

微生物油脂花生四烯酸产生菌离子束诱变和发酵调控

余增亮*, 王纪, 袁成凌, 黄青*, 冯慧云, 贡国鸿, 郑之明, 姚建铭

中国科学院和安徽省离子束生物工程重点实验室, 中国科学院合肥物质科学研究院, 合肥 230031

* 联系人, E-mail: zlyu@ipp.ac.cn; huangq@ipp.ac.cn

2011-11-02 收稿, 2012-03-06 接受

国家自然科学基金(19890300)、国家“十五”科技攻关计划(2001BA302B-04)、安徽省科技攻关计划(85-722-22-01)、中国科学院知识创新工程方向性项目(KSCXZ-SW-324)和中国科学院“百人计划”资助

摘要 某些微生物是高质量油脂的生产者. 微生物油脂不仅有益健康, 而且是生物柴油潜在的油脂来源. 中国是个油脂资源缺乏的国家, 开发微生物源油脂具有重要的意义. 本文以产油微生物——高山被孢霉菌为出发菌, 以单细胞油脂多不饱和脂肪酸产率为筛选目标, 采用二步离子束诱变-筛选的策略, 获得了高产菌株. 研究了高产菌株的营养需求, 创建了重复利用提油后的残体(菌粕)合成微生物油脂的技术. 针对丝状真菌高密度发酵的传能和传质问题, 研制了 6×50 和 4×200 m³大容量专用反应器组, 单位发酵容积生物量达 38.2 g/L(发酵液)、油脂 20.67 g/L. 其中具有重要生理活性的花生四烯酸产率最高达 9.89 g/L, 平均为 8.97 g/L. 花生四烯酸提取和精炼后的残油转化为生物柴油, 主要指标达到国家生物柴油标准.

关键词

单细胞油脂
高山被孢霉菌
离子注入
花生四烯酸
生物柴油

在自然界, 某些富含脂类的微生物, 如酵母、真菌、藻类等, 是高质量油脂, 特别是长链多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs)的生产者. 微生物油脂也称单细胞油脂(single cell oils, SCO). 20世纪, 人们试图利用单细胞油脂代替植物或动物油脂, 但由于经济问题, 此过程进展缓慢. 1985年世界上第一个利用毛霉菌(*Mucor circinelloides*)工业化生产 γ -亚麻酸的工程也只持续了6年时间^[1]. 此后, 少数国家利用高山被孢霉菌(*Mortierella alpina*)进行花生四烯酸的资源开发. 进入21世纪, 微藻发酵生产DHA^[2]和生物柴油油脂的研究逐渐发展起来.

长链多不饱和脂肪酸, 特别是二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA, 俗称脑黄金)和二十碳四烯酸(arachidonic acid, ARA或AA; 花生四烯酸)对婴幼儿健康发育是必需的^[3]. DHA可从深海鱼油中提取, 比较容易获得. 而ARA, 除了母乳中含量较丰富外, 自然资源十分稀缺. 因此, 开发微生物来源的ARA就成为国内外关注的热点课题^[4].

20年多前, 我们选择产油微生物——高山被孢

霉菌为对象, 利用离子束诱变技术对其进行遗传性修饰. 经过8年的努力, 获得了具有商业化前景的ARA高产菌株^[5], 并在武汉市建立生产基地进行工业规模的合成研究^[6], 生产出国际上ARA含量最高的单细胞油脂^[7]. *Single Cell Oils*一书认为, 当人们正在寻找替代的富含ARA油脂的生物合成技术时, 中国武汉利用高山被孢霉菌的新菌株实现了工业化生产^[8].

在影响发酵产率的诸因素中, “种子”(即菌种)是第一要素. 要使菌株在代谢过程中大量地合成并积累特定产物, 只有控制菌株的代谢过程才能达到. 通常菌种代谢人工控制有2种相互补充的途径: 一是对菌株进行遗传性修饰, 如通过基因工程、细胞工程和物理化学诱变等; 二是控制发酵条件, 如培养基的优化、环境条件的调节等. 本文利用以高产ARA为筛选目标的高山被孢霉菌的离子束诱变和筛选策略, 研究了突变菌株培养基限制与营养需求矛盾的解决途径; 针对丝状真菌高密度发酵传能传质问题, 研制了大容量专用反应器组, 生产出高质量单细胞ARA

英文引用格式: Yu Z L, Wang J, Yuan C L, et al. Ion-beam-mutation breeding of an arachidonic acid biosynthesis microorganism and its industrial fermentation control (in Chinese). *Chin Sci Bull (Chin Ver)*, 2012, 57: 883–890, doi: 10.1360/972011-2199

油脂. 高山被孢霉菌可以代谢 10 多种脂肪酸, 除了 ARA 以外, 其他主要脂肪酸的含量与大豆油相当, 是微生物柴油潜在的油脂来源.

1 菌种的诱变选育

1.1 离子束诱变

高山被孢霉为丝状真菌. 从代谢途径可知, 影响 ARA 代谢的至少有 2 个关键的环节, 即从乙酰辅酶 A (AcCoA) 到软脂酸 (palmitic acid) 的合成以及亚油酸 (linoleic acid) 到 γ -亚油酸再到 ARA 的合成^[9,10]. 在野生环境下, 高山被孢霉菌通过自我调节, 维持各个代谢途径的协调, 使其代谢产物的积累既不会太少也不会过多. 要使菌株在代谢过程中大量地合成并积累 ARA 油脂, 只有当菌株部分正常代谢机制发生改变, 切断或减弱支路代谢, 促使两个关键代谢环节朝着有利于 ARA 合成和积累的方向进行才有可能. 这必须对菌株进行遗传修饰. 在高山被孢霉菌遗传背景不是很清楚的情况下, 诱变是菌株改良的首选方法.

