

产神经酸菌种的筛选及发酵条件优化

宋贤娟¹, 孙爱娣¹, 张 瑞², 周佩蓉¹, 黄艾祥¹, 王雪峰^{1,2}

(1. 云南农业大学 食品科学技术学院, 昆明 650201; 2. 滨州市检验检测中心, 山东 滨州 256600)

摘要:旨在为神经酸的获取及相关研究提供参考,以云南特色木本植物油辣木籽油为底物,从4种产油菌株中筛选出产神经酸较高的菌种,通过单因素实验和响应面实验对优选菌种的发酵条件进行了优化,并采用气相色谱-质谱(GC-MS)测定了添加与不添加辣木籽油乳液(辣木籽油、水、吐温80体积比2:2:1)发酵获得的优选菌种冻干粉中脂肪酸组成及含量。结果表明:圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)为产神经酸最优菌种;圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)最佳发酵条件为辣木籽油添加量7%(以乳液形式添加)、菌液添加量10%、培养温度28℃、培养时间48 h,在此条件下圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)提取物中神经酸含量为2.40 mg/mL;未添加辣木籽油乳液发酵获得的圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)冻干粉(对照组)中饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸相对含量分别为38.91%、41.92%、19.18%,神经酸含量为10.983 μg/g,而添加辣木籽油乳液发酵获得的圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)冻干粉中饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸相对含量分别为48.57%、31.98%、19.46%,神经酸含量为13.518 μg/g,比对照组中神经酸含量提升了23.1%。综上,添加辣木籽油底物可以提高菌种冻干粉中神经酸的绝对含量。

关键词:神经酸;微生物发酵;圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226);辣木籽油

中图分类号:Q815;TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2025)03-0029-08

Screening of nervonic acid – producing bacteria and optimization of fermentation conditions

SONG Xianjuan¹, SUN Aidi¹, ZHANG Rui², ZHOU Peirong¹,
HUANG Aixiang¹, WANG Xuefeng^{1,2}

(1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University,
Kunming 650201, China; 2. Binzhou Inspection and Testing Center,
Binzhou 256600, Shandong, China)

Abstract: In order to provide reference for the acquisition and related studies of nervonic acid, Yunnan's characteristic woody oil *Moringa oleifolia* seed oil was used as the substrate to select the strains with high nervonic acid production from four oil – producing strains. The fermentation conditions of the selected strains were optimized by single factor experiment and response surface methodology. The composition and content of fatty acids in the lyophilized powder of the selected strains obtained by fermentation with or without *Moringa oleifolia* seed oil emulsion (volume ratio of *Moringa oleifolia* seed oil, water and Tween 80 2:2:1) were determined by GC – MS. The results showed that *Saccharomyces rhodospora* GDMCC 2.226 was the best strain to produce nervonic acid. The optimal fermentation conditions of *Saccharomyces rhodospora* GDMCC 2.226 were as follows: *Moringa oleifolia* seed oil (in the form of emulsion) dosage

收稿日期:2023-11-03;修回日期:2024-09-30

基金项目:云南省重大科技专项(202102AE090027);云南省科学技术协会2022—2024年度青年科技人才托举工程项目
作者简介:宋贤娟(1999),女,硕士研究生,研究方向为食品加工与安全(E-mail)2867384336@qq.com。

通信作者:王雪峰,副教授,博士(E-mail)364135728@qq.com。

7%, bacterial fluid dosage 10%, culture temperature 28℃ and culture time 48 h. Under these conditions, the content of nervonic acid in the extract of *Saccharomyces rhodospora* GDMCC 2.226 was 2.40 mg/mL. The contents of saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids

and polyunsaturated fatty acids (accounting for total fatty acids) in lyophilized powder of *Saccharomyces rhodospora* GDMCC 2.226 obtained by fermentation without *Moringa oleifolia* seed oil emulsion (control) were 38.91%, 41.92% and 19.18%, respectively, and the content of nervonic acid was 10.983 $\mu\text{g/g}$. The contents of saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids (accounting for total fatty acids) were 48.57%, 31.98% and 19.46%, respectively, and the content of nervonic acid was 13.518 $\mu\text{g/g}$ in the lyophilized powder of *Saccharomyces rhodospora* GDMCC 2.226 obtained by fermentation with *Moringa oleifolia* seed oil emulsion, and its absolute content of nervonic acid was 23.1% higher than that of the control. In conclusion, adding *Moringa oleifolia* seed oil substrate can increase the absolute content of nervonic acid in the lyophilized powder of strain.

