

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(1) 44-48; 4 January 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

深黄被孢霉高产花生四烯酸菌株的紫外诱变原生质体育种

于长青, 李丽娜

(黑龙江八一农垦大学食品学院, 大庆 163319)

摘要 【目的】为了获得一株生长活力较强, 产花生四烯酸能力强的菌株。【方法】我们以干菌重、微生物油脂产量和花生四烯酸产量为评价指标, 采用紫外线诱变原生质体的方法。我们利用单因素实验确定了紫外线诱变剂量, 并采用气相色谱分析了花生四烯酸含量。【结果】试验结果表明: 紫外灯功率 20 W, 照射距离 30 cm, 照射时间 40 s, 其致死率为 79.5%。【结论】经过诱变及菌种筛选所获得高产菌株 YZ-124 的生物量为 36.5 g/L, 微生物油脂含量为 19.2 g/L, 花生四烯酸含量为 4.72 g/L, 花生四烯酸产量比出发菌株 AS3.3410 提高 576%, 并且遗传性能稳定。

关键词: 花生四烯酸; 深黄被孢霉; 原生质体; 紫外线; 诱变

中图分类号: Q319.33 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)01-0044-05

花生四烯酸(Arachidonic acid, AA 或 ARA)是 5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸, 作为人体的一种重要多不饱和脂肪酸^[1], 在维持细胞膜的结构与功能方面具有重要的作用, 是人体前列腺素合成的重要前体物质, 具有广泛的生物活性和重要的营养作用^[2], 已经在保健食品、化妆品、医药等领域得到广泛应用^[3]。

ARA 的传统来源是动物肝脏、猪肾上腺、血液、鱼油和蛋黄等^[4], 但动物组织中的 ARA 含量很低, 约为 0.2%, 并且受来源和季节的限制。研究人员发现低等真菌^[5], 特别是被孢霉属真菌含有大量的 ARA, 利用微生物制取 ARA 既可以降低成本, 又可以提高 ARA 的产量, 弥补动、植物资源的不足, 有利于 ARA 大量地被使用, 得到了国内外研究人员的广泛关注^[6]。

霉菌能生产高比例的不饱和脂肪酸, 油脂含量超过 25% 的霉菌约有 64 种, 开发潜力很大, 能产 ARA 的霉菌一般在低等真菌中存在^[7]。真菌在自然界分布广且易培养, 野生菌株产花生四烯酸的能力很低, 因此要利用诱变育种和遗传工程等方法培

育出高产菌株^[8-13]。孢子对诱变剂较为迟钝, 获得的突变株大部分是负突变株, 且长时间使用同一种诱变剂处理, 孢子对诱变条件会产生一定抗性^[14], 而原生质体一般由对数生长期细胞制得, 活力较强, 对环境和诱变剂较为敏感, 破壁和再生过程中又淘汰了大量弱势菌株, 能再生的菌株不论初级代谢与次级代谢过程均较活跃, 正突变菌株比例大^[15]。我们已经对深黄被孢霉 AS3.3410 进行了紫外线诱变和微波诱变, 但由于孢子的细胞壁较厚, 影响了诱变剂的作用效果^[16]。原生质体作为单个脱壁细胞, 可以在高渗透压溶液中处于悬浮状态, 同时原生质体具有细胞的全能性及细胞壁再生的能力, 是一种良好的诱变材料^[17-18]。

1 材料和方法

1.1 材料

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

1.1.2 培养基及溶液: ①斜面培养基、种子培养基

基金项目: 黑龙江省教育厅利心护肝保健乳制品关键技术研究项目(10551226)

作者简介: 于长青(1969-), 男, 黑龙江大庆人, 副教授, 在职博士研究生, 从事畜产品加工和功能性食品研究与开发。Tel: +86-459-6819231; Fax: +86-459-6819235; E-mail: spxyycq@126.com

收稿日期: 2008-08-05; 修回日期: 2008-09-26

和产脂培养基请见参考文献[5]。原生质体再生培养基:含3% NaCl的PDA培养基。②混合酶溶液请见参考文献[14]。③缓冲溶液:请见参考文献[14]。

1.1.3 主要试剂和仪器:蜗牛酶和纤维素酶,购自哈尔滨无限峰试剂公司;ARA标准品,购自美国Sigma公司。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(GMX-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)。

1.2 培养方法

PDA斜面培养、摇瓶种子培养和摇瓶产脂培养:请见参考文献[5]。

1.3 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,快速混匀器震荡5 min,使形成单孢子悬液浓度为 10^8 cfu/mL。取1 mL此菌液稀释10倍,震荡混匀,制成 10^7 cfu/mL,供诱变。

