

文章编号:1673-1689(2009)01-0117-05

深黄被孢霉高产花生四烯酸菌株的微波诱变育种

李丽娜, 汤华成, 于长青*

(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 ARA 能力强的菌株, 以干菌重、微生物油脂产量和花生四烯酸 (ARA) 产量为评价指标, 采用两轮微波诱变的方法, 利用单因素试验确定微波累计加热时间, 并采用气相色谱分析 ARA 含量。试验结果表明: 微波频率为高档, 累计加热时间为 35 s, 其致死率为 78.3%。经过两轮微波诱变及菌种筛选, 获得一株高产菌株 W35s2-153, 其生物量为 30.85 g/L, 总油脂含量为 15.5 g/L, ARA 质量浓度为 2.61 g/L, ARA 产量比原始对照菌株提高 3.18 倍, 并且遗传性能稳定。

关键词: 花生四烯酸; 深黄被孢霉; 微波; 诱变

中图分类号: Q 319.33

文献标识码: A

Breeding of Arachidonic acid Producing Strain with *Mortierella sabellina* by Microwave Mutation

LI Li-na, TANG Hua-cheng, YU Chang-qing*

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

Abstract: The aim of this study was to screen a high growth vigor, high biomass concentration, high ARA production strain. For this, two twice microwave mutation (hypso-step and 35 s heating time) was adopted, the dried mycelia, microbes olein yield, and ARA yield of the mutants were determined to select the aim mutant. Strain W35s2-153, which arachidonic acid content was higher 3.18 times than that of the parent, was screened. The mutants exhibited high genetic stability.

Key words: arachidonic acid, *Mortierella isabellina*, microwave, mutation

花生四烯酸 (Arachidonic acid, AA 或 ARA), 系统名为 5,8,11,14-全顺-二十碳四烯酸, 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^[1]。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, 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。

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

收稿日期: 2008-03-14。

基金项目: 黑龙江省教育厅项目 (10551226)。

* 通讯作者: 于长青 (1969-), 男, 黑龙江大庆人, 博士研究生, 副教授, 主要从事畜产品加工和功能性食品方面的研究与开发。Email: spxypjb@126.com

高产菌株,ARA产量最高达到7.43 g/L^[2-9]。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^[10]。

微波是近年来发展的新型诱变剂,其生物学效应分为热效应和非热效应。但有关微波在 ARA 诱变选育中的应用尚未见报道。作者以深黄被孢霉 *As3. 3410* 为出发菌株,采用两轮微波诱变的方法,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 菌种和培养基

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

2) 斜面培养基:PDA 培养基。

3) 种子培养基:葡萄糖 10 g/dL,磷酸二氢钾 0.1 g/dL,硫酸镁 0.03 g/dL,酵母膏 0.2 g/dL,硫酸铵 0.2 g/dL。pH 6.1,121 °C 灭菌 20 min。

4) 产脂培养基:葡萄糖 10 g/dL,柠檬酸钠 0.2 g/dL,磷酸二氢钾 0.2 g/dL,硫酸镁 0.05 g/dL,酵母膏 0.2 g/dL。pH 6.0,121 °C 灭菌 20 min。

5) 初筛培养基:添加乙酰水杨酸的 PDA 培养基。

1.2 主要仪器设备

XSP-2CA 型电子显微镜,上海光学仪器一厂制造;DRP-9082 型电热恒温培养箱,上海森信实验仪器有限公司制造;BCN-1360 型净化工作台,哈尔滨东联电子技术开发有限公司制造;HEQ-D 型恒温振荡器,哈尔滨东联电子技术开发有限公司制造;GMX-280 型手提式高压消毒器,山东医疗器械厂制造。

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 cfu/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 微波诱变 取孢子悬液 5 mL 于直径为

90 mm 的平板中,开启微波炉,加热一段时间后,再转到筛选培养基中,28 °C 避光培养 5 d,进行初筛、复筛。

1.3.4 培养方法

1) 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 的三角瓶中,28 °C、180 r/min 振荡培养 2 d。

2) 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 的三角瓶中,振荡数次后,28 °C、180 r/min 振荡培养 7 d。

