

产油脂和 γ -亚麻酸被孢霉 M11 的诱变

张超^{1,2}, 徐洲², 魏琴², 李正国^{1,*}

(1.重庆大学生物工程学院, 重庆 400044; 2.宜宾学院生命科学与食品工程学院,
发酵资源与应用四川省高校重点实验室, 四川 宜宾 644000)

摘要: 为了提高被孢霉 M11 的油脂与 γ -亚麻酸(GLA)含量, 对 M11 菌株分别进行紫外(UV)、硫酸二乙酯(DES)、紫外与硫酸二乙酯复合(UV-DES)诱变的研究。结果表明: UV、DES、UV-DES 复合诱变措施在一定程度上提高了突变菌株的油脂含量及 GLA 含量, 但复合诱变比单一诱变更有效。突变株 M117 的油脂含量为 41.3%, GLA 含量 9.28%, GLA 产量 1.52g/L, 分别比出发菌株提高了 11.26%、11.81% 和 24.59%。经 9 代连续传代培养, M117 都能保持较稳定的产油和产 γ -亚麻酸能力。

关键词: 被孢霉; 紫外诱变; 硫酸二乙酯诱变; 复合诱变; 油脂; γ -亚麻酸

Induced Mutagenesis of *Mortierella* M11 for Improving the Abilities to Produce Lipid and γ -Linolenic Acid

ZHANG Chao^{1,2}, XU Zhou², WEI Qin², LI Zheng-guo^{1,*}

(1. College of Bio-engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China;
2. Key Laboratory of Fermentation Resource and Application of Institutes of Higher Learning in Sichuan, College of Life Science and Food Engineering, Yibin University, Yibin 644000, China)

Abstract: In order to improve the productivity of lipid and γ -linolenic acid in *Mortierella* M11, the mutagenesis of *Mortierella* M11 was induced by UV irradiation, DES treatment and their combination, respectively. All the three mutant strains of *Mortierella* M11 obtained exhibited higher contents of lipid and γ -linolenic acid in comparison with it, and the combined induction was the most effective mutagenesis approach. The mutant strain M117 obtained through the combined induction of UV irradiation and DES treatment showed 41.3% lipid content, 9.28% GLA content and 1.52 g/L GLA yield, with incremental percentages of 11.26%, 11.81% and 24.59% as compared to the original strain, respectively. After nine generations of passage, the abilities of this stain to produce lipid and γ -linolenic acid were both kept stable.

Key words: *Mortierella*; UV mutagenesis; DES mutagenesis; combinatorial mutagenesis; lipid; γ -linolenic acid
中图分类号: TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2010)23-0322-04

微生物油脂是一种重要和极具开发潜力的油脂资源^[1], 主要含有亚油酸、 γ -亚麻酸(GLA)等不饱和脂肪酸, 是维持生命的重要营养物质。 γ -亚麻酸(γ -Linolenic acid, GLA)作为一种人体必需的不饱和脂肪酸, 被认为对人体具有重要的生理生化作用, 具有多方面的药用价值和营养价值^[2-4], 人体补充 GLA 已成为抗衰老, 预防和治疗某些疾病的一个重要手段^[5-6]。目前, 在国内由于植物是其来源, 所以应用受到一定限制。由于微生物生产油脂和 γ -亚麻酸具有速度快、原料易得、生产过程人工可控等优点, 一段时间以来, 开发微生物油脂资源和 GLA 资源受到众多研究者的重视^[7-8]。我国对微

生物发酵法生产油脂和 γ -亚麻酸的研究起步较晚, 虽然上海工业微生物研究所、天津南开大学微生物系等单位取得了一些研究进展, 但在菌株产油脂和 γ -亚麻酸的水平上与日本和美国相比仍有较大差距^[9-10]。