1.4 原生质体的制备

将新鲜的孢子悬浮液镜鉴无污染后,用无菌脱脂棉过滤除去菌丝,制成孢子悬浮液,取2 mL孢子悬浮液到10 mL离心管中,加入2 mL β -巯基乙醇,28℃下前处理1 h,加入5 mL缓冲溶液洗涤2次。加入适量的混合酶溶液,在适当的温度下,酶解一定的时间。酶解结束时,加入5 mL缓冲溶液终止酶解反应,混匀,离心($300 \times g$, 10 min),去上清液,加5 mL缓冲溶液洗涤2次,离心($300 \times g$, 10 min/次)。去上清液,加1 mL缓冲溶液稀释,涂平板,计算原生质体生成率和再生率。

$$\text{生成率} = (A - B) / A \times 100\%$$

$$\text{再生率} = (C - B) / (A - B) \times 100\%$$

A:为酶解前菌体稀释液在普通PDA培养基上的菌落数

B:为原生质体稀释液在普通PDA培养基上长出的菌落数

C:对原生质体稀释液在高渗PDA培养基上长出的菌落数

1.5 紫外线诱变深黄被孢霉原生质体

取原生质体悬液(浓度为 10^7 cfu/mL)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℃培养1 h~2 h,28℃避光培养7 d,挑取单菌落,以待筛选。

1.6 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25 mg于容量瓶,加入1%硫酸-甲醇混合液5 mL,于70℃水浴中加热2 h,然后加入5 mL正己烷清洗一次,合并上清液,放入10 mL离心管中,加入少量的无水 Na_2SO_4 去除水分,静置4 h,进样。

气相色谱条件^[19]:色谱柱为弹性石英毛细管柱FFAP(30 m \times 0.32 mm \times 0.5 μm)。

1.7 610 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℃,转速为180 r/min,自然pH,发酵时间为7 d。

1.8 遗传稳定性实验

用菌体连续传代的方法考察原生质体再生诱变后筛选到的ARA高产菌株的遗传稳定性。将该菌株制备孢子悬浮液,涂布于PDA培养基平板,28℃培养7 d后随机挑取3个单菌落,每代做3个平行样,每传一代测定ARA产量,连续传6代。

2 结果和分析

2.1 紫外线诱变剂量对原生质体致死率的影响

我们已采用二次回归正交旋转组合试验方案对原生质体制备条件进行了优化,得到最佳制备条件为:酶浓度为4%(混合酶在孢子悬浮液中的浓度),酶解温度为30℃,酶解时间为7.5 h。因此本实验采用此条件按照1.4论述的方法制备原生质体,将得到的原生质体按照1.5论述的方法进行紫外线诱变原生质体。任何诱变剂都同时具有致死和诱变的双

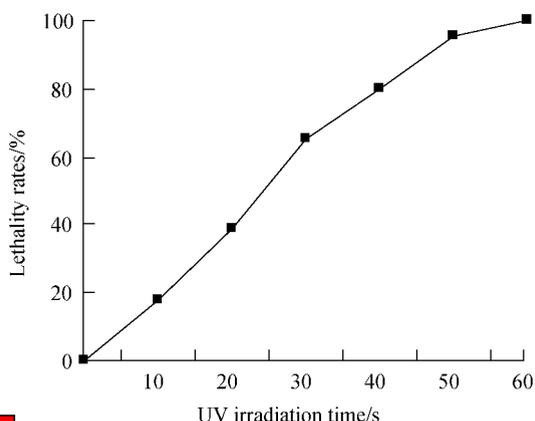


Fig. 1 紫外线诱变剂量对原生质体致死率的影响

Effect of inhibition of ultraviolet radiation on protoplast.

重效应,因此需要测定深黄被孢霉的原生质体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1所示。

如图1可以看出,原生质体的致死率随着紫外线照射时间的增加而逐渐增加,当紫外线照射时间为40 s时,致死率为79.5%,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^[8],而更高的致死率下,虽然突变率可能较高,但负突变率往往很高,而正突变率却很低。因此本研究选择紫外线照射时间为40 s,实验证明较为有效。与紫外线诱变深黄被孢霉孢子相比较,在

相同的诱变条件下,致死率达到75%~80%时,照射时间节约40 s,说明孢子细胞壁对诱变剂的作用效果具有一定的影响。

2.2 紫外线诱变原生质体结果

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40 s。初筛时挑选大菌落,且孢子丰富的菌落。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,选出10株ARA产量最高的菌株,筛选结果如图2。

