

高山被孢霉发酵生产花生四烯酸的优化

曹刚刚¹, 管政兵², 廖祥儒¹, 蔡宇杰^{*1}

(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: 研究了高山被孢霉液态发酵产花生四烯酸过程中主要底物和培养条件对花生四烯酸产量的影响。采用单因素和正交试验设计优化了碳源、氮源、无机盐的种类及浓度, 找出了最佳的培养温度和变温策略。试验结果显示最佳碳源和氮源及浓度是: 玉米粉 66 g/L, 豆粕粉 54 g/L; 最佳无机盐配方是: KH_2PO_4 3 g/L, MgSO_4 1 g/L, Na_2SO_4 2 g/L。采取逐级变温培养: 30 °C(3 d), 25 °C(4 d), 20 °C(4 d)。优化后生物量和花生四烯酸产量分别达到 52.3 和 13.6 g/L。

关键词: 谷物粗粉; 碳氮比; 变温策略; 无机盐; 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)01—0101—06

Optimization for the Production of Arachidonic Acid from *Mortierella alpina*

CAO Ganggang¹, GUAN Zhengbing², LIAO Xiangru¹, CAI Yujie^{*1}

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

Abstract: Single factor and orthogonal experiments were applied to investigate effects of different nutrients and conditions on the fermentation of arachidonic acid by *M. alpina*. Results indicated that corn and soybean meal were preferred for fungal growth and lipid accumulation. With a temperature-shift strategy the fermentation time was shortened two days. Arachidonic acid reached the maximum yield (13.6 g/L) when the medium was comprised of 66 g/L corn meal, 54 g/L soybean meal, 3 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L MgSO_4 and 2 g/L Na_2SO_4 .

Keywords: raw crop materials, C/N ratio, temperature-shift strategy, arachidonic acid, *Mortierella alpina*

花生四烯酸即全顺式 Δ -5,8,11,14-二十碳四烯酸, 缩写为 ARA。ARA 是重要的人体生长发育必需的三大脂肪酸之一, 在维持人体的健康和正常的生长发育中扮演重要的角色。作为多不饱和脂肪酸家族的重要一员, ARA 是 ω -6 系列脂肪酸的代谢枢纽。ARA 主要在以下两个方面发挥它的生理功能: (1) 结构组分。ARA 是膜磷脂的组分之一, 对于

细胞的生长和分裂不可或缺。另外, 其在人脑和视网膜等特殊结构中含量很高, 对于智力和视力发育至关重要^[1]; (2) 调节功能。ARA 能被人体吸收并转化为多种二十碳衍生物, 其中包括多种代谢调节物质, 比如前列腺素、白细胞三烯和凝血噁烷等^[2], 对于维持人体的内稳态具有重要作用^[3]。另外, 近年来的研究发现, ARA 与信号传导和癌症的发生也有较

收稿日期: 2014-08-21

* 通信作者: 蔡宇杰(1973—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物工程研究。E-mail: yjcai@jiangnan.edu.cn

为密切的关系^[4-5]。目前,ARA 在食品、水产养殖、医药和化妆品等领域都得到了广泛的应用^[6-8]。

ARA 的传统来源主要是植物草籽、动物肝脏和猪肾上腺等。但是这些来源一方面 ARA 含量很低,资源少,提取成本高昂,而且产量远远达不到市场需求。近年来实现的微生物发酵生产,相对而言优势明显:ARA 含量高,大大降低了提取成本;发酵周期短,产量高;生产可操作性强,不受季节、气候影响等^[1,9]。

目前利用高山被孢霉已经实现了 ARA 的商业化生产,主要底物是葡萄糖、酵母粉等^[10-11],生产成本仍然较高,作者探索玉米和豆粕等生物质原料经生物转化发酵生产 ARA,并在此基础上优化培养条件以期进一步提高转化率和产量。

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; 种子培养基: 玉米粉 40 g/L, pH 自然; 发酵初始培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母粉 5, KH_2PO_4 3, MgSO_4 0.5, Na_2SO_4 1, CaCl_2 0.5, pH 自然。以上培养基均经过 115 °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打碎, 使得菌丝分散均匀。然后接入种子培养基。

