

被孢霉菌发酵产生花生四烯酸的研究*

鲍时翔 朱法科 林炜铁 姚汝华

(华南理工大学生物工程系 广州 510641)

摘要 研究了温度、培养基初始 pH、碳源、氮源对被孢霉(*Mortierella* sp.)产生花生四烯酸的影响。正交试验结果表明, *Mortierella* sp. M10 最佳培养基组成为(g/L): 葡萄糖 100, 酵母膏 10, KNO_3 4.0, KH_2PO_4 2.0, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.015, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0075, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0005。采用最佳培养基及发酵条件, 细胞干重和花生四烯酸产量分别为 33.51g/L 和 0.827g/L。同时对摇瓶发酵过程进行了分析。

关键词 花生四烯酸, 发酵, 被孢霉

花生四烯酸(Arachidonic Acid, 简称 AA)属于 n-6 系列多不饱和脂肪酸, 是人体前列腺素合成的重要前体物质。近年来研究发现, 它在降血脂血糖、抑制血小板聚集、抗炎症、抗癌、抗脂质氧化、促进脑组织发育等方面具有独特的生物活性, 已引起世界各国的高度重视^[1]。目前, 花生四烯酸主要来源于动物肾上腺、肝脏及沙丁鱼等, 但其产量甚低, 难以满足社会的需求。1979 年 Iizuka 等^[2]发现 *Penicillium cyaneu* 菌体内富含花生四烯酸。1987 年 Yamada 等^[3]从土壤中分离到多株花生四烯酸产生菌, 经选育获得一株高产菌 *Mortierella elongata* IS-5, 利用葡萄糖作碳源进行发酵, 花生四烯酸产量达 0.99g/L。1990 年 Sajbidor 等^[4]研究了发酵培养基 C/N 比对真菌生产花生四烯酸的影响。由于微生物具有生长速度快、培养简单等特点, 且利用微生物发酵生产花生四烯酸可以不受原料限制, 因此吸引了国内外学者的致力研究。目前日本和英国等已有花生四烯酸的发酵产品问世, 但产率较低。国内在这方面的研究还未见文献报道。

我们在前期实验中已从土壤中分离选育出一株花生四烯酸产生菌^[5], 本文对其培养基组成、培养条件及摇瓶发酵进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

被孢霉菌(*Mortierella* sp. M10), 华南理工大学发酵工程博士点保存。

1.2 培养基

斜面培养基: 将新鲜马铃薯去皮, 切粒, 称取 20 g 于 250 ml 烧杯中, 加水 100 ml, 水煮 20 min, 四层纱布过滤。滤液加水至 100 ml, 再加蔗糖 2.0 g, 琼脂 2.0 g, 调 pH5.6。

种子培养基: 每升培养基含葡萄糖 30 g, 酵母膏 2.0 g, 蛋白胨 3.0 g, KH_2PO_4 5.0 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, pH6.0。

* 中国博士后科学基金和广东省自然科学基金资助项目。

本文于1996年6月6日收到。

基础培养基: 每升培养基含葡萄糖 80 g, 酵母膏 0.5 g, KNO_3 4.0 g, KH_2PO_4 3.0 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 15 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.5 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg, pH6.0.

1.3 菌体培养与收集

- 1.3.1 菌种活化: 将保存菌种转接至斜面培养基, 28℃ 培养 4d.
- 1.3.2 种子液制备: 用 5 ml 无菌水将斜面菌种洗入装有 50 ml 种子培养基的 250 ml 三角瓶中, 25℃、180 r / min 下摇瓶培养 4d.
- 1.3.3 摇瓶培养: 取 2 ml 种子液于装有 50 ml 发酵培养基的 250 ml 三角瓶中, 25℃、180r / min 下摇瓶培养 5d.
- 1.3.4 菌体收集: 抽滤发酵液, 水洗三次后, 于 105℃ 恒温箱中烘干至恒重, 得菌体干重(DC).

1.4 分析方法

- 1.4.1 发酵液残糖的测定: 采用菲林法^[6].
- 1.4.2 菌体油脂抽提: 采用 Soxhlet 抽提法^[7].
- 1.4.3 油脂成分分析: 采用氢氧化钾-甲醇酯交换法^[8]处理样品, 用岛津 GC-14B 气相色谱仪分析油脂组成. CBP-20 毛细管柱, 柱长 25 m, 内径 0.33 mm, 液膜厚 0.5 μm. 测定条件为: 柱前压 0.15MPa, 柱温 180℃, 然后以 1℃ / min 程序升温至 230℃. 气化室温度 240℃, 检测器温度 280℃.

