

植物油对被孢霉菌发酵生产花生四烯酸的影响

林炜铁, 朱敏

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510006)

摘要: 研究了四种植物油(豆油、棕榈油、花生油、芝麻油)对被孢霉菌发酵生产花生四烯酸(Arachidonic acid, AA)的影响。结果表明:(1)四种植物油显著促进了菌体油脂的积累;(2)被孢霉生长在以植物油为唯一碳源的培养基上时,菌体油脂中的AA含量比以葡萄糖为碳源时显著下降;生长在以植物油和葡萄糖为混合碳源的培养基上时,与以葡萄糖为碳源相比油脂中的AA含量仍然下降,但比生长在以植物油为唯一碳源时AA含量有所提高。说明这四种植物油对花生四烯酸的合成有抑制作用。(3)菌体油脂成分与培养基中植物油的油脂成分有一定的相似性。

关键词: 被孢霉; 花生四烯酸合成; 植物油

中图分类号: TQ645.7; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)11-0015-04

Effect of Vegetable Oils Addition on Arachidonic Acid Production

by *Mortierella* sp.

LIN Wei-tie, ZHU Min

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The Effects of addition of four kinds of vegetable oils (soybean oil, palm oil, peanut oil and sesame oil) on arachidonic acid production by *Mortierella* sp. were studied. The results indicated that vegetable oils markedly enhanced the mycelial lipid accumulation. When *Mortierella* sp. was cultured in medium with vegetable oils as single carbon source, arachidonic acid content in lipids of the fungi greatly decreased compared with that using glucose as single carbon source. For that cultured in medium with vegetable oil and glucose as carbon sources, the arachidonic acid content was also lower than that using glucose as single carbon source, but higher than that using vegetable oils as carbon source. These pheromones indicated that vegetable oils inhibited the biosynthesis of arachidonic acid. In addition, the composition of the mycelia lipid was similar to the vegetable oil added in the medium.

Key words: *Mortierella* sp.; arachidonic acid synthesis; vegetable oil

花生四烯酸是属于n-6系列的一种多不饱和脂肪酸,与人体健康有着密切的关系,是人体前列腺素和白三烯等合成的重要前体物质,在降血脂血糖、抗炎症、抗脂质氧化、促进胎儿发育等方面具有独特的生物活性^[1],从而受到医药、生物、化妆品等领域的重视。花生四烯酸的天然来源有限,主要来源于动物肾上腺、肝、沙丁鱼等,其产量难以满足社会需要。国外利用微生物技术发酵生产花生四烯酸已有了很大的发展^[2];国内很多学者也进行了这方面的研究,鲍时翔等^[3]首次采用被孢霉发酵产生花生四烯酸,黄惠琴等^[4]、周蓬蓬等^[5]对被孢霉菌产生花生四烯酸的工艺激发酵条件进行了研究和优化。

根据文献^[6]报道,植物油对被孢霉积累油脂,尤其是含多不饱和脂肪酸的油脂是有促进作用的,并作

收稿日期: 2007-07-20

作者简介: 林炜铁, 副教授

为提高产量的一个方法,因此外源植物油转化为目的产物引起了人们的浓厚兴趣。本文研究了四种植物油对被孢霉中花生四烯酸合成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株: 被孢霉(*Mortierella* sp.) M10, 华南理工大学发酵工程博士点实验室保存。植物油(见表1)。

表1 植物油的脂肪酸成分/%

Table 1 Fatty acid composition of vegetable oils

植物油	棕榈酸	硬脂酸	油酸+亚油酸	α -亚麻酸
棕榈油	44.6	4.5	44.6	--
豆油	10.5	4.7	81.5	2.0
花生油	12.2	4.7	82.6	--
芝麻油	10.3	5.9	81.5	--

注: 因采用非极性固定相, 未能使 18:1、18:2 峰分开。

1.2 培养基

斜面培养基: 蔡氏培养基。

1.3 摇瓶培养基

葡萄糖5%, 酵母膏0.5%, NaNO₃ 0.3%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, KCl 0.05%, FeSO₄·7H₂O 0.01%, pH 6.0。

