

碳氮比(C/N)对高山被孢霉中花生四烯酸积累的影响

顾晓颖^{1,2}, 金娜¹, 付晓萍¹, 李凌飞¹

(1. 云南农业大学 食品科学技术学院, 昆明 650201; 2. 昆明理工大学 津桥学院, 昆明 650106)

摘要:为探究氮源及碳氮比(C/N)对高山被孢霉(*Mortierella alpina*)中花生四烯酸(ARA)积累的影响,选取无机氮硝酸钠和有机氮尿素为氮源,分别于高、中、低C/N条件下(C/N为40:1、20:1和10:1)进行*M. alpina*发酵实验。分析发酵过程中菌体生物量(DCW)、发酵液残C量、发酵液残N量的变化,并通过气相色谱质谱联用技术(GC-MS)检测菌体中脂肪酸组分及其含量的动态变化,同时对各分析指标间进行了Pearson相关性分析。结果表明,以硝酸钠为氮源,高C/N条件下所获DCW更高(6.42 g/L),为低C/N条件下的2.3倍,且高C/N条件下ARA产量也更高(0.21 g/L),高C/N条件下ARA产量与DCW和N消耗量呈显著正相关。以尿素为氮源,低C/N条件下获得较高的DCW(18.2 g/L),但因低C/N条件下菌体中ARA含量较低,故ARA产量不高;且相同C/N条件下,DCW和ARA产量远高于以硝酸钠为氮源的;不同C/N条件下,ARA产量与DCW、C消耗量、N消耗量和总脂肪酸含量均呈显著正相关。综上所述,有机氮比无机氮更有利于*M. alpina*菌体的生长和ARA的积累,且尿素的中C/N条件更有利于提高ARA的产量(0.99 g/L)。

关键词:高山被孢霉;碳氮比;花生四烯酸;生物量;气相色谱质谱联用技术

中图分类号:TS201.3;Q547 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2020)12-0105-07

Effects of carbon/nitrogen ratio (C/N) on the arachidonic acid accumulation in *Mortierella alpina*

GU Xiaoying^{1,2}, JIN Na¹, FU Xiaoping¹, LI Lingfei¹

(1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Oxbridge College, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650106, China)

Abstract: In order to investigate the effect of carbon/nitrogen ratio (C/N) on the accumulation of arachidonic acid (ARA) in *Mortierella alpina*, sodium nitrate (inorganic nitrogen) and urea (organic nitrogen) were selected as the representative nitrogen sources, and *M. alpina* was fermented at the C/N ratio of 40:1, 20:1 and 10:1, respectively. Changes of dry cell weight (DCW), residual C and N contents in broth during fermentation were measured, the composition and contents of fatty acids in mycelia were also examined by GC-MS, and the correlation analysis of Pearson was carried out between each index. The results showed that with sodium nitrate as the nitrogen source, the DCW (6.42 g/L) obtained under the high C/N condition was significantly higher, which was 2.3 times of that obtained under low C/N, ARA production (0.21 g/L) was also higher, and ARA production was significantly positively correlated with DCW and N consumption under the high C/N condition. With urea as the

nitrogen source, the higher DCW (18.2 g/L) was obtained under the low C/N condition, but ARA production was not higher due to the low ARA content in mycelia. Moreover, under the same C/N condition, the DCW and ARA production of mycelia were much higher than those with sodium nitrate as the nitrogen source. With urea as the nitrogen source, ARA production was significantly

收稿日期:2020-01-13;修回日期:2020-05-04

基金项目:云南省农业联合重点项目(2017FG001-015);云南省自然科学基金面上项目(2016FB030)

作者简介:顾晓颖(1992),女,在读硕士,研究方向为发酵食品微生物(E-mail)1697047926@qq.com;金娜(1995),女,在读硕士,研究方向为发酵食品微生物(E-mail)1345695931@qq.com。顾晓颖与金娜共同为第一作者。

通信作者:李凌飞,副教授(E-mail)lingfeili@163.com。

positively correlated with DCW, C consumption, N consumption and total fatty acid content under different C/N conditions. In summary, organic nitrogen was more beneficial to the growth of *M. alpina* and ARA accumulation than inorganic nitrogen, and the medium C/N of urea was more conducive to increase the production of ARA(0.99 g/L).