1986 年, 作者发现了离子注入生物效应, 创建了离子束生物技术, 既可用于诱变育种, 又可用于介导基因转移^[11-16], 引起了国内外的关注^[17-19]. 离子注入需在真空中进行, 该技术最早应用于农作物育种, 用于微生物育种的研究始于本课题组的相关研究. 微生物细胞含水率高, 首先必须解决其真空耐受性, 才能进行离子注入. 实验研究了细胞在真空中的状态, 利用细胞包埋法测得细胞团的温度随真空度的变化. 当压强达到离子注入所要求的真空度时 ($<10^{-2}$ Pa), 细胞团温度降至 -25°C 以下, 胞内自由水结冰膨胀致使细胞很难存活. 由低温生物学可知, 采取防冻剂处理、按一定的程序降温, 细胞可以在液氮温区长期保存. 为此, 我们设计了专用的离子束生物工程装置, 把细胞真空耐受性问题转换为低温生物学问题^[20], 使细胞所处的靶室压强-细胞温度下降过程接近细胞低温冻存的温度下降过程, 以保证短时间内(离子注入时间)微生物细胞的真空存活.

不考虑微生物细胞冷冻状态下的生物学特性, 在研究离子注入与微生物相互作用时可视细胞为“固体”. 实验表明, 离子束对细胞表面的高溅射速率增加了细胞膜的通透性, 电荷交换改变了细胞跨膜电场. 更重要的是, 离子注入不仅向细胞内输入能量, 而且输入了有静止质量的粒子. 当注入粒子能量降

至化学反应范围时, 将与本底原子、移位原子或离子径迹产生的碎片分子等反应生成新的分子^[5,21]. 这种能量沉积、质量沉积和电荷转移过程可能导致细胞多种形式的损伤, 包括物理的、化学的和生物学的损伤.

利用同步辐射红外显微谱学成像技术可以研究离子束辐照前后细胞内蛋白和多糖等物质的化学损伤. 选择离子束辐照前后各培养一段时间的单一菌丝, 蛋白以 Amide I 在 $1655\sim 1590\text{ cm}^{-1}$ 之间的区域进行积分, 多糖在 $1048\sim 1013\text{ cm}^{-1}$ 之间的区域进行积分, 结果如图 1 所示. 其中(a)是未辐照的培养 20 h 的菌丝, (b)是辐照后培养 20 h 的菌丝. 进一步研究发现, 辐照后菌丝体内的 ROS 自由基含量显著增加, 说明辐照产生的自由基是导致菌丝损伤的原因之一.

损伤是突变的前奏. 在分子水平上, 离子束诱发基因突变的显著特点是高密度、多位点的碱基变异, 平均每 40 个碱基内便可能出现一次碱基的变异. 变异类型包括碱基的转换、颠换和缺失^[22], 甚至可能出现大片的缺失, 或引起生物体的致死突变. 图 2 是氮离子注入高山被孢霉菌株的致死损伤与剂量的关系. 由图 2 可见, 菌株存活-剂量曲线不再遵从常见电离辐射存活-剂量的指数下降规律, 而呈现下降-上升-再下降的趋势. 其他菌株离子束诱变也有类似的现象^[23]. 研究认为, 离子束能量沉积、质量沉积和电荷转移等“多因子”的联合作用导致生物体的反常辐照损伤, 一种因子诱导损伤的同时, 另一种因子可能对损伤进行着修复^[24]. 多因子动态的物理化学损伤-修复、修复-损伤, 就可能引起这种反常现象的出现^[5].

实验表明, 如果以选育高产 ARA 的突变菌株为目标, 离子束诱变的剂量应在图 2 曲线上的峰值范围内选择(即 $6.0\times 10^{13}\sim 10.0\times 10^{13}$ 离子 cm^{-2}), 这样可以获得较高的正突变率. 应当指出, 如果长期使用一种离子对菌株进行诱变, 即使剂量不同, 菌株也可能产生抗性. 这时, 应换一种离子. 同样, 离子种类变了, 还要通过实验做出菌株相对于这种离子照射的存活-剂量关系曲线, 以确定诱变剂量的最佳选择范围.

