

一株高产 γ - 亚麻酸丝状真菌菌株的 发酵接种方式研究

戴传超, 史 央, 王安琪, 袁志林
(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

摘 要: 从土壤中筛选到一株高产 γ - 亚麻酸(GLA)的丝状真菌, GLA 占总脂肪酸的12.85%, 菌丝含油量为19.70%。经鉴定为根霉属真菌。比较两种不同的接种方式发现, 孢子接种发酵所得菌丝体干物质产量、GLA 含量以及油脂含量分别比菌丝接种高25.98%、51.90%和43.87%。用菌丝制作液体种子二级发酵, 其GLA 含量可以达到孢子接种水平, 但菌丝生物量仍然低于孢子接种组。

关键词: γ - 亚麻酸; 根霉; 孢子接种; 菌丝接种; 液体种子

Studies on Inoculation Types of γ - Linolenic Acid Fermentation by a High-producing Filamentous Fungus Strain

DAI Chuan-chao, SHI Yang, WANG An-qi, YUAN Zhi-lin,
(College of Biology Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: A filamentous fungi strain identified as *Rhizopus* sp., producing high γ - linolenic acid (GLA) was obtained. In its mycelium, GLA amounted to 12.85% of the fatty acid while oil amounted to 19.70% of the mycelia. Two inoculation types were compared. By the spore inoculation the biomass, GLA composition and oil content of the mycelia were respectively 4.17g/L, 18.41% and 28.34%. By using mycelia inoculation got the results were 25.98%, 51.90%, 43.87% higher than those above respectively. Using the mycelium as the secondary inoculum the final GLA content could reach the same level as that of the spores; but the biomass could not meet the level of the spore inoculation.

Key words: γ - linolenic acid *Rhizopus* sp.; spore inoculation mycelia inoculation, liquid seed

中图分类号 Q939.96

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)04-0055-04

γ -亚麻酸(γ -linolenic acid, GLA, 18:3, ω -6)是重要的多不饱和脂肪酸,它是人体合成前列腺素(PEG)的前体物质,在调控体内多种生理过程中,如扩张血管、抑制血液凝固、调节体内胆固醇代谢及增强免疫能力方面有十分重要的作用,GLA被认为是极具特殊医疗保健作用的营养素,包括我国在内的世界上许多国家生产含GLA的药品、特种食品及化妆品等。自然界中GLA主要存在于某些植物种子中,如月见草(evening primrose)、黑加仑(*Ribes nigrum*)和玻璃苣(borage)种子中^[1,2]。为了获得更为充足廉价的GLA,人们探索从微生物中获得GLA。目前,人们已发现被孢霉(*Mortierella*)、小克银汉霉(*Cunninghamella*)、毛霉(*Mucor*)、螺旋藻

(*Spirulina*)、根霉(*Rhizopus*)等属的一些种含有GLA,并已工业化生产^[1~5],但生产效率仍有待进一步提高。为了获得高产GLA的菌种,我们拟从红壤中筛选出富含GLA的菌种,以用于工业化生产。

用微生物发酵生产不饱和脂肪酸一般用丝状真菌作为菌种,接种方式多选用菌丝接种^[5~9],而鲜见用孢子接种。我们^[10]在研究菌种储藏对一株丝状真菌的二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid, DHA, 22:6, ω -3)产量的影响时发现,在20℃放置10d的菌种,DHA产量比在4℃储藏的高,在讨论中认为这和20℃培养一定时间后,产生孢子有关。孢子接种和菌丝接种带来了DHA产量的差异。但由于研究的菌种孢子较少,并

收稿日期: 2004-04-12

基金项目: 中国科学院红壤生态开放站项目(2000-K-02); 江苏省教育厅项目(03KJB180065)

作者简介: 戴传超(1970-), 副教授, 博士, 从事微生物及微生物生态等方向研究。

未对两种接种方式进行比较。为探讨接种方式对不饱和脂肪酸产量的影响,本文以筛出的一株真菌为实验材料,就两种接种方式对脂肪酸组分含量和油脂含量的影响进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土样

