

生物工程

# 产 $\gamma$ -亚麻酸诱变菌拉曼被孢霉 HLY0902 的 发酵条件优化

刘欣<sup>1,2</sup>, 刘杨洋<sup>1,2</sup>, 杨玉壮<sup>1,2</sup>, 朱健树<sup>1,2</sup>, 金建亮<sup>1</sup>, 彭灿旺<sup>1</sup>, 孔艳琴<sup>1</sup>

(1. 长春工业大学 化学工程学院, 长春 130012; 2. 吉林省石化资源与生物质综合利用工程实验室, 长春 130012)

**摘要:**采用正交实验和单因素实验, 分别对诱变菌拉曼被孢霉 HLY0902 的培养基及培养条件进行优化, 以期提高  $\gamma$ -亚麻酸 (GLA) 的产量。结果表明: 当发酵培养基组成为葡萄糖 100 g/L、酵母浸粉 10 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g/L、 $\text{NaNO}_3$  1 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L 时, GLA 的产量最大, 可达 1.05 g/L, 较优化前提高了 43.8%; 最优培养条件为接种量 10%, 装液量 20%, 发酵时间 168 h, 适合菌体生长和油脂积累的 pH 为 5.5、发酵温度为 22 °C, 适合 GLA 积累的 pH 为 7.5、发酵温度为 20 °C。通过该系列的优化研究, 诱变菌拉曼被孢霉 HLY0902 产 GLA 的能力显著提高。

**关键词:**  $\gamma$ -亚麻酸; 拉曼被孢霉; 培养条件; 培养基

中图分类号: Q933; TQ920.6

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2018)04-0101-05

## Optimization of fermentation conditions for $\gamma$ -linolenic acid production by mutant strain *Mortierella ramanniana* HLY0902

LIU Xin<sup>1,2</sup>, LIU Yangyang<sup>1,2</sup>, YANG Yuzhuang<sup>1,2</sup>, ZHU Jianshu<sup>1,2</sup>,  
JIN Jianliang<sup>1</sup>, PENG Canwang<sup>1</sup>, KONG Yanqin<sup>1</sup>

(1. College of Chemical Engineering, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China;

2. Jilin Provincial Engineering Laboratory for the Complex Utilization of Petroresources and Biomass, Changchun 130012, China)

**Abstract:** The culture medium and culture conditions of the mutant strain *Mortierella ramanniana* HLY0902 were optimized by orthogonal experiment and single factor experiment in order to increase the production of  $\gamma$ -linolenic acid (GLA). The results showed that the yield of GLA was up to 1.05 g/L in the medium containing glucose 100 g/L, yeast extract powder 10 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g/L,  $\text{NaNO}_3$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L and increased by 43.8% compared with that before optimization. The optimal culture conditions were identified as follows: inoculation amount 10%, loading amount 20%, batch time 168 h. Furthermore, the optimal conditions for mycelium growth and oil accumulation were pH 5.5 and 22 °C, and the optimal conditions for GLA accumulation were pH 7.5 and 20 °C. The results showed that the capacity of GLA production by mutant strain *Mortierella ramanniana* HLY0902 improved through the optimization.

**Key words:**  $\gamma$ -linolenic acid; *Mortierella ramanniana*; culture condition; culture medium

收稿日期: 2017-07-21; 修回日期: 2018-01-03

基金项目: 吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目 (2015126); 国家自然科学基金项目 (21506015); 国家留学基金 (留金发[2017]3105); 长春工业大学“大学生创新创业训练计划”项目 (2017xcxy134)

作者简介: 刘欣 (1983), 女, 讲师, 博士, 研究方向为微生物油脂 (E-mail) liuxin83@ccut.edu.cn。

$\gamma$ -亚麻酸 ( $\gamma$ -linolenic, GLA) 又称维生素 F, 是一种人体必需多不饱和脂肪酸, 以甘油酯的形式主要存在于深绿色的植株中, 是构成人体组织细胞的重要成分之一。GLA 具有缓解炎症、动脉粥样硬化、高血压、糖尿病, 改善溃疡症状等药理作用及生理活性<sup>[1-4]</sup>, 在食品营养<sup>[5]</sup>、医药<sup>[6]</sup>、美容<sup>[7]</sup>等行业得到了广泛的应用。化学合成和植物提取 GLA 的

