

紫外线诱变深黄被孢霉选育花生四烯酸高产菌株

于长青* 李丽娜

(黑龙江八一农垦大学食品学院 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 为获得生长活力较强, 产花生四烯酸能力强的菌株, 以微生物油脂产量和花生四烯酸产量为评价指标, 采用 2 轮紫外线诱变的方法, 利用单因素试验确定紫外线照射时间, 并采用气相色谱分析花生四烯酸含量。试验结果表明: 紫外灯功率 20 W, 照射距离 30 cm, 照射时间 80 s, 其致死率为 76.4%。经过诱变及菌种筛选, 获得 1 株高产菌株 Z80s2-109, 其总油脂含量为 16 g/L, 花生四烯酸产量为 2.34 g/L, 花生四烯酸产量比原始对照菌株提高 377%, 并且遗传性能稳定。

关键词: 花生四烯酸, 深黄被孢霉, 紫外线, 诱变

Breeding of Arachidonic Acid Producing Strain with *Mortierella Sabellina* by Ultraviolet Mutation

YU Chang-Qing* LI Li-Na

(Foodstuff College, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

Abstract: In order to gain the strain which has high growth vigor and whose biomass concentration satisfy further fermentation to produce arachidonic acid, we took the yield of microbes olein and arachidonic acid as evaluative index, adopted twice ultraviolet mutation, determined the time of ultraviolet irradiation by single factor experiment, and then the content of the arachidonic acid was measured by GC. The results of this experiment showed that the power of viltalight lamp was 20 W, exposure distance was 30 cm and exposure time was 80 s, lethality of spores of *Mortierella isabellina* was 76.4%. After twice ultraviolet mutation and repeatedly screen, a mutation of *Mortierella isabellina* Z80s2-109 whose arachidonic acid concentration in biomass were 3.77 times of the control strains was obtained and genetic stability.

Keywords: Arachidonic acid, *Mortierella isabellina*, Ultraviolet, Mutation

花生四烯酸(Arachidonic acid, AA或ARA)是人体的一种重要多不饱和脂肪酸^[1], 在维持细胞膜的结构和功能方面具有重要的作用, 它不仅作为一种极为重要的结构脂类广泛存在于哺乳动物的组织(特别是神经组织)器官中, 而且还是人体前列腺素合成的重要前体物质^[2], 具有广泛的生物活性和重要的营养作用, 已经在保健食品、化妆品、医药等

领域得到广泛应用^[3]。利用微生物发酵法生产花生四烯酸是制备花生四烯酸的新途径^[4]。

从 2000 年开始, 中科院等离子体物理研究所和华中科技大学生命科学技术学院的袁成凌、姚建铭、周蓬蓬、余龙江等人以高山被孢霉为出发菌株采用不同诱变方法进行诱变育种, 获得多株 ARA 高产菌株, ARA 产量最高达到 7.43 g/L^[5-7]。2005 年王啸、

邱树毅等人对深黄被孢霉(AS3.2793)进行复合诱变获得突变株MUI0310, ARA产量为 0.73 g/L^[8]。目前使用的出发菌株多为被孢霉属真菌, 由于野生菌株产花生四烯酸的能力很低, 因此需利用诱变育种等方法培育出高产菌株^[9-11]。紫外线在工业微生物育种史上曾经发挥过极其重要的作用, 迄今仍然是微生物育种中最常用和有效的诱变剂之一。鉴此, 本文以深黄被孢霉As3.3410 为出发菌株, 采用两轮紫外线诱变的方法, 选用含乙酰水杨的初筛培养基, 获得一株ARA高产菌株, 其总油脂含量和ARA含量都明显优于出发菌株。

1 材料与方 法

1.1 材 料

深黄被孢霉(*Mortierella isabellina* As3.3410), 购自中国科学院北京微生物研究所。

斜面培养基: PDA 培养基。

种子培养基: 葡萄糖 10 g, 磷酸二氢钾 0.1 g, 硫酸镁 0.03 g, 酵母膏 0.2 g, 硫酸铵 0.2 g, 蒸馏水 100 g, pH 6.1, 1×10^5 Pa灭菌 20 min。

