

发酵法生产 γ -亚麻酸的研究进展*

黎志勇 纪晓俊 丛蕾蕾 聂志奎 彭超 高振黄 和**

(南京工业大学生物与制药工程学院 材料化学工程国家重点实验室 南京 210009)

摘要 γ -亚麻酸是一种人体必需的多不饱和脂肪酸,具有多种重要的生理功能。最初 γ -亚麻酸主要来源于植物种子油,如黑醋栗、月见草和琉璃苣等的种子油。但是从植物中提取 γ -亚麻酸受到诸多因素的限制,远不能满足市场需求,采用微生物发酵法生产 γ -亚麻酸具有广阔的应用前景。综述了目前发酵生产 γ -亚麻酸的菌株,对其代谢途径进行了分析,重点总结了国内外有关菌种选育及发酵调控方面的研究,并探讨了今后的研究方向。

关键词 γ -亚麻酸 微生物 发酵 菌种选育 代谢调控

中图分类号 Q815

γ -亚麻酸(γ -linolenic acid, GLA)为全顺式 6,9,12-十八碳三烯酸,分子式 $C_{18}H_{30}O_2$,是一种 ω -6 系列多不饱和脂肪酸,为无色油状液体,在空气中极易被氧化^[1]。它是一种人体的必需脂肪酸,在人体内由亚油酸转化而来,继而被转化为双高亚麻酸(dihomo- γ -linolenic acid, DGLA)及花生四烯酸(arachidonic acid, ARA),再转变成前列腺素 E1(PGE1)、白三烯(LT)和前列环素(PGI2)等。 γ -亚麻酸具有广泛的生理活性和明显的药理作用,它可以降血脂,抗血栓性心脑血管疾病,预防和治疗高血压、动脉粥样硬化^[2-4]。同时又能抗菌^[5],抗炎^[6],抗肿瘤^[7-8],抗糖尿病^[9],抗 HIV 感染^[10]等,在美容、化妆品行业也有应用^[11],对月经前期综合症具有一定疗效^[12],被高度评价为“21 世纪功能性食品主角”。

1919 年,Hei-duschka 首次从柳叶菜科(Evening Primrose Family)植物月见草中发现 γ -亚麻酸^[13]。目前已知有 80 多种高等植物种子油脂中含有一定量的 γ -亚麻酸,其中含量较高的有月见草、琉璃苣、黑醋栗、蓝蓟、微孔草等^[14]。但是从植物中提取 γ -亚麻酸受到诸多因素的限制,植物的生长周期长,占地面积大,且受到自然条件的限制,植物种子的采集较难,油含量不

稳定等,难以满足人们日益增长的需求^[15]。1948 年 Bernhard 和 Albercht^[16]首次从布拉克须霉(*Phycomyces blakesleeanus*)的菌体脂肪中鉴定出含有 γ -亚麻酸,揭开了微生物发酵法生产 γ -亚麻酸的序幕,大量的研究随之展开。本文针对国内外微生物发酵生产 γ -亚麻酸的菌种、代谢途径、菌种选育和发酵调控等方面的研究进行了总结,并探讨了今后的研究方向。

1 发酵法生产 γ -亚麻酸的菌种研究

1.1 发酵法生产 γ -亚麻酸的菌种

目前发现能积累 γ -亚麻酸的微生物主要是一些真菌和微藻,其中真菌研究较多的有被孢霉属(*Mortierella*)^[17-19]、毛霉属(*Mucor*)^[20-22]、枝霉属(*Thamnidium*)^[23-24]、小克银汉霉属(*Cunninghamella*)^[17, 25-26]、根霉属(*Rhizopus*)^[21]、须霉属(*Phycomyces*)^[16, 24]、接霉属(*Zygorhynchus*)^[24, 27]和犁头霉属(*Absidia*)^[24]等,藻类的研究主要集中在螺旋藻(*Spirulina*)^[28]。藻类的培养受外界条件的影响较大,用它生产多不饱和脂肪酸有一定难度,真菌在自然界分布广且易培养,所以目前利用真菌发酵生产 GLA 已经成为国内外研究热点。

1.2 微生物合成 γ -亚麻酸的代谢途径分析

在大多数微生物体内,多不饱和脂肪酸都是从丙酮酸合成乙酰-CoA 开始,经脂肪酸从头合成途径转化成软脂酸,再经一系列的延长酶和去饱和酶催化成 GLA、ARA、EPA、DHA 等多不饱和脂肪酸(图 1)^[29]。

收稿日期:2010-05-11 修回日期:2010-07-01

* 教育部新世纪优秀人才资助项目(NCET-09-0157)、江苏省六大人才高峰项目(2008)、江苏省高校产业化项目(2009)、教育部霍英东教育基金(123014)、中国博士后科学基金(20100471327)资助项目

**通讯作者,电子信箱:biotech@njut.edu.cn

近年来在某些真菌体内还发现有 PKS 合成途径^[30], 如裂殖弧菌(*Schizochytrium*) 合成 DHA 等, 而 GLA 的合成主要经脂肪酸从头合成途径。从图 1 中可以看出 GLA 的积累与多个酶有关: ① $\Delta 12$ 去饱和酶; ② $\Delta 15$ 去饱和

酶; ③ $\Delta 6$ 去饱和酶; ④延长酶。通过对多不饱和脂肪酸代谢途径的分析, 可以指导微生物发酵生产 GLA 的菌株选育及发酵调控, 具有重要意义。