方法都具有一定的局限性<sup>[8]</sup>,而微生物却能够提供一种简单、便捷的途径来获取 GLA。国内外研究者们对产 GLA 微生物的研究以霉菌为主,主要包括被孢霉属、根霉属、小克银汉霉属等。刘胜男等<sup>[9]</sup>基于代谢调控对深黄被孢霉的发酵培养基优化,在最优条件下 GLA 的产量达 1.525 g/L。本文以通过紫外线-氯化锂-硫酸二乙酯复合诱变的方法<sup>[10]</sup>获得的一株 GLA 产量较高的诱变株拉曼被孢霉为研究对象,先通过正交实验对培养基的组成进行优化,然后采用单因素实验研究菌株的培养条件对菌株生长发酵的影响,以期进一步提高拉曼被孢霉的发酵性能,并为其生产应用提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌株

通过紫外线-氯化锂-硫酸二乙酯复合诱变经筛选获得的一株拉曼被孢霉 (*Mortierella ramanniana*) 诱变株,以下简称 *M. ramanniana* HLY0902,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 M2015569。

#### 1.1.2 试剂

琼脂粉、酵母浸粉,生化试剂;葡萄糖、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $NaNO_3$ 、 $KH_2PO_4$ ; 甲醇、三氟化硼乙醚、氯化钠、正己烷、无水硫酸钠,分析纯。

#### 1.1.3 培养基

PDA 培养基:土豆 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂粉 20 g/L。种子培养基:葡萄糖 50 g/L,酵母浸粉 6 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g/L, $NaNO_3$  2 g/L, $KH_2PO_4$  2 g/L;pH 6.0。基础发酵培养基:葡萄糖 80 g/L,酵母浸粉 10 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g/L, $NaNO_3$  3 g/L, $KH_2PO_4$  4 g/L;pH 自然。以上培养基均在  $7 \times 10^4$  Pa 灭菌 30 min。

#### 1.1.4 仪器与设备

SW-CJ-2FD 双人单面净化工作台;GH6000 隔水培养箱;HVE-50 全自动高压灭菌锅,日本 HIRAYAMA 公司;QYC-211 全温培养摇床;RE-201D 旋转蒸发器;6890N GC 气相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 菌种活化与发酵培养

菌种活化:将 *M. ramanniana* HLY0902 转接于 PDA 斜面,25 °C 培养 120 h。

种子活化:用无菌水洗下培养成熟的斜面孢子,经 6~8 层无菌纱布过滤至装有玻璃珠的三角瓶中

振荡 20 min,形成均一的孢子悬浮液。接入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 带挡板的三角瓶中,接种量 10%。培养条件:25 °C,125 r/min,24 h。

发酵培养:活化完毕后接入含 50 mL 发酵培养基的 250 mL 带挡板的三角瓶中,接种量 10%。培养条件:25 °C,125 r/min,144 h,初始 pH 自然。

### 1.2.2 干菌体的收集与测定

发酵结束后,将培养物进行抽滤,用蒸馏水清洗 3 次后置于 60 °C 烘箱烘干至恒重,称量其质量并计算生物量:生物量 = 菌体干重/发酵液体积。

### 1.2.3 油脂的提取

采用索氏提取法<sup>[11]</sup>提取粗油脂,乙醚为萃取剂,浸泡 1~2 h 后,水浴 80 °C 抽提 4 h,萃取液旋蒸至恒重,计算油脂含量及油脂产量。计算公式为:油脂含量 = 油脂质量/菌体干重  $\times 100\%$ ,油脂产量 = 生物量  $\times$  油脂含量。

### 1.2.4 GLA 含量的测定

脂肪酸甲酯的制备参照文献 [12]。利用气相色谱进行脂肪酸组成分析,气相色谱条件参照文献 [13]。GLA 产量 = 油脂产量  $\times$  GLA 含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基优化的正交实验