被孢霉是目前研究的较多的重要真菌之一, 被孢霉 M11 已被证明是一种能产生油脂和 γ -亚麻酸的丝状真菌^[11]。但由于其油脂和 γ -亚麻酸的含量不高, 还不具备工业化生产的优势。因此, 如何提高其油脂和 γ -亚麻酸含量是值得研究的问题。诱变选育是提高菌株产物产生能力的一种有效方法^[12], 因此, 本研究用 UV、DES、UV/DES 复合诱变方法处理 M11, 获得了多株突变菌株。研究

收稿日期: 2010-09-02

基金项目: 四川省教育厅青年基金项目(2002B23)

作者简介: 张超(1966—), 男, 副教授, 博士研究生, 主要从事生物工程与食品生物技术研究。E-mail: chzh1966@126.com

* 通信作者: 李正国(1964—), 男, 教授, 博士, 主要从事食品科学与植物生物技术研究。E-mail: zgli6@163.com

对比了3种诱变方式及其定向筛选的诱变效果,并获得了9株正突变菌株的摇瓶实验及M117突变菌株的稳定性实验结果。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

被孢霉 M11, 由宜宾学院发酵资源与应用四川省高校重点实验室、发酵工程与食品科学研究所保存。

保藏培养基(g/L): 葡萄糖 20.0、酵母膏 2.0、蛋白胨 5.0、琼脂 20, pH 值自然; 活化培养基(g/L): 葡萄糖 40.0、酵母膏 4.0、蛋白胨 7.0、琼脂 20, pH 值自然, 营养盐溶液 1mL; 基本培养基(g/L): 葡萄糖 120.0、 KH_2PO_4 1.8、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0、尿素 2.0、酵母膏 2.0、蛋白胨 5.0, 营养盐溶液 1mL; 定向筛选培养基(g/L): 葡萄糖 120.0、NaCl 1.5、KCl 1.5、 KH_2PO_4 1.8、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0、尿素 2.0、酵母膏 2.0、蛋白胨 5.0、琼脂 20, 营养盐溶液 1mL; 营养盐溶液组成(g/L)^[13]: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.0、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.0。

1.2 方法

1.2.1 菌种的活化

接种于活化培养基上, 28℃培养3d。

1.2.2 孢子悬浮液的制备

用0.1mol/L磷酸缓冲溶液洗下出发菌株的斜面孢子, 做成适当浓度($10^6 \sim 10^7$ 个/mL)的孢子悬浮液。

1.2.3 紫外(UV)诱变

紫外诱变基本操作参照文献[14]。稀释涂皿时, 采用筛选培养基(3个重复), 于28℃避光培养3d。与对照组对比, 观察菌落形态特征, 测定活菌数。

1.2.4 硫酸二乙酯(DES)诱变^[14]

取适当体积2g/100mL的DES溶液与孢子悬浮液于无菌试管中混匀, 使DES质量浓度分别为0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8g/100mL, 在20℃条件下振荡60min后, 加0.5mL的2g/100mL的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 终止反应。稀释后取0.2mL涂布于筛选培养基平板上, 28℃恒温培养3d, 与对照组对比, 观察菌落形态特征, 测定活菌数。

1.2.5 UV-DES复合诱变

将经紫外线照射一定时间后的孢子悬浮液, 接种到基本培养基上, 28℃避光培养3d, 并制成孢悬液。在无菌试管中按设定DES浓度梯度混匀孢悬液与2g/100mL的DES溶液, 振荡处理60min后, 加0.5mL 2g/100mL的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 终止反应。稀释后涂布于筛选培养基平板上, 28℃培养3d, 与对照组对比, 观察菌落形态特征, 测定活菌数。

1.2.6 突变菌株培养

在无菌条件下取3d培养物10mL接种于90mL基本培养基内, $(28 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、160r/min振荡培养7d, 测定菌体干质量、油脂含量、GLA含量。

1.2.7 孢子数量测定

采用血球计数法^[15]。

1.2.8 致死率的计算

采用诱变前后菌落计数法计算, 即诱变前后的孢悬液按一定浓度梯度都分别涂布3个平板, 于28℃的恒温培养, 计菌落数。

$$\text{致死率}/\% = \frac{\text{对照菌落数} - \text{诱变处理后菌落数}}{\text{对照菌落数}} \times 100$$

