

甘蔗糖蜜发酵生产多不饱和脂肪酸的菌种筛选

李楠¹, 邓智年², 覃拥灵^{1,3}, 凌敏¹, 梁智群^{1*}

(¹ 广西大学生命科学与技术学院 南宁 530004; ² 广西农业科学院作物改良重点实验室 南宁 530007)

(³ 河池学院化学与生命科学系 宜州 546300)

摘要 利用苏丹黑 B 染色和测定多不饱和脂肪酸碘值的方法, 从土壤中筛选出一株适合用甘蔗糖蜜为原料生产多不饱和脂肪酸的霉菌 LB1。研究表明, 该菌株培养的最适糖蜜浓度为 10°BX, 通过单因素实验和正交实验设计, 确定了优化培养条件: 最适温度 28℃、摇床转速为 160r/min、pH 值为 6.0 和培养天数为 5d。在优化条件下, 菌株的油脂含量为其生物量的 57.08%, 其中油脂中多不饱和脂肪酸的组成及含量为: 油酸 15.42%、亚油酸 14.38%、 γ -亚麻酸 23.55%、 α -亚麻酸 3.06%、花生四烯酸 9.87%、廿碳五烯酸 8.14%、廿二碳六烯酸 6.07% 等。多不饱和脂肪酸的含量占总脂肪酸的 80.49%。对 LB1 菌株进行形态特征、生理特征分析及 5.8S rDNA 基因两侧的内转录间隙进行序列分析推测该菌株为反屈毛霉。

关键词 毛霉 LB1; 多不饱和脂肪酸; 甘蔗糖蜜; 发酵条件; 鉴定

中图分类号 Q935 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2006)04-0552-05

多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acids, PUFAs)是指含两个或两个以上双键且碳原子数为 16-22 的直链脂肪酸, 主要有亚油酸(Linoleic acid, LA)、 γ -亚麻酸(γ -Linolenic acid, GLA)、花生四烯酸(Arachidonic acid, ARA)、 α -亚麻油(α -Linolenic acid, ALA)、廿碳五烯酸(Eicosapentaenoic acid, EPA)和廿二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid, DHA)等^[1]。多不饱和脂肪酸大多数是生物活性物质的前体, 尤其是对智力发育、心血管病等有良好效果^[2~5]。此外 PUFAs 还可用作食品添加剂、营养配方、健康辅料以及保健品等^[6]。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。目前国内外研究通常利用葡萄糖、淀粉和蔗糖等作为碳源生产多不饱和脂肪酸^[7]。作者试图从土壤中筛选出以甘蔗糖蜜为碳源, 发酵生产多不饱和脂肪酸的菌株, 并对发酵条件、油脂含量和组成进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土样 采自广西大学校园不同树林下土壤。

1.1.2 培养基: 初筛培养基: PDA 固体培养基和 PDA 液体培养基^[8]。转化斜面培养基: 5°BX 糖蜜,

0.005% (NH₄)₂SO₄, 0.001% K₂HPO₄, 2% 琼脂, pH6.0。复筛培养基: 10°BX 糖蜜, 0.005% (NH₄)₂SO₄, 0.001% K₂HPO₄, pH 6.0。察氏培养基: 自然 pH。改良察氏培养基: 以等量蛋白胨代替硝酸钠, 其他成分不变。葡萄糖蛋白胨培养基: 葡萄糖 2%, 蛋白胨 2%, 琼脂 1.5%, pH 5.8。灭菌条件: 0.1Mpa, 灭菌 20min。

1.1.3 主要试剂和仪器: Shimadzu, GC-17A 气相色谱仪(日本岛津公司); 脂肪酸标准品(美国 Sigma 公司); DNA Marker(TaKaRa 公司); PCR 纯化试剂盒(上海 Sangon 公司); ITS 引物(大连宝生物工程公司合成); iCycler™ 型 PCR 仪(BIO-RAD); 水平电泳仪(北京六一仪器公司); Gel Doc™ XR 型凝胶成像系统(BIO-RAD); JEM-1200EX/S 型透射电子显微镜(日本); 甘蔗糖蜜(广西南宁糖业公司明阳糖厂)。

1.2 菌种的筛选

1g 土样溶于 10mL 无菌水, 制成悬浮液, 稀释到一定倍数。准确移取 1mL 稀释悬液到初筛培养基涂布平板, 置于 28℃ 下培养 3d。挑单菌落平板划线分离, 直至分出纯菌株, 并转接到 PDA 斜面培养基^[8]。