#### 2.1.1 正交实验

为了提高诱变菌株 GLA 产量,在前期实验的基础上,采取正交实验对发酵培养基进行优化。设计  $L_9(3^4)$  正交实验,固定  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g/L,发酵条件同 1.2.1。考察葡萄糖、酵母浸粉、 $KH_2PO_4$ 、 $NaNO_3$  4 个组分对 *M. ramanniana* HLY0902 产 GLA 的影响。正交实验设计及结果见表 1。

表 1 正交实验设计及结果

实验号	葡萄糖/ (g/L)	酵母浸粉/ (g/L)	$KH_2PO_4$ / (g/L)	$NaNO_3$ / (g/L)	GLA 产量/ (g/L)
1	60	2	3	1	0.46
2	60	6	4	2	0.69
3	60	10	5	3	0.41
4	80	2	4	3	0.45
5	80	6	5	1	0.41
6	80	10	3	2	0.47
7	100	2	5	2	0.47
8	100	6	3	3	0.59
9	100	10	4	1	1.03
$k_1$	0.52	0.46	0.51	0.63	
$k_2$	0.44	0.56	0.72	0.54	
$k_3$	0.70	0.64	0.43	0.48	
R	0.26	0.18	0.29	0.15	

由表 1 可知,以 GLA 产量为优化目标,根据 R

值判断4个因素对其的影响顺序依次为:  $\text{KH}_2\text{PO}_4 >$  葡萄糖  $>$  酵母浸粉  $>$   $\text{NaNO}_3$ , 最有利于GLA产量提高的发酵培养基为葡萄糖 100 g/L、酵母浸粉 10 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g/L、 $\text{NaNO}_3$  1 g/L, 在此条件下GLA产量最高, 达 1.03 g/L。

## 2.1.2 验证实验

为了进一步考察发酵培养基优化的可靠性与稳定性, 采用2.1.1中最佳条件进行发酵验证, 并与优化前发酵结果进行比较, 结果见表2。

表2 验证实验发酵结果

培养基	生物量/(g/L)	油脂含量/%	油脂产量/(g/L)	GLA含量/%	GLA产量/(g/L)
优化前	31.10 ± 0.45	53.71 ± 0.89	16.70 ± 1.14	4.39 ± 0.06	0.73 ± 0.03
优化后	34.18 ± 0.75	56.77 ± 0.12	19.40 ± 0.34	5.41 ± 0.08	1.05 ± 0.08

由表2可知, 培养基优化后, GLA产量与正交实验结果相近, 为 1.05 g/L, 较优化前提高了 43.8%。通过验证实验可以证明这一优化条件是可再现的, 且提升的效果较显著。与原始培养基配方相比, 优化后培养基中葡萄糖增加了 20 g/L,  $\text{NaNO}_3$  减少了 2 g/L, 碳氮比由原来的 23.21:1 提升至 45.21:1。氮源的增加有利于生物量的积累, 碳氮比提高则有助于油脂产量的提高。油脂含量由 53.71% 提高至 56.77%; GLA含量由 4.39% 提高至

5.41%, 较优化前提高了 23.2%; GLA产量由 0.73 g/L 提高至 1.05 g/L。这与黎志勇等<sup>[14]</sup>对拉曼被孢霉的培养基优化结果 (GLA产量 0.968 g/L) 相似, 说明这一方法是有效的。

## 2.2 培养条件优化的单因素实验

### 2.2.1 接种量对发酵的影响

以不同接种量 (6%、10%、14%、18%、22%) 进行发酵培养 (其他发酵条件同 1.2.1)。接种量对发酵结果的影响如表3所示。

表3 接种量对生物量、油脂含量、油脂产量、GLA含量及GLA产量的影响

接种量/%	生物量/(g/L)	油脂含量/%	油脂产量/(g/L)	GLA含量/%	GLA产量/(g/L)
6	29.00 ± 0.86	50.77 ± 1.32	14.73 ± 0.80	4.62 ± 0.53	0.68 ± 0.10
10	30.02 ± 0.30	53.23 ± 0.54	15.98 ± 0.05	4.84 ± 0.39	0.77 ± 0.06
14	30.42 ± 0.32	54.12 ± 1.32	16.46 ± 0.55	3.36 ± 0.20	0.55 ± 0.05
18	28.73 ± 1.10	50.06 ± 0.88	14.38 ± 0.61	3.39 ± 0.15	0.49 ± 0.03
22	28.20 ± 0.57	49.88 ± 0.43	14.07 ± 0.40	3.59 ± 0.08	0.51 ± 0.02