产脂培养基: 葡萄糖 10 g, 柠檬酸钠 0.2 g, 磷酸二氢钾 0.2 g, 硫酸镁 0.05 g, 酵母膏 0.2 g, 蒸馏水 100 g, pH 6.0, 1×10^5 Pa灭菌 20 min。

初筛培养基: 添加乙酰水杨酸的 PDA 培养基。

1.2 设备与仪器

电子显微镜(XSP-2CA型, 上海光学仪器一厂), 电热恒温培养箱(DRP - 9082型, 上海森信实验仪器有限公司), 净化工作台(BCN - 1360, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司), 恒温振荡器(HEQ-D型, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司), 手提式高压消毒器(GMX¹-280, 山东医疗器械厂), 10 L发酵罐(GBJS10C, 镇江东方生物工程设备技术公司), 气相色谱(GC9900, 上海科创色谱仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 传代活化: 将试管斜面菌种转接到PDA斜面上, 恒温箱中 28°C 培养 7 d, 待孢子大量生成转变为灰色后, 4°C 冰箱保存, 或者作为斜面种子来制备孢子悬浮液。

1.3.2 孢子悬液的制备: 取 5 mL 无菌水洗下孢子, 用无菌脱脂棉过滤除去菌丝, 将孢子悬浮于无菌水中, 快速混匀器振荡 5 min, 使形成单孢子悬液浓度为 1×10^7 /mL。取 1 mL 此菌液稀释 10 倍, 振荡混匀,

制成 10^6 CFU/mL, 供诱变。

1.3.3 紫外线诱变: 取孢子悬液 5 mL 于直径为 90 mm 的平板中, 开启紫外灯, 预热 20 min, 开启磁力搅拌器, 打开平皿盖, 用 20 W 紫外灯照射, 照射距离 30 cm, 照射一段时间后, 把菌液转到无菌试管中, 0°C 培养 1 h~2 h, 28°C 避光培养 7 d, 挑取单菌落, 以待筛选。

1.3.4 培养方法: 摇瓶种子培养: 取 5 mL 无菌水洗下孢子, 然后注入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 28°C, 180 r/min 振荡培养 2 d。

摇瓶产脂培养: 取培养 2 d 的摇瓶种子培养液 5 mL 接入装有 50 mL 产脂培养基的 250 mL 三角瓶中, 振荡数次后, 28°C, 180 r/min 振荡培养 7 d。

1.3.5 油脂提取: 量取 10 mL 产脂培养 7 d 的发酵液, 置于具塞量筒中, 加入 1.25 mL 浓氨水, 充分摇匀。置于 60°C 水浴中加热 5 min, 再摇动 2 min, 加 95%乙醇 10 mL, 充分摇匀。于冷水中冷却后, 加 25 mL 乙醚, 摇动 30 s。加入 25 mL 石油醚, 充分摇匀, 静置 30 min, 使液层分离。当上层液澄清时, 读取醚层体积。吸出醚层 10 mL 置于一已知重量的脂肪瓶中, 蒸馏回收乙醚。将脂肪瓶置于 100°C 烘箱中干燥 1 h 后称重, 继续烘干 30 min 后再称重, 前后 2 次重量差小于 1 mg 即为恒重。

1.4 气相色谱分析花生四烯酸含量

样品的处理方法: 取微生物油脂 20 mg 溶于 2.5 mL 正己烷中, 加入 0.1 mL 0.5 mol/L 的甲醇钠溶液, 室温下轻摇 5 min, 然后加入少量的无水 Na_2SO_4 去除水分, 静置 1 h 后, 于 3000 r/min 下离心 3 min, 上清液进样。