1.2 二步筛选策略

离子束辐照这个环节并不复杂, 关键是把高产 ARA 的菌株从大量突变体中筛选出来. 高山被孢霉菌落小, 生长缓慢, 胞外产物又没有特殊的显色反应, 平板筛选不可行, 只能把摇瓶发酵作为初筛的手段. 由高山被孢霉菌发酵曲线(图 3)可见, ARA 积累要到

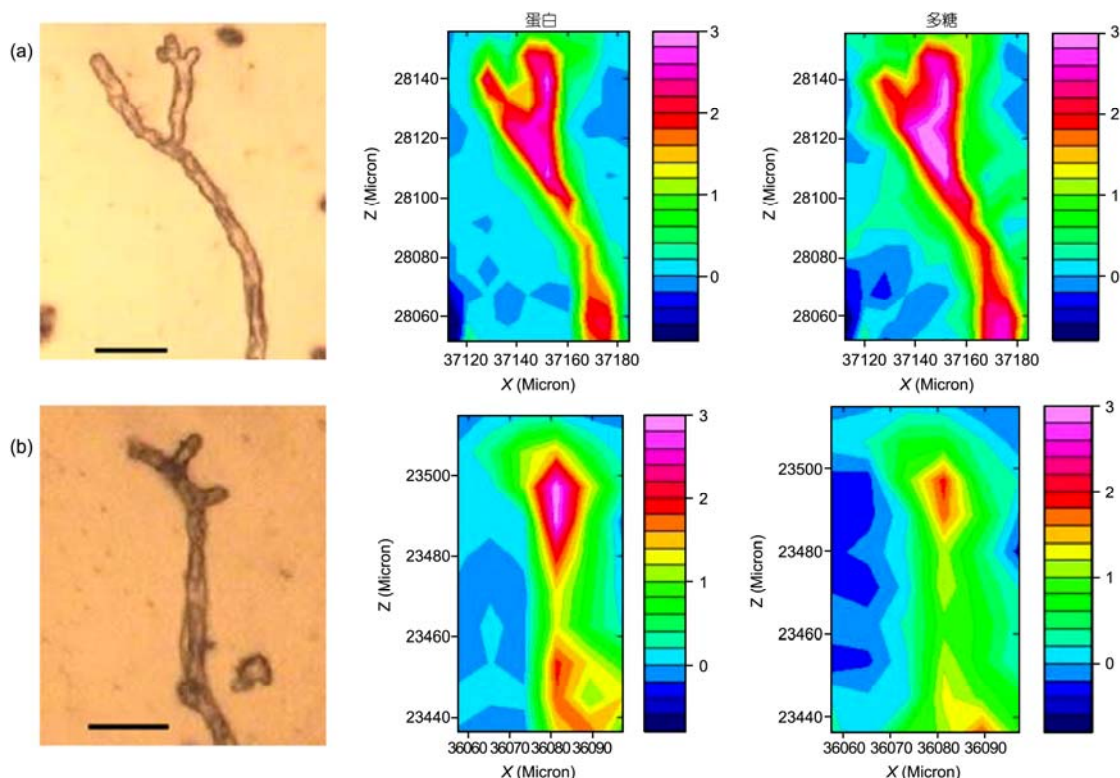


图 1 辐照前(a)、后(b)蛋白和多糖在菌丝中的分布

菌丝可划分为 2 个部分: 一是生长顶点位置, 菌丝的延伸、分支和生长发生在该处; 二是代谢活跃部位, 此处有大量代谢产物的合成, 后期在自身酶的催化下进行降解。利用同步辐射红外显微谱学成像技术, 蛋白以 Amide I 在 $1655\sim 1590\text{ cm}^{-1}$ 之间的区域进行积分, 多糖在 $1048\sim 1013\text{ cm}^{-1}$ 之间的区域进行积分。图中, 辐照后培养 20 h 的菌丝生长顶点部位蛋白质和多糖含量明显降低, 分支短粗, 呈现生长滞后现象; 在代谢活跃部位, 辐照后细胞内蛋白质和多糖提前降解, 细胞进入衰亡期, 反映其代谢过程加快

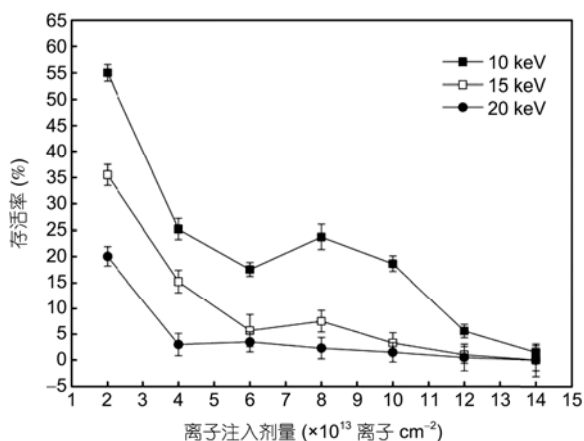


图 2 离子注入高山被孢霉菌存活率与剂量的关系

第 11 天才达到峰值。如果离子注入后在平板上长出的每一个菌落都要等到发酵第 11 天再筛选, 不仅因发酵时间长存在染菌的风险, 而且每一瓶发酵液用气相色谱法检测 ARA 也很费事。实际上, ARA 发酵

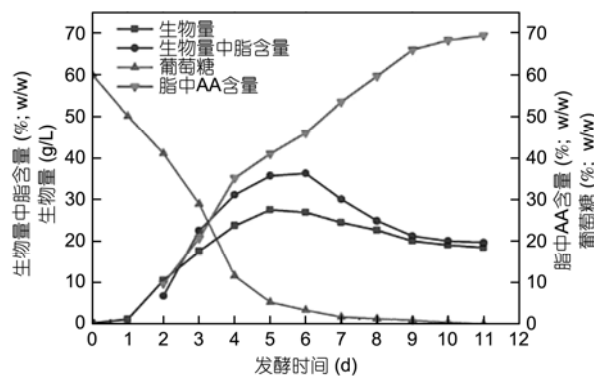


图 3 高山被孢霉菌发酵曲线

产率由菌体的生物量、总脂肪酸占生物量的比率和 ARA 占总脂的份额决定。从发酵曲线看, 菌丝体生长经历了丝状真菌 3 个典型的时期: 快速(指数)生长期、稳定期和减速期。菌丝体在第 5 和第 6 天达到峰值, 与总脂肪酸积累的峰值基本同步, 之后再缓慢下

