

研究报告

深黄被孢霉高产脂变株的选育及其发酵的研究

黄建忠 施巧琴 周晓兰 林跃鑫 谢必峰 吴松刚

(福建师范大学生物工程学院 福州 350007)

摘要 以深黄被孢霉(*Mortierella isabellina*) AS3.3410 为出发菌株,经紫外线,硫酸二乙酯和亚硝基胍复合诱变处理,选育成功高产脂深黄被孢霉 M018 变株,其摇瓶培养菌体油脂含量达 65.6%,比出发菌株提高 133%。60m³罐三级发酵培养菌体油脂含量高达 79.2%,生物量达 37.8g/L。气相色谱分析表明变株 M018 γ -亚麻酸的含量比出发菌株提高了 53%。连续传代试验表明 M018 是一稳定的变株。该变株油脂合成的最佳碳源为葡萄糖,最佳氮源为酵母膏,最佳 C/N 为 60:1,中温(25~30℃)适于菌丝生长,低温(15~20℃)适于细胞油脂合成。代谢曲线表明 M018 变株是在培养基残氮极低时,才开始将葡萄糖大量转化合成油脂。

关键词 被孢霉, 选育, 油脂合成, 发酵

分类号 Q933

油脂是构成和维持细胞生命的重要大分子物质,也是人类赖以生存的重要工业原料。随着人们对组成油脂的不饱和脂肪酸(GLA EPA DHA)生理功效(降血脂、降糖、健脑和益智等)的深入了解,寻求富含不饱和脂肪酸的新油源,就显得尤为重要和迫切。微生物所具有的营养简单、生长繁殖快、易变异、可工业化大规模培养的优点决定了利用微生物生产油脂是一条开发新油源的良好途径;它不仅可以通过补充现有动植物油源的不足,而且还可以获得经济价值高且有生理活性功能和特殊利用价值的油脂。酵母和被孢霉属真菌是良好的产脂微生物^[1,2],其菌丝干细胞油脂含量一般为 40%~60%^[3~7]。我们以深黄被孢霉 AS3.3410 为出发菌株,以多种理化诱变剂复合处理,选育出高产脂变株 M018。该变株摇瓶产脂达 65.6%,60m³罐三级发酵产脂高达 79.2%。现将 M018 变株的选育及其油脂合成条件的研究报告如下。

1 材料和方法

1.1 菌种

深黄被孢霉(*Mortierella isabellina*) AS3.3410

购自中科院菌种保存中心,用作出发菌株;深黄被孢霉 M018 变株是 AS3.3410 菌株经硫酸二乙酯(DES),亚硝基胍(NTG)等复合诱变剂诱变选育而得,现保存于我院菌种保存中心。

1.2 培养基

1.2.1 平皿诱变培养基(%): 葡萄糖 10, (NH₄)₂SO₄ 0.25, KH₂PO₄ 0.1, 柠檬酸钠 0.1, MgSO₄ 0.03, 琼脂 2.0, pH6.2, 0.70 × 10⁵ Pa 灭菌 30min。

1.2.2 摇瓶种子培养基(%): 葡萄糖 10, 尿素 0.2, KH₂PO₄ 0.1, 酵母膏 0.2, (NH₄)₂SO₄ 0.2, MgSO₄ 0.03; pH6.4, 0.70 × 10⁵ Pa 灭菌 30min。

1.2.3 摇瓶产指培养基(%): 葡萄糖 10, 酵母膏 0.2, 柠檬酸钠 0.2, KH₂PO₄ 0.2, MgSO₄ 0.05, pH6.0, 0.70 × 10⁵ Pa 灭菌 30min。

1.2.4 60M³大罐三级发酵培养基

一级种子培养基(%): 葡萄糖 8, 尿素 0.3, 酵母膏 0.1, KH₂PO₄ 0.1; pH6.4, 0.70 × 10⁵ Pa 灭菌 30min。

二级种子培养基(%): 葡萄糖 10, 尿素 0.2,

酵母膏 0.1, KH₂PO₄ 0.1; pH6.2, 0.70 × 10⁵ Pa 灭菌 30min.

发酵产脂培养基(%): 葡萄糖 12, 酵母膏 0.2, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄ 0.03, 柠檬酸钠 0.1; pH5.8, 0.70 × 10⁵ Pa 灭菌 30min.