Key words: nervonic acid; microbial fermentation; *Saccharomyces rhodospora* GDMCC 2.226; *Moringa oleifolia* seed oil

神经酸(Nervonic acid),化学名为顺-15-二十四碳烯酸,又名鲨鱼酸(Selacholeic acid)^[1]。研究表明,大脑中缺乏神经酸会引起大脑损伤以及记忆力减退,导致中风、老年痴呆等大脑疾病^[2]。目前,神经酸已成为公认的能够修复脑受损“神经传递通道”,并促使“神经再生”的双效、高能物质,因其独特的神经保护作用受到市场关注^[3]。

神经酸最早发现于鲨鱼的神经组织中^[4],过去主要依靠捕杀鲨鱼获得。但随着人类短期快速大量地捕杀鲨鱼,鲨鱼资源逐渐匮乏,生态环境平衡遭到破坏,为了保护鲨鱼资源,国际上开始禁止捕杀鲨鱼,这也使神经酸的获取受到极大制约。随着油脂化学的发展,研究者发现一些植物果实和种子中含有神经酸。由此,对神经酸的研究由动物源转向植物源,从植物中提取成为获取神经酸的主要方向。目前已发现13科31属的38种植物中含有神经酸,其中8种木本植物和2种草本植物的神经酸含量至少为4.6%^[1]。我国神经酸含量较高的植物有元宝枫、文冠果、蒜头果。虽然一些植物表现出较高的种子油含量和神经酸含量,但由于各种条件的制约,植物源神经酸的获取遭遇瓶颈,远不能满足市场需求。除了鲨鱼组织和部分植物中含有神经酸外,利用微生物资源进行发酵和半工业化生产也能够获得神经酸,且通过微生物发酵的方式生产神经酸具有生长繁殖快、发酵条件易控制、培养时间短等优势,已成为生产神经酸的一种新趋势,引起越来越多的关注。如范勇等^[5]利用微藻 *Mychonastes afer* HSO-3 生产神经酸,发现 *Mychonastes afer* HSO-3 油脂中神经酸含量能够达到细胞内中性脂肪酸含量的6.5%。目前,通过发酵法产神经酸的研究主要集中在从植物内生菌中筛选出产神经酸的真菌,通过基因

工程技术对菌株进行改造,外源添加油酸等进行诱导的方式获取神经酸^[6-7],但从特定植物中培养、提取具有一定局限性,基因改造过程复杂、耗时,不利于产业化生产。Chen等^[8]研究发现,利用植物乳杆菌CGMCC 8198发酵元宝枫籽油可提高共轭亚油酸的含量,这一发现为神经酸的获取提供了新思路。若以油脂为底物直接发酵获取神经酸,不仅可改善从特定动植物中提取的局限性,且具有耗时短、条件易控制、可根据需要进行小批量或大批量连续化生产等优点,利于实现产业化生产。本文以云南特色木本植物油辣木籽油为底物,从4种产油菌株中筛选出产神经酸较高的菌株,进行发酵条件优化,并采用气相色谱-质谱(GC-MS)测定添加辣木籽油前后菌种冻干粉中脂肪酸组成及含量,以期为神经酸的获取及相关研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

辣木籽,云南天佑有限公司;神经酸甲酯标准品、37种混合脂肪酸甲酯标准品(4 000 $\mu\text{g/mL}$),上海源叶生物科技有限公司;圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)、解脂假丝酵母(GDMCC 2.187)、深黄被孢霉(GDMCC 3.241),广东省微生物菌种保藏中心;深黄被孢霉(BNCC 336207),北京北纳创联生物技术研究院;氢氧化钾、氢氧化钠、甲醇、无水硫酸钠、乙醇、无水乙醚、氯仿,天津市风船化学试剂科技有限公司;盐酸,重庆川东化工(集团)有限公司;硫酸,上海星可高纯溶剂有限公司;氯化钠,天津市恒兴化学试剂制造有限公司;冰乙酸,天津市富宇精细化工有限公司;三氯甲烷,成都市科隆化学品有限公司;麦芽汁(YM)培养基、综合马铃薯(PDA)培养基,青岛日水生物技术有限公司。

ZYJ-420 榨油机,东莞市房太电器有限公司; EPED-ESL-10TH 超纯水机,南京易普易达科技发展有限公司;SCQ-9201B 超声波提取仪,上海声彦超声波仪器有限公司;LDZM-60KCS 立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;THZ-98A 振荡摇床培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;H2-16KR 台式高速冷冻离心机,湖南可成仪器设备有限公司;SCIENTZ-18N 真空冷冻干燥机,上海比朗仪器制造有限公司;Agilent 7890A 气相色谱仪;Thermo Trace 1300 气相色谱仪、TSQ 9000 质谱仪,美国赛默飞世尔科学公司。

1.2 实验方法

1.2.1 辣木籽油乳液的制备

取一定量辣木籽,除去杂质,于 60℃ 烘箱中烘 4 h,榨油机预热 10 min,将烘好的辣木籽缓慢加入榨油机进行压榨,静置、去除沉淀后得到辣木籽油,倒入瓶中密封,于 -20℃ 保存备用。将辣木籽油、水、吐温 80 按体积比 2:2:1 混合均匀,冰水浴超声 10 min(超声 10 s 后间歇 10 s,共 10 min)得到辣木籽油乳液,置于无菌操作台(紫外 30 min)中备用。

1.2.2 菌种的复苏、传代

将菌种冻干粉开管,加 0.5 mL 培养基(圆红冬孢酵母、解脂假丝酵母加 YM 培养基,深黄被孢霉加 PDA 培养基)于菌管中混匀后,取 0.25 mL 于装有 50 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中,摇匀,于 28℃、200 r/min 恒温摇床中培养(圆红冬孢酵母、解脂假丝酵母培养 24 h,深黄被孢霉培养 72 h),即得一代菌,取 1 mL 一代菌于装有 50 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中,按上述条件培养即得二代菌,重复操作得三代菌(可用于后续实验),取 1 mL 三代菌液于装有 1 mL 30% 甘油的冻存管中,密封,于 -80℃ 保存备用。