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, 30 °C、200 r/min 条件下培养 36 h。

1.3.3 摇瓶培养 种子液以体积分数 10% 的接种量接入发酵生产培养基, 200 r/min 培养 7 d。

1.3.4 碳源和氮源优化 分别以葡萄糖和酵母粉为碳源和氮源, 研究不同氮源和碳源对菌丝生长和 ARA 产量的影响。

1.3.5 4 种无机盐质量浓度的优化 玉米粉和豆粕粉作为碳源和氮源, 按表 1 设计 4 因素三水平正交试验。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交优化设计因素水平表

Table 1 Orthogonal design

水平	质量浓度/(g/L)			
	A (KH_2PO_4)	B (Na_2SO_4)	C (MgSO_4)	D (CaCl_2)
1	0	0	0	0
2	3	1	0.5	0.5
3	6	2	1	1

1.3.6 最佳培养温度的确定 发酵培养基接种后分别在 20、25、30 °C 和分步降温条件下培养 13 d, 并且每隔 2 d 测定生物量、总油脂和油脂组成。

1.3.7 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。菌体 70 °C 烘干至恒重。

1.3.8 胞内油脂提取 烘干后的菌体用研钵研磨成粉末, 取 0.5 g 置于 50 mL 离心管中, 加入 2 mL 去离子水和 1.5 mL 浓盐酸, 密封后 80 °C 水浴消化 1 h。细胞经消化裂解后用 6 mL v (氯仿): v (甲醇)=2:1, 分 3 次提取油脂。合并每次的氯仿抽提液, 烘干挥发除去溶剂, 称重得油脂质量。

1.3.9 脂肪酸组成分析 取 50 μL 粗油脂加入 50 mL 离心管中, 以 2 mg 十九烷酸作为内标, 混合后加入 2 mL 0.5 mol/L 氢氧化钾甲醇溶液, 70 °C 水浴保温 0.5 h; 冷却后再加入 2 mL 体积分数 14% 三氟化硼甲醇溶液, 70 °C 水浴保温 0.5 h。脂肪酸甲酯化后加入 6 mL 正己烷和 3 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检测。

脂肪酸甲酯采用配备 FID 检测器和 EC-Wax (30 m \times 0.32 mm \times 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 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。

2 结果与分析

2.1 不同碳源的比较

碳源是影响微生物生长和产物形成最重要的因素之一。用于构成细胞和代谢产物的碳链支架。高山被孢霉胞内油脂的主要存在形式是甘油三酯^[12-13], 主要元素即为碳。因此, 要获得生物量和油脂的高产就必须找到对生长和油脂积累最佳的碳源种类, 并且供应量必须充足。

图1显示了使用不同碳源时的生物量、总油脂和ARA的产量。由图可见,淀粉作为碳源时最有利于菌体的生长,以可溶性淀粉和玉米粉作为碳源时的生物量远高于其它碳源。由于油脂是胞内产物,使用这两种碳源也就得到了相对较高的总油脂和ARA产量。之前,国内外的相关研究普遍指出葡萄糖是高山被孢霉生长和产油的最佳碳源^[11,14],区别可能源于使用的菌株不同。另外,玉米磨粉直接用于高山被孢霉液态发酵生产ARA还没有专门报道。由作者的研究结果可见,使用玉米粉作为碳源不仅可以大幅度降低原料成本,同时还可以获得更高的产量。最高的生物量和ARA产量分别达到10.34、1.86 g/L,接近葡萄糖做碳源时的3倍。

