

生物工程

# 高产花生四烯酸高山被孢霉的诱变育种研究

唐鑫, 陈海琴, 姚青蔚, 顾震南, 张灏, 陈永泉, 陈卫

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:**通过菌种选育获得具有优良产脂性能的菌株是实现微生物油脂工业化生产的重要前提。利用实验室前期构建的产油丝状真菌快速筛选技术,以前期筛选获得的一株性状优良的高山被孢霉 TSM-3 为出发菌株,通过常压室温等离子体(ARTP)诱变方法得到能够稳定遗传的高产突变菌株 TSM-3-1,其油脂产量和花生四烯酸(AA)产量分别达到 5.07 g/L 和 1.55 g/L,与出发菌株相比分别提高了 47.81% 和 84.52%。将产油丝状真菌快速筛选技术与诱变育种相结合,提高了目标菌株筛选效率并强化了野生型菌株油脂合成能力,为产油丝状真菌菌种选育提供了新颖的研究思路及方法。

**关键词:**花生四烯酸; 高山被孢霉; 诱变育种; 油脂产量; 常压室温等离子体

中图分类号: Q81; TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2018)08-0104-05

## Mutation breeding of high arachidonic acid – producing strain in *Mortierella alpina*

TANG Xin, CHEN Haiqin, YAO Qingwei, GU Zhennan, ZHANG Hao, CHEN Yongquan, CHEN Wei

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:** Obtaining the strains with good properties through breeding technologies is the precondition of achieving industrial production of microbial oil. *Mortierella alpina* TSM-3 was selected as the original strain, which was screened through a quick and efficient screening strategy for oleaginous filamentous fungi established by laboratory before. By the method of atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis, the oil and arachidonic acid(AA) yields reached 5.07 g/L and 1.55 g/L in the stable genetic mutant strain *M. alpina* TSM-3-1, which increased by 47.81% and 84.52% compared with the original strain. By means of combining the quick and efficient screening strategy with ARTP mutation breeding, the screening efficiency and oil producing capacity of wild strain were well enhanced, which provided a novel research strategy in the study of oleaginous filamentous fungi.

**Key words:** arachidonic acid; *Mortierella alpina*; mutation breeding; oil yield; atmospheric and room temperature plasma

多不饱和脂肪酸(PUFAs)是人类膳食中重要的营养物质,其中 $\omega-3$ 系列二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)和 $\omega-6$ 系列花生四烯酸

(AA)因在维持身体健康和预防疾病等方面的有益作用而备受关注<sup>[1-2]</sup>。PUFAs的传统来源主要是深海鱼油和植物油,但因海洋及土地资源无法满足日益增长的市场需求,以及环境污染等潜在危害,使得开发微生物来源的PUFAs成为该领域的研究热点<sup>[2-3]</sup>。尽管目前已在自然界中筛选到很多具有PUFAs合成能力的产油微生物,但这些野生菌株的生长性状和产脂能力还无法满足工业化生产需求。因此,还需通过诱变育种、基因工程改造及发酵条件

收稿日期:2018-03-28;修回日期:2018-05-25

基金项目:江苏省自然科学基金青年基金(BK20160172)