1.3 糖蜜的处理

糖蜜原液(85°BX): 用水作 1:1.5 稀释。H₂SO₄ 调 pH3.5, 摇匀, 静置 8h, 取滤液加石灰乳, 调

* 通讯作者。Tel 86-771-3270733; Fax 86-771-3271181; E-mail: zqliang@gxu.edu.cn

作者简介: 李楠(1969-)男, 广西南宁人, 讲师, 博士研究生, 主要从事应用微生物学研究。E-mail: linan97690612@163.com

收稿日期: 2005-09-19; 接受日期: 2006-01-19; 修回日期: 2006-03-17

pH7.2,60℃加热并搅拌30min,静置12h,取滤液,调pH6.0。稀释适当浓度备用。

1.4 类脂物质和菌株形态的观察

按常规制成涂片,用0.3%苏丹黑B溶液染色10min,二甲苯冲洗涂片至无色,0.5%番红水溶液复染1~2min;用水漂洗,盖上盖玻片,显微镜下观察脂类物质^[9]。光学显微镜结合扫描电镜进行形态的观察。

1.5 初筛发酵培养

无菌状态下,将10mL无菌水移入PDA斜面菌种中,制成孢子液;后转入PDA液体培养基中,25℃,140r/min,培养4d。

1.6 复筛发酵培养

无菌状态下,将PDA斜面菌种转入转化斜面培养基,培养3d后用10mL无菌水制成孢子液,转入复筛培养基中,25℃,140r/min,培养4d。

1.7 生理生化特征及培养条件实验

将LB1接种于不同的试管斜面或三角瓶固体培养基上,在28℃培养,观察并比较其生长情况。

将LB1接种于PDA培养基上,分别于不同温度下培养观察生长情况。

1.8 培养条件的初步优化

进行不同培养条件实验,选取 $L_{64}(4^3)$ 正交实验表,确认影响因素的显著性^[14]。确定发酵优化条件。

1.9 发酵分析

1.9.1 生物量测定:布氏漏斗真空抽滤发酵液,得菌体,冷冻干燥至恒重得生物量。

1.9.2 总脂量测定:参照李植峰等^[10]的热酸法进行。

1.9.3 脂肪酸碘值的测定:根据李建武等^[11]测定脂肪酸碘值的方法进行。

1.10 脂肪酸的检测

采用气相色谱法进行^[12]。称取冷冻干燥后的菌体,加入10mol/L HCl-CH₃OH溶液,80℃水浴1h,进行脂肪酸甲基化,正己烷抽提,静置分层,取上层液体分析。十四酸甲脂、软脂酸甲脂、硬脂酸甲脂、十八碳烯酸甲脂、十八碳二烯酸甲脂、γ-亚麻酸甲脂、二十二碳二烯酸甲脂、二十碳五烯酸甲脂、二十二碳六烯酸甲脂(美国Sigma公司)配制成1mg/mL浓度的混合液为标品。岛津气相色谱仪(Shimadzu GC-17A)进行气相色谱测定,氢火焰检测器(FID),石英毛细管柱DB-1型30m×0.25mm(ID)×0.25μm(Film)。柱温初温180℃,采用程序升温2℃/min,柱温220℃(保温

30min)进样口温度260℃,检测器温度280℃。氮气为载气,分流比1:60,进样量1.0μL^[13]。

1.11 PCR扩增和序列分析

1.11.1 总DNA的提取:参照Michaelson等总DNA的提取方法进行^[15]。收集菌体,冷冻干燥,加液氮研磨成粉末,移入离心管,加入提取缓冲液(200mmol/L NaCl,4mmol/L EDTA-Na₂,100mmol/L pH 8.0 Tris-HCl,2% SDS)8mL,摇匀;68℃水浴15min;4℃,12000r/min离心15min。上清加入等体积水饱和酚,摇匀,4℃,12000r/min离心10min,取上清;用苯酚/氯仿(1:1)和氯仿/异戊醇(24:1)各抽提一次;上清液加入1/10V NaAc(pH4.8)和2V无水乙醇,-20℃放置1h;4℃和12000r/min离心15min,弃上清;用70%(V/V)乙醇洗涤沉淀2次,晾干后溶于适量TE(pH8.0),-20℃保存备用。

1.11.2 PCR的扩增:PCR引物按White等报道设计^[16]。引物ITS1的序列为:5'-TCCGTAGGTG AACCTGCGG-3',引物ITS4的序列为:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',由大连宝生物工程公司合成。反应条件为:95℃ 1min,然后96℃ 20s,55℃ 30s,72℃ 1.5min,30个循环,72℃ 5min。

