

# $\gamma$ -亚麻酸产生菌的原生质体诱变育种

李明春 邢来君

(南开大学生命科学学院微生物系 天津 300071)

**摘要** 为了提高深黄被孢霉产生 $\gamma$ -亚麻酸的量,对原生质体进行了紫外线诱变,实验表明采用紫外线(UV)照射45s,可获得高产突变株,突变株MH<sub>23</sub>、MH<sub>18</sub>和MX<sub>26</sub>分别比对照株M<sub>6-22</sub>的 $\gamma$ -亚麻酸产量提高了70.7%、54.1%和53.6%。表明用原生质体进行诱变处理是较好的方法。

**关键词** 深黄被孢霉,原生质体,诱变育种, $\gamma$ -亚麻酸

**分类号** Q344

亚油酸(Linoleic acid, LA)和 $\gamma$ -亚麻酸( $\gamma$ -Linolenic acid, GLA)是人体必需脂肪酸(Essential fatty acids, EFAs)。LA不能由人体合成而只能从食物中获得。从食物中获取的LA在人体内首先转化为GLA,然后由GLA转化为二高 $\gamma$ -亚麻酸(Dihomo- $\gamma$ -Linolenic acid, DGLA)和花生四烯酸(Arachidonic acid,

AA),两者再分别合成前列腺素类物质发挥它们对人体生理功能的重要调节作用<sup>[1]</sup>。

LA向GLA转化的过程中被高脂肪和高碳水化合物饮食及衰老、糖尿病等因素所阻断,

---

天津市科委重点攻关项目资助

1997-01-27收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

因此,向人体内补充 GLA 已成为治疗疾病和抗衰老的一个重要手段<sup>[2]</sup>。 $\gamma$ -亚麻酸是一种人体不能合成的而又必需的多烯不饱和脂肪酸,人体经常出现不同程度的缺乏症,这种缺乏会导致机体代谢的紊乱而引起多种疾病,如高血压、糖尿病、癌症、病毒感染以及皮肤老化等。因此,对 $\gamma$ -亚麻酸生理作用的研究以及开发自然资源的研究受到科学家们的重视。我们从丝状真菌深黄被孢霉中选育到一株产 $\gamma$ -亚麻酸的菌株 *Mortierella isabellina*  $M_{6-22}$ <sup>[3,4]</sup>。为了提高 *M. isabellina*  $M_{6-22}$  菌株的产量性状,采用了原生质体-紫外线诱变方法,获得了三株  $MH_{23}$ 、 $MH_{18}$  和  $MX_{26}$  菌株,在菌体干重、出油率和 $\gamma$ -亚麻酸含量方面都优于出发菌株。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和培养基

1.1.1 供试菌株:深黄被孢霉  $M_{6-22}$  (*Mortierella isabellina*  $M_{6-22}$ ), 本实验室保藏。

1.1.2 斜面培养基:SPDA 培养基。

1.1.3 基础摇瓶培养基:参考文献 [4]。

1.1.4 原生质体再生培养基:0.7mol/L 的 NaCl 配制的 SPDA 培养基。

### 1.2 原生质体制备

1.2.1 渗透压稳定剂:0.2mol/L 磷酸缓冲液配制的 0.8mol/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  溶液。

1.2.2 酶液配制:2% 溶壁酶 + 4% 蜗牛酶

1.2.3 菌龄:SPDA 液体培养基,28℃ 旋转摇床 160r/min 培养 12h。

1.2.4 酶解时间:4h。

1.2.5 原生质体分离方法:参照“深黄被孢霉原生质体的形成和再生”一文(待发表)。

1.2.6 原生质体再生:将上述纯化的原生质体悬液,用 0.7mol/L NaCl 作不同稀释,分别接种于高渗和低渗再生培养基,血球计数板计数作对照,28℃ 培养 3d 后菌落计数,再生率 = (高渗培养基上的菌落数 - 低渗培养基上的菌落数) / 对照。

### 1.3 原生质体-紫外线诱变处理

将制备好的原生质体稀释至  $10^6$  个/ml,取

15ml 放于无菌的 9cm 平皿内,15W 紫外灯,距离 30cm 照射不同时间,取 1ml 样品适当稀释至不同浓度,取 0.1ml 涂平板,黑暗闭光 28℃ 温箱培养,待平板长出菌落后,菌落计数,转斜面培养,并计算原生质体再生率和紫外线致死率。诱变后的斜面菌株,28℃ 培养 5d 后,进行摇瓶发酵的测定。

