

六种金属离子对轮梗霉生长及产花生四烯酸的影响

王安琪, 戴传超*, 陈佳昕, 姚俊杰

(南京师范大学生命科学学院微生物工程重点实验室, 江苏 南京 210097)

摘 要: 研究工业发酵中常见的 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 及 Co^{2+} 对轮梗霉生长及产花生四烯酸的影响。结果表明: Ca^{2+} 浓度在 $10^{-4} \sim 10^{-2} \text{mol/L}$ 范围内促进菌体生长, 但抑制 AA 产量。 Mn^{2+} 浓度为 $5 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 时 AA 产量达到最大, 但对菌体生长都有抑制作用。 Zn^{2+} 在 $3 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 浓度时 AA 产量达最大, 而生物量的变化不大。 Fe^{3+} 浓度为 $5 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 时, 生物量达最大, 而 AA 产量受其抑制, Cu^{2+} 浓度为 $5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 时菌体生物量和 AA 产量同时达到最大。 Co^{2+} 在 10^{-7}mol/L 浓度时生物量及 AA 产量同时达最大。

关键词: 花生四烯酸; 生长; 轮梗霉; 金属离子

Effects of Metal Ions Addition on the Growth of and Arachidonic Acid Production by *Diasporangium* sp.

WANG An-qi, DAI Chuan-chao*, CHEN Jia-xin, YAO Jun-jie

(Key Laboratory of Microbial Engineering, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The culture conditions for arachidonic acid(AA) production and the growth by *Diasporangium* sp. were investigated. Ca^{2+} or Fe^{3+} enhanced the cell growth, but suppressed the AA production, while Mn^{2+} revealed the possibility of the enhancement on cell growth but suppression of AA production. With the addition of Zn^{2+} , AA yield reached higher, but there was little effect on cell growth. A medium containing $5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ Cu^{2+} or 10^{-7}mol/L Co^{2+} was found to be the optimum for the AA yield and cell growth.

Key words: Arachidonic acid; growth; *Diasporangium* sp.; metal ions

中图分类号 Q939.96

文献标识码 A

文献编号 1002-6630(2005)09-0067-06

花生四烯酸(Arachidonic acid, 简称AA)是n-6系列长链多不饱和脂肪酸, 它能帮助神经系统的信息正常传递, 增强记忆, 对人体视力、大脑功能和协调能力起着极为重要的作用; AA 还是一系列类花生酸类生物活性物质的生物合成前体, 如前列腺系列和白细胞三烯的前体^[1], 这两类物质对人体几乎所有的组织产生相应的影响。AA 在婴儿营养中也起到重要作用^[2]。

轮梗霉(*Diasporangium* sp.)是本实验室自淡水中分离到的一株能高产花生四烯酸、二十碳五烯酸(Eicosapentaenoic acid, EPA)等多不饱和脂肪酸的菌株, 是一种水生的低等真菌^[3]。在培养过程中发现, 该菌对外界的培养条件要求很严格, 稍有不慎其生物量就会受到严重的抑制, 为了能将其扩大用于工业生产, 本

文从工业化生产中常可能遇到的几种金属离子入手, 研究了金属离子对轮梗霉生长及产脂肪酸的影响。另据报道^[4], 钴离子对 $\Delta 9$ 脱饱和酶基因的表达有促进作用, 因此本文也将其列入研究范围。

金属离子在工业发酵培养基中广泛存在。一般发酵所用的水多为硬水, 其中含有 Ca^{2+} , 即使是软水也允许含有 17.1mg/L 的矿物质; 现采用的《地表水环境质量标准》基本项目标准限值中, 允许一级地表水中含 0.01mg/L 的铜及 0.05mg/L 的锌; 工业上大量设备是由碳钢或铸铁制造的, 碳钢和铸铁在充满空气的软水中的腐蚀速度为 0.05~0.15mm/年; 碳钢中小于 1.5% 锰为允许的杂质范围; 而且经常在钢表面或者是接缝处镀锌, 以起电化防腐作用; 铜还是钢铁和铝等合金中的重要添加元

收稿日期 2004-07-15

*通讯作者

基金项目: 江苏省教育厅自然科学基金(03KJB180065)

作者简介: 王安琪(1979-), 女, 硕士研究生, 从事微生物学学习和研究。

素,少量铜(0.2%~0.5%)加入低合金结构用钢中,可以提高钢的强度及耐大气腐蚀性能^[5]。因此,由于生产原料不纯、生产设备腐蚀及生产工艺等原因,都会使培养基中金属离子超标。由此,研究金属离子对菌株生长及产物的影响,对其今后用于工业化生产是非常有必要的。本文以AA产量及菌体生物量为主要指标来确定金属离子的最适添加量;另外, $\Sigma C18/\Sigma C16$ 为脂肪酸合成过程中16C向18C延长作用的一个重要指标^[6],PUFA(the content of polyunsaturated fatty acid)、IUFA(the index of unsaturated fatty acid)两者都能反映出脂肪酸组分中不饱和脂肪酸含量的高低^[7]。因此,结合 $\Sigma C18/\Sigma C16$ 、PUFA、IUFA指标来考察金属离子对轮梗霉脂肪酸合成过程中碳链延长和脱饱和作用的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种 轮梗霉(*Diasporangium* sp.)系本实验室分离纯化并保藏。