作者简介:唐鑫(1987),男,助理研究员,博士,研究方向为食品生物技术(E-mail)xintang@jiangnan.edu.cn。

通信作者:陈海琴,教授(E-mail)haiqinchen@jiangnan.edu.cn。

优化等手段进一步强化野生型菌株的产脂性状,以获得适用于工业化生产的优良菌株。

本实验室前期以脂肪酸合酶(FAS)抑制剂浅蓝菌素为抗性筛选因子,以表征脱氢酶活性的氯化三苯基四氮唑(TTC)为筛选指示剂,建立了一种从环境中快速、高效筛选具有较高FAS活性且高产PUFAs丝状真菌的方法<sup>[4]</sup>,为产油丝状真菌的筛选研究提供了极大便利。基于以上方法,本实验室筛选到一株具有优良产脂性状的高山被孢霉(*Mortierella alpina*) TSM-3<sup>[4]</sup>。为进一步优化该菌株产脂性能,通过常压室温等离子体(ARTP)技术<sup>[5-6]</sup>对该菌株诱变育种。ARTP是用于生物育种的新方法,可通过产生高浓度中性活性粒子破坏靶细胞DNA和蛋白质等大分子结构,导致生物体启动自身DNA修复机制自动修复损伤,并在修复过程中产生基因突变<sup>[7-8]</sup>。ARTP因其活性粒子浓度高、损伤机制多样、突变率高、突变快速和操作安全便捷等优点<sup>[6]</sup>,已被成功应用于细菌、放线菌、微藻、酵母、真菌等40余种微生物中<sup>[9]</sup>。本研究将ARTP诱变育种技术与前期建立的高效筛选策略相结合,以期获得具有良好产脂性状的产油丝状真菌。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌株

实验所用菌株为高山被孢霉TSM-3,为本实验室自行筛选获得<sup>[4]</sup>。

#### 1.1.2 主要试剂

浅蓝菌素、氯化三苯基四氮唑(TTC)购自碧云天生物公司;葡萄糖试剂盒(F006)购自南京建成生物公司;酵母提取物购自Oxoid公司;正十五烷酸(C15:0)、盐酸甲醇购自Sigma公司;实验所用其他试剂购自江南大学后勤管理处。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 培养基配制

PDA培养基、Broth种子培养基及发酵培养基、GY培养基配制方法见参考文献[10]。

7.5 L 搅拌式发酵罐培养基(装液量4 L):初始葡萄糖50 g/L,豆粕粉20 g/L,磷酸二氢钾1 g/L,七水合硫酸镁0.25 g/L,硝酸钾5 g/L。后根据需要在发酵过程中分批补充葡萄糖。

#### 1.2.2 孢子悬液制备

取高山被孢霉TSM-3固体GY斜面试管1支,用6~8 mL 0.9%的生理盐水冲刷斜面,使用45 μm滤膜过滤以截留菌丝,得到孢子悬液,适度稀释

控制孢子浓度为 $10^6$ 个/mL数量级。新鲜孢子液用于诱变育种,其余保存于甘油管中冻存备用。

#### 1.2.3 常压室温等离子体(ARTP)诱变

通过ARTP诱变仪对出发菌株进行诱变育种。实验工作气体为氦气,诱变操作条件如表1所示,高活性粒子浓度的等离子体射流温度为25~35℃。取10 μL上述新鲜孢子悬液(浓度为 $10^6$ 个/mL)于无菌金属载片表面,将载片置于ARTP诱变仪操作室载物台的凹槽内用于后续实验。

表1 ARTP诱变条件

诱变参数	操作条件
功率/W	100
处理距离/mm	2
气体流量/(L/min)	10
诱变时间/s	0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180

#### 1.2.4 致死率曲线的确定

为研究诱变时间对诱变后孢子存活率的影响,以诱变时间为横坐标,致死率为纵坐标,制作ARTP对高山被孢霉TSM-3孢子的致死率曲线。诱变时间由10 s递增至180 s,洗脱金属载片上的经诱变处理的孢子,稀释后涂布于PDA平板,28℃培养3 d,以菌落形成单位(CFU)计算致死率<sup>[9]</sup>。对照组为稀释相同倍数未经诱变的孢子液。致死率计算公式为:

$$\text{致死率} = (\text{空白对照菌落形成数} - \text{诱变后菌落形成数}) / \text{空白对照菌落形成数} \times 100\%$$

#### 1.2.5 正突变菌株的筛选

根据1.2.4中确定的致死率曲线选择最佳处理时间进行诱变。诱变处理后将涂有孢子液的金属载片放入装有990 μL无菌水的EP管中,充分振荡洗脱金属载片上的孢子,梯度稀释后涂布于含有 $1 \times 10^{-7}$  mol/L浅蓝菌素和0.5 g/L的TTC的PDA平板上,28℃避光培养3 d,每天观察突变菌株的生长状况,根据菌落大小及菌落颜色(红色)深浅,排除生长速度慢、菌落颜色浅(白色或浅粉红色)的突变菌株,挑选目标突变菌株分离纯化,摇瓶发酵复筛并提脂分析。