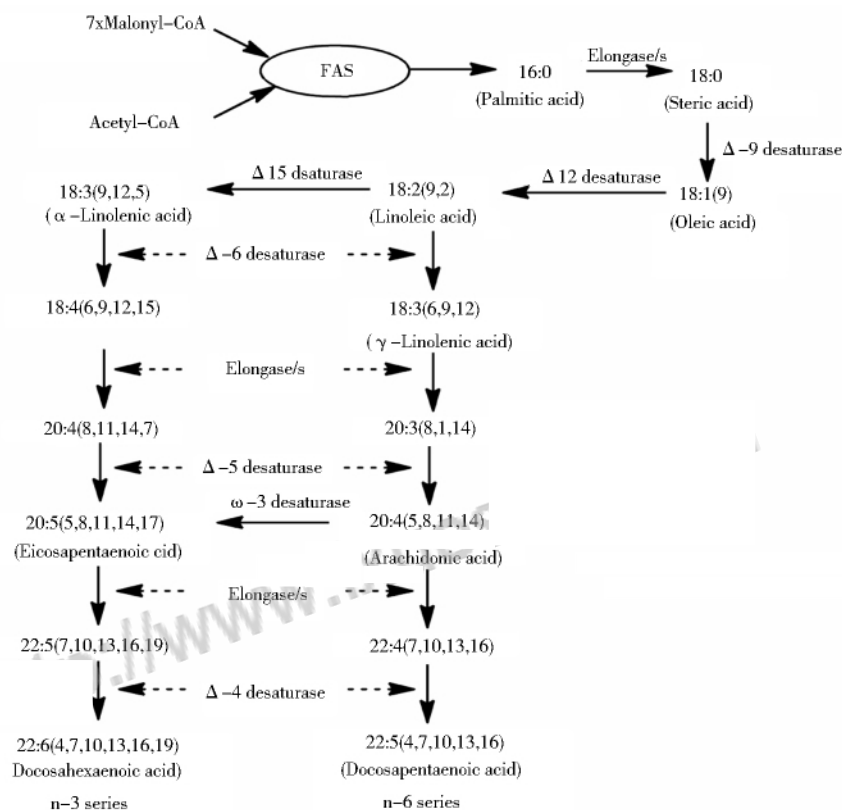


图 1 微生物多不饱和脂肪酸的合成途径^[29]

Fig. 1 The desaturation and elongation pathway of polyunsaturated fatty acids synthesis by microorganism

另外值得注意的是脂肪酸合成的前体物质, 一是, 乙酰-CoA, 为脂肪酸的合成提供碳骨架; 二是, NADPH, 为脂肪酸的合成提供还原力。它们在胞内的合成如图 2 所示。乙酰-CoA 最初在线粒体中由丙酮酸脱氢酶复合体催化丙酮酸合成, 因其不能穿过线粒体膜, 在线粒体中与草酰乙酸结合生成柠檬酸, 通过柠檬酸/苹果酸循环转运到胞质中, 再被柠檬酸裂解酶裂解生成乙酰-CoA, 从而实现胞质中乙酰-CoA 的积累, 为脂肪酸合成提供足够的碳骨架。然而, 产油微生物体内油脂的多少并不仅仅由乙酰-CoA 量来决定, 很大程度上取决于胞质中的 NADPH 量。NADPH 主要由胞质转氢酶循环产生, 限速酶为苹果酸酶。当苹果酸酶的活性受到抑制或者表达上被削弱时, 胞质中的 NADPH 将减少, 脂肪酸的合成也将随之减少^[31]。因此, 胞内 NADPH 与乙酰-CoA 的水平对微生物合成 GLA 至关重要。

1.3 高产 γ -亚麻酸的菌种选育策略

1.3.1 诱变育种及其筛选方法 目前, 用于产 GLA 微生物诱变的方法主要有物理诱变和化学诱变, 物理诱变包括: 紫外诱变、He-Ne 激光诱变、低能 N^+ 离子注入等; 常用的化学诱变方法有: 硫酸二乙酯、亚硝基胍、氯化锂和亚硝酸盐诱变等。然而, 无论采用哪种诱变方法, 都是一个相当繁琐的过程, 产生正突变的概率通常较小, 这就给筛选带来很大难度, 因此发展一种简单易行的筛选方法不仅可以减轻工作量, 还可以提高筛选效率, 减小盲目性。

苏丹黑染色法筛选: 其原理是菌体用苏丹黑染色后, 油脂被染成蓝黑色, 原生质为淡红色, 在显微镜下观察菌体的颜色, 蓝黑色深者说明菌体内的油脂含量较多^[32]。于爱群等^[33]利用苏丹黑染色法筛选获得 1 株 GLA 产生菌 EM-10, 通过摇瓶培养, 其生物量达

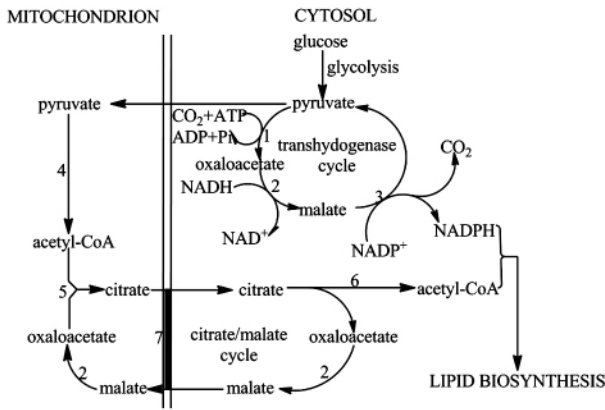


图2 胞内乙酰-CoA与NADPH的合成途径^[29]

