

高大毛霉发酵产  $\gamma$ -亚麻酸的初步研究\*

章银良

( 郑州轻工业学院食品与生物工程系 郑州 450002 )

**摘 要** 对采用高大毛霉进行微生物发酵生产  $\gamma$ -亚麻酸作了初步探索。主要对培养基组成(碳源、氮源、碳氮比、无机盐、最适氮源浓度进行了均匀试验设计,同时对培养条件( pH 值、通气量)进行了实验。优化了发酵培养基组成( g/L ):淀粉 185.6、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.7、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2、蛋白胨 0.1、酵母浸粉 0.2。较适的 pH 值是 5.5 装液量 30%。结果表明  $\gamma$ -亚麻酸含量可高达 30% 以上,与传统菌种相比具有广泛的应用前景。

**关键词**  $\gamma$ -亚麻酸 高大毛霉(*Mucor mucedo*) 发酵 均匀试验

在过去 20 年中,人们越来越多地意识到多不饱和脂肪酸( polyunsaturated fatty acids, PUFAs )的缺乏与某些疾病有关,除了其潜在的制药应用外,PUFAs 在食物源中的存在和公众对健康食品的重视,使这些化合物引起消费者的广泛关注。特别是含有 3 个或多个非共轭顺式双键的 C18 ~ C22 PUFAs 因潜在的治疗学和营养学等方面的作用而引起研究者的极大兴趣<sup>[1]</sup>。 $\gamma$ -亚麻酸( GLA )是其中最为突出的一个代表。其直接来源是天然植物月见草籽,但因受产地、产量、成本高的影响而不能满足社会的需要。微生物特别是藻类、真菌能合成  $\gamma$ -亚麻酸并能在工业规模上培育而被视为有开发价值的生物资源,因此利用微生物生产 PUFAs 成为近年来国内外的研究热点。

在已报道的微生物发酵生产中,发酵用微生物菌种主要有被孢霉<sup>[2~5]</sup>,雅枝致霉<sup>[6]</sup>,雅致小克银汉霉<sup>[7~10]</sup>,微小毛霉<sup>[11]</sup>等,而未见有用高大毛霉作菌种进行的研究,因此笔者通过对高大毛霉的培养基和培养条件的优化来提高生产  $\gamma$ -亚麻酸的能力,为微生物工业化生产提供更多的选择。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌 种

高大毛霉(*Mucor mucedo*) 3.3438 购于中国科学院微生物研究所菌种室。

### 1.2 培养基组成和基本培养方法

(1)斜面培养基( g/L ):葡萄糖 20,酵母浸粉 4,蛋白胨 7,琼脂 20,培养方法:28℃;恒温培养 48 h。

(2)种子培养基( g/L ):葡萄糖 5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,NaCl 0.1,蛋白胨 1.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.005, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.01,0.01。培养方法:28℃,恒温摇床培养(150 r/min),24 h。

(3)最初发酵培养基( g/L ):葡萄糖 100, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,NaAc 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3,蛋白胨 0.1,酵母浸粉 0.2。培养方法:28℃ 恒温摇床培养(150 min/r)4 d。

### 1.3 分析方法

(1)菌体细胞浓度的测定:干重法。

(2)油脂提取 酸热法。发酵结束后,发酵液离心,收集菌体。菌体沉淀按每克菌体加 5 mL 浓度为 4 mol/L 的 HCl 混匀,室温下放置 1 h,然后沸水煮沸 3 min,置冰室速冷,

作者:工学硕士,讲师。

\* 省教育厅科技攻关项目和学院基金项目( No.200123 )

收稿时间:2002-09-05 改回时间:2003-02-27

然后加入 1 倍体积四氯化碳-甲醇(体积比 1:1)提取液,充分振荡后,4 000 r/min 离心,取四氯化碳层,挥发除去四氯化碳后得油脂。

(3) 葡萄糖 3,5-二硝基水杨酸法。

(4) 氮源 靛定酚蓝比色法。

(5)  $\gamma$ -亚麻酸分析:气相色谱法。取油脂 0.2 g 加入皂化液(0.5 mol/L KOH-甲醇) 2 mL 混匀,于 60℃ 水浴皂化至油珠消失,然后冷却,加入甲酯化液(14% 三氟化硼-甲醇) 2 mL,于 60℃ 水浴甲酯化 30 min,冷却后加热正己烷 1 mL,饱和 NaCl 溶液 1 mL,离心后取上清液,即可用气相色谱仪分析油脂组成。仪器和工作条件:用 GC-950 型气相色谱仪分析油脂组成;10% DEGS(乙二酸二乙二醇聚酯)和 Chromosorb W(AW-DMCS, 60-80 目)不锈钢柱,柱长 2 m,内径 3 mm,检测器为氢火焰离子化检测器,柱温 170℃,室温 220℃,检测器温度 270℃。