取自江西省鹰潭市中科院红壤生态开放站旱地(花生)中,采样方法参照文献^[11]。

1.1.2 培养基

斜面培养基为马铃薯培养基,发酵培养基为液体PDA培养基^[12]。

1.2 方法

1.2.1 菌种筛选及鉴定

菌种筛选参照文献^[11],菌种鉴定参照文献^[13]。

1.2.2 菌丝发酵和收获

菌丝或孢子接种比较:菌种从冰箱中取出,转移至PDA斜面,28℃生长1d或生长5d至长出孢子。倒入无菌水,刮取菌丝或孢子,制成菌丝悬液或者孢子悬液,转入液体PDA培养基中(250ml三角瓶装50ml液体),28℃150r/min发酵3d。用布氏漏斗抽滤菌丝,并用蒸馏水洗3遍。二级发酵的接种方式为:将菌丝或孢子接入液体PDA,同上培养条件培养2d作为种子,以20%(V/V%)接种量,接入新培养基中,培养不同时间收获。

1.2.3 脂肪酸检测

脂肪酸用气相色谱进行检测。具体百分含量及产量计算及分析条件同文献^[14]。

1.2.4 油脂含量测定

用索氏抽提法^[15]。

1.2.5 菌丝生物量的测定

用布氏漏斗抽滤发酵菌丝,并用蒸馏水洗3遍,105~110℃烘干至恒重^[15]。

1.2.6 残余还原糖的测定参照文献^[15]。

2 结果与分析

2.1 菌种来源

从江西省鹰潭市中科院红壤生态开放站的旱地中,分离到一株丝状真菌,编号为NSHR-1号。用气相色谱分析其脂肪酸成分,与标准品对照,发现其GLA占总脂肪酸的比例较高,达12.85%,总不饱和脂肪酸达67.89%。油脂含量达19.70%。在液体PDA上发酵后,干物质产量可达3.31g/L,油脂产量达625.07mg/L。具体脂肪酸

表1 NSHR-1号菌丝主要脂肪酸成分

Table 1 The main fatty acid composition of strain NSHR-1

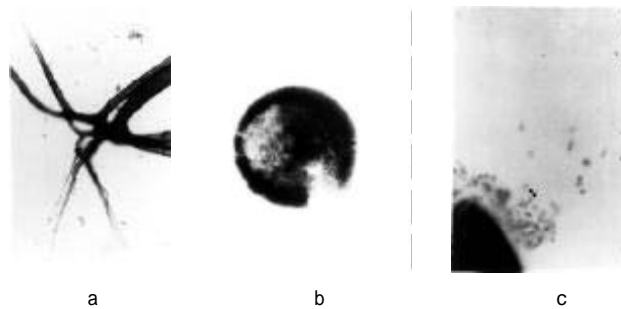
脂肪酸Fatty acid	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
保留时间Retention time (min)	3.01	4.80	7.37	7.74	8.44	8.97
含量Content (%)	0.53	21.08	7.40	38.27	16.77	12.85

14:0:豆蔻酸;16:0:棕榈酸;18:0:硬脂酸;18:1:油酸;18:2:亚油酸;18:3:γ-亚麻酸。

成分见表1。

2.2 NSHR-1号菌株的菌种鉴定

PDA-28℃-3.5cm/d,生长旺盛,气生菌丝发达,充满平皿。菌落初为白色,老后变灰色,较稀疏,菌丝宽13.8~40.3μm,无分枝,无隔,和孢子囊对生处有假根(图1, a)。孢子囊黑色,直径为80.2~172.4μm(图1, b);孢囊孢子黑色,圆形或椭圆形,直径3.2~5.4μm(图1, c),为根霉属(*Rhizopus* sp.)真菌。



a 假根 rhizoid(10×20), b 孢子囊 sporangium(10×20), c 孢子 spores(10×40)

图1 根霉的假根与孢子

Fig.1 The rhizoid and spores of *Rhizopus* sp.