气相色谱条件: 色谱柱为弹性石英毛细管柱 FFAP(30 m \times 0.32 mm \times 0.5 μm); 柱初温为 100°C, 以 8°C/min 升温至 240°C, 然后恒温至完成分析; 汽化室温度为 250°C; 载气流量为 48 mL/min; 氢气流量为 42 mL/min; 空气流量为 261 mL/min; 尾吹流量为 34 mL/min; 进样量为 4 μL 。测定结果以面积归一法计算 ARA 的含量。

1.5 10 L 发酵罐实验

GBJS10C 型发酵罐: 10 L 发酵罐装 8 L 产脂培养基; 接种量为 10%; 培养温度为 28°C; 转速为 180 r/min; 自然 pH; 发酵时间为 7 d。

1.6 突变株稳定性的测定

将诱变菌株连续传代 6 次, 每传代 1 次进行

ARA 产量的测定, 观察稳定性。

2 结果与分析

2.1 乙酰水杨酸浓度对抑菌效果的影响

乙酰水杨酸选择培养基: 取 12 片阿司匹林(每片含乙酰水杨酸 25 mg), 用 100 mL 无水乙醇溶解, 用微孔过滤器除菌, 加入到 50°C 左右的 PDA 培养基中, 加入量分别为 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%。

乙酰水杨酸浓度的确定: 取 0.2 mL 新培养的单孢子悬液涂筛选平板, 28°C 培养 5 d, 结果如图 1。乙酰水杨酸能通过对前列腺素合成酶氨基末端的乙酰化来抑制前列腺素合成过程中的氧化反应, 从而乙酰水杨酸会抑制 ARA 的生物合成, 因此筛选对乙酰水杨酸具有抗性的菌株, 可以获得 ARA 高产菌落。如图 1 显示乙酰水杨酸浓度为 5% 时无菌落生长, 但是, 乙酰水杨酸浓度过高, 会导致漏筛一些高产菌株。因此初筛培养基乙酰水杨酸浓度为 5%。

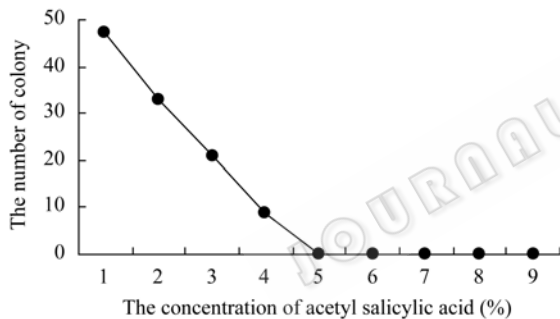


图 1 乙酰水杨酸浓度对抑菌效果的影响
Fig. 1 Effect of Sulfacetic Acid on bacteriostasis

2.2 紫外线诱变结果

2.2.1 紫外线诱变剂量对诱变效果的影响: 任何诱变剂都同时具有致死和诱变的双重效应, 因此需要测定深黄被孢霉经紫外照射后的致死率曲线, 确定最佳的诱变时间, 测得其紫外照射后的致死率曲线, 结果如图 2 所示。现代育种理论认为, 当诱变的微生物致死率在 75%~80% 时, 产量性状正突变率较高。因此本研究选择紫外线照射时间为 80 s, 致死率为 76.4%。

2.2.2 第一轮诱变结果: 本研究选择的紫外线诱变剂量为: 用 20 W 紫外灯照射, 照射距离 30 cm, 照射时间 80 s。初筛时挑选菌落出现较早, 菌落直径

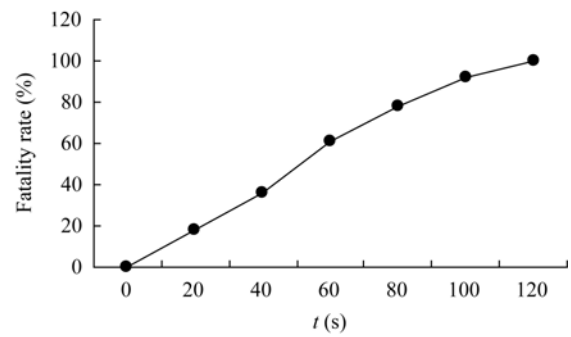


图 2 紫外线对深黄被孢霉的致死率
Fig. 2 Inhibition of ultraviolet radiation on *Mortierella isabellina*