降. 这样, 可以在第5天或第6天以生物量和总脂含量作为初筛的指标, 且生物量和总脂含量用称量法, 筛选通量提高. 待生物量和总脂含量高的突变株传代稳定后, 再以此为出发菌株进行第二阶段的离子束诱变选育, 在第11天筛选高产ARA的突变株. 虽然第二步筛选方法仍用色谱法, 但筛选的范围缩小、目标集中, 筛选的效率自然就提高了.

1.3 限制性培养基条件下的菌种选育

发酵培养基(底物)是供菌体生长、繁殖和合成代谢产物所必需的一类营养元素组成的基质. 已经知道, 组成生物体的元素大约有30种. 从营养角度考虑, 一般要求培养基组成丰富、完全, 且各组分的配比适宜. 因此, 根据菌株不同生长阶段的营养要求添加适当种类和数量的营养物, 并注意营养元素之间的配比是发酵调控的常用手段. 在实验室和生产实验阶段, ARA菌株经过多轮诱变, 每一轮筛选出的突变株都进行过培养基优化, 以期找到最适合突变株生长繁殖和代谢产物积累的培养基组成和配比, 达到合成最多发酵产物的目的^[25]. 但是, ARA作为食品类发酵产物, 各国对培养基的残留都制定了严格的限制标准. 除了葡萄糖用作发酵培养基的碳源外, 原培养基中已优化的氮源及其他营养成分, 如花生粉内含物可能使欧美部分人群致敏、某些民族对动物源蛋白禁忌口、豆粕可能存在转基因问题等, 都应避免使用, 只能保留葡萄糖(碳源)和酵母粉提取物(氮源)两种成分. 这就限制了培养基氮源、磷源等营养物的选择范围. 培养基的限制使得发酵产率显著下降. 一方面, 通过离子束诱变使其适应限制性培养基条件; 另一方面, 分析了高山被孢霉菌的营养组成. 认为仅靠酵母粉不一定能提供菌株生长除碳源以外的、配比合理的其他营养素. 一个巧妙的解决办法是重复利用高山被孢霉菌体提取油脂后的残体(菌粕)制备ARA^[26]. 可见, 高山被孢霉菌粕内理应含有菌株生长所需要的所有营养素. 比较提油前的菌体与提油后的菌粕化学组成, 发现提油(萃取)工艺并未使菌体内除油脂以外的成分丢失, 其中氮(5%)、磷(1.3%)和其他微量元素, 如S, K, Ca, Mg, Zn和Fe等含量丰富, 且配比合理, 这应当是高山被孢霉菌生长的优质营养源. 实验证实了这一点: 菌粕经过粉碎、酶解等前处理, 以葡萄糖为碳源, 按0~100%比例取代酵母粉, 在10%~80%范围内, ARA产率均超过单一的酵母粉营

养源. 50%~60%范围取代效果最好, 摇瓶发酵ARA产率可达5.9 g/L(图4), 70 L罐发酵达到7.6 g/L; 50 t生产罐超过8.0 g/L.

高山被孢霉菌发酵培养基的限制束缚了通过培养基优化提高发酵产率的代谢调控手段的应用. 但从菌株选育而言, 也省去了每一轮诱变后培养基优化这一环节, 加快了育种的进程.

2 最简底物下的发酵控制

高山被孢霉菌合成ARA的发酵底物只有葡萄糖和菌渣(菌粕和酵母粉)两种, 不能任意添加所需种类和数量的营养素(包括酶促因子)调控发酵过程, 只能在限制性培养基条件下调节发酵的环境因素, 如温度、溶氧和pH等. 即使这样, 两种培养基如何添加也需要仔细研究.

2.1 碳氮比与碳源流加对发酵的影响

对单细胞油脂(SCO)代谢过程研究发现, 发酵中先合成中低碳脂肪酸, 然后通过延长酶和去饱和酶作用合成多不饱和脂肪酸. 发酵调控的目的是引导碳流向ARA合成的方向进行. 一个关键的因素是碳源充足而其他营养成分缺乏时, 菌株将过量的碳水化合物转化为脂类. 实验观察到, 在氮源严重匮乏的情况下, 高山被孢霉菌细胞内脂类的积累照常进行, 但菌体生长受到抑制, 生物量减少. 氮源的作用是促进细胞的生长. 在快速生长期, 碳/氮比按4:1(质量比, 葡萄糖/酵母粉提取物)添加; 之后, 通过限制氮源浓度使得碳流明显地从快速生长期用于生物量的合成延至稳定期、减速期内用于脂肪酸的合成.