2.3 不同接种方式对菌丝产脂肪酸的影响

分别用孢子和菌丝接种,在液体PDA上发酵后,比较菌丝体干重,发现孢子接种有利于该株根霉菌丝体的生长,干重比菌丝接种平均高25.98%(表2)。比较其多不饱和脂肪酸比例发现,孢子接种也有利于多不饱和脂肪酸的产生,平均比菌丝接种高出5.37%。从表2中还可看出,油酸(18:1)的变化和GLA相反,油酸含量高,往往转化的多不饱和脂肪酸含量较低,如菌丝接种发酵所得菌丝体的油酸含量较高,平均达37.50%,GLA含量就相对较低,平均为12.12%,表明油酸(18:1)向亚油酸(18:2)的转化是合成GLA的枢纽,合成亚油酸后可以顺利地合成GLA。这与文献认为18:1向18:2转化是合成DHA的枢纽相一致^[15]。

具体脂肪酸产量见表3。从表3的结果看,孢子接种有利于此株根霉产GLA,GLA的产量平均是菌丝接种的2.75倍;也有利于油脂的产生,油脂产量平均比菌丝接种高89.06%。

研究中还发现,不同的接种方式,根霉菌丝体形态

表2 两种接种方式对菌丝产脂肪酸及生物量的影响
Table 2 The effect of two inoculation types to the fatty acid in the mycelium and the biomass

	菌丝接种 Mycelium as the inoculums					平均值 Average	孢子接种 Spores as the inoculums				
	试验号Test No				平均值 Average		试验号Test No				平均值 Average
	1	2	3	4			1	2	3	4	
14:0	0.53	0.59	0.52	0.87	0.63	0.15	N.D.	0.13	0.34	0.21	
16:0	21.08	24.02	23.98	20.57	22.41	26.11	29.58	24.10	22.98	25.69	
18:0	7.40	8.16	7.81	8.11	7.87	1.90	3.49	3.27	3.52	3.05	
18:1	38.27	39.16	37.83	34.75	37.50	28.93	28.69	32.96	31.55	30.53	
18:2	16.77	15.75	16.89	15.74	16.29	23.26	21.89	21.87	22.34	22.34	
18:3	12.85	12.11	12.43	11.07	12.12	19.65	17.61	17.52	18.86	18.41	
∑USFA	67.89	67.02	67.16	61.56	65.91	71.84	68.19	72.34	72.75	71.28	
18:3/18:2	0.77	0.77	0.74	0.70	0.75	0.85	0.80	0.80	0.84	0.82	
生物量Biomass(g/L)	3.38	3.56	3.05	3.23	3.31	4.45	4.70	3.42	4.12	4.17	

脂肪酸含量为百分含量; 14:0: 豆蔻酸; 16:0: 棕榈酸; 18:0: 硬脂酸; 18:1: 油酸; 18:2: 亚油酸; 18:3: γ -亚麻酸; N.D.: 未测出; FA: 脂肪酸; USFA: 不饱和脂肪酸。

表3 两种接种方式各脂肪酸产量及含油量的比较
Table 3 The comparison of the fatty acid yield and oil content in two inoculation types

接种方式Inoculation type	FA产量 Fatty acid yield(mg/L)						油产量Oil yield (mg/L)	含油量Oil content (%)
	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3		
菌丝接种 Mycelium as the inoculums	2.39	84.97	29.84	142.19	61.77	45.96	625.07	19.70
孢子接种 Spores as the inoculums	1.44	176.54	20.96	209.80	153.52	126.51	1181.78	28.34

表4 两种接种方式菌丝体生长情况的比较
Table 4 The comparison of growth type in two inoculation types

时间time(h)	孢子接种Spores as the inoculums			菌丝接种形态Mycelium as the inoculums
	形态 Growth type	菌丝球直径(mm) Diameter of mycelium ball	菌丝球数目(个/100ml) Mycelium ball number	
24	若干小球	2~4	33	一个较大的菌丝球
48	若干小球	8~10	24	
72	若干小球	10~12	15	

表5 两级发酵对菌丝产脂肪酸及生物量的影响
Table 5 The effect to the fatty acid in the mycelium and biomass by two stage culturing

