

利用脂肪酸合成酶抑制剂和磷酸香草醛 反应筛选高产油脂酵母菌

李仁民^{1,2*} 王菊芳¹ 马爽^{1,2} 严亚平^{1,2} 李文建¹

(1. 中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

(2. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要: 利用 80 MeV/u 碳离子束对产油菌株粘红酵母进行辐照诱变, 采用含有脂肪酸合成酶抑制剂 cerulenin 的培养基进行高产油脂突变株的初筛, 并通过磷酸香草醛反应和氯仿甲醇抽提法对初筛菌株油脂含量进行分析。结果表明, cerulenin 对酵母细胞生长有较好的抑制作用, 浓度为 8.96×10^{-6} mol/L 时, 抑制率达 98% 以上, 可作为筛选浓度。通过磷酸香草醛反应法对初筛菌体油脂含量进行定量分析, 发现菌体油脂含量与该反应在 530 nm 处的光吸收成线性正相关, 初筛菌株的正突变率达 65% 以上。该方法快速方便, 是一种较为理想的产油酵母筛选方法。通过该方法, 筛选出了 2 株油脂含量高于对照 90% 以上的突变株。

关键词: 微生物油脂, 脂肪酸合成酶, Cerulenin, 磷酸香草醛反应

Selection of Yeast High in Lipids-yield by Fatty Acid Synthetase Inhibitor and Phosphoric Acid-vanillin Reaction

LI Ren-Min^{1,2*} WANG Ju-Fang¹ MA Shuang^{1,2} YAN Ya-Ping^{1,2} LI Wen-Jian¹

(1. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000)

(2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison was irradiated with 80 MeV/u carbon ions. primary selection of yeast high in lipids-yield was performed with culture medium supplemented cerulenin, an inhibitor of fatty acid synthetase (FAS). The quantity of the lipids of selected strains was analyzed by phosphoric acid-vanillin reaction and traditional methanol-chloroform extraction methods. The results showed that the growth of *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) could be inhibited efficiently by cerulenin. The inhibition rate was up to 98% at cerulenin concentration of 8.96×10^{-6} mol/L, which was considered suitable for mutant selection. Through the phosphoric acid-vanillin reaction, it was found that the quantity of the lipids was a positive linear relation with the OD at 530 nm. The positive mutant rate of primary selection reached to 65%. With the advantage of rapid and easy to perform, it can be considered as a good method to select yeast high in lipid-yield. By these methods, 2 mutant strains with lipid yield improved 90% compared with control was selected out.

Keywords: Microbial lipids, Fatty acid synthetase (FAS), Cerulenin, Phosphoric acid-vanillin reaction

微生物油脂作为一种重要的保健食品,其作用已经有了较多的研究,尤其是随着各种多不饱和脂肪酸(GLA、EPA、DHA、AA)在抗肿瘤、抗衰老、降血脂、降糖等方面作用的逐步阐述,微生物油脂的应用表现出了十分广阔的市场前景^[1]。另外,更有研究发现,微生物油脂在化学组成上与植物油十分相近,并且其通过转酯化可得生物柴油^[2],这进一步引起了研究者的极大关注。然而,油脂产量依然是限制其各方面应用的主要瓶颈。目前仍然没有一种较为理想的高产油脂突变菌株的筛选方法。

Cerulenin 是一种蓝色头孢霉的自然代谢产物,分子式为 $C_{12}H_{17}NO_3$ 。在细胞环境中,cerulenin 以开放式链和羟基内酰胺两种平衡形式存在。它通过与脂肪酸合成酶中 β -酮脂酰-ACP 合酶末端丝氨酸上的-SH 基结合,形成羟基内酰胺环而使之失活。 β -酮脂酰-ACP 合酶是脂肪酸合成的关键酶,故低浓度的 cerulenin 能够不可逆地抑制生物体的内源性脂肪酸合成,从而抑制细胞的生长代谢^[3]。在一定浓度的 cerulenin 培养基上,只有脂肪酸合成酶活性比较高的菌株才能存活下来而被选出。

本研究尝试利用脂肪酸合成酶(FAS)抑制 cerulenin 进行高产油脂酵母菌的筛选,建立一种高通量、快速方便的高产油脂微生物的筛选方法。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