#### 1.2.6 菌株培养

取保藏于甘油管中的孢子液接入Broth种子培养基,28℃、200 r/min培养48 h后用组织分散器打碎,将打碎液以1%的接种量接于Broth种子培养基,28℃、200 r/min培养36~48 h,重复上述步骤,接于Broth发酵培养基,28℃、200 r/min发酵培养7 d。

### 1.2.7 遗传稳定性分析

为考察高产突变菌株的遗传稳定性,将高产突变菌株在 Broth 发酵培养基中进行 7 次传代培养,根据每一代菌体的生长速度、生物量、总脂及脂肪酸组成情况分析其遗传稳定性。

### 1.2.8 培养基葡萄糖含量测定

取培养基上清液过滤除菌,根据南京建成生物公司葡萄糖试剂盒(F006)说明书进行葡萄糖含量测定。

### 1.2.9 发酵罐实验

搅拌式发酵罐容量为 7.5 L(装液量 4 L),发酵液 pH 为 6.0,搅拌速率为 500 r/min,初始通气量为 2 L/min。发酵过程中,根据菌体生长情况调节搅拌速率和通气量,将溶氧保持在 20% 以上,采用分批补料发酵方式补充葡萄糖。每隔 24 h 取样一次并测定发酵液中残糖浓度,以便进行适时补糖。

### 1.2.10 脂肪酸组成分析

收集湿菌体后用水洗去残余培养基,真空冷冻干燥后称量菌体干重后使用氯仿-甲醇法提脂,之后通过 GC-MS 分析。脂肪酸组成分析的具体操作步骤参见文献[10-11]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 ARTP 诱变致死率曲线的测定

有文献报道,适当的 ARTP 诱变时间能够促使微生物产生快速突变,诱变致死率在 90%~95% 时正突变率最高<sup>[5,9]</sup>,因此需通过致死率曲线确定最佳诱变时间。图 1 为 ARTP 诱导时间对菌株 TSM-3 的致死率曲线。

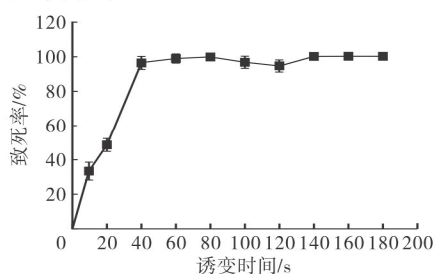


图 1 ARTP 诱变时间对菌株 TSM-3 的致死率曲线

如图 1 所示,ARTP 等离子体对高山被孢霉 TSM-3 孢子有较强的杀伤力,在 0~40 s 内诱变时间与致死率呈正相关;当诱变时间为 40 s 时,致死率达到 95%;诱变时间达到 80 s 时,致死率达到 100%。但是当诱变时间在 80~140 s 内时,致死率出现先降低后增加的趋势,至 140 s 后逐渐趋于稳定,致死率达到 100%。由于 ARTP 诱变产生的突变存在随机性,且受诱变条件和菌株自身特性影响,会导致致死率出

现一定波动。为便于选择最有可能高产的单菌落,选择致死率在 95% 以上的诱变时间(40 s)对高山被孢霉 TSM-3 的新鲜孢子进行诱变。

### 2.2 高产突变菌株的快速筛选

依据本实验室前期建立的产油丝状真菌高效筛选方法<sup>[4]</sup>及 ARTP 对高山被孢霉 TSM-3 最佳诱变时间(40 s),将诱变后的 TSM-3 孢子进行梯度稀释,按照 1.2.5 的方法进行筛选,总共从初筛平板上挑取 20 株突变菌株进行后续摇瓶发酵复筛实验。发酵结束后收集湿菌体,真空冷冻干燥后测定菌体干重并进行提脂分析。

