

低能离子注入在花生四烯酸(AA)高产菌株选育中的研究

袁成凌 姚建铭 王纪 余增亮

(中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程学重点实验室 合肥 230031)

摘要 利用低能离子束生物技术对花生四烯酸产生菌(*Mortierella alpina*)进行诱变选育。研究表明,在离子注入(10keV , $3\times 10^{14}\text{N}^+/\text{cm}^2$)条件下,后代菌株离散程度明显高于自然分离。经连续诱变处理,最终获得一株花生四烯酸高产菌 $I_{49}\text{-N}_{18}$,该菌每升培养液可得生物量 26.3g ,干菌体中油脂含量为 33.8% ,其中花生四烯酸的含量占总脂的 52.36% 。而其AA产量高达 4.66g/L ,比对照 N_7 菌株产量提高 126.2% ,且继代遗传功能稳定,表明 $I_{49}\text{-N}_{18}$ 是一株极具工业化前景的高产菌,同时证明离子注入是一种有效的诱变手段。

关键词 花生四烯酸,离子注入,诱变,筛选,发酵

中图分类号 TL99, Q547, TQ92

低能离子生物学是一门新兴边缘交叉学科,它在生物技术上的应用是育种方法学的重要创新。离子束诱变技术、离子束DNA大分子转移技术、离子束辅助农杆菌遗传转化技术、离子束介导超远缘分子杂交技术和离子束细胞加工技术等已成为定向遗传改良的新方法、新途径^[1]。离子束作为一种新的诱变源,一经在工业微生物诱变育种上应用,就体现了强大的优越性。离子注入生物体集能量沉积、动量传递、质量沉积及电荷交换等效应^[2-4],同时还具有高LET(传能线密度)值、集束性好、射程可控、能量沉积和质量沉积区域集中等特点,因此可以在损伤轻的情况下,获得更高的突变率和更宽的突变谱。

花生四烯酸(Arachidonic acid,简称AA,C20:4)是人体内一种重要的多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acids, PUFAs)。它具有益智健脑,提高视敏度,酯化胆固醇,抑制血小板聚集,增加血管弹性,降低血液粘度,调节血细胞功能,提高免疫力等一系列生理活性,与人类的健康密不可分。AA的缺乏对于人体组织器官的发育,尤其是大脑和神经系统的发育将产生严重不良的影响,并且还容易引起心血管疾病的产生^[5-7]。Birch等采用不同配方奶对新生儿的喂养实验表明^[8],AA+DHA组的婴儿平均智力水平比对照组高出7分,比DHA组高出3分,进一步证实了AA对婴幼儿大脑神经系统发育的重要作用。1999年4月,

国家卫生部批准花生四烯酸作为新型营养强化剂。

天然的AA广泛而少量地存在于动物的肝和肾上腺、鱼油、微生物(原生动物、变形虫、微藻以及真菌)中,目前国际上销售的花生四烯酸主要是以其甲酯形式从动物脂质或鱼油中分离出来,但不适合于大规模的生产,产品不能满足市场需求,AA的价格一直居高不下,因此长期以来其研究和应用一直受到限制。利用微生物发酵法生产AA已成为许多国家的研究热点,尤其是日本、美国一直都致力于运用现代生物工程进行AA工业化生产的研究,并已相继有花生四烯酸的发酵产品问世^[9,10]。国内在这一领域的研究起步较晚,华南理工大学食品与生物工程学院、山东大学微生物系和南开大学生物系等在微生物发酵生产花生四烯酸方面作了比较深入的研究^[11-13],但还存在菌体产率以及油脂含量偏低的问题,因此离大规模生产还存在一定的距离。

我们应用低能离子注入技术对AA产生菌进行诱变改良,筛选得到一株AA高产菌,AA产量为 4.66g/L ,比出发菌株产量提高 126.2% ,发酵水平处于国内外领先地位,且该菌株培养条件粗放,易于产业化。

1 材料与方法

1.1 出发菌株

AA产生菌 N_7 ——高山被孢霉(*Mortierella*)

国家“九五”、“十五”重点科技攻关项目支持,专题编号:96-538-01-02;2001BA302B-04

第一作者:袁成凌,女,1973年12月出生,2002年在中国科学院等离子体物理研究所获博士学位,核能科学与工程专业

收稿日期:初稿2002-05-18,修回2002-12-16

alpina), 由中国科学院离子束生物工程学重点实验室保存。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 马铃薯葡萄糖培养基(PDA)^[14]。

