

γ-亚麻酸高产菌株的选育及发酵产物的分离提取

张峻 邢来君 王红梅

(南开大学生物系, 天津 300071)

摘要 以深黄被孢霉 AS3.3410 为出发菌株发酵产生 γ-亚麻酸, 其菌体得率为 10%, 油脂含量为 27%, γ-亚麻酸含量为 3.3%。经过紫外线诱变处理, 得到变异株 M₆, 其菌体得率为 25%, 油脂含量为 32.8%, γ-亚麻酸含量为 8.84%。传代实验表明, M₆ 具有良好的遗传稳定性。经摇瓶发酵条件试验, 选出了最佳培养基配方, 以 10 升罐进行发酵, 结果为: 菌体得率 29.3%, 油脂含量 44.7%, γ-亚麻酸含量 9.44%。菌体油脂提取方法的研究表明, 以乙醇和正己烷对湿菌体进行分步抽提效果较好。

关键词 γ-亚麻酸; 被孢霉; 发酵

γ-亚麻酸 (γ-Linolenic acid) 是人体的一种必需脂肪酸, 是食物中的亚油酸转化为前列腺素 (PG) 及白细胞介素 (LT) 的中间物质, 而后两者具有许多重要的生理效应, 如: 降血糖、降血脂、抑制血小板凝聚、抗血栓形成等。因此, γ-亚麻酸的缺乏会抑制 PG 及 LT 的合成, 从而导致体内机能的显著紊乱^[1,2]。以前国际上销售的 γ-亚麻酸主要从月见草的种子油中提取, 但是月见草种子的来源受天气、产地等的影响, 不能满足市场的需求。而微生物发酵法生产 γ-亚麻酸却不受原料限制, 精炼成本也较低。因此, 从 1985 年开始, 日本、英国等纷纷采用发酵法生产 γ-亚麻酸, 产品已相继投入市场。在国内则少有报道^[3], 且 γ-亚麻酸含量为 8% 左右, 与国外相比差距较大。本文报道以毛霉目的 22 个菌株进行了发酵初筛, 从中选出一株深黄被孢霉 (*Mortierella isabellina*) AS 3.3410 为出发菌株, 进行了诱变育种及高碳源 (10%) 培养发酵生产 γ-亚麻酸的研究。

材料和方法

(一) 菌株和培养基

1. 菌株: 深黄被孢霉 (*Mortierella isabellina*) AS 3.3410 购自中国科学院菌种保藏中心。
2. 斜面培养基: 为 SPDA 培养基。
3. 种子液培养基 (%): 葡萄糖 10, (NH₄)₂SO₄ 0.3, NaAc 0.5, KH₂PO₄ 0.2,

MgSO₄·7H₂O 0.03, NaCl 0.01, 酵母膏 0.02, 蛋白胨 0.01, pH6.0, 0.7kg/cm² 灭菌 30 分钟。

4. 基础摇瓶发酵培养基 (%): 同 3。

5. 平皿诱变培养基 (%): 葡萄糖 10, (NH₄)₂SO₄ 0.3, KH₂PO₄ 0.2, MgSO₄ · 7H₂O 0.03, 琼脂 2, pH6.0, 0.7kg/cm² 灭菌 30 分钟。

(二) 紫外线诱变处理

诱变条件及操作见文献 [4]。

(三) 菌体的培养与收集

1. 菌种活化: 将保存的菌种转接到斜面培养基上, 28℃, 培养 4 天。

2. 种子液制备: 活化菌种以 10ml 无菌水洗入装有 100ml 种子液培养基的 500ml 三角瓶中, 30℃, 150r/min, 培养 2—3 天。

3. 摇瓶发酵: 500ml 三角瓶装 100ml 发酵液, 接 2ml 种子液, 30℃, 150r/min, 培养 4 天。

4. 10L 罐发酵: 装液量 6L, 接种量 5%, 罐压 0.5kg/cm², 通气量 1:05(v/v/m), 搅拌速度 400r/min, 罐温 30℃。

5. 菌体收集: 培养好的菌体经镜检后, 以的确良布过滤, 蒸馏水洗三次, 称湿重, 取部分湿菌体, 60℃烘干, 称干重, 以确定湿菌体的含水率。所得湿菌体马上进行油脂的抽提。

(四) 分析方法

1. 发酵液残糖的测定: 参照文献 [5]。

2. 菌体油脂的抽提:主要参照 Folch 法^[6]。

3. 油脂中 γ -亚麻酸含量的气相色谱测定

(1) 待测样品的处理:菌体油脂加 5%KOH-甲醇溶液封管水解 → 加 14%BF₃-甲醇溶液封管甲酯化 → 加饱和 NaCl 溶液分层 → 以石油醚(bp30-60)提取 → 无水 Na₂SO₄ 干燥 → 挥发溶剂 → 样品置安瓿管中, -20 °C 保存。