粘红酵母 *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison 由甘肃省科学院微生物研究所惠赠。

YEPD 液体培养基组成(g/L): 葡萄糖 20, 酵母粉 10, 蛋白胨 10; pH 5.8~6.0。

YEPD 固体培养基: 在液体培养基的基础上加入 15 g 琼脂粉, 1×10^5 Pa 下饱和蒸汽灭菌 20 min。

1.2 试剂

磷酸香草醛试剂: 0.12 g 香草醛溶解于 20 mL 蒸馏水中,用 85%的磷酸定容至 100 mL。

2.24×10^{-3} mol/L cerulenin 母液: 5 mg cerulenin 充分溶解于 10 mL DMSO 中。

Cerulenin(BIOMOL), 香草醛 (SANGON), 1 mol/L HCl, 氯仿, 甲醇, 85%磷酸, 98%硫酸。

1.3 出发菌株的活化及辐照

将新鲜斜面上长好的酵母菌接种于 20 mL 液体培养基中,于 28 °C, 120 r/min 摇床培养 20 h~24 h。以 10%接种量接种于 50 mL 液体培养基中,相同条件下摇床培养 96 h。取 2 mL 菌悬液置于无菌空平皿,封口膜密封,置于兰州近代物理研究所重离子加速器装置终端下用 80MeV/u 的碳离子束辐照,剂量分别为 2.5Gy、7.5Gy、10Gy、15Gy、40Gy、50Gy、55Gy。辐照结束后,加 30%甘油于-20 °C 冰箱保存。

1.4 酵母菌株的辐照存活率

用 10 倍稀释法将辐照过的菌液稀释至适宜的浓度,取适量涂布于直径为 90 mm 的培养皿中,使每皿长出的菌落数控制在 50~100 个左右为宜,每个剂量 3 个平行,28 °C 培养 3 d,统计长出的菌落。辐照存活率=各剂量平均菌落数/对照平均菌落数。

1.5 Cerulenin 筛选高产油脂酵母

将辐照后的菌种涂布于含 cerulenin 浓度为 8.96×10^{-6} mol/L 的 YEPD 固体培养基上,28 °C 培养 3 d。以同样浓度下未辐照菌落为对照,挑取较大菌落,作为初筛菌株,于 28 °C、120 r/min YEPD 液体培养基中培养 24 h。10%的接种量转接到 20 mL YEPD 液体培养基中,同样条件下培养 5 d,分析初筛菌体的油脂含量。

1.6 磷酸香草醛反应分析初筛菌体的油脂含量^[4]

取 10 mL 菌液,4000 r/min 离心 10 min,蒸馏水洗 1~2 次。定容至 2 mL,取 100 μ L(对照取蒸馏水),加入一带塞试管中,加入 18 mol/L H_2SO_4 2 mL,沸水浴中孵化 10 min,常温水浴 5 min,加入 5 mL 磷酸-香草醛试剂,37 °C 保温 15 min,常温水浴 10 min,于 530 nm 测其 OD 值(UV-1100/上海美谱达仪器有限公司)。

1.7 氯仿-甲醇法抽提油脂

方法参见文献[5]。

2 结果

2.1 重离子束辐照后粘红酵母菌的存活曲线

图 1 为 80 MeV/u $^{12}C^{6+}$ 辐照下粘红酵母 *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison 的存活率随辐照剂量的变化曲线。存活率随辐照剂量的增加呈先减小后增加,又减小的马鞍型剂量-效应曲线,这是重离子所特有的质量沉积效应的体现。

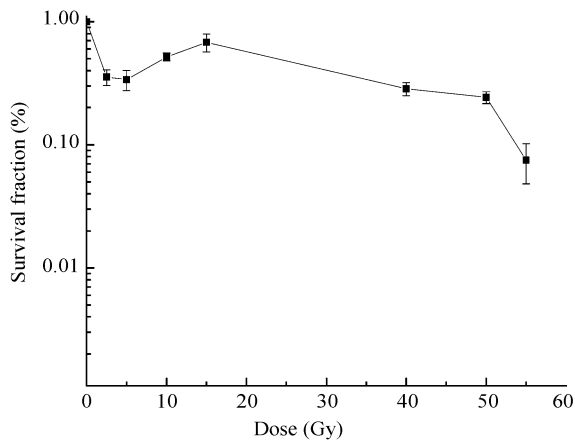


图 1 80MeV/u $^{12}\text{C}^{6+}$ 辐照后粘红酵母 *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison 的存活曲线

Fig. 1 The Survival fraction of *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison cells irradiated by 80MeV/u $^{12}\text{C}^{6+}$

2.2 Cerulenin 筛选高产油脂酵母

为了便于筛选, 首先要对 cerulenin 的抑制浓度进行标定。在每皿加入 20 mL YEPD 固体培养基的同时, 分别加入 2.24×10^{-3} mol/L 的 cerulenin 母液 20 μL 、40 μL 、60 μL 、80 μL 和 100 μL , 制成梯度培养基, 按照常规方法涂布平板, 统计 cerulenin 对菌体菌落形成率的影响, 确定其最适抑制浓度。得到 cerulenin 的抑制曲线如图 2 所示。