1.2.9 正突变菌株的鉴定与计算

采用脂肪粒染色法^[16], 与对照组进行比较, 根据脂肪粒密度高低、颗粒大小判断是否正突变。

$$\text{正突变率}/\% = \frac{\text{正突变菌落数}}{\text{诱变处理后菌落总数}} \times 100$$

1.2.10 菌体干质量

一定量培养物经抽滤后, 于60℃烘干至质量恒定。

1.2.11 油脂提取含量测定

采用酸热法^[17]。

1.2.12 GLA测定方法

采用甲酯化-气相色谱测定法^[13]。

2 结果与分析

2.1 紫外线诱变剂量的选择

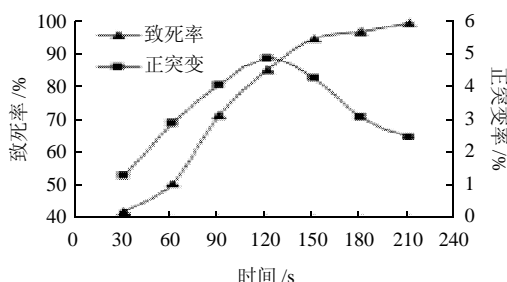


图1 紫外照射时间与致死率和正突变率的关系

Fig.1 Effect of UV irradiation time on fatality and positive mutation rate

由图1可以看出, 随紫外照射时间的延长, 致死率逐渐增加, 而正突变率则出现先升后降的变化。在照射时间为120s时, 正突变率最高达4.9%, 此时菌体致死率为85.4%。综合考虑致死率、正变率等因素, 确

定紫外照射 120s 是适宜的诱变条件。

2.2 硫酸二乙酯(DES)诱变

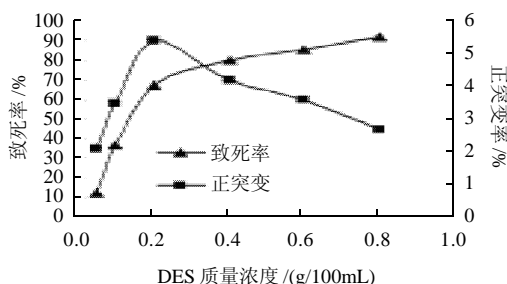


图2 DES 浓度与致死率和正突变率关系

Fig.2 Effect of DES concentration on fatality and positive mutation rate

由图2可知,随DES质量浓度在0.05~0.2g/100mL增加时,菌体致死率、正突变率增加,正突变率最高达5.4%;DES质量浓度超过0.2g/100mL,致死率继续平缓增加,而正突变率下降。从菌体生长状况来看,DES质量浓度为0.05g/100mL和0.1g/100mL时菌丝团生长和染色与对照组几乎无差异。从0.2g/100mL开始,菌丝团数量减少,染色发现少量菌丝体与对照组有差异;当DES质量浓度达到0.4g/100mL时,随DES质量浓度的增加,菌丝体生长数量逐步减少,且形态瘦小。综合致死率、正突变率等因素,确定0.2g/100mL的DES质量浓度是适宜诱变条件。

2.3 紫外线(UV)与硫酸二乙酯(DES)复合诱变

在上述实验的基础上,设计了先用紫外线诱变,然后用硫酸二乙酯进行诱变的实验方案。复合诱变剂量与致死率、正突变率的关系如表1所示。

表1 复合诱变剂量与致死率和正突变率的关系

Table 1 Effect of doses of combined UV irradiation and DES treatment on fatality and positive mutation rate