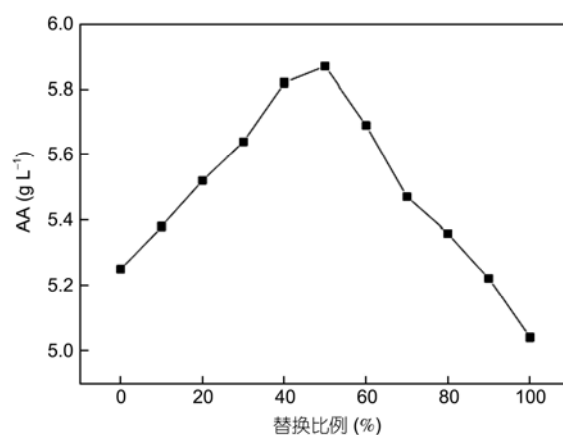


图4 菌粕取代氮源(酵母粉提取物)的ARA产率

ARA 发酵一个典型的培养周期中, 每升培养液大约需用 100 g 葡萄糖和 15 g 菌体氮源提取物当量. 装罐时, 发酵营养液糖含量控制在 3.6% 左右比较适宜, 而氮源的 60% 在装罐时投加. 实验时必须对发酵过程中营养物水平进行适时监测. 研究发现, 在发酵过程中要求将初始氮源耗尽, 然后分一次或多次在 96 h 前添加完其余的氮源, 这样能显著提高油脂的产量. 葡萄糖采取流加的方式. 通过 50 m³ 发酵罐补糖实验分析, 发酵前期菌体对碳源的利用速率较高, 随培养时间的延长, 逐步下降. 在发酵全过程内, 控制培养液中适宜的糖浓度有利于提高糖的利用效率和脂肪酸的积累. 因此, 在流加补糖时应遵循如图 5 所示的规律, 在指数生长期维持较高的糖浓度. 从第 3 天开始, 即指数期向稳定期过渡, 维持较低的糖浓度, 在稳定期适当提高糖浓度, 直到第 5 天补糖结束.

2.2 发酵控制条件和程序的确立

培养时间是产油真菌合成油脂的一个重要条件. 时间过短, 油脂没有完全形成; 时间过长, 菌体细胞自溶或不再形成新的菌丝体. 只有在适宜的培养时间内, 才能达到最佳的产油脂状态. 摇瓶发酵 ARA 合成一般要 11 d (图 3). 生产上, 50 和 200 m³ 专用反应器罐组采用三级和四级发酵, 综合考虑油品质量、ARA 产率、节能和生产效率, 主发酵罐 (50 和 200 m³) 发酵控制在 7 d 范围内是适宜的.

培养温度对真菌产油脂有着极其重要的影响. 实验发现, 在低温环境下能增加真菌的不饱和脂肪酸的合成. 如果增加氧在低温下的可溶性, 将有助于催化长链不饱和脂肪酸的去饱和作用. 但低温不利于菌体生长, 发酵周期要相对延长.

在 50 m³ 反应器生产实验中, 菌株在 30℃ 时生长最适宜, 此时生物量和油脂在干菌体中的含量都同时达到较高水平; 而 25℃ 发酵则最有利于花生四烯

酸的合成, ARA 占总脂的含量可达 60%, 甚至 70% 以上. 综合考虑生物量、油脂和 ARA 产率与温度的关系, 在实际生产中采用变温发酵, 即 28℃ 发酵到第 6 天, 然后每小时降 1℃, 维持在 22℃ 直到发酵结束.

维持培养液中的高溶氧浓度 (D.O.) 能够缓解高营养物浓度引起的生长抑制, 提高油脂中的 ARA 的相对浓度. D.O. 可以通过提高通气量、增加罐压和/或增加喷射气体中 O₂ 含量来实现. 增加溶氧可促进菌体生长, 增强代谢活力. 但菌体耗糖速度也随之提高, 应注意及时补糖. 发酵后期, 即 ARA 积累阶段, 由于菌丝体浓度高, 相互缠绕, 应逐步减少通气, 避免菌丝体破碎影响 ARA 积累.

在发酵过程中, 调节酸碱度 (pH) 对微生物细胞保持适当的氧化还原电位和渗透压有重要作用. 实验表明, ARA 菌株在整个发酵过程中 pH 变化不大, 但 pH 的高低是生物量、油脂含量和 ARA 产率高度显著因子. 在高营养物浓度、低 pH (pH 5~6) 下发酵可促进生物体的生长. 但是, 这种条件下产出的油脂 ARA 含量较低. 相反, 高 pH (pH 7.5~8.5) 发酵可提高油脂中的 ARA 含量. 因此, 在生产中采用的是 pH 限定发酵, 即 pH 在发酵的早期较低而在后期调高. 早期包括快速 (指数) 生长期和稳定期, 该阶段中营养物代谢迅速; 后期指减速期, 此时, 细胞分裂被抑制, 通常由于一种或多种营养物质不足, 而富含 ARA 的油脂的合成得以加强.

高山被孢霉菌发酵合成 ARA 的调控策略由图 6 表示.