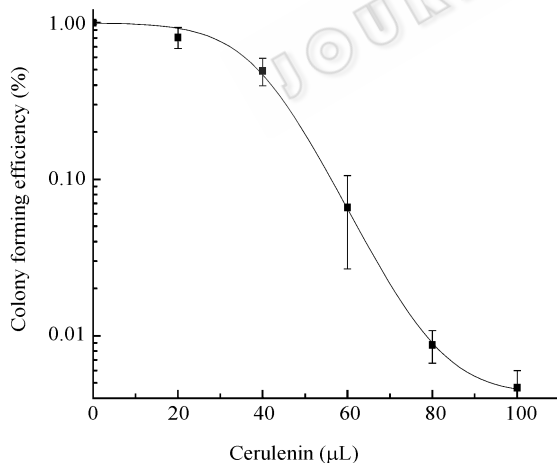


图 2 Cerulenin 处理下粘红酵母 *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison 的菌落形成率

Fig. 2 The colony forming efficiency of *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison cells treated with cerulenin

由图 2 可以看出, 粘红酵母的菌落形成率随 cerulenin 浓度的递增呈逐步减小的趋势。当 cerulenin 的量达到 80 μL 时, 粘红酵母的菌落形成

率约为 2%, 故以 80 μL 作为筛选处理的最佳剂量, 此时培养基中 cerulenin 的浓度为 8.96×10^{-6} mol/L。

在重离子辐照和 8.96×10^{-6} mol/L cerulenin 的双重作用下, 仅有部分剂量有少数菌落存活下来, 且菌落大小不一, 通常在比较大的菌落周围都存在有少数几个小的菌落, 形成了明显的对比。以此浓度下未辐照菌株菌落大小为对照, 挑取较大菌落, 筛选出了 20 株可能高产油脂的菌株。

2.3 氯仿-甲醇法和磷酸香草醛反应法分析初筛菌体的油脂含量

在酵母培养物中加入硫酸-磷酸香草醛试剂后, 生成一种有色物质, 从浅绿色到茶红色, 随油脂含量的增加而加深, 且其在 530 nm 的光吸收与氯仿-甲醇抽提法测得的菌体油脂含量成正比, 如图 3 所示。标准曲线方程为 $y=38.2257x+0.67314$, R^2 为 0.995, 其中脂肪酸含量的值来源于粗脂肪酸的重量与培养液体积的比。

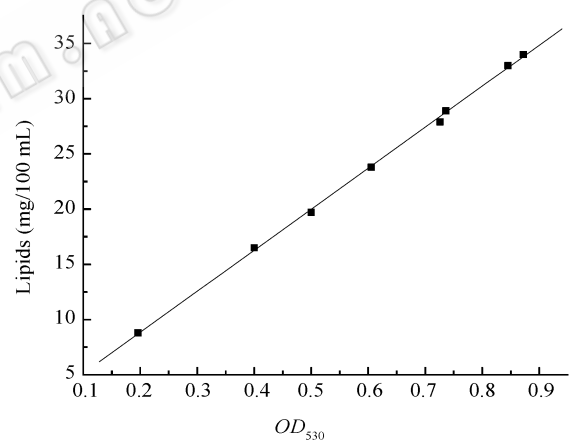


图 3 磷酸香草醛反应法测定粘红酵母 *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison 油脂含量的标准曲线

Fig. 3 The standard curve of quantitation of lipids of *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison cells by the sulfo-phosphovanillin method

为了验证 cerulenin 初筛菌株的正向突变率, 利用上述方法对初筛菌株进行复筛。对照标准曲线, 得到初筛菌株的油脂含量。其中有 13 株的油脂含量明显高于对照(30.1 mg/100 mL), 属于正突变, 正突变率达 65% 以上, 并得到了 5 号、16 号 2 株油脂含量高于对照 90% 以上的突变株, 其脂肪酸含量分别为 59.6 mg/100 mL、64.6 mg/100 mL, 如图 4 所示。

