

# 高山被孢霉的红四氮唑染色程度与菌体油脂中花生四烯酸含量的关系

朱敏<sup>1</sup>, 余龙江<sup>1</sup>, 肖靓<sup>1</sup>, 马德松<sup>2</sup>

(1. 华中科技大学 生命科学与技术学院, 中国湖北 武汉 430074 2. 武汉经济开发区第一中学, 中国湖北 武汉 430056)

**摘要:**研究了高山被孢霉菌体被红四氮唑(TTC)染色的条件,并探讨了染色程度与菌体油脂中花生四烯酸含量的关系。高山被孢霉的种子菌体被TTC染色的程度随种龄增加而增加,而种子中的油脂含量和油脂中的花生四烯酸含量也都随种龄增加而增加。在发酵过程中,菌体被TTC染色的程度和菌体中的油脂含量以及油脂中的花生四烯酸含量随培养时间增加而增加。三株具有相似油脂含量、不同花生四烯酸含量的高山被孢霉以及一株不产花生四烯酸的鲁氏毛霉的染色结果显示菌体被红四氮唑染色的程度与菌体油脂中的花生四烯酸含量具有正相关性。该发现有助于花生四烯酸高产菌的快速筛选。

**关键词:**花生四烯酸;真菌油脂;高山被孢霉;红四氮唑

中图分类号:Q93

文献标识码:A

文章编号:1007-7847(2004)04-0339-05

## Correlation Between Staining Degree of Mycelia of *Mortierella Alpina* by Triphenyltetrazolium Chloride and Arachidonic Acid Content in the Fungal Lipids

ZHU Min<sup>1</sup>, YU Long-jiang<sup>1</sup>, XIAO Jing<sup>1</sup>, MA De-song<sup>2</sup>

(1. Huazhong University of Science and Technology, School of Life Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei, China;

2. First Middle School of Wuhan Economy Development Zone, Wuhan 430056, Hubei, China)

**Abstract:** Correlation between the staining degree of the mycelia of *Mortierella alpina* by triphenyltetrazolium chloride and arachidonic acid in the fungal lipids was investigated. The staining degree of inoculum mycelia stained by triphenyltetrazolium chloride increased with the inoculum age, which positively correlated to the lipids content in fungal biomass and arachidonic acid content in the fungal lipids. During fermentation, the staining degree of mycelia stained by triphenyltetrazolium chloride was found increased, which also positively correlated to the lipids content in fungal biomass and arachidonic acid content in the mycelia lipids. Mycelia of three strains of *Mortierella alpina*, which have similar lipids content in mycelia and different arachidonic acid content in lipids, and a strain of *Mucor rouxianus* AF93201, which didn't produce arachidonic acid, were stained by triphenyltetrazolium chloride. The results showed that staining degree of mycelia was not related to the lipid content in mycelia but positively correlated with arachidonic acid content in mycelia lipid. These

收稿日期 2004-06-10;修回日期 2004-09-10

作者简介:朱敏(1969-),女,湖北荆州人,讲师,博士,从事微生物学研究;余龙江(1966-),男,湖北黄冈人,华中科技大学教授,博士,从事生物技术研究, Tel: +86-027-87543633, E-mail: yulongjiang@mail.hust.edu.cn.

findings may be useful in the fast screening of high arachidonic acid producing strains.

**Key words:** arachidonic acid; fungal lipids; *Mortierella alpina*; triphenyltetrazolium chloride(TTC)

(*Life Science Research*, 2004, 8(4): 339 ~ 343)

花生四烯酸(arachidonic acid,简称AA,5,8,11,14-全顺-二十碳四烯酸)是 $\omega$ -6系列的一种多不饱和脂肪酸,作为合成人体前列腺素、凝血噁烷以及白三烯的前体物质,具有广泛的生物活性<sup>[1]</sup>,而且AA还具有重要的营养作用,它是人类的必需脂肪酸之一,作为人母乳的天然成分,AA对于婴儿的神经及其生理的发育必不可少<sup>[2]</sup>,目前AA已经被世界卫生组织等国际权威机构推荐作为营养补充剂添加到婴儿配方奶粉中。