2.3 大容量 ARA 反应器发酵控制实验

上述发酵控制方法的确立是在 6×50 m³ 反应器罐组获得的. 随着高山被孢霉菌发酵技术进步和 ARA 油品需求量的不断增加, 研制节能、高效、大容量反应器提到日程. 反应器主发酵罐设计容积为 200 m³,

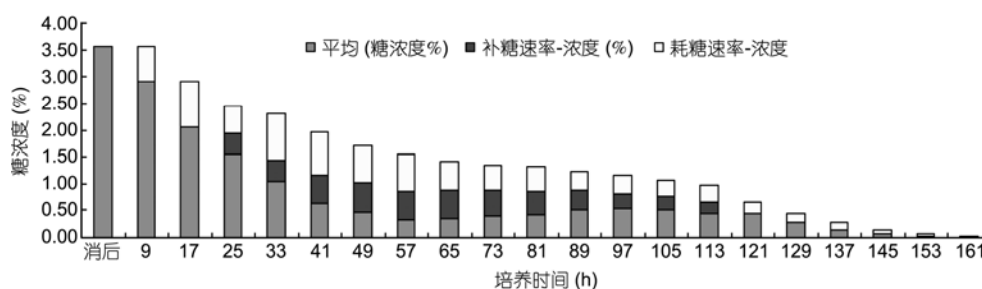


图 5 发酵过程补糖-耗糖的对应关系

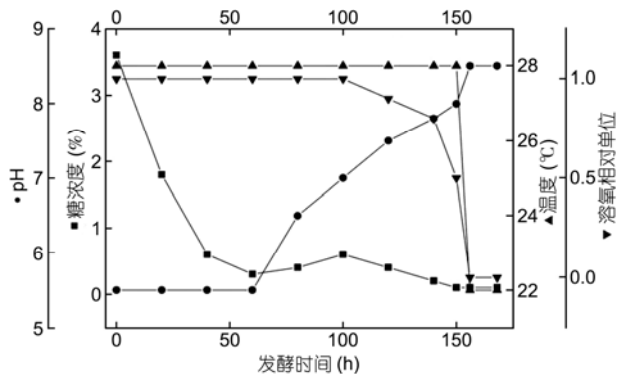


图 6 发酵条件随发酵时间的动态调节

是迄今世界上单罐最大的高山被孢霉菌发酵装置之一。反应器设计除满足传质、传能要求外,还应具备发酵环境参数自动调节的全部功能。与 50 m^3 反应器比较, 200 m^3 反应器有高的筒径比,且在上方预留安装缓冲罐和液泡回流系统的空间,减少逃液,提高罐容利用率。在反应器内安装多层空气分布器,相邻两层的空气分布器进气角度相反,使得上下两股方向相反的气流带动相邻两层发酵液反向旋转,形成湍流,提高了空气利用率和溶氧分布的均匀性。反应器在接种、加料、放罐等操作以及发酵调节均采取远程控制,既提高了能量利用率,又降低了染菌的风险。

$4\times 200\text{ m}^3$ 反应器组于 2009 年 10 月建成。经过 1 年的运转测试,主要指标达到设计要求。试生产阶段,按照图 6 所示的控制参数运行,首批 11 罐次平均发酵指标随时间的变化由图 7 给出。

由图 7 可以看出,112 h 后总脂增加缓慢,代谢进入 ARA 积累阶段,单位发酵容积的 ARA 产率迅速增加,到放罐时,最高罐次生物量达到 38.2 g/L ,油脂含量 20.67 g/L , ARA 产率 9.89 g/L ,11 罐次平均生物量 35.8 g/L ,油脂 18.4 g/L , ARA 产率为 8.97 g/L 。

3 残油的利用: 生物柴油

生物柴油的主要成分是高级脂肪酸的低级醇酯,即软脂酸、硬脂酸、油酸、亚油酸等长链饱和或不饱和脂肪酸同甲醇或乙醇等醇类物质所形成的酯类化合物,具有可再生性和环保特性。发展生物柴油,油脂原料是关键,它占生物柴油生产成本的 75%~80%。