	菌丝接种 Mycelium as the inoculums(d)				孢子接种 Spores as the inoculums(d)			
	1	2	3	4	1	2	3	4
14:0	1.06	0.82	0.46	0.78	0.40	0.70	0.63	0.47
16:0	24.40	29.26	23.01	27.52	26.67	27.43	28.77	28.35
18:0	6.46	6.0	9.16	7.48	7.62	7.81	9.70	9.76
18:1	25.44	23.70	27.09	25.03	28.01	27.29	25.85	26.27
18:2	17.50	19.02	17.90	17.60	15.85	15.16	15.16	15.25
18:3	19.68	18.24	19.90	18.98	17.58	18.55	17.66	17.49
∑USFA	62.62	60.96	65.79	61.61	61.44	61.0	58.56	59.01
18:3/18:2	1.12	0.96	1.11	1.08	1.11	1.22	1.16	1.15
生物量Biomass(g/L)	2.75	2.89	2.95	3.40	2.88	2.95	3.15	4.93
残糖 Reduced sugar(mg/ml)	2.68	0.83	0.32	0.80	2.66	2.05	0.36	0.51

脂肪酸含量Fatty acid content (%)。

及菌丝球数目也有显著不同。在同一培养条件下(28℃, 150r/min), 分别取培养24h、48h和72h后的菌丝体, 观察其形态, 并测定其菌丝球直径及数目。结果表明, 孢子接种发酵的菌丝体是若干菌丝小球, 在生长过程中, 这些菌丝小球也有可能聚合在一起形成一个较大的

菌丝球, 所以到发酵后期, 菌丝球的直径与数目成反比关系; 而菌丝接种则始终是一个较大的菌丝球(见表4)。

2.4 提高菌丝接种GLA含量的方法探讨

孢子有利于GLA的产生, 但是对于大量不产生孢子或很少产生孢子的丝状真菌, 其发酵过程中只能采用

菌丝接种, 如何提高这类丝状真菌的多不饱和脂肪酸产量, 需进一步探讨。前面的研究中发现, 如果菌丝生长在斜面上, 经过进一步活化, 则可以提高多不饱和脂肪酸产量^[10], 因此采用菌丝制作发酵种子, 进行二级发酵, 结果如表 5。表 5 表明, 当菌丝制作种子, 进一步发酵, 则其 GLA 含量达到了孢子接种的水平, 脂肪酸和孢子接种无差异。这表明, 菌丝接种经过一级种子活化后, 其脂肪酸代谢能力和孢子组达到一致。分析其生物量增长表明, 孢子接种的二级种子接种, 生物量仍然高于菌丝接种, 残糖结果和生物量反映状况一致。至 4d 时, 孢子接种组生物量达到 4.93g/L, 仍然大于菌丝接种的 3.40g/L。这说明从生长角度, 孢子制作的二级种子仍然比菌丝制作的二级种子好。

3 讨论

3.1 研究表明, 酸性条件有利于多不饱和脂肪酸产生^[9]。因此选择偏酸性环境, 筛选产多不饱和脂肪酸的菌种, 可能会获得高产菌株。中科院红壤生态站, 位于江西红壤地区, 取样地点 pH 值平均在 4.8~5.1 左右^[16]。从中筛选出这株根霉具有生长速度快, 油脂含量高, GLA 含量高的优点, 有望成为工业化生产的菌种。

3.2 影响不饱和脂肪酸产量的因素是多种多样的。其中, 碳源、氮源、温度等已有较多研究^[3~9], 而接种方式的研究鲜见报道。在研究菌种储藏时发现^[10], 不同温度储藏菌种和 DHA 产量有关, 推测这和孢子形成有关。本研究表明, 孢子接种的 GLA 产量远大于菌丝接种。在发酵中发现, 孢子接种, 菌丝以若干小球形式出现, 小球直径约 9mm, 而菌丝接种, 菌丝以一个大球形式生长。Higashiyama K 等^[17]在研究发酵生产花生四烯酸(AA)时认为, 小菌丝球有利于获得 AA 的高产。我们的结果与其有相似之处。可能小菌丝球对于氧气的溶解, 营养物质的传递都是有利的, 因此 GLA 的产量高。在发酵中, 斜面菌种转接多代后, 往往导致生产能力的下降, 这和用菌丝接种容易导致有关酶活力下降有关^[18]。在刮取菌丝时, 部分菌丝断裂, 导致菌丝胞内酶释放, 其中包括一些导致菌丝自溶的酶, 使菌种易老化, 这对菌丝发酵是极其不利的。王卫卫等研究根霉固体发酵产 γ -亚麻酸时也用孢子接种, 也说明我们的实验结果的可行性^[19]。

