文章编号: 1673-1689(2011)04-0602-07

短小芽孢杆菌脂肪酸羟基化发酵特性与培养条件优化

吴立新[1,2], 吴祖芳*[1,2]

(1. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘 要: 利用一株具有转化油酸进行羟基化的短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)突变株 M-F641 发酵生产具有重要功能的 ω-羟基脂肪酸。以细胞生长、NADPH 生成及油酸转化产物为测定指标, 研究了培养基的最佳碳源及其发酵工艺条件; 在单因素实验的基础上, 采用响应面分析法, 以油酸转化率作为指标, 优化了发酵工艺条件, 并对优化后的发酵条件进行了验证。结果表明, 最佳碳源为葡萄糖, 其最佳初始质量浓度为 20 g/L, 最佳发酵条件为: 温度 30 ℃、pH 7.4、装液量 60 mL/250 mL。在此条件下油酸转化率为 74.58%, ω-羟基脂肪酸产率达 22.3%。在优化的发酵条件下羟基脂肪酸生产效率得到了显著的提高。

关键词: ω-羟基脂肪酸; 短小芽孢杆菌 MF-641; 发酵条件; 响应面法
中图分类号: TQ 920.1 文献标识码: A

Fermentation Characters of Fatty Acids Hydroxylation and Optimization of Culture Conditions by *Bacillus pumilus*

WU Li-xin[1,2], WU Zu-fang*[1,2]

(1. Key laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo 315211, China; 2. Ministry of Education, Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: A mutated strain of Bacillus pumilus M-F641 was used for production of ω-hydroxy fatty acids(ω-HFA) by bio-conversion of oleic acid. The optimum carbon source of the medium and fermentation conditions were investigated for the cell growth, NADPH content and conversion yield of oleic acid as index. On the basis of single factor experiment, the optimal fermentation condition was obtained by response surface methodology, using the oleic acid conversion rate as index. Further experiment was conducted under the optimal culture condition. The optimum conditions were listed as follows: the glucose concentration 20 g/L, the environmental conditions were 30℃, pH 7.4 and 60 mL in 250mL flask, respectively. Under the optimum conditions, oleic acid transformation yield was achieved at 74.58%, and the ratio of ω-HFA with total oleic acid was 22.3%. ω-HFA production yield was significantly improved under the optimized fermentation conditions.

收稿日期: 2010-07-10
基金项目: 国家自然科学基金项目(30840012)。

* 通信作者: 吴祖芳(1963-), 男, 浙江奉化人, 工学博士, 教授, 主要从事食品生物技术研究。
Email: wuzufang06@yahoo.com.cn

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Key words: ω-hydroxy fatty acid, *Bacillus pumilus* M-F641, fermentation condition, response surface method

羟基脂肪酸是指脂肪酸分子中长链碳位具有单个或多个羟基的一类有机羧酸[1]。羟基脂肪酸可广泛应用于金属润滑剂、防锈剂、表面活性剂、洗涤剂及食品抑菌剂等方面[2-7]。尤其是 ω_1、ω_2 和 ω_3-羟基脂肪酸因其羟基位置较靠近首位甲基碳端, 不但反应性质活泼, 更重要的是作为单体在合成高分子聚合物时提供最长的单体分子碳链, 是当今绿色聚合物材料研究开发中最理想的单体成分之一[4]。目前, 国内外有关微生物转化生成羟基脂肪酸的报道主要集中在菌种的筛选方面[2-8], 而关于发酵条件对菌株发酵影响的报道极少[9-10]。

作者在前期研究基础上[11], 利用一株脂肪酸羟基化突变株 BP M-F641, 研究了羟基脂肪酸发酵生产的理化参数(温度、pH、溶氧水平)的影响及其发酵特性, 在单因素影响的实验基础上, 进一步通过响应面分析法优化发酵条件, 并进行发酵验证, 得到了最佳的发酵工艺条件, 提高了油酸的转化效率。