花生四烯酸的天然来源主要是蛋黄和一些动物脏器如猪肝,但含量很低,而且所含的其它成分如磷和固醇类限制了它的使用,采用微生物发酵法生产花生四烯酸是一种替代性来源,受到高度关注。高山被孢霉(*Mortierella alpina*)是一种丝状真菌,它在以碳水化合物为碳源的培养基中生长时,菌体内会积累较多的油脂,其油脂的脂肪酸组成中含有丰富的多不饱和脂肪酸,尤其是AA含量较高,被认为是生产AA的最佳菌种。产花生四烯酸的菌种的筛选<sup>[3]</sup>、发酵条件的优化<sup>[4]</sup>、花生四烯酸生物合成途径中关键的脱饱和酶的克隆<sup>[5]</sup>等方面都得到了广泛的研究。

红四氮唑即氯化三苯基四氮唑(TTC)是一种氧化剂,从脱氢酶接受电子后自身从无色被还原为红色的三苯基甲臜(triphenylformazan),从而可以表征细胞内脱氢酶的活性。TTC染色的方法广泛用于植物组织和细胞的活力评价<sup>[6]</sup>以及细菌呼吸活力的测定<sup>[7]</sup>。但尚未有报道TTC对丝状真菌尤其是AA产生菌高山被孢霉的染色。本实验目的是探讨红四氮唑对花生四烯酸产生菌高山被孢霉的染色条件及菌体染色程度与菌体油脂中花生四烯酸含量的关系,以期建立一种AA高产菌快速筛选的新方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

高山被孢霉(*Mortierella alpina*) M23,由本实验室从土壤中分离,经荷兰CBS鉴定。高山被孢霉M10、L31由本实验室从土壤中分离,鲁氏毛霉AY93201购买自武汉大学菌种保藏中心。菌种于

PDA斜面保存,每3个月转接一次。

### 1.2 液体培养方法

种子的制备及培养:保藏茄子瓶斜面用无菌水加玻珠剧烈摇动,洗脱,接入内装200 mL种子培养基的500 mL三角瓶。种子培养基为5%葡萄糖,50%豆芽汁。种子瓶于150 r/min,25℃培养3 d。

摇瓶培养:250 mL三角瓶装50 mL发酵培养基,发酵培养基组成为:葡萄糖80 g/L,豆饼汁蛋白5 g/L,硝酸钾3 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  3 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g/L,pH 6.5。按10%的接种量接入种子,150 r/min,25℃培养7 d。

### 1.3 TTC染色及染色程度的定量

新鲜菌体收获后用蒸馏水洗涤两遍,取0.1 g菌体置于有盖试管,加入TTC溶液,25℃置于暗处放置1 h。菌体用蒸馏水洗涤两遍后碾磨成匀浆,用2 mL乙酸乙酯室温抽提3遍,合并抽提液,在485 nm波长下用Beckman DU-7500型分光光度计比色确定染色程度。

### 1.4 分析方法

菌体干重的确定:对发酵液进行抽滤,菌丝用蒸馏水洗3次,80℃烘干,测定干重。

油脂抽提:1 g菌体用3 mL石油醚(30-60程)抽提2次,蒸干溶剂,测定菌体中油脂含量。油脂含量 = 油脂重量 / 菌体干重。

油脂中AA含量的确定:油脂采用KOH-CH<sub>3</sub>OH进行甲酯化,用浙江福立分析仪器厂9790气相色谱仪分析脂肪酸甲酯,配备交联FFAP 30 m × 0.25 mm石英毛细管柱以及FID检测器。炉温升温程序为160~200℃,8℃/min,200~220℃,2℃/min,保留10 min。进样器温度,检测器温度为240℃。利用SIGMA花生四烯酸甲酯标准品确定AA含量。油脂中AA含量 = (样品AA峰面积 / 标准品AA峰面积) × 标准品AA浓度 × (样品体积 / 样品重量)