Fig. 2 Pathway of acetyl-CoA and NADPH formation in microorganisms

1: Pyruvate decarboxylase; 2: Malate dehydrogenase; 3: Malic enzyme; 4: Pyruvate dehydrogenase; 5: Citrate synthase; 6: ATP: citrate lyase; 7: Citrate/malate translocase

11.882g/L,菌丝体油脂含量达18.86%,进一步鉴定该菌株,表明该菌为毛霉属。刘阳等^[34]通过紫外-硫酸二乙酯复合诱变深黄被孢霉AS 3.3410,用苏丹黑染色初筛,得到突变株H 3.3410-5,其GLA含量较原始菌株提高了14.4%。

甘草酸筛选:其原理是吡啶族类除草剂可以抑制 $\omega-3$ 脂肪酸的脱饱和作用,根据多不饱和脂肪酸的转化途径(图1)可以看出当 $\omega-3$ 脂肪酸脱饱和酶受到抑制,就会提高GLA的产量,通过使用该类除草剂进行菌种筛选,则可以获得GLA高产菌株^[35]。吕飒音等^[36]用紫外线诱变,以甘草酸进行筛选,获得了高产菌被孢霉A20,其生物量达20.12g/L,较出发菌株提高了25.5%,GLA产量为0.96g/L,较出发菌株提高了81%。

失水苹果酰肼筛选:GLA经由多种不同的脂肪酸脱氢酶催化油酸、亚油酸等一系列脂肪酸脱饱和产生,失水苹果酰肼(又叫马来酰肼,抑芽丹)对这些脱氢酶具有一定的抑制作用。一定浓度的失水苹果酰肼会因为抑制了菌株正常生理所必需的 γ -亚麻酸的产生而抑制菌株的生长。因此,通过筛选失水苹果酰肼抗性突变株可以得到GLA的高产菌株。沈以凌等^[37]用低能氮离子注入方法对一株雅致小克银汉霉进行诱变,通过失水苹果酰肼进行筛选得到一株高产菌株B3-7,其 γ -亚麻酸产量达到1.72g/L,经多次传代实验表明该菌遗传稳定性较好。陈波等^[38]以深黄被孢霉为出发菌株,经紫外诱变处理后,采用失水苹果酰肼为抑制剂初

筛,摇瓶复筛得到突变株M₈₀,其GLA含量提高了1.07倍,而GLA产率提高了8.23倍,效果明显。

红四氮唑(TTC)酶活法: $\Delta 6$ -脱氢酶是微生物合成GLA的关键酶之一,其活性的高低与GLA的含量密切相关,因此在菌种筛选过程中可采用TTC酶活测定法测定其脱氢酶活性^[39],从而间接反映菌体GLA含量的高低。TTC是一种无色的氧化还原剂,能被脱氢酶还原成红色物质,反应后红色越深,表示菌体内脱氢酶活力愈强,不饱和脂肪酸的积累量愈多。汪晨辉等^[40]对卷枝毛霉(*Mucor circinelloides* AS 3.2208)进行紫外诱变,采用苏丹黑染色和TTC酶活法进行初筛,摇瓶发酵测定相关指标进行复筛,获得1株突变株,其GLA产量为630.72mg/L,是出发菌株的5.61倍。

低温抗性筛选:在低温环境下,饱和脂肪酸由于凝固点低,易凝固,使得细胞膜的流动性变差,不利于细胞的生长、繁殖,为了抵抗这种环境压力,细胞趋向于将一部分饱和脂肪酸去饱和生成多不饱和脂肪酸,来增加膜脂的流动性,以维持正常的生理功能。Hiruta等^[41]用亚硝基胍对拉曼被孢霉IFO 8187进行诱变,通过低温筛选,得到一株低温(15℃)抗性突变株MM15-1,其GLA含量达到了18.3%,较出发菌株提高了2倍多。

1.3.2 基因工程育种随着现代分子生物学技术的发展,人们对不饱和脂肪酸合成过程中各种关键酶在分子水平上的作用与调节机制有了进一步了解,不断有通过基因工程手段改造 γ -亚麻酸生产菌的报道,并大幅度提高了菌种的 γ -亚麻酸合成能力。

Huang等^[42]从高山被孢霉中克隆得到 $\Delta 12$ 和 $\Delta 6$ 去饱和酶编码基因的cDNA序列,并将它们分别克隆至啤酒酵母中。当表达 $\Delta 12$ 去饱和酶时,以油酸为底物,发酵终点时其亚油酸的含量达到了25%,当表达 $\Delta 6$ 去饱和酶时,以亚麻酸为底物,其发酵产物GLA含量为10%。当共同表达这两个酶,在不添加前体脂肪酸的条件下,GLA的含量也能达到8%。

Dyer等^[43]从桐树基因组中克隆得到 $\omega 3$ 去饱和酶基因,并将其成功导入到了一株酵母中。当以亚油酸为底物发酵时,其GLA含量占总油的18%。并发现其 $\omega-3$ 去饱和酶的活性是在酵母中表达芸苔(*Brassica napus*) $\omega-3$ 去饱和酶基因的11倍,所获得的重组菌具有较好的工业化应用潜力。

