

培养条件对头孢霉菌丝体脂肪酸组分的影响*

戴传超¹ 袁 生^{**} 李 霞 刘吉华 幸定坤 陆 玲

(南京师范大学生命科学学院 南京 210097)

摘 要 研究了头孢霉(*Cephalosporium* sp.)菌丝体最大生产力和多不饱和脂肪酸形成积累的条件。菌丝体最适培养条件为:麦芽糖 60g/L、KNO₃ 3g/L、起始 pH 为 6.0、500mL 三角瓶装 100mL 培养基、接种 25%、25℃ 培养 10d 则菌丝体达到最大干重。多不饱和脂肪酸形成积累的最适条件为:葡萄糖 10~20g/L、(NH₄)₂SO₄ 或 NH₄Cl 3g/L、培养基起始 pH 为 4.0、500mL 三角瓶装 100mL 培养基、接种 10%~20%、10℃ 下照光培养。因此,在整个生产流程中可采用不同条件分段掌握的技术原则。同时提出在多不饱和脂肪酸的形成和积累途径中油酸(18:1)向亚油酸(18:2)的转化是关键,为进一步探索最适培养条件和关键酶的调节提供依据。

关键词: 头孢霉(*Cephalosporium* sp.), 菌丝体, 脂肪酸, 多不饱和脂肪酸

中图分类号: Q547 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2001)01-0087-07

脂类具有十分重要的生物学功能,它是构成生物膜的重要成分,是机体储存能量的一种形式。细胞表面的脂类还和细胞识别、种的特异性和组织免疫有一定关系。脂肪酸是脂质的重要组成成分之一,它分为饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸。不饱和脂肪酸和膜脂流动性及多种重要生理功能有关,如人体必需脂肪酸亚油酸(18:2, Linoleic acid), γ -亚麻酸(18:3, γ -Linolenic acid, GLA ω -6)在体内可进一步转化为花生四烯酸(20:4, Arachidonic acid, AA ω -6), 二十碳五烯酸(20:5, Eicosapentaenoic acid, EPA ω -3)和二十二碳六烯酸(22:6, Docosahexaenoic acid, DHA ω -3)等多种重要不饱和脂肪酸,从而具有重要的生理功能^[1~3]。由于多不饱和脂肪酸来源有限,学者们努力探索新的来源^[4,5]。微生物由于富含多不饱和脂肪酸,而且生产不受季节限制,因而成为多不饱和脂肪酸的新来源之一。目前, GLA 和 AA 虽已投入生产,但产率较低。而 EPA、DHA、 α -亚麻酸(18:3, ALA ω -3)等 ω -3 脂肪酸尚在研究阶段^[5,6]。我们在研究中筛选获得了一株富含 DHA、ALA 等多不饱和脂肪酸的真菌,经鉴定为头孢霉^[7]。为探讨头孢霉高产多不饱和脂肪酸的条件,我们研究了九种单一因子对头孢霉合成脂肪酸组分和菌丝体干重的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 头孢霉(*Cephalosporium* sp.) 本实验室筛选、鉴定^[7]。

* 江苏省青年基金(BQ96025)和南京师范大学理科青年基金资助

** 联系作者

作者简介: 戴传超(1970-),男,江苏泗阳人,南京师范大学生命科学学院讲师,现在中国药科大学攻读博士学位。

收稿日期: 1999-10-25, 修回日期: 2000-05-23

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.1.2 培养基 斜面培养基为 PDA 培养基 ,发酵培养基为 :葡萄糖 :20g/L ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 3g/L ; KH_2PO_4 :2g/L ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:0.3g/L ;NaCl :0.1g/L ;酵母膏 :0.2g/L ;蛋白胨 : 0.1g/L。 pH6.0 ,121℃ 灭菌 20min。

1.2 仪器条件 :

HPSF1890GC 3295 积分仪 ,具体分析条件同文献 [7]

1.3 方法

1.3.1 培养方法 斜面菌种从冰箱中取出 ,转接活化 ,20℃ 培养 10d ,用无菌水刮取菌丝 , 转接入液体培养基中 20℃ ,150r/min 震荡培养 10d。