## 2 结果与分析

### 2.1 最佳染色条件的确定

通过对高山被孢霉M23菌体进行TTC染色

时的缓冲液 pH、染色时间和 TTC 的浓度的实验研究结果见图1 表明 TTC 缓冲液最佳的是 pH 8.0 的硼酸缓冲液;菌体染色程度随染色时间延长而

增加,但染色时间达到 1 h 后染色程度增加较少;最佳 TTC 浓度为 0.8%。因此,随后的实验选择最佳染色条件进行。

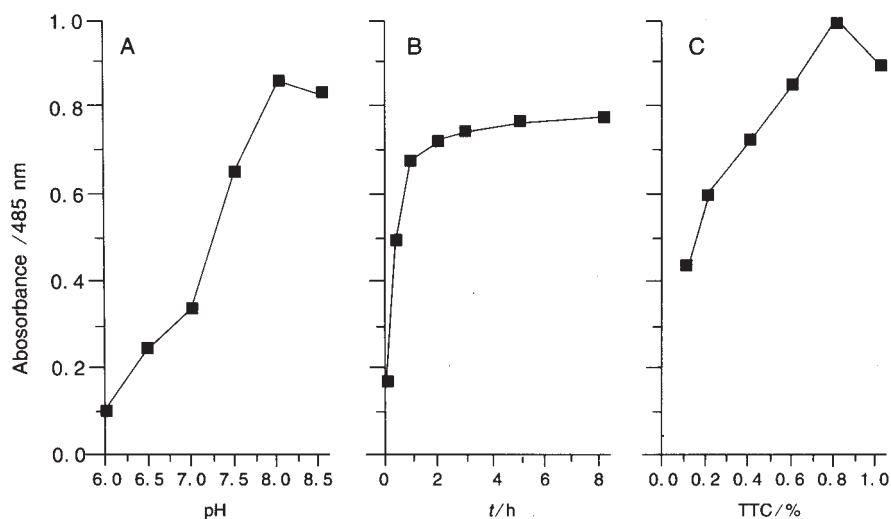


图1 高山被孢霉 M23 菌体 TTC 染色时优化条件的确定 (染色程度通过 A485 nm 来定量)

A :TTC 溶液的 pH 对染色程度的影响 ;B :染色时间对染色程度的影响 ;C :TTC 浓度对染色程度的影响

Fig.1 Determination of the optimal conditions of mycelia of *Mortierella alpina*M23 stained by TTC

A :Effect of pH of the TTC solution on staining degree quantified by 485 nm absorbance (incubation time was 1 h, TTC concentration was 0.4%) ;B :Effect of incubation time on staining degree (pH 8.0, TTC concentration was 0.4%) ;C :Effect of TTC concentration on staining degree (pH 8.0, incubation time was 1 h).

## 2.2 高山被孢霉 M23 种子菌体和发酵菌体的 TTC 染色分析

有活力的种子是大规模发酵所需的,而目前种子活力的评价往往根据最终 AA 的产量,是一个很费时间的过程。因为 TTC 广泛用于植物细胞和组织的活力测定,所以本研究利用 TTC 染色的方法来考察高山被孢霉的种子能否根据其染色程度判断其接种后的 AA 合成能力。种子染色程度与种子培养时间即种龄的关系见图 2。结果显示染色程度随种龄增加而增加。根据我们以前的实验结果,种龄为 3 d 的种子最有利于花生四烯酸的生产,获得的 AA 产量最高。可见种子的 TTC 染色程度与最终的 AA 产量不相关。

尽管种子的 TTC 染色程度与最终的 AA 产量不相关,TTC 染色程度随种龄增加是否与种子中其他方面的变化有关呢?经对种子菌体的油脂和油脂中 AA 含量随种龄的变化的测定(图 3)发现种子菌体的油脂和油脂中 AA 含量随种龄的增加而增加。比较图 2 和图 3 种子的 TTC 染色程度、种子中的油脂含量以及油脂中花生四烯酸含量随种龄的变化曲线相似。

在发酵培养基中培养比在种子培养基中培养时高山被孢霉 M23 能产生更多的油脂和 AA。发酵培养基中培养的菌体经 TTC 染色来进一步考查染色程度与菌体中油脂含量和油脂中 AA 含量的关系。结果如图 4。结果表明,随着培养时间的增加,菌体的 TTC 染色程度、菌体中的油脂含量以及油脂中的 AA 含量都增加。