1.11.3 序列测序和同源性比较:扩增产物经纯化后,送由大连宝生物工程公司测序。将测序结果用BLAST软件与GenBank+EMBL+DDBJ+PDB中已知的基因序列进行同源性比对^[17]。

2 结果

2.1 菌种的筛选

苏丹黑B染色显微镜观测,初筛出脂肪粒密度较高的菌株,分别编号为LB1、LB2、LB3。甘蔗糖蜜对LB1、LB2、LB3进行液体发酵复筛,对3种菌株的生长情况、生物量、总脂含量以及碘值等作比较(表1),复筛出一株适合糖蜜发酵生产的菌株LB1。

表1 菌株复筛生物量,总脂量和碘值的结果

Strain	Biomass(g/L)	Total lipids/%	Iodine value
LB1	10.67	48.98	76.41
LB2	13.44	31.64	51.32
LB3	7.930	33.98	45.33

2.2 菌种鉴定

2.2.1 菌落形态的观察:对总脂含量高、碘值高的菌株LB1进行显微镜观察及扫描电镜观察:气生菌丝发达,充满平皿,高度>1cm。菌落白色、疏松、呈絮状、边缘整齐。培养时培养基无颜色变化。幼嫩菌

丝无隔,老菌丝有隔,有少量分枝。孢囊梗膨大成球形,表面生小型孢子囊,孢囊孢子单生。孢子圆球形,有短刺。菌丝及孢子囊形态见图1^[18]。

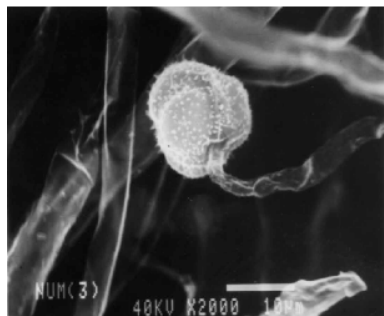


图1 菌株LB1菌丝及孢子囊形态(2000×)

Fig.1 The modality of mycelium and sporangium of LB1(2000×).

2.2.2 LB1的培养条件及生理特征 菌株LB1能在PDA、葡萄糖蛋白胨等固体培养基上生长茂盛,菌丝体洁白较致密,但在察氏培养基上生长较慢,菌丝稀疏,而在改良察氏培养基的有机氮源成分能使LB1生长良好。这说明LB1菌株对硝基氮利用能力弱,而能很好的利用有机氮。

菌株LB1的最适生长温度为28℃,在室温20℃至25℃条件下生长良好,12℃时生长缓慢,35℃对LB1生长有所抑制,升高温度菌株甚至停止生长。

2.3 LB1菌株ITS位点的序列测定及其同源性

以LB1的基因组DNA为模板,通过PCR扩增其ITS位点。扩增产物用0.8%的琼脂糖凝胶电泳,EB染色后,紫外灯下切下约750bp的PCR扩增产物,试剂盒回收。PCR产物进行序列测定^[19]。

序列测定表明,LB1菌株ITS位点长744bp。利用BLAST软件与GenBank+EMBL+DDBJ+PDB中已知的基因序列进行序列的同源性比对分析,结果表明,LB1与报道的反屈毛霉(*Mucor recurvus*) (GenBank号为AF412294)具有极高的同源性,ITS位点有97%以上的同源性。综合LB1菌株ITS位点的序列分析结果,结合菌落形态观察,推测LB1菌株为反屈毛霉(*M. recurvus*)。

2.4 糖蜜浓度的确定

糖蜜浓度对菌体生长及产多不饱和脂肪酸有很大影响。配制不同浓度的糖蜜培养基5°BX,10°BX,15°BX,20°BX,自然pH值,140r/min,25℃,培养4d。结果见图2,不同浓度的糖蜜培养基对生物量、总脂含量以及碘值有一定的影响,10°BX糖蜜浓度为最适浓度。

2.5 LB1菌株产脂的最适时间

微生物培养时间影响菌株积累脂肪酸。10°BX

糖蜜浓度培养基,自然pH值,140r/min,25℃研究不同培养时间(3d,4d,5d,6d),进行发酵分析。实验结果表明,随着培养时间的增加,LB1产生的总脂量也逐渐增加,培养5d时,总脂含量达到最大值为50.02%,碘值达92.01。随后,产脂量降低。因此,培养5d较为合适(图2)。