1.2.2 发酵罐培养基(%) 葡萄糖 8.0, 蛋白胨 1.2, 酵母粉 0.7, 花生饼粉 0.4, pH 8.5。

1.3 培养工艺

1.3.1 斜面培养 沙土管菌种接种于试管斜面, 28℃培养 7d, 转接至茄子瓶斜面 28℃培养 5—6d。

1.3.2 摇瓶培养 分别将 100mL 种子培养基装入 500mL 三角瓶中, 120℃灭菌 30min, 冷却后, 按 5% 接种量接入单孢子悬液, 置于摇床 (200r/min) 28℃培养 10d。

1.4 离子注入诱变选育方法

1.4.1 50keV 离子注入机 由中国科学院离子束生物工程学重点实验室自行研制。

1.4.2 诱变育种方案 出发菌株沙土管→母斜面→子斜面→单孢子悬浮液→涂无菌平皿、风干→离子注入→稀释涂平皿→挑单菌落传斜面→摇瓶初筛→挑高产斜面→摇瓶复筛→挑高产菌株埋沙土—(→斜面→单孢子悬浮液→摇瓶复筛→挑高产菌株埋沙土—)_n→稳定性考察→小试、中试→工业化生产。

1.4.3 离子注入诱变处理 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, 选单菌落转接斜面培养, 接摇瓶发酵。

1.5 分析方法

1.5.1 生物量测定 菌丝体干重法, 取培养好的菌体发酵液 100mL, 用双层纱布过滤, 水洗充分, 在 105℃下烘干到恒重, 称干重。

1.5.2 菌体总脂测定 直滴式索氏提取法^[15]。

1.5.3 AA 含量测定 气相色谱法 (GC)。

1.5.4 GC 样品预处理方法 KOH-CH₃OH/ BF₃-CH₃OH 甲酯化^[16]。

1.5.5 色谱条件 岛津 GC-14A 气相色谱仪, C-R4A 数据处理仪, 毛细管柱 BPX70, (25m× ϕ 0.22mm×0.25 μ m), 氢焰离子化检测器 (FID), 柱温在 120—240℃, 5℃/min 程升, 进样量: 1.0 μ L, 分流比: 1:80, 气化室温度 250℃, 检测室温度为 250℃

1.5.6 致死率的计算 致死率是通过注入前后孢子液活菌计数来测定的。在制备注入平皿的同时, 同样方法制备对照皿。两者同时进行吹干, 同时放入靶室抽真空。放置时, 将两皿叠加, 注入皿在上, 这样注入皿接受离子注入而对照皿不接受注入。注入结束后, 用 2mL 无菌水将附于平皿上的孢子洗下, 适当稀释后涂平皿。28℃培养 48h 后计数并计算出致死率。

2 结果与讨论

2.1 注入离子能量和剂量的选择

多数试验表明, N⁺ 在诱变育种中效果较好。因此, 本实验选用 N⁺ 作为注入离子, 对 N₇ 菌株进行诱变筛选实验, 其注入离子能量、注入率 (即单位面积注入的离子数) 与致死率的关系见表 1。

Table 1 Death rate / % of the N₇ strain under N⁺ implantation of different energies

Energy	N ⁺ implantation rate (N ⁺ /cm ²)				
	1.5×10 ¹⁴	2×10 ¹⁴	3×10 ¹⁴	4×10 ¹⁴	6×10 ¹⁴
10keV		65.50	70.30	95.40	100
15keV	90.27		98.75		100
20keV		99.0		99.5	100

现代育种理论认为^[17]: 当被诱变的微生物致死率在 70%—75%左右时, 产量性状的正常突变率往往很高, 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, 选择 10keV, 3×10¹⁴N⁺/cm² 作为该菌株的离子注入参数, 实践证明较为有效。

2.2 10keV, 3×10¹⁴N⁺/cm² 下的诱变效果分析

为考察离子注入对 *Mortierella alpina* 菌株的诱变效果,从 N₇ 自然分离和离子注入后所得菌株的测定结果中分别随机抽取 50 个数据,考察两者单位培养基 AA 产量的分布情况。由于所取的数据来自于不同批试验,为消除批间误差,AA 产量数值为其相对值,即每个菌株 AA 实际产量与该批对照菌株产量的比值。表 2 为 N₇ 菌株自丝分离 AA 相对产量频数表;表 3 为 N₇ 菌株离子注入 AA 相对产量频数表。