由表3可知, 生物量、油脂含量、油脂产量、GLA含量以及GLA产量总体均随着接种量的增加先升高再降低, 呈现单峰趋势。当接种量低于10%时, 发酵的延滞期增加, 不利于菌体的生长, 相同的培养时间内, 生物量降低, 油脂积累时间延迟, 表现出油脂含量的降低, 从而导致GLA产量下降; 当接种量为10%时, 生物量为 30.02 g/L, GLA产量达最高 (0.77 g/L); 随接种量继续增加, GLA含量及GLA产量均呈显著下降趋势, 这是由于随接种量增加, 菌

球直径增加, 不利于溶氧, 从而造成抑制GLA合成。接种量为14%时, 生物量、油脂含量及油脂产量较接种量为10%时虽略有升高, 但GLA产量下降至 0.55 g/L, 影响显著。因此, 以GLA产量作为优化目标应将接种量控制在10%。

### 2.2.2 装液量对发酵的影响

分别以12%、20%、28%、36%、44%的装液量进行发酵培养 (其他发酵条件同 1.2.1)。装液量对发酵结果的影响如表4所示。

表4 装液量对生物量、油脂含量、油脂产量、GLA含量及GLA产量的影响

装液量/%	生物量/(g/L)	油脂含量/%	油脂产量/(g/L)	GLA含量/%	GLA产量/(g/L)
12	36.14 ± 1.70	49.78 ± 0.71	17.99 ± 1.06	4.30 ± 0.29	0.78 ± 0.03
20	30.21 ± 0.32	49.34 ± 0.63	14.90 ± 0.27	4.48 ± 0.32	0.67 ± 0.04
28	22.18 ± 1.28	43.08 ± 0.98	9.56 ± 0.69	2.40 ± 0.04	0.23 ± 0.02
36	16.85 ± 2.71	33.53 ± 1.32	5.62 ± 0.74	2.75 ± 0.18	0.16 ± 0.03
44	12.23 ± 1.53	25.12 ± 0.96	3.06 ± 0.27	2.65 ± 0.11	0.08 ± 0.01

GLA等多不饱和脂肪酸的合成以乙酰-CoA为前体, 因此提高发酵液的溶氧量能够强化有氧呼吸, 增加TCA循环中ATP的积累, 促进乙酰-CoA的合成, 从而有利于GLA的合成。在间歇培养中,

随着装液量的增加, 发酵培养基中的溶氧量也会随着降低<sup>[15]</sup>。由表4可知, 生物量、油脂含量、油脂产量、GLA产量均与装液量呈负相关。当装液量为12%时, 生物量、油脂产量、GLA产量和油脂含量达

到最大值,分别为 36.14、17.99、0.78 g/L 和 49.78%。当装液量为 20% 时, GLA 含量达到最大,为 4.48%;而生物量、油脂含量、油脂产量、GLA 产量较装液量为 10% 时均有下降。但装液量为 12% 时设备的使用率低,成本高,因此综合考虑 20% 的

