

高山被孢霉产花生四烯酸的发酵和老化工艺

曹刚刚^{1,2}, 管政兵^{1,2}, 廖祥儒^{1,2}, 蔡宇杰^{*1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 高山被孢霉对于淀粉质原料具有优良的利用能力。采用经淀粉酶液化的玉米粉-豆粕培养基,研究了高山被孢霉在 5 L 容积机械搅拌罐液态发酵的主要参数,如搅拌转速和通气体积比对于高山被孢霉发酵产花生四烯酸的影响,得到最优的搅拌转速和通气体积比,分别为 200 r/min 和 1:1。研究发现,采用发酵罐培养 5 d 的菌丝体,最佳的老化温度和保温时间分别是 20 ℃ 和 5 d。本研究把谷物粗原料成功用于高山被孢霉发酵产花生四烯酸,经发酵罐优化和菌体老化后的花生四烯酸产量达到 11.7 g/L,菌体老化可以在保持产量的同时缩短发酵周期,有效降低生产成本,有望实际用于花生四烯酸的工业化生产。

关键词: 谷物原料;发酵罐;老化;花生四烯酸;高山被孢霉

中图分类号:Q 815 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2016)06—0617—06

Fermentation and Cell Aging Strategy for Arachidonic Acid Production by *Mortierella alpina*

CAO Ganggang^{1,2}, GUAN Zhengbing^{1,2}, LIAO Xiangru^{1,2}, CAI Yujie^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: *Mortierella alpina* possesses the excellent ability of using starch-based materials to produce arachidonic acid, while the production need to be verified in a fermentor. This study focused on fermentation and cell aging strategy to reduce production cost. Starch liquefaction was applied to improve media rheology and dissolved oxygen. The results indicated that the best mixing speed and ventilation was 200 r/min and 1:1, respectively. The study also found that the optimal temperature and aging time was 20 ℃ and 5 d respectively. Cell aging can effectively reduce the production cost while maintaining production. Arachidonic acid production reached 11.7 g/L when the optimal fermentation and cell aging strategy was employed which allowed large-scale production of arachidonic acid by using raw crop meals.

Keywords: raw crop materials, 5 L fermentor, cell aging, arachidonic acid, *Mortierella alpina*

收稿日期: 2014-12-19

基金项目: 国家 863 计划项目(2014AA021701)。

* 通信作者: 蔡宇杰(1973—),男,江苏无锡人,工学博士,教授,硕士研究生导师,主要从事生物工程方面的研究。

E-mail: yjcai@jiangnan.edu.cn

花生四烯酸即全顺式 Δ -5,8,11,14-二十碳四烯酸(arachidonic acid, ARA), 是人体生长和发育所必需的三大脂肪酸之一^[1], 隶属于 ω -6 系列多不饱和脂肪酸。花生四烯酸及其代谢衍生物具有很强的生物活性, 能够发挥多种生理功能, 主要体现在几个方面: 1) 其二十碳烯酸代谢物在神经节细胞中能介导由组胺引起的效应, 发挥第二信使作用^[2]; 2) 花生四烯酸是前列腺素的直接前体, 而后者对造血干细胞的增殖分化具有明显的促进作用^[3]; 3) 血管壁中 ARA 的主要代谢产物 PGI₂ 是应对血小板聚集的有效抑制剂, 使血管舒张, 从而防止高血压^[4-6], 改善心血管系统; 4) ARA 的二十碳代谢物白细胞三烯为致炎症介质, 在炎症反应中发挥重要作用^[7-9]; 5) ARA 还具有保护和营养皮肤的功能^[10-11]。基于优良的生理功能, ARA 在食品、饲料、医药和化妆品等领域得到了广泛应用。