1.2.3 菌种的活化

取出 1.2.2 中菌种冻存管,室温解冻,于无菌操作台中接入灭好菌的培养基中,于 28℃、200 r/min 恒温摇床中培养(圆红冬孢酵母、解脂假丝酵母培养 24 h,深黄被孢霉培养 72 h),得到菌液,备用。

1.2.4 产神经酸菌种的筛选

以培养基体积为基准,取 1% 辣木籽油乳液、5% 1.2.3 中活化好的菌液于装有 100 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中,摇匀,于 28℃、200 r/min 恒温摇床中培养(圆红冬孢酵母、解脂假丝酵母培养 48 h,深黄被孢霉培养 144 h)。将培养液于 8 000 r/min 离心 10 min,去除上清液,用无菌水清洗下层菌体 3 次,将菌体置于圆底烧瓶中,加 15 mL 质量分数为

10% 的氢氧化钾-甲醇溶液,混匀后于 80℃ 水浴冷凝回流 2 h,结束后用 5 mL 6 mol/L 的盐酸溶液进行酸化,加 10 mL 正己烷,于 200 r/min 摇床中振荡萃取 2 h,将上层有机相取出, N_2 吹至 0.5~1 mL,得到菌种提取物^[9]。以菌种提取物中神经酸含量筛选菌种。

1.2.5 菌种提取物中神经酸含量的测定

1.2.5.1 标准曲线的建立

取神经酸甲酯标准品,用正己烷溶解,分别配制 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 mg/mL 神经酸甲酯标准品工作溶液,使用 Agilent 7890A 气相色谱仪进行检测,以峰面积(y)为纵坐标,神经酸甲酯质量浓度(x)为横坐标绘图,拟合得到标准曲线回归方程($y = 328.04x - 10.07, R^2 = 0.9995$)。

1.2.5.2 气相色谱条件

HP-88 毛细管色谱柱(60 mm × 250 μm × 0.2 μm);进样口温度 230℃;载气为氮气,流速 1 mL/min;分流进样,分流比 40:1;检测器温度 250℃;进样量 1 μL;升温程序为初始温度 150℃,保持 1 min,以 6℃/min 升到 230℃并保持 20 min。

1.2.5.3 菌种提取物的甲酯化及分析

取菌种提取物,加入 4 mL 质量分数为 1% 的硫酸-甲醇溶液,于 60℃ 水浴锅中反应 1 h,取出,于室温冷却,加 5 mL 饱和氯化钠溶液,再加 1 mL 正己烷,盖上塞子,用旋涡振荡仪振荡 3 min,静置 30 min,取出上层溶液,向其中加入无水硫酸钠除去多余水分,再经 0.45 μm 滤膜过滤后进气相色谱仪检测,根据神经酸的峰面积和标准曲线回归方程计算神经酸含量。

1.2.6 优选菌种发酵产神经酸实验

取装有 100 mL 培养基的三角瓶,以培养基体积为基准,加入一定量的辣木籽油乳液(以辣木籽油添加量表示),接种一定量活化好的菌液,摇匀,于一定温度、200 r/min 恒温摇床中培养一定时间,然后按照 1.2.4 的方法对培养液进行处理获得菌种提取物。

1.2.7 菌种冻干粉中脂肪酸组成及含量的测定

1.2.7.1 菌种冻干粉的制备

将 1.2.6 中获得的培养液于 4 000 r/min 离心 10 min,去除上清液,无菌水清洗 3 次后于 -80℃ 冰箱冷冻 24 h,再在真空冷冻干燥机中冷冻干燥 3 d,完全冻干后取出密封,于 -20℃ 保存备用。

1.2.7.2 菌种冻干粉中油脂的提取及甲酯化

精确称取适量菌种冻干粉(未添加辣木籽油乳

液 51.4 mg, 添加辣木籽油乳液 50.6 mg) 于 2 mL 离心管中, 准确加入 1 mL 氯仿-甲醇(体积比 2:1, 用于提取油脂)溶液, 加入 100 mg 玻璃珠, 放入高通量组织研磨仪中 60 Hz 振荡 1 min, 重复 2 次, 室温超声 30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液于 15 mL 离心管中, 加入 2 mL 质量分数 1% 的硫酸-甲醇溶液, 振荡 1 min 充分混匀, 80 °C 水浴锅中甲酯化 30 min, 取出后冷却至室温, 加入 1 mL 正己烷, 振荡混匀 30 s, 静置 5 min, 再加入 5 mL H₂O (4 °C) 洗涤, 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 吸取 700 μL 上清液于 2 mL 离心管中, 再加入 100 mg 无水硫酸钠粉末, 振荡混匀 30 s, 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取 300 μL 上清液于 2 mL 离心管中, 加入 15 μL 500 μg/mL 水杨酸甲酯作为内标, 振荡混匀 10 s, 精准吸取 200 μL 上清液加入到检测瓶中, 待气相色谱-质谱分析。