装液量是更加经济有效的选择。

### 2.2.3 发酵时间对发酵的影响

将活化后的种子分别发酵培养 96、120、144、168、192 h(其他发酵条件同 1.2.1)。发酵时间对发酵结果的影响如表 5 所示。

表 5 发酵时间对生物量、油脂含量、油脂产量、GLA 含量及 GLA 产量的影响

发酵时间/h	生物量/(g/L)	油脂含量/%	油脂产量/(g/L)	GLA 含量/%	GLA 产量/(g/L)
96	22.91 ± 0.54	45.52 ± 0.82	10.43 ± 0.38	3.05 ± 0.09	0.32 ± 0.02
120	28.17 ± 0.41	46.64 ± 1.15	13.14 ± 0.49	3.94 ± 0.39	0.52 ± 0.03
144	29.46 ± 0.43	50.18 ± 0.20	14.78 ± 0.25	4.01 ± 0.19	0.59 ± 0.03
168	31.54 ± 0.23	50.84 ± 0.36	16.03 ± 0.22	4.12 ± 0.04	0.66 ± 0.02
192	29.90 ± 0.36	46.02 ± 1.42	13.76 ± 0.51	4.35 ± 0.38	0.60 ± 0.07

由表 5 可知,随着发酵时间延长,生物量、油脂含量、油脂产量及 GLA 产量均先增加后减少,在发酵 168 h 时达最大,分别为 31.54 g/L、50.84%、16.03 g/L 和 0.66 g/L。发酵时间在 96 ~ 168 h, GLA 迅速积累,而生物量的增长速度逐渐放缓,这是由于菌体由指数生长期进入稳定期,次级代谢产物大量积累;当发酵时间超过 168 h 时,营养物质耗尽,菌体开始进入衰亡期,胞内分解代谢逐渐超过合成代谢,并发生自溶现象,从而导致生物量、油脂产量、GLA 产量下降。为了尽可能多地收获 GLA,最佳发酵时间为 168 h。

### 2.2.4 初始 pH 对发酵的影响

在多不饱和脂肪酸合成的过程中, pH 起到了关键性作用。一方面,调节初始 pH 会影响到菌株细胞膜上蛋白酶的活性,进而影响膜的通透性,最适的 pH 会促进菌株吸收和利用发酵液中的营养物质,从而提高菌体生物量;另一方面,调节初始 pH 会影响菌丝体表面的电荷,进而影响到菌丝之间的聚集状态,导致菌体的形态发生变化<sup>[16]</sup>。以发酵液初始 pH 分别为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 时进行发酵培养(其他发酵条件同 1.2.1)。初始 pH 对发酵结果的影响如表 6 所示。

表 6 初始 pH 对生物量、油脂含量、油脂产量、GLA 含量及 GLA 产量的影响

初始 pH	生物量/(g/L)	油脂含量/%	油脂产量/(g/L)	GLA 含量/%	GLA 产量/(g/L)
4.5	28.98 ± 0.83	48.41 ± 0.20	14.03 ± 0.36	4.46 ± 0.19	0.63 ± 0.05
5.0	29.70 ± 0.96	50.94 ± 0.21	15.13 ± 0.24	4.26 ± 0.11	0.65 ± 0.05
5.5	31.35 ± 0.84	55.34 ± 0.18	17.35 ± 1.04	3.71 ± 0.19	0.64 ± 0.04
6.0	28.46 ± 0.93	55.74 ± 0.11	15.86 ± 0.99	4.15 ± 0.13	0.66 ± 0.04
6.5	27.11 ± 0.26	53.97 ± 0.23	14.63 ± 0.42	4.84 ± 0.14	0.71 ± 0.08
7.0	25.17 ± 1.02	50.65 ± 0.17	12.75 ± 0.79	6.34 ± 0.19	0.81 ± 0.03
7.5	24.16 ± 0.42	51.85 ± 0.23	12.52 ± 0.41	6.52 ± 0.19	0.82 ± 0.03

由表 6 可知,当初始 pH 小于等于 5.0 时,发酵液中菌丝体多呈絮状,且菌球松散,发酵液黏稠,从而导致低通气量和搅拌效率,生物量、油脂产量及油脂含量随着初始 pH 的升高逐渐增加,当初始 pH 5.5 时,菌丝体多呈球状,这种形态被广泛利用,此时发酵液体黏度降低,生物量和油脂产量达最大,分别为 31.35 g/L 和 17.35 g/L,而初始 pH 5.5 时油脂含量与初始 pH 6.0 时几乎相等,分别为 55.34% 和 55.74%;随着初始 pH 继续增加,发酵液颜色加深,菌球会更加致密且呈颗粒状,此种形态会对菌丝内部营养物质和氧气的传递造成阻碍,不利于油脂的积累<sup>[17]</sup>,因此生物量、油脂产量及油脂含量也随初始 pH 的继续升高而呈下降趋势,但 GLA 产量与