### 1.4 摇瓶发酵培养与菌体收获

1.4.1 摇瓶培养:从培养 5d 的诱变菌种斜面挑取一环孢子,接入装有 60ml 摇瓶培养基的 500ml 三角瓶中,30℃,98r/min 往复摇床振荡培养 120h。

1.4.2 菌体收获:摇瓶发酵后的培养液,用白的确良布过滤收集菌丝体,并用蒸馏水冲洗三次,挤干,50℃ 烘干,称重。

### 1.5 油脂提取和 GLA 测定

1.5.1 油脂提取:将烘干的菌体放于研钵中研磨,加入适量石油醚混悬,经 4000r/min 离心收集上清液,于通风橱内挥发石油醚,即得油脂,称重,进行油脂皂化并测定油脂中 GLA 含量。

1.5.2 油脂皂化:见文献 [5],略有修改。

1.5.3 GLA 含量测定:以化学异构法测定,见文献 [6~8]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 原生质体的获得

以 2% 溶壁酶 + 4% 蜗牛酶,0.8mol/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  为渗透稳定剂,菌龄 12h,32℃ 振荡酶解 4h,结果如图 1 所示。

酶解液经 G3 漏斗过滤,2000r/min 离心洗涤,接种于高渗和低渗培养基上生长,2~3d 后菌落计数,计算再生率,重复实验表明原生质体的平均再生率为 36%。

### 2.2 紫外线对原生质体的影响

将纯化的原生质体悬液稀释至  $10^6$  / ml,用紫外线分别进行不同时间的照射处理,结果见表 1。

在表 1 中,我们以出发菌株产生 $\gamma$ -亚麻酸的量为对照确定正变和负变株,表中的存活率

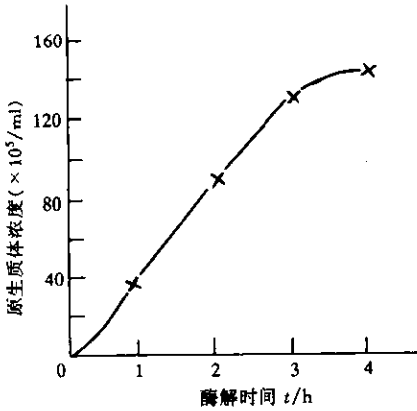


图1 深黄被孢霉原生质体的释放量

表1 紫外线对深黄被孢霉原生质体的影响

照射时间 (s)	存活率 (%)	测定菌 株数	正变率 (%)	负变率 (%)
30	2.1	53	20.8	78.8
45	1.7	42	42.8	57.2
60	1.2	34	35.5	64.5

即为原生质体经紫外线照射后的再生率。通过表 1 的结果可以看出,深黄被孢霉  $M_{6-22}$  菌株的原生质体,经 45s 照射后正变效果最好,60s 照射次之。因此,我们在其后的诱变处理中选择了 45s 和 60s 的照射剂量。

### 2.3 高 $\gamma$ -亚麻酸诱变株的获得

分别以 60s 和 45s 的照射剂量对  $M_{6-22}$  菌株原生质体进行诱变。随机挑取不同菌落形态的变异株进行摇瓶培养、油脂提取和  $\gamma$ -亚麻酸含量测定,结果列于表 2。

$\gamma$ -亚麻酸是胞内脂肪酸,因此,在考察诱变效果时,不只以  $\gamma$ -亚麻酸的含量作为唯一指标,同时要考察发酵培养物的量即菌丝体干重以及干菌体的出油率。从表 2 的结果看出  $MY_{21}$   $\gamma$ -亚麻酸占油脂含量的 10.25%,但是每升发酵液收获的干菌体仅为 18.3g,出油率 43.5%,而  $MH_{23}$   $\gamma$ -亚麻酸占油脂含量的 9.92%,干菌体 26.4g/L,出油率 52.3%。综合分析结果表明  $MH_{23}$  每升发酵液所得  $\gamma$ -亚麻酸为 1379mg,而  $MY_{21}$  是 851mg/L,因此从产量性状来说  $MH_{23}$  优于  $MY_{21}$ 。对表 2 进行全面分析,不难发现  $MH_{23}$ 、 $MH_{18}$  和  $MX_{26}$  三株诱变株在