1.2.7.3 气相色谱-质谱分析条件

气相色谱条件: Thermo Trace 1300 气相色谱仪; Thermo TG-FAME 毛细管色谱柱(50 m × 0.25 mm × 0.20 μm); 进样口温度 250 °C; 分流进样, 分流比 8:1; 进样量 1 μL; 升温程序为起始温度 80 °C, 保持 1 min, 以 20 °C/min 升至 160 °C 并保持 1.5 min, 以 3 °C/min 升至 196 °C 并保持 8.5 min, 以 20 °C/min 升至 250 °C 并保持 3 min; 载气为氦气, 流速 0.63 mL/min。

质谱条件: Thermo TSQ 9000 质谱仪, 电子轰击电离(EI)源, SIM 扫描方式, 电子能量 70 eV, 离子源温度 300 °C, 传输线温度 280 °C。

1.2.7.4 标准曲线制作

将 37 种混合脂肪酸甲酯标准品(4 000 μg/mL)用正己烷分别配制成 1、5、10、25、50、100、250、500、1 000、2 000 μg/mL 的混标工作液, 现用现配。将混标工作液进行气相色谱-质谱分析, 以各脂肪酸标准品的质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.7.5 样品中脂肪酸定性和定量

将待测样品进行气相色谱-质谱分析, 根据保留时间和特征离子对脂肪酸进行定性, 根据定量离子的峰面积以及标准曲线进行定量。

1.2.8 数据处理

所有实验均重复 3 次, 利用 Microsoft Office Excel 2019 进行数据收集整理, 用 Graphpad prism 7.0、Origin 2021 绘图, IBM SPSS Statistics 19 对数据进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 不同菌种提取物中神经酸含量

不同菌种提取物中神经酸含量如表 1 所示。

表 1 不同菌种提取物中神经酸含量

Table 1 Nervonic acid content in extracts of different strains

菌种	神经酸含量/(mg/mL)
圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)	0.71 ± 0.02
解脂假丝酵母(GDMCC 2.187)	0.58 ± 0.01
深黄被孢霉(GDMCC 3.241)	-
深黄被孢霉(BNCC 336207)	0.52 ± 0.02

注: - 未检出

Note: - . Not detected

从表 1 可以看出, 解脂假丝酵母(GDMCC 2.187)提取物中神经酸含量为(0.58 ± 0.01) mg/mL, 深黄被孢霉(GDMCC 3.241)提取物中未检测到神经酸, 深黄被孢霉(BNCC 336207)提取物中神经酸含量为(0.52 ± 0.02) mg/mL, 圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)提取物中神经酸含量最高, 为(0.71 ± 0.02) mg/mL, 因此确定圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)为产神经酸最优菌株。

2.2 圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)发酵产神经酸单因素实验

2.2.1 培养时间的影响

在辣木籽油添加量 4%、菌液添加量 6%、培养温度 28 °C 条件下, 考察培养时间对菌种提取物中神经酸含量的影响, 结果如图 1 所示。

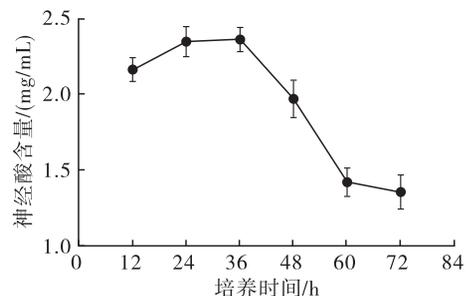


图 1 培养时间对菌种提取物中神经酸含量的影响

Fig. 1 Influence of culture time on nervonic acid content in yeast extract

由图 1 可知, 当培养时间为 12 ~ 36 h 时, 神经酸含量随培养时间延长逐渐增大, 在培养时间为 36 h 时, 神经酸含量达到最大, 为 2.37 mg/mL, 这是因为随着菌体的生长, 菌体生物量逐渐增大, 菌种提取物中神经酸含量逐渐增加。当培养时间超过 36 h 后, 神经酸含量开始下降, 这可能是由于培养时间过长, 培养基中的营养物质减少, 细胞缺乏外来碳源维持生命活动, 进入内源呼吸阶段, 开始分解细胞内油

脂来提供生命活动所需的能源,导致神经酸含量降低^[10]。因此,选择最适培养时间为36 h。

2.2.2 培养温度的影响

培养温度影响细胞内酶的活性,从而影响细胞的代谢途径及强度,改变细胞(膜)中脂肪酸的比例,进而影响神经酸含量^[11]。在辣木籽油添加量4%、菌液添加量6%、培养时间36 h条件下,考察培养温度对菌种提取物中神经酸含量的影响,结果如图2所示。

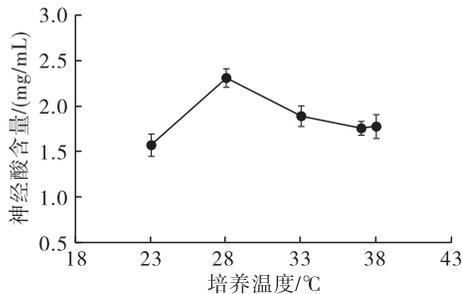


图2 培养温度对菌种提取物中神经酸含量的影响

Fig.2 Influence of culture temperature on nervonic acid content in yeast extract

由图2可知,神经酸含量随培养温度的升高呈先上升后下降的趋势,在培养温度为28℃时,神经酸含量最大,为2.31 mg/mL。圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)的最适生长温度为28~30℃,温度过低或过高时都不利于其生长和神经酸的产生^[12]。因此,选择最适培养温度为28℃。