GLA 含量随初始 pH 继续升高逐渐上升,当初始 pH 7.5 时达最高,分别为 0.82 g/L 和 6.52%。因此,在发酵过程中, pH 5.5 有利于菌体的生长,而 pH 7.5 有利于 GLA 的积累,因此后续研究中可以采用分阶段调控 pH 策略有效提高生物量及 GLA 产量。

### 2.2.5 发酵温度对发酵的影响

分别在 20、22、25、28、30 °C 条件下进行发酵培养(其他发酵条件同 1.2.1)。发酵温度对发酵结果的影响如表 7 所示。

由表 7 可知,发酵温度在 20 ~ 28 °C 区间,生物量较稳定,说明此温度范围较适合菌体生长;而 GLA 产量及 GLA 含量总体均随发酵温度的升高而降低,因  $\Delta$ -12 脱氢酶和  $\Delta$ -6 脱氢酶都与 GLA 合

成有着密切关系,随着发酵温度的升高, $\Delta-12$  脱氢酶和  $\Delta-6$  脱氢酶的活性会逐渐降低, GLA 的产量即会随之降低。当发酵温度为 20℃ 时, GLA 产量及 GLA 含量均达最大,分别为 1.24 g/L 及 8.00%,说明此温度最适合 GLA 的积累。在发酵温度较低时,菌株的细胞膜流动性会降低,促使多不饱和脂肪酸脱氢酶活性增强<sup>[18]</sup>,从而有利于 GLA 的合成。Mamatha 等<sup>[19]</sup> 研究证实,低温有助于油脂的积累,

相对于 25℃ 的发酵温度,20℃ 的低温更有利于促进油脂的合成。当发酵温度为 22℃ 时,生物量与 20℃ 时相近,达 29.90 g/L,油脂产量及油脂含量达最高,分别为 16.77 g/L 和 56.08%,因此此温度适合 *M. ramanniana* HLY0902 菌体生长及油脂的积累。而发酵温度为 30℃ 时,生物量、油脂产量与油脂含量下降显著,达到最低,说明高温不利于菌体生长及油脂的积累。

表 7 发酵温度对生物量、油脂含量、油脂产量、GLA 含量及 GLA 产量的影响

发酵温度/℃	生物量/(g/L)	油脂含量/%	油脂产量/(g/L)	GLA 含量/%	GLA 产量/(g/L)
20	30.14 ± 1.42	51.16 ± 0.58	15.42 ± 0.87	8.00 ± 0.54	1.24 ± 0.07
22	29.90 ± 0.47	56.08 ± 1.12	16.77 ± 0.59	5.68 ± 0.86	0.95 ± 0.07
25	29.59 ± 0.27	50.75 ± 0.87	15.02 ± 0.39	6.41 ± 0.13	0.96 ± 0.04
28	28.18 ± 0.81	52.88 ± 1.02	14.90 ± 0.63	5.38 ± 0.12	0.80 ± 0.05
30	22.97 ± 0.75	46.55 ± 1.81	10.70 ± 0.76	6.90 ± 0.75	0.74 ± 0.08

### 3 结论

对诱变菌株 *M. ramanniana* HLY0902 发酵培养基进行了正交实验优化,并对其培养条件进行了单因素实验的优化。培养基优化结果为:葡萄糖 100 g/L、酵母浸粉 10 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 g/L、NaNO<sub>3</sub> 1 g/L、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L,在此条件下 GLA 产量达到 1.05 g/L;优化培养条件为:接种量 10%,装液量 20%,培养时间 168 h,适合菌体生长和油脂积累的 pH 为 5.5、发酵温度为 22℃,适合 GLA 积累的 pH 为 7.5、发酵温度为 20℃。通过在优化过程中所发现的 pH 和发酵温度对菌体生长和 GLA 积累的影响规律,分阶段调控进一步提高 GLA 产量将是后续研究中需要解决的问题。