Key words: *Mortierella alpina*; C/N; arachidonic acid; dry cell weight; GC - MS

花生四烯酸(Arachidonic acid, ARA), 即顺-5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸, 属于 $n-6$ 系列多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acids, PUFAs), 其具有多种药理功能和营养功效^[1-2]。高山被孢霉(*Mortierella alpina*) 属于接合菌纲毛霉目被孢霉科被孢霉属, 是一种产油丝状真菌, 目前已作为商业菌株工业化生产 ARA^[3], 且在美国、日本、英国和加拿大已有 ARA 的发酵商品投放市场。

优化 *M. alpina* 发酵条件是提高 ARA 产量最直接有效的方法, 亦是当前的研究热点。影响 *M. alpina* 中 ARA 产量的发酵因素有碳源、氮源、溶氧量、pH、温度等, 其中碳、氮源的种类及浓度对 *M. alpina* 的生长及脂肪酸的积累具有较大影响。*M. alpina* 可利用的氮源有无机氮源和有机氮源, 不同种类的氮源能影响代谢产物合成的方向和产量^[4-6]。在碳过量而氮缺乏条件下, *M. alpina* 代谢平衡被打破, 菌株不再继续生长而是进入脂质积累期, 将过量的碳源以甘油三酯的形式储存于细胞内^[7]。

ARA 属于 *M. alpina* 的胞内油, 其产量不仅受菌体内脂肪酸含量的影响, 同时受菌体生物量的影响。在氮限制条件下, 菌体内脂肪酸含量的升高有利于 ARA 产量的提高, 同时氮限制对菌体生长的抑制又会造成 ARA 产量的降低。目前, 关于碳氮比(C/N) 如何影响 *M. alpina* 中 ARA 积累的研究甚少。本研究分别以无机氮硝酸钠和有机氮尿素为氮源, 在不同 C/N 条件下进行 *M. alpina* 发酵实验, 测定发酵过程中菌体生物量(DCW)、发酵液残 C 量和残 N 量、菌体中各脂肪酸组分含量随时间的动态变化, 明确 C/N 对 *M. alpina* 中 ARA 积累的影响, 以期获得 *M. alpina* 高产 ARA 的最优氮源种类及 C/N, 为 *M. alpina* 工业化生产 ARA 提供理论依据和实际指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

高山被孢霉(*M. alpina* D36), 由本实验室从土壤中分离获得, 并通过形态学结合分子生物学技术进行了鉴定。

1.1.2 试剂

葡萄糖, 酵母浸粉, 尿素, 硝酸钠, 磷酸二氢钾, 七水硫酸镁, 甲苯, 浓硫酸, 甲醇, 正己烷, 氯化钠, 碳酸氢钾, 3, 5-二硝基水杨酸, 酒石酸钾钠, 氢氧化钠, 对二甲氨基苯甲醛, 标准品十七烷酸(Sigma 公司)等。

1.1.3 仪器

安捷伦 5975C-7890A 气相色谱-质谱联用仪, DN-12A 干式氮吹仪, LGJ-12 冷冻干燥机, TS-211CF 往复回旋式摇床, 752S 紫外分光光度计, YXQ-LS-70A 立式压力蒸汽灭菌锅, SW-CJ-1C 双人单面净化工作台, -80℃ 低温冰箱。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基的配制

种子培养基: 葡萄糖 30 g/L, 酵母浸粉 6 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NaNO_3 3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L。

以尿素为氮源, 低 C/N 培养基(C/N 10:1) 配方为葡萄糖 47.86 g/L、尿素 4.29 g/L、 KH_2PO_4 3.8 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L; 中 C/N 培养基(C/N 20:1) 配方为葡萄糖 48.93 g/L、尿素 2.14 g/L、 KH_2PO_4 3.8 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L; 高 C/N 培养基(C/N 40:1) 配方为葡萄糖 49.46 g/L、尿素 1.07 g/L、 KH_2PO_4 3.8 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L。

以硝酸钠为氮源, 低 C/N 培养基(C/N 10:1) 配方为葡萄糖 50 g/L、 NaNO_3 12.15 g/L、 KH_2PO_4 3.8 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L; 中 C/N 培养基(C/N 20:1) 配方为葡萄糖 50 g/L、 NaNO_3 6.07 g/L、 KH_2PO_4 3.8 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L; 高 C/N 培养基(C/N 40:1) 配方为葡萄糖 50 g/L、 NaNO_3 3.03 g/L、 KH_2PO_4 3.8 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L。