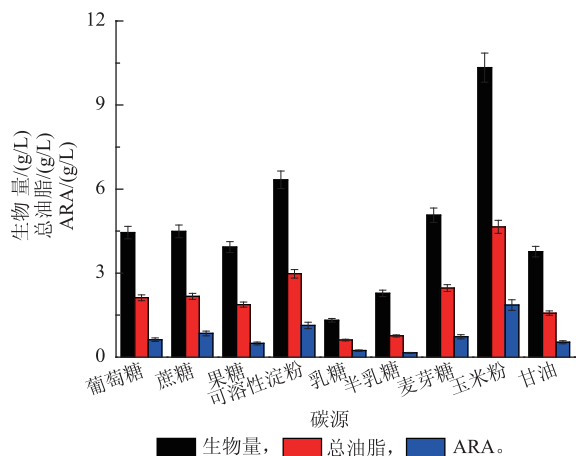


图1 不同碳源对于生长、总油脂和ARA产量的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources on biomass, total lipids and ARA yield

2.2 不同氮源的比较

氮源是又一决定产量的因素。作为氮源的营养物质主要为发酵体系提供氮元素。虽然氮并不直接参与ARA的元素组成,但是对于形成细胞成分的蛋白质及催化合成代谢产物的酶必不可少,因此间接影响了ARA产量。因为高生物量是高产的关键,因此,与碳源的优化相似,优良的氮源必须易于被菌体吸收同化并促进生长。

图2显示了不同氮源对于高山被孢霉生物量、总油脂和ARA产量的影响。总体上,高山被孢霉难于利用无机氮源而易于利用有机氮源。无机态氮作为唯一氮源时的生物量普遍极低,而有机氮源相反,尤其是豆粕粉,生物量达到14.45 g/L,相应的ARA产量达到了3.18 g/L。之前的研究者普遍报道酵母粉是ARA生产的最佳氮源^[10,15]。作者的研究结

果显示高山被孢霉对于豆粕粉具有优良的利用能力。另外,豆粕本身油脂含量较高,能被细胞作为碳源利用,也可以作为多不饱和脂肪酸合成的前体^[16]。因此,豆粕作为氮源时菌体的总油脂含量较其他有机氮源为高。

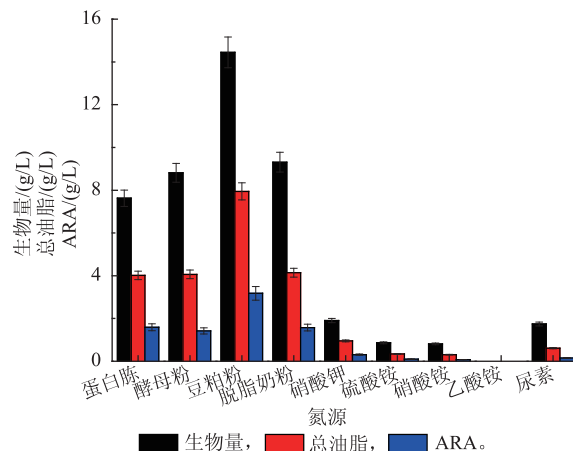


图2 不同氮源对于生长、总油脂和ARA产量的影响

Fig. 2 Effect of different nitrogen sources on biomass, total lipids and ARA yield

2.3 无机盐的正交优化

KH_2PO_4 , MgSO_4 , Na_2SO_4 , CaCl_2 是已报道的对高山被孢霉发酵产ARA产量影响较大的4种无机盐^[17]。由于采用玉米粉和豆粕粉作为碳源和氮源,本身已经含有丰富的微量元素和生长因子,因此只选择以上几种优化浓度以提供充足的K、Na、Mg、Ca、P、S等元素。正交试验设计及结果见表2。

由表所示极差计算结果可知各因素对于ARA的产量影响大小依次为 $\text{CaCl}_2 > \text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{MgSO}_4$ 。最佳组合为 $\text{A}_2\text{B}_3\text{C}_3\text{D}_1$,最佳的无机盐添加配方为 (g/L): KH_2PO_4 3, Na_2SO_4 2, MgSO_4 1。其中 MgSO_4 和 Na_2SO_4 质量浓度均是初始培养基的两倍。在最佳添加量时ARA的产量比优化前有了较大幅度的提高。

2.4 碳氮质量比的优化

Koike等^[18]研究表明,碳氮质量比对于菌体的油脂含量影响明显。低碳氮质量比时,氮源相对丰富,更有利于菌体的生长,此时菌体的总油脂质量浓度则相对偏低;反之,氮源相对匮乏,更有利于菌体的油脂积累,此时的生物量则相对偏低。为了获得较高的ARA产量,需要找到最佳的碳氮质量比,使得生物量和油脂质量浓度得以平衡,从而获得较高的总油脂产量。