## 2 结果与讨论

### 2.1 优化前的代谢曲线

从菌种的初步代谢曲线(见图 1)可以看出,高大毛霉在 72 h 后处于对数生长期后期,96 h 基本达到稳定期,此时,生物量达到最大。在前 30 h,碳源消耗迅速,此时菌体生长迅速。在 30~60 h,氮源消耗迅速,此时胞内物质大量合成。由于脂肪酸属于初级代谢产物,一般在对数生长期合成,所以发酵时间以 96 h 为宜。

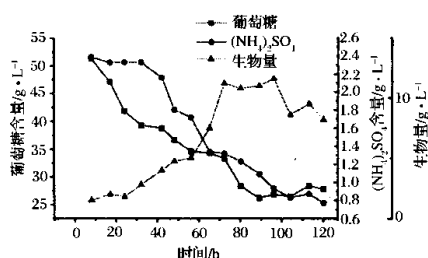


图 1 高大毛霉初步代谢曲线

### 2.2 不同碳源对 GLA 积累的影响

在最初发酵培养基组成的基础上,选用不同的碳源(葡萄糖、蔗糖、淀粉),取相同的碳原子摩尔数来对它们影响 GLA 的合成进行分析,发酵培养 96 h 后取样分析结果见图 2。

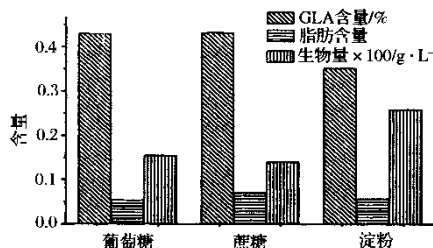


图 2 碳源对 GLA 积累的影响

虽然碳原子摩尔数相同,但合成 GLA 的能力不同。以蔗糖为碳源,油脂含量和 GLA 的含量均最高,但生物量最少;淀粉虽然 GLA 的含量偏低,但生物量很大,综合 3 方面的因素,再考虑淀粉来源丰富,价格低廉,碳源以淀粉为优。淀粉优于葡萄糖的原因可能是,GLA 的合成需要大量的碳源,而且一般在对数生长期合成,葡萄糖作为碳源往往消耗迅速,大部分用于菌体生长,而淀粉属于多糖,消耗缓慢,能够为 GLA 的合成提供大量碳源。综上所述,以淀粉作为碳源。

### 2.3 不同氮源对 GLA 合成的影响

根据不同氮源((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、KNO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>Ac、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>),观察它们影响 GLA 的合成情况,发酵培养 96 h 后取样分析,结果见图 3。

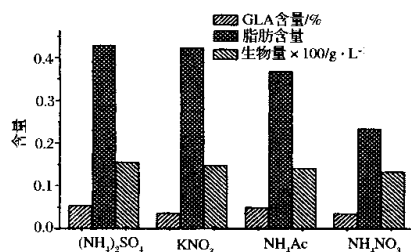


图 3 氮源对 GLA 积累的影响

虽然氮原子摩尔数相同,但合成 GLA 的

能力却不相同。无论是生物量、油脂含量,还是 GLA 的含量,均是硫酸铵最好。所以氮源选择硫酸铵。

## 2.4 碳源、氮源、无机盐离子浓度对 GLA 积累的影响

不同的碳源、氮源浓度及无机盐离子的

种类和浓度影响菌体的生长代谢以及菌体对营养成分的利用率,进而影响到菌体生物量和积累 GLA。为了考察这几种因素对 GLA 积累的影响,进行均匀试验,结果见表 1。

均匀试验数据由 Mathematical 2.2 软件

处理分析由表 1 可知,各种因素对油脂和

表 1 碳源、氮源、无机盐离子浓度对 GLA 积累影响的均匀试验结果

水平数	因 素					生物量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (a)	脂肪/% (b)	GLA/% (c)	$a \times b \times c$
	碳源 $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	氮源 $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$				
1	60	10	10	8	2	6.69	5.91	27.33	0.108
2	80	30	20	6	1.6	9.23	3.95	11.04	0.04
3	100	60	8	4	1.4	11.06	3.68	21.87	0.089
4	120	90	16	0	1.2	16.10	3.5	22.07	0.124
5	140	5	4	10	1	19.44	6.95	19.71	0.266
6	160	15	14	7	0.8	19.66	4.94	17.66	0.172
7	180	45	0	5	0.4	23.42	6.59	15.63	0.241
8	200	75	12	2	0	26.8	3.81	18.47	0.186

GLA 的积累的影响不同。影响最大的是  $\text{Fe}^{2+}$  的浓度,其次是氮源浓度,就脂肪含量和 GLA 含量而言, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  的较适浓度是  $10 \text{ mg/L}$ 。