各培养基中初始 C 质量浓度均为 20 g/L; 高、中、低 C/N 条件下培养基中初始 N 质量浓度分别为 0.5、1.0、2.0 g/L。

种子培养基装液量为 50 mL/250 mL, 发酵培养基装液量为 100 mL/500 mL, 115℃ 灭菌 15 min。

1.2.2 *M. alpina* 发酵实验

无菌挑取少量保藏于 PDA 斜面培养基上的 *M. alpina* 菌丝体, 转接于种子培养基中, 在前期研究筛

选出的最优发酵温度(20℃)和转速(175 r/min)^[8]下培养3 d。而后挑取10~15个1~2 mm的种子菌球分别转接于不同C/N的培养基中,20℃、175 r/min下培养,分别于3、6、9、12 d取样进行检测分析。

1.2.3 发酵液中残C量和残N量的测定

发酵液中葡萄糖含量的测定采用3,5-二硝基水杨酸法^[9],尿素含量的测定采用对二甲氨基苯甲醛显色分光光度法^[10],硝酸钠含量的测定参照GB 11894—1989《水质 总氮的测定 碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法》。

以硝酸钠为氮源,发酵液中残C量=发酵液中葡萄糖含量×葡萄糖中碳元素质量分数;发酵液中残N量=发酵液中硝酸钠含量×硝酸钠中氮元素质量分数。C消耗量=培养基中初始C含量-残C量。

以尿素为氮源,发酵液中残C量=发酵液中葡萄糖含量×葡萄糖中碳元素质量分数+发酵液中尿素含量×尿素中碳元素质量分数,发酵液中残N量=发酵液中尿素含量×尿素中氮元素质量分数,N消耗量=培养基中初始N含量-残N量。

1.2.4 菌体生物量(DCW)的测定。

采用干重法测定。发酵完成后,真空抽滤分离发酵液和菌体,蒸馏水洗涤菌体3次。收获的菌体至-20℃预冻24 h后真空冷冻3 d,称重。菌体生物量以每升发酵液中干菌体的质量表示。

1.2.5 脂肪酸组成的测定

参考文献[8, 11],向50 mg冻干的菌丝粉中加入1 mL甲苯,2 mL 1%硫酸甲醇溶液和1 mL质量浓度为1 mg/mL的十七烷酸作为内标,于50℃过夜,然后采用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)对形成的脂肪酸甲酯进行定性和定量分析。GC-MS的参数设置参照Gu等^[8]的方法。菌体中各脂肪酸含量,以每克冻干菌丝粉中所含脂肪酸的毫克数表示。菌体总脂肪酸(TFA)含量为菌体中各脂肪酸含量之和,以ARA含量与TFA含量的比例计算ARA比例,以菌体中ARA含量与菌体生物量乘积计算ARA产量。

1.2.6 统计分析

利用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。对各组数据进行单因素方差分析(One Way ANOVA),各组之间均值的两两比较采用Duncan多重比较法。对不同C/N条件下C消耗量、N消耗量、DCW、TFA含量、ARA产量进行Pearson相关性分析。

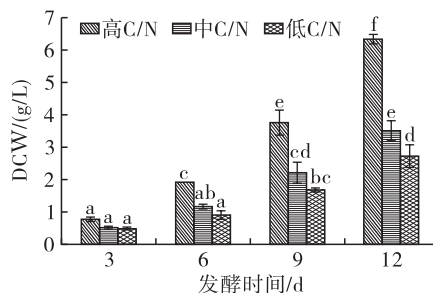
2 结果与讨论

2.1 以硝酸钠为氮源,不同C/N条件下的发酵实验

2.1.1 不同C/N对菌体生长的影响(见图1)

由图1可见:以硝酸钠为氮源,高C/N条件下

真菌生长最快;发酵时间相同时(除3 d),高C/N条件下DCW显著高于中、低C/N条件;高C/N条件下发酵12 d,DCW最高,为6.42 g/L,是低C/N条件下的2.3倍。可见,低浓度硝酸钠(即高C/N条件)有利于菌体生长,原因可能是低浓度硝酸钠有利于菌体对C、N的消耗吸收。



注:图中字母相同表示无统计学差异($P > 0.05$),反之有统计学意义($P < 0.05$)。下同。

图1 硝酸钠为氮源,不同C/N条件下不同发酵时间的菌体生物量

2.1.2 不同C/N对C消耗量的影响(见图2)