紫外照射 时间/s	0.05g/100mL DES 致死率	0.05g/100mL DES 正突变率	0.1g/100mL DES 致死率	0.1g/100mL DES 正突变率	0.2g/100mL DES 致死率	0.2g/100mL DES 正突变率	0.4g/100mL DES 致死率	0.4g/100mL DES 正突变率
30	76.1	1.2	84.4	1.8	93.5	2.1	100.0	0
60	90.3	1.6	92.1	2.5	97.9	3.1	100.0	0
90	93.6	2.3	97.8	3.8	99.7	5.1	100.0	0
120	98.5	1.8	99.3	2.1	99.9	2.5	100.0	0
150	99.7	0.8	100.0	0	100.0	0	100.0	0

由表1可知,对被孢霉M11而言,经紫外照射,DES处理后,在筛选培养基上生长情况与单一诱变因子的结果不同。经紫外诱变后,在0.4g/100mL的DES质量浓度下的致死率100%,这表明复合诱变比单因子诱变的菌体致死率更高。从染色镜检结果来看,当紫外照射时间90s,DES质量浓度是0.2g/100mL时,有脂肪

粒密度高、颗粒大的菌丝体。综合致死率、正变率等因素,确定紫外照射时间90s、0.2g/100mL DES处理60min是较好的M11的复合诱变条件。

2.4 3种诱变方式的比较

分别选取上述3种诱变方式下获得的染色特点突出的突变菌株各3株,按编号为1~9,接入液体基本培养基中,在相同条件下摇瓶培养7d,测定生物量、油脂、GLA量。结果如表2所示。

表2 9株正突变株产油脂和γ-亚麻酸比较

Table 2 Comparison on the contents of lipid and GLA produced by nine positive mutant strains

	菌株编号	菌株生物量/(g/L)	油脂含量/%	油脂产量/(g/L)	GLA 含量/%	GLA 产量/(g/L)
出发菌株	M11	39.30	37.50	14.74	8.30	1.22
	M111	39.80	39.10	15.56	8.80	1.37
	M112	39.90	38.90	15.52	8.60	1.33
紫外诱变株	M113	39.40	40.10	15.80	8.90	1.41
	M114	37.60	39.30	14.78	7.20	1.06
	M115	37.90	39.80	15.08	8.70	1.31
DES 诱变株	M116	38.20	38.70	14.78	9.10	1.35
	M117	39.70	41.30	16.40	9.28	1.52
	M118	38.40	40.20	15.44	9.14	1.41
复合诱变株	M119	39.30	39.80	15.64	9.22	1.44

由表2可知,通过诱变,实验所得到的9株菌株的性能发生一定变化。单独的紫外或DES诱变菌株的菌体生物量虽然变化不大,但菌体的油脂含量和油脂中GLA含量均有提高;复合诱变突变株的油脂和GLA提高的量最明显,其中菌株M117的油脂含量达到41.3g/L,油脂中GLA含量达到9.28%,GLA产量达到1.52g/L,分别比出发菌株提高11.26%、11.81%和24.59%。

2.5 传代次数对M117产油脂和γ-亚麻酸稳定性的影响

按菌株保藏和液体基本培养方法,将M117接进行9代连续培养,考察传代次数对产油脂和γ-亚麻酸的影响,结果如图3所示。

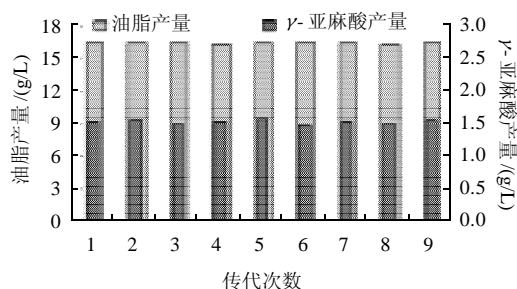


图3 传代次数对M117性能稳定性的影响

Fig.3 Effect of passage number on the abilities of mutant strain M117 to produce lipid and γ-linolenic acid

由图3可知,经9次连续传代后,M117均能保持较稳定的产油和产 γ -亚麻酸的能力,且油脂产量保持在16.40g/L左右,产 γ -亚麻酸的能力保持在1.52g/L左右,分别比出发菌株(14.74g/L和1.22g/L)提高了11.26%和24.59%。

