一系列脂肪酸的脱饱和而产生的, 且脱氢酶受某些物质的抑制, 因此, 一定浓度的脱氢酶抑制物会因为抑制了菌株正常生理需要所必需的  $\gamma$ -亚麻酸的产生而抑制菌株的生长。不同浓度的脱氢酶抑制物抑芽丹对出发菌株生长的抑制结果见表 1。

从表 1 可以看出,

表 1 不同浓度抑芽丹对出发菌株生长的抑制结果

随着抑芽丹浓度的增加, 能够生长的菌落数逐渐减少, 抑制率逐渐增加。

抑芽丹浓度 (mg/L)	0	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20
菌落数 (个/皿)	265	209	132	58	29	9	0
抑制率 (%)	0	21.13	50.19	78.11	89.06	96.60	100.00

当抑制物浓度达到 1.20mg/L 时, 不再有菌落生长, 抑制率为 100%, 因此确定 1.20mg/L 的抑制物浓度为梯度平板中抑制物的加入浓度。

### 2.2 紫外线诱变剂量的确定

紫外线杀菌曲线见图 1。众多的诱变育种的试验及经验表明, 高诱变剂量突变率较高, 但同时负变率也高; 低诱变剂量突变率较低, 但正变率较高。因此, 现在紫外线诱变育种一般多采用较低剂量。根据紫外线杀菌曲线, 本试验采用 70% 左右的杀菌率为相对诱变剂量, 即在紫外灯功率为 15W, 照射距离为 30cm 的条件下, 用紫外线照射 15s 进行诱变。

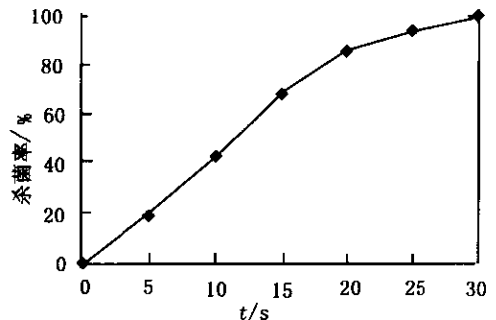


图 1 紫外线杀菌曲线

### 2.3 筛选结果

采用抗性筛选的方法在梯度平板上直接进行初步筛选, 初筛菌株通过摇瓶发酵测定主要筛选指标进行复筛, 综合考虑各生产性能, 最终筛选出突变株 M<sub>80</sub>, 结果见表 2。

表2  $M_{80}$ 与出发菌株生产性能之比较

菌株	菌体收率 (g/L)	油脂含量 (%)	油脂产率 (g/L)	GLA含量 (%)	GLA产率 (mg/L)
出发菌株	11.00	25.14	2.77	3.02	83.65
$M_{80}$	25.10	49.21	12.35	6.25	771.88
增加倍数	1.28	0.96	3.46	1.07	8.23

油脂含量增加0.96倍, 油脂产率增加3.46倍, GLA含量增加1.07倍, GLA产率增加最明显, 从出发菌株的83.65mg/L增加到771.88mg/L, 增加了8.23倍。

表3  $M_{80}$ 传代10次前后的性能比较

测定指标	菌体收率 (g/L)	油脂含量 (%)	油脂产率 (g/L)	GLA含量 (%)	GLA产率 (mg/L)
传代前	25.10	49.21	12.35	6.25	771.88
十代后	24.60	48.30	11.88	6.18	733.98
变化率(%)	1.99	1.85	3.81	1.12	4.91

其遗传性能稳定。

### 3 结语

采用抗性筛选的方法, 直接在梯度平板上挑选抗脂肪酸脱氢酶抑制物抑芽丹的菌株的初筛方法是有效的、可行的。较之一般的随机筛选, 可减少盲目性, 减轻工作量, 提高筛选效率。此法在产物产生及调控机制不甚明了的情况下, 不失为一种较好的半理性筛选法。

通过紫外线诱变育种, 获得一株生产性能比出发菌株显著提高的突变株  $M_{80}$ , 其菌体收率达25.10g/L, 油脂产率达12.35g/L, GLA产率达771.88mg/L, 分别比出发菌株增加了1.28倍、3.46倍及8.23倍。

### 参考文献

- [1] 尤新. 功能性发酵制品. 北京: 中国轻工业出版社, 2000. 227~243.
- [2] 钟辉, 张峻, 邢来君. 微生物学通报, 1994, 21(4): 237~239.
- [3] Cohen Z, Dili S, Heimer Y M. Plant Physiology, 1992, 98: 569~572.
- [4] 张俊, 邢来君, 王红梅. 微生物学通报, 1993, 20(3): 140~143.
- [5] 达世禄. 色谱学导论. 武汉: 武汉大学出版社, 1988.
- [6] 史坚. 现代柱色谱分析. 上海: 上海科技文献出版社, 1988.

$M_{80}$ 菌体收率为25.10g/L、油脂含量为49.21%、油脂产率为12.35g/L、GLA含量为6.25%、GLA产率为771.88mg/L, 与出发菌株比较, 菌体收率增加1.28倍,

### 2.4 遗传稳定性试验

$M_{80}$ 传代10次后测定性能指标, 结果见表3。

结果表明, 筛选出的突变株  $M_{80}$ , 传代10次后, 其性能指标变化率 < 5%, 说明