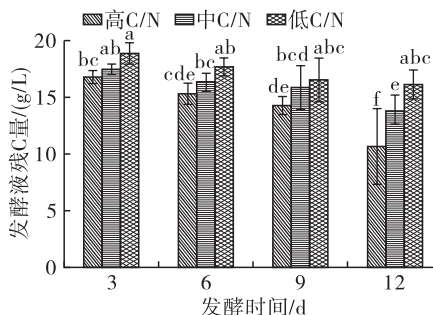


图2 硝酸钠为氮源,不同C/N条件下不同发酵时间发酵液残C量

由图2可见:以硝酸钠为氮源,发酵液初始C含量相同(20 g/L),但高C/N培养基中残C量较低,表明高C/N有利于*M. alpina*消耗发酵液中的C;相同发酵时间下,高C/N培养基中C消耗量最大,其次是中C/N;发酵结束时,高、中、低C/N条件下发酵液中残C量分别为10.68、13.81、16.05 g/L,即C消耗量分别为9.32、6.19、3.95 g/L。高C/N条件下的C消耗量是低C/N条件下C消耗量的2.36倍,是中C/N条件下的1.51倍。

2.1.3 不同C/N对N消耗量的影响(见图3)

由图3可见,以硝酸钠为氮源,*M. alpina*的N消耗量与发酵液中的初始N浓度相关。随着发酵时间的延长,高C/N条件下发酵液残N量下降明显,表明高C/N条件下真菌对N的消耗更快。发酵结束时,各个浓度下发酵液中的N均未耗尽,高、中、低C/N条件下发酵液中残N量分别为0.21、0.83、1.88 g/L,即N消耗量分别为0.29、0.17、0.12

g/L。高 C/N 条件下 N 消耗量是低 C/N 条件下的 2.4 倍。

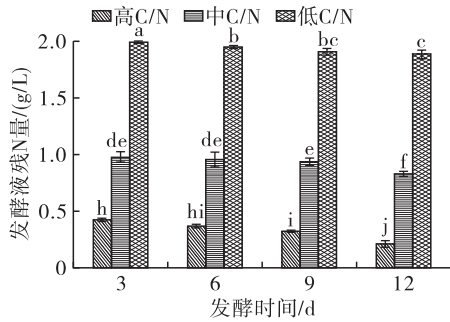


图3 硝酸钠为氮源,不同 C/N 条件下不同发酵时间发酵液残 N 量

2.1.4 不同 C/N 对菌体中 TFA 含量和 ARA 比例的影响(见图 4、图 5)

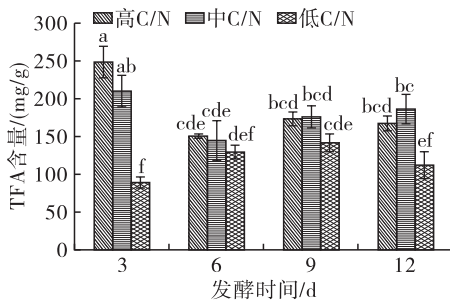


图4 硝酸钠为氮源,不同 C/N 条件下不同发酵时间菌体中的 TFA 含量

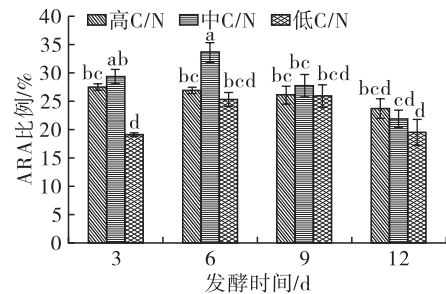


图5 硝酸钠为氮源,不同 C/N 条件下不同发酵时间 TFA 中 ARA 的比例

由图 4 可见,以硝酸钠为氮源,*M. alpina* 干菌体

中 TFA 含量的变化无明显规律性。发酵 3 d 和 12 d 时,高、中 C/N 条件下菌体中 TFA 含量显著高于低 C/N 条件下的;而发酵 6 d 和 12 d 时,高、中、低 C/N 条件下的 TFA 含量没有统计学差异。

由图 5 可见,以硝酸钠为氮源,TFA 中 ARA 比例在 19.13% ~ 33.77% 之间。发酵 9 d 和 12 d 时,高、中、低 C/N 条件下 ARA 比例均无统计学差异。中 C/N 条件下,ARA 比例随发酵时间延长呈现先升高而后降低的趋势,发酵 6 d 时 ARA 比例最高,为 33.77%。高、低 C/N 条件下 ARA 的比例随发酵时间的延长没有统计学差异。

