

## 离子注入花生四烯酸产生菌诱变选育

姚建铭 王 纪 王相勤 袁成凌 王文生 余增亮

(中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程中心 合肥 230031)

**摘 要** 利用离子束注入生物技术对花生四烯酸产生菌(*Mortierella alpina*)进行诱变高产菌筛选。筛选到高产菌 I<sub>49</sub>-N<sub>18</sub>, 该菌每升培养液可得生物量 30.80g (约 4% 的含水量), 干菌体油脂含量为 25.8%, 其中花生四烯酸的含量占总脂的 45.37%。30L 和 250L 发酵罐发酵试验, 该高产菌的花生四烯酸得率为 4.0g/L。

**关键词** 花生四烯酸, 离子注入, 筛选, 发酵

中图分类号 O644.23 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0478-04

花生四烯酸(Arachidonic acid, AA, C<sub>20</sub>:<sub>4</sub>; n-6, 5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸), 属 n-6 系列的多不饱和脂肪酸(Polysaturated fatty acid, PUFA), 是人体最重要、含量最丰富的 C<sub>20</sub>PUFA。它主要存在于器官、肌肉和血液组织中, 与磷脂结合成结构脂类起着重要作用。而且花生四烯酸还是许多二十烯酸衍生物(Eicosanoid)的直接前体, 如前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>), 前列环素(PGI<sub>2</sub>), 血栓素 A<sub>2</sub>(TxA<sub>2</sub>)和白三烯等。这些二十烯酸衍生物对细胞和机体的生理代谢活动具有重要的调节作用。花生四烯酸的传统来源是鱼油、血液、内脏等, 但含量极低。60 年代起, 国外许多学者开始研究微生物发酵法生产花生四烯酸, 目前, 日本、英国等已有花生四烯酸的发酵产品问世。而国内华南理工大学、曲阜师范大学等<sup>[1-2]</sup>单位也已开展这方面的研究, 但尚未见有产品问世。本文报道利用离子束生物技术对原花生四烯酸产生菌进行诱变改良, 筛选得到一株花生四烯酸高产菌及该高产菌 30L、250L 发酵罐试验结果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株

花生四烯酸产生菌(*Mortierella alpina*)N<sub>7</sub>, 本室保存。

### 1.2 培养工艺

#### 1.2.1 培养基配方: 斜面培养基: 马铃薯浸出液

20%、琼脂 2.0%、0.1MPa 灭菌 15~20min。发酵培养基: 葡萄糖、酵母膏、花生饼粉、淀粉、蛋白胨等, 500mL 三角瓶 200mL 装量, 0.1MPa 灭菌 20min。

### 1.3 离子注入

1.3.1 50keV 离子注入机, 本所离子束生物工程中心自行研制生产。

1.3.2 注入方式: 纯种斜面制取孢子悬液, 取 0.2mL 孢子悬液于无菌空平皿, 制成菌斑, 于注入机靶室进行注入, 采用脉冲式注入方式。注入完成后, 将菌斑用无菌水洗脱, 稀释涂平皿, 进行单菌落筛选。

1.3.3 筛选: 选单菌落转接斜面, 接摇瓶发酵。

### 1.4 分析方法

1.4.1 生物量: 培养好的菌体用 2 层纱布过滤, 蒸馏水洗 3 次, 于 60℃ 下烘干, 称干重(含水量在 4% 以下)。

1.4.2 菌体油脂含量采用索氏提取法。

1.4.3 花生四烯酸含量测定: 气相色谱法(1002 型气相色谱仪, 上海分析仪器厂生产)。取 0.3g 样品置于 5mL 容量瓶中→加入 0.5mol/L KOH-甲醇溶液 1mL, 60℃ 水浴 30min, 其间经常震荡→加入三氯化硼-甲醇溶液 1mL(1:2V/V), 60℃ 水浴 30min, 其间充分震荡→加入 1mL 石油醚, 充分震荡→加入饱和食盐水→取最上层上清液(石油醚层)进样。色谱仪器工作条件为: SGE-P10 毛细管柱, 柱长 50m, 内径 0.25mm。