2.2.3 菌液添加量的影响

菌种添加量过低或过高均会影响菌体的生长繁殖速度^[13]。在辣木籽油添加量4%、培养时间36 h、培养温度28℃条件下,考察菌液添加量对菌种提取物中神经酸含量的影响,结果如图3所示。

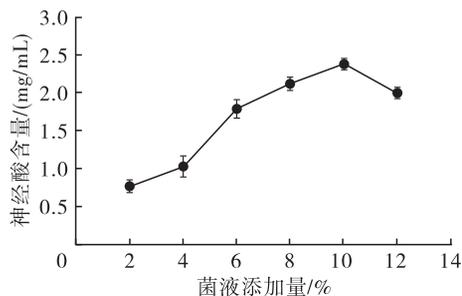


图3 菌液添加量对菌种提取物中神经酸含量的影响

Fig.3 Influence of bacterial fluid dosage on nervonic acid content in yeast extract

由图3可知,当菌液添加量在2%~10%时,神经酸含量不断增加,菌液添加量为10%时,神经酸含量达到最大,为2.38 mg/mL,这可能是因为在菌液添加量较低时,营养物质充足,菌种能够很好地生

长繁殖,而当菌液添加量大于10%时,神经酸含量开始降低,可能是接种量过高,菌体开始结团生长,内部菌体微环境恶劣,单位菌体氧气供应量不足(圆红冬孢酵母为好氧菌),油脂积累受到抑制所致^[14]。因此,选择最适菌液添加量为10%。

2.2.4 辣木籽油添加量的影响

在菌液添加量10%、培养时间36 h、培养温度28℃条件下,考察辣木籽油添加量对菌种提取物中神经酸含量的影响,结果如图4所示。

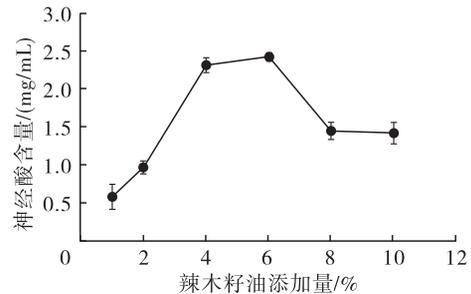


图4 辣木籽油添加量对菌种提取物中神经酸含量的影响

Fig.4 Influence of *Moringa oleifolia* seed oil dosage on nervonic acid content in yeast extract

由图4可知,当辣木籽油添加量为1%~6%时,神经酸含量随辣木籽油添加量的增加逐渐增大,在辣木籽油添加量为6%时,神经酸含量达到最大,为2.42 mg/mL,这可能是由于外源添加的辣木籽油在圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)的诱导下能够转化产生神经酸,且随着辣木籽油添加量的增加,转化的神经酸含量逐渐增多。当辣木籽油添加量大于6%时,神经酸含量开始下降,这可能是由于随着辣木籽油添加量的继续增加,营养成分供给不足,抑制了菌体的生长,导致转化的神经酸减少。因此,选择最适辣木籽油添加量为6%。

2.3 圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)发酵产神经酸响应面实验

在单因素实验基础上,固定培养温度28℃,以菌种提取物中神经酸含量为响应值,选取培养时间、菌液添加量和辣木籽油添加量3个因素进行三因素三水平的响应面实验,以优化圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)产神经酸的发酵条件。响应面实验因素与水平见表2,响应面实验设计与结果见表3。

表2 响应面实验因素与水平

Table 2 Factors and levels of response surface methodology

水平	A 培养时间/h	B 菌液添加量/%	C 辣木籽油添加量/%
-1	24	8	4
0	36	10	6
1	48	12	8

表3 响应面实验设计与结果
Table 3 Design and results of response surface methodology

实验号	A	B	C	神经酸含量/(mg/mL)
1	0	0	0	2.34
2	0	1	1	2.30
3	-1	0	-1	1.43
4	0	-1	-1	1.98
5	0	0	0	2.32
6	1	1	0	2.38
7	-1	0	1	1.39
8	0	0	0	2.26
9	-1	-1	0	1.45
10	1	0	-1	2.01
11	1	0	1	2.30
12	-1	1	0	1.44
13	1	-1	0	2.28
14	0	1	-1	1.97
15	0	-1	1	2.13
16	0	0	0	2.33
17	0	0	0	2.34

利用 Design - Expert. v8. 0. 6. 1 软件对表 3 中数据进行多元回归拟合, 得到神经酸含量 (Y) 与各因素的回归方程: $Y = 2.320 + 0.410A + 0.031B + 0.091C + 0.027AB + 0.083AC + 0.045BC - 0.370A^2 - 0.059B^2 - 0.160C^2$ 。对回归模型进行显著性分析, 结果见表 4。