表 2 无机盐优化 $L_9(3^4)$ 正交实验数据和结果

Table 2 Data and results of orthogonal design for optimization of mineral addition

试验号	质量浓度/(g/L)				
	A (KH_2PO_4)	B (Na_2SO_4)	C (MgSO_4)	D (CaCl_2)	AA
1	1	1	1	1	3.5367
2	1	2	2	2	3.0517
3	1	3	3	3	2.6349
4	2	1	2	3	1.8684
5	2	2	3	1	5.0498
6	2	3	1	2	4.6258
7	3	1	3	2	2.9068
8	3	2	1	3	1.7551
9	3	3	2	1	3.7547
K_1	3.074	2.771	3.306	4.114	
K_2	3.848	3.286	2.892	3.528	
K_3	2.806	3.672	3.530	2.086	
R	1.042	0.901	0.638	2.028	

图 3 显示了碳氮质量比在 13~28 范围时生物量、菌体的油脂质量浓度和油脂中 ARA 质量浓度随碳氮质量比改变的变化趋势。随碳氮质量比的升高,生物量逐渐减少;菌体的油脂质量浓度逐渐增大;而油脂中的 ARA 质量浓度则先升高后降低,在 19 时达到最大,达到 34 g/dL。可见作者的研究结果与先前的报道相符。最佳碳氮质量比下 ARA 产量比初始碳氮质量比 13 时提高了 17%。

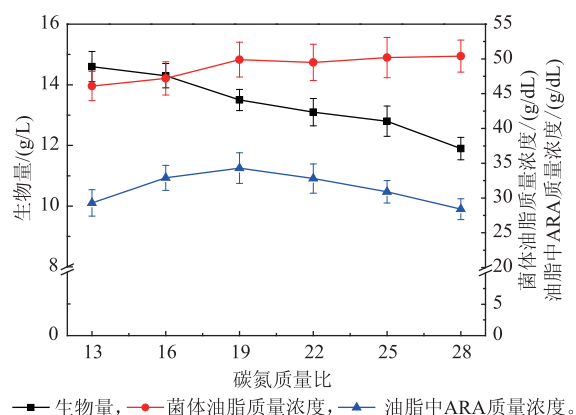


图 3 碳氮质量比对生物量、菌体的油脂质量浓度以及油脂中 ARA 质量浓度的影响

Fig. 3 Effect of C/N ratio on biomass yield, lipids and ARA content

在以上优化的基础上,把碳源和氮源质量浓度

均提高 3 倍,在同样的发酵时间和发酵条件下,生物量、总油脂和 ARA 产量分别达到 45.1、21.8、8.7 g/L。

2.5 温度对生长及 ARA 产量的影响

温度从多个方面影响 ARA 的生产效率。温度偏低,菌体生长和分裂缓慢,造成迟滞期和对数期延长,延长了发酵周期,但是 ARA 含量高;温度偏高,虽然可以快速进入稳定期,但是 ARA 含量减少。因为在低温条件下菌体需要合成更多的多不饱和脂肪酸以维持细胞膜的流动性^[9]。

不同温度下生物量、总油脂和 ARA 产量列于表 3 中。随着温度的升高,达到稳定期所需的时间缩短。20 °C 时,第 7 天生物量才达到最大值;而在 30 °C 时只需要 3 天生物量即达到最大值。但是,较低的温度能得到更高的生物量(图 4)。不同温度下菌体的油脂含量差别相对较小。油脂中 ARA 质量浓度也取决于温度,20 °C、13 d 时,ARA 达到了总油脂的 57%,比 30 °C 时高了 17%。总体上,20 °C 时 ARA 产量最高,发酵 13 d 达到 13.4 g/L。但是过长的发酵时间降低了生产效率。为了缩短发酵周期,采取逐级降温的策略。如图 4 所示,即 30 °C 培养 3 d,降温到 25 °C 培养 4 d,最后降温到 20 °C 再培养 4 d。此时的生物量和 ARA 的产量达到了 20 °C 的水平,发酵时间缩短了 2 d,提高了经济效益。变温培养时的生物量、总油脂和 ARA 产量随时间的变化列于表 3 中。