测定条件 柱温 200℃,以 4℃/min 程序升温至 240℃,气化室温度 230℃,检测室温度 230℃。

### 1.5 发酵罐

30L 机械搅拌式发酵罐(无锡轻工大学研制生产)、250L 气升式发酵罐(江苏理工大学生物工程研究所研制生产)。

### 1.6 干菌体油脂中脂肪酸组成分析

样品送卫生部食品检测中心(中国农业大学食品学院)进行脂肪酸成分及含量检测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 注入离子能量和剂量的选择

注入离子选用常用的  $N^+$ ,其注入离子能量、剂量与致死率的关系见表 1。

表 1  $N^+$  注入能量、剂量与致死率的关系

Table 1 The relation of energy dose and survival rate of  $N^+$  implantation

Energy/keV	Dose	Survival rate				
		$1.5 \times 10^{14}$ $N^+/\text{cm}^2$	$2 \times 10^{14}$ $N^+/\text{cm}^2$	$3 \times 10^{14}$ $N^+/\text{cm}^2$	$4 \times 10^{14}$ $N^+/\text{cm}^2$	$6 \times 10^{14}$ $N^+/\text{cm}^2$
10			65.50	70.30	95.40	100
15	90			98.75		100
20			99		99.5	100

就现代育种理论认为<sup>[3]</sup>:当被诱变的微生物致死率在 70%~75%左右时,产量性状的正突变率往往很高,而更高的致死率下,虽然突变率可能较高,但负变率往往很高,而正变率却很低。因此,我们多选择 10keV,  $3 \times 10^{14} N^+/\text{cm}^2$  作为该菌的离子注入参数,实践证明较为有效。

### 2.2 离子注入 AA 产生菌初筛结果

工业微生物诱变育种两大关键因素:一是诱变工具,二是优化的筛选工艺。本研究所利用的低能离子注入与传统的诱变源如 X 射线、 $\gamma$  射线及化学诱变剂等相比,离子注入除有能量沉积外,还有动量传递、质量沉积及电荷交换等效应<sup>[4-6]</sup>,将不同离子( $H^+$ 、 $N^+$ 、 $Ar^+$  等)注入细胞,通过电、能、质的共同作用,不仅可影响细胞的生理生化功能,更重要的是还可使细胞中的染色体畸变,DNA 链发生断裂,所以离子注入诱变是一种集物理和化学诱变特性于一身的综合诱变方法。

产量性状往往是微效多基因调控的数量性状,因此,我们将初筛摇瓶高于对照 20% 的菌种作为下一轮注入诱变的出发菌。经过反复的菌种纯化和注入交替进行,共初筛摇瓶 519 只,最终筛选到一株高产菌  $I_{49-N_{18}}$ 。较出发菌  $N_7$  的 AA 产率提高了 62.36%,且传代稳定。筛选流程如下:

原始菌种  $N_7$  → 分离纯化 → 发酵工艺优化 → 离子注入 → 高产菌分离纯化 → → → 离子注入,分离纯化交替进行 → 高产菌发酵工艺优化 → 传代实验。AA 产生菌离子注入诱变筛选结果见表 2。

表 2 AA 高产菌筛选结果

Table 2 Screening results of AA high-yield strain

Strains	DW/ (g/100mL)	TL/DW (%)	AA/TL (%)	AA/DW (g/L)	Advance (%)
$N_7$ (CK)	6.20	31.04	29.81	2.87	100
$I_{49-N_{18}}$	6.31	29.13	52.36	4.66	162.36

DW: Dry-Weight; TL: Total Lipid

### 2.3 AA 高产菌 $I_{49-N_{18}}$ 生长曲线制作

取 2 支生长良好、孢子丰富的茄子瓶,加入无菌生理盐水,轻轻刮下,倒入含玻璃珠的三角瓶,于 200 r/min 摇床震荡 15min,取孢子悬液 3mL 接种于 500mL 三角瓶,200mL 装瓶量,于 28℃、200r/min 摇床培养,每 24h 取样两瓶,测定残糖、生物量、油脂含量及 AA 含量,结果见图 1。