表2  $M_{6-22}$ 原生质体的诱变结果

菌株号	照射时间 (s)	DC (g/L)	TL (g/L)	TL/DC (%)	GLA (%)	GLA (mg/L)
MH <sub>18</sub>	45	27.1	13.8	50.9	9.02	1245
MH <sub>19</sub>	45	27.2	13.8	50.7	8.46	1167
MH <sub>23</sub>	45	26.4	13.9	52.3	9.92	1379
MH <sub>24</sub>	45	27.7	12.9	46.7	8.33	1075
MH <sub>34</sub>	45	26.6	13.8	51.9	8.51	1174
MX <sub>26</sub>	60	24.7	12.6	51.0	9.85	1241
MX <sub>30</sub>	60	23.2	12.0	51.5	8.69	1043
MX <sub>45</sub>	60	26.4	11.8	44.7	9.09	1073
MX <sub>46</sub>	60	26.1	10.3	39.4	9.83	1012
MX <sub>51</sub>	60	22.6	8.8	38.9	9.52	838
MY <sub>3</sub>	60	21.2	10.8	50.9	8.36	903
MY <sub>21</sub>	60	18.3	8.3	45.4	10.25	851
MY <sub>25</sub>	60	24.8	10.8	43.5	8.75	945
MY <sub>33</sub>	60	25.7	11.3	43.9	8.74	988
MY <sub>2</sub>	60	26.7	10.8	40.4	9.02	974
MY <sub>7</sub>	60	25.9	11.0	42.6	8.69	955
对照 $M_{6-22}$	0	26.0	13.1	50.4	6.17	808

DC=Dry Cell TL=Total lipid

菌体干重,出油率和  $\gamma$ -亚麻酸含量是比较优秀的菌株。这一结果与表 1 显示的结果相吻合,深黄被孢霉原生质体 45s 的紫外线照射时间正变率较高,容易获得高产菌株。

实验获得的  $MH_{23}$ 、 $MH_{18}$  和  $MX_{26}$  分别比对照菌株  $M_{6-22}$  的  $\gamma$ -亚麻酸产率分别提高了 70.7%、54.1% 和 53.6%。我们实验室曾对深黄被孢霉  $M_{6-22}$  菌株的孢子采用微波-紫外线诱变处理和化学诱变剂 NTG 处理,但结果都不理想, $\gamma$ -亚麻酸产率的提高幅度都在 50% 以下(资料未发表),而采用原生质体-紫外线复合处理,得到了比较好的结果。因此,我们认为利用原生质体-紫外线复合处理是提高深黄被孢霉  $\gamma$ -亚麻酸产率的较好方法。

### 2.4 遗传稳定性实验

从表 2 中选择了一株产量性状较好的  $MH_{23}$  和一株出油率较低而产量性状较高的  $MX_{51}$  进行了遗传稳定性实验,每传二代进行  $\gamma$ -亚麻酸测定,结果列于表 3。

从表 3 可以看出,  $MH_{23}$  和  $MX_{51}$  经过 10 次  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

传代, 其 GLA 产量性状基本稳定。

表3 遗传稳定性实验

菌株号	GLA 含量(%)	传代次数					
		1	2	4	6	8	10
MH <sub>23</sub>		9.92	8.91	10.57	9.84	8.63	10.19
MX <sub>26</sub>		9.52	9.80	10.19	9.82	9.02	9.27

### 参 考 文 献

[1] European patent 0409559 1991.

[2] European patent 0078434 1983.

[3] 张 峻, 邢来君, 王红梅. 微生物学通报, 1993, 20(3): 140~143.

[4] 邢来君, 钟 辉, 周 辉等. 真菌学报, 1996, 15(4): 272~277.

[5] 高雅琴, 李霞冰, 朱廷儒. 沈阳药学院学报, 1985, 2(2): 125~128.

[6] 汤 逢. 油脂化学, 南昌: 江西出版社, 1985.

[7] Hidditch T P. Analyst, 1951, 76: 81~84.

[8] Metcalfe L D. Analytical Chemistry, 1961, 33(3): 363~366.

## STRAIN IMPROVEMENT OF $\gamma$ - LINOLENIC ACID - PRODUCING BY PROTOPLAST MUTAGENESIS

Li Mingchun Xing Laijun

(Microbiology Department of Nankai University, Tianjin 300071)

**Abstract** The feasibility of the protoplast - UV mutagenesis for increasing  $\gamma$  - linolenic acid was studied on *Mortierella isabellina* strain. The experiments showed that the high mutants were obtained by UV - irradiation of the protoplasts with 45 seconds. The  $\gamma$  - linolenic acid content of the mutant MH<sub>23</sub>, MH<sub>18</sub> and MX<sub>26</sub> was respectively increased 70.7%, 54.1% and 53.6% than that of the contrast strain M<sub>6</sub>-22'. The results indicated that the protoplast mutagenesis is a better approach to increase  $\gamma$  - linolenic acid yield of *M. isabellina*.

**Key words** *Mortierella isabellina*, Protoplast, Mutagenesis,  $\gamma$  - Linolenic acid