1.2 培养条件

活化斜面: PDA 固体斜面。

种子培养液: 葡萄糖 20g/L、 $(NH_4)_2SO_4$ 2g/L、 KNO_3 2g/L、 KH_2PO_4 2g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3g/L、NaCl 0.1g/L、酵母膏 0.2g/L、蛋白胨 0.1g/L, 加去离子水至 1000ml。装液量为 100ml/250ml 三角瓶。

发酵培养液: 在种子培养液的基础上加上相应离子浓度的无机盐。其中 Ca^{2+} 取 $CaCl_2$, Zn^{2+} 取 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, Mn^{2+} 取 $MnSO_4 \cdot H_2O$, Fe^{3+} 取 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, Cu^{2+} 取 $CuSO_4 \cdot 7H_2O$, Co^{2+} 取 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 。装液量为 50ml/250ml 三角瓶。

1.3 菌丝发酵和收获 将保藏菌种转接到 PDA 斜面, 25℃ 生长 3d, 倒入无菌去离子水, 刮取菌丝, 转接入种子培养液, 25℃, 120r/min 发酵培养 3d, 以 10% 的接种量接种到发酵培养液, 相同条件培养 6d, 用烘干的滤纸过滤菌丝, 以蒸馏水洗涤三次。

1.4 生物量测定 将收获的菌丝于 100℃ 2h 烘干后称重, 得到的干菌丝重量作为生物量。

1.5 脂肪酸测定及分析方法

具体操作参见文献[3]。AA 产量用标准物添加法^[8], 以硬脂酸作为添加物来进行定量。PUFA 和 IUFA 按照文献[7]方式计算。

2 结果与分析

2.1 Ca^{2+} 对轮梗霉的影响

取 Ca^{2+} 梯度为 10^{-4} 、 5×10^{-4} 、 10^{-3} 、 5×10^{-3} 、 10^{-2} mol/L。 Ca^{2+} 的存在对 AA 产量有抑制作用(图 1b), 在 Ca^{2+} 浓度为 10^{-2} mol/L 时抑制作用达到最大, 为 78.15%。其中 Ca^{2+}

浓度为 10^{-3} mol/L 时, AA 产量在添加了 Ca^{2+} 的实验组中为最大, 但抑制率也有 57.52%, 但此时的生物量为添加钙离子后最低的。在所取的 Ca^{2+} 浓度范围内, 生物量呈逐渐升高的趋势(图 1a), 但变化幅度不是很大, 同样生物量最大值出现在 Ca^{2+} 浓度为 10^{-2} mol/L 时, 但也仅比空白增加 21.41%。 $\Sigma C18/\Sigma C16$ 、PUFA、IUFA 与 AA 产量的变化趋势相似(表 1)。

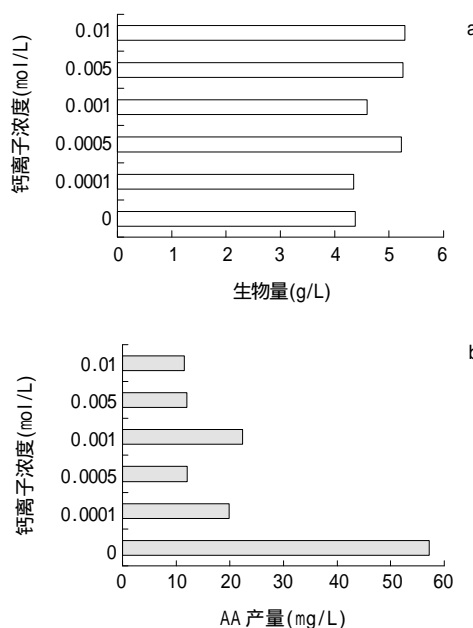


图1 Ca^{2+} 对轮梗霉生物量及 AA 产量的影响

Fig.1 The effects of Ca^{2+} on the biomass and the arachidonic acid yield of *Diasporangium* sp.

从各脂肪酸的含量来分析, 钙离子有助于饱和及单不饱和脂肪酸含量的提高, 而对多不饱和脂肪酸有一定的抑制作用。从菌体形态来看, 培养液中菌球体积随钙离子浓度的增加而变大。Braun 等人证明钙离子能导致菌丝聚集和菌球形成^[9]; Kenichi Higashiyama 等的研究^[10]也表明在培养 *Mortierella alpin* 1S-4 的发酵罐中只添加 $CaCl_2$ 使菌球增加, 菌球体积增大, 发酵液粘度下降, 并认为菌球是物质转化的限制因素, 它引起了沿菌球细胞壁形成营养和氧气的梯度, 从而引起 AA 产量的下降。本实验得到了相同的菌丝聚集、菌球增大、AA 产量下降的结果。