表 3 延长发酵时间时不同温度及变温条件下的生物量、总油脂和 ARA 产量比较

Table 3 Culture profiles of *M. alpina* grown at constant and stepwise temperature decreasing strategy associated with prolonged incubation time

温度/℃	产量/(g/L)	时间/d					
		3	5	7	9	11	13
20	生物量	34.6±0.7	46.9±1.5	50.2±1.3	50.4±2.3	50.1±0.9	49.7±0.6
	总油脂	13.8±0.3	21.1±0.6	25.7±0.8	25.4±0.5	24.6±0.5	23.5±0.4
	ARA	5.5±0.1	9.5±0.3	11.8±0.5	12.1±0.2	12.7±0.4	13.4±0.5
25	生物量	40.5±1.7	48.7±0.9	48.8±1.3	48.5±1.2	47.4±0.9	45.2±0.4
	总油脂	16.2±0.3	24.3±1.1	24.6±1.6	24.2±1.7	23.5±0.5	22.4±0.9
	ARA	4.8±0.2	9.7±0.3	11.1±0.5	12.1±0.9	11.8±0.7	11.5±0.8
30	生物量	44.9±1.2	45.3±1.2	45.1±1.4	44.8±1.3	43.7±0.7	42.9±0.8
	总油脂	18.7±0.5	22.2±0.7	21.8±0.3	21.3±0.8	20.3±0.5	18.6±0.4
	ARA	5.6±0.2	7.8±0.4	8.7±0.9	8.5±0.7	8.1±0.4	7.44±0.5
变温培养 ^a	生物量	45.3±0.8	48.4±1.3	52.5±2.1	52.7±1.8	52.3±1.5	51.8±1.7
	总油脂	18.5±0.2	25.2±0.7	27.1±0.9	28.2±0.4	27.4±0.8	24.8±0.9
	ARA	5.5±0.6	8.5±0.9	11.8±0.4	12.5±0.9	13.6±0.7	13.2±0.8

a 变温策略为:30℃培养3d,25℃培养4d,最后在20℃培养4d。

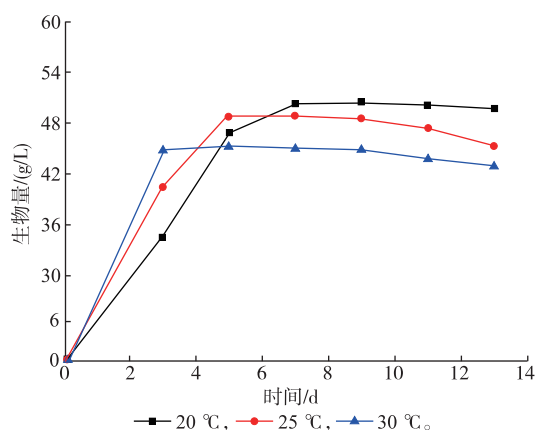


图 4 不同温度下生物量随时间的变化

Fig. 4 Time courses of *M. alpina* under different temperatures

3 结语

作者通过优化高山被孢霉发酵产花生四烯酸的培养基组分和培养条件,发现碳源、氮源、无机盐和温度都对产量有重要影响。前两者主要影响生物量,温度则影响生物量和总油脂中的 ARA 产量。研究得出培养基最佳组成为:玉米粉 66 g/L,豆粕粉 54 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, MgSO₄ 1 g/L, Na₂SO₄ 2 g/L。采用玉米粉和豆粕粉等作为原料,可降低生产成本,变温培养可以在不减少产量的同时缩短发酵时间。

参考文献:

[1] Ratledge C. Single cell oils—have they a biotechnological future?[J]. **Trends in Biotechnology**, 1993, 11:278-284.

[2] Marx J L. The leukotrienes in allergy and inflammation[J]. **Science**, 1982, 215: 1380-1383.