1.4 菌体培养与收集

1.4.1 菌种活化

将保存菌种转接到斜面培养基上, 28 °C培养10~14 d。

1.4.2 摇瓶培养

250 mL三角瓶中装50 mL培养基, 孢子斜面用加1滴吐温80的50 mL无菌水洗脱, 接入摇瓶, 140 r/min, 28 °C条件下培养5 d。

1.4.3 菌体收集

对发酵液进行抽滤, 菌丝先以蒸馏水冲洗, 然后用吐温80 (0.5%) 洗涤, 再用乙醇 (95%) 洗涤, 最后用蒸馏水冲洗, 80 °C烘干。

1.5 分析方法

1.5.1 油脂抽提: 见文献^[7], 略有修改。

1.5.2 发酵液残糖测定: 采用费林试剂法^[8]。

1.5.3 油脂成分分析

采用 KOH-CH₃OH 酯交换法^[9]处理样品, 用惠普 5890SERIES II 气相色谱仪分析菌体油脂及植物油成分。

检测器: FID; 色谱柱: 毛细管柱 30 m×0.25 mm, HP 5% PHMEsiloxane; 载气: N₂, 410 mL/min; H₂, 50 mL/min; 柱前压: 15 psi; 柱温: 240 °C; 进样器温度: 280 °C; 检测器温度: 290 °C; 采用分流进样。

2 结果与讨论

2.1 以植物油为唯一碳源时对菌体生长和 AA 形成的影响

以 4%植物油为唯一碳源培养被孢霉的结果见表 2。从表 2 知, 被孢霉能生长在以植物油为唯一碳源的培养基中, 说明被孢霉有分解植物油的酶系, 为菌体生长提供能源。菌体得率不如以葡萄糖为碳源高, 可见植物油不是被孢霉生长的最佳碳源, 或者是因为植物油上生长时溶氧受到限制。油脂含量有很大提高, 说明植物油对油脂积累有利。这些植物油中都不含有花生四烯酸, 但利用这些植物油可产含花生四烯酸的油脂, 但油脂中的花生四烯酸含量与生长在葡萄糖上相比显著下降, 花生四烯酸得率降低。比较葡萄糖和脂肪酸的代谢方式的差异, 可能是植物油中生长的被

孢霉菌缺少合成花生四烯酸的辅酶因子, 或者是植物油抑制了花生四烯酸合成所需的酶。

表 2 植物油为唯一碳源时对菌体生长和 AA 形成的影响

Table 2 Effect of oils as sole carbon sources on growth and AA formation

碳源	菌体得率 /(g/L)	菌体中油 脂含量/%	油脂得率 /(g/L)	油脂中 AA 含量 (%)	AA 得率 /(g/L)
葡萄糖	12.9	24.0	3.1	10.8	0.34
豆油	8.7	49.5	4.3	3.3	0.14
棕榈油	9.8	49.0	4.8	2.2	0.15
花生油	9.5	50.5	4.8	3.0	0.14
芝麻油	9.7	51.2	5.0	1.8	0.09

2.2 混合碳源对菌体生长和 AA 形成的影响

当以 2%植物油和 3%葡萄糖为混合碳源培养被孢霉的结果见表 3。从表 3 可以看出, 被孢霉在有葡萄糖存在时能很好地利用多种植物油, 与以葡萄糖为唯一碳源相比, 菌体得率和油脂得率有显著提高, 植物油能明显促进菌体生长及油脂积累。花生四烯酸含量仍显著下降, 但花生四烯酸得率下降不多。与以植物油为唯一碳源相比, 在混合碳源中生长的被孢霉菌, 菌体得率、油脂得率、花生四烯酸含量及得率都有明显增加, 说明葡萄糖的代谢能产生脱饱和酶及延长酶的辅因子, 使花生四烯酸的合成增加, 而其含量仍然降低, 说明植物油抑制了酶本身。

表 3 植物油和葡萄糖为混合碳源时对菌体生长和 AA 形成的影响

Table 3 Effect of oils and glucose as mixed carbon source on growth and AA formation

碳源	菌体得 率/(g/L)	菌体中油 脂含量/%	油脂得率 /(g/L)	油脂中 AA 含量/%	AA 得率 /(g/L)
对照	12.9	24.0	3.1	10.8	0.34
豆油	14.8	41.5	6.1	4.5	0.28
棕榈油	15.6	52.6	8.2	4.1	0.33
花生油	18.1	49.5	9.0	3.7	0.33
芝麻油	12.0	51.0	6.1	3.1	0.19

从以上的实验结果可以看出, 这四种植物油对被孢霉菌的生长和油脂积累有促进作用, 在葡萄糖和植物油为碳源的培养基上, 菌体得率和油脂得率高于以葡萄糖为唯一碳源时。

根据这几种碳源上生长时菌体油脂的脂肪酸成分来看, 各种碳源上生长的被孢霉所含有的脂肪酸组成是一致的, 但含量有明显变化, 说明碳源的不同并不能改变菌本身合成脂肪酸的能力, 但对菌体中脂肪酸的合成有调节作用。从图 1 可以看出培养基中的植