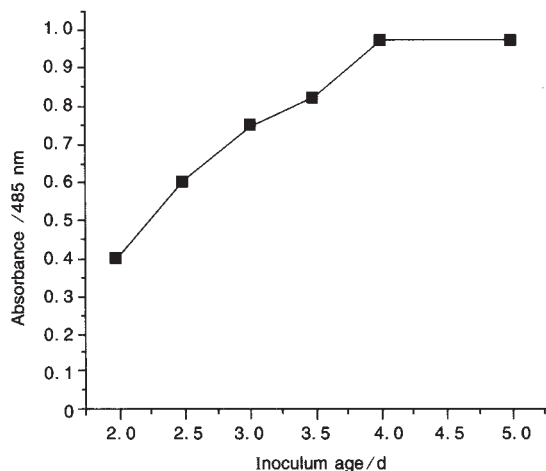


图2 高山被孢霉 M23 种子在不同种龄时的染色程度

Fig.2 Staining degree of TTC in inoculum mycelia of *Mortierella alpina* M23 at different inoculum age

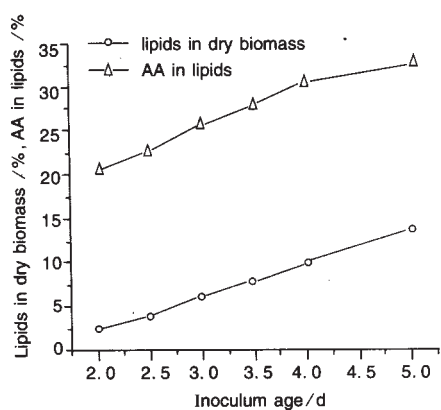


图3 高山被孢霉 M23 种子在不同种龄时菌体中的油脂含量和油脂中的 AA 含量

Fig.3 Lipids in dry biomass of inoculum and AA in lipids at different inoculum age of *Mortierella alpina* M23

为了进一步研究菌体的 TTC 染色程度是与菌体中的油脂含量相关还是与油脂中的 AA 含量相关, 本文采用三株具有相似油脂含量和不同 AA 含量的高山被孢霉菌以及一株不产 AA 的鲁氏毛霉进行 TTC 染色分析. 结果 (表 1) 显示菌体

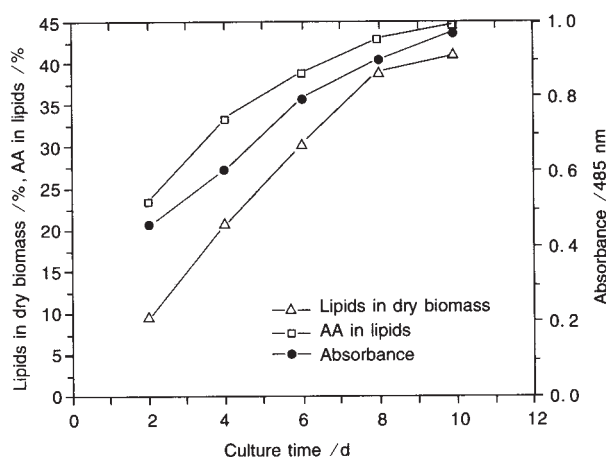


图4 高山被孢霉 M23 菌体中的油脂含量、油脂中的 AA 含量和 TTC 染色程度的发酵过程曲线

Fig.4 Time courses of lipids in dry biomass, AA in the lipids and staining degree of TTC in *Mortierella alpina* M23

TTC 的染色程度与菌体中的油脂含量无关, 而菌体的 TTC 染色程度与 AA 含量具有正相关性, AA 含量高的菌株 TTC 染色程度深, 而不含 AA 的鲁氏毛霉则不被染色.

表 1 不同菌株菌体的 TTC 染色程度、菌体中的油脂含量与油脂中的 AA 含量

Table 1 Staining degree of mycelia of different strains and their lipid content and AA content

Strain	Staining degree (A485 nm)	Lipid in dry biomass	AA in lipids
<i>Mortierella alpina</i> M23	0.861	36.5	39.6
<i>Mortierella alpina</i> M10	0.325	38.2	16.1
<i>Mortierella alpina</i> L31	0.472	37.6	28.4
<i>Mucor rouxianus</i> AF93201	0	34.0	0

### 3 讨论

TTC 的还原被经常用来作为生物体的活力的生化指标. 各种生物的 TTC 染色条件并不相同, 一般植物细胞和组织的 TTC 染色需要 18~20 h, 而对于高山被孢霉染色 1 h 即可获得稳定的染色程度. 海藻的 TTC 染色时间与高山被孢霉类似<sup>[8]</sup>, 可能与海藻和高山被孢霉所生长的环境有关, 从而其细胞的透性比植物大.