根据菌体干重及脂肪酸组成分析,各突变菌株与出发菌株 TSM-3 的生物量、油脂产量及 AA 产量如表 2 所示。

表 2 出发菌株 TSM-3 和 20 个突变菌株的生物量、油脂产量和 AA 含量

菌株编号	生物量/(g/L)	油脂产量/(g/L)	AA 含量/(mg/L)
TSM-3	12.91	3.59	943.33
TSM-3-1	13.21	5.07	1 551.47
TSM-3-2	12.58	4.34	1 368.75
TSM-3-3	12.82	4.01	1 250.23
TSM-3-4	12.38	3.94	1 280.66
TSM-3-5	13.12	4.79	1 394.60
TSM-3-6	12.15	3.86	1 216.72
TSM-3-7	13.10	3.80	961.26
TSM-3-8	12.44	3.95	970.37
TSM-3-9	12.39	3.40	798.91
TSM-3-10	14.11	4.53	1 072.38
TSM-3-11	14.70	3.84	964.30
TSM-3-12	13.12	3.95	911.72
TSM-3-13	12.76	3.80	923.92
TSM-3-14	13.13	3.53	901.24
TSM-3-15	12.79	3.30	805.91
TSM-3-16	12.46	3.24	738.92
TSM-3-17	13.32	3.86	932.98
TSM-3-18	12.67	3.58	819.83
TSM-3-19	13.66	4.08	981.56
TSM-3-20	12.67	3.69	895.03

由表 2 可知,与出发菌株相比,初步筛选得到的 20 株突变菌株中 15 株油脂产量有所提高,但生物量无明显差异,再次证实前期构建的产油丝状真菌快速筛选技术的高效性及准确性。综合比较各突变菌株的生长情况以及油脂和 AA 合成能力,认为突变菌株 TSM-3-1 产脂性状呈现较大优势,可用于后续实验。

进一步对突变菌株 TSM-3-1 进行发酵培养,分析其生物量、油脂产量及 AA 产量,结果如表 3 所示。

表3 出发菌株 TSM-3 和突变菌株 TSM-3-1

菌株	发酵结果比较		
	生物量	油脂产量	AA 产量
TSM-3	12.67 ± 0.44	3.43 ± 0.07	0.84 ± 0.02
TSM-3-1	13.21 ± 0.06	5.07 ± 0.08	1.55 ± 0.03

由表3可知,在相同发酵条件下,出发菌株 TSM-3 和突变菌株 TSM-3-1 生物量无明显差异,但突变菌株 TSM-3-1 油脂产量和 AA 产量分别达到 5.07 g/L 和 1.55 g/L,比出发菌株提高 47.81% 和 84.52%,即 ARTP 诱变处理显著提高了突变菌株油脂积累能力和 AA 合成能力。进一步分析出发菌株 TSM-3 和突变菌株 TSM-3-1 的脂肪酸组成,如图2所示。

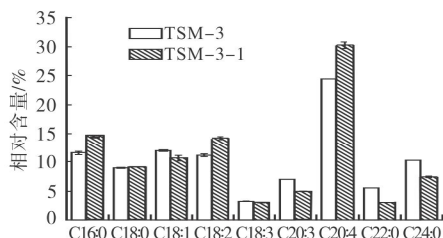


图2 出发菌株 TSM-3 和突变菌株 TSM-3-1 脂肪酸组成分析

表4 突变菌株 TSM-3-1 的遗传稳定性分析

项目	第一代	第二代	第三代	第四代	第五代	第六代	第七代	平均值
生物量	13.01	12.91	13.56	12.85	13.42	13.81	12.83	13.20
油脂产量	4.38	4.50	4.60	4.65	4.68	4.71	4.54	4.58
AA 产量	1.05	1.04	1.10	1.12	1.08	1.13	1.00	1.07