2.1.5 不同 C/N 对 ARA 产量的影响(见图 6)

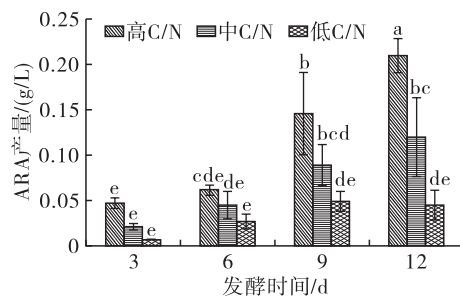


图6 硝酸钠为氮源,不同 C/N 条件下不同发酵时间 ARA 的产量

由图 6 可见:以硝酸钠为氮源,C/N 对 ARA 产量的影响与对 DCW 的影响一致;ARA 产量随发酵时间的延长逐渐升高,相同发酵时间下 ARA 产量的趋势为高 C/N > 中 C/N > 低 C/N。发酵 12 d,高 C/N 条件下 ARA 产量为 0.21 g/L,是中 C/N 条件下的 1.75 倍,是低 C/N 条件下的 4.67 倍。以硝酸钠为氮源,高 C/N 有利于 *M. alpina* 发酵生产 ARA,主要是由于高 C/N 条件下所获 DCW 更高。

2.1.6 不同 C/N 条件下各变量之间的 Pearson 相关系数(见表 1)

表 1 以硝酸钠为氮源时不同 C/N 条件下各变量之间的 Pearson 相关系数

C/N 条件	变量	DCW	C 消耗量	N 消耗量	TFA 含量	ARA 产量
高 C/N	DCW	1	0.537 *	0.904 ***	-0.286	0.688 **
	C 消耗量	0.537 *	1	0.387	-0.392	0.200
	N 消耗量	0.904 ***	0.387	1	-0.336	0.574 *
	TFA 含量	-0.286	-0.392	-0.336	1	0.118
	ARA 产量	0.688 **	0.200	0.574 *	0.118	1
中 C/N	DCW	1	0.853 ***	0.913 ***	-0.057	0.508 *
	C 消耗量	0.853 ***	1	0.880 ***	-0.009	0.539 *
	N 消耗量	0.913 ***	0.880 ***	1	-0.430	0.384
	TFA 含量	-0.057	-0.009	-0.430	1	0.620 *
	ARA 产量	0.508 *	0.539 *	0.384	0.620 *	1

续表 1

C/N 条件	变量	DCW	C 消耗量	N 消耗量	TFA 含量	ARA 产量
低 C/N	DCW	1	0.623 *	0.731 **	0.173	0.603 *
	C 消耗量	0.623 *	1	0.622 *	-0.222	0.155
	N 消耗量	0.731 **	0.622 *	1	0.069	0.491
	TFA 含量	0.173	-0.222	0.069	1	0.785 **
	ARA 产量	0.603 *	0.155	0.491	0.785 **	1

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。下同。

由表 1 可见:高、中、低 C/N 条件下 DCW 与 C 消耗量和 N 消耗量呈显著正相关,并且,中、低 C/N 条件下 C 消耗量与 N 消耗量也呈显著正相关;TFA 含量与 DCW、C 消耗量、N 消耗量无显著相关性;高、中、低 C/N 条件下,ARA 产量与 DCW 呈显著正相关, Pearson 相关系数分别为 0.688、0.508 和 0.603。

综上,以硝酸钠为氮源,虽然高、中 C/N 条件下菌体中 TFA 含量和 ARA 比例整体没有显著差异,但由于高 C/N 条件下 DCW 最高,故 ARA 产量也最高。其原因可能是在较差的无机氮条件下, *M. alpina* 的 C 消耗量较低,摄入的有限 C 仅能满足 *M. alpina* 的生存需求,由于 *M. alpina* 生长状态较差,胞内代谢物积累量也较低。

2.2 以尿素为氮源,不同 C/N 条件下的发酵实验

2.2.1 不同 C/N 对菌体生长的影响(见图 7)