3.3 在研究菌种储藏时还发现^[10], DHA 产量和发酵前菌种是否活化有关。根据 2.3 的研究结果和分析, 增加菌丝接种的发酵级数使由于菌丝老化带来的影响减小, 或者增加菌种的活化次数, 应该可以增加 GLA 的含量和产量。本研究证明了这一假设。这表明, 对于大量不产孢子或产孢子很少的真菌, 可以通过二级发酵, 多

次活化菌种的方式提高多不饱和脂肪酸的产量。对于产生大量孢子的菌种, 则可以直接用孢子接种获得高产。

参考文献:

- [1] 尹卓容. 超临界CO₂萃取法从月见草种子和丝状真菌中提取 γ -亚麻酸[J]. 食品与发酵工业, 1996, 22(4): 21-26.
- [2] 郑建仙, 耿立萍. 功能性食品基料— γ -亚麻酸[J]. 食品与发酵工业, 1996, 22(1): 49-54.
- [3] 邢来君, 钟辉, 周辉, 等. 深黄被孢霉发酵产 γ -亚麻酸的研究[J]. 真菌学报, 1996, 15(4): 272-277.
- [4] De B K, Chaudhury S, Bhattacharyya D K. Effect of nitrogen sources on γ -linolenic acid accumulation in *Spirulina platensis*[J]. JAOCS, 1999, 76(1): 153-156.
- [5] Lindberg A-M and Hansson L. Production of γ -linolenic acid by the fungus *Mucor rouxii* on cheap nitrogen and carbon sources[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1991, 36: 26-28.
- [6] Gandhi S R, Weete J D. Production of the polyunsaturated fatty acids arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by the fungus *Pythium ultimum*[J]. Journal of General Microbiology, 1991, 137: 1825-1830.
- [7] Chen H C, Chang C C, Chen C X. Optimization of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* Wujii-H4 isolate [J]. JAOCS, 1997, 74(5): 569-578.
- [8] 赵人俊, 郑幼霞. 丝状真菌被孢霉产油脂研究[J]. 真菌学报, 1995, 14(2): 130-135.
- [9] 戴传超, 袁生, 李霞, 等. 培养条件对头孢霉菌丝体脂肪酸组分的影响[J]. 微生物学报, 2001, 41(1): 87-93.
- [10] 戴传超, 袁生, 幸定坤, 等. 菌种储藏对一株头孢霉产 DHA 的影响[J]. 南京师范大学学报(自然科学版), 2000, 23(2): 90-93.
- [11] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 232-278.
- [12] 范秀容, 李广武, 沈萍. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1989. 267-304.
- [13] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979. 62-66.
- [14] 戴传超, 袁生, 刘吉华, 等. 二十碳五烯酸等多不饱和脂肪酸高产菌的筛选[J]. 菌物系统, 2000, 19(2): 261-267.
- [15] 天津轻工学院, 大连轻工学院, 无锡轻工学院, 等. 工业发酵分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1980. 16-17, 41-42.
- [16] 陈志诚, 季耿善, 赵文君. 红壤生态站土壤类型及背景土壤图概述. 红壤生态系统研究(第一集)[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1992. 33-58.
- [17] Higashiyama K, Yaguchi T, Akimoto K, et al. Effect of mineral addition on the growth morphology of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* IS-4[J]. JAOCS, 1998, 75(12): 1815-1819.
- [18] 邢来君, 李明春. 普通真菌学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 26-42.
- [19] 王卫卫, 任鹏康. 少根根霉 γ -亚麻酸高产菌株选育及发酵条件优化[J]. 菌物系统, 2002, 21(1): 92-98.