[3] Carlson S E, Koletzko B, Gibson R A. PUFA in infant nutrition; consensus and controversies[J]. **Lipids**, 1999, 34: 129-130.

[4] Rodríguez-Blanco G, Burgers P C, Dekker L J, et al. Serum levels of arachidonic acid metabolites change during prostate cancer progression[J]. **The Prostate**, 2014,

[5] Wen Z, Su Y, Lai P, et al. Critical role of arachidonic acid-activated mTOR signaling in breast carcinogenesis and angiogenesis [J]. **Oncogene**, 2013, 32: 160-170.

[6] Ward O P, Singh A. Omega-3/6 fatty acids; alternative sources of production[J]. **Process Biochemistry**, 2005, 40: 3627-3652.

[7] Dyal S D, Narine S S. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids[J]. **Food Research International**, 2005, 38: 445-467.

[8] Dedyukhina E, Chistyakova T, Vainshtein M. Biosynthesis of arachidonic acid by micromycetes (review) [J]. **Applied**

- Biochemistry and Microbiology**, 2011, 47: 109-117.
- [9] Radwan S S. Sources of C20-polyunsaturated fatty acids for biotechnological use[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1991, 35: 421-430.
- [10] Bajpai P K, Bajpai P, Ward O P. Arachidonic acid production by fungi [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1991, 57: 1255-1258.
- [11] Higashiyama K, Fujikawa S, Park E, et al. Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi[J]. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 2002, 7: 252-262.
- [12] Higashiyama K, Yaguchi T, Akimoto K, et al. Enhancement of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4 [J]. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 1998, 75: 1501-1505.
- [13] Shimizu A. Production of functional lipids by microorganisms[J]. **Bioscience & Industry**, 2004, 62: 11-16.
- [14] Shinmen Y, Shimizu S, Akimoto K, et al. Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1989, 31: 11-16.
- [15] Chen H, Chang C, Chen C. Optimization of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* Wuji-H4 isolate[J]. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 1997, 74: 569-578.
- [16] Aki T, Nagahata Y, Ishihara K, et al. Production of arachidonic acid by filamentous fungus, *Mortierella alliacea* strain YN-15[J]. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 2001, 78: 599-604.
- [17] Higashiyama K, Yaguchi T, Akimoto K, et al. Effects of mineral addition on the growth morphology of and arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4[J]. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 1998, 75: 1815-1819.
- [18] Koike Y, Jie Cai H, Higashiyama K, et al. Effect of consumed carbon to nitrogen ratio of mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina*[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2001, 91: 382-389.
- [19] 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 Technology**, 2012, 111: 404-409.

科 技 信 息

欧洲食品安全局提供欧洲综合食品消费数据库查询

2015年12月10日,据欧洲食品安全局(EFSA)网站消息,欧洲食品安全局提供欧洲综合食品消费数据库查询,将新数据库中资源向所有人开放。

综合食品消费数据库是欧盟范围内有关食品消费的信息资源库。它的具体数据来源于许多欧盟国家。该数据库在风险评估方面扮演了重要角色。

EFSA采用风险评估方法,将化学污染物和食品消费方面的数据输入到新的欧洲综合食品消费数据库中。

[信息来源]厦门WTO工作站. 欧洲食品安全局提供欧洲综合食品消费数据库查询 [EB/OL]. (2015-12-14). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=50391>

美国FDA就“天然”食品标识征求意见

据美国FDA消息,美国FDA发布通告,将“天然”食品标识征求意见的截止日期延长至2016年5月10日。

美国FDA表示,有团体向其申请,要求禁止“天然”词汇用于食品标识,还有团体认为转基因食品或者含果葡糖浆的食品也可标注“天然”。

有关团体和个人可就以下提出意见:

给“天然”下定义是否合理;如果合理,应该怎样界定“天然”;机构如何界定食品标识合理使用“天然”。

[信息来源]食品伙伴网. 美国FDA就“天然”食品标识征求意见 [EB/OL]. (2015-12-25). <http://news.foodmate.net/2015/12/345874.html>