#### 2.4 突变菌株 TSM-3-1 发酵罐扩大培养

在培养基组成相同的条件下,由于摇瓶培养与发酵罐扩大培养在溶氧、传质及搅拌速率等发酵参数方面的不同,导致发酵结果有所差异。为进一步考察突变菌株 TSM-3-1 生长以及产脂性能,在 7.5 L 搅拌式发酵罐中对其进行扩大培养。发酵培养基配制方法及发酵参数如 1.2.1 和 1.2.9 所述。前期报道显示,一定范围内较高的碳氮比有利于产油微生物油脂积累<sup>[12]</sup>,但当培养环境中初始葡萄糖浓度过高时,高渗透压会导致细胞生长受限<sup>[13-14]</sup>。为避免这一不利因素,每 24 h 取样分析菌体生物量及油脂产量,并测定发酵液中残糖含量,采用分批补料发酵的方式添加葡萄糖,以消除高渗透压对菌体生长的抑制并维持适合油脂积累的碳氮比。发酵过程中生物量、油脂产量、AA 产量及残糖含量变化如图3所示。

由图3可知,在发酵前 4 d,培养基中的营养物质主要被菌体用于生长繁殖,生物量不断增加;发酵

由图2可知,出发菌株 TSM-3 和突变菌株 TSM-3-1 的脂肪酸组成并无差异,但部分脂肪酸相对含量有所变化。突变菌株 TSM-3-1 中棕榈酸(C16:0)、亚油酸(C18:2)和花生四烯酸(C20:4)相对含量明显提高,二十四烷酸(C24:0)相对含量则明显降低,而硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1)、亚麻酸(C18:3)、双高亚麻酸(C20:3)以及二十二烷酸(C22:0)相对含量无明显变化。

#### 2.3 突变菌株遗传稳定性分析

良好的遗传稳定性是工程菌株用于工业化生产的必要前提,为分析所选突变菌株的遗传稳定性,对突变菌株 TSM-3-1 进行连续 7 代的摇瓶传代培养,对各代菌株生物量、油脂产量及 AA 产量进行分析,结果见表4。由表4可知,突变菌株 TSM-3-1 生物量、油脂产量和 AA 产量维持在较稳定的状态,生物量最高可达 13.81 g/L,油脂产量最高为 4.71 g/L,AA 产量为 1.13 g/L。实验结果表明,经 ARTP 诱变的突变菌株 TSM-3-1 能够稳定遗传 7 代,且产脂性状没有发生改变,具有良好的遗传稳定性。

中、后期,生物量增长基本趋于平稳,在发酵末期达到 38 g/L。测定发酵过程中残糖含量发现,菌体耗糖量每天约为 10 g/L,且发酵前期因菌体快速增长其耗糖速率较快。为保证菌体自身正常生长的同时还有足够的碳源用于油脂积累,根据培养液残糖含量在发酵 3、4 d 和 5 d 进行分批补糖。在整个发酵过程中,油脂产量呈现缓慢上升的趋势,7 d 发酵结束后油脂产量达到 10 g/L。AA 产量在发酵前期增长缓慢,而在发酵后期 AA 有明显上升趋势,最终 AA 产量为 1.7 g/L。

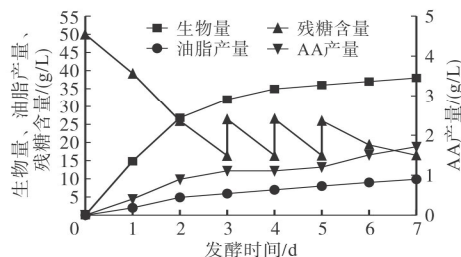


图3 突变菌株 TSM-3-1 在 7.5 L 搅拌式发酵罐中生长及油脂积累情况

观察发酵过程中的菌体生长状态发现,发酵前期生物量的快速增长使菌体贴罐壁生长而结块,且整个发酵过程中生物量偏高,直至第4天才进入稳定期。较高的生物量会导致发酵过程中溶氧降低,限制了脂肪酸合成过程中碳链的延长及脱饱和过程,因此发酵末期突变菌株AA产量与摇瓶发酵相比提高幅度不大。此外,菌体油脂产量在发酵过程中一直呈上升趋势,若适当延长发酵周期,可能有助于进一步提高突变菌株总脂及AA产量。但由于发酵后期营养物质的耗尽、以及某些代谢产物特别是次级代谢产物的积累会抑制菌体生长,延长发酵周期可能会降低生物量。因此,还需通过发酵条件优化使油脂积累与菌体生长达到一个良好的平衡点,在提高生物量的同时,进一步提高突变菌株产脂性能。