Chuang等^[44]将来自于高山被孢霉的 $\Delta-6$ 和 $\Delta-12$ 去饱和酶编码基因的cDNA分别连接到hp4d启动子后,并连接在同一个载体上,导入解脂耶氏酵母

(*Yarrowia lipolytica*) 利用自身的油酸来合成 GLA, 结果在对照组 GLA 含量为零的情况下, 重组菌的 GLA 含量达到了 20%。

除了上述针对不同去饱和酶的异源表达手段外, 苹果酸酶作为 NADPH 合成的关键酶, 近年来也有学者针对其过量表达对 GLA 合成影响展开了研究。Zhang 等^[45] 设计简并引物从卷枝毛霉 (*Mucor circinelloides* CBS 108.16) 和高山被孢霉 (*Mortierella alpine* Peyron CBS 696.70) 中克隆得到苹果酸酶基因, 并将它们分别置于 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因启动子后, 导入亮氨酸缺陷型卷枝毛霉 (*Mucor circinelloides* R7B) 中过表达。通过 DNA 印迹法筛选得到两株重组子 *McmalEMt* (苹果酸酶基因来自高山被孢霉) 和 *McmalEMc* (苹果酸酶基因来自卷枝毛霉)。它们在高碳氮比条件下产脂发酵, 苹果酸酶活性分别提高了 3 倍和 2 倍, 油脂含量分别提高了 2.5 倍和 2.4 倍, GLA 的含量从 23.2% 分别提高到了 26.1% 和 30.1%。

目前对于各种关键酶的基因工程操作主要集中在目的基因的分离、鉴定以及已知代谢途径的强化上, 所构建工程菌的 GLA 产量都还比较低, 有待进一步深入研究, 如利用全局转录机器工程^[46]、多基因组工程^[47] 等新兴发展的工业微生物育种技术, 深入到转录水平和基因组水平, 选育高效的 GLA 生产菌株将是未来研究的重点。

2 发酵法生产 γ -亚麻酸的影响因素

2.1 碳氮源及其比例对发酵产 γ -亚麻酸的影响

碳源是微生物生长的能量来源, 同时又是生产 GLA 的原料物质, 在代谢调控中起着极其重要的作用。可用于发酵产 GLA 的碳源物质主要有淀粉、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖和糖蜜等, 目前葡萄糖用的最多。培养基中葡萄糖的含量直接关系到 GLA 的产量, 通常情况下, 葡萄糖越多, 生物量越大, GLA 产量越大。Fakas 等^[17] 考察了在氮限制的前提下, 不同碳源 (木糖、粗甘油和葡糖糖) 对深黄被孢霉和刺孢小克银汉霉脂肪酸的积累情况。当以葡萄糖为碳源时, 生物量分别为 27g/L, 15g/L, 油脂含量分别为 44.6%, 46.0%。当以木糖为碳源时含油量分别为 65.5%, 57.7%, 此时刺孢小克银汉霉中积累了大量的 GLA, 总油脂含量达 6.7g/L, GLA 达 1119mg/L。在粗甘油中两种菌都生长缓慢, 且含油量不高。Papanikolaou 等^[48] 在氮限制培养基中通过不同的初糖浓度考察脂肪酸的积累, 当葡萄

糖含量为 100g/L 时, 生物量达到了 35.9g/L, 总油脂含量为 18.1g/L, GLA 为 801mg/L, 实现了高糖培养。

氮源在微生物油脂发酵中主要是作为限制因素, 与微生物菌体的多少直接相关, 同时也影响着 GLA 的合成。在氮限制的发酵中, 当氮源利用完全时, 重要的脂肪酸才开始大量的积累^[48]。Fakas 等^[49] 研究了 *Cunninghamella echinulata* 在多种有机氮源 (玉米麸, 玉米浆, 乳清浓缩物, 酵母浸膏和土豆水解物) 上的生长情况, 通过对比发现, 在含土豆水解物的培养基上生长最好, 生物量达到了 17.6g/L, 油脂含量为 39.6%, GLA 产量为 800mg/L。

对于大多数产油微生物来说, 生长在初始 C: N < 20 的培养基中通常不能积累油脂, 最适的油脂积累 C: N 为 30 ~ 80^[25]。为了优化 *C. echinulata* CCRC 31840 对 GLA 的积累, Chen 等^[50] 对其培养基的 C: N 进行了研究, 随着碳氮比的提高, 生物量逐渐升高, 油脂含量先增加后减少, 当碳氮比为 35 时达到最大, GLA 的含量当碳氮比为 17.5 的时候达到最大, 为 18.9%。

