

影响被孢霉产生含 γ -亚麻酸油脂的几种因素

赵人俊 严虹 郑幼霞

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

摘 要 对培养条件,如氮源种类、C/N 比率、pH、种子种龄与接种量对被孢霉 (*Mortierella* sp.) M14 菌株的细胞生长和油脂形成的影响作了研究。结果表明,二级发酵优于一级发酵。M14 菌株二级发酵时,种子种龄以 49h 为适,接种量宜大 (30%)。无机氮源有利于不饱和脂肪酸的产生,有机氮源有利于细胞的增殖。低 C/N 比率有利于菌丝体产量的提高,提高 C/N 比率则能促进菌体细胞内的油脂合成。pH 对菌体生长、油脂产生以及 γ -亚麻酸含量都有显著的影响。

关键词 被孢霉, 油脂, γ -亚麻酸

丝状真菌被孢霉,可以发酵产生丰富的多不饱和脂肪酸,如 γ -亚麻酸 (Gamma-linolenic acid, GLA)^[1],双高- γ -亚麻酸 (Dihomo- γ -linolenic acid, DHGLA)^[2],花生四烯酸 (Arachidonic acid, ARA)^[3]和廿碳五烯酸 (Eicosapentaenic acid, EPA)^[4],为人类提供必需的营养补充要素和治疗疾病的药物,从而引起人们的浓厚兴趣^[5]。我们以前报道的被孢霉 (*Mortierella* sp.) M14 等菌株细胞内,积累大量富含 GLA 的油脂^[6]。在人体一系列代谢过程中,GLA 作为合成前列腺素的前体,对正常代谢起着十分重要的作用。如果缺少 GLA,就会造成机体生理功能失调,而导致如高血脂等多种疾病。

被孢霉菌体细胞内油脂的形成是其生长过程中的初级代谢产物。油脂产量以及油脂中的脂肪酸组成,均与培养条件,诸如培养温度、培养基碳氮源种类和碳氮比率 (C/N)、pH、种子种龄与接种量等有着密切关系。本文报道这几种因素对被孢霉 M14 产生油脂以及油脂的脂肪酸组成的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株

被孢霉 (*Mortierella* sp.) M14 等菌株。

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 斜面培养基 (PDA): 见前文^[6]。

1.2.2 种子培养基: 见文献 [7]。

1.2.3 发酵培养基: 见文献 [1]。

1.2.4 培养条件: PDA 斜面接种后,经 28℃ 培养 7d,将斜面培养物接种到种子摇瓶中,28℃ 振荡培养 2d,再转接到发酵摇瓶继续培养。

1.3 油脂萃取

本文于 1994 年 4 月 11 日收到。

见文献[6]。

1.4 脂肪酸分析

用气相色谱法定量分析脂肪酸组成,气相色谱分析条件,见文献[6]。

2 结果与讨论

2.1 三株菌的比较

将 M10、M13 和 M14 三株被孢霉菌,通过摇瓶发酵,过滤收集菌丝体,溶剂萃取油脂,并分析油脂的脂肪酸成分,进行综合对比,结果如表 1 所示。从菌体生物量来看,M14 菌株最高,在 15.6g/L;从油脂产量来看,M10 菌株优于 M13 与 M14 菌株,油脂产量达 5.92g/L;干菌体的油脂收率为 45.7%;油脂中 GLA,则以 M14 菌株为高(8.97%)。对 M10 与 M14 两个菌株同时进行一级发酵与二级发酵的进一步对比试验,结果显示,菌体产量和油脂得量,二级发酵都优于一级发酵,M14 菌株明显好于 M10 菌株。

表 1 三个菌株的摇瓶发酵

Table 1 The shaker fermentation of three *Mortierella* sp. strains

Fermentation	Strains	DCW/g · L ⁻¹	Lipid yield		GLA/%
			TL/g · L ⁻¹	TL/DC (%)	
1 step (93h)	M10	12.96	5.92	45.7	7.59
	M13	5.33	2.00	37.5	7.98
	M14	15.60	5.60	35.9	8.97
1 step (165h)	M10	21.0	3.64	17.3	7.55
	M14	22.4	4.76	21.2	8.92
1 step (136h)	M10	21.6	4.14	19.2	7.05
	M14	27.3	6.67	24.5	8.72

DCW=dry cell weight; TL=total lipid; GLA=gamma linolenic acid.