1.3.5 菌体收集 将产脂培养 7 d 的摇瓶取出,分组离心,去上清液,加蒸馏水水洗 2 次,取沉淀物,放入铝盒中,75 °C 烘干至恒重,称干重,计算生物量。生物量计算公式:生物量 = 每克菌体干重/发酵液体积(升)

1.3.6 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,加体积分数 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,置于一已知质量的脂肪瓶中,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,前后两次质量差小于 1 mg 即为恒重。脂肪质量分数计算公式:

$$\text{脂肪质量分数} = \frac{\text{称得的脂肪质量} \times \text{醚层的总体积}}{\text{样品的质量} \times \text{测定时所取醚层的体积}} \times 100\%$$

1.4 气相色谱分析花生四烯酸含量

1) 样品的处理方法:取微生物油脂 25 mg 于容量瓶中,加入体积分数 1% 硫酸-甲醇混合液 5 mL,于 70 °C 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。

2) 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;载气体积流量为 48 mL/min;氢气体积流量为 42 mL/min;空气体积流量为 261 mL/min;尾吹体积流量为 34 mL/min;进样量为 4 μL 。

1.5 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 乙酰水杨酸质量浓度对抑菌效果的影响

2.1.1 培养基的选择 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 ℃ 左右的 PDA 培养基中,加入量分别为 1,2,3,4,5,6,7,8,9 g/dL。

2.1.2 乙酰水杨酸质量浓度的确定 取 0.2 mL 新培养的单孢子悬液涂筛选平板,28 ℃ 培养 5 d,结果见图 1。乙酰水杨酸质量浓度大于 5 g/dL 时无菌落生长。乙酰水杨酸能通过对前列腺素合成酶的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,可以提高 ARA 的产量。但是,乙酰水杨酸质量浓度过高,会漏筛一些高产菌株。因此初筛培养基乙酰水杨酸质量浓度为 5 g/dL。

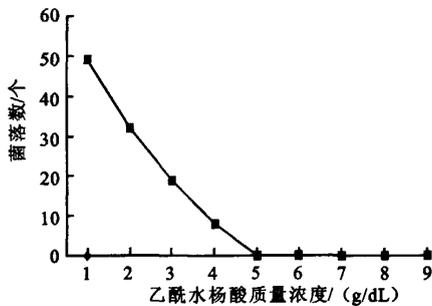


图 1 乙酰水杨酸质量浓度对抑菌效果的影响

Fig.1 Effect of salicylic acid on bacteriostasis

2.2 微波诱变结果

2.2.1 平皿盖对诱变的影响 诱变过程中平皿盖加否对实验结果的影响见表 1。结果表明,在诱变过程中,加平皿盖的 ARA 产量高于不加平皿盖的,并且加平皿盖还可以防止杂菌污染,因此作者选择诱变过程加平皿盖。由于加平皿盖会阻碍散热,因此在试验过程中选择加热 5 s,停 8 s 的加热方法。

表 1 平皿盖对诱变的影响

Tab.1 Effect of plate cover on mutation

方式	干菌重/ (g/L)	总油脂质量 浓度/(g/L)	ARA 质量 浓度/(g/L)
不加盖	15.8	6.3	1.26
加盖	19.42	8.35	1.49

2.2.2 微波频率对诱变的影响 选择的微波频率为高火档和中高档,分别累计加热 35 s,结果见表 2。结果表明,选用高火的微波频率诱变结果好于中高频率,因此作者采用高火频率进行诱变。

表 2 微波频率对诱变的影响

Tab.2 Effect of frequency on mutation

微波 频率	干菌重/ (g/L)	总油脂质量 浓度/(g/L)	ARA 质量 浓度/(g/L)
高火	19.42	8.35	1.49
中高	16.30	6.90	1.17

2.2.3 微波剂量对诱变效果的影响 微波加热时间与深黄被孢霉致死率的关系见图 2。根据育种工作者长期的研究和实践经验,认为较低的杀菌率有利于正突变株的产生,当诱变的微生物致死率在 75%~80% 时,产量性状正突变率较高。因此作者选择累计加热时间为 35 s(即加热 7 次)。