表4 回归模型方差分析
Table 4 Analysis of variance of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F	p
模型	2.20	9	0.24	79.49	< 0.000 1***
A	1.33	1	1.33	432.42	< 0.000 1***
B	7.81E-003	1	7.81E-003	2.54	0.154 8
C	0.07	1	0.07	21.68	0.002 3**
AB	3.03E-003	1	3.03E-003	0.98	0.354 1
AC	0.03	1	0.03	8.86	0.020 6*
BC	8.10E-003	1	8.10E-003	2.64	0.148 5
A ²	0.58	1	0.58	189.15	< 0.000 1***
B ²	0.02	1	0.02	4.77	0.065 2
C ²	0.11	1	0.11	36.86	0.000 5***
残差	0.02	7	3.07E-003		
失拟项	0.02	3	5.68E-003	5.07	0.075 5
纯误差	4.48E-003	4	1.12E-003		
总误差	2.22	16			

注: *** 表示高度显著 ($p < 0.001$), ** 表示极显著 ($p < 0.01$), * 表示显著 ($p < 0.05$)

Note: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

由表 4 可见, 模型高度显著, 失拟项不显著, 说明模型拟合良好。3 个因素对菌种提取物中神经酸

含量的影响大小为 $A > C > B$, 即培养时间 > 辣木籽油添加量 > 菌液添加量, 其中培养时间的影响高度显著, 而菌液添加量的影响不显著。采用 Design - Expert. v8. 0. 6. 1 软件计算得到圆红冬孢酵母 (GDMCC 2. 226) 产神经酸的最佳发酵条件为培养时间 48 h、菌液添加量 10. 17%、辣木籽油添加量 6. 63%, 在此条件下菌种提取物中神经酸含量理论值为 2. 39 mg/mL。结合实际操作简便性, 将最佳发酵条件调整为培养时间 48 h、菌液添加量 10%、辣木籽油添加量 7%, 在此条件下进行 3 组平行实验, 得到菌种提取物中神经酸平均含量为 2. 40 mg/mL, 与理论值接近。

2.4 圆红冬孢酵母 (GDMCC 2. 226) 冻干粉中脂肪酸组成及含量

在优化的发酵条件下, 按 1. 2. 6 的方法, 以不添加辣木籽油乳液为对照, 对圆红冬孢酵母 (GDMCC 2. 226) 进行发酵, 再按 1. 2. 7 方法测定圆红冬孢酵母 (GDMCC 2. 226) 冻干粉中脂肪酸组成及含量, 结果如表 5 所示。

表5 圆红冬孢酵母 (GDMCC 2. 226) 冻干粉中脂肪酸组成及含量

Table 5 Fatty acid composition and content in lyophilized powder of *Saccharomyces rhodospora* GDMCC 2. 226

脂肪酸	对照组/ ($\mu\text{g/g}$)	添加辣木 籽油乳液/ ($\mu\text{g/g}$)	提升率/ %
己酸 (C6:0)	0.230	0.598	160.0
辛酸 (C8:0)	0.743	1.788	140.6
癸酸 (C10:0)	0.771	5.644	632.0
十一烷酸 (C11:0)	0.707	0.892	26.2
月桂酸 (C12:0)	10.129	21.930	116.5
十三烷酸 (C13:0)	0.649	0.777	19.7
肉豆蔻酸 (C14:0)	36.378	123.178	238.6
顺-9-肉豆蔻烯酸 (C14:1n5)	13.717	9.702	-29.3
十五烷酸 (C15:0)	29.636	28.077	-5.3
顺-10-十五烯酸 (C15:1n5)	4.769	4.273	-10.4
棕榈酸 (C16:0)	611.427	1761.254	188.1
顺-9-棕榈油酸 (C16:1n7)	554.041	1313.753	137.1
十七烷酸 (C17:0)	106.876	117.028	9.5
顺-10-十七烯酸 (C17:1n7)	132.518	102.342	-22.8
硬脂酸 (C18:0)	288.627	118.837	-58.8
反油酸 (C18:1n9t)	15.901	42.498	167.3
油酸 (C18:1n9)	653.443	999.029	52.9
反亚油酸 (C18:2n6t)	6.002	235.991	3831.9
亚油酸 (C18:2n6)	523.372	1100.961	110.4
花生酸 (C20:0)	25.803	613.237	2276.6
γ -亚麻酸 (C18:3n6)	1.891	58.891	3014.3

续表 5

脂肪酸	对照组/ ($\mu\text{g/g}$)	添加辣木 籽油乳液/ ($\mu\text{g/g}$)	提升率/ %
顺-11-二十碳烯酸 (C20:1n9)	53.790	325.980	506.0
α -亚麻酸(C18:3n3)	100.327	253.828	153.0
二十一烷酸(C21:0)	5.623	62.577	1012.9
顺-11,14-二十碳二烯酸 (C20:2n6)	4.836	39.148	709.5
山嵛酸(C22:0)	43.795	609.756	1292.3
HOMO- γ -亚麻酸(C20:3n6)	2.820	36.431	1191.9
芥酸(C22:1n9)	5.737	71.819	1151.9
顺-11,14,17-二十碳三烯酸 (C20:3n3)	3.725	5.409	45.2
花生四烯酸(C20:4n6)	4.275	12.861	200.8
二十三烷酸(C23:0)	6.654	111.067	1569.2
顺-13,16-二十二碳二烯酸 (C22:2n6)	5.610	3.267	-41.8
二十碳五烯酸(C20:5n3)	2.401	3.976	65.6
木蜡酸(C24:0)	172.911	802.298	364.0
神经酸(C24:1n9)	10.983	13.518	23.1
二十二碳六烯酸(C22:6n3)	5.658	3.372	-40.4
SFA	1340.959	4378.938	226.6
MUFA	1444.899	2882.914	99.5
PUFA	660.917	1754.135	165.4