物油的脂肪酸成分与菌体油脂的脂肪酸成分有一定的相似性。植物油中富含的成分相应导致菌体油脂中该成分含量的增高。造成这种情况,有可能是植物油被水解后的脂肪酸进入细胞,即菌体对培养基中的脂肪酸根据浓度差进行选择性吸收。也不排除植物油直接进入细胞的可能性。

关于植物油对被孢霉生长、油脂积累及花生四烯酸合成的影响,本实验结果在促进油脂积累方面与文献是一致的,而对花生四烯酸的合成有抑制作用则与文献有抵触。以植物油为唯一碳源时花生四烯酸含量最低,以植物油和葡萄糖为混合碳源时的花生四烯酸含量居中,以葡萄糖为唯一碳源的花生四烯酸含量最高,说明植物油对花生四烯酸的产生是有抑制作用的。这几种植物油对花生四烯酸积累的影响,以芝麻油的抑制作用最强,芝麻油中含有特殊成分脂麻素, Kawashima^[10]报导脂麻素对使二高- γ -亚麻酸到花生四烯酸的 Δ^5 脱饱和酶具有非竞争性抑制作用,从而导致了花生四烯酸含量的降低。Kendrick^[11]曾报道多种油包括芝麻油、亚麻籽油、红花油、油精以及被孢霉油抑制四种丝状真菌多不饱和脂肪酸的合成。植物油的抑制作用可能与菌种及培养条件的差异有关。

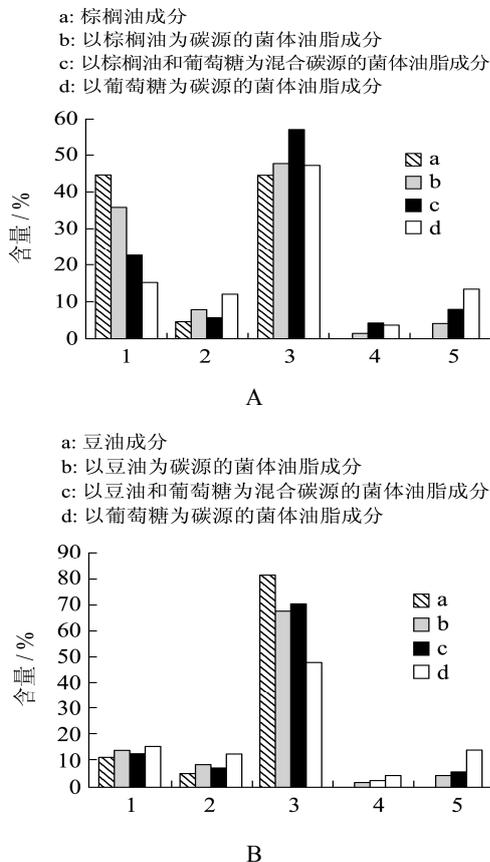


图1 植物油及菌体油脂的脂肪酸成分

Fig.1 Fatty acids composition of vegetable oils and mycelial lipids

其中: 1:棕榈酸; 2:硬脂酸; 3:油酸+亚油酸; 4:GLA; 5:花生四烯。

参考文献

- [1] 杨朝霞,张丽,李朝阳.花生四烯酸的营养保健功能[J].食品与药物,2005,7(1):69-71
- [2] Seiki Takeno, Eiji Sakuradani, Akiko Tomi, et al. Transformation of Oil-Producing Fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, Using Zeocin, and Application to Arachidonic Acid Production[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005,100(6):617-622
- [3] 鲍时翔,朱法科,林炜铁,等.被孢霉菌发酵产生花生四烯酸的研究[J].微生物学报,1997,37(5):374-377
- [4] 黄惠琴,朱法科,林炜铁等.被孢霉发酵生产花生四烯酸工艺的研究[J].华南热带农业大学学报,1999,5(2):1-4
- [5] 周蓬蓬,余龙江,吴元喜等.高山被孢霉产花生四烯酸发酵条件的研究[J].工业微生物,2003,33(2):41-45
- [6] Shinmen, Y., Shimizu, S., Akimoto, K., et al. Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi[J]. Applied