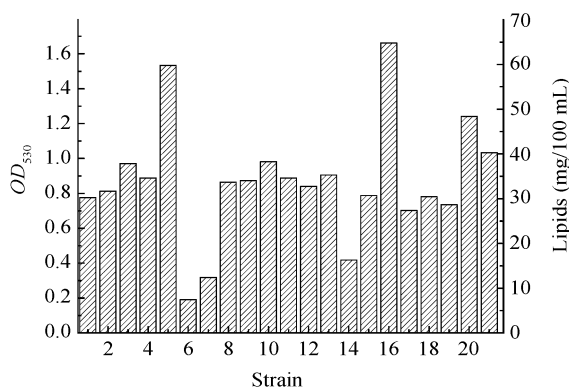


图 4 磷酸香草醛反应法测定的粘红酵母 *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison 各突变株的脂肪酸含量

Fig. 4 The quantity of lipids of the selected strains tested by sulfo-phospho-vanillin method

1: 对照; 2-21: Cerulenin 培养基筛选的各突变株

1: *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison; 2-21: The selected strain by cerulenin media

3 分析讨论

重离子辐照对生物体的作用是集动量传递、能量及质量沉积、电荷的中和与交换于一体的联合作用^[6, 7]。这种马鞍型-剂量效应曲线正是重离子所特有的质量沉积效应的体现。现在一般认为低剂量的重离子辐射在造成微生物个体损伤的同时, 其质量沉积产物对菌体的生长和修复产生刺激效应^[8], 而高剂量主要表现为杀伤作用, 从而导致菌体的存活率在注入剂量的一定范围内上升, 形成“马鞍型”曲线。

脂类不仅是微生物细胞膜的重要组成部分, 而且是细胞内许多重要生化反应的参与者和调节者, 包括蛋白的分泌、分解、转运、折叠, DNA 的复制, 细胞的分裂, 能量的产生, 细胞的完整性和免疫防御机制等^[9, 10]。cerulenin 能特异的和脂肪酸合成酶的 β -酮脂酰-ACP 合酶末端丝氨酸上的-SH 基结合, 使细胞内的各种生化反应无法正常进行, 从而达到抑制细胞生长的目的。这样, 只有脂肪酸合成能力比较强的突变株能存活下来, 达到筛选正突变株的目的。然而, 一定浓度的 cerulenin 并不能完全抑制菌体的生长, 与对照相比(菌落直径 $d = 5$ mm), 依然会形成很小的菌落($d = 2$ mm), 为了便于分析, 直径小于 2 mm 的菌落不予统计, 得到了其最佳抑制浓度为 8.96×10^{-6} mol/L。经复筛, 正突变率达 65% 以上, 说明 cerulenin 是一种较为理想的产油酵母筛选方

法。同时, 仍然有部分脂肪酸含量比较低的菌株能摆脱 cerulenin 的抑制而生存下来, 对其机理还需进一步的探讨。

传统的筛选方法主要是基于苏丹黑染色, 现在比较常用的有脂肪粒计数法和苏丹黑菌泥印染法^[11]。脂肪粒计数法是一种通过菌体内脂肪粒的数目和大小来估计菌体油脂含量的方法。然而, 即使同一菌株不同个体间脂肪粒的数目和大小亦存在较大差异, 可行性差, 且属于随机筛选, 工作量大。苏丹黑菌泥印染法染色的深浅与所沾菌体的多少有关, 准确性差。利用 Cerulenin 筛选法, 可以实现产油酵母的高通量筛选, 省时省力, 是一种比较理想的产油酵母筛选方法, 有望打破产油微生物筛选的瓶颈。由于酵母及各种产油真菌的脂肪酸合成酶都属于 β -型脂肪酸合成酶^[12], 组成比较接近, 因此有望用作各种产油真菌的筛选。

在磷酸香草醛反应中, 各突变株均属同批培养, 且属于同一出发菌株, 以其在 660 nm 的光吸收值来表示菌体浓度, 均在 2.4~2.5 之间, 差别很小。生物体与磷酸香草醛试剂反应, 生成一种红色物质, 其机理尚不清楚。有一种推测认为不饱和脂类与硫酸作用水解后生成碳鎓离子, 试剂中的磷酸与香草醛的羟基作用产生芳香族的磷酸酯, 并且改变了香草醛分子中的电子分配。使醛基变成反应增强的酯基, 碳鎓离子与磷酸酯的羰基起反应, 生成红色醌化物, 吸收可见光^[13]。根据颜色的深浅即可以定性分析油脂含量的高低, 同时该物质在 530 nm 存在最大光吸收, 且与菌体油脂含量成正相关, 通过测定其在 530 nm 的光吸收即可定量分析油脂含量。然而本反应的显色强度与脂肪酸的饱和度有关, 一般是甘油三酯大于软脂酸, 油酸大于亚油酸大于胆固醇。所以测定结果与所采用的参考标准物质有关。该研究采用氯仿-甲醇法提取的出发菌株油脂作为参考标准, 其组成与各对照株相近, 结果比较符合实际情况。该显色反应稳定, 一般在 2 h 内其光密度无明显改变。与传统的氯仿甲醇两相萃取方法相比, 该方法需要的生物量小, 且无须细胞破碎, 便可以直接对细胞油脂含量进行定量分析, 快速方便, 有利于实现自动化分析^[14], 具有很好的应用前景。