2.2 廉价基质对发酵产 γ -亚麻酸的影响

近年来, 工农业副产品及其他的一些材料被广泛用于微生物合成高附加产品的原料, 由于其低廉, 具有广阔的应用价值。咸漠等^[18] 研究了以十六醇为碳源来发酵生产 GLA, 通过对发酵条件进行优化, 培养基中十六醇 20g/L, 酵母浸膏 10g/L, 在 23℃ 培养 120h, 经过滤, 菌丝体在 5℃ 时老化 15 天, 最后 GLA 的含量达到了 47%, GLA 的产量为 2.44mg/ml。他们还研究了十八醇为碳源时 GLA 的发酵, 十八醇 20g/L, 酵母浸膏 10g/L, Mg^{2+} 为 25mmol/L, 在 23℃ 培养 5h, 其 GLA 的含量为 0.31mg/ml^[19]。除了以长链醇为碳源外, 很多研究者还对各种植物油的添加进行了研究。Tauk-Tornisielo 等^[21] 考察了各种植物油 (棕榈油、芸苔油、油煎过的大豆油、芝麻油和葵花油) 和碳水化合物 (半乳糖、麦芽糖、麦芽浸膏和山梨醇) 对 *Mucor circinelloides* 和 *Rhizopus* sp. 发酵产 GLA 的影响。当以芸苔油为主要碳源时, *Rhizopus* sp. 产 GLA 为最高, 达到了 1.2g/L, 当以芝麻油为主要碳源时, *Mucor circinelloides* 产 GLA 最高, 达到了 4.1g/L。

2.3 金属离子对发酵产 γ -亚麻酸的影响

金属离子作为多种酶的辅酶, 同时又是维持细胞内外渗透压平衡的重要因子, 在微生物合成代谢中扮演着重要的角色。Muhid 等^[25] 考察了不同金属离子 (Mg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} 和 Mn^{2+}) 对小克银汉霉

(*Cunninghamella* sp. 2A1) 发酵生产 GLA 的影响,发现 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 对油脂的积累影响较大,这 3 种离子同样影响 GLA 的含量,其中 Zn^{2+} 影响最大,较之没有添加 Zn^{2+} ,GLA 的含量增加了 74%,同时他们发现金属离子的有无对生物量没有影响。

2.4 温度对发酵产 γ -亚麻酸的影响

温度一方面影响细胞膜的流动性,随着温度的变化,脂肪酸的分布也随之变化,低温时趋于形成不饱和脂肪酸,以维持膜功能;另一方面影响溶液中氧的溶解度,氧是去饱和酶催化脱氢的电子受体,在不饱和脂肪酸的形成中扮演着重要的角色^[51]。de Oliveira Carvalho 等^[20]在对 *Mucor* sp. LB-54 的培养时发现,当培养温度为 28℃ 时 GLA 占总脂肪酸的 15%,当将温度降低为 12℃ 时,GLA 的含量达到了 24%,因此建立了两步温度调控策略,在前期将培养温度定为 28℃,培养 5 天,后期将温度降为 12℃ 培养 3 天,最后 GLA 的产量从 44mg/L 升高到了 74mg/L,提高了 68%。

2.5 菌体形态控制对发酵产 γ -亚麻酸的影响

在真菌的发酵过程中,形态控制一直是研究的焦点。真菌发酵通常有两种形态:一是,丝状;二是,球状。在丝状情况下,发酵液很容易形成非牛顿流体,极其黏稠,降低搅拌和通气的效率。菌球形式由于可以降低发酵液黏度,被广泛用于丝状真菌的发酵。然而,菌球的大小在发酵过程中难以保持恒定,一直是丝状真菌发酵面临的一个难题。菌球的形成与大小主要取决于培养时的各个因素,如 pH、接种量和搅拌速度等。Kang 等^[52]在研究 *Mucor* sp. KCTC 8405P 时发现,在低 pH 的培养基上生长时,菌丝呈现出酵母状 (yeast-like),而在高 pH 时则表现出菌丝状。Park 等^[53]在此基础上对该菌株进行了深入的研究,建立了两步 pH 策略,先让菌株在初始 pH4.3 的培养基上自然生长,培养 2 天 pH 先降为 1.9 再升高为 3.0,再用 NaOH 调节 pH 使其保持在 3.0 直至发酵终点。前一段菌丝呈酵母状,后一阶段菌丝呈丝状。Higashiyama 等^[54]在研究花生四烯酸发酵时也发现溶解氧对高山被孢霉 *Mortierella alpina* 1S-4 的形态有影响。他们分别通过两种方法来改变溶液中的溶解氧:一是,加压法;二是,富氧鼓风法。研究发现最优的氧浓度为 10~15ppm,当氧浓度保持在 20~50ppm 时,菌体形态从丝状变成球状,由于菌球的厚壁影响了传质,花生四烯酸的产量急剧减少。当氧浓度为 15~20ppm 时,菌体形态基本不发生变化。他们推测:在高氧浓度情况下,细胞为了要保