图 3 菌落形态
Fig. 3 The photograph of colonial morphology

较大, 生长旺盛的菌落, 菌落形状如图 3。

初筛共筛选出 200 株菌进行种子培养与产脂培养, 测定生物量和总油脂含量, 将两个指标均高的发酵液进行气相色谱分析, 测定微生物油脂中花生四烯酸含量, 其中 10 株 ARA 产量最高的菌株筛选结果如图 4。

根据图 4 数据比较分析, 其中突变株 Z80s1-92 和 Z80s1-166 的总油脂产量最高, 为 13 g/L。突变株 Z80s1-76 的总油脂中 ARA 含量最高, 为 12.2%。ARA 的产量不仅受总油脂产量的影响, 还受微生物油脂中 ARA 含量的影响, 综合上述两种影响因素, 本轮诱变选择突变株 Z80s1-92 为第二轮诱变的出发菌株, 其 ARA 产量为 1.52 g/L, 比原始对照菌株的 ARA 产量提高 245%。因此, 可以看出, 紫外线诱变是选育菌种的一个比较好的方法。

2.2.3 第二轮诱变结果: 取第一轮诱变产量最高的突变株 Z80s1-92 进行第二轮微波诱变, 诱变条件和方法同第一轮诱变条件, 共筛选出 10 株产量较高的突变株, 筛选结果如图 5。