### 3 结论

本研究通过ARTP技术对筛选到的性状优良的高山被孢霉TSM-3进行诱变育种,得到遗传性状稳定的高产突变菌株TSM-3-1,其平均油脂产量和花生四烯酸(AA)产量分别达到5.07 g/L和1.55 g/L,与出发菌株相比分别提高了47.81%和84.52%,具有很好的油脂合成能力及AA合成能力。这种基于产油丝状真菌快速筛选技术与ARTP诱变育种相结合的方式大幅提高了产油丝状真菌筛选效率,并进一步强化了野生型菌株油脂合成能力,为产油微生物菌种选育提供了新颖的研究思路并具有广泛的应用前景。后期还需进一步对该菌株发酵条件进行优化,在满足生物量的同时提高其油脂产量及AA产量,为该菌株的应用奠定基础。

### 参考文献:

- [1] CONNOR K M, SANGIOVANNI J P, LOFQVIST C, et al. Increased dietary intake of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis[J]. Nat Med, 2007, 13(7):868-873.
- [2] GONG Y M, WAN X, JIANG M L, et al. Metabolic engineering of microorganisms to produce  $\omega$ -3 very long-chain polyunsaturated fatty acids[J]. Prog Lipid Res, 2014, 56:19-35.
- [3] TAI M, STEPHANOPOULOS G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production[J]. Metab Eng, 2013, 15: 1-9.
- [4] 陈海琴, 陈永泉, 陈卫, 等. 一种用于快速筛选产多不饱和脂肪酸丝状真菌的培养基及其用途: CN106834125A [P]. 2017-06-13.
- [5] HUA X F, WANG J, WU Z F, et al. A salt tolerant *Enterobacter cloacae* mutant for bioaugmentation of petroleum- and salt-contaminated soil[J]. Biochem Eng J, 2010, 49(2):201-206.
- [6] LU Y, WANG L Y, MA K, et al. Characteristics of hydrogen production of an *Enterobacter aerogenes* mutant generated by a new atmospheric and room temperature plasma (ARTP)[J]. Biochem Eng J, 2011, 55(1):17-22.
- [7] SHI J J, KONG M G. Expansion of the plasma stability range in radio-frequency atmospheric-pressure glow discharges[J]. Appl Phys Lett, 2005, 87(20):1685.
- [8] SCHUTZE A, JEONG J Y, BABAYAN S E, et al. The atmospheric-pressure plasma jet: a review and comparison to other plasma sources[J]. IEEE T Plasma Sci, 1998, 26(6):1685-1694.
- [9] 王玉霞, 胡基华, 刘宇帅, 等. 低温生防菌株的诱变选育及生防效果[J]. 核农学报, 2017, 31(10):1873-1880.
- [10] 郝光飞. 高山被孢霉脂肪酸合成过程转录水平调控和还原力来源研究[D]. 江苏无锡:江南大学, 2014.
- [11] WANG L, CHEN W, FENG Y, et al. Genome characterization of the oleaginous fungus *Mortierella alpina*[J]. Plos One, 2011, 6(12):1-16.
- [12] VELMURUGAN N, SUNG M, YIM S S, et al. Systematically programmed adaptive evolution reveals potential role of carbon and nitrogen pathways during lipid accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Biotechnol Biofuels, 2014, 7(1):1-15.
- [13] ZHOU A, MA H, FENG S, et al. A Novel sugar transporter from *Dianthus spiculifolius*, DsSWEET12, affects sugar metabolism and confers osmotic and oxidative stress tolerance in arabidopsis[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2):497.
- [14] TIAN X W, WANG Y H, CHU J, et al. Enhanced L-lactic acid production in *Lactobacillus paracasei* by exogenous proline addition based on comparative metabolite profiling analysis[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(5):2301-2310.