护自身,高度分散的菌丝趋于形成厚的菌球壁来抵御高氧环境。此时主要是菌球外表面的菌丝在生长,内部形成中空,并慢慢发生菌体自溶,故花生四烯酸的产量减少。

2.6 固态发酵对生产 γ -亚麻酸的影响

固态发酵生产 GLA 是近年来的一个热点,相对于液体发酵具有很大优势:一是,所需的技术简单,不需要高昂的设备;二是,原料容易获得且价格便宜,可以充分利用工农业的一些废弃物,并能够提供丰富的营养物质供微生物生长;三是,用水少,节省能源,且无污染。由于真菌能够分泌胞外酶,如多糖水解酶和蛋白质水解酶,通常能够利用一个比较宽泛的基质范围,许多工农业的副产品被用作微生物发酵生产 GLA 的原料。Certik 等^[22]考察了毛霉目的大量低等丝状真菌固体发酵 GLA 的能力,最后选择 *Thamnidium elegans* 进一步研究。首先对多种谷物自身的脂肪酸分布进行了检测,发现亚油酸含量占主导地位,为 32.7%~64.4%,未检测到 GLA 的存在。以用过的麦芽 (spent malt grains, SMG) 为基质支持物 (谷物:SMG=3:1) 时有利于总脂和 GLA 的积累。当在用过的小麦片 (spelt wheat flakes):SMG 为 3:1 的基质上生长时,产物中 GLA 的产率最高,达到了 7.2g/kg,GLA 的含量为 13.1%。Jangbua 等^[55]优化了一株鲁西毛霉利用低劣生物质固体发酵产 GLA 的培养条件,当接种量为 5×10^5 个孢子/g 基质时,*Mucor rouxii* 在米糠和大豆粕上均能生长良好,经过在 30℃ 下培养 5 天,米糠中的 GLA 达到了 6g/kg。Fakas 等^[56]研究了 *Mortierella isabellina* 固体发酵时菌龄对脂肪酸组成的影响,发现年轻菌丝中富含极性脂,在老菌丝中中性脂略有升高。这就表明多不饱和脂肪酸的合成在年轻菌丝中较有利,当在梨子渣上培养时,总油脂含量达 12%,GLA 达 2.9 mg/g。

3 展望

γ -亚麻酸作为“21 世纪功能性食品主角”,具有广阔的应用和市场前景,但是由于目前其发酵产量还比较低,国内外仅有少数几家公司实现了工业化生产,目前市售的 GLA 相关产品还主要来源于植物种子。随着现代生物技术的发展,利用代谢工程、合成生物学、系统生物学等学科发展起来的新兴技术手段来改造 GLA 生产菌种,辅之以一些简便的筛选方法,有望大幅度提高菌种的 GLA 合成能力,并在发酵水平上对其培养条件进行优化,以实现其高产,同时开发高效低成本的

GLA 提取工艺将有利于 GLA 的工业化生产。今后研究可以从以下几个方面展开:

(1) 进一步研究 γ -亚麻酸生物合成代谢途径,着重研究关键酶(如去饱和酶、延长酶和苹果酸酶等)的酶学性质,阐明 γ -亚麻酸生物合成的代谢机理,在此基础上通过添加某些因子来调节酶活以达到大量积累 γ -亚麻酸的目的。

(2) 重视野生菌株的筛选,利用全局转录机器工程、多基因组工程等技术手段进行菌株的改造,建立一个发酵生产 γ -亚麻酸的微生物资源库,为工业化生产 γ -亚麻酸提供菌种支持。

(3) 在对发酵过程进行动力学分析的基础上利用数学工具模拟优化发酵过程,以优化发酵工艺,并在此基础上开发高效率、低成本的分离提取工艺。

(4) 对 γ -亚麻酸及其衍生物进行应用开发,以进一步拓宽其应用领域。

参考文献

- [1] 林峰,张燕. γ -亚麻酸及其研究和应用. 中国药学杂志, 1994, 29(5): 263-267.
Lin F, Zhang Y. Chinese Pharmaceutical Journal, 1994, 29(5): 263-267.
- [2] Laidlaw M, Holub B J. Effects of supplementation with fish oil - derived n-3 fatty acids and γ -linolenic acid on circulating plasma lipids and fatty acid profiles in women. American Journal of Clinical Nutrition, 2003, 77(1): 37-42.
- [3] Guivernau M, Meza N, Barja P, et al. Clinical and experimental study on the long-term effect of dietary gamma-linolenic acid on plasma lipids, platelet aggregation, thromboxane formation, and prostacyclin production. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 1994, 51(5): 311-316.
- [4] Fan Y Y, Ramos K S, Chapkin R S. Dietary gamma-linolenic acid enhances mouse macrophage - derived prostaglandin E1 which inhibits vascular smooth muscle cell proliferation. The Journal of Nutrition, 1997, 127(9): 1765-1771.
- [5] Giamarellos-Bourboulis E J, Grecka P, Dionyssiou-Asteriou A, et al. In vitro influence of polyunsaturated fatty acids on nosocomial Pseudomonas aeruginosa: a preliminary report. International Journal of Antimicrobial Agents, 1995, 6(1): 47-50.
- [6] Kapoor R, Huang Y S. Gamma linolenic acid: an antiinflammatory omega-6 fatty acid. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2006, 7(6): 531-534.
- [7] 董杰明,吴锐华,袁锡鲁,等. γ -亚麻酸的保健作用. 卫生研究, 2003, 32(3): 299-301.
Dong J M, Wu R H, Yuan C L, et al. Journal of Hygiene Research, 2003, 32(3): 299-301.
- [8] Jiang W G, Hiseox S, Hallett M B, et al. Regulation of the expression of e-cadherin on human cancer cells by γ -linolenic acid (GLA). Cancer Research, 1995, 55(21): 5043-5048.
- [9] 曹中春,张力,周晓刚,等. 亚麻酸膳食干预对免疫系统疾病的调节作用. 中国油脂, 2000, 25(6): 189-191.
Cao Z C, Zhang L, Zhou X G, et al. China Oils and Fats, 2000, 25(6): 189-191.
- [10] Kinchington D, Randall S, Winter M, et al. Lithium gamma-linolenate-induced cytotoxicity against cells chronically infected with HIV-1. FEBS Letters, 1993, 330(2): 219-221.
- [11] 苏桂红. 亚麻酸的开发与应用. 黑龙江医药, 2004, 17(2): 142-143.
Su G H. Heilongjiang Medicine Journal, 2004, 17(2): 142-143.
- [12] 张耀,方向明. γ -亚麻酸干预经前综合征的临床观察. 中国医师杂志, 2002, 4(11): 1281.
Zhang Y, Fang X M. Journal of Chinese Physician, 2002, 4(11): 1281.
- [13] Heiduschka A, Lüft K. Das fette Oel der Samen der Nachtkerze (Oenothera biennis) und über eine neue Linolensäure. Archiv der Pharmazie, 1919, 257(1): 33-69.
- [14] 田歆珍,王贤磊,孙桂林,等. γ -亚麻酸的研究进展. 生物技术, 2008, 18(1): 89-92.
Tian X Z, Wang X L, Sun G L, et al. Biotechnology, 2008, 18(1): 89-92.
- [15] 海华,尚德静,李庆伟. 真菌发酵生产 γ -亚麻酸的研究进展. 工业微生物, 2002, 32(4): 46-50.
Hai H, Shang D J, Li Q W. Industrial Microorganism, 2002, 32(4): 46-50.
- [16] Bernhard K, Albrecht H. Die lipide aus phycomyces blakesleanus. Helvetica Chimica Acta, 1948, 31(4): 977-988.
- [17] Fakas S, Papanikolaou S, Batsos A, et al. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by Cunninghamella echinulata and Mortierella isabellina. Biomass and Bioenergy, 2009, 33(4): 573-580.
- [18] Xian M, Yan J, Kang Y, et al. Production of γ -linolenic acid by Mortierella isabellina grown on hexadecanol. Letters in Applied Microbiology, 2001, 33(5): 367-370.
- [19] Xian M, Kang Y, Yan J, et al. Production of linolenic acid by Mortierella isabellina grown on octadecanol. Current Microbiology, 2002, 44(2): 141-144.
- [20] De Oliveira Carvalho P, De Oliveira J G, Maria P G. Enhancement of gamma-linolenic acid production by the fungus Mucor sp LB-54 by growth temperature. Revista de