## 2.5 C/N 对 GLA 合成的影响

C/N 是影响毛霉生长和油脂合成的主要因素,合适的 C/N 一方面有利于提高生物

量,另一方面有利于提高油脂含量,以求得到合适的 C/N。

均匀试验数据由 Mathematical 2.2 软件处理,由结果(表 2)可知,氮源的浓度对 GLA 的合成影响比碳源的浓度大。根据处理过程,可得最适氮源浓度是  $2.7 \text{ g/L}$ ,最适碳源浓度是  $185.6 \text{ g/L}$ ,C/N 是 68.7。

表 2 C/N 对 GLA 合成影响的均匀试验结果

水平数	因 素			GLA 含量/% (c)	$a \times b \times c$
	氮源 $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	碳源 $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	生物量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (a)	油脂含量/% (b)	
1	1	20	8.82	10.93	0.340
2	2	80	16.61	5.06	0.299
3	3	150	23.2	5.75	0.479
4	8	10	4.24	3.04	0.028
5	10	30	9.69	4.41	0.104
6	15	100	10.48	5.45	0.183

## 2.6 pH 值、装液量对 GLA 产量的影响

不同的菌种生长的最适 pH 值往往不同,考查不同 pH 值条件下高大毛霉的生长情况,有利于选择出适合高大毛霉生长的最适 pH 值,高大毛霉属于好氧菌,通过不同的装液量( $500 \text{ mL}$  三角瓶),可以考查不同的供氧量对高大毛霉生长的影响。试验通过均

匀试验,来考查这 2 个因素的影响。

由均匀试验结果和数据处理结果(表 3)可知,第 4 组的产量最高,测得其油脂含量为 5.5%,油脂中  $\gamma$ -亚麻酸含量为 31.21%,所以比较合适的 pH 值可取 5.5,装液量可取 30%。

表3 pH值、装液量对GLA产量影响的均匀试验结果

水平数	因 素		
	pH 值	装液量 /%	生物量 /g·L <sup>-1</sup>
1	2.0	20	3.86
2	3.5	40	5.51
3	4.5	10	6.52
4	5.5	30	31.59
5	7.5	60	9.62

### 3 结 论

(1) 高大毛霉在无机盐-淀粉培养基上生长良好。生长4d后,处于稳定期,随后出现菌体自溶现象。

(2) 在碳源选择中,淀粉综合效果最好;在氮源选择中,硫酸铵效果最好。C/N和氮源浓度对油脂合成影响较大,适合的C/N在60/1~70/1之间。

无机盐影响高大毛霉的生长和GLA的合成,其中Fe<sup>2+</sup>影响最大。

(3) pH值和装液量也影响菌体生长和油脂合成,较适的pH值是5.5,装液量为30%。

(4) 优化的发酵培养基组成(g/L):淀粉185.6,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.7,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,NaAc

5,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3,蛋白胨 0.1,酵母浸粉 0.2,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.005,MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.01。

(5) 高大毛霉发酵产γ-亚麻酸的含量可以达到30%以上,与传统菌种相比具有广泛的应用前景。

### 参 考 文 献

- 1 张志群,王 兰,姜莉青等. 沈阳药科大学学报, 1997,14(2):99~102
- 2 赵人俊,严 虹,郑幼霞. 生物工程学报,1995,11(4):361~369
- 3 李植峰,张 玲,赖炳森等. 氨基酸和生物资源, 2001,23(3):17~20
- 4 张道海,未 名,陆文华等. 生物技术,1995,5(1):27~29
- 5 关洁雯,林炜铁,姚汝华. 食品与发酵工业, 1998,24(5):18~20
- 6 张 玲,李植峰,赖炳森等. 中国生化药物杂志, 2000,21(6):277~299
- 7 李艳明,安家彦,宋建国等. 大连轻工业学院学报,2000,19(4):277~280
- 8 Hung-Chang Chen, Chi-Chia Chang. Biotechnol Prog,1996,12:338~341
- 9 Hung-Chang Chen, Tse-Ming Liu. Enzyme and Microbial Technology,1997,21:137~142
- 10 Elena V Emelyanova. Process Biochemistry, 1996,31(5):431~434
- 11 Elena V Emelyanova. Process Biochemistry, 1997,32(3):173~177

## Preliminary Study on Production of γ-linolenic Acid by Shake Culture of *Mucor mucedo*

Zhang Yinliang

(Zhengzhou Institute of Light Industry, Department of Food & Bioengineering, Zhengzhou 450002)

**ABSTRACT** Fermentation of γ-linolenic acid (GLA) by *Mucor mucedo* was studied preliminarily. Effects of different carbon source and nitrogen source on GLA production were investigated. Three uniform design experiments were carried out to optimize the concentration of carbon source and nitrogen source, C/N ratio, metal ions supply, pH, volume of broth in flask. The optimum conditions were starch 185.36 g/L, NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> 2.7 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L, peptone 0.1 g/L, yeast extract 0.2 g/L, pH 5.5, and 150 mL broth in 500 mL. Under the optimum conditions, the yield of GLA reached more than 30%.

**Key words** γ-linolenic acid, *Mucor mucedo*, fermentation, uniform experiment