ARA 的主要来源有动物肝脏、鱼油、微生物和微藻等。微生物发酵法生产 ARA 由于具有周期短、原料成本低、多价不饱和脂肪酸含量高, 以及产量高等优势^[12], 得到了广泛的应用。目前工业化生产的 ARA 主要发酵原料是葡萄糖、酵母粉、豆粕等, 成本仍然较高。由于形态差异造成的产量稳定性也比较差。作者前期的研究发现, 高山被孢霉能够很好地利用玉米粉和豆粕生长并在胞内积累油脂, 摇瓶中生长形态佳、产量高。但是, 由于发酵罐与摇瓶的诸多差异, 尤其是由于基质不溶性物质含量高, 灭菌后较黏稠。为应对培养基在发酵罐中无法得到有效的搅拌均质的难题, 作者采取淀粉液化的方法对原料进行预处理, 把廉价的基质成功运用到高山被孢霉产 ARA 的深层液态发酵, 并且在发酵罐对发酵工艺进行了初步的、有益的探索, 验证了该工艺的可行性。

多种微生物在培养过程中会以脂类的形式贮藏能量, 一般以饱和和单不饱和脂肪酸为主。在菌体老化的过程中, 不饱和脂肪酸的含量通常会逐渐减少。但是对于某些种类的被孢霉^[1,12], 不饱和脂肪酸的含量反而增加^[13], 但是相关的详细报道不多。本文详细研讨了老化温度、时间对于老化后菌体失重率、ARA 含量的影响, 并在此基础上进行放大。在缩短了发酵罐培养时间、降低了成本的同时, 保证了 ARA 的产量。

1 材料与方法

1.1 菌种

高山被孢霉 *Mortierella alpina*, 作者所在实验室保藏。

1.2 培养基

斜面培养基(g/L): 去皮马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20。115 °C 灭菌 20 min。

种子培养基: 玉米粉 40 g/L, pH 自然。115 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基: 66.0 g 玉米粉加入 500 mL 水, 煮沸彻底糊化后加入 10 mL 50 g/L 的耐高温 α -淀粉酶溶液, 搅拌并于 90 °C 保温 20 min。冷却后定容到 1 000 mL, 加入豆粕 54.0 g, MgSO₄ 1.0 g, Na₂SO₄ 2.0 g, CaCl₂ 1.0 g, pH 自然。发酵培养基 121 °C 灭菌 20 min。

1.3 方法

1.3.1 菌丝和孢子悬液的制备 斜面种子在 25 °C 培养 7 d 至白色菌丝铺满斜面。加入 5 mL 无菌水用接种环刮下斜面表面菌丝和孢子, 取出后置于三角瓶中用玻璃珠震动打碎, 使得菌丝分散均匀。

1.3.2 种子培养 菌丝和孢子悬液按照体积分数 10% 的接种量接入种子培养基 (装液量 100 mL / 500 mL), 30 °C、200 r/min 条件下摇床培养 48 h。

1.3.3 5 L 发酵罐培养 种子液以体积分数 10% 的接种量接入发酵生产培养基, 发酵罐装液量 3 L, 分别设置转速为 100, 200, 300 r/min (通气体积比 1/1); 调节通气体积比 0.5/1, 1/1, 1.5/1 (转速 200 r/min), 25 °C 培养 7 d, 测定生物量和花生四烯酸的产量。

1.3.4 菌体老化工工艺探索 高山被孢霉在最佳的发酵罐培养条件下培养 5 d, 发酵液经单层纱布过滤并用大量蒸馏水冲洗, 直到滤液澄清。用纱布把菌丝体的水分尽量挤干, 然后搓碎成直径约 2 mm 的小颗粒, 取 5 g 均匀散布在灭过菌的平皿中, 在 25 °C 下分别培养 3, 5, 7, 9 d; 最后分别在 20, 25, 30 °C 培养箱中保温 5 d。测定菌体的干质量、总脂肪酸和 ARA 含量。

1.3.5 老化工工艺的放大 把菌丝体颗粒均匀散布在 100 目、直径 30 cm 的不锈钢筛子上, 厚度约 5 mm, 于 20 °C 静置 5 d, 测定菌体的总脂肪酸和花生四烯酸含量。