- Microbiologia, 1999, 30(2): 170-175.
- [21] Tauk-Tornisiello S M, Arasato L S, de Almeida A F, et al. Lipid formation and gamma-linolenic acid production by *Mucor circinelloides* and *Rhizopus* sp., grown on vegetable oil. Brazilian Journal of Microbiology, 2009, 40(2): 342-345.
- [22] Certik M, Slavikova L, Masmova S, et al. Enhancement of nutritional value of cereals with gamma-linolenic acid by fungal solid-state fermentations. Food Technology and Biotechnology, 2006, 44(1): 75-82.
- [23] Streanská S, Šajbidor J. Oligounsaturated fatty acid production by selected strains of micromycetes. Folia Microbiologica, 1992, 37(5): 357-359.
- [24] Weete J, Shewmaker F, Gandhi S. γ -Linolenic acid in Zygomycetous fungi: *Syzygites megalocarpus*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1998, 75(10): 1367-1372.
- [25] Muhiđ F, Nawi W N N W, Kader A J A, et al. Effects of metal ion concentrations on lipid and gamma linolenic acid production by *Cunninghamella* sp. 2A1. OnLine Journal of Biological Sciences, 2008, 8(3): 62-67.
- [26] Moreton R S. Physiology of lipid accumulating yeasts//Moreton RS. Single cell oil. Harlow, Essex, England: Longman Scientific and Technical, 1988: 1-32.
- [27] Kavadia A, Komaitis M, Chevalot I, et al. Lipid and γ -linolenic acid accumulation in strains of Zygomycetes growing on glucose. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2001, 78(4): 341-346.
- [28] Nichols B, Wood B. The occurrence and biosynthesis of gamma-linolenic acid in a blue-green alga, *Spirulina platensis*. Lipids, 1968, 3(1): 46-50.
- [29] Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. Biochimie 2004 86(11): 807-815.
- [30] 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(5528): 290-293.
- [31] Ratledge C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. Biochemical Society Transactions, 2002, 30(6): 1047-1050.
- [32] 方心芳. 应用微生物学实验法. 北京: 中国轻工业出版社, 1993: 22-23.
Fang X F. Applied Microbiology Experiment. Beijing: Chinese Light Industry Press, 1993: 22-23.
- [33] 于爱群, 江贤章, 夏晓峰, 等. γ -亚麻酸产生菌 *Mucor* sp EM-10 的筛选及分子鉴定. 生物加工过程, 2009, 7(2): 74-78.
Yu A Q, Jiang X Z, Xia X F, et al. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2009, 7(2): 74-78.
- [34] 刘阳, 孟晓敏, 张春枝, 等. γ -亚麻酸生产菌株的诱变选育. 大连轻工业学院学报, 2006, 25(3): 172-175.
Liu Y, Meng X M, Zhang C Z, et al. Journal of Dalian Polytechnic University 2006, 25(3): 172-175.
- [35] Cohen Z, Didi S, Heimer Y M. Overproduction of γ -linolenic and eicosapentaenoic acids by algae. Plant Physiology, 1992, 98(2): 569-572.
- [36] 吕飒音, 潘璠. 被孢霉高产 γ -亚麻酸菌株的选育. 中国生化药物杂志, 2000, 21(2): 79-80.
Lu S Y, Pan F. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2000, 21(2): 79-80.
- [37] 沈以凌, 谢飞, 虞龙. 低能氮离子注入在 γ -亚麻酸发酵中的应用研究. 中国酿造, 2009, 202(1): 96-99.
Shen Y L, Xie F, Yu L. China Brewing, 2009, 202(1): 96-99.
- [38] 陈波, 张玲, 贺新生, 等. 用抗性筛选法选育 γ -亚麻酸(GLA) 高产菌株. 微生物学通报, 2003, 30(1): 53-56.
Chen B, Zhang L, He X S, et al. Microbiology, 2003, 30(1): 53-56.
- [39] 王岳五, 陈宁. 微生物遗传学与实验技术. 天津: 南开大学出版社, 1988: 120.
Wang Y W, Chen N. Microbial Genetics and Experimental Technique. Tian jing: Nankai University Press, 1988: 120.
- [40] 汪晨辉, 曹健, 曾实. 卷枝毛霉 γ -亚麻酸高产菌株的选育. 河南工业大学学报(自然科学版), 2005, 26(2): 24-27.
Wang C H, Cao J, Zeng S. Journal of Henan University of Technology(Natural Science Edition), 2005, 26(2): 24-27.
- [41] Hiruta O, Kamisaka Y, Yokochi T, et al. γ -linolenic acid production by a low temperature-resistant mutant of *Mortierella ramanniana*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996, 82(2): 119-123.
- [42] Huang Y S, Chaudhary S, Thurmond J, et al. Cloning of $\Delta 12$ - and $\Delta 6$ -desaturases from *Mortierella alpine* and recombinant production of γ -linolenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. Lipids, 1999, 34(7): 649-659.
- [43] Dyer J M, Chapital D C, Kuan J C W. Production of linolenic acid in yeast cells expressing an omega-3 desaturase from tung (*Aleurites fordii*). Journal of the American Oil Chemists' Society, 2004, 81(7): 647-651.
- [44] Chuang L T, Chenb D C, Nicaude J M, et al. Co-expression of heterologous desaturase genes in *Yarrowia lipolytica*. New biotechnology. 2010. doi:10.1016/j.nbt.2010.02.006.
- [45] Zhang Y, Adams I P, Ratledge C. Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation. Microbiology, 2007, 153(7): 2013-2025.
- [46] Alper H, Stephanopoulos G. Global transcription machinery engineering: A new approach for improving cellular phenotype.