根据图 5 数据比较分析, 其中突变株 Z80s2-97、

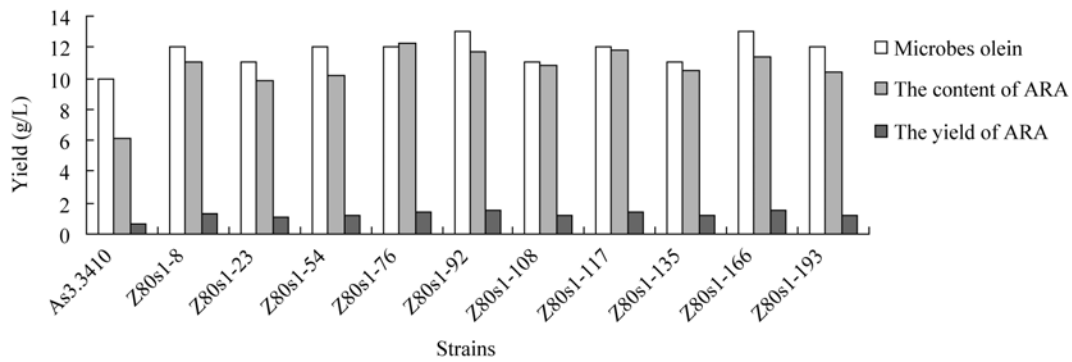


图4 第一轮诱变结果

Fig. 4 The result of the first ultraviolet mutation

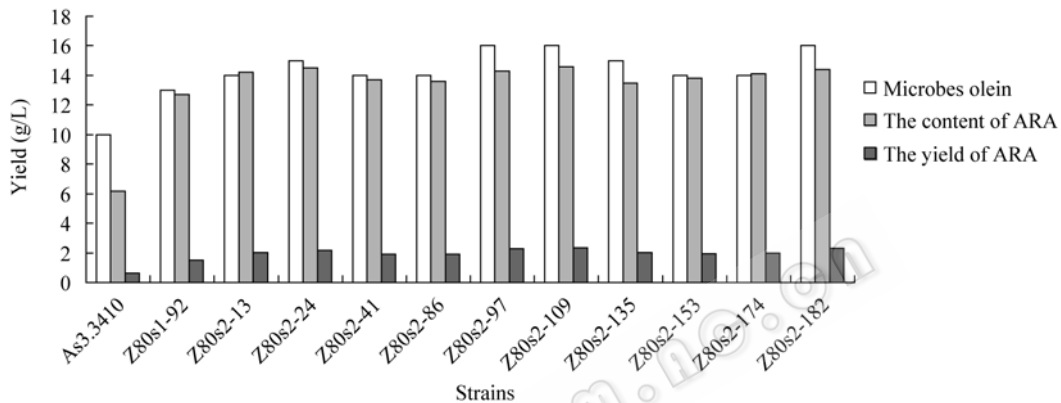


图5 第二轮诱变结果

Fig. 5 The result of the twice ultraviolet mutation

Z80s2-109 和 Z80s2-182 的总油脂产量最高, 为 16 g/L; 突变株 Z80s2-109 的总油脂中 ARA 含量最高, 为 14.6%, 其 ARA 产量也最高, 为 2.34 g/L, ARA 产量比原始对照菌株提高 377%, 比出发菌株 Z80s1-92 提高了 153%。实验表明, 经过两轮诱变筛选, ARA 产量明显提高, 但是第二轮诱变 ARA 产量提高的幅度远远小于第一轮诱变。其原因是由于对出发菌株进行诱变次数过多会导致出发菌株对诱变剂的不敏感, 因此本研究只进行了两轮诱变。

2.2.4 10 L 发酵罐实验结果: 如图 6 所示, 经 10 L 发酵罐发酵, 突变株 Z80s2-109 的总油脂产量和 ARA 产量分别比原始菌株提高了 50% 和 247%。

2.2.5 高产菌株的遗传稳定性实验结果: 通过紫外线诱变所得的 ARA 高产菌株 Z80s2-109 与原始菌株进行继代遗传稳定性实验的比较研究。每传一代进行 ARA 含量测定, 结果如图 7。结果表明该菌株的遗传性能较稳定, 未发生原位回复突变等情况。同时进一步证明紫外线诱变微生物育种是有效的。

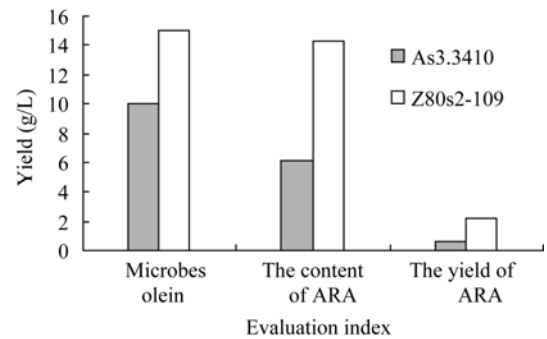


图6 10 L 发酵罐发酵结果

Fig. 6 The yield of fermentation

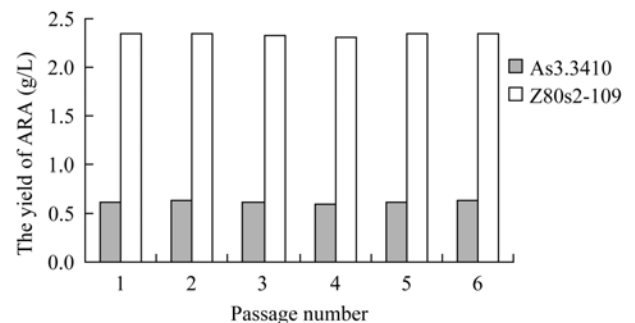


图7 Z80s2-109 遗传稳定性实验结果

Fig. 7 ARA yields of As3.3410 and Z80s2-109 having been propagated for six generations