1.3.2 菌丝收获、脂肪酸甲酯化及气相色谱分析方法 :参见文献 [7]

1.3.3 发酵液还原糖测定 :参见文献 [8]

1.3.4 光照条件 :在光照培养箱内 150r/min 震荡培养 ,光源为 1 支 5W 日光灯管 ,距三 角瓶 0.5m。非光照组在相同条件下遮光培养至结束。

2 结果

2.1 培养时间

该菌接种后菌丝体干重、还原糖、pH 随培养时间的变化见图 1。从图中可见 ,在 0~ 2d 内菌丝体干重急剧上升 ,而还原糖量和 pH 值急剧下降 ;至 10d 时 ,菌丝体干重达最大。 0~10d 脂肪酸组分基本稳定 (图 2) ,多不饱和脂肪酸占总脂肪酸基本稳定在 $(65.70 \pm 2.55)\%$ 之间。从以上结果看出 ,10d 是获得最大菌丝体的最佳时间 ,由于多不饱和脂肪酸基本稳定 ,10d 之后可以着眼促进多不饱和脂肪酸的积累。

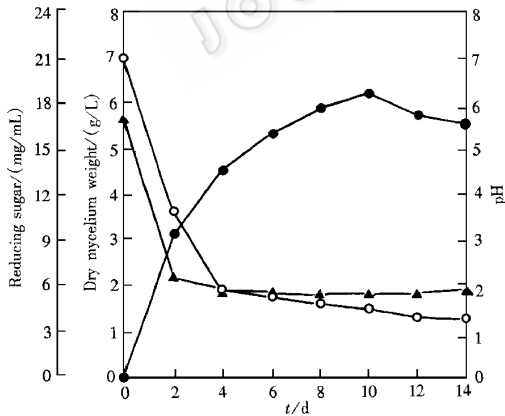


图 1 菌丝发酵时菌丝体干重、还原糖及 pH 变化

Fig.1 The dry mycelium weight, reducing sugar and pH changed with culture time

● Dry mycelium weight ; ▲ pH value ;
○ Reducing sugar.

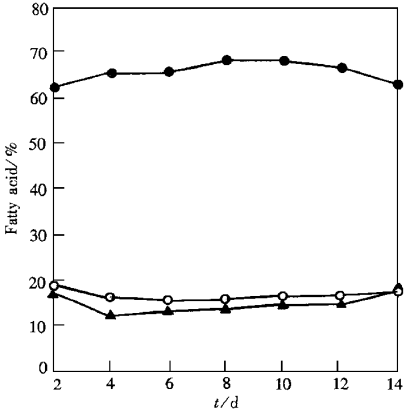


图 2 培养时间对菌丝体脂肪酸组分的影响

Fig.2 Effect of culture time on fatty acid composition in the mycelia

○ Saturated fatty acid (SFA) ; ▲ Monounsaturated FA (MUFA) ; ● Polyunsaturated FA (PUFA) .

2.2 碳源

比较了六种碳源,在玉米粉和淀粉中该菌丝几乎不生长,在其余四种碳源中,均可以良好生长。其中,在麦芽糖中菌丝体干重最大,可达 9.59g/L。比较其多不饱和脂肪酸比例发现,葡萄糖作为碳源,最有利于多不饱和脂肪酸的产生,蔗糖次之,而甘油最差。饱和脂肪酸比例以甘油最高,蔗糖次之,麦芽糖最低。单不饱和脂肪酸比例以麦芽糖最高,甘油次之,而蔗糖最低(表 1)。这说明菌丝体生长和多不饱和脂肪酸积累可以分别选择麦芽糖和葡萄糖为碳源。表 1 还表明,油酸(18:1)含量高,往往转化的多不饱和脂肪酸含量较低。如在麦芽糖和甘油为碳源时,油酸含量高时转化为亚油酸(18:2)和亚麻酸(18:3)等多不饱和脂肪酸的含量低,这表明在这三种脂肪酸的转化中,油酸向亚油酸的转化是关键。

表 1 碳源对菌丝体脂肪酸组分和菌丝体干重的影响

Table 1 The effect of carbon resource on fatty acid composition and dry weight of the mycelium