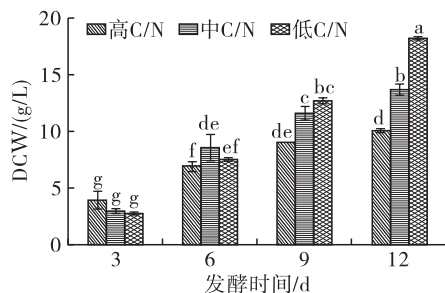


图 7 尿素为氮源,不同 C/N 条件下不同发酵时间的菌体生物量

由图 7 可见:随着发酵时间的延长,同一发酵时间不同 C/N 条件下 DCW 差异逐渐增大;发酵 3 d 和 6 d 时,各 C/N 条件下 DCW 差异不大;发酵 12 d 时,低 C/N 条件下 DCW 显著高于中、高 C/N 条件下,为 18.2 g/L。结合图 1 可见,以尿素为氮源,DCW 明显高于以硝酸钠为氮源。

2.2.2 不同 C/N 对 C 消耗量的影响(见图 8)

由图 8 可见:发酵 12 d,发酵液中的 C 均未耗尽,高 C/N 条件下发酵液中残 C 量为 9.55 g/L(发酵液中初始 C 含量相同,均为 20 g/L),即 C 消耗量为 10.45 g/L,C 消耗率为 52.3%;中 C/N 条件下残 C 量为 4.53 g/L,即 C 消耗量为 15.47 g/L,C 消耗率为 77.4%;低 C/N 条件下残 C 量为 4.39 g/L,即

C 消耗量为 15.61 g/L,C 消耗率为 78.1%。发酵后期(9 d 和 12 d),中、低 C/N 条件下 C 的消耗量显著高于高 C/N 条件。

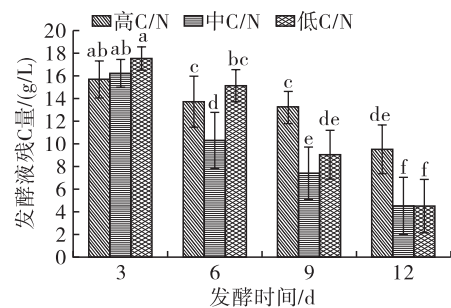


图 8 尿素为氮源,不同 C/N 条件下不同发酵时间发酵液残 C 量

2.2.3 不同 C/N 对 N 消耗量的影响(见图 9)

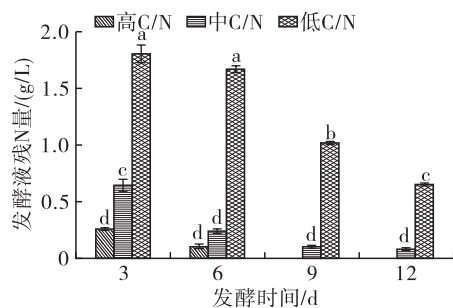


图 9 尿素为氮源,不同 C/N 条件下不同发酵时间发酵液残 N 量

由图 9 可见,不同 C/N 条件下发酵液中残 N 量随发酵时间的延长急剧下降。高 C/N 条件下,发酵液中的 N 在 9 d 时消耗殆尽;中 C/N 条件下发酵 9 d 时,发酵液中残 N 量仅为 0.1 g/L,发酵结束(12 d)时 N 消耗率为 92.5%;低 C/N 条件发酵 12 d 时,残 N 量为 0.65 g/L,N 消耗率仅为 67.5%。

2.2.4 不同 C/N 对菌体中 TFA 含量和 ARA 比例的影响(见图 10、图 11)

由图 10 可见,以尿素为氮源,随发酵时间的延长,菌体中 TFA 含量不断增加。同一发酵时间,高、中 C/N 条件下菌体中 TFA 含量明显高于低 C/N 条件;发酵结束时高 C/N 条件下菌体中 TFA 含量达 305 mg/g(干基)。故高、中 C/N 条件有利于 *M. alpina* 积累 TFA。