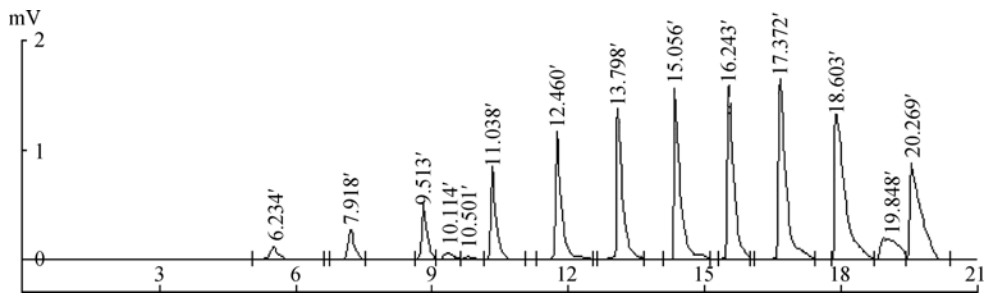


图 8 突变株 Z80s2-109 微生物油脂气相色谱分析结果

Fig. 8 The gas chromatographic analysis result of microbes olein on mutant strain Z80s2-10

2.3 气象色谱分析结果

本研究所采用的毛细管气象色谱程序升温条件, 可以将饱和与不饱和长链脂肪酸甲酯分开。检测出的脂肪酸结果如图 8。结果表明, 高产菌株 Z80s2-109 经发酵获得的微生物油脂中 ARA(保留时间为 17.372 min)的含量为 14.6%, 另外还含有丰富的其他多不饱和脂肪酸。

3 讨论

菌种是发酵工业的关键, 只有具备了良好的菌种基础, 才能通过改进发酵工艺和设备, 得到理想的发酵产品。目前工业生产上应用的优良菌种, 绝大多数都是经过诱变处理后的高产菌株。本研究选择的紫外线诱变剂量为: 用 20 W 紫外灯照射, 照射距离 30 cm, 照射时间 80 s。通过两轮诱变筛选出 ARA 高产菌株 Z80s2-109, 使其 ARA 产量比原始对照菌株提高了 377%, 达到 2.34 g/L, 说明了深黄被孢霉 As3.3410 具有较强的生产 ARA 的能力。如果采用多种诱变剂进行处理, 可以防止诱变效应的饱和, 同时进行培养基成分的优化, 有望进一步提高 ARA 产量。

参考文献

- [1] Seki T, Eiji S, Akiko T, *et al.* Transformation of oil-producing fungus, *Mortierella alpina* IS-4. using zeocin, and application to arachidonic acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2005, **100**(6): 617-622.
- [2] James GM, Paul R, Daniel F, *et al.* Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science*, 2001, **293**: 290-293.
- [3] 于长青, 李丽娜. 花生四烯酸研究进展. *农产品加工(学刊)*, 2007, **4**: 10-12.
- [4] Eiji S, Takahiro A, Ketta I, *et al.* A novel fungal ω 3-desaturase with wide substrate specificity from arachidonic acid-producing *Mortierella alpina* IS-4. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **66**: 648-654.
- [5] 周蓬蓬, 余龙江, 汪建华, 等. 微波等离子体溅射诱变选育花生四烯酸高产菌及补料工艺研究. *激光生物学报*, 2003, **1**: 59-62.
- [6] 袁成凌, 姚建铭, 王纪, 等. 低能离子注入在花生四烯酸(AA)高产菌株选育中的研究. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2003, **04**: 237-242.
- [7] 朱敏, 余龙江, 肖靓, 等. 高山被孢霉的红四氮唑染色程度与菌体油脂中花生四烯酸含量的关系. *生命科学研究*, 2004, **04**: 339-343.
- [8] 王啸, 邱树毅, 叶丹, 等. 花生四烯酸产生菌的选育. *贵州工业大学学报(自然科学版)*, 2005, **34**(01): 56-59.
- [9] 马雪瑞. Co^{60} 辐射诱变深黄被孢霉高产多不饱和脂肪酸突变株的选育. 中国科学院研究生院硕士论文, 2004.
- [10] Eiji S, Yuriko H, Nozomu K, *et al.* Improvement of arachidonic acid production by mutants with lower n-3 desaturation activity derived from *Mortierella alpina* IS-4. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **66**: 243-248.
- [11] Kenichi H, Shigeaki F, Enoch Y, *et al.* Production of arachidonic acid by *Mortierella Fungi*. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2002, **7**(5): 252-262.