1.3.6 生物量的测定 发酵结束后,用双层纱布过滤发酵液,用去离子水洗涤菌体至滤液澄清。菌丝体经冷冻干燥后测质量,老化后的菌体冷冻干燥测定干质量。

1.3.7 脂肪酸组成分析 精确称取 0.100 g 研磨成粉末的干菌体,加入到 50 mL 的离心管中,加入 4 mL 0.5 mol/L 的氢氧化钾-甲醇,65 °C 水浴保温 1 h;冷却后加入 2 mg 十七烷酸作为内标,再加入 4 mL 14 g/dL 的三氟化硼-甲醇,混匀后 65 °C 水浴保温 1 h。脂肪酸甲酯化后加入 5 mL 正己烷和 4 mL 饱和氯化钠溶液,震荡后离心分层。上层正己烷用于气相色谱分析,由脂肪酸总峰面积、花生四烯酸峰面积以及内标峰面积计算总脂肪酸和花生四烯酸相对含量。脂肪酸甲酯采用配备 FID 检测器和 EC-Wax (30 m×0.32 mm×0.25 μm) 色谱柱的气相色谱仪 GC-9160 进行分析。条件如下:载气为氮气,进样量 1 μL;进样口和检测器温度分别设定为 250 °C 和 280 °C;程序升温,柱炉初始温度 120 °C,保持 3 min,然后以 2 °C/min 升温至 160 °C,再以 4 °C/min 升温至 190 °C。

1.4 仪器与设备

YXD-LS-60 型立式压力蒸汽灭菌锅,上海沪粤明科学仪器有限公司制造;SW-CJ-1FD 超净工作台,苏州净化设备有限公司制造;LRH-250A 生化培养箱,广东省医疗器械厂制造;HYG-B 全温度摇床柜,太仓市强乐实验设备厂制造;GZX-9420 MBE 电热恒温鼓风干燥箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂制造;GC-9160 型气相色谱仪,浙大智达信息工程有限公司制造;电子天平,奥豪斯上海仪器有限公司制造。

2 结果与分析

2.1 搅拌转速对高山被孢霉生长和油脂积累的影响

高山被孢霉是好氧真菌,其正常的生长和某些代谢产物的生成需要氧气的参与。因此保证发酵体系的氧的供给是发酵控制的关键技术之一。细胞内花生四烯酸主要由脂肪酸碳链的延长和脱饱和和两类反应交替进行生成,而脱饱和反应需要氧的参与。此外,花生四烯酸是胞内产物,为了获得高产,必须保证生物量。基于两方面的需求,氧的供应更为重要,尤其对于发酵液黏度较高的液体深层发

酵,更需要考虑传质和传氧对于发酵的影响。另一方面,溶解氧过高也会对细胞有毒害作用。决定发酵罐溶氧的因素有搅拌转速、通气量、罐压、发酵液的流变学特性等。发酵罐的转速对高山被孢霉的生长和油脂的积累的影响如图 1 所示。

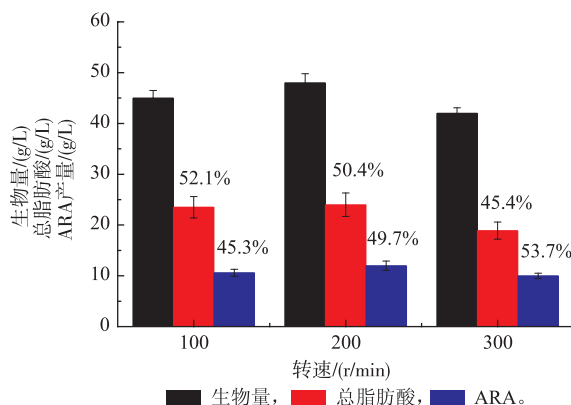


图 1 不同搅拌转速对于高山被孢霉生长、总油脂和 ARA 产量的影响

Fig. 1 Effect of different mixing speeds on biomass, total fatty acids and ARA yield