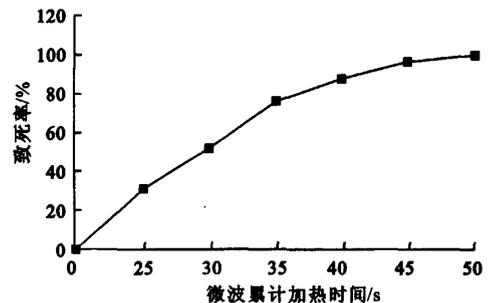


图 2 微波剂量对诱变效果的影响

Fig.2 Effect of mutation dose on mutation

2.2.4 第一轮诱变结果 作者选择高档频率,累计加热 35 s。菌种的生长性能好,在固体培养基上形成的菌落就大,反之则小。深黄被孢霉的代谢产物 ARA 为不饱和脂肪酸,常温下类似油状,在固体培养基上会渗入培养基形成透明圈。透明圈越大,说明产花生四烯酸量越多。因此初筛时挑选大菌落,并且透明圈与菌落比大的菌落。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,其中 10 株 ARA 产量最高的菌株筛选结果见表 3。

表 3 第一轮诱变结果

Tab.3 The result of the first mutation

菌株	干菌重/ (g/L)	总油脂质量 浓度/(g/L)	ARA 质量 浓度/(g/L)
As3.3410	14.88	5.48	0.82
W35s1-8	18.41	8.35	1.44
W35s1-23	16.48	7.60	1.38
W35s1-54	19.78	9.86	1.73
W35s1-76	21.05	10.68	1.86
W35s1-92	18.58	8.82	1.26

续表 3

菌株	干菌重/ (g/L)	总油脂质量 浓度/(g/L)	ARA 质量 浓度/(g/L)
W35s1-108	20.14	9.84	1.66
W35s1-117	23.96	10.37	1.71
W35s1-135	17.23	7.31	1.41
W35s1-166	19.47	8.34	1.57
W35s1-193	20.16	9.02	1.69

根据表 3 数据比较分析,其中突变株 W35s1-76 的生物量为 21.05 g/L,总油脂质量浓度为 10.68 g/L,ARA 质量浓度为 1.86 g/L,比原始对照菌株的 ARA 产量提高 2.27 倍。因此可以看出,微波诱变是选育菌种的一个比较好的方法。

2.2.5 第二轮诱变结果 取第一轮诱变产量最高的突变株 W35s1-73 进行第二轮微波诱变,诱变条件和方法同第一轮诱变条件,筛选结果见表 4。

表 4 第二轮诱变结果

Tab. 4 The result of the twice mutation

菌株	干菌重/ (g/L)	总油脂质量 浓度/(g/L)	ARA 质量 浓度/(g/L)
As3.3410	11.97	5.48	0.82
W35s1-76	21.05	10.68	1.86
W35s2-13	25.74	12.10	2.16
W35s2-24	34.30	13.86	2.35
W35s2-41	33.14	16.18	2.59
W35s2-86	31.05	15.50	2.48
W35s2-97	31.60	15.46	2.32
W35s2-109	27.50	13.68	2.47
W35s2-135	29.40	13.23	2.25
W35s2-153	30.85	15.50	2.61
W35s2-174	29.50	14.84	2.54
W35s2-182	30.20	14.19	2.51

根据表 4 数据比较分析,其中突变株 W35s2-153 的生物量为 30.85 g/L,总油脂质量浓度为 15.5 g/L,ARA 质量浓度为 2.61 g/L,ARA 产量比原始对照菌株提高 3.18 倍,比出发菌株

W35s1-73 提高 1.4 倍。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。其原因是菌株长期接受相同诱变剂处理,产生诱变剂钝化现象,导致菌体对诱变剂表现不敏感,造成突变株的活力下降,代谢缓慢,因此作者选择两轮诱变的方法。

2.2.6 高产菌株的遗传稳定性实验 通过微波诱变所得的 ARA 高产菌株 W35s2-153 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,结果见表 5。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。同时进一步证明微波诱变微生物育种的可行性。

表 5 W35s2-153 遗传稳定性实验

Tab. 5 ARA yields of As3.3410 and W35s2-153 having been propagated for six generations