2.6 LB1菌株产脂的最适温度

温度对微生物的生长有很大的影响。改变培养的温度,会影响到微生物的生长和产生脂肪酸的能力。研究不同培养温度,分别为20℃,25℃,28℃,30℃,其它培养条件为10°BX糖蜜浓度,培养5d,进行发酵分析。结果表明,菌丝生长、油脂合成和碘值与最适温度是一致的,随温度升高而增大。但温度达30℃后,菌株生物量、总脂量和碘值都有所下降。说明低温较高温条件有利于不饱和脂肪酸的积累,在此,LB1菌株最佳的培养温度为28℃(图2)。

2.7 摇床转速对LB1产脂量的影响

不饱和脂肪酸的产生与积累,受脱氢酶的影响,溶氧浓度与摇床转速有着密切联系。设定不同的摇床转速140r/min,160r/min,180r/min,200r/min进行培养,温度为28℃,发酵培养5d,进行发酵分析。结果表明(图2),LB1菌株培养过程中160r/min条件有较高的碘值99.00,故确定该菌株的培养摇床转速为160r/min。

2.8 初始pH对LB1产脂肪酸的影响

改变培养基的初始pH,会影响到微生物的生长和产脂肪酸的能力。在实验中分别调节培养基的初始pH值,在160r/min,28℃下培养5d,进行发酵分析。结果表明(图2),初始pH对LB1菌株的生物量没有多大的影响,但对总脂量和碘值有一定的影响。当初始pH值为6.0时,菌株的总脂量和碘值最高。因此,初始pH值应控制在6.0。

2.9 正交试验设计

选取温度、培养时间和摇床转速等3个因素的4个不同水平,利用 $L_{64}(4^3)$ 正交实验表(表2),测定不饱和脂肪酸的碘值,以确定这些因素对毛霉进行甘蔗糖蜜发酵生产不饱和脂肪酸含量影响的显著性。

从极差的大小可以看出因素的重要性次序为:摇床转速→培养温度→培养时间。(表3)对于不饱和脂肪酸的生成和积累,摇床的转速影响特别大,其次为温度,而培养时间的影响不大。以脂肪酸碘值为判断指标,则指标越大越好,因此选水平时应考虑平均值大的,这就得到:摇床转速应为160r/min,温

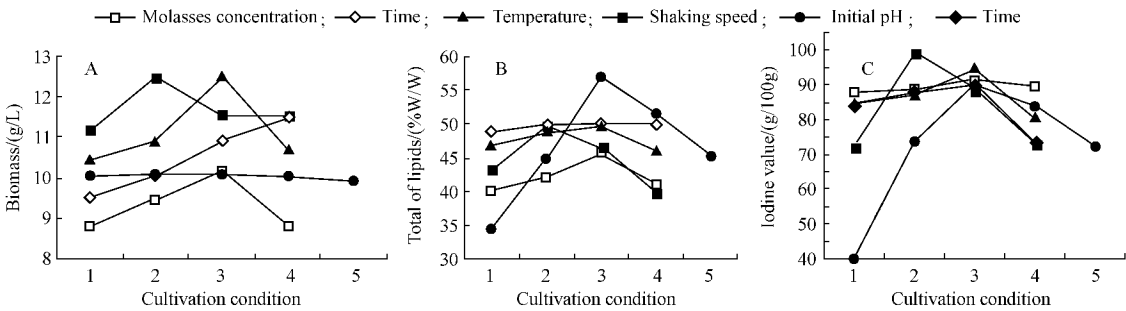


图2 培养条件对LB1菌株生物量(A)、总脂含量(B)和PUFAs碘值(C)的影响
Fig.2 Effect of cultivation conditions on biomass (A), total of lipids (B) and iodine value (C).

度应取 28℃ ,培养时间应用 5d。综合结果得到毛霉发酵生产不饱和脂肪酸的培养条件为 160r/min , 28℃ 5d。

表2 L64(4³)正交实验表
Table 2 L64(4³) orthogonal experiments

Level	Factor		
	temperature/℃	Rotate speed(r/min)	Cultural time/d
1	20	140	3
2	25	160	4
5	28	180	5
4	30	200	6

表3 L64(4³)正交实验结果

Number	Factor			Iodine value
	Temperature/℃	Rotate speed(r/min)	Cultural time/d	
I	1100.1	926.2	1177.5	4803.8
II	1289.6	1440.3	1179.4	
III	1178.4	1188.3	1247.8	
IV	1235.7	1258.8	1199.1	
I /16	68.76	57.89	73.59	
II /16	80.60	90.02	73.71	
III /16	73.65	74.27	77.99	
IV /16	77.23	78.68	74.94	
Range	11.84	32.13	4.4	