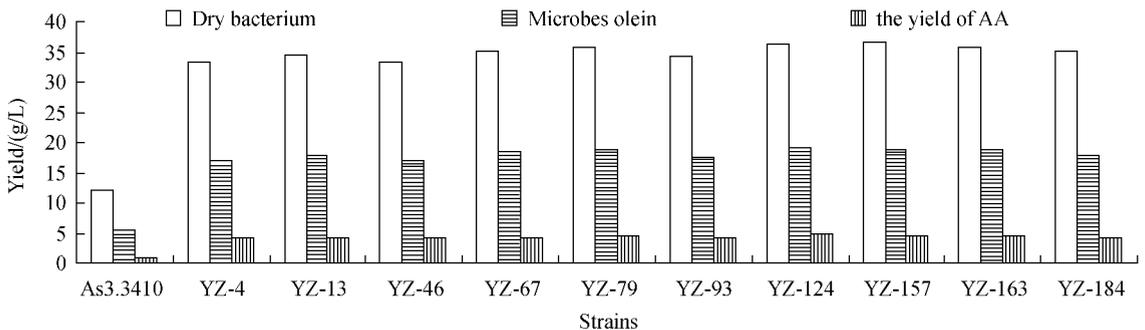


图2 紫外线诱变原生质体结果

Fig.2 The result of ultraviolet mutation.

根据图2数据比较分析,其中突变株YZ-124的生物量为36.5 g/L,微生物油脂含量为19.2 g/L,ARA含量为4.72 g/L,ARA产量比出发菌株AS3.3410提高576%。突变株YZ-124与之前所做的紫外线诱变深黄被孢霉孢子得到的突变株Z80s2-109相比较,微生物油脂含量提高了120%,ARA产量提高了201%,说明紫外诱变深黄被孢霉原生质体选育ARA高产菌株的方法是可行的,诱变效果是显著的。

2.3 10 L发酵罐实验结果

如表1所示,经10 L发酵罐发酵,突变株YZ-124的干菌重、微生物油脂产量和ARA产量分别比原始菌株提高了291%、314%和506%。

表1 10 L发酵罐发酵实验结果

Table 1 The result of fermentation

Strains	Biomass(g/L)	Yield of lipid(g/L)	Yield of ARA(g/L)
AS3.3410	11.97	5.48	0.82
YZ-124	34.83	17.2	4.15

但是,10 L发酵罐实验结果却没有达到三角瓶发酵的效果。其原因有可能如下(1)被孢霉产生的油脂在细胞内积累,三角瓶发酵时,发酵液中装有玻璃珠,起到打碎细胞的作用。在10 L发酵罐发酵过

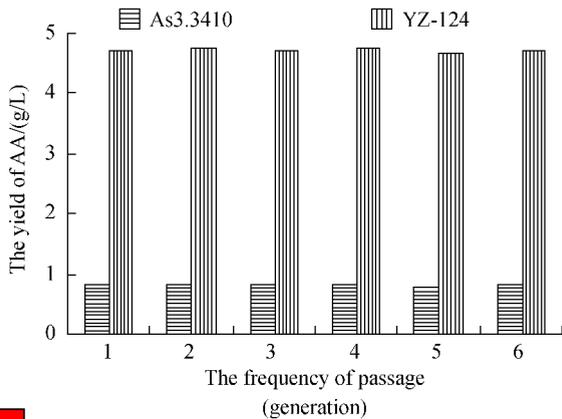
程中,尝试用此方法来破碎细胞,但没有得到预期效果(2)三角瓶发酵的培养基组分不能适应大规模生产(3)10 L发酵罐发酵时接种量过小(4)10 L发酵罐发酵过程,菌体生长速度大于三角瓶发酵,消耗培养基的速度也随之加快,因此在发酵后期,影响了ARA的合成。尽管如此,但就ARA产量上看已经基本达到国内工业生产水平。

2.4 高产菌株的遗传稳定性实验

通过紫外线诱变原生质体所得的ARA高产菌株YZ-124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,结果显示(图3)ARA产量与传代前菌株相比无显著差异,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。同时进一步证明原生质体再生诱变育种的可行性。

2.5 气相色谱实验结果

本研究所采用的毛细管气相色谱程序升温条件,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4所示,A图为ARA标准品气相色谱分析图,根据标准品浓度,ARA的保留时间为17.554 min,与相关资料的报道一致。图中有3个峰的原因是标准品纯度不够高且甲酯化不彻底



3 YZ-124 遗传稳定性实验结果

Fig. 3 ARA yields of As3.3410 and YZ-124 having been propagated for six generations.