- Microbiology and Biotechnology, 1989 31(1):11-16
- [7] 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].北京:轻工业出版社,1994,41-42
- [8] 张龙翔,张庭芳,李令媛等.生化实验方法与技术[M].北京:高等教育出版社,1981:6-9
- [9] 程志青,吴惠勤.GC/MS 法快速测定食用植物油中的脂肪酸含量[J].分析测试通报.1989,8(6):49-52
- [10] Kawashima, H., Akimoto,K., Shirasaka,N., et al. Inhibitory effects of alkyl gallate and its derivatives on fatty acid desaturation[J]. Biochimica et Biophysica Acta,1996 ,1299: 34-38
- [11] Kendrick, A., Ratledge, C.. Cessation of polyunsaturated fatty acid formation in four selected filamentous fungi when grown on plant oils[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 1996,73(4):431-435

(上接第3页)

细胞周期蛋白与细胞凋亡有着密切的关系。细胞周期是个复杂的过程,它必须依靠各种相关的蛋白来调控细胞的增殖、分化与凋亡。其中Cyclin D1和P21就是细胞周期蛋白中比较重要的两种。Cyclin D1是细胞周期的启动因子,是细胞周期中G₁期进入S期的一个重要调控因子,在G₁/S期转换中发挥重要作用,若此基因失控,则导致细胞异常增殖。Cyclin D1作为原癌基因与其他癌基因协同促进癌细胞的分化。研究中发现Cyclin D1在许多癌症的转化和发展中都出现高表达的现象。P21属于细胞周期调控因子,对细胞增长起负调控作用,它是一种富含精氨酸的蛋白质。P21蛋白具有抑制CDKs的活性,抑制细胞从G₁期进入S期,抑制细胞DNA合成、协调细胞周期与DNA修复等作用。

为了进一步研究CA诱导H22细胞凋亡的机制,本实验采用了免疫荧光的方法检测了P21和Cyclin D1的表达情况。结果发现,随着用药时间的延长,CyclinD1表达均逐渐降低,而P21的表达均逐渐升高。从而表明CA有可能通过下调CyclinD1和上调P21的表达水平使肿瘤细胞受到破坏,进而诱导H22细胞的凋亡。P21和Cyclin D1介导的对细胞周期的调节是引起H22细胞凋亡的重要途径之一。

总之,CA可以有效抑制H22细胞的生长,诱导H22细胞凋亡,具有显著的抗肿瘤效应。

参考文献

- [1] 刘安军,尤玲玲,张国蓉,等.软骨多糖对小鼠肉瘤细胞 S₁₈₀ 抑制作用的实验研究.中国肿瘤,2006,11(15):772-774
- [2] 朱彩平,张声华.枸杞多糖对肝癌 H22 荷瘤鼠的抑瘤和免疫增强作用.营养学报.2006,28(2):182-183
- [3] 董兰凤,刘京生,苗智慧,等.附子多糖对 H22 和 S180 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究,中国中医基础医学杂志.2003,9(9):14-17
- [4] 叶菲,曹瑞敏.黄磨多糖对小鼠 H22 腹水肝癌细胞周期的影响.实用肿瘤学杂志,1995,9(4):3-4
- [5] 宋萍,王学美,谢爽,等.鲜壁虎冻干粉抑制 H22 肿瘤血管生成机理的实验研究.中国中西医结合杂志,2006,26(1):58-62
- [6] 孙玉书,毕力夫,苏秀兰.多糖及多糖类药物研究概况.内蒙古医学院学报.2006,28(1):75-78
- [7] 王文亮.细胞凋亡研究进展.心脏杂志,2005,17(6):603-606
- [8] 郭冰芳,张晓东,王文亮.细胞凋亡与肿瘤的关系.肿瘤.1995,15(2)增刊:241-241
- [9] 李晓军,梁力建,吴宝安.普伐他汀对肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用.中华实验外科杂志.2006,23(4):554-556
- [10] 扶正.抑瘤颗粒对小鼠肝癌细胞H22凋亡的影响.中国中医药科技.2006,12(3):146-147
- [11] Joo M, Kang YK, Kim MR, Lee HK, Jang JJ. Cyclin D1 overexpression in hepatocellular carcinoma. Liver, 2001, 121:89-95
- [12] Li QF, Ou-Yang GL, Peng XX, Hong SG. Effects of tachyple-sin on the regulation Of cell cycle in human hepatocarcinoma SM M C-7721 cells. World, Gastroenterol,2003;9:454-458
- [13] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science,1995;267:1456
- [14] Nicolson DW. From bench to clinic with apoptosis based therapeutic agents.Nature,2000,407:810