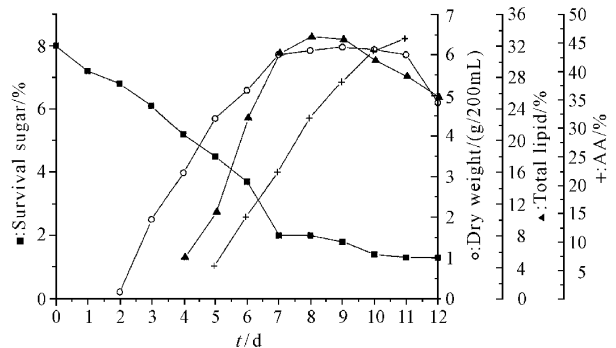


图 1 AA 高产菌  $I_{49-N_{18}}$  生长曲线

Fig. 1 Growth curve of AA high-yield strain  $I_{49-N_{18}}$

从图 1 可以看出,8.0% 的起始糖,使菌体生长起步较慢,如果是 4.0% 的起始糖,则菌体将较快进入

对数生长期,这在 30L 实验罐上得以证明,另外 6d 以后,菌体生长趋于平稳,对糖的消耗能力减弱,生物量与油脂总量几乎是同步发展,并随发酵时间的延长有所降低,AA 的积累相对推迟 2~3d,约于 10~11d 达到最高。同时对高产菌的发酵工艺进行了优化(另报)。

## 2.4 AA 高产菌发酵干菌体各脂肪酸组成及甘油三酯立体结构分析

富含 AA 的干菌体送交中国农业大学卫生部食品检测中心检测(HPLC 法)结果见表 3。

表 3 干菌体各脂肪酸组成

Table 3 Fatty acid component of biomass

Fatty acid	Content/%	Fatty acid	Content/%
14:0	0.38	16:0	8.01
16:1	0.86	18:0	11.78
18:1	16.96	18:2	6.88
18:3(n-6)	3.93	20:0	1.06
18:3(n-3)	0.24	20:1	0.42
20:4	47.93	Other	1.55

据检测,干菌体中不饱和脂肪酸约 78.77%,各脂肪酸在甘油三酯中的分布见表 4。

表 4 甘油三酯中脂肪酸的分布

Table 4 Fatty acid distribution of triglyceride(mol%)

Fatty acid	Sn-1	Sn-2	Sn-3
14:0	0.45	0.23	0.45
16:0	7.15	1.25	15.62
16:1	0.19	2.18	0.21
18:0	5.28	1.05	27.20
18:1	8.80	36.50	5.58
18:2	1.87	16.70	2.07
18:3(n-6)	2.65	6.82	2.33
20:0	0.30	0.07	2.81
18:3(n-3)	0.02	0.60	0.09
20:1	0.42	0.13	0.71
20:4	71.60	39.64	32.56
Other	1.51	1.89	1.26

由表可知,花生四烯酸主要分布在 Sn-1 位置,占总花生四烯酸含量的 49.79%。由于胰脂酶主要水解甘油三酯 1,3 位的脂肪酸,形成的游离脂肪酸及 2-单脂肪酸酰甘油酯在细胞内重新脂化,结合到细胞膜上,作为脂肪酸的库。通过对富含 AA 干菌

体脂质中甘油三酯中脂肪酸分布的研究,结合膳食脂肪代谢理论认为,该干菌体不仅具有 AA 含量丰富,从而具有调节生物体内脂质代谢的功能,而且具有对生物体内花生四烯酸库没有影响的特点,从而不会引起生物体内 n-3/n-6 或  $\gamma$ -亚麻酸/花生四烯酸等代谢的不平衡。