一般认为 TTC 是由脱氢酶还原的. TTC 被活细胞吸收, 与脱氢酶释放的氢原子作用而被还原. 有些研究认为 TTC 是电子传递链的人工电子受体. TTC 还原的位点有的报道认为在细胞色素氧

化酶<sup>[9]</sup>, Rich 等报道则认为是在脱氢酶尤其是呼吸链的复合体 I<sup>[10]</sup>. 高山被孢霉是产生 AA 的菌种, 其中有着众多的脱氢酶, 尤其有着一类特殊的脱氢酶—脂酰脱饱和酶, 它们催化脂肪酸的双键形成, 本文的研究表明菌体的 TTC 染色程度与菌体油脂中的 AA 含量正相关, 而且不产生 AA 的毛霉并不能染色,  $\Delta^5$  脂酰脱饱和酶是 AA 合成途径上关键的酶, 它催化二高  $\gamma$  亚麻酸在 5 位脱饱和形成 AA, 高山被孢霉菌体的 TTC 染色程度与菌体油脂中的 AA 含量有关是否表明该酶就是 TTC 反应的酶需要进一步的研究.

本研究关于高山被孢霉菌体的 TTC 染色程度与菌体油脂中的 AA 含量呈正相关的发现有助

于高产 AA 菌的筛选。有一些报道研究了 AA 高产菌的筛选。因为阿司匹林是 AA 进一步代谢形成前列腺素的环加氧酶的抑制剂, 阻断 AA 的降解去路, 所以 Eroshin<sup>[11]</sup> 利用含阿司匹林的培养基选择性的筛选了产 AA 的被孢霉菌株, 并获得三株油脂中 AA 含量超过 40% 的被孢霉菌株。一般认为能产生多不饱和脂肪酸的真菌可以在较低的温度下生长, 因为细胞膜中的多不饱和脂肪酸越多, 膜的流动性越好, 从而能抵抗冷的环境。因此低温筛选成为筛选 AA 高产菌的常用方法, Chen 等<sup>[12]</sup> 在 10 °C 的温度下筛选到一株油脂中含 AA 达到 42.4% 的菌株 Wuji-H4, 而 Botha 等<sup>[3]</sup> 报道了在 5 °C 的温度下筛选 AA 产生菌的方法。但无论采用哪种筛选方法, 在分离获得大量菌株后都需要进行油脂中 AA 含量的测定以寻找其中的高产菌株, 这是一个非常耗时的工作, 包括菌体干燥、油脂提取和气相色谱分析等。本文的研究结果将有助于快速判断菌体中的 AA 含量, 从而加快 AA 高产菌的筛选。