1.3 培养条件

1.3.1 摇瓶种子培养: 28℃, 28h, 转速 300r / min, 接种量 2 × 10⁶ 孢子 / ml.

1.3.2 摇瓶产脂培养: 25℃, 70h, 转速 280r / min, 移种量 10%.

1.3.3 60m³罐一级种子培养: 28℃, 24h, 接种量: 7 × 10¹⁰ 孢子 / 500L 培养液, 通气量 15m³ / h.

1.3.4 60m³大罐二级种子培养: 28℃, 20h, 移种量 10%, 通气量 240m³ / h.

1.3.5 60m³大罐发酵产脂培养: 25℃, 56~60h, 移种量 12%, 通气量 2700m³ / h.

1.4 菌体细胞油脂定性分析

苏丹黑染色法^[8].

1.5 菌体细胞油脂含量测定

参照文献[9], 乙醇和正己烷抽提.

1.6 油脂碘值测定

参照文献 [10] 方法.

1.7 油脂脂肪酸组成分析

1.7.1 待测样品的处理: 菌体油脂加 5%KOH-甲醇溶液封管水解→加 14%BF₃-甲醇溶液封管甲酯化→加饱和 NaCl 溶液分层→以石油醚(bp30~60)提取→无水 Na₂SO₄干燥→挥发溶剂→样品置安瓿管中, -20℃保存.

1.7.2 对照样品: γ-亚麻酸甲酯(美国 Sigma 公司产品).

1.7.3 仪器和工作条件

仪器: Shimadzu GC-7A气相色谱仪, ShimadzuC-RIB数据处理机.

检测器: 氢火焰离子化检测器(ID).

色谱柱: DEGS 玻璃毛细管柱(30cm), RANGE: 100, ATT: 1, SPEED: 2.5mm / min.

尾气: 50ml / min, 线速: 12cm / sec. 柱温: 210℃, 检测气化温度: 280℃.

1.8 菌丝生物量的测定

离心 15min(4000r / min), 洗涤后烘干至恒重(85℃).

1.9 发酵液残糖的测定 参照文献 [11].

1.10 发酵液氨基氮的测定 参照文献 [12].

2 结果

2.1 深黄被孢霉变株 M018 的选育

以深黄被孢霉 AS3.3410 为出发菌株, 经连续处理五代, 挑选 1500 个菌落, 通过初筛(苏丹黑压片染色法)和摇瓶多次复筛选育出高产脂变株 M018; 其摇瓶培养 70h(25℃)后, 菌丝体

表1 高产脂变株M018的选育系谱

选育系谱	致死率 (%)	菌体油脂含量 (%)
As3.3410		28.2
↓ UV+LiCl	70.5	
F525		35.9
↓ UV+2%DES	78.6	
G785		43.7
↓ LiCl	50.3	
H101		47.4
↓ UV+NTG(500µg/ml)	87.4	
K202		53.7
↓ NTG(1000µg/ml)	80.7	
L310		64.2
↓ 自然分离	—	
M018		65.6

表2 M018变株与出发菌株AS3.3410油脂脂肪酸组成的对比分析

脂肪酸种类	脂肪酸含量 (%)	
	M018变株	出发菌株
C14: 0 豆蔻酸	0.90	1.1
C14: 1 豆蔻油酸	0.1	0.1
C16: 0 棕榈酸	21.4	23.7
C16: 1 棕榈油酸	5.7	5.3
C18: 0 硬脂酸	1.3	1.3
C18: 1 油酸	49.6	50.9
C18: 2 亚油酸	11.6	10.9
C18: 3 γ-亚麻酸	7.2	4.7
C20: 0 花生酸	0.5	0.5
C20: 1 花生油酸	0.8	0.9
其它	0.9	0.6

表3 变株M018传代次数对菌丝体油脂合成的影响

传代次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
油脂含量(%)	67.5	65.4	66.2	64.7	64.9	63.5	67.2	64.3	65.2	64.8	63.7	64.7
碘值	91.2	88.7	89.3	90.4	91.7	92.5	93.0	92.1	88.3	89.7	91.2	90.7