FA/DW	Glucose	Maltose	Sucrose	Glycerin	Cornmeal	Starch
14:0	0.24	0.27	0.27	TR	N.D.	N.D.
16:0	17.33	14.62	17.24	18.92	15.43	17.99
16:1	N.D.	2.03	1.10	0.94	N.D.	N.D.
18:0	2.50	3.31	5.16	5.96	3.59	3.02
18:1	26.87	33.57	21.50	32.19	20.24	22.08
18:2	34.61	31.37	35.49	27.41	42.70	40.46
18:3(α-)	13.78	8.77	15.33	6.05	12.92	10.27
22:2	2.32	0.96	N.D.	2.15	N.D.	N.D.
22:6	0.21	0.22	0.01	0.15	N.D.	0.26
others	2.26	5.10	3.60	6.92	5.12	6.18
ΣSFA	20.07	18.20	22.67	24.88	19.02	21.01
ΣMUFA	26.87	35.60	22.60	33.13	20.24	22.08
ΣPUFA	50.92	41.32	50.83	35.74	55.62	50.73
DW	6.67	9.59	6.45	6.17	TR	TR

14:0 :Myristic acid ; 16:0 :palmitic acid ; 16:1 :Palmitoleic acid ; 18:0 :Stearic acid ; 18:1 :Oleic acid ; 22:2 :Docosa-dienoic acid ; N.D. :Not detected ; TR :Trace ; FA :Fatty acid ; SFA :Saturated fatty acid ; MUFA :Monounsaturated fatty acid ; PUFA :Polyunsaturated fatty acid ; DW :Dry mycelium weight.

2.3 氮源

比较了三种无机氮源和三种有机氮源,在六种氮源中该菌丝均可以良好生长,在以 KNO₃ 为氮源时菌丝体干重最高。NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄ 和蛋白胨作为氮源均较有利于多不饱和脂肪酸产生。KNO₃、酵母膏及蛋白胨为氮源饱和脂肪酸比例较高。这说明菌丝体生长可以选用 KNO₃ 为氮源,积累多不饱和脂肪酸则宜选用 (NH₄)₂SO₄ 和 NH₄Cl 为氮源。表 2 也表明,油酸(18:1)向亚油酸(18:2)转化是单不饱和脂肪酸向多不饱和脂肪酸转化的关键。如酵母膏为氮源,单不饱和脂肪酸含量最高,则多不饱和脂肪酸是最低的。在

以 NH_4Cl 为氮源 ,单不饱和脂肪酸含量很低 ,则多不饱和脂肪酸含量较高。

表 2 氮源对菌丝体脂肪酸组分(w/w ,%)和菌丝体干重(g/L)的影响

Table 2 The effect of nitrogen resource on fatty acid composition(w/w ,%)and dry weight of the mycelium(g/L)						
FA/DW	KNO_3	NH_4Cl	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Urea	Peptone	Yeast extract
14:0	4.63	0.28	0.24	0.10	0.48	0.25
16:0	18.88	18.03	17.33	13.42	17.29	18.80
16:1	1.31	2.20	N.D.	3.57	0.82	1.88
18:0	0.51	1.69	2.50	4.96	3.81	4.61
18:1	19.82	21.59	26.87	25.76	19.66	42.68
18:2	34.06	35.33	34.61	31.97	36.48	22.14
18:3(α -)	5.44	14.50	13.78	9.05	13.47	6.08
22:2	4.34	2.24	2.32	6.11	0.82	0.63
22:6	0.22	0.26	0.21	0.17	0.31	0.03
others	10.06	3.97	2.21	4.89	7.26	2.93
ΣSFA	24.02	20.00	20.07	18.48	21.58	23.66
ΣMUFA	21.13	23.79	26.87	29.33	20.48	44.56
ΣPUFA	44.06	52.33	50.92	47.30	51.08	28.88
DW	7.59	5.60	6.64	5.44	4.50	6.19

N.D. :Not detected ;TR :Trace ;FA :Fatty acid ;SFA :Saturated fatty acid ;MUFA :Monounsaturated fatty acid ;
PUFA :Polyunsaturated fatty acid ;DW :Dry mycelium weight.