2.10 脂肪酸分析

采用气相色谱法测定由毛霉菌 LB1 产生油脂中的脂肪酸。通过样品和标品气相色谱出峰及保留时间的对照 ,利用面积归一化计算 ,得出该菌株油脂所含的不饱和脂肪酸比例较高(图 3)。其中油酸 15.42% ,亚油酸 14.38%、γ-亚麻酸 23.55%、α-亚麻酸 3.06%、花生四烯酸 9.87%、廿碳五烯酸 8.14%、廿二碳六烯酸 6.07%等 ,不饱和脂肪酸占总脂量的 80.49%。

3 讨论

在普通环境中寻找新的真菌资源 ,筛选高产 PUFAs 且适应性强的新菌种 ,是微生物 PUFAs 成为

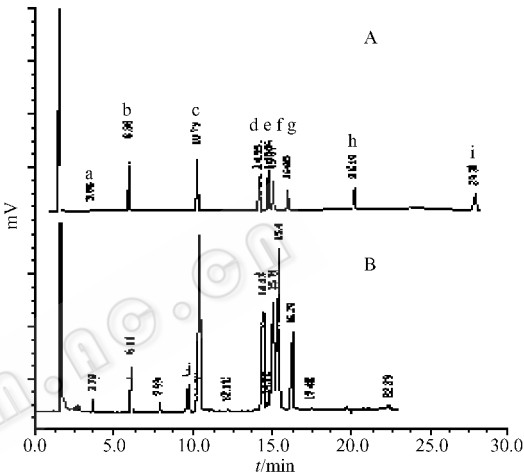


图3 标准样品和菌株LB1气相色谱图

Fig.3 The gas chromatography (GC) of standards and lipids of LB1(A is standard peak ; B is LB1 peak). a. Myristic Acid Methyl Ester ; b. Palmitic Acid Methyl Ester ; c. γ-Linolenic Acid Methyl Ester ; d. Linolenic Acid Methyl Ester ; e. Oleic Acid Methyl Ester , f. Stearic Acid Methyl Ester ; g. Eicosapentaenoic Acid Methyl Ester ; h. Docosahexaenoic Acid Methyl Ester ; i. Docosadienoic Acid Methyl Ester.

鱼油 PUFAs 替代资源的关键。戴传超等利用头孢霉菌(*Cephalosporium* sp.)发酵淀粉生产多不饱和脂肪酸中^[20] ,菌丝含油为 21.23% ,不饱和脂肪酸占总脂量的 80%。研究者从土壤筛到一种适合于甘蔗糖蜜生长的毛霉菌株 LB1 ,菌丝含油高达 57.08% ,其中不饱和脂肪酸占总脂量的 80.49%。能利用该菌株进行糖蜜发酵生产 PUFAs ,将为糖厂的深加工综合利用提供一个很好发展前景。

培养基的组成和培养条件影响着多不饱和脂肪酸的质量^[21]。目前微生物生产多不饱和脂肪酸分别以葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉、甘油等作为碳源发酵培养基^[22] ,而甘蔗糖蜜含有丰富的糖类、氮源、无机盐及维生素等 ,可作为微生物发酵生产多不饱和脂肪酸的培养基。从经济价值相比 ,甘蔗糖蜜的成本较低 ,可用作基本物质生产 PUFAs。