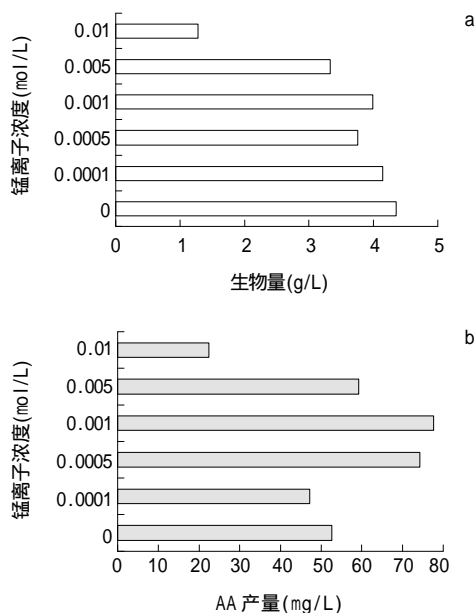
2.2 Mn^{2+} 对轮梗霉的影响

取 Mn^{2+} 梯度为 5×10^{-5} 、 10^{-4} 、 5×10^{-4} 、 10^{-3} 、 5×10^{-3} mol/L。在 10^{-3} mol/L 浓度范围内, Mn^{2+} 对轮梗霉产 AA 有一定的促进作用(图 2a), 其中 Mn^{2+} 浓度为 5×10^{-4} mol/L 时 AA 产量达到最大, 比对照提高 47.68%, 5×10^{-3} mol/L Mn^{2+} 对 AA 产量有抑制作用, 使 AA 产量降低 57.42%。在所试验的浓度范围内, Mn^{2+} 对轮梗霉

表1 Ca^{2+} 对轮梗霉脂肪酸组成的影响(mol%)Table 1 The effects of Ca^{2+} on the fatty acid composition(mol%) of *Diasporangium* sp.

	钙离子浓度($\times 10^{-2}\text{mol/L}$) The concentration of Ca^{2+} ion($\times 10^{-2}\text{mol/L}$)					
	0	0.01	0.05	0.1	0.5	1
14:0	15.31	11.18	15.67	13.57	15.40	16.68
16:0	12.32	10.90	13.55	13.41	16.87	17.18
16:1	2.06	1.37	2.42	2.82	3.10	3.30
18:0	1.30	0.90	0.97	1.62	1.56	1.69
18:1	20.01	15.61	20.72	22.37	26.40	25.70
18:2	11.41	11.13	11.49	10.91	9.80	9.62
18:3(γ -)	1.08	0.93	0.93	0.96	1.06	1.00
18:3(α -)	0.52	0.43	0.29	0.43	0.38	0.52
20:3	8.51	7.26	4.69	7.61	6.16	5.43
20:4	18.16	20.18	21.01	19.75	9.94	9.72
20:5	5.21	11.87	5.20	3.33	2.59	2.42
其他	4.11	8.26	3.07	3.23	6.73	6.76
$\Sigma \text{C18}/\Sigma \text{C16}$	2.39	2.36	2.15	2.24	1.96	1.88
PUFA	44.88	51.80	43.61	42.98	29.93	28.70
IUFA	178.00	213.42	176.93	172.87	131.36	126.79

14:0: 豆蔻酸; 16:0: 棕榈酸; 16:1: 棕榈油酸; 18:0: 硬脂酸; 18:1: 油酸; 18:2: 亚油酸; 18:3(γ -): γ -亚麻酸; 18:3(α -): α -亚麻酸; 20:3: 二十碳三烯酸; 20:4: 花生四烯酸; 20:5: EPA; $\Sigma \text{C16}=16:0+16:1$; $\Sigma \text{C18}=18:0+18:1+18:2+18:3(\gamma-)+18:3(\alpha-)$; PUFA Polyunsaturated fatty acid IUFA=16:1+18:1+18:2 \times 2+18:3(γ -) \times 3+18:3(α -) \times 3+20:3 \times 3+20:4 \times 4+20:5 \times 5+其他。

图2 Mn^{2+} 对轮梗霉生物量及AA产量的影响Fig.2 The effects of Mn^{2+} on the biomass and arachidonic acid yield of *Diasporangium* sp.

的生长有抑制作用(图2b), 在 $5 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 以下影响还不是很大, 在13.62%的范围之内。 Mn^{2+} 浓度为 $5 \times 10^{-3}\text{mol/L}$ 时, 抑制作用明显, 抑制率达70.76%。 $\Sigma \text{C18}/\Sigma \text{C16}$ 、PUFA、IUFA与生物量的变化趋势相反(表2), 抑制轮

梗霉生长的 Mn^{2+} 浓度对脂肪酸的不饱和程度却有促进作用。前人研究油脂酵母^[11]中 10mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (约 10^{-4}mol/L)的缺乏不利于菌体的生长和油脂产量的积累; 而且锰的不足将减少裸藻属的n-3系列多不饱和脂肪酸的合成^[12]。本实验中, 锰的添加引起了菌体生物量的抑制, 而属于n-6系列多不饱和脂肪酸的AA产量却是增加, 对碳链延长及脱饱和作用也有一定的促进作用, 锰对轮梗霉产AA的促进作用可能还存在着其他机制。

表2 Mn^{2+} 对轮梗霉脂肪酸组成的影响(mol%)Table 2 The effects of Mn^{2+} on the fatty acid composition(mol%) of *Diasporangium* sp.