## 2.5 AA 高产菌 30L 和 250L 发酵罐实验结果

### 2.5.1 30L 发酵罐实验结果

成熟斜面制孢子悬浮液,接种子瓶,种子培养基成分为 3% 葡萄糖、1.2% 蛋白胨、0.5% 酵母膏, pH8.0, 200r/min, 28℃ 培养 60h, 约 8 只种子瓶于超净台并瓶于 2 只 1000mL 的无菌三角瓶, 供火圈接种。

30L 不锈钢机械搅拌发酵罐, 配制发酵培养基 16L, 配方为 1.2% 蛋白胨、0.5% 酵母膏、1.0% 花生粉、20mL 泡敌, 底糖浓度考察了 4%、6%, 其中 6% 底糖浓度又分两种方式, 一是一次投糖, 二是起始投糖 4%, 余下 2% 的糖在发酵的第三天、第五天补入。一次性投糖则第三天、第五天补同体积无菌水。

结果发现, 分批补糖的罐批前期菌体生长快, 经过补糖, 中后期生长代谢旺盛, 生物量、油脂、AA 含量均达到摇瓶水平, 在第 10 天, AA 得率达到 4.53g/L。

### 2.5.2 250L 气升式发酵罐实验

采取二级发酵, 种子罐 25L, 装液量为 14L, 培养 48h 接入 250L 发酵罐, 配方同小试发酵培养基, 唯泡敌数量加至 100mL, 罐压 0.08MPa, 通气量 8000L/h, 起始糖浓度 4%, 分批补糖至总糖 6%。其中第三罐批较为成功, 发酵时间 11d, 生物量为 28.7g/L, 油脂为 10.2g/L, AA 为 4.59g/L, 基本与小试及摇瓶水平相当。

## 3 讨 论

本研究通过对本室保存的 AA 产生菌进行离子注入诱变筛选, 得到一株 AA 高产菌 I<sub>49</sub>-N<sub>18</sub>, 其花生四烯酸的得率摇瓶、小试和 250L 中试均可达到 4.5g/L。据国外专利(96192002.5)文献报道, AA 得率最高可达 2.28g/L, 该高产菌 AA 得率提高近 1 倍。

该高产菌经过了小试和 250L 中试, 为工业化发酵生产花生四烯酸打下良好的基础。另外, 通过干菌体甘油三酯立体结构的测定得知, AA 主要分布于 Sn-1, Sn-3 位置, 对进一步研究干菌体中 AA 在人体中的代谢调控等机理, 有着重要意义。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 鲍时翔 朱法科 林炜铁等 ,微生物学报 ,1997 ,37( 5 ) 374~377 .
- [ 2 ] 杨 革 王玉萍 李翔太等 ,菌物系统 ,1998 ,17( 1 ) 86~90 .
- [ 3 ] 钱海伦著 ,微生物学 ,北京 :中国医药工业出版社 ,1990 ,第二版 .
- [ 4 ] YU Z L ,DENG J G ,HE J J *et al* ,Instruments and Methods in Physics Research ,1990 ,B59/60 ,705~708 .
- [ 5 ] 江泽慧 彭镇华 ,安徽农业大学学报 ,1994 ,21( 3 ) 295~298 .
- [ 6 ] 陈 宇 林梓鑫 张 峰等 ,中国抗生素杂志 ,1997 ,22( 6 ) 410~414 .

## Breeding of Arachidonic Acid Producing Strain by Ion Implantation

YAO Jian-Ming WANG Ji WANG Xiang-Qin YUAN Cheng-Ling WANG Wen-Sheng YU Zeng-Liang  
( Centre of Ion Beam Bioengineering ,Institute of Plasma Physics ,Academia Sinica ,Hefei 230031 )

**Abstract** With ion implantation , a high-yield arachidonic acid producing strain( *Mortierella alpina* )I<sub>49</sub>-N<sub>18</sub> was selected , whose biomass was 30.80g/L. The lipid component of biomass was 25.8% , in which AA content was 45.37% . The results showed that selected high-yield strain was steady on 250L fermentor ,whose AA yield was 4.0g/L.

**Key words** Arachidonic acid , ion implantation , screening , ferment