### 参考文献:

- [1] KAPOOR R, HUANG Y S. *Gamma* linolenic acid: an anti-inflammatory *omega* - 6 fatty acid [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2006, 7(6):531 - 534.
- [2] TAKAI S, JIN D, KAWASHIMA H, et al. Anti - atherosclerotic effects of dihomogamma - linolenic acid in ApoE - deficient mice [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2009, 16(4):480 - 489.
- [3] 殷俊俊,马传国,朱换,等.  $\gamma$  - 亚麻酸降血压作用及其机制探究[J]. *粮食与油脂*, 2013(7):49 - 52.
- [4] DAS U N. Can essential fatty acids reduce the burden of disease(s)? [J]. *Lipids Health Dis*, 2008, 7(1):9.
- [5] 仲玉梅. 营养素:  $\gamma$  - 亚麻酸[J]. *食品工业科技*, 1989(2):32 - 36.
- [6] MORSE N L, CLOUGH P M. A meta - analysis of randomized, placebo - controlled clinical trials of Efamol evening primrose oil in atopic eczema. Where do we go from here in light of more recent discoveries? [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2006, 7(6):503 - 524.
- [7] 苏桂红.  $\gamma$  - 亚麻酸的开发与应用[J]. *黑龙江医药*, 2004, 17(2):142 - 143.
- [8] 彭永健,许新德,吕红萍,等.  $\gamma$  - 亚麻酸的研究进展[J]. *中国油脂*, 2015,40(增刊):84 - 87.
- [9] 刘胜男,王亚洲,李市场,等. 基于代谢调控深黄被孢霉产  $\gamma$  - 亚麻酸培养基优化[J]. *中国油脂*, 2015, 40(9):56 - 60.
- [10] 刘欣,杨玉壮,邵利婷. 一种产  $\gamma$  - 亚麻酸的拉曼被孢霉突变菌株及其应用: CN105349433A [P]. 2016 - 02 - 24.
- [11] HEIDLAS J, CULLY J, VOLLBRECHT H R. Process for the extraction of fats and oils: US005405633A [P]. 1995 - 04 - 11.
- [12] LIU X, ZHANG H M, JI X J, et al. An improved sampling protocol for analysis of intracellular metabolites in *Mortierella alpina* [J]. *Biotechnol Lett*, 2012, 34:2275 - 2282.
- [13] 刘欣,朱健树,刘杨洋,等. 两种复合诱变方法选育拟胞酵母高产油脂菌株[J]. *中国油脂*, 2017, 42(12): 85 - 89.
- [14] 黎志勇,丛蕾蕾,聂志奎,等. 拉曼被孢霉产  $\gamma$  - 亚麻酸的发酵条件优化[J]. *生物加工过程*, 2013, 11(4): 14 - 18.
- [15] SPURVEY S A, SHAHIDI F. Concentration of *gamma* linolenic acid (GLA) from borage oil by urea complexation: optimization of reaction conditions [J]. *J Food Lipids*, 2000, 7(3):163 - 174.
- [16] 夏宁茂,张嗣良. 青霉素菌丝球内氧浓度分布与生长模型的研究[J]. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 1995, 21(1):42 - 48.
- [17] KANG H S, SHIN H K. Influence of medium composition of the production on  $\gamma$  - linolenic acid by *Mucor* sp. KCTC 8405P [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 1989, 17(6): 568 - 573.
- [18] 康亦兼,咸漠,王君霞,等. 菌丝体的膜流动性对去饱和酶活性的影响 [J]. *分子催化*, 2012, 16(1): 1 - 4.
- [19] MAMATHA S S, VENKATESWARAN G. Differential temperature effect on the production of enhanced *gamma* linolenic acid in *Mucor rouxii* CFR - G15 [J]. *Indian J Microbiol*, 2010, 50(1):52 - 56.