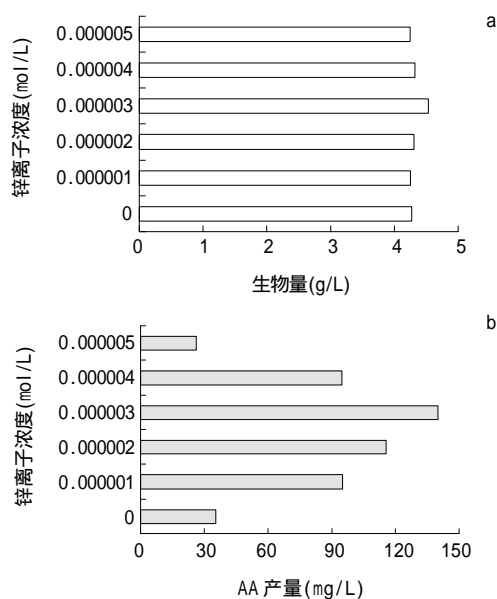
	锰离子浓度($\times 10^{-3}\text{mol/L}$) The concentration of Mn^{2+} ion($\times 10^{-3}\text{mol/L}$)					
	0	0.05	0.1	0.5	1	5
14:0	15.94	15.13	20.92	14.09	9.84	6.06
16:0	14.57	14.03	16.28	14.42	11.11	11.80
16:1	1.67	2.26	2.02	1.77	1.36	1.57
18:0	1.25	1.10	1.26	1.76	1.54	2.11
18:1	22.64	20.34	21.04	22.76	17.50	17.27
18:2	12.17	11.56	12.16	11.83	10.67	13.22
18:3(γ -)	1.16	1.31	1.15	0.98	1.12	1.07
18:3(α -)	0.36	0.52	0.45	0.51	0.45	0.74
20:3	4.95	3.65	3.43	3.92	4.67	3.39
20:4	9.36	11.25	7.68	10.94	14.30	14.96
20:5	4.01	3.87	2.79	4.93	4.21	6.58
其他	11.93	14.99	10.83	12.09	23.23	21.23
$\Sigma \text{C18}/\Sigma \text{C16}$	2.31	2.14	1.97	2.34	2.51	2.58
PUFA	32.01	32.15	27.66	33.12	35.42	39.97
IUFA	137.48	141.46	117.95	144.94	160.41	174.85

14:0: 豆蔻酸; 16:0: 棕榈酸; 16:1: 棕榈油酸; 18:0: 硬脂酸; 18:1: 油酸; 18:2: 亚油酸; 18:3(γ -): γ -亚麻酸; 18:3(α -): α -亚麻酸; 20:3: 二十碳三烯酸; 20:4: 花生四烯酸; 20:5: EPA; $\Sigma \text{C16}=16:0+16:1$; $\Sigma \text{C18}=18:0+18:1+18:2+18:3(\gamma-)+18:3(\alpha-)$; PUFA Polyunsaturated fatty acid IUFA=16:1+18:1+18:2 \times 2+18:3(γ -) \times 3+18:3(α -) \times 3+20:3 \times 3+20:4 \times 4+20:5 \times 5+其他。

2.3 Zn^{2+} 对轮梗霉的影响

在做预实验时发现, Zn^{2+} 在 10^{-5}mol/L 甚至更低浓度时就有抑制作用, 于是就选取 1×10^{-6} 、 2×10^{-6} 、 3×10^{-6} 、 4×10^{-6} 、 $5 \times 10^{-6}\text{mol/L}$ 的锌离子浓度梯度, 在这一范围内, 生物量的变化不大(图3a), 最高出现在 $3 \times 10^{-6}\text{mol/L}$ 时, 生物量比对照高5.81%, $5 \times 10^{-6}\text{mol/L}$ 时的抑制率也仅为0.63%。而AA产量的变化却很大(图3b), 在 $1 \times 10^{-6} \sim 4 \times 10^{-6}\text{mol/L}$ 的范围内都有促进作用, $3 \times 10^{-6}\text{mol/L}$ 时达最大, 比对照高296.96%, 浓度达 $5 \times 10^{-6}\text{mol/L}$ 时有一定的抑制作用。 $\Sigma \text{C18}/\Sigma \text{C16}$ 、PUFA、IUFA的变化趋势与AA产量的相反(表3)。

有研究表明, 低浓度锌对脱饱和酶是一种激活剂^[13], 而且能促进n-3系列多不饱和脂肪酸产量^[14], 同时对拉曼被孢霉^[13]、被孢霉^[15]、油脂酵母^[11]、海洋酵母^[14]的生长有促进作用, 而对深黄被孢霉除可显著提高油

图3 Zn²⁺对轮梗霉生物量及AA产量的影响Fig.3 The effects of Zn²⁺ on the biomass and arachidonic acid yield of *Diasporangium* sp.