3 讨 论

诱变育种是一项复杂的工作,高效判断正突变是该项工作的重要内容之一。在实验方法上,本研究采用苏丹黑染色法筛选产油正突变菌株;设计了高渗透压筛选培养基,可能对提高目的突变菌株的检出率有帮助,此方法是否存在漏掉优质正突变菌株的可能,有待进一步研究;从实验结果来看,复合诱变比单因素诱变有更高致死率,所获得的突变体的产油脂及其GLA的能力更强,这表明复合诱变方法更加有效地提高了与油脂和GLA合成有关的酶的表达或活性;通过对M117菌株产油脂和 γ -亚麻酸稳定性研究,表明该方法所获得的突变株的遗传稳定性良好;研究结果与希腊学者Papanikolaou等^[18]报道的*M.isabellina* 18.1g/L油脂产量有较大的差距。因此,还有必要对突变菌株的生长条件和工艺方法做进一步研究。

参考文献:

- [1] 颜治,陈晶.微生物油脂及其开发利用研究进展[J].油脂工程,2003(7): 13-15.
- [2] CONTI E, STREDANSKY M, STREDANSKA S, et al. γ -Linolenic acid production by solid-state fermentation of *Mucorales* strains on cereals[J]. Bioresource Technology, 2001, 76: 283-286.
- [3] CHEN Hungchang, LIU Tseming. Inoculum effects on the production of γ -linolenic acid by the shake culture of *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840[J]. Enzyme Microb Technol, 1997, 21(8): 137-142.
- [4] PARDINI R S. Nutritional intervention with omega-3 fatty acids enhances tumor response to anti-neoplastic agents[J]. Chemico-Biological Interactions, 2006, 162: 89-105.
- [5] 邢旭光,郭国庆,孙晗笑,等. γ -亚麻酸的防病抗病作用[J].中国公共卫生,2002,18(12): 1513-1514.
- [6] CHENE G, DUBOURDEAU M, BALARD P, et al. n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids induce the expression of COX-2 via PPAR γ activation in human keratinocyte HaCaT cells[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2007, 1771(5): 576-589.
- [7] 李忠玲,岳淑宁,王卫卫,等.丝状真菌发酵生产 γ -亚麻酸的研究进展[J].微生物学杂志,2008,28(1): 94-97.
- [8] 于爱群,江贤章,夏晓峰,等. γ -亚麻酸产生菌*Mucor* sp. EM-10的筛选及分子鉴定[J].生物加工过程,2009,7(2): 74-78.
- [9] 刘波,孙艳,刘永红,等.产油微生物油脂生物合成与代谢调控研究进展[J].微生物学报,2005,45(1): 153-155.
- [10] 王萍,张银波,江木兰.多不饱和脂肪酸的研究进展[J].中国油脂,2008,33(12): 42-46.
- [11] 张超,冯学愚.甘油和乙醇对 γ -亚麻酸生产菌M11发酵的影响[J].应用科技,2000,27(5): 26-28.
- [12] 张秋卓,蔡伟民.纤维素酶高产菌株的复合交替诱变选育[J].工业微生物,2008,38(6): 32-37.
- [13] 关洁雯,林炜铁,姚汝华,等.被孢霉产 γ -亚麻酸的补料工艺研究[J].食品与发酵工业,1998,24(4): 18-20.
- [14] 施巧琴,吴松刚.工业微生物育种学[M].2版.北京:科学出版社,2003: 73-89.
- [15] 范秀容,沈萍.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1980: 48-51.
- [16] 微生物研究法讨论会(日).微生物学实验法[M].北京:科学出版社,1981: 104.
- [17] 李植峰,张玲,沈晓京,等.四种真菌油脂提取方法的比较研究[J].微生物学通报,2001,28(6): 72-75.
- [18] PAPANIKOLAOU S, KOMAITIS M, AGGELIS G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media[J]. Bioresource Technology, 2004, 95: 287-291.