#### 参考文献 (References)

- [1] GILL I, VALIVETY R. Polyunsaturated fatty acids, part I: occurrence, biological activities and application[J]. Trends Biotechnol, 1997, 15: 401-409.
- [2] BRICK E E, GARFIELD S, HOFFMAN D R, et al. A randomized controlled trial of early dietary supply of long chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants[J]. Dev Med Child Neurol, 2000, 42: 174-181.
- [3] BOTH A, PAUL I, ROUX C, et al. An isolation procedure for arachidonic acid producing *Mortierella* species[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1999, 75: 253-256.
- [4] ZHU M, YU L J, WU Y X. An inexpensive medium for production of arachidonic acid by *Mortierella alpina*[J]. J Ind Microbiol Biot, 2003, 30: 75-79.
- [5] KNUTZON D S, THURMOND J M, HUANG Y S. Identification of  $\Delta 5$ -Desaturase from *Mortierella alpina* by heterologous expression in Bakers' yeast and canola[J]. J Biol Chem, 1998, 273 (45) 29360-29366.
- [6] PALTA J P, LEVITT J, STADELMANN E J. Plant viability assay[J]. Cryobiol, 1978, 15: 249-255.
- [7] RUKLISHA M, PAEGLE L. Metabolic fluxes and L-lysine synthesis by *Corynebacterium glutamicum* in relation to cellular total reducing activity[J]. Process Biochem, 2001, 36: 1233-1240.
- [8] NAM B H, JIN H J, KIM S K, et al. Quantitative viability of seaweed tissues assessed with 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride[J]. J Appl Phycol, 1998, 10: 31-36.
- [9] MUSSER D A, OSEROFF A R. The use of tetrazolium salts to determine sites of damage to the mitochondrial electron transport chain in intact cells following *in vitro* photodynamic therapy with photofin II[J]. Photochem Photobiol, 1994, 59: 621-626.
- [10] RICH P R, MISCHIS L A, PURTON S, et al. The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains[J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 202: 181-187.
- [11] EROSHIN V K, DEDYUKHINA E G, CHISTYAKOVA T I, et al. Arachidonic-acid production by species of *Mortierella* [J]. World J Microbiol, 1996, 12: 91-96.
- [12] CHEN H C, CHANG C C, CHEN C X. Optimization of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* Wuji-H4 isolate[J]. J Am Oil Chem Soc, 1997, 74: 569-578.
- [1] GILL I, VALIVETY R. Polyunsaturated fatty acids, part I: occurrence, biological activities and application[J]. Trends Biotechnol, 1997, 15: 401-409.
- [2] BRICK E E, GARFIELD S, HOFFMAN D R, et al. A randomized controlled trial of early dietary supply of long chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term

(上接第 313 页)

- [2] OGOT P H, EDELMANN A, KIRSCH S, et al. Human Y chromosome azoospermia factor (AZF) mapped to different subregions in Yq11 [J]. Hum Mol Genet, 1996, 5: 933-943.
- [3] SUN C, SKALETSKY H, BIRREN B, et al. An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y [J]. Nat Genet, 1999, 23: 429-432.
- [4] MCELREAVEY K, KRAUSE C. Male infertility and the Y chromosome [J]. Am J Hum Genet, 1999, 64: 928-933.
- [5] TAKEUCHI A, MISHINA Y, MIYAISHI O, et al. Heterozygosity with respect to Zfp148 causes complete loss of fetal germ cells during mouse embryogenesis [J]. Nat Genet, 2003, 33(2): 172-176.
- [6] FLANAGAN J, HEALEY S, YOUNG J, et al. Analysis of the transcription regulator, CNOT7, as a candidate chromosome 8 tumor suppressor gene in colorectal cancer [J]. Int J Cancer, 2003, 106(4): 505-509.
- [7] NAKAMURA T, YAO R, OGAWA T, et al. Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking Cnot7, a regulator of retinoid X receptor beta [J]. Nat Genet, 2004, 36(5): 528-533.
- [8] SCHEURLE D, DEYOUNG M P, BINNINGER D M, et al. Cancer gene discovery using digital differential display [J]. Cancer Research, 2000, 60(15): 4037-4043.
- [9] HUBANK M, SCHATZ D C. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA [J]. Nuclei Acids Research, 1994, 22(25): 5640.
- [10] VON STEIN O D, THIES W G, HOFMANN M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes [J]. Nuclei Acids Research, 1997, 25(13): 2598.
- [11] LIANG P, PARADEE A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. Science, 1992, 257: 967.
- [12] WELSH J, CHADA K, DALAL S S, et al. Arbitrarily primed-PCR fingerprinting of RNA[J]. Nuclei Acids Research, 1992, 20(1): 4965.
- [13] TAKEUCHI A, MISHINA Y, MIYAISHI O, et al. Heterozygosity with respect to Zfp148 causes complete loss of fetal germ cells during mouse embryogenesis [J]. Nat Genet, 2003, 33(2): 172-176.
- [14] WEI Y, KATHLEEN H, LANG M, et al. Identification of Zfp393, a germ cell-specific gene encoding a novel zinc finger protein [J]. Mechanisms of Development, 2002, (118): 233-239.