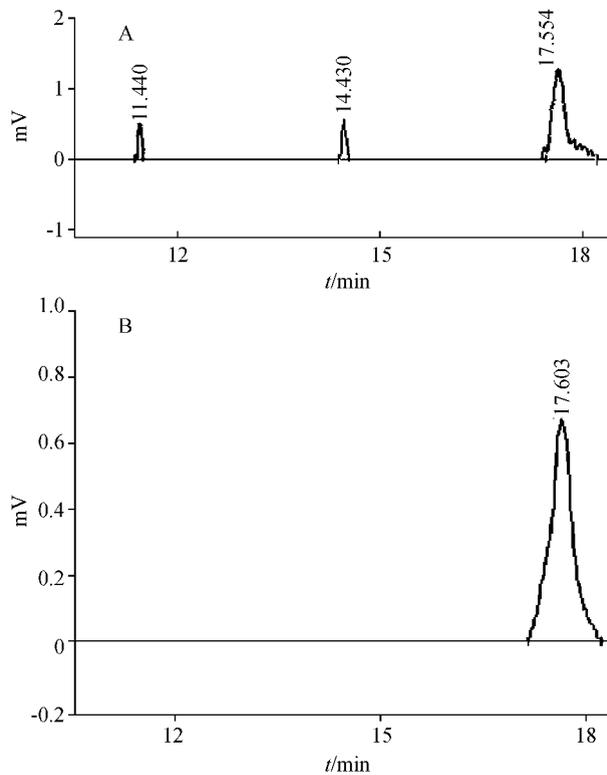


图 4 微生物油脂气相色谱分析结果

Fig. 4 The gas chromatographic analysis result of microbes olein. A : standard preparation ; B : mutant strain YZ-124.

(对照空白样也显示 2 个峰)。目前不饱和脂肪酸甲基化的最好方法是使用 BF₃, 但是 BF₃ 有巨毒, 为了避免对实验室及实验人员造成污染与伤害, 本实验没有选择此种方法。B 图为高产菌株 YZ-124 的气相色谱分析图, 根据标准品中 ARA 的保留时间, B 图中 AA 的保留时间为 17.603 min, 与标准品的保留时间相差 0.049 min, 小于 5%, 符合误差要求, 实验误差产生的原因是进样后启动程序的速度不一样。高产菌株 YZ-124 经发酵后获得的微生物油脂中

ARA 的含量为 24.6%, 另外还含有丰富的其他多不饱和脂肪酸。

3 结论

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^[20]。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。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^[8, 11, 12, 14]。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^[5]。本文通过对深黄被孢霉原生质体制备条件的优化, 得到了深黄被孢霉原生质体制备的最佳条件为: 酶浓度为 4%, 酶解温度为 30℃, 酶解时间为 7.5 h。用此方法制备原生质体, 使其在适当的紫外线诱变剂(紫外灯功率 20 W, 照射距离 30 cm, 照射时间 40 s)作用下, 经过初筛和复筛获得的突变株 YZ-124, 其生物量为 36.5 g/L, 微生物油脂含量为 19.2 g/L, ARA 含量为 4.72 g/L, ARA 产量比出发菌株 AS3.3410 提高 576%, 并且该菌株遗传性能稳定。因此, 可以证明紫外线诱变原生质体微生物育种的可行性, 同时也说明了深黄被孢霉 AS3.3410 具有较强的生产 ARA 的能力。今后, 我们准备采用分子生物学法对突变株 YZ-124 进行鉴定, 同时进行种子培养基和产脂培养基成分的优化, 这样有望进一步提高 ARA 产量。由于 10 L 发酵罐实验结果没有三角瓶实验结果好, 我们还要对培养基及培养条件进行优化。如果采用多种诱变剂进行处理, 可以防止诱变效应的饱和, 进一步提高 ARA 产量。我们还可以将此法运用到工业菌株 (*M. alpina*) 上, 以便进一步提高 ARA 产量。

参考文献

- [1] 李冠, 杜钰, 黄琼, 等. 脂肪酸脱氢酶研究进展. 食品与生物技术学报 (*Journal of Food Science and Biotechnology*) 2007 (02): 121 - 126.
- [2] 杨朝霞, 张丽, 李朝阳. 花生四烯酸的营养保健功能. 食品与药品 (*Food and Drug*) 2005 (01): 69 - 71.
- [3] 姚昕, 秦文, 齐春梅, 等. 花生四烯的生理活性极其应用. 粮油加工与食品机械 (*Mechinery for Cereals Oil and Food Processing*) 2004 (05): 57 - 59.