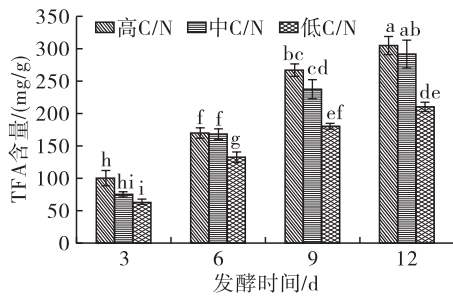


图10 尿素为氮源,不同 C/N 条件下不同发酵时间菌体中的 TFA 含量

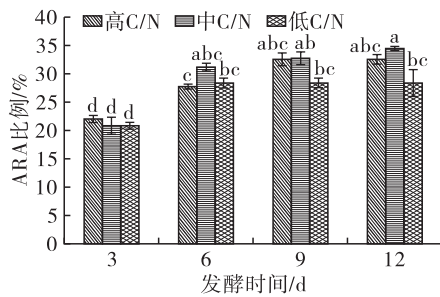


图11 尿素为氮源,不同 C/N 条件下不同发酵时间 TFA 中的 ARA 比例

由图 11 可见,以尿素为氮源,TFA 中 ARA 比例在 20.67% ~ 34.32% 之间。随发酵时间的延长,高、中、低 C/N 条件下菌体中 ARA 比例呈现相同的变化趋势,即发酵 3 d 时 ARA 含量最低,从 6 d 起

ARA 含量无统计学差异。在各发酵时间点,高、中、低 C/N 条件下 ARA 比例也无统计学差异。表明以尿素为氮源,不同 C/N 条件对菌体中 ARA 的比例几乎无影响。

2.2.5 不同 C/N 对 ARA 产量的影响(见图 12)

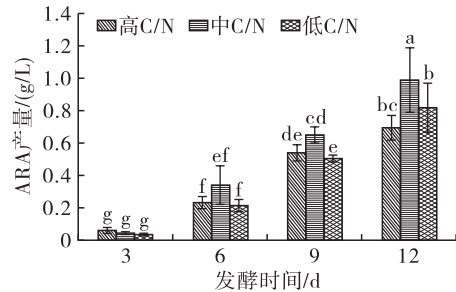


图12 尿素为氮源,不同 C/N 条件下不同发酵时间的 ARA 产量

由图 12 可见,以尿素为氮源,中 C/N 条件有利于 *M. alpina* 生产 ARA。发酵 3 d 和 6 d 时,高、中、低 C/N 条件下 ARA 产量没有统计学差异。发酵 12 d 时,中 C/N 条件下 ARA 产量为 0.99 g/L,显著高于高、低 C/N 条件。对比图 6 可以看出,以尿素为氮源,ARA 产量明显高于以硝酸钠为氮源。

2.2.6 不同 C/N 条件下各变量之间的 Pearson 相关系数(见表 2)

表 2 以尿素为氮源时不同 C/N 条件下各变量之间的 Pearson 相关系数

C/N 条件	变量	DCW	C 消耗量	N 消耗量	TFA 含量	ARA 产量
高 C/N	DCW	1	0.672 *	0.648 *	0.507	0.697 **
	C 消耗量	0.672 *	1	0.866 **	0.603 *	0.806 **
	N 消耗量	0.648 *	0.866 **	1	0.461	0.709 **
	TFA 含量	0.507	0.603 *	0.461	1	0.929 ***
	ARA 产量	0.697 **	0.806 **	0.709 **	0.929 ***	1
中 C/N	DCW	1	0.601 *	0.685 *	0.921 ***	0.878 ***
	C 消耗量	0.601 *	1	0.607 *	0.499 *	0.604 *
	N 消耗量	0.685 *	0.607 *	1	0.651 **	0.778 ***
	TFA 含量	0.921 ***	0.499 *	0.651 **	1	0.941 ***
	ARA 产量	0.878 ***	0.604 *	0.778 ***	0.941 ***	1
低 C/N	DCW	1	0.576 *	0.650 **	0.800 ***	0.736 **
	C 消耗量	0.576 *	1	0.631 **	0.587 *	0.587 *
	N 消耗量	0.650 **	0.631 **	1	0.588 *	0.566 *
	TFA 含量	0.800 ***	0.587 *	0.588 *	1	0.922 ***
	ARA 产量	0.736 **	0.587 *	0.566 *	0.922 ***	1

由表 2 可见,以尿素为氮源,高、中、低 C/N 条件下 DCW 与 C 消耗量、N 消耗量均呈显著正相关,该结果与以硝酸钠为氮源时一致。与硝酸钠不同的是,以尿素为氮源,中、低 C/N 条件下 TFA 含量与 C 消耗量也呈正相关,表明消耗的 C 一部分满足菌体生长,另一部分则通过正常代谢积累 TFA。在尿素为氮源、高 C/N 条件下,TFA 含量与 DCW 无明显相