(2) 对照样品: γ -亚麻酸甲酯(99%)。

(3) 仪器和工作条件

仪器: Shimadzu GC-7A 气相色谱仪, Shimadzu C-RIB 数据处理机。

检测器: 氢火焰离子化检测器(ID)。

色谱柱: DEGS 玻璃毛细管柱(30cm), RANGE:100, ATT:1, SPEED:2.5mm/min。

尾吹: 60ml/min, 线速: 12cm/sec. 柱温:

180 °C。检测气化温度: 250 °C。

结果与讨论

(一) 紫外线诱变结果

由表 1 可知, 诱变照射 15 秒时正变率最高。固定照射时间(15 秒), 以每次诱变所得 γ -亚麻酸含量最高的菌株作为下次诱变的出发菌株, 进行反复诱变, 最终获得变异株 M₆, 其性状与原始菌株对比见表 2。

表 1 诱变时间与死亡率及正变率

诱变时间(s)	0	10	15	20	25	30	35
死亡率(%)	0	22.7	65.0	80.8	89.7	98.5	99.5
正变率(%)	0	20	60	40	10	0	0

表 2 M₆ 与 AS3.3410 性状对比

菌号	菌体得率(%)	菌体油脂含量(%)	油脂中 γ -亚麻酸含量(%)
AS3.3410	10.0	27.0	3.30
M ₆	25.0	32.8	8.84

注: 菌体得率(%)= 菌体干重 × 100 / 培养基中碳源重量

取 M₆ 菌株试管斜面每 10 天转接一次, 共转接 10 次, 发酵测定, 结果表明 M₆ 菌株的遗传性状稳定。

(二) M₆ 菌株摇瓶发酵条件的研究

1. M₆ 对不同碳源的利用: 在基础培养基中加入不同碳源, 结果表明, 葡萄糖为最适碳源(表 3)。

表 3 不同碳源对发酵的影响

碳源	葡萄糖	玉米淀粉	糖蜜	糊精	麦芽汁	纤维素	蔗糖
浓度(%)	10	5	5	5	10	5	10
菌体得率(%)	24.5	微量	微量	13.6	20.5	微量	微量
油脂含量(%)	38.8			36.0	30.2		
γ -亚麻酸含量(%)	8.20			7.80	7.20		

2. M₆ 对不同氮源的利用: 在基础培养基中加入不同氮源, 结果见表 4, 如果从经济学角度

(价格、来源)考虑, 蛋白胨与 (NH₄)₂SO₄ 均为良好氮源。

表 4 不同氮源对发酵的影响

氮源	(NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ HPO ₄	NH ₄ NO ₃	NaNO ₃	蛋白胨	尿素	鱼粉
菌体得率(%)	24.0	21.8	21.0	8.9	21.1	23.8	9.5
油脂含量(%)	41.7	42.7	35.2	24.0	55.9	16.4	30.5
γ -亚麻酸含量(%)	8.40	8.90	7.50	7.80	9.60	10.20	8.50

3. 培养温度对 M₆ 发酵结果的影响: 综合 个因素, 则 30 ℃ 为最适培养温度 (表 5)。考虑菌体得率, 油脂含量、γ-亚麻酸含量这三

表 5 培养温度对发酵的影响

培养温度 (℃)	培养时间 (h)	菌体得率 (%)	油脂含量 (%)	γ-亚麻酸含量 (%)
10.0	120	18.0	30.0	10.2
20.0	108	22.0	35.0	8.8
30.0	84	24.0	40.0	8.0
35.0	144	10.0	31.0	10.8

4. 最适发酵培养基组成的确定: 利用正交试验法, 分析葡萄糖、(NH₄)₂SO₄、NaAc、KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O、酵母膏、蛋白胨之间的最佳配比, 结果得最佳培养基组成为 (%): 葡萄糖 10, (NH₄)₂SO₄ 0.5, NaAc 0.3, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.05, 蛋白胨 0.01, 酵母膏 0.02。以此配方进行摇瓶发酵验证, 结果见表 6。

国际及国内水平进行比较 (表 7)。

表 6 发酵验证试验

培养基	菌体得率 (%)	油脂含量 (%)	γ-亚麻酸含量 (%)
基础配方	20.4	40.7	8.78
优化配方	28.0	44.6	8.80

(三) 10L 罐发酵试验

选用优化培养基配方进行 10L 罐发酵, 发酵动态曲线见图 1, 气相色谱结果见图 2。发酵初期, 菌体呈菌丝状, 较细, 多分枝, 菌体合成的脂肪主要参与细胞物质的构建, 因而脂肪粒很少。随着发酵时间的延长, 菌体生长高峰期过后, 转向次生代谢产物的合成及过剩物质的积累。在高碳氮比的培养条件下, M₆ 菌株可以合成并积累大量的油脂, 因而菌丝逐渐变成酵母型, 内含脂肪粒大且密集。现把 M₆ 发酵结果与