2.2 种龄和接种量的影响

不同种龄的种子接入摇瓶发酵,其结果列于表 2。种龄以 49h 最为适宜,菌体生物量,油脂产量和产率都是最佳,种龄 37h,虽然菌体生物量与种龄 49h 相近;但其油脂产量却明显低于 49h 的水平。如果种龄延长到 62h,则菌体生物量,油脂产量和产率,都不及种龄 49h。

表 2 种龄对 M14 菌株油脂形成的影响

Table 2 Influence of cultural seed age on lipid formation by strain M14

Age of culture/h	DCW/g · L ⁻¹	Lipid yield		Productivity /mg · L ⁻¹ · h ⁻¹
		TL/g · L ⁻¹	TL/DC (%)	
37	28.1	12.5	44.4	167
49	29.0	15.5	53.5	207
62	25.8	12.8	49.2	170

以种龄 49h 的种子,按不同种量接到摇瓶中培养,收集菌丝体,萃取油脂,结果列

于表 3。实验表明菌体生物量，以 10%接种量为最高；但就油脂产量，油脂得率和产率而言，则以 30%接种量为佳，这是因为 10%接种量相对于 30%而言，摇瓶培养基的营养成分较为丰富，有助于菌体细胞生长繁殖；而 30%接种量摇瓶中营养就相对地显得不足，菌体细胞的生长发育提前进入半饥饿状态，而制约了菌体细胞的大量繁殖，转入油脂合成阶段。

表 3 接种量对 M14 菌株油脂形成的影响

Table 3 Influence of cultural seed volume on lipid formation by strain M14

Seed volume/%	DCW/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Lipid yield		Productivity $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
		TL/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	TL/DC (%)	
10	49.7	15.0	30.2	200
20	29.0	15.5	53.5	207
30	25.7	17.0	66.1	227

2.1 氮源的影响

据报道^(7,8)，产油被孢霉的培养，以葡萄糖作碳源为合适。我们分别试验了以 NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 和尿素（单独或混合）作为氮源对菌体生长与油脂合成的情况（表 4）。观察到 NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 单独或与尿素混合作为氮源时，生物量和油脂产量都不高； KNO_3 单独作为氮源，表现略优，而与尿素一起作为混合氮源时，不仅菌体生物量大，油脂产量高达 $218\text{mg/L} \cdot \text{h}$ 。对油脂中脂肪酸组成分析数据的考察（表 5），可以看到无机氮源有利于不饱和脂肪酸的合成，其总量普遍高于以尿素单独作为氮源时的不饱和脂肪酸总量。均明显高于尿素的 78.22%。值得注意的是 GLA 含量却是以后者为高。这些结果与文献报道基本一致。

表 4 不同氮源对 M14 菌株油脂形成的影响

Table 4 Influence of different nitrogen sources on lipid formation by strain M14

Nitrogen source	Amount/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	DCW/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Lipid yield		Productivity $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
			TL/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	TL/DC (%)	
NH_4Cl	1	5.1	3.64	71.37	51
NH_4Cl + Urea	0.5 2	6.5	5.45	83.84	77
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	3.4	2.00	58.82	28
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Urea	1 2	9.2	6.00	65.22	85
KNO_3	1	17.5	10.91	62.34	154
KNO_3 + Urea	0.5 2	29.8	15.45	51.84	218
Urea	4	28.7	11.82	41.82	166

2.4 碳氮比率 (C/N) 的影响

以葡萄糖为碳源，尿素为氮源，在固定葡萄糖用量的情况下，比较不同 C/N 比率对

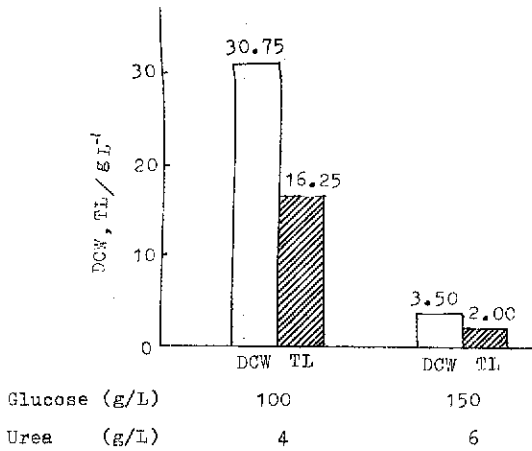


图1 一定C/N比率时,变化碳氮源量对M14菌株油脂形成的影响

Fig. 1 Influence of varied amount of carbon and nitrogen source in a given C/N ratio on lipid formation by strain M14

□ Dry cell weight, ▨ Total lipid

菌体细胞增殖及油脂产量的影响。表6的结果表明,低C/N比率(9.37)有利于细胞增殖,菌体生物量达到40g/L;C/N比率提高,菌体生物量与油脂产量都相应减少,但菌体细胞内油脂含量(TL/DC)却有相应递增趋势。显然,提高C/N比率能促进细胞的油脂合成。

固定C/N比率(19.47),改变碳氮源含量,对菌体生物量及油脂产量都有明显的差异(见图1)。这些结果说明,适当的C/N比率固然十分重要,合适的碳氮源浓度也是不可忽视的。

2.5 pH对M14菌株油脂形成的影响

发酵培养基的起始pH,对M14菌株的细胞生长与油脂产生有着密切的关系。从图2可见起始pH在4.5~6.5之间较为合适,其中又以pH4.5~5.5为最佳,此时,菌体生物量27.6g/L,油脂产量16g/L,菌体的油脂率62.8%,油脂产率229mg/L·h, GLA含量为8.6%。