Table 2 Relative AA yield frequency of natural division strain

Yield section	Number	Frequency
0.84—0.89	6	0.12
0.89—0.94	4	0.08
0.94—0.99	11	0.22
0.99—1.04	6	0.12
1.04—1.09	14	0.28
1.09—1.14	4	0.08
1.14—1.19	3	0.06
1.19—1.24	2	0.04
Total	50	1.00

Table 3 Relative AA yield frequency of ion implanted strain

Yield section	Number	Frequency
0.77—0.85	4	0.08
0.85—0.93	3	0.06
0.93—1.01	10	0.20
1.01—1.09	9	0.18
1.09—1.17	10	0.20
1.17—1.25	9	0.18
1.25—1.33	4	0.08
1.33—1.41	1	0.02
Total	50	1.00

为了更直观地描述这两个分布,将表 1 和表 2 做出 AA 产量分布直方图 (见图 1)。

由图 1 可以看出,两种情况下,AA 产量分布均趋向于正态分布。为进一步验证这个结果,对其进行正态分布的符合度检验。首先由公式 (1)、(2) 计算出两分布的平均数和标准差,分别为 1.01、0.097 和 1.08、0.135。由此可以看出,后者的离散程度比前者大,提示离子注入对微生物有明显的诱变作用。

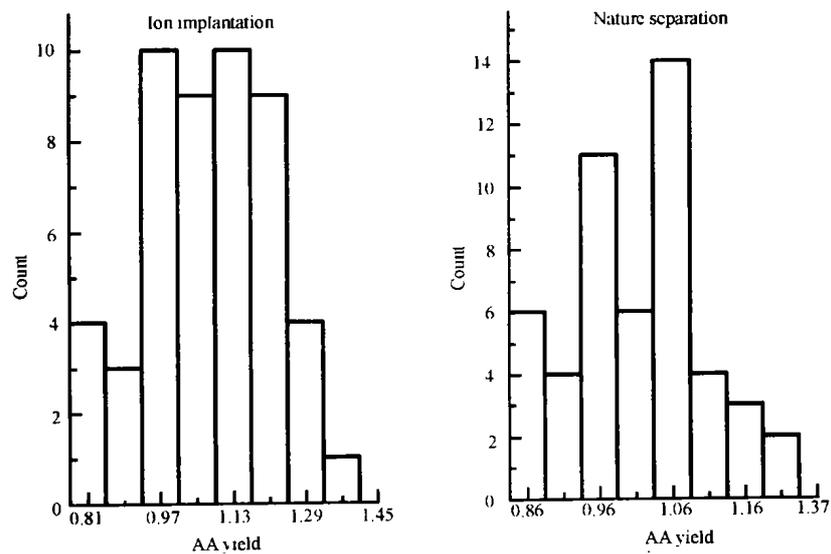


Fig.1 Distribution of relative AA yield of natural division and N⁺ implanted strains Left: N⁺ implanted, Right: natural division.

$$x=1 / 50\sum x_i \quad (1)$$

$$S^2=[\sum x^2 - (\sum x)^2 / 50] / (50-1) \quad (2)$$

进一步假设自然分离和离子注入下 AA 产量分布分别服从正态分布 $N(1.01, 0.097^2)$ 和 $N(1.08, 0.135^2)$, 经过计算后查 χ^2 分布表, 证明 AA 产量分布符合正态分布, 而不是随机无序的。

2.3 离子注入诱变对 *Mortierella alpina* AA 产量的影响

产量性状往往是微效多基因调控的数量性状, 因此, 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 AA 高产菌 $I_{49-N_{18}}$ 。较出发菌 N_7 的 AA 产率提高了 126.2%, 且传代稳定。AA 产生菌离子注入诱变筛选结果见表 4。

Table 4 Screening results of AA high-yield strain

Strains	Biomass / g · L ⁻¹	TL / Biomass / %	AA / TL / %	AA / g · L ⁻¹
N ₇ / CK	20.8	31.1	31.81	2.06
I _{49-N₁₈}	26.3	33.8	52.36	4.66
Advanced / %	26.4	8.68	64.6	126.2

TL: Total Lipids

2.4 AA 高产菌 $I_{49-N_{18}}$ 发酵曲线的测定

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, 制成单孢子悬液, 取 5mL 接种于 500mL 三角瓶, 100mL 装瓶量, 28℃ 下, 200r/min 摇床培养, 每 24h 取样两瓶, 测定发酵过程中残糖、生物量、油脂和花生四烯酸的含量 (包括 AA 在油脂中的含量和 AA 在发酵液中的产率), 结果见图 2。