- Metabolic Engineering, 2007, 9(3): 258-267.
- [47] Wang H H, Isaacs F J, Carr P A, et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. Nature, 2009, 460(7257): 894-899.
- [48] Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G, et al. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. Bioresource Technology, 2004, 95(3): 287-291.
- [49] Fakas S, Certik M, Papanikolaou S, et al. Gamma-linolenic acid production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources. Bioresource Technology, 2008, 99(13): 5986-5990.
- [50] Chen H C and Chang C C. Production of gamma-linolenic acid by the fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. Biotechnology Progress, 1996, 12(3): 338-341.
- [51] Kendrick A, Ratledge C. Lipid formation in the oleaginous mould *Entomophthora exitalis* grown in continuous culture: effects of growth rate, temperature and dissolved oxygen tension on polyunsaturated fatty acids. Applied Microbiology and Biotechnology, 1992, 37(1): 18-22.
- [52] Kang H S, Shin H K. Influence of medium composition of the production of γ -linolenic acid by *Mucor* sp KCTC 8405P. Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 1989, 17: 568-573.
- [53] Park J H, Shin H K. High density cell culture of *Mucor* sp. KCTC 8450P for production of γ -linolenic acid in fed-batch culture. Journal of Microbiology and Biotechnology, 1991, 1(2): 126-129.
- [54] Higashiyama K, Murakami K, Tsujimura H, et al. Effects of dissolved oxygen on the morphology of an arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4. Biotechnology and Bioengineering, 1999, 63(4): 442-448.
- [55] Jangbua P, Laoteng K, Kitsubun P, et al. Gamma-linolenic acid production of *Mucor rouxii* by solid-state fermentation using agricultural by-products. Letters in Applied Microbiology, 2009, 49(1): 91-97.
- [56] Fakas S, Makri A, Mavromati M, et al. Fatty acid composition in lipid fractions lengthwise the mycelium of *Mortierella isabellina* and lipid production by solid state fermentation. Bioresource Technology, 2009, 100(23): 6118-6120.

Progresses in Fermentative Production of γ -Linolenic Acid

LI Zhi-yong JI Xiao-jun CONG Lei-wei NIE Zhi-kui PENG Chao GAO Zhen HUANG He

(State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract γ -Linolenic acid is an essential fatty acid of ω -6 series with a variety of special physiological function for human beings. It is available commercially in seed oils from black currant, evening primrose, borage, and so on. However, this means is limited by many factors, and can not meet the huge requirement of human beings. Therefore, it might be expected that potential commercial sources of γ -linolenic acid may be found among the microorganism. The present review outlines the status of our current understanding on γ -linolenic acid by microbial fermentation, including the strains and the metabolite pathways. Breeding strategies, including mutation breeding and molecular breeding, are especially introduced. In addition, the effect of various factors on the fermentative production of γ -linolenic acid, such as carbon sources, nitrogen sources, cheap substances, trace minerals, temperature, morphology, and solid state fermentation were summarized. At last, the future research emphasis was prospected.

Key words γ -linolenic acid Microorganism Fermentation Breeding Metabolic control