关性,而与 C 消耗量呈显著正相关,表明当菌株处于 N 饥饿条件下,菌体生长缓慢甚至不生长,发酵液中消耗的 C 大量流向 TFA 积累途径^[12]。

总之,以尿素为氮源,中 C/N 条件有利于提高 *M. alpina* 的 ARA 产量。虽然随着发酵时间的延长,低 C/N 条件下 *M. alpina* 的生长优势逐渐凸显(DCW 最高),但其菌体中 TFA 含量较低,ARA 比例

也较低,导致ARA产量较低;虽然中、高C/N条件下菌体中TFA含量及ARA比例没有显著差异,但随着发酵时间的延长,9 d时高C/N条件下发酵液中的N被耗尽,抑制了菌体生长,最终导致ARA产量不高。

3 结论

本研究基于不同氮源及不同C/N条件下*M. alpina*的生长状况和脂肪酸积累分析,明确了C/N对*M. alpina*中ARA产量的影响效应。以无机氮硝酸钠为氮源,高C/N条件有利于*M. alpina*发酵生产ARA,但生物量和ARA产量远低于以有机氮尿素为氮源的;以尿素为氮源,低C/N条件下获得了较高的DCW,但低C/N条件下菌体中TFA含量和ARA比例较低,故ARA产量不高。研究表明有机氮更有利于*M. alpina*菌体生长和ARA的积累,以尿素为氮源,在中C/N条件下可获得较高的ARA产量。

参考文献:

- [1] LU J, PENG C, JI X J, et al. Fermentation characteristics of *Mortierella alpina* in response to different nitrogen sources[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2011, 164(7): 979-990.
- [2] NISHA A, VENKATESWARAN G. Effect of culture variables on mycelial arachidonic acid production by *Mortierella alpina* [J]. Food Bioproc Technol, 2011, 4(2): 232-240.
- [3] WANG L, CHEN W, FENG Y, et al. Genome characterization of the oleaginous fungus *Mortierella alpina* [J/OL]. Plos One, 2011, 6(12): e28319 [2020-01-13]. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0028319>.
- [4] 沈以凌,刘洋,虞龙.高山被孢霉发酵生产花生四烯酸条件的研究[J].食品科技,2009,34(2):35-38.
- [5] STRESSLER T, EISELE T, ROST J, et al. Production of polyunsaturated fatty acids by *Mortierella alpina* using submerge and solid state fermentation [J]. Chemie Ingenieur Technik, 2013, 85(3): 318-322.
- [6] JANG H, LIN Y, YANG S. Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina* [J]. Bioresour Technol, 2005, 96(15): 1633-1644.
- [7] 代鹏,陈海琴,顾震南,等.高山被孢霉生产多不饱和脂肪酸发酵条件研究进展[J].食品工业科技,2014,35(5):354-359.
- [8] GU X Y, FU X P, LI L F. Effect of temperature and agitation speed on fatty acid accumulation in *Mortierella alpina*[J]. Int J Agric Biol, 2018, 20(10): 2319-2324.
- [9] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Anal Biochem, 1959, 31(3): 426-428.
- [10] 苗晓杰,蒋恩臣,王佳,等.对二甲氨基苯甲醛显色分光光度法检测水溶液中常微量尿素[J].东北农业大学学报,2011,42(8):87-92.
- [11] LIU B, LIU J, SUN P, et al. Sesamol enhances cell growth and the biosynthesis and accumulation of docosahexaenoic acid in the microalga *Cryptocodinium cohnii* [J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(23): 5640-5645.
- [12] SAMADLOUIE H R, HAMIDI-ESFAHANI Z, ALAVI S M, et al. Expression analysis for genes involved in arachidonic acid biosynthesis in *Mortierella alpina* CBS 754.68[J]. Braz J Microbiol, 2014, 45(2): 439-445.

更 正

1. 发表于《中国油脂》2020年第45卷第3期68~73页转97页的“鲜榨山茶油食用安全性毒理学评价”一文,基金项目更正为“国家重点研发计划(2019YFD1002400,2019YFD1002402)”。

2. 发表于《中国油脂》2020年第45卷第7期93~96页的“不同工艺山茶油预防胃肠道、胃溃疡的研究”一文,基金项目更正为“国家重点研发计划(2019YFD1002400,2019YFD1002402)”。

3. 发表于《中国油脂》2020年第45卷第10期73~76页的“桐油高压水解制备 α -桐酸的工艺研究”一文,需增加基金项目,基金项目信息为“湖南省教育厅科技计划项目(17A174)”。

特此更正!

《中国油脂》编辑部

2020-11-16