养条件的进一步优化,菌种的诱变改良以适应高糖浓度的生产以及 PUFAs 的分离提取、富集方法上。

参 考 文 献

- [1] 曹淑兰,关紫烽,蔡云萍.深海鱼油、海狗油脂脂肪酸组份的分析研究.质谱学报,1999,20(1):70-75.
- [2] Yoshida H, Kumamaru J. Lymphatic absorption of seal and fish oils and their effect on metabolism and eicosanoid production in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, 60(8):1293.
- [3] Bjerregaard P, Pedersen HS, Mulvad G. The associations of a marine diet with plasma lipids, blood glucose, blood pressure and obesity among the Inuit in Greenland. *Eur J Clin Nutr*, 2000, 54(9):732.
- [4] Moller SM, Hannsen JC, Thorling EB. Effects of dietary seal oil on fat metabolism. *Int J Circumpolar Health*, 1998, 57(Suppl 1):322.
- [5] Horrocks LA, Yeo YK. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol Res*, 1999, 40(3):203.
- [6] Uauy R, Hoffman DR, Peirano P. Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids*, 2001, 36(9):885.
- [7] Bajpai PK, Bajpai P, Ward OP. Production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* ATCC 32222. *Indust Microbiol*, 1991, 8:179-186.
- [8] 周德庆.微生物学实验手册.上海:上海科学技术出版社,1986,232-234.
- [9] 中国科学院微生物研究所细菌分类组.一般细菌常用鉴定方法.北京:科学出版社,1978,126-127.
- [10] 李植峰,张玲,沈晓京.四种真菌油脂提取方法的比较研究.微生物学通报,2001,28(6):72-75.
- [11] 李建武,余瑞元,袁明秀,等.生物化学实验原理和方法.北京:北京大学出版社,1994,139-141.
- [12] Sakuradani Ei ji, Kobayashi M, Ashikari T, *et al.* Identification of Δ^{12} -Fatty acid desaturase gene from arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus by heterologous expression in the yeast *saccharomyces cerevisiae* and the fungus *Aspergillus oryzae*. *Eur J Biochem*, 1999, 261:812-820.
- [13] 卞曙光,张晓昱,张磊.海洋真菌多不饱和脂肪酸的快速检测.微生物学通报,2001,28(1):73-76.
- [14] 汪荣鑫.数理统计.西安:西安交通大学出版社,2000,120-158.
- [15] Michaelson LV, Lazarus CM, Griffiths G, *et al.* Isolation of a Δ^5 -Fatty acid desaturase gene from *Mortierella alpina*. *Biol Chem*, 1998, 273(30):19055-19059.
- [16] White TJ, Bruns T, Lee S. Analysis of phylogenetic relationship by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA gene. In: Innis MA, ed. PCR protocol: A Guide to Methods and Application. New York: Academic, 1990, 315-322.
- [17] 武波,韦东,唐咸来,等.一株产絮凝剂的曲霉菌株的筛选.微生物学杂志,2001,21(2):3-5.
- [18] 魏景超.真菌鉴定手册.上海:上海科学技术出版社,1979,61-89.
- [19] Chun J, Huq A, Colwell RR. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(5):2202-2208.
- [20] 戴传超,袁生,刘吉华.产二十二碳六烯酸等多不饱和脂肪酸真菌的筛选.菌物系统,2000,19(2):261-267.
- [21] Granger LM, Perlot P, Goma G, *et al.* Kinetics of growth and fatty acid production of *Rhodotorulaglutinis*. *Appl Microbiol Biotech*, 1992, 37:13-17.
- [22] 吴水清,姚如华.真菌产生多不饱和脂肪酸的研究.中国生化药物杂志,1997,18(3):127-129.

Screening of microorganism producing polyunsaturated fatty acids with sugarcane molasses

LI Nan¹, DENG Zhi-nian², QIN Yong-ling^{1,3}, LING Min¹, LIANG Zhi-qun^{1*}

(¹ College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

(² Key Laboratory for Crop Genetic Improvement of Guangxi Agricultural Science Academy, Nanning 530007, China)

(³ Department of Chemistry and Life Sciences, HeChi University, Yizhou 546300, China)

Abstract A strain name LB1 producing polyunsaturated fatty acids with sugarcane molasses was screened from soil samples by the methods of Sudan Black B stain and the determination of PUFAs' iodine value. Based on the grass morphological and physiological characteristics and the sequence similarity of ribosomal DNA-ITS, the strain was identified as *Mucor recurvus* sp.. The results of L64 (4³) orthogonal experiments indicated when *Mucor recurvus* was cultivated at 28°C for 5 days with 160r/min, the yields of PUFAs with 10⁰ BX sugarcane molasses (pH6.0) were up to 80.49% content of total fatty acids. The total lipids content was 57.08% of fermentation biomass, which were composed of 15.42% Oleic acid, 14.38% Linolenic, 23.55% γ -Linolenic, 3.06% α -Linolenic, 9.87% Arachidonic acid, 8.14% Eicosapentaenoic acid, 6.07% Docosahexaenoic acid, etc.

Keywords : *Mucor* sp. LB1; Polyunsaturated fatty acids; Sugarcane molasses; Cultivation condition; Identification

* Corresponding author. Tel 86-771-3270733; Fax 86-771-3271181; E-mail: zqliang@gxu.edu.cn

Received: 19 September 2005/Accepted: 19 January 2006/Revised: 17 March 2006