离子束诱变获得高山被孢霉突变菌株不仅产油量高(油脂占生物量的 50%以上,图 7),而且油脂中除了富含花生四烯酸外,还含有多种饱和的/或不饱

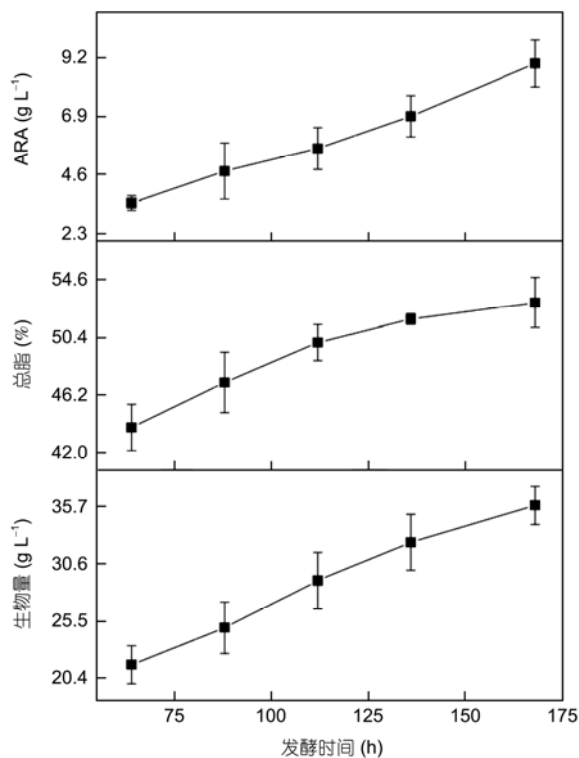


图 7 ARA 专用大型反应器 11 批次发酵平均产率

和脂肪酸,如棕榈酸、 γ -亚油酸(GLA)和亚麻酸等。这些脂肪酸与大豆油脂的组成很类似(表 1),是制备生物柴油的良好原料。

高山被孢霉菌发酵后收集菌丝体。菌丝体在保护性气体氛围中烘干,细胞内油脂用丁烷亚临界萃取技术常温浸出。在高山被孢霉菌发酵合成的 10 多种脂肪酸中,ARA 的凝固点最低(-49°C),可利用低温技术把 ARA 和其他脂肪酸拆分。低温拆分时,液态油脂 ARA 含量高,精炼后作为 ARA 的婴幼儿营养强化剂;固态油脂 ARA 含量低,可与 ARA 精炼后的残油混合制备生物柴油。混合油与甲醇的摩尔比按 1:6 配制,由 1% KOH 催化。反应釜转速 500 r/min ,反应温度 55°C ,时间 50 min。最后用 0.5%冰醋酸终止碱催化,获得的微生物柴油的转化率达 90%以上,甲醇可以循环利用。

微生物柴油经安徽省产品质量监督检验研究院检测列于表 2,除了酸度值以外,主要指标达到国家标准。

4 讨论

产油微生物高山被孢霉菌胞内含有 11 种从十四碳到二十二碳饱和的或不饱和的脂肪酸。通过离子

表 1 微生物油脂与大豆油脂组成比较^{a)}

脂肪酸	棕榈酸 C ₁₆ H ₃₂ O ₂	十八烷酸 C ₁₈ H ₃₆ O ₂	亚油酸 C ₁₈ H ₃₄ O ₂	亚麻酸 C ₁₈ H ₃₂ O ₂	花生四烯酸 C ₂₀ H ₃₂ O ₂	其他 PUFAs
被孢霉菌油(wt%)	17.2	3.6	19.1	5.4	44	4.0
大豆(wt%)	6~8	3~5	25~36	52~65	—	—

a) wt%, 质量分数

表 2 微生物柴油检测结果

检测项目	质量标准	检测结果
运动黏度(mm ² s ⁻¹)	1.9~6.0	4.59
密度(20℃) (kg m ⁻³)	820~900	883.3
酸度(mg KOH/100 mL)	≤80	121
水分, % (体积比)	≤0.05	0.0483
闪点(闭口) (℃)	≥130	193
铜片腐蚀(50℃, 3 h)	≥1	1a
热值(mJ/L)	≥32	37.8

束诱变, 促使两个关键代谢节点朝着有利于二十二碳四烯酸(ARA)合成和积累的方向进行, 使得生物量、总脂肪酸、ARA 占总脂肪酸的含量都得到显著提高. 即使在限制性培养基条件下, 通过菌种改良和温度、溶氧和 pH 等的动态调控, ARA 产率最高达 9.89 g/L. 值得提出的是, 单细胞油脂 ARA 生产过程中的主要废弃物都得到利用: 菌粕作为培养基氮源、磷源和其他营养素的补充, 残油转化为生物柴油, 做到“吃干榨净”, 清洁生产.

随着石油资源的逐渐枯竭, 各国制定鼓励政策发展生物柴油作为替代的燃料油, 并已商业化运作. 如欧洲的菜籽油、美国的大豆油制备的生物柴油. 我国约 60% 的石油和 60% 的植物油依赖进口. 在保住 18 亿亩耕地红线、利用荒山滩涂和边地开发植物油

脂资源的同时, 发展微生物油脂产业是满足不断增长的油脂需求的战略选项之一. 微生物油脂生产不受场地、季节和气候变化的影响, 原料来源广泛, 产出的油脂质量优良.

微生物油脂不仅是高级食用油资源, 也是生物柴油的油脂来源. 大部分微生物油脂的脂肪酸组成和一般植物油相近, 以 C16 和 C18 系脂肪酸, 如油酸、棕榈酸、亚油酸和硬脂酸为主. 最近美国国家可再生能源实验室(NREL)的报告特别指出, 微生物发酵合成单细胞油脂可能是生物柴油产业和生物经济的重要研究方向. 本文利用高山被孢霉菌发酵合成单细胞油脂转化生物柴油, 是一条值得探索的途径.

利用高山被孢霉菌油脂作为生物柴油资源的关键是其经济性, 这里还有很多科学问题要解决. 作者曾尝试以木糖(秸秆水解糖)代替葡萄糖发酵, 探索秸秆转化生物柴油的可行性. 实验指出, 直接用秸秆水解糖替代葡萄糖发酵, 总脂肪酸含量下降. 但通过离子束诱变, 以产油而不是 ARA 为筛选目标, 油脂含量提高了 2.05 倍, 这是值得重视的研究方向. 由于生物柴油原料油生产没有像食用油脂生产那样有严格的卫生限制, 也许将来通过菌种改良和发酵调控, 利用高山被孢霉菌大幅度降低单细胞油脂的生产成本是可能的.

致谢 武汉烯王生物工程公司的易德炜、杜斌、尚耘、汪志明、唐孝鹏、朱子清、何平等工程技术人员为本文提供了 ARA 发酵最新的数据, 作者对他们的贡献表示感谢.