菌株传代	ARA 产量/(g/L)	
	As3.3410	W35s2-153
1	0.82	2.61
2	0.84	2.58
3	0.81	2.60
4	0.79	2.61
5	0.79	2.58
6	0.81	2.63

3 结 语

微波是近年来发展的新型诱变剂,其生物学效应分为热效应和非热效应,作者利用此特性诱变筛选出 ARA 高产菌株 W35s2-153,使其 ARA 产量比原始对照菌株提高 3.18 倍,达到 2.61 g/L。实验结果表明,高山被孢霉 As3.3410 具有较强的产 ARA 的能力。反复使用一种诱变剂进行处理,会产生诱变效应饱和现象,在以后的研究中,可采取复合诱变的方法,同时优化培养基成分,有望进一步提高 ARA 产量。

参考文献(References):

- [1] James G M, Paul R, Daniel F, et al. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes[J]. *Science*, 2001, 293: 290—293.
- [2] 李冠, 杜钰, 黄琼, 等. 脂肪酸脱氢酶研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2007, 26(2): 121—126.
LI Guan, DU Yu, HUANG Qiong. Research advances on fatty acid desaturases[J]. *Journal of Food Science and Biotechnol-*

- gy, 2007, 26(2):121-126. (in Chinese)
- [3] 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[J].辐射研究与辐射工艺学报,2003(4):237-242.
YUAN Cheng-ling, YAO Jiang-ming, WANG Ji. Breeding of arachidonic acid-producing strain by low-energy ion implantation[J]. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 2003(4):237-242. (in Chinese)
- [4] 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[J].华中理工大学学报,2000(7):105-110.
ZHOU Peng-peng, YU Long-jiang, ZHU Min. Strain improvement of arachidonic acid-producing by protoplast mutagenesis[J]. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*, 2000(7):105-110. (in Chinese)
- [5] 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量的关系[J].生命科学研究,2004(4):339-343.
ZHU Min, YU Long-jiang, XIAO Jing. Correlation between staining degree of mycelia of *Mortierella alpina* by triphenyltetrazolium chloride and arachidonic acid content in the fungal lipids[J]. *Life Science Research*, 2004(4):339-343. (in Chinese)
- [6] 王啸,邱树毅,叶丹,等.花生四烯产生菌的选育[J].贵州工业大学学报:自然科学版,2005,34,(1):56-59.
WANG Xiao, QIU Shu-yi, YE Dan. Screening of arachidonic acid producing strain[J]. *Journal of Guizhou University of Technology: Natural Science Edition*, 2005, 34(1):56-59. (in Chinese)
- [7] 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[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 66:648-654.
- [8] Kenichi Higashiyama, Shigeaki Fujikawa, Enoch Y Park, et al. Production of arachidonic acid by *Mortierella fungi*[J]. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2002, 7(5):252-262.
- [9] Seki Takeno, Eiji Sakuradani, Akiko Tomi, et al. Transformation of oil-producing fungus, *Mortierella alpina* IS-4 using zeocin and application to arachidonic acid production[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100(6):617-622.

(责任编辑:李春丽)

《食品与生物技术学报》2009年征稿征订启事

《食品与生物技术学报》(双月刊)是教育部主管、江南大学主办的有关食品科学与工程、生物技术与发酵工程及其相关研究的专业性学术期刊,为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国期刊方阵双效期刊,目前被美国化学文摘(CA)等国内外10余家著名检索系统收录。主要刊发食品科学与工程,食品营养学,粮食、油脂及植物蛋白工程,制糖工程,农产品及水产品加工与贮藏,动物营养与饲料工程,微生物发酵,生物制药工程,环境生物技术等专业最新科研成果(新理论、新方法、新技术)的学术论文,以及反映学科前沿研究动态的高质量综述文章等,供相关领域的高等院校、科研院所、企事业单位的教学、科研等专业技术人员、专业管理人员以及有关院校师生阅读,热忱欢迎广大读者订阅。

《食品与生物技术学报》为A4(大16K)开本,144页,全年6期,每册定价15.00元,邮发代号:28-79,全国各地邮局均可订阅。

《食品与生物技术学报》编辑部