2.4 碳源浓度

比较 10g/L~60g/L 不同的葡萄糖浓度看出 ,随着碳源浓度的增加 ,菌丝体干重也从 5.07g/L 增加至 6.70g/L ,说明较高的碳源浓度有利于获得较大的菌丝体干重(图 3)。从多不饱和脂肪酸积累看 ,10~20g/L 的碳源浓度 ,其值最高 ,稳定在 64.40%~64.17% 之间 ,随后逐渐下降。这说明菌丝生长可以选用 60g/L 的碳源浓度 ,积累多不饱和脂肪则以选用 10~20g/L 碳源浓度为佳。

2.5 温度

比较从 10℃ 至 35℃ 的六种不同温度看出 ,在 10℃~25℃ 之间 ,菌丝体生长随温度增加而增加 ,25℃ 为最适菌丝体生长温度(6.81g/L) ,30℃ 以后 ,菌丝体生长则急剧下降。积累多不饱和脂肪酸以温度较低为宜 ,10℃ 是积累多不饱和脂肪酸的最佳温度(图 4)。

2.6 培养基起始 pH

比较了六种不同的起始 pH ,菌丝均可以良好生长 ,其中在 pH6.0 时可以获得最大菌丝体干重(7.13g/L) ,pH4.0~5.0 为积累多不饱和脂肪酸的最佳起始 pH ,pH7.0 时多不饱和脂肪酸比例最低 ,碱性条件时 ,多不饱和脂肪酸又会有所增高。饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸的变化趋势和多不饱和脂肪酸相反。

2.7 装液量

在 500mL 三角瓶装液量为 100~250mL 时 ,菌丝体干重基本不变 ,稳定在一个较高

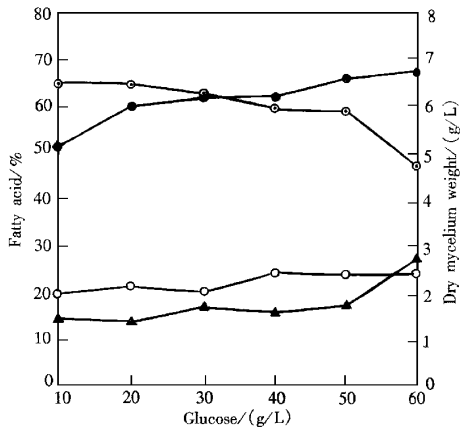


图 3 葡萄糖浓度对菌丝体脂肪酸组分和干重的影响

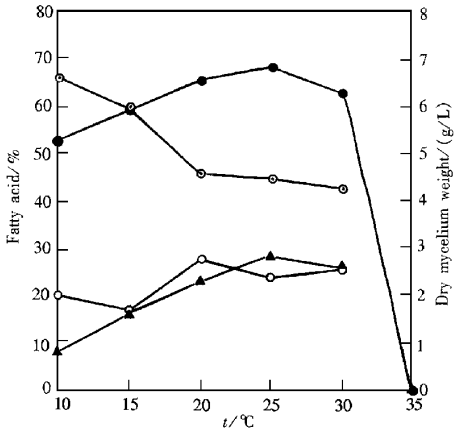


图 4 培养温度对菌丝体脂肪酸组分和干重的影响

Fig. 3 Effect of glucose concentration on fatty acids composition and dry weight of the mycelium
● Dry mycelium weight ; ○ SFA ;
▲ MUFA ; ○ PUFA.

Fig. 4 Effect of temperature on fatty acid concentration and dry weight of the mycelium
● Dry mycelium weight ; ○ SFA ;
▲ MUFA ; ○ PUFA.