2 结果和讨论

2.1 温度对花生四烯酸发酵的影响

温度是影响菌体生长及花生四烯酸产量的重要因素, 结果如图 1. 菌株 *Mortierella* sp. M10 在 25℃ 时生长适宜, 此时发酵液细胞干重为 27.3g / L, 花生四烯酸产率为 0.752g / L. 温度过高或过低, 都不利于菌体生长和花生四烯酸的积累.

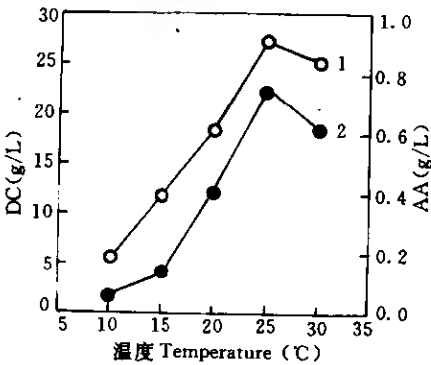


图 1 温度对花生四烯酸发酵的影响
Fig.1 Effect of temperature on the production of arachidonic acid

1. 细胞干重 DC; 2. 花生四烯酸 AA.

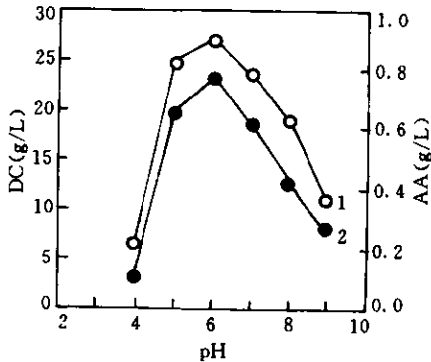


图 2 初始 pH 对花生四烯酸发酵的影响
Fig.2 Effect of initial pH on the production of arachidonic acid

1. 细胞干重 DC; 2. 花生四烯酸 AA.

2.2 初始 pH 对花生四烯酸发酵的影响

将菌株 *Mortierella* sp. M10 接种于不同初始 pH 的发酵培养基上, 摇瓶发酵, 结果于图 2。初始 pH 为 6.0 时, 发酵液细胞干重和花生四烯酸产量分别达 26.9 g/L 和 0.768 g/L。

2.3 碳源对花生四烯酸发酵的影响

在基础培养基中, 分别以 6% 的葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉、糖蜜和甘油等成分作为碳源, 摇瓶培养, 测发酵液细胞干重及花生四烯酸产量, 结果如表 1。葡萄糖是被孢霉 *Mortierella* sp. M10 发酵生产花生四烯酸的最有效碳源, 其次是麦芽糖和甘油。

表1 碳源对花生四烯酸发酵的影响

Table 1 Effect of carbon source on the production of arachidonic acid

| 碳 源 | 葡萄糖 | 麦芽糖 | 蔗 糖 | 可溶性淀粉 | 糖 蜜 | 甘 油 |
|---------------|---------|---------|---------|----------------|----------|----------|
| Carbon source | Glucose | Maltose | Sucrose | Soluble starch | Molasses | Glycerin |
| 细胞干重DC(g/L) | 26.5 | 23.9 | 7.1 | 5.0 | 5.6 | 22.4 |
| 花生四烯酸AA(g/L) | 0.72 | 0.61 | 0.14 | 0.05 | 0.03 | 0.54 |

2.4 氮源对花生四烯酸发酵的影响

在基础培养基中, 分别以 0.3% 的蛋白胨、玉米浆、硫酸铵、尿素、硝酸铵、硝酸钾等成分作为氮源, 摇瓶发酵, 测发酵液细胞干重和花生四烯酸产量, 实验结果如表 2。蛋白胨、硝酸钾是 *Mortierella* sp. M10 生长和产酸的最佳氮源。

表2 氮源对花生四烯酸发酵的影响

Table 2 Effect of nitrogen source on the production of arachidonic acid

| 氮 源 | 蛋白胨 | 玉米浆 | 硫酸铵 | 尿素 | 硝酸铵 | 硝酸钾 |
|-----------------|---------|-------------------|---|------|---------------------------------|------------------|
| Nitrogen source | Peptone | Corn steep liquor | (NH ₄) ₂ SO ₄ | Urea | NH ₄ NO ₃ | KNO ₃ |
| 细胞干重DC(g/L) | 25.8 | 17.5 | 10.5 | 8.26 | 14.7 | 25.6 |
| 花生四烯酸AA(g/L) | 0.67 | 0.45 | 0.26 | 0.19 | 0.37 | 0.70 |