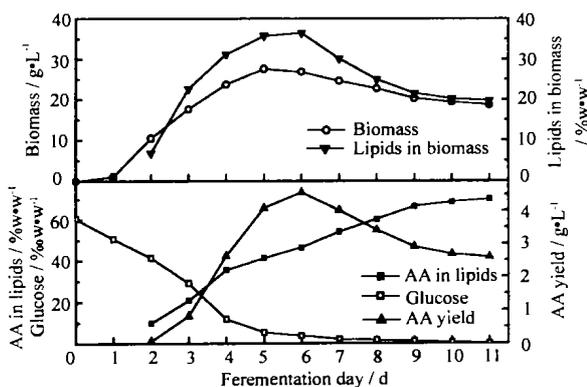


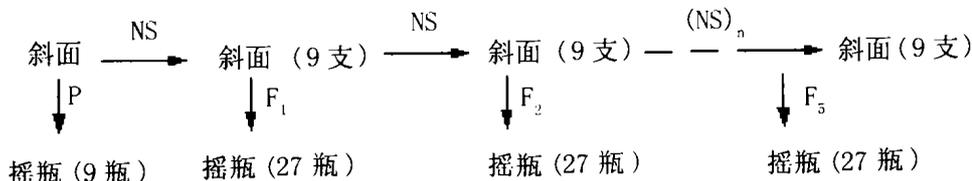
Fig.2 Fermentation curve of AA high yield strain $I_{49-N_{18}}$ in shaking flask.

从图 2 中可以看出, 8.0% 的起始葡萄糖含量, 菌体生长的潜伏期相对较长, 影响了菌体的生长周期, 在小试、中试时, 可以通过降低起始糖浓度, 中期分批补糖措施缩短潜伏期, 同时提高 AA 产量。同时曲线表明, 菌丝体的生长经历了霉菌典型的 3 个时期: 延迟期、快速生长期和衰亡期。发酵前期, 菌体处于延迟期, 糖耗较少, 菌体生长缓慢, 产生的花生四烯酸也极少。24h 后菌丝体进入对数生长期, 糖耗急剧增加, 生物量和油脂含量也随之增加, 并分别在第 5 天和第 6 天时达到最高。随着时间的延长, 生物量变化不大而油脂含量则减少较快, 在第 11 天时已不足 20%。另外, 从发酵曲线中还可以看出, 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—3 天, 约于第 10—11 天达到最高, 而 AA 在发酵液中的产率是在第 6 天达到最高值。

2.5 AA 高产菌 $I_{49-N_{18}}$ 传代实验结果

为了考察 $I_{49-N_{18}}$ 菌株的遗传稳定性, 我们进行了菌株的传代试验。

2.5.1 传代工艺



2.5.2 传代实验结果 对 I₄₉-N₁₈ 菌株连传五代, 其 AA 产量见表 5。从传代实验结果可以看出, 该高产菌的遗传性能稳定, 是一株符合工业化生产要求的

高产菌株, 这在以后的小试、中试及生产实验中都得到了进一步的验证。

Table 5 AA yield and genomic stability of mutagenic strain

Strain	P	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅
AA yield (g·L ⁻¹)	4.67±0.52	4.53±0.35	4.70±0.50	4.61±0.61	4.58±0.36	4.62±0.57

2.6 低能离子注入的生物学机理浅析

离子注入微生物体内能产生可见的生物效应, 离子束辐射不仅可以引起细胞损伤死亡, 而且可以导致突变的发生。细胞壁是疏松、多孔洞的结构, 在细胞之间、细胞器以及细胞质内存在着大量微孔洞和间隙, 可允许离子、小分子、甚至大分子物质如蛋白质、核酸等自由通过, 而细胞膜则是物质进出的屏障, 细胞膜一般厚 7—8nm, 因此, 在离子注入过程中, 有些离子能够穿过细胞壁、细胞膜, 进入细胞内部; 另一方面, 大量的入射离子对细胞壁和细胞膜形成了局部刻蚀或溅射穿孔, 使后来的离子可以在生物体内穿越较长的距离, 达到与生物遗传物质发生相互作用的目的。陆挺采用 PAT 技术证明植物种子的特殊微孔结构是低能离子注入生物效应机理的基础^[18]。