总体上,200 r/min 的搅拌速度最有利于花生四烯酸的生产,生物量和花生四烯酸产量都优于其他两组,最高生物量和 ARA 产量分别达到 48.5 g/L 和 12.1 g/L。由于发酵体系中豆粕的存在造成发酵液黏度较高,低转速不能满足细胞对传氧和传质的需求,故 100 r/min 时的生物量较低;转速过高则导致油脂积累时间缩短,细胞过早进入衰退期,过于激烈的搅拌剪切力使得部分菌丝自溶,故 300 r/min 时的生物量也较低。随着转速的提高,发酵体系的传氧和传质都改善,细胞的代谢加快,生长速度也加快。发酵罐培养时发现,300 r/min 时,只需 2 d 菌丝球密度即达到最大;低转速时生长期则达到 3 d 以上。相反,菌体的总脂肪酸含量随转速的提高下降。转速 100 r/min 培养 7 d 的高山被孢霉胞内的总脂肪酸质量达到菌体干质量的 52.1%,相应的 300 r/min 时的只有 45.4%。可见高 DO 促进细胞生长和代谢,对于积累油脂却不利。与之相反,ARA 在总脂肪酸中的质量分数呈现相反的趋势,随着转速的升高而提高,300 r/min 时达到 53.7%,比 100 r/min 时高 8.5%,可见高转速提高了 DO,因此促进其他脂肪酸向长链不饱和脂肪酸转化。综合考虑发酵的产量和经济性,选择 200 r/min 作为发酵罐最佳转速。

2.2 机械搅拌罐的通气体积比对高山被孢霉生长和油脂积累的影响

如同 2.1 所述, 供氧对于高山被孢霉发酵生产 ARA 的水平十分关键。但是由于过高的转速会造成对菌丝体的剪切破坏, 从而引起菌丝自溶; 与此同时, 提高 DO 可以增加 ARA 在总脂肪酸中的含量。为了保证供氧的同时尽量降低剪切损失, 调节通气量是最有效的方法。图 2 显示了不同通气体积比对于高山被孢霉液态发酵生产花生四烯酸的影响。

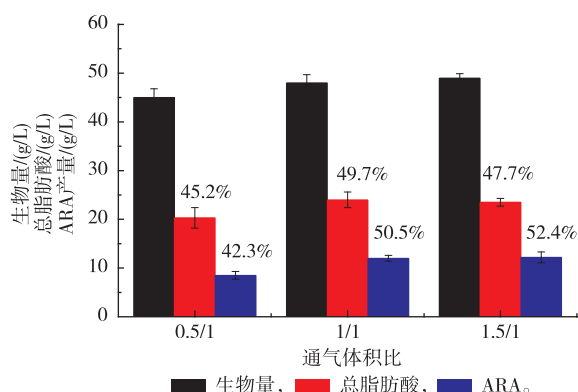


图 2 不同通气比对于高山被孢霉生长、总油脂和 ARA 产量的影响

Fig. 2 Effect of different aeration ratio on biomass, total fatty acids and ARA yield

由图可知, 通气量过小, 无法满足细胞分裂和代谢对氧的需求, 因此在通气体积比 0.5/1 时生物量、菌体的脂肪酸含量以及 ARA 含量均最低, ARA 产量只有 8.5 g/L。通气体积比 1/1 和 1.5/1 两种条件下, 高山被孢霉的发酵性能相近。前者的菌体脂肪酸含量较后者高而 ARA 含量较后者低。前者的 ARA 产量为 11.9 g/L, 稍低于后者的 12.2 g/L。由于培养基中存在高浓度的豆粕, 黏度大, 随着通气量增大, 发酵液泡沫急剧增多, 必须流加消泡剂。因此大通气量增加了消泡剂的消耗量。另一方面, 大通气量也增加了动力消耗, 并且由于泡沫多而增大了染菌的风险。综合上述, 选择 1/1 作为最佳通气体积比。