值(6.64g/L~6.43g/L),当装液量大于250mL时则急剧下降。在100~300mL装液量时,随着装液量的增加,多不饱和脂肪酸比例逐步下降,尤其在250~300mL装液量时,变化最为显著。说明较多的溶解氧既有利于多不饱和脂肪酸的积累,又有利于菌丝体生长。看来,100mL装液量最有利于多不饱和脂肪酸的产生(图5)。

2.8 接种量

在5%~20%接种量时,其菌丝体干重基本保持不变(6.65g/L~6.74g/L)而25%接种量时菌丝体干重略有增加,进一步加大接种量菌丝体干重反而下降。随着接种量的增加,多不饱和脂肪酸比例逐步下降,而饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸比例逐步增加。在10%~20%接种量时,其多不饱和脂肪酸比例处于较高值,是最佳接种量。

2.9 光照

Bajpai 等报道照光对菌丝体生长有促进作用^[9]。我们实验结果表明,不照光组的菌丝体干重大于照光组的。照光有利于不饱和脂肪酸产生,尤其有利于多不饱和脂肪酸的

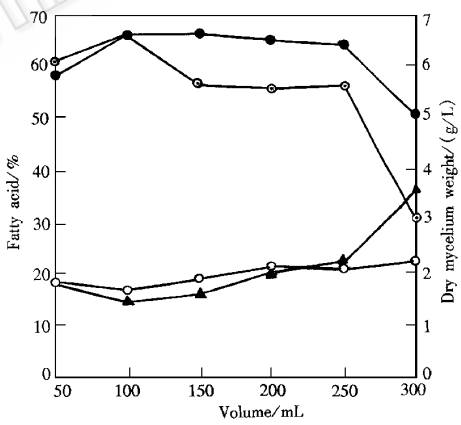


图 5 装液量对菌丝体脂肪酸组分和干重的影响

Fig. 5 Effect of medium's volume on fatty acids composition and dry weight of the mycelium
● Dry mycelium weight ; ○ SFA ;
▲ MUFA ; ○ PUFA.

产生(表3)。照光后 18:3,18:2 比例远远高于不照光组。这说明培养菌丝体以不照光为好,积累多不饱和脂肪酸以照(弱)光为好。

表 3 光照对菌丝体脂肪酸组分和菌丝体干重的影响

Table 3 the effect of light on the fatty acid composition (w/w, %) and dry mycelium weight (g/L)

FA/DW	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3(α-)
lighted	0.31	15.87	1.84	1.04	9.03	36.76	30.02
not lighted	0.36	25.93	3.22	1.97	12.21	30.62	23.77

续表 3

22:2	22:6	others	ΣSFA	ΣMUFA	ΣPUFA	DW
2.09	0.10	2.73	17.22	10.87	68.97	6.44
0.79	0.28	0.57	28.26	15.43	55.46	7.02

FA Fatty acid ; SFA Saturated fatty acid ; MUFA Monounsaturated fatty acid ; PUFA Polyunsaturated fatty acid ; DW Dry mycelium weight

3 讨论

对微生物产不饱和脂肪酸已进行了大量研究^[2,4~7,9~14],如发酵产 γ-亚麻酸 (GLA)^[14]、花生四烯酸(AA)^[6,13]、二十碳五烯酸(EPA)^[11,12]、二十二碳六烯酸(DHA)^[7,9]等。从葡萄糖经丙酮酸生成乙酰辅酶 A,由此再形成各种脂肪酸的化学途径已非常清楚,然而植物和微生物如何控制不饱和脂肪酸的类型和含量,仍然知之甚少^[10]。在微生物发酵产 DHA 等多不饱和脂肪酸时,学者们已发现有些条件可以促进单不饱和脂肪酸向多不饱和脂肪酸转化。Bajpai 等报道,在用破囊壶菌(*Thraustochytrium aureum*)比较十种不同培养基发酵产 DHA 时,单不饱和脂肪酸向多不饱和脂肪酸转化有极大的差异。用水霉(*Saprolegnia* sp.)^[11]和终极腐霉(*Pythium ultimum*)^[12]产 EPA,长孢被孢霉(*Motierella elongata*)产 AA^[13],被孢霉(*Motierella* sp.)产 GLA^[14]时都会积累高比例的单不饱和脂肪酸而不能很好地转化为多不饱和脂肪酸,因而多不饱和脂肪酸产量不高。这说明如能将饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸向多不饱和脂肪酸充分转化,将极大地提高这些多不饱和脂肪酸的产量。从许多学者研究中看到,多不饱和脂肪酸的生成关键步骤是 18:1(油酸)向 18:2(亚油酸)的转化^[2,7,10,15]。我们的研究结果中也发展了这一论点,并看到了多不饱和脂肪酸的生成是一个“库、流、产”的问题。总脂肪酸为库,库高,流(转化)顺,则产高。本文表明,要想获得高产,一是要最大菌丝体产量,二是要好的转化。要生产较高的菌丝体,又要获得较高的多不饱和脂肪酸含量,其共同条件是:培养时间、装液量、接种量;不同条件为:碳源、氮源、碳氮比值、温度、起始 pH 和照光等六种因素。因此,要获得较大菌丝体产量,又要获得较高多不饱和脂肪酸产量,在技术流程上可以分两步进行。即从第一阶段以麦芽糖(60g/L)为碳源、KNO₃ 为氮源(3g/L),起始 pH 为 7.0、装液量为 500mL 三角瓶装 100mL 液体、接种 10%~20%、25℃ 不照光培养 10d 以积累菌丝体,在第二阶段,添加葡萄糖至 10~20g/L、(NH₄)₂SO₄ 或 NH₄Cl 3g/L,调 pH 至 4.0,温度为 10℃,照弱光的情况下,培养一段时间,以利于多不饱和脂肪酸的转化。