低能离子注入与传统的诱变源如 X 射线、γ 射线、电子束及化学诱变剂等相比, 其作用机理有所不同。在原初机制上荷能离子注入除了具有 γ 射线能量沉积引起机体损伤的特征外, 还有动量交换产生的级联损伤, 表现为遗传物质原子移位、重排或基因的缺失, 还有慢化离子、移位原子和本底元素复合反应造成的化学损伤, 以及电荷交换引起的生物分子电荷转移造成的损伤^[19, 20]。由于注入离子的不同电荷数、质量数、能量、剂量的组合, 可提供众多的诱变条件。通过这种电、能、质的联合作用, 不仅可强烈影响生物细胞的生理生化特性, 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。

谢立青等测定了 N⁺注入核糖霉素产生菌和卡那霉素产生菌所引起的各种自由基变化, 认为这些自由基的存在是引起菌种损伤的重要因素之一^[21]。宋道军等提出离子注入生物器官引起的两次电子、特征软 X 射线、大量自由基等是引起生物诱变的原因之一^[22]。而陈宇等认为离子注入产生的自由基对生物效应基本无影响, 离子注入效应主要由注入离子与生物分子的直接作用引起^[23]。在低能离子直接辐照质粒和噬菌体 DNA 的研究中发现, 离子注入可以引起质粒 DNA 的单链断裂 (SSB) 和双链断裂

(DSB), 而且 DSB/SSB 要远高于 γ 射线引起的 DSB/SSB^[4, 24]。被处理的 DNA 除了部分丧失转化 (转染) 活性外, 还使其上 LacZ 基因发生了较高频率的突变, 且为多位点的碱基变异^[25]。离子注入微生物体内所发生的作用十分复杂的, 从目前研究的结果还难以清楚地解释离子注入引起生物变异的机理, 还需要进一步深入研究。

3 结论

通过采用低能离子注入技术对 AA 产生菌 (*Mortierella alpina*) 进行诱变筛选, 得到一株 AA 高产菌 I₄₉-N₁₈, 其 AA 产量高达 4.66g/L, 比对照 N₇ 菌株产量提高了 126.2%。研究表明, 在离子注入 (10keV, 3×10¹⁴N⁺/cm) 条件下, 后代菌株离散程度明显高于自然分离, 提示离子注入对微生物具有显著的诱变作用。经连续诱变处理, 最终获得一株稳定高产的菌株 I₄₉-N₁₈, 该菌株生物量可达 26.3g/L, 干菌体中油脂含量为 33.8%, 其中 AA 的含量占总脂的 52.36%。该高产菌培养条件粗放, 在经过了小试和中试后, 成功地在 50t 发酵罐上实现了规模化生产, 且发酵水平在生物量、发酵菌体收率、菌体总脂含量以及油脂中 AA 含量都接近甚至高于摇瓶水平 (另文报道), 这一成果必将促进 AA 在婴幼儿配方食品、保健品、功能化妆品及化学分析、制药等多个领域发挥重要作用。

从已取得的很多相关研究结果来看, 离子注入诱变具有突变范围广、突变程度高的特点, 而且可以筛选到符合生产要求、产量水平提高的突变体。离子注入作为一种有效的诱变方法具有广泛的应用范围和使用价值。

参考文献

- 1 陈佳洱. 自然科学基金战略研究报告《核技术》. 北京: 科学出版社, 1991
CHEN J E. Nuclear technology, Strategy research report by natural science fund, Beijing: Sci Press, 1991
- 2 Yu Zengliang. Instruments and Methods in Physics Research, 1990, B59/60, 705-708
- 3 江泽慧, 彭慎华. 安徽农业大学学报, 1994, 21(3): 295-298