脂的碘值(与IUFA同)外,对其他影响甚微^[16];Max^[17]也认为脱饱和酶的活性及其生物合成与锌有关。本实验结果中,锌对AA产量的促进,同时对PUFA、IUFA的抑制,而对生物量没有太大影响,可能是锌对特定的脱饱和酶有促进作用。

表3 Zn²⁺对轮梗霉脂肪酸组成的影响(mol%)Table 3 The effects of Zn²⁺ on the fatty acid composition(mol%) of *Diasporangium* sp.

	锌离子浓度($\times 10^{-6}$ mol/L)					
	The concentration of Zn ²⁺ ion($\times 10^{-6}$ mol/L)					
	0	1	2	3	4	5
14:0	8.86	16.00	12.56	19.08	16.31	12.34
16:0	12.59	20.84	20.18	23.53	21.59	16.50
16:1	1.71	1.77	2.18	1.94	1.86	1.48
18:0	1.41	3.47	4.29	3.37	5.54	3.83
18:1	23.40	22.65	22.33	19.49	21.99	22.49
18:2	9.68	10.02	8.08	8.76	8.19	9.83
18:3(γ -)	1.78	1.87	0.83	1.16	1.00	1.54
18:3(α -)	0.78	0.60	0.56	0.16	0.18	0.45
20:3	3.09	4.38	5.15	4.02	3.99	6.01
20:4	8.66	6.51	6.61	3.88	6.28	8.96
20:5	3.08	1.83	1.64	3.00	1.84	4.18
其他	24.96	10.06	15.58	11.61	11.22	12.39
Σ C18/ Σ C16	2.59	1.71	1.61	1.29	1.57	2.12
PUFA	27.07	25.21	22.88	20.97	21.49	30.98
IUFA	136.42	110.28	110.55	97.09	101.32	136.78

14:0: 豆蔻酸; 16:0: 棕榈酸; 16:1: 棕榈油酸; 18:0: 硬脂酸; 18:1: 油酸; 18:2: 亚油酸; 18:3(γ -): γ -亚麻酸; 18:3(α -): α -亚麻酸; 20:3: 二十碳三烯酸; 20:4: 花生四烯酸; 20:5: EPA; Σ C16=16:0+16:1; Σ C18=18:0+18:1+18:2+18:3(γ -)+18:3(α -); PUFA Polyunsaturated fatty acid IUFA=16:1+18:1+18:2+18:3(γ -)+18:3(α -)+18:3(α -)+3+20:3+3+20:4+4+20:5+5+其他。

2.4 Fe³⁺对轮梗霉的影响

在 $10^{-5} \sim 10^{-3}$ mol/L浓度范围内,AA产量受Fe³⁺的抑制,Fe³⁺浓度为 10^{-3} mol/L时,AA等多种多不饱和脂肪酸已经检测不到。而低浓度Fe³⁺对菌体生长有促进作用,Fe³⁺浓度为 5×10^{-5} mol/L时,生物量比对照提高101.47%,为实验组最大值,浓度达到 5×10^{-4} mol/L时生长受抑制,生物量急剧下降,当浓度为 10^{-3} mol/L时生物量仅为对照的9.02%。 Σ C18/ Σ C16、PUFA、IUFA的变化趋势与AA产量的变化相似(表4)。

表4 Fe³⁺对轮梗霉脂肪酸组成(mol%)、AA产量及生物量的影响Table 4 The effects of Fe³⁺ on the fatty acid composition(mol%), arachidonic acid yield and biomass of *Diasporangium* sp.

	铁离子浓度($\times 10^{-3}$ mol/L)					
	The concentration of Fe ³⁺ ion($\times 10^{-3}$ mol/L)					
	0	0.01	0.05	0.1	0.5	1
Σ C18/ Σ C16	2.25	2.07	2.16	2.03	2.31	2.01
PUFA	27.34	22.53	17.76	19.32	13.52	7.69
IUFA	131.08	118.46	104.42	114.39	108.68	85.51
AA产量(mg/L)	38.07	18.49	9.55	33.94	0.83	0
AA yield(mg/L)	38.07	18.49	9.55	33.94	0.83	0
生物量(g/L)	4.08	7.21	8.22	6.68	0.69	0.37
Biomass(g/L)	4.08	7.21	8.22	6.68	0.69	0.37

Σ C16=16:0+16:1; Σ C18=18:0+18:1+18:2+18:3(γ -)+18:3(α -); PUFA Polyunsaturated fatty acid IUFA=16:1+18:1+18:2+18:3(γ -)+18:3(α -)+18:3(α -)+3+20:3+3+20:4+4+20:5+5+其他。

殷春涛等^[18]研究表明缺Fe²⁺时钝顶螺旋藻(*Sp*)NS-90020的GLA相对含量略有升高,而且铁对球等鞭金藻的生长速度有促进作用^[19]。铁对菌体生长有促进作用而对多不饱和脂肪酸产量有抑制作用,本文结果与之相似。