2.3 菌体的脂肪酸含量和组成在老化过程中的变化

发酵罐中通气搅拌培养 5 d 的菌体的生物量和胞内总脂肪酸含量都已经基本达到最大, 此时脂肪酸中的 ARA 相对含量尚未达到最高, 只有 40% 左右, 见图 3 中老化时间为 0 时的脂肪酸相对含量和

ARA 相对含量。在发酵罐中培养的后期主要实现了 ARA 相对含量的进一步提高, 即低不饱和度的脂肪酸向多不饱和脂肪酸转化的过程。把这个过程转移到罐外, 即培养箱中进行, 只需要保温即可, 如果可以实现相似的效果, 则无疑可以缩短发酵周期, 大大节省发酵成本, 并且促进节能减排。

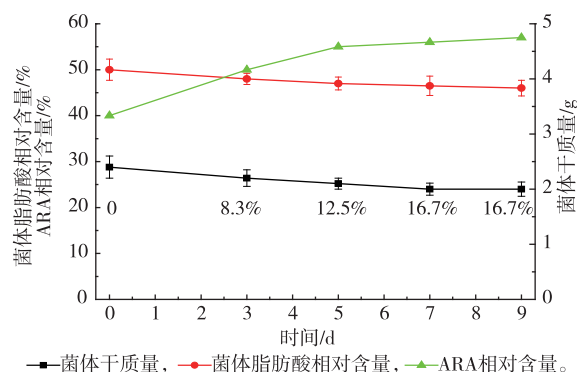


图 3 菌体干质量、总脂肪酸相对含量以及脂肪酸中 ARA 相对含量在老化过程中的变化

Fig. 3 Changes in cell dry weight, total fatty acid content and ARA content of fatty acids in the aging process

图 3 呈现了菌体干质量、总脂肪酸相对含量以及脂肪酸中 ARA 相对含量在老化过程中的变化。老化 5 d 内, 脂肪酸中 ARA 相对含量上升明显, 由初始的 40% 增加到 55%, 但是菌体干质量和总脂肪酸相对含量均略有降低。由于菌丝继续萌发生长和代谢, 失重率约 12.5%。随放置时间的延长, 菌丝体颗粒水分逐渐损失, 湿质量逐渐减小。5 d 之后水分和营养物质双重匮乏的状态下, 细胞代谢减缓, 干基失重率基本达到平衡, 维持在 16.7%。菌体的脂肪酸相对含量以及 ARA 占总脂肪酸的相对含量也基本达到稳定。5 g 湿菌体的 ARA 产量在第 5 天达到最大的 0.54 g, 比老化前的 0.48 g 提高了 12.5%。

2.4 老化温度对菌体的脂肪酸含量和组成的影响

ARA 发酵的后期, 细胞内不同脂肪酸之间的转化都是在脱饱和酶的作用下完成的。有学者报道, 温度会影响脱饱和酶的活性^[14]。此外, 多不饱和脂肪酸由于熔点低, 对于细胞在低温条件下维持细胞膜的流动性至关重要^[15-16]。因此, 低温可能更有利于 ARA 的积累。

图 4 显示了老化温度对菌体干质量、总脂肪酸

相对含量以及脂肪酸中 ARA 相对含量的影响。由图可见,随着老化温度的升高,5 d 后的菌体干质量、总脂肪酸相对含量及 ARA 相对含量均有所降低,验证了上述结论。高温下细胞代谢强度高,造成干基失重率和总脂肪酸相对含量的降低。在实验范围内,20 ℃是最佳的老化温度(在更低的温度下,菌丝发育缓慢造成老化时间延长,且 ARA 含量没有明显提高),失重率最低,总脂肪酸相对含量和 ARA 相对含量也较 25 ℃和 30 ℃时为高。5 g 湿菌体的 ARA 产量达到 0.6 g,比 25 ℃时提高了约 10%。