- [4] 符嫦娥, 韩伟, 卞进发, 等. 花生四烯的研究进展. 云南化工(*Yunnan Chemical Technology*) 2004 (05) 31 - 34.
- [5] 王啸, 邱树毅, 叶丹, 等. 花生四烯产生菌的选育. 贵州工业大学学报(自然科学版)(*Journal of Guizhou University of Technology(Natural Science Edition)*), 2005 , (01) 56 - 59.
- [6] 王啸, 邱树毅. 微生物发酵生产花生四烯酸的研究进展. 中国油脂(*China Oils and Fats*) 2004 (09) 37 - 40.
- [7] Takeno S, Sakuradani E, Tomi A, 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, 10(6) 617 - 622.
- [8] 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(*Journal of Radiation Research and Radiation Processing*) 2003 (04) 237 - 242.
- [9] 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. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2005 66 648 - 654.
- [10] Higashiyama K, Fujikawa S, Park EY, et al. Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2002, 7(5) 252 - 262.
- [11] 周蓬蓬, 秦文敏, 余龙江, 等. 毛霉菌对被孢霉产生花生四烯酸的影响. 生命科学研究(*Life Science Research*), 2002 (3) 246 - 249.
- [12] 周蓬蓬, 余龙江, 李为, 等. YAG 激光照射对高山被孢霉花生四烯产量的影响. 激光生物学报(*Acta Laser Biology Sinica*) 2002 (05) 372 - 376.
- [13] Brick EE, Garfield S, Hoffman DR, et al. A randomized controlled trial of early dietary supply of long chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. *Developmental Medicine and Child Neurology* 2000 , 42 :174 - 181.
- [14] 周蓬蓬, 余龙江, 朱敏, 等. 花生四烯产生菌的原生质体诱变育种. 华中理工大学学报(*Journal of Huazhong University of Science and Technology*), 2000 (07) :105 - 110.
- [15] 杜海英, 于宏伟, 朝军, 等. 原生质体诱变选育乳糖酶高产菌株. 微生物学通报(*Microbiology*), 2006, 33(6) : 48 - 51.
- [16] 谭珍连, 梁静娟, 庞宗问, 等. 原生质体紫外诱变选育白地霉 GXU08 脂肪酶高产菌株. 生物技术(*BioTechnology*) 2007, 17(2) 42 - 44.
- [17] 陈冬纯, 周传云. 根霉、酵母原生质体的制备与融合探讨. 现代食品科技(*Modern Food Science and Technology*) 2005, 22(1) 26 - 29.
- [18] 蔡车国, 刘月英, 戴玉聪, 等. 用原生质体融合法优化啤酒酵母的凝聚性和发酵性能. 厦门大学学报(自然科学版)(*Journal of Xiamen University(Natural Science)*), 2006, 45(1) :110 - 112.
- [19] 何平. 花生四烯酸在奶粉中的应用. 中国乳品工业(*China Dairy Industry*) 2003 (03) 61 - 62.
- [20] Jin MJ, Huang H, Xiao AH, et al. A novel two-step fermentation process for improved arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. *Biotechnology Letters* , 2008, 30(6) 87 - 91.

Breeding of arachidonic acid producing *Mortierella sabellina* by ultraviolet mutation

Changqing Yu* , Lina Li

(College of Food Science, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, China)

Abstract [Objective] We obtained a new mutant with higher growth rate and high capability of producing arachidonic acid after protoplast ultraviolet mutation. **[Methods]** Using dry weight of biomass, microbial total lipid and total arachidonic acid production as evaluation index, we determined time of ultraviolet irradiation by single factor experiment and measured the content of the arachidonic acid by gas chromatography. **[Results]** When the power of vitalight lamp was set at 20W, exposure distance at 30cm and exposure time at 80 s, lethality of spores of *Mortierella isabellina* was 76.4%. **[Conclusion]** After ultraviolet mutation and repeatedly screening, a mutant of *Mortierella isabellina* YZ-124 whose arachidonic acid concentration in biomass was 5.76 times of the control strains was obtained.

Keywords : arachidonic acid ; *Mortierella isabellina* ; protoplast ; ultraviolet ; mutation

(本文责编 : 王晋芳)

Supported by the Department of Education of Heilongjiang Province in China (10551226)

* Corresponding author. Tel : + 86-459-6819231 ; Fax : + 86-459-6819235 ; E-mail : spxyycq@126.com

Received 5 August 2008/Revised 26 September 2008