2.5 Cu²⁺对轮梗霉的影响

添加一定量的Cu²⁺对轮梗霉生长及产AA有促进作用。Cu²⁺浓度为 5×10^{-6} mol/L时,AA产量达到最大,比对照高124.84%。同时菌体生物量达到最大,比对照高18.23%。Cu²⁺浓度达 10^{-5} mol/L时仍对菌体有促进作用。 Σ C18/ Σ C16相互间的变化幅度不大,PUFA、IUFA的变化趋势与生物量及AA产量的变化趋势相同(表5)。Cu²⁺促进了菌体整体的生长,且对脱饱和作用有一定的促进作用。低浓度Cu²⁺对被孢霉生长有刺激作用,有利于细胞中油脂的积累,而且直接参与脂肪酸的脱饱和作用^{[13][15]},Cu²⁺还影响n-3系列多不饱和脂肪酸的产量^[14]。本实验结果与前人研究的相似。

2.6 Co²⁺对轮梗霉的影响

低浓度Co²⁺对轮梗霉产AA有一定的促进作用,Co²⁺浓度为 10^{-7} mol/L时,AA产量比对照高18.55%,为实验组最大,AA的形成对Co²⁺还是较为敏感的,在浓度达 5×10^{-7} mol/L时AA产量就出现抑制现象。轮梗霉生长对Co²⁺的敏感性就较低,浓度达到 5×10^{-6} mol/L时Co²⁺的抑制作用才很明显, 5×10^{-6} mol/L时的抑制率为

表5 Cu^{2+} 对轮梗霉脂肪酸组成(mol%)、AA产量及生物量的影响
Table 5 The effects of Cu^{2+} on the fatty acid composition(mol%), arachidonic acid yield and biomass of *Diasporangium* sp.

	铜离子浓度($\times 10^{-5}\text{mol/L}$) The concentration of Cu^{2+} ion($\times 10^{-5}\text{mol/L}$)					
	0	0.01	0.05	0.1	0.5	1
$\Sigma \text{C18}/\Sigma \text{C16}$	2.17	1.94	2.17	1.91	2.34	2.23
PUFA	19.48	17.82	18.19	20.37	28.73	24.14
IUFA	109.65	103.39	106.82	108.44	133.49	120.23
AA产量(mg/L)	46.90	63.27	71.61	72.23	105.45	89.88
AA yield(mg/L)	46.90	63.27	71.61	72.23	105.45	89.88
生物量(g/L)	4.34	4.29	4.62	4.67	5.13	4.53
Biomass(g/L)	4.34	4.29	4.62	4.67	5.13	4.53

$\Sigma \text{C16}=16:0+16:1$; $\Sigma \text{C18}=18:0+18:1+18:2+18:3(\gamma-)+18:3(\alpha-)$; PUFA: Polyunsaturated fatty acid IUFA=16:1+18:1+18:2+2+18:3(γ -) $\times 3+18:3(\alpha-)\times 3+20:3\times 3+20:4\times 4+20:5\times 5+$ 其他。

76.11%, 10^{-5}mol/L 时的抑制率为 86.67%, 此外生物量与 AA 产量的变化趋势还是基本相似的, 低浓度 Co^{2+} 对轮梗霉的生物量也有一定的促进作用, Co^{2+} 浓度为 10^{-7}mol/L 时生物量达最大, 比对照高 16.11%。 $\Sigma \text{C18}/\Sigma \text{C16}$ 、PUFA、IUFA 的变化趋势与生物量的一致(表 6)。 Co^{2+} 对不饱和脂肪酸合成过程中脱饱和反应确实有一定的促进作用, 与 Martin C.E^[4]的研究结果一致。缺 Co^{2+} 还不利于油脂酵母菌体的生长和油脂的积累^[11], 本文结果与之相似。

表6 Co^{2+} 对轮梗霉脂肪酸组成(mol%)、AA产量及生物量的影响
Table 6 The effects of Co^{2+} on the fatty acid composition(mol%), arachidonic acid yield and biomass of *Diasporangium* sp.

	钴离子浓度($\times 10^{-5}\text{mol/L}$) The concentration of Co^{2+} ion($\times 10^{-5}\text{mol/L}$)					
	0	0.01	0.05	0.1	0.5	1
$\Sigma \text{C18}/\Sigma \text{C16}$	2.77	2.83	3.02	3.90	2.10	2.57
PUFA	32.45	41.87	35.21	34.75	22.48	19.63
IUFA	144.08	178.80	151.46	156.90	119.36	121.14
AA产量(mg/L)	35.51	42.10	27.38	11.99	9.68	5.36
AA yield(mg/L)	35.51	42.10	27.38	11.99	9.68	5.36
生物量(g/L)	3.60	4.18	3.98	3.88	0.86	0.48
Biomass(g/L)	3.60	4.18	3.98	3.88	0.86	0.48

$\Sigma \text{C16}=16:0+16:1$; $\Sigma \text{C18}=18:0+18:1+18:2+18:3(\gamma-)+18:3(\alpha-)$; PUFA: Polyunsaturated fatty acid IUFA=16:1+18:1+18:2+2+18:3(γ -) $\times 3+18:3(\alpha-)\times 3+20:3\times 3+20:4\times 4+20:5\times 5+$ 其他。