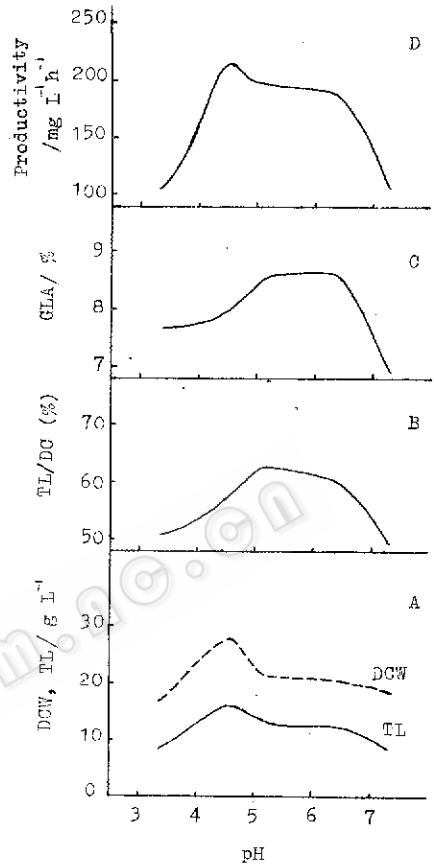


图2 pH对M14菌株细胞生长与油脂形成的影响

Fig. 2 Influence of pH on cell growth and lipid formation by strain M14

- A. Influence of pH on cell growth and lipid yield
- B. Influence of pH on TL/DC
- C. Influence of pH on GLA content
- D. Influence of pH on lipid productivity

表 5 不同氮源对 M14 菌株产生的油脂脂肪酸组成的影响
Table 5 Influence of different nitrogen sources on fatty acid compositions in lipid produced by strain M14

Fatty acid \ Nitrogen source	NH ₄ Cl	NH ₄ Cl+Urea	(NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄ +Urea	KNO ₃	KNO ₃ +Urea	Urea
Mysritic acid	0.55	0.54	0.64	0.61	0.48	0.69	0.72
Palmitic acid	11.86	13.73	12.09	13.88	11.74	12.47	14.95
Palmitoleic acid	1.31	0.53	0.97	1.14	2.39	1.87	0.28
Stearic acid	3.42	2.85	3.02	4.06	1.45	3.16	5.96
Oleic acid	61.22	60.29	59.16	57.40	61.52	55.86	54.18
Linoleic acid	14.08	14.40	14.69	14.40	14.52	18.06	14.33
γ -linolenic acid	7.38	7.50	8.46	8.29	7.79	7.77	9.43
Eicosanoic acid	0.18	0.15	0.0	0.11	0.09	0.08	0.13
Total USFA*	83.99	82.72	83.28	81.23	86.22	83.56	78.22

* : USFA=unsaturated fatty acid.

表 6 不同 C/N 比率对 M14 菌株油脂形成的影响
Table 6 Influence of C/N ratio on lipid formation by strain M14

Glucose/g · L ⁻¹	Urea/g · L ⁻¹	C/N	DCW/g · L ⁻¹	Lipid yield	
				TL/g · L ⁻¹	TL/DC (%)
100	8	8.71	40.00	18.12	45.31
100	4	19.42	30.75	16.25	56.91
100	2	38.84	16.75	14.37	85.82

参 考 文 献

- [1] Suzuki O, Yokochi T, Yamashina T. 油化学, 1982, 31 (11): 921~931.
- [2] Shimizu S, Akimoto K, Kawashima H *et al.* J Am Oil Chem Soc, 1989, 66 (2): 237~241.
- [3] Bajpai P K, Bajpai P, Ward O P. Appl Environ Microbiol, 1991, 57 (4): 1255~1258.
- [4] Shimizu S, Kawashima H, Shinmen Y *et al.* J Am Oil Chem Soc, 1988, 65 (9): 1455~1459.
- [5] Ratledge C. Acta Biotechnol, 1991, 11 (5): 429~438.
- [6] 赵人俊、郑幼霞. 真菌学报, 1995, 14 (2): 130~135.
- [7] Hannson L, Dostalek M. Appl Microbiol Biotechnol, 1988, 28 (2): 240~246.
- [8] Chesters C G C, Peberdy J K. J Gen Microbiol, 1965, 41 (1): 127~134.

Factors Effecting on Production of Lipid Containing γ -linolenic Acid by *Mortierella* sp.

Zhao Renjun Yan Hong Zheng Youxia

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)

Abstract The influence of cultural conditions, such as nitrogen source, C/N ratio, pH, age and volume of inoculum on cell growth and lipid formation of *Mortierella* sp. M14 strain was studied. It was showed that 2 steps was better than 1 step fermentation. During 2 steps fermentation with M14 strain, 49h seed age was suitable, and larger seed volume was required (30%). Inorganic nitrogen source contributed to produce unsaturated fatty acid and organic nitrogen source contributed the cell growth of M14. Low C/N ratio facilitate the enhancement of biomass, higher C/N ratio was able to promote the synthesis of lipid in mycelia. The cell growth, lipid formation were also influenced by pH markedly.

Key words *Mortierella* sp. lipid, γ -linolenic acid