油脂含量平均达 65.6%(表 1), 比出发菌株提高 133%。气相色谱分析表明(表 2)组成 M018 变株菌丝体油脂的 γ -亚麻酸 (GLA) 含量达 7.2%, 而出发菌株 γ -亚麻酸含量仅为 4.7%。将 M018 变株试管斜面每 10 天转接一次连续传代 12 次后, 其菌丝体油脂含量没有发生显著改变, 表 3 的结果说明了 M018 是一个稳定的变株。

2.2 碳源对 M018 菌丝生长和油脂合成的影响

改变摇瓶产脂培养基中的碳源的种类, 经摇瓶培养后获得干菌体, 测定菌丝的生物量和干菌体细胞油脂的含量(表 4)。葡萄糖是菌丝细胞生长的最适碳源, 也是菌体油脂合成的最适碳源, 其生物量达 31.2g/L 培养液, 细胞油脂含量达 66.4%, 脂肪系数高达 20.6(脂肪系数: 细胞利用 100g 糖所积累的脂肪克数)。尽管不同碳源对油脂合成影响很大, 但油脂的碘值却没有显著差异。

表4 不同碳源对变株M018菌丝细胞生长和油脂合成的影响

碳源 (10%)	生物量 (g/L培养液)	菌体油脂含量 (%)	脂肪系数	油脂碘值
葡萄糖	31.2	66.4	20.6	89.4
蔗糖	24.6	46.5	11.4	88.6
半乳糖	21.2	40.2	8.8	89.8
麦芽糖	29.3	52.5	15.4	92.5
乳糖	20.1	41.3	8.3	90.4
糊精	24.4	44.5	10.9	86.7
淀粉	12.3	41.2	5.06	88.5

2.3 不同氮源对变株 M018 菌丝细胞生长和油脂合成的影响

改变摇瓶产脂培养基中氮源(酵母膏)种类, 经摇瓶培养后获得干菌体, 测定其生物量及其油脂含量和碘值。结果(表 5)表明 $(NH_4)_2SO_4$ 、 NH_4NO_3 、 $NH_4H_2PO_4$ 和尿素适合于细胞生长, 但不利于细胞油脂的合成; 而蛋白胨、牛肉膏不适于细胞生长, 但有利于油脂的合成; 酵母

膏不仅是菌体细胞生长的适宜氮源而且也是细胞油脂合成的最佳氮源物质, 以尿素作为氮源的培养基有利于菌体细胞合成不饱和脂肪酸酯(提高碘值)。

表5 不同氮源对变株M018菌丝细胞生长和油脂合成的影响

氮源 (0.3%)	生物量 (g/L培养液)	菌体油脂含量 (%)	油脂碘值
酵母膏	32.8	67.8	90.5
$(NH_4)_2SO_4$	32.4	57.4	82.2
KNO_3	22.5	58.9	81.7
NH_4NO_3	34.2	51.0	78.5
$NaNO_3$	28.2	58.5	79.4
$NH_4H_2PO_4$	34.5	54.2	78.9
NH_4Cl	22.5	60.1	87.4
蛋白胨	22.4	67.6	79.5
牛肉膏	23.7	66.3	84.2
尿素	35.7	48.9	102.8

2.4 C/N 对 M018 菌丝生长和油脂合成的影响

细胞生长需要充足的氮源, 而细胞油脂的合成一般是在氮源贫乏的时候才开始, C/N 的高低对菌体细胞的生长和油脂的合成影响很大。经测定变株 M018 菌丝生长的最适 C/N 为 40:1, 而油脂合成的最适 C/N 为 60:1。

2.5 温度对 M018 菌丝生长和油脂合成的影响

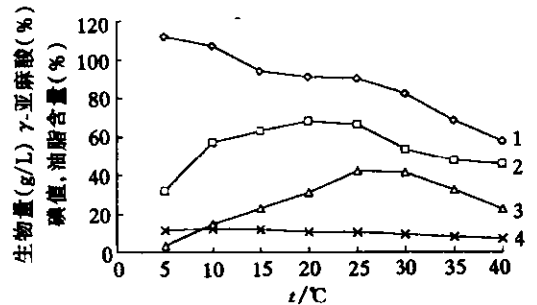


图1 培养温度对变株M018细胞生长和胞内油脂合成的影响

1. 油脂碘值, 2. 油脂含量, 3. 生物量, 4. γ -亚麻酸

M018 菌丝细胞生长和油脂合成的最适温度不相一致, 25~30℃ 适于菌丝生长; 15~20℃ 既适合细胞积累油脂又适合γ-亚麻酸的生物合成; 随着温度的升高, 油脂碘值呈下降趋势(图 1)。