3 讨论

金属离子对丝状真菌的生长及产不饱和脂肪酸的作用有多个方面, 离子不仅影响菌体细胞渗透压、物质运输、微环境的酸碱度, 而且调控酶的活性从而调节代谢的途径等。有几种金属离子(Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+})可促进微生物中脂肪酸的合成, 其中 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 金属离子作为生物必需的微量元素参与氧化还原的酶反应, 对氧的运输有一定的作用, 对 PUFA 合成中的脱氢酶活

性十分重要, 此外对菌体的生长也有一定影响; Ca^{2+} 和多聚阳离子^[10]能导致菌丝聚集和菌球形成, 改变菌丝状态, 从而影响溶液的流动状态, 对菌体产不饱和脂肪酸也有一定的影响。此外有报道^[20]称金属元素 Fe、Cu、Mg、Mn、Zn、Co 是 PUFA 合成酶的重要组成成分, 有利于提高关键酶的活性, 增加多不饱和脂肪酸的产量。

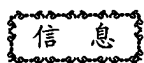
本实验中 Ca^{2+} 浓度在 $10^{-4}\sim 10^{-2}\text{mol/L}$ 范围内对菌体生长有促进作用, 而且有助于饱和及单不饱和脂肪酸含量的提高, 但对多不饱和脂肪酸都有一定的抑制作用。 Mn^{2+} 在 10^{-3}mol/L 浓度范围内, 对轮梗霉产 AA 有一定的促进作用, 其中浓度为 $5\times 10^{-4}\text{mol/L}$ 时 AA 产量达到最大, 但在 $5\times 10^{-5}\sim 5\times 10^{-3}\text{mol/L}$ 的浓度范围内, Mn^{2+} 对轮梗霉的生长都有抑制作用, 10^{-3}mol/L 及以上时, 抑制作用尤为明显, Mn^{2+} 对脂肪酸合成的脱饱和有一定的促进作用。 Zn^{2+} 在 $1\times 10^{-6}\sim 4\times 10^{-6}\text{mol/L}$ 的范围内对 AA 产量都有促进作用, $3\times 10^{-6}\text{mol/L}$ 时达最大, 而在这一范围内, 生物量的变化不大, Zn^{2+} 对菌体产 AA 的促进作用既不是菌体总体量的增加, 也不是脱饱和作用的增强, 可能还存在着其他的促进机制。 Fe^{3+} 在 $10^{-5}\sim 10^{-3}\text{mol/L}$ 范围内, 低浓度对菌体生长有促进作用, 浓度为 $5\times 10^{-5}\text{mol/L}$ 时, 生物量为实验组最大值, 浓度达到 $5\times 10^{-4}\text{mol/L}$ 时生长受抑制, 而 AA 产量在所选取的 Fe^{3+} 浓度范围内都受其抑制, Fe^{3+} 对 AA 的抑制表现在其对脂肪酸合成过程中碳链延长和脱饱和作用的抑制。 Cu^{2+} 浓度在 $10^{-7}\sim 10^{-5}\text{mol/L}$ 范围内对轮梗霉生长及产 AA 都有促进作用, Cu^{2+} 浓度为 $5\times 10^{-6}\text{mol/L}$ 时菌体生物量和 AA 产量同时达到最大, Cu^{2+} 对菌体的影响有一个整体促进的作用, 除对碳链延长作用不大, 菌丝生长、AA 产量、不饱和指数都呈现出低浓度促进, 高浓度抑制的现象。 Co^{2+} 在 $10^{-7}\sim 10^{-5}\text{mol/L}$ 浓度范围内, 低浓度对轮梗霉的生长及产 AA 有一定的促进作用, 10^{-7}mol/L 时生物量达最大, 同时 AA 产量达最大, AA 对 Co^{2+} 的敏感性较大, 浓度为 $5\times 10^{-7}\text{mol/L}$ 时就出现抑制, 而生物量在 $5\times 10^{-6}\text{mol/L}$ 时才表现出抑制作用, Co^{2+} 对不饱和脂肪酸合成过程中脱饱和反应有一定的促进作用。

在整个脂肪酸的代谢过程中, 从葡萄糖到多不饱和脂肪酸的合成过程中涉及到多种酶, 各种金属离子影响的可能是不同的酶促反应, 而且相互之间可能存在协同作用, 前人也多是研究多种离子对菌体生长、脂含量及多不饱和脂肪酸产量的共同作用^[20~22]。因此我们拟进一步在此基础上研究各种金属离子的最佳配比添加量, 以实现菌体生物量和 AA 产量的最大。

参考文献:

- [1] Nelson NA, Kelly RC, Jognson RA. Prostaglandins and the arachidonic cascade[J]. Chemical and Engineering News,