- JIANG Z H, PENG S H. *J Anhui Agri Univ*, 1994, **21**(3): 295-298
- 4 陈宇, 林梓鑫, 张峰等. 中国抗生素杂志, 1997, **22**(6): 410-414
CHEN Y, LIN Z X, ZHANG F *et al.* *J China Antibiot*, 1997, **22**(6): 410-414
- 5 Bliss T V P, Douglas R M, Errington M L *et al.* *J Physiol*, 1986, **377**(1): 391-408
- 6 Mong S, Chi-Rosso G, Miller J *et al.* *Mol Pharmacol*, 1986, **30**(3): 235-242
- 7 Nigam S, Fiore S, Luscinskas F W *et al.* *J Cell Physiol*, 1990, **143**(5): 512-523
- 8 Birch E E, Garfield S, Hoffman D *et al.* *Developmental Medicine Child Neurology*, 2000, **42**(3): 174-181
- 9 Singh A, Ward O P. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **48**(1): 1-5
- 10 Zu Yili, Lu Yingyin, Yadwad V B. *The Canadian J Chemical Engineering*, 1995, **73**(2): 135
- 11 鲍时翔, 朱法科, 林炜铁等. 微生物学报, 1997, **37**(5): 374-377
BAO S X, ZHU F K, LIN W T *et al.* *Acta Microbiol*, 1997, **37**(5): 374-377
- 12 杨革, 王玉萍, 李翔太等. 食品与发酵工业, 1997, **23**(2): 8-13
YANG G, WANG Y P, LI X T *et al.* *Food and Fermentation Industry*, 1997, **23**(2): 8-13
- 13 刘莉, 李明春, 胡国武等. 生物工程学报, 2001, **17**(2): 161-164
LIU L, LI M C, HU G W *et al.* *Acta Bioeng*, 2001, **17**(2): 161-164
- 14 范秀容, 李广武, 沈萍. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1989
FAN Xiurong, LI Guangwu, SHEN Ping, *The handle of microbiology experimentation*. Beijing: higher education publishing company, 1989
- 15 GB/T 5512-85
- 16 Gunter Zweing, Joseph Sherma. *Handbook of Chromatography*, 1988, Vol II
- 17 章明春. 工业微生物诱变育种. 北京: 科学出版社, 1999, 206
ZHANG Mingchun. *The induce and breeding of industrial microbe*. Beijing: Science publishing company, 1999, 206
- 18 陆挺. 第三次全国离子束生物工程学大会暨第一次国际学术研讨会, 乌鲁木齐: 2002, 41-42
LU Ting. *The Third National Conference of Ion Beam Bioengineering and The First International Symposium on Ion Beams*, Urumqi: 2002, 41-42
- 19 Yu Zengliang. *IEEE Transactions on plasma science*, 2000, **28**(1): 128-132
- 20 Yu Z L, Wu Y J, Deng J G. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res*, 1991, **B59/60**: 705-708
- 21 谢立青, 张荫芬, 陈如意等. 核技术, 1995, **18**(9): 527-529
XIE L Q, ZHANG Y F, CHEN R Y *et al.* *Nucl Tech*, 1995, **18**(9): 527-529
- 22 宋道军, 余汛. 激光生物学报, 1998, **7**(4): 245-251
SONG D J, YU X. *Acta Laser Biology Sinica*, 1998, **7**(4): 245-251
- 23 陈宇, 林梓鑫, 张峰等. 中国抗生素杂志, 1998, **23**(6): 415-419
CHEN Y, LIN Z X, ZHANG F *et al.* *J China Antibiot*, 1998, **23**(6): 415-419
- 24 杜严华, 何颖, 丘冠英. 自然科学进展, 2001, **11**(6): 577-581
DU Y H, HE Y, QIU G Y *et al.* *Progress in Nat Sci*, 2001, **11**(6): 577-581
- 25 杨剑波, 吴李君, 吴家道等. 中国科学 B 辑, 1995, **25**(12): 1273-1278
YANG J B, WU L J, WU J D *et al.* *China Sci (B)*, 1995, **25**(12): 1273-1278

Breeding of arachidonic acid-producing strain by low-energy ion implantation

YUAN Chengling YAO Jianming WANG Ji YU Zengliang

(Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Institute of Plasma Physics, the Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031)

ABSTRACT Low energy ion implantation technology was used in mutation breeding on arachidonic acid (5, 8, 11, 14-eicosatetraenoic acid, AA) yielding starting strain, *Mortierella alpina* N₇. The results indicate that dispersion of descendants of the N₇ strain implanted with 10keV N⁺ (3×10¹⁴ N⁺/cm²) was bigger than that in natural division strain. I₄₉-N₁₈, a high-yield AA-producing strain, was screened out by continuous mutagenicity. The biomass, lipid in biomass, AA in lipids of the high-yield strain were 26.3g/L, 33.8%(w/w), and 52.36%(w/w), respectively. The AA content in culture was 4.66g/L, which is 126.2% higher than the control, and its descendibility was stable. It is concluded that I₄₉-N₁₈ is a promising strain for industrialization, and that ion implantation has remarkable mutagenic effect on microorganism.

KEYWORDS Aachidonic acid, Frmentation, In implantation, Mtagenicity, Sreening

CLC TL99, Q547, TQ92