由表5可见,圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)冻干粉对照组中饱和脂肪酸(SFA)含量为1340.959 $\mu\text{g/g}$, 占总脂肪酸含量的38.91%,以棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)和木蜡酸(C24:0)为主,单不饱和脂肪酸(MUFA)含量为1444.899 $\mu\text{g/g}$,占总脂肪酸含量的41.92%,以油酸(C18:1n9)、顺-9-棕榈油酸(C16:1n7)、顺-10-十七烯酸(C17:1n7)为主,多不饱和脂肪酸(PUFA)含量为660.917 $\mu\text{g/g}$,占总脂肪酸含量的19.18%,以亚油酸(C18:2n6)和 α -亚麻酸(C18:3n3)为主。添加辣木籽油乳液发酵的圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)冻干粉中SFA含量为4378.938 $\mu\text{g/g}$,占总脂肪酸含量的48.57%,以棕榈酸(C16:0)、木蜡酸(C24:0)、花生酸(C20:0)和山嵛酸(C22:0)为主,MUFA含量为2882.914 $\mu\text{g/g}$,占总脂肪酸含量的31.98%,以顺-9-棕榈油酸(C16:1n7)、油酸(C18:1n9)和顺-11-二十碳烯酸(C20:1n9)为主,PUFA含量为1754.135 $\mu\text{g/g}$,占总脂肪酸含量的19.46%,以亚油酸(C18:2n6)为主。添加辣木籽油乳液发酵的圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)冻干粉中神经酸(C24:1n9)含量为13.518 $\mu\text{g/g}$,比对照组中神经酸含量(10.983 $\mu\text{g/g}$)提升了23.1%,说明以辣木籽油为

底物时能够促进圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)转化生产出更多的神经酸,同时还有多种PUFA含量也显著提高,如 γ -亚麻酸(C18:3n6)、 α -亚麻酸(C18:3n3)、顺-11,14-二十碳二烯酸(C20:2n6)、HOMO- γ -亚麻酸(C20:3n6)等。本实验所得圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)冻干粉中神经酸绝对含量虽然显著提高,但是神经酸含量占总脂肪酸含量比例仍较低,想要最终实现产业化生产还有一定局限性。

3 结论

本文以云南特色木本植物油辣木籽油为底物,从4种产油菌株中筛选确定圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)为产神经酸较高的菌种,通过单因素实验结合响应面法得到其最佳发酵条件为辣木籽油添加量7%(以乳液形式添加)、菌液添加量10%、培养温度28 $^{\circ}\text{C}$ 、培养时间48 h。不添加与添加辣木籽油乳液发酵获得的圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)冻干粉中神经酸含量分别为10.983 $\mu\text{g/g}$ 和13.518 $\mu\text{g/g}$,后者比前者的神经酸绝对含量提升了23.1%,说明添加辣木籽油底物可以提高菌种冻干粉中神经酸含量,但是神经酸含量占总脂肪酸含量比例仍较低,后续研究中可以结合转录组学和代谢组学技术挖掘圆红冬孢酵母(GDMCC 2.226)以油为底物发酵产神经酸的主要通路及合成机制,进一步探讨其参与神经酸合成的主要调控因素,以达到高产神经酸的目的。

参考文献:

- [1] LIU F, WANG P, XIONG X, et al. A review of nervonic acid production in plants: Prospects for the genetic engineering of high nervonic acid cultivars plants[J/OL]. Front Plant Sci, 2021, 12: 626625 [2023-11-03]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.626625>.
- [2] 赖福兵. 蒜头果油中高纯神经酸的制备研究[D]. 南宁: 广西大学, 2018.
- [3] 李素英. 乡村振兴视域下邯郸邱县文冠果品牌营销研究[D]. 河北邯郸: 河北工程大学, 2020.
- [4] TSUJIMOTO M, KIMURA K. New fatty acids in shark-liver oil[J]. J Soc Chem, 1926, 46: 385-388.
- [5] 范勇, 袁程, 刘君寒, 等. 利用微藻 *Mychonastes afer* HSO-3 生产神经酸的研究初探[C]//中国藻类学会第八次会员大会暨第十六次学术讨论会论文摘要集. 上海: 中国海洋湖沼学会, 2011: 229.
- [6] 高瑞岭. 解脂亚罗菌利用挥发性脂肪酸合成油脂的研究及优化[D]. 北京: 北京科技大学, 2020.
- [7] FILLET S, RONCHEL C, CALLEJO C, et al. Engineering *Rhodospiridium toruloides* for the production of very long-chain monounsaturated fatty acid-rich oils[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2017, 101(19): 7271-7280.