- 1982, 60: 1-15.
- [2] 朱敏, 余龙江, 吴元喜. 二十二碳六稀酸和花生四稀酸在婴儿配方奶粉中的应用[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(4): 22-25.
- [3] 刘吉华, 袁生, 戴传超. 二十碳五稀酸等多不饱和脂肪酸高产菌的筛选[J]. 菌物系统, 2000, 19(3): 407-409.
- [4] Martin C E, Oh C S, Knadasamy P, et al. Yeast desaturase [J]. Biochemical Society Transactions, 2002, 30: 1080-1082.
- [5] 华南工学院, 大连轻工业学院, 天津轻工业学院, 等. 发酵工程与设备[M]. 轻工业出版社, 1985. 422-450.
- [6] 戴传超, 李霞, 史央. ω -3多不饱和脂肪酸发酵生产中两个调控指标的探讨[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(3): 4-5,9.
- [7] Choi S Y, D D w Ryu, J S Rhee. Production of microbial lipid: effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*[J]. Biotechnol Bioeng, 1992, 24: 1165-1172.
- [8] 天津轻工业学院, 大连轻工业学院, 无锡轻工业学院, 等. 工业发酵分析[M]. 轻工业出版社, 1980. 326-335.
- [9] Braun S, S E Vecht-lifshitz. Mycelial morphology and metabolite production[J]. Trends in Biotechnol, 1991, (9): 63-68.
- [10] Kenichi Higashiyama, Toshiaki Yaguchi, Kengo Akimoto, et al. Effects of mineral addition on the growth morphology of and Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* IS-4 [J]. JAOCs, 1998, 75(12): 1815-1819.
- [11] 刘淑君, 杨文博, 施安辉. 高产油脂酵母菌选育及摇瓶发酵条件的研究[J]. 微生物学通报, 2000, 27(2): 93-97.
- [12] 徐天宇. 利用生物技术生产廿碳五稀酸和廿碳六稀酸[J]. 食品与发酵工业, 1995, 21(1): 56-65.
- [13] 杨革, 王玉萍, 李翔太, 等. 铜与锌对拉曼被孢霉的生长、油脂及花生四稀酸合成的影响[J]. 药物生物技术, 1998, 5(1): 21-24.
- [14] 吴格天, 马悦欣, 童圣英, 等. 培养基对海洋酵母脂肪酸组成的影响[J]. 大连水产学院学报, 2000, 15(1): 17-22.
- [15] 杨革, 王玉萍, 李翔太, 等. 多价不饱和脂肪酸发酵条件的初步研究[J]. 食品与发酵工业, 1997, 23(2): 8-13.
- [16] 黄建忠, 施巧琴, 周晓兰, 等. 提高深黄被孢霉菌丝细胞油脂合成总量及其不饱和脂肪酸含量的研究[J]. 食品与发酵工业, 1998, 24(2): 27-31.
- [17] Max J J. Fatty acid production characteristics of fungi with particular emphasis on gamma linoleic acid production[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1993, 42: 625-634.
- [18] 殷春涛, 胡鸿钧, 龚小敏, 等. 培养条件对钝顶螺旋藻(Sp) NS-90020脂肪酸组成和含量的影响[J]. 武汉植物学研究, 1997, 15(1): 59-65.
- [19] 樊云真, 刘发义, 李荷芳. 海洋微藻高度不饱和脂肪酸的研究 II, 环境因子对球等鞭金藻3011中高度不饱和脂肪酸含量的影响[J]. 海洋科学集刊, 1998, 40: 155-160.
- [20] J D Weete, H Kim, S R Gandhi, et al. Lipids and ultrastructure of *Thraustochytrium* sp[J]. ATCC26185. Lipids, 1997, 32(8): 839-845.
- [21] 鲍时翔, 朱法科, 林炜铁, 等. 被孢霉菌发酵生产花生四稀酸的研究[J]. 微生物学报, 1997, 37(5): 374-377.
- [22] 吴克刚, 杨连生. 利用海生真菌发酵生产DHA研究概况[J]. 海洋科学, 2000, 24(7): 19-21.



意大利刮拉瓶盖公司研制出“人造瓶塞”

据悉,意大利刮拉瓶盖股份公司(Guala Group)成功研制开发出一种人造瓶塞Guala Seal Elite。

Guala Seal Elite是一种人造成木塞,具有传统软木塞的外观和质地。葡萄酒在瓶中陈熟的过程中,传统软木塞有可能带来污染,而这种人造木塞则可以克服这一系列酿造老问题,从而降低损失。

Guala Seal Elite由三种成分组成。瓶塞底架是由高硬度的 techno-polymer 制成,塞体则是由泡沫热塑性弹性体构成,可以与玻璃形成良好的结合;而位于瓶塞顶部底端的护罩也是由 techno-polymer 组成,这主要是利用其化学惰性。研究人员对这种瓶塞做了详尽的陈酿试验,结果表明这种瓶塞性能良好。这项生产技术已经得到了麻省理工学院(MIT)的认证许可。

Guala Seal Elite不同于其它合成塞,它允许微量的氧气进入酒瓶中,而现在这被认为在葡萄酒的长期成熟过程中具有很重要的作用。此外,酿酒师还可以根据自己的需要调节瓶塞的渗透性。Guala Seal Elite可以利用传统的打塞设备进行打塞。