2.6 Zn²⁺ 对 M018 油脂组分中不饱和脂肪酸含量的影响

以摇瓶产脂培养基(不含 Zn²⁺) 为对照, 调节培养基中 Zn²⁺ 的浓度, 观其对 M018 菌体油脂组分中不饱和脂肪酸含量(碘值的高低)的影响。结果显示尽管 Zn²⁺ 在所试浓度范围内对油脂合成总量影响甚微, 但 Zn²⁺ 在低于 200 mmol / L 浓度范围内随浓度升高可显著提高油脂的碘值; Zn²⁺ 200mmol / L 时, 菌体油脂的碘值高达 123.4, Zn²⁺ 可改善菌体油脂的不饱和度。

2.7 M018 变株 60m³ 罐上发酵产脂水平

在 60M³ 大罐规模上采用三级发酵技术对 M018 变株产脂发酵进行了连续 10 罐批中试生产, 菌体平均油脂含量达 79.2%, γ-亚麻酸平均含量达 7.2%, 菌体平均罐产量 1503Kg(表 6)。

表6 M018变株60M³罐规模发酵产脂水平

罐批号	菌体油脂含量 (%)	γ-亚麻酸含量 (%)	菌体产量 (Kg)
9508001	78.3	7.0	1532
9508002	79.8	7.2	1497
9508003	80.6	7.3	1482
9508004	82.4	7.0	1507
9509005	81.3	7.4	1521
9509006	78.0	7.5	1510
9509007	77.6	7.1	1498
9510008	77.2	6.9	1516
9510009	80.0	7.3	1476
9511010	76.8	7.2	1491
平均	79.2	7.2	1503

M018 变株在 60M³ 罐三级发酵培养过程中, 细胞油脂合成呈现稳定的累积态势(图 2)。前期 20h, 细胞消耗大量的氮源和碳源来满足菌丝生长的需要, 并迅速进入对数生长期, 30h 时生物量达 37.8g / L; 30~60h 期间, 随着培养基氮源物质的逐渐消耗, 菌体细胞开始将培养基中残留的葡萄糖大量转化合成胞内油脂, 同

时因胞内积累了大量的油脂而逐渐膨胀呈圆形、椭圆形; 10 罐批 60h 培养物的平均油脂含量达 79.2%; 60h 后随着培养基中残糖降至 1% 以下时, 菌体细胞开始部分自溶, 发酵产脂周期应控制在 60h 左右。

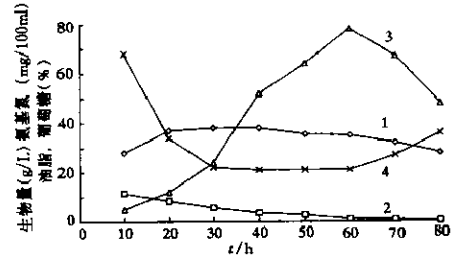


图2 M018变株60m³罐规模培养的产脂代谢曲线
1. 生物量, 2. 葡萄糖, 3. 油脂含量, 4. 氨基氮

3 讨论

优良的产脂微生物必需具备菌体油脂含量高, 菌体得率高(每升培养液中菌丝体细胞干重)和不饱和脂肪酸含量高这三个特点^[13, 14]。深黄被孢霉 M018 变株菌体油脂含量高达 79.2%, 生物量 37.8g / L, 油酸、亚麻酸和γ-亚麻酸的总量达 68.4%, M018 是一株良好的产脂微生物。我们已将 M018 变株开发成功具有良好降脂调脂功效的真菌降脂素药物。M018 变株是经 DES、NTG 等多种诱变剂复合处理选育而成的正突变株, 其油脂含量和γ-亚麻酸均比出发菌株提高了 133% 和 52%; DES 和 NTG 属烷化剂, 它们可以取代细胞 DNA 分子中活泼的氢原子, 使 DNA 分子的碱基及磷酸基团发生烷化作用, 从而使得 DNA 分子复制时碱基发生错配而引起突变^[15]。