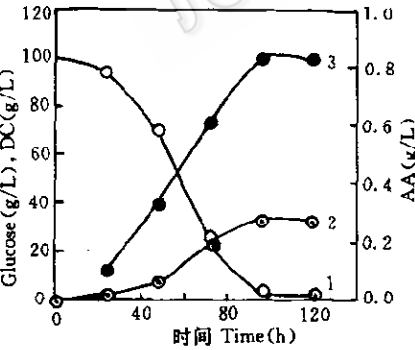


图 3 花生四烯酸发酵过程

Fig.3 Time course of the production of arachidonic acid

1. 葡萄糖 Glucose; 2. 细胞干重 DC;
3. 花生四烯酸 AA.

2.5 最适培养基组分的确定

利用正交试验法考察了葡萄糖、酵母膏、硝酸钾、磷酸二氢钾、金属离子浓度等对发酵的影响, 其最佳培养基组成为 (g/L): 葡萄糖 100, 酵母膏 10, KNO₃ 4.0, KH₂PO₄ 2.0, CaCl₂ · 2H₂O 0.1, MgSO₄ · 7H₂O 0.5, FeCl₃ · 6H₂O 0.015, ZnSO₄ · 7H₂O 0.0075, CuSO₄ · 5H₂O 0.0005。以此培养基摇瓶培养, 细胞干重、花生四烯酸产量分别为 33.1g / L 和 0.82g / L。

2.6 摇瓶发酵过程分析

采用上述最佳组分培养基及发酵条件, 进行摇瓶培养, 测定发酵过程葡萄糖浓度、细胞干重和花生四烯酸含量, 结果如图 3。

发酵过程曲线表明: 发酵前 24 h, *Mortierella* sp. M10 菌株耗糖量较少, 菌体生长较慢, 产生的花生

四烯酸也少。24h 后, 菌体进入对数生长期, 耗糖量急剧增大, 菌体内油脂开始大量积累。发酵至 96h, 细胞干重和花生四烯酸含量达最大值, 分别为 33.51g / L 和 0.827g / L, 接近文献 [3] 报道水平。培养时间再延长, 细胞干重和花生四烯酸含量变化不大。

参 考 文 献

- [1] Simopoulos A P. *J Nutr*, 1989, **119**: 521~528.
- [2] Iizuka H, Ohtomo T, Yoshida K. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1979, **7**: 173~180.
- [3] Yamada H, Shimizu S, Shinmen Y. *Agric Biol Chem*, 1987, **51**(3): 785~790.
- [4] Sajbodor J, Dobronova S, Cerik M. *Biotechnol Lett*, 1990, **12**(6): 455~456.
- [5] 吴水清. 微生物多不饱和脂肪酸的研究(博士论文). 广州: 华南理工大学, 1995. 46~52.
- [6] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 等. 生化实验方法与技术. 北京: 高等教育出版社, 1981. 6~9.
- [7] 天津轻工业学院, 大连轻工业学院, 无锡轻工业学院, 等. 工业发酵分析. 北京: 轻工业出版社, 1994. 41~42.
- [8] 程志青, 吴惠勤. 分析测试通报, 1989, **8**(6): 49~52.

STUDIES ON ARACHIDONIC ACID PRODUCTION BY *MORTIERELLA*

Bao Shixiang Zhu Fake Lin Weitie Yao Ruhua

(Dept. of Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641)

Abstract The effects of the incubation temperature, initial pH of the medium, carbon source and nitrogen source on the production of arachidonic acid by *Mortierella* sp. M10 were studied. Through orthogonal experiments, the optimum culture medium was obtained (g/L): glucose, 100; yeast extract, 10; KNO₃, 4.0; KH₂PO₄, 2.0; CaCl₂ · 2H₂O, 0.1; MgSO₄ · 7H₂O, 0.5; FeCl₃ · 6H₂O, 0.015; ZnSO₄ · 7H₂O, 0.0075; CuSO₄ · 5H₂O, 0.0005. Under the optimum culture conditions, the dry cell weight and arachidonic acid was 33.51g/L and 0.827g/L, respectively. The flask culture process was analysed.

Key words Arachidonic acid, Fermentation, *Mortierella* sp.