(下转第59页)

由图 3 可知,黑芝麻粉碎后其酸值非常不稳定,随着储存时间的延长,其酸值呈上升趋势,在储存 7 d 左右超过国家标准规定的限量值,在储存 10 d 时已远远超过国家标准规定的限量值,储存时间超过 10 d 后,酸值升高更加明显,在储存 30 d 时酸值(KOH)已达到 21.8 mg/g。这可能是因为黑芝麻粉碎过程中的机械摩擦与升温使其发生氧化;另外粉碎后的芝麻粒度变小,表面积变大,与空气中氧气接触的机会增多,导致脂肪氧化分解速度加快,酸值上升明显。

3 结 论

本文测定了不同包装形式及粉碎后黑芝麻的酸值变化情况。结果表明:采用不同包装形式(透明、铝箔、黑色避光自封塑料袋,空气、真空、充氮气环境,抗氧化剂)保存一年以上,黑芝麻酸值均满足 GB 19300—2014 的限量要求,整体而言,不同包装形式均优于敞开接触空气储存的,真空环境的储存效果优于氮气和空气环境的,加抗氧化剂的储存效果优于不加抗氧化剂的,在加抗氧化剂及在空气环境不加抗氧化剂的条件下,黑色避光自封塑料袋的储存效果最好。黑芝麻粉碎后酸值持续上升,储存 7 d 左右超过国家标准规定的限量值,不宜久存。市售芝麻酸值不合格可能与本身品质、储存条件不佳有关,有效包装储存黑芝麻一年,其品质变化不大。后续研究将探索更长储存时间对黑芝麻酸值及品质的影响。

参考文献:

- [1] 贾廷伟,江晓林,刘艳阳,等.不同品种类型芝麻品质性状的比较分析[J].中国油脂,2021,46(8):81-86.
- [2] 邵家威,祁国栋,张桂香,等.芝麻的营养与功能价值评价研究进展[J].粮油食品科技,2019,27(6):86-92.
- [3] 马凤,方伟.芝麻活性成分及产品开发生的研究进展

[J].安徽农学通报,2019,25(20):46-48,61.

- [4] 高秀娟.芝麻酚对脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[D].济南:山东大学,2017.
- [5] 魏学鼎.芝麻素的提取及抗氧化性能的研究[D].武汉:武汉轻工大学,2020.
- [6] ANILAKUMAR K R, PAL A, KHANUM F, et al. Nutritional, medicinal and industrial uses of sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds: An overview[J]. Agric Conspec Sci, 2010, 75(4): 159-168.
- [7] 郑珍玉,车成日,白金权,等.芝麻素对肺腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J].肿瘤防治研究,2014,41(4):331-336.
- [8] NAMIKI M. Nutraceutical functions of sesame: A review[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2007, 47(7): 651-673.
- [9] 张雅娜,归艳,杨钦伟,等.芝麻油氧化稳定性研究进展[J].农产品加工,2020(19):90-93.
- [10] 周晔,裴东.核桃油品质及贮藏稳定性的影响因素探讨[J].中国油脂,2016,41(1):60-63.
- [11] PIGNITTER M, STOLZE K, GARTNER S, et al. Cold fluorescent light as major inducer of lipid oxidation in soybean oil stored at household conditions for eight weeks[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(10): 2297-2305.
- [12] 纪俊敏,马宇翔,娄丽娟.微波加热对几种油脂品质的影响[J].粮油加工,2008(9):53-56.
- [13] 李书国,赵文华,陈辉.食用油脂抗氧化剂及其安全性研究进展[J].粮食与油脂,2006(5):34-37.
- [14] 邱亚峰,刘赛,郭璐瑶,等.浅析芝麻酸价的影响因素[J].食品安全导刊,2022(25):85-87.
- [15] 孙强,曹世娜,朱笑鹏,等.气调密闭贮藏对芝麻品质的影响[J].中国农业科技导报,2019,21(6):87-93.
- [16] 周巾英,祝水兰,欧阳玲花,等.充CO₂气调包装对芝麻原料品质的影响[J].福建农业学报,2020,35(8):896-901.

(上接第 35 页)

- [8] CHEN D J, YAN L H, LI Q, et al. Bioconversion of conjugated linoleic acid by *Lactobacillus plantarum* CGMCC8198 supplemented with *Acer truncatum* Bunge seeds oil[J]. Food Sci Biotechnol, 2017, 26(6): 1595-1611.
- [9] HUANG C, CHEN X, XIONG L, et al. Microbial oil production from corncob acid hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme* [J]. Biomass Bioenerg, 2013, 49: 273-278.
- [10] 夏俊杰.高产神经酸工程菌的构建及发酵条件的优化[D].北京:北京化工大学,2020.
- [11] ABELN F, CHUCK C J. The role of temperature, pH and

nutrition in process development of the unique oleaginous yeast *Metschnikowia pulcherrima* [J]. J Chem Technol Biotechnol, 2020, 95(4): 1163-1172.

- [12] 刘晓飞,侯艳,郑志辉,等.降解玉米秸秆放线菌的筛选及发酵工艺优化[J].哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2022,38(2):143-153.
- [13] 高振,马晓宇,高明,等.圆红冬孢酵母利用生物柴油副产物粗甘油产油脂的影响因素分析[J].环境工程,2020,38(8):52-57.
- [14] 张疏雨,于婷婷,郝捷,等.蛹虫草液体菌种发酵工艺条件优化[J].食用菌,2021,43(6):30-35.