油脂碘值的高低直接反映了脂肪酸组分中不饱和脂肪酸含量的高低, 也决定了油源的经济价值。油酸、亚油酸和γ-亚麻酸的生物合成都与不同的脱饱和酶的催化作用有关^[16], 脱饱和酶的生物合成及其酶活性的高低与 Zn²⁺ 有关^[17]。本文的试验结果也同样证实了 Zn²⁺ 可以提高 M018 变株油脂中不饱和脂肪酸的总量。Cohen^[18] 发现了吡啶族的除草剂能显著抑制脂肪酸脱饱和酶的活性, 我们将进一

步以抗吡啶族除草剂为突变标记,以 M018 菌株为出发菌株选育出不饱和脂肪酸含量更高的优良菌株。

参 考 文 献

- [1] Abraham M J, Srinivasan R A. *J Food Sci*, 1984, 49:950~951.
- [2] Davies R J, Holdsworth J E. *Adv Appl Lipid Res*, 1992, 1:119~159.
- [3] Babi J T, Moss F J, Ralph B J. *Biotechnol Bioeng*, 1969, 11:593~630.
- [4] Farag R S, Knalil F A, Salen H, Ali L H M. *JAQCS*, 1983, 60:785~800.
- [5] Hansson L, Dostalek M. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, 28:240~246.
- [6] Sakayu Shimizu, Hiroshi Kawashima, Yoshifumi Shinmen *et al.* *JAQCS*, 1988, 56:1455~1459.
- [7] 张峻, 邢来君, 王红梅. *微生物学通报*, 1993, 20(3): 140~143.
- [8] 方心芳. *应用微生物学实验法*. 北京:中国轻工业出版社, 1993, 22~23.
- [9] Gunter Zweig, Joseph Sherma. *Handbook of Chromatography*. Florida: CRC Press Inc. 1984, 33~37.
- [10] 李建武, 肖能庚, 余瑞元等. *生物化学实验原理和方法*. 北京:北京大学出版社, 1991, 139~141.
- [11] 北京大学生物系生化教研室. *生物化学实验指导*. 北京:高等教育出版社, 1984, 22~24.
- [12] 天津轻工学院等. *工业发酵分析*. 北京:中国轻工业出版社, 1994, 118~123.
- [13] 铃木修. *发酵工业*, 1985, 43(11):1024.
- [14] 吴菊芬, 储云福, 章健等. *工业微生物*, 1989, 19(4): 10~13.
- [15] 施巧琴, 吴松刚. *工业微生物育种学*. 福州:福建科学技术出版社, 1991, 50~57.
- [16] Andrew K, Ratledge C. *Eur J Biochem*, 1992, 209: 667.
- [17] Max J, Sarah L R, Davies R J. *Biotechnology and Bioengineering*, 1993, 42:625~634.
- [18] Cohen Z, Didi S, Heimer Y. *Plant Physiol*, 1992, 98: 569~572.

STUDIES ON THE BREEDING OF *MORTIERELLA ISABELLINA* MUTANT HIGH PRODUCING LIPID AND ITS FERMENTATION CONDITIONS

Huang Jianzhong Shi Qiaoqin Zhou Xiaolan Lin Yaixin Xie Bifeng Wu Songgang

(*Bioengineering College of Fujian Normal University, Fuzhou 350007*)

Abstract A mutant strain M018 accumulating a large amount of lipid was successful obtained when the original strain *Mortierella isabellina* AS3.3410 was treated by UV, DES, NTG as mutating agent. The content of lipid in M018 mycelium cultured in 500ml shaking flask was up to 65.5%, which was 133% higher than that in the original strain mycelium, and the content of lipid in M018 mycelium cultured in 60m³ fermentor was up to 79.2% with biomass 37.8g/L. Analysis by gas chromatograph indicated content of γ -linolenic existing in lipid from M018 mycelium was 7.2% which was 53% more than that from AS3.3410 mycelium. Pass-generation test showed that the heredity character of mutant M018 was stable. The optimal medium for M018 producing lipid was made up of glucose as carbon source and yeast extract as nitrogen source with C/N ratio 60:1. Temperature 25~30°C was suitable for M018 mycelium growing and 15~20°C was more suitable for the mycelium producing lipid. The fermentation course curve showed that the mutant M018 began to rapidly convert glucose existing in fermentative medium into lipid when the content of nitrogen source was very low. Ion Zn²⁺ could improve idion value of lipid.

Key words *Mortierella isabellina*, Breeding, Lipid, Fermentation