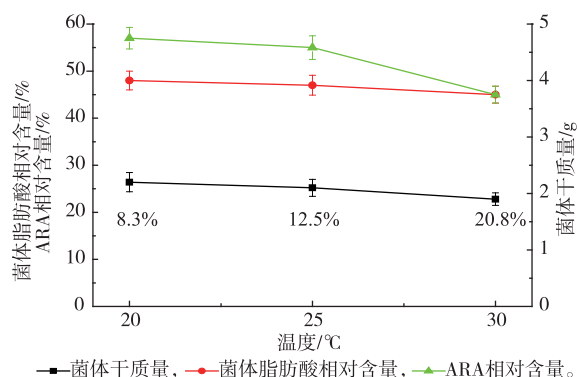


图4 老化温度对菌体干质量、总脂肪酸相对含量以及脂肪酸中 ARA 相对含量的影响

Fig. 4 Effect of temperature on cell dry weight, total fatty acid content and ARA content of fatty acids in the aging process

静置的温度决定了菌丝体的形态。如图5所示,30 ℃下经过5 d,高山被孢霉的菌丝体颗粒几乎没有改变,含水量低;25 ℃的菌丝体萌发出新菌丝,且十分密集,但是厚度较薄,也比较干燥;20 ℃下同样萌发出新的菌丝,且分散较厚,尚含有较多的水分。可见较低温利于菌丝的发育和 ARA 的积累。

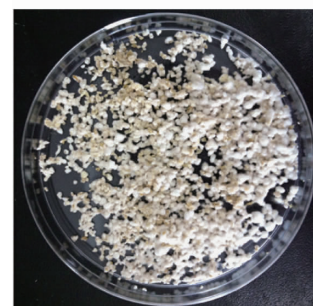
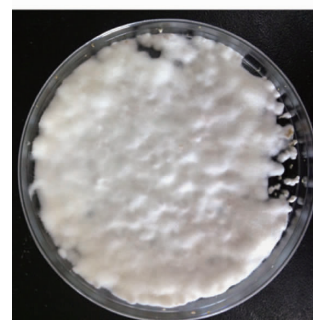
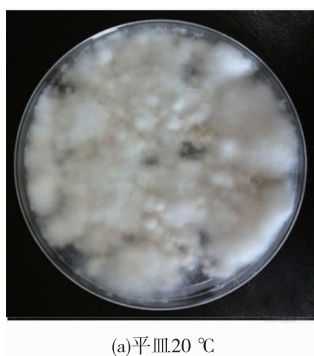


图5 高山被孢霉在不同老化条件下静置5 d的菌丝体形态
Fig. 5 Mycelium morphology of *Mortierella alpina* under different aging conditions after 5 d

2.5 老化工工艺的浅盘放大

上述的老化工艺探索都在9 cm平皿中进行,为了实现大规模应用,必须放大。使用直径30 cm的100目不锈钢筛子试验,20 ℃静置5 d,菌丝体的形态如图5(d)所示,菌丝繁茂。由于透气性优于平皿,氧的供应充足,菌丝的密度也比同温度下的平皿的高,厚度约2 cm。测得浅盘老化的菌体的脂肪酸相对含量为47.2%,脂肪酸中的ARA相对含量为56.8%,与平皿中培养时相当。干基失重率8.7%。经过换算,总体上ARA产量为11.7 g/L,稍低于发酵罐培养7 d的不经老化的产量11.9 g/L。说明老化工艺具有充分的可操作性,能够在降低成本的同时保证产量。

3 结 语

作者采取淀粉液化的方法对原料进行预处理,把廉价的基质运用到高山被孢霉产花生四烯酸的深层液态发酵。研究了 5 L 容积发酵罐的转速、通气体积比对高山被孢霉发酵生长和积累胞内油脂的