参考文献

- 1 Ratledge C. Microbial production of ϵ -linolenic acid. In: Akoh C, ed. CRC Handbook of Functional Lipids. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005
- 2 Metz J G, Roessler P, Facciotti D, et al. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. Science, 2001, 293: 290–293
- 3 Carlson S E, Werkman S H, Peebles J M, et al. Arachidonic acid status correlates with first year growth in preterm infants. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 1073–1077
- 4 Totani N, Someya K, Oba K. Industrial production of arachidonic acid by *Mortierella*. In: Kyle D J, Ratledge C, eds. Industrial Applications of Single Cell Oils. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society, 1992
- 5 余增亮. 离子束生物技术引论. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998
- 6 凌关庭. 保健食品原料手册. 北京: 化学工业出版社, 2003

- 7 Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*, 2004, 86: 807–815
- 8 Cohen Z, Ratledge C. *Single Cell Oils*. Champaign, IL: AOCS Press, 2005
- 9 Ratledge C, Wynn J P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in *Oleaginous* microorganisms. *Adv Appl Microbiol*, 2002, 51: 1–51
- 10 Wynn J P, Hamid A A, Ratledge C. The role of malic enzyme in the regulation of lipids accumulation in filamentous fungi. *Microbiology*, 1999, 145: 1911–1917
- 11 Yu Z, Deng J, He J, et al. Mutation breeding by ion implantation. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, 1991, 59/60: 705–708
- 12 Yu Z, Yang J, Wu Y, et al. Transferring Gus gene into intact rice cells by low energy ion beam. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, 1993, 80/81: 1328–1331
- 13 杨剑波, 吴李君, 吴家道, 等. 应用低能离子束介导法获得水稻转基因植株. *科学通报*, 1994, 16: 1530–1534
- 14 吴丽芳, 李红, 冯慧云, 等. 用低能氦离子束介导将水稻几丁质酶基因导入小麦. *科学通报*, 2000, 21: 2316–2321
- 15 宋道军, 余汛. 离子束介导转基因提高 *E. coli* UV 敏感菌株的 DNA 损伤修复能力. *科学通报*, 1999, 18: 1968–1972
- 16 Anuntalabhochai S, Chandej R, Phanchaisri B, et al. Ion-beam-induced deoxyribose nucleic acid transfer. *Appl Phys Lett*, 2001, 78: 2393–2395
- 17 Oztarhan A. A message from the Conference Chairman. In: *Proceeding of the 14th International Conference on Surface Modification of Materials by Ion Beams*. Surf Coat Technol, 2007, 201: 8003
- 18 Dearnaley G. The SMMIB conferences: A retrospective. *Surf Coat Technol*, 2007, 201: 8004–8005
- 19 Feng H Y, Wu L J, Yu Z L, et al. Survival of mammalian cells under high vacuum condition for ion bombardment. *Cryobiology*, 2004, 49: 241–249
- 20 Shu Q Y. A Summary of the International Symposium on Induced Mutations Plants. In: *Induced Plant Mutations in the Genomics Era*. Rome: Food and Agriculture Organizations Press, 2009
- 21 Feng H Y, Yu Z L, Chu P K. Ion implantation of organisms. *Mater Sci Engin R*, 2006, 54: 49–120
- 22 Yang J B, Wu L J, Li L, et al. Sequence analysis of lacZ⁻ mutation induced by ion beam in double-stranded M13mp18 DNA. *Sci China Ser C-Life Sci*, 1997, 40: 107–112
- 23 Xu A, Yao J, Yu L, et al. Mutation of *Gluconobacter oxydans* and *Bacillus megatwrium* in a two-step process of L-ascorbic acid manufacture by ion beam. *J Appl Microbiol*, 2004, 96: 1317–1323
- 24 邵春林, 余增亮. 低能离子辐照的刺激效应模型. *核技术*, 1996, 6: 321–325
- 25 Yuan C L, Wang J, Shang Y, et al. Production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* I49-N18. *Food Technol Biotechnol*, 2002, 40: 311–315
- 26 王志明, 唐孝鹏, 张玉良, 等. 重复利用高山被孢霉菌粕制备花生四烯酸的方法. 中国专利, ZL 2009 1 0063369.6

Ion-beam-mutation breeding of an arachidonic acid biosynthesis microorganism and its industrial fermentation control

YU ZengLiang, WANG Ji, YUAN ChengLing, HUANG Qing, FENG HuiYun, GONG GuoHong, ZHENG ZhiMing & YAO JianMing

Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, CAS and Anhui Province, Hefei Institutes of Physical Science, CAS, Hefei 230031, China

Some microorganisms in nature produce high-quality oils. These oils provide nutritional benefits to human health, and can be potential sources of biodiesel. Developing microorganism-derived oils, also known as single-cell oils, is particularly important for China because of the shortage of oil resources. We have bred a high-yielding, polyunsaturated fatty acids (PUFCs)-producing strain from the fungi *Mortierella alpina* by using a two-step strategy of ion-beam-mutation breeding and PUFCs productivity screening. We further studied the nutritional requirements of this new strain, and developed a technique that recycles the fungi residues, after oil extraction, into fermentation substrates. A biomass of 38.2 g/L, 20.67 g/L of which were oils, was reached in the 6×50 m³ and 4×200 m³ high-capacity reactors, designed for mycelial fungus fermentation at high-density, with optimized energy and mass transmission efficiency. Among the oils, the content of the physiologically active arachidonic acid reached 9.89 g/L at the highest level and 8.97 g/L on average. Residual oils, after arachidonic acid extraction and refinement, were processed into biodiesel, the main indexes of which attained the national standards.

single-cell oils, *Mortierella alpina*, ion-implantation, arachidonic acid, biodiesel

doi: 10.1360/972011-2199