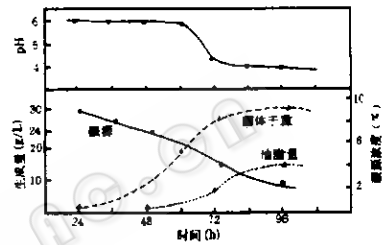


图 1 M₆ 菌株的发酵动态

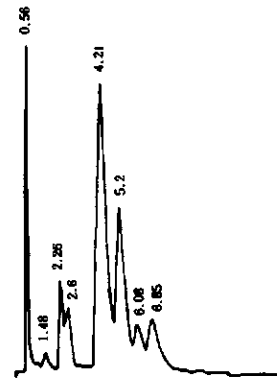


图 2 10L 罐发酵样品的气相色谱图 6.85 处为 γ-亚麻酸甲酯峰

表 7 M₆ 菌株的发酵水平

菌名	菌体得率 (%)	油脂含量 (%)	γ-亚麻酸含量 (%)	来源	时间
被孢霉	36.3	55.3	10.0	Osamu suzuki ^[7]	1985
小克银汉霉	不详	40.0	18.0	兼岛良一 ^[8]	1987
枝霉	4.0	22.5	28.1	Akira seto ^[9]	1987
不详	不详	不详	8.0	上海工微所 ^[3]	1989
被孢霉	29.3	44.7	9.44	本文作者	1992

(四) 菌体油脂分离提取方法的研究

由于油滴存在于菌体细胞内,所以须先将菌体细胞破碎。在工业生产上可以采用球磨机进行机械破碎,也可利用高压匀浆机匀浆。本文利用研磨加匀浆的办法,经镜检,菌体细胞有80%左右破碎,所有细胞中几乎见不到脂肪粒。

匀浆时须加入有机溶剂进行油脂的抽提,

根据相似相溶原理,极性酯易溶于强极性溶剂,如甲醇、乙醇,中性酯易溶于烷烃类溶剂,如己烷、苯等。所以,为了保证油脂抽提的完全,可以用不同极性的溶剂混合抽提或分步抽提。本文试验了6种不同的抽提方法,从表8可见,方法4抽提较完全,且油脂中含色素少,颜色浅。

表 8 不同提取方法的比较

编号	菌体干重 (g)	抽提方法	所得油脂 (g)	颜色
1	4	以氯仿: 甲醇 (2:1) 抽提	1.66	金黄
2	4	先用甲醇, 后用氯仿抽提	1.50	金黄
3	4	先用乙醇, 后用石油醚抽提	1.58	淡黄
4	4	先用乙醇, 后用正己烷抽提	1.80	淡黄
5	4	先用乙醇, 后用苯抽提	1.46	淡黄
6	4	以石油醚抽提	1.52	淡黄

参 考 文 献

- Holman R T: *Am. J. Clin. Nutr.*, 35 (23): 37-61, 1982.
- Horrobin D F: *Clinical uses of essential fatty acids*, Eden Press, Montreal. London, 1982.
- 吴菊芬等: *工业微生物*, 19 (4): 10-12, 1989.
- 王家玲: *环境微生物学实验*, p. 213-218, 高等教育出版社, 北京, 1988.
- 北京大学生物系生化教研室编: *生物化学实验指导*, P.22-24, 高等教育出版社, 北京, 1984.
- Gunter Zweig and Joseph Sherma: *Handbook of Chromatography, Lipids Vol.1*, p.33-37, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1984.
- Osamu Suzuki: *US Patent*, 4 783 408, 1988.
- 藁岛良一: *公开特许公报 (A)*, 昭 62-232379, 1987.
- Akira seto: *US Patent*, 4 871 666, 1989.

(1992-7-7 收稿)

BREEDING OF A HIGH γ -LINOLENIC ACID YIELD PRODUCING STRAIN AND THE EXTRACTION OF FERMENTATION PRODUCT

Zhang Jun Xing Laijun Wang Hongmei

(Biology Department of Nan Kai University, Tian Jin 300071)

Mortierella isbellina (AS 3.3410) was used as the starting strain in the experiment. Through fermentation, the production rate of fungal body was 10%, content of lipid in fungal body was 27%, content of γ -Linolenic acid in lipid was 3.3%. When it was treated by U.V, mutant M_6 was obtained, its production rate of fungal body was 25%, lipid content was 32.8%, γ -linolenic acid content was 8.44%. Pass-generation test indicated that the heredity character of M_6 was stable.

The optimum culture medium was obtained through culture condition test, and the result of fermentation in 10L tank showed that the production rate of fungal body was 29.3%, lipid content was 44.7%, GLA content was 9.44%.

In the meantime, the method of extraction of fungal lipid was primarily studied, which indicated that it is preferable to use a combination of ethanol and hexane to extract alternately.

Key words γ -Linolenic acid (GLA); *Mortierella*; Fermentation