参考文献

[1] Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms

- being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*, 2004, **86**: 807–815.
- [2] 赵宗保. 加快微生物油脂研究为生物柴油产业提供廉价原料. *生物工程杂志*, 2005, **25**(2): 8–11.
- [3] Ohno T, Desado T, Awaya J, *et al.* Target of inhibition by the anti-lipogenic antibiotic cerulenin of sterol synthesis in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1974, **57**(4): 1119–1124.
- [4] IZARD J, LIMBERGER RJ. Rapid screening methods for quantitation of bacterial cell lipids from whole cell. *Journal of microbiological methods*, 2003, **55**: 411–418.
- [5] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 1959, **37**: 911–917.
- [6] Shao Chunlin, Xu An, Yu Zengliang. Charge exchange effect of ion implantation to bimolecular. *High Technology Letters*, 1997, **20** (2): 70–73.
- [7] Song Daojun, YAO Jianming, Shao Chunlin. A possible mechanism of dose related survival of microorganism implanted by N^+ ions. *High Technology Letters*, 1999, **22**(3): 129–132.
- [8] 邵春林, 余增亮. 低能离子辐照的刺激效应模型. *核技术*, 1996, **19**(6): 321–325.
- [9] Binenbaum Z, Klyman E, Fishov I. Division-associated changes in membrane viscosity of *Escherichia coli*. *Biochimie*, 1999, **81**: 921–929.
- [10] Bogdanov M, Dowhan W. Phospholipid-assisted protein folding: phosphatidylethanolamine is required at a late step of the conformational maturation of the polytopic membrane protein lactose permease. *EMBO J*, 1998, **17**: 5255–5264.
- [11] 董欣荣, 曹健, 赵斌, 等. 几种真菌油脂的检测与提取. *郑州工程学院学报*, 2002, **23**(1): 14–18.
- [12] Schweizer E, Hofmann J. Microbial Type I Fatty Acid Synthases (FAS): Major Players in a Network of Cellular FAS Systems. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2004, **9**: 501–517.
- [13] Tietz NW. *Fundamentals of Clinical Chemistry*. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1982, pp.76–79.
- [14] IZARD J, LIMBERGER RJ. Rapid screening methods for quantitation of bacterial cell lipids from whole cell. *Journal of microbiological methods*, 2003, **55**: 411–418.

科技信息

一种致病“超级菌”金黄色葡萄球菌正在威胁患者的生命

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)为人们所熟知,它是一种革兰氏阳性球菌。感染伤口化脓、感染褥疮,甚至皮肤接触也感染,严重者可导致死亡。在日本曾发现一种金葡菌可抵抗所有的抗生素,其中如万古霉素等,把它称之为“超级菌”。它之所以具有如此高的毒性是因为该菌在产生抗药性的同时,还合成一种可攻击白血球的毒素叫PVL毒素,在欧洲国家、美国、日本、中国等8个国家传染较为普遍。近期有报道,这种高致病性的“超级抗药性金葡菌”在美国的西部至东部人群中传播,染病者的数字相当高,引起人们高度重视。这种抗药性金葡菌是经过长时间演化而成的。表现出几个特点:1)高抗药性。强力抗生素和药物对该菌不起杀死作用,具有强抗药性,因此,它照样引起感染和传染,具有致命性,所以把这种菌称为“超级菌”也不为过;2)该菌释放致命性物质即产生一种可溶性蛋白(PSMs),有“分子炸弹”之称,一般大多数医院的金葡菌并不制造这种PSM,而只有金葡菌的获得性PSM才显现其实力,从而其危险性就大大地增加了;3)超级金葡菌的致命点是摧毁人体免疫系统,其效力高于HIV,在美国,每年因超级金葡菌而导致死亡的人数达18000例,超过2005年美国死于艾滋病(AIDS)的16000人。

基于上面所述,我们应采取相应的对策以防止“超级致病菌”的发生和流行:1)警惕这类超级抗药性致病菌的流行;2)患者应该在医生指导下使用抗生素药物;3)各医院系统要重视超级致病菌的流行和产生的“土壤”。

(柯为供稿)