致谢 江苏省农业科学院作物遗传生理所焦德茂研究员在论文修改过程中提出宝贵意见,在此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] 沈 同,王镜岩,赵帮梯.生物化学(上册).北京:高等教育出版社,1980.39.
- [2] 曾晓雄,罗泽民.天然产物开发与研究,1997,9(1):65~70.
- [3] 翁新楚,董新伟,任国谱.生物工程进展,1994,14(6):56~65.
- [4] 徐天宇.食品与发酵工业,1995,22(1):56~65.
- [5] 戴传超,袁 生,龚 洁,等.生物技术,1995,5(5):44~46.
- [6] 鲍时翔,朱法科,林炜铁.微生物学报,1997,37(5):374~377.
- [7] 戴传超,袁 生,刘吉华,等.菌物系统,2000,19(2):261~267.
- [8] 天津轻工学院,大连轻工学院,无锡轻工学院,等.工业发酵分析.北京:中国轻工出版社,1980.16~17.
- [9] Bajpai P K, Bajpai P, Ward O P. *Appl Microbio Biotechnol*, 1991, 35:701~710.
- [10] Ohlrogge J B, Jaworski J G. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48:109~136.
- [11] Shirasaka N, Shimizu S. *JAOCS*, 1995, 72(12):1545~1549.
- [12] Gandhi S R, Weete J D. *Journal of General Microbiology*, 1991, 137:1825~1830.
- [13] Yamada H, Shimizu S, Shinmen Y. *Agric Biol Chem*, 1987, 51(3):785~790.
- [14] 赵人俊,严 虹,郑幼霞.生物工程学报,1995,11(4):361~365.
- [15] 张羽航,鲍时翔,郑学勤,等.生物技术通报,1998,4:1~9.

THE EFFECT OF CULTURE CONDITIONS ON THE FATTY ACID COMPOSITION IN THE MYCELIUM OF THE *CEPHALOSPORIUM* SP.

Dai Chuanchao Yuan Sheng Li Xia Liu Jihua Xing Dingkun Lu Ling
(The Biology Science College of Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract : The optimal condition of *Cephalosporium* sp. to culture mycelia and accumulate polyunsaturated fatty acid (PUFA) was researched. The optimal culture condition to get mycelium productivity was :maltose 60g/L, KNO₃ 3g/L, initial pH6.0, 100mL medium in 500mL flask, seeding 25%(v/v), 25℃ culture it for 10 days. The optimal condition to accumulation PUFA proportion to total fatty acid was :glucose 10~20g/L, NH₄Cl or (NH₄)₂SO₄ 3g/L, initial pH 4.0, 100mL medium in 500mL flask, seeding 10~20%(v/v) and lighted it when it was cultured. It was suggested that two step could be used in the producing progress. A proposal was put forward that the oleic acid transformed to linoleic acid was the key step to produce PUFA. This proposal gave a base to research the optimal culture condition and enzyme regulation.

Key words : *Cephalosporium* sp. , Mycelium , Fatty acids , Polyunsaturated fatty acids (PUFA).