影响,得出最佳转速 200 r/min,最佳通气体积比 1/1。探索了老化温度和时间对于花生四烯酸产量的影响,得出最佳老化温度是 20℃,最佳老化时间为 5 d。在保证产量的前提下,缩短了发酵罐培养时间,降低了生产成本。

参考文献:

- [1] Bajpai P K, Bajpai P, Ward O P. Arachidonic acid production by fungi[J]. **Appl Environ Microb**, 1991, 57: 1255-1258.
- [2] Tseng C L, Wei J W. Investigation on signal transduction pathways after H-1 receptor activated by histamine in C6 glioma cells: Involvement of phosphatidylinositol and arachidonic acid metabolisms [J]. **Journal of the Chinese Medical Association**, 2012, 75: 143-150.
- [3] Tateishi N, Kakutani S, Kawashima H, et al. Dietary supplementation of arachidonic acid increases arachidonic acid and lipoxin A (4) contents in colon, but does not affect severity or prostaglandin E-2 content in murine colitis model [J]. **Lipids in Health and Disease**, 2014, 13: 1-22.
- [4] ZHANG Y, HU L X, Mori T A, et al. Urinary arachidonic acid metabolism in glucocorticoid-induced hypertension [J]. **Hypertension**, 2007, 49: 1480-1480.
- [5] Sarkis A, Roman R J. Role of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in hypertension [J]. **Curr Drug Metab**, 2004 (5): 245-256.
- [6] Capdevila J H, Falck J R, Imig J D. Roles of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenases in the control of systemic blood pressure and experimental hypertension[J]. **Kidney Int**, 2007, 72: 683-689.
- [7] Levick S P, Loch D C, Taylor S M, et al. Arachidonic acid metabolism as a potential mediator of cardiac fibrosis associated with inflammation[J]. **J Immunol**, 2007, 178: 641-646.
- [8] Margalit A, Duffin K L, Shaffer A F, et al. Altered arachidonic acid metabolism in urate crystal induced inflammation[J]. **Inflammation**, 1997, 21: 205-222.
- [9] Samuelsson B. Arachidonic-Acid Metabolism-Role in Inflammation[J]. **Z Rheumatol**, 1991, 50: 3-6.
- [10] Goldyne M E, Rea L, Hanley K, et al. Child Syndrome-Distribution of esterified Arachidonic-Acid is significantly altered in involved skin fibroblasts[J]. **Clinical Research**, 1991, 39: A486-A486.
- [11] Barr R M, Lawlor F, Judge M R, et al. Platelet-Activating-Factor, Lyso-Platelet-Activating-Factor and Arachidonic-Acid release in normal human skin and the influence of topical steroid treatment[J]. **Brit J Clin Pharmacol**, 1993, 35: 637-641.
- [12] Shinmen Y, Shimizu S, Akimoto K, et al. Production of arachidonic acid by *Mortierella fungi*[J]. **Appl Microbiol Biot**, 1989, 31: 11-16.
- [13] JIN M J, HUANG H, XIAO A H, et al. Enhancing arachidonic acid production by *Mortierella alpina* ME-1 using improved mycelium aging technology[J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2009, 32: 117-122.
- [14] Kaewsuwan S, Cahoon E B, Perroud P F, et al. Identification and functional characterization of the moss *Physcomitrella patens* Delta (5)-desaturase gene involved in arachidonic and eicosapentaenoic acid biosynthesis [J]. **J Biol Chem**, 2006, 281: 21988-21997.
- [15] LIANG Y, ZHAO X, Strait M, et al. Use of Dry-Milling derived thin stillage for producing eicosapentaenoic acid (EPA) by the fungus *Pythium irregulare*[J]. **Bioresource Technol**, 2012, 111: 404-409.
- [16] Bigogno C, Khozin-Goldberg I, Boussiba S, et al. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid[J]. **Phytochemistry**, 2002, 60: 497-503.