1　材料与方法

1.1　材料与设备

1.1.1　菌株和培养基　短小芽孢杆菌突变株 M-F641, 由作者所在实验室保藏。

种子培养基采用 LB 培养基; 斜面培养基在 LB 培养基中加入质量分数 2% ~ 5% 的琼脂粉; 发酵培养基在种子培养基的基础上加入 0.2 g/dL $MnSO_4$, 底物油酸在发酵后期(稳定生长期)约 30 h 左右加入[9]。

1.1.2　仪器与试剂　仪器: 可见分光光度计, 北京普析通用仪器设备责任有限公司产品; Agilent 7890 气相色谱仪, 安捷伦公司产品; pH. S-25 型数显 pH 计, 上海精科仪器厂产品。

试剂: 曲拉通 X-100(Triton X-100), 油酸均为化学纯, 国药集团化学试剂有限公司产品; 葡萄糖, 乙醚, 棕榈酸, 无水硫酸钠, 浓硫酸, 甲醇等均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司产品; 正己烷(色谱纯), 天津市化学试剂研究所; NADPH, 色谱纯, 上海润成生物技术有限公司产品。

1.2　菌种培养及发酵方法

将保藏于 4 ℃冰箱的试验菌接入斜面培养基中进行活化, 于 30 ℃静置过夜培养(约 24 h 左右); 将活化好的斜面菌种挑取 2 环接入种子培养基(装液量 30 mL/250 mL 锥形瓶), 30 ℃摇床转速 150 r/min 培养至 20 h, 作为种子液。将种子液以体积分数 4% 的接种量接入不同的发酵培养基中进行相关分析和测定。

1.3　分析方法

1.3.1　细胞生物量的测定　种子、发酵培养基中细胞生物量的测定采用分光光度法, 在 560 nm 处测定其光密度[12]。

1.3.2　NADPH 标准曲线的建立及胞内 NADPH 含量测定　NADPH 标准曲线的建立根据文献报道方法[13], 用缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.0、0.01 mol/L EDTA、体积分数 0.05%(V/V) Triton X-100)将 NADPH 配成 0.02~0.1 mmol/L 不同浓度范围溶液, 于 37 ℃孵育 5 min 后用紫外分光光度计在 340 nm 处测其吸收波长, 求得 NADPH 浓度与吸光度之间的关系, 得到回归方程 $Y = 5.6586X + 0.0142$, 相关系数 $R^2 = 0.9958$, t 检验回归显著。

短小芽孢杆菌胞内 NADPH 含量的测定: 取新鲜发酵培养的短小芽孢杆菌发酵液 2 mL, 于 10 000 r/min 下离心 10 min, 得短小芽孢杆菌湿菌体。按 1 g∶4 mL 加入标准磷酸缓冲液 PBS(0.02 mol/L, pH 7.5)。然后再加入液氮进行冰浴超声波细胞破碎(工作 5 s, 间隙 5 s, 工作 90 次), 在处理后的细胞破碎液中加入 10 mL 缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl pH8.0, 0.01mol/L EDTA, 体积分数 0.05% Triton-X100)并再一次离心(4 ℃ 12 000 r/min, 离心 30 min)。取离心后的上清液并加入 1 mL 4 ℃ 0.04 mol/L NaOH 于暗处 37 ℃水浴锅中保温 5 min 后立即取出用分光光度计进行 NADPH 的测定[14], 并由标准曲线求出 NADPH 的含量。

1.3.3　发酵液中羟基脂肪酸分析及含量测定　取发酵液 50 mL, 用 9 mol/L 的浓硫酸酸化至 pH 2.0 并加入 50 mL 乙醚, 同时加入棕榈酸 20 mg 作为内标, 通过分液漏斗过滤取上清液旋转蒸发去乙醚, 得到发酵产物。脂肪酸甲酯化采用 H_2SO_4-甲醇水浴法。

ω-羟基脂肪酸的鉴定按文献[8]报道的 GC-MS 方法; HP7890GC; 质谱仪 HP5970。ω-羟基脂肪酸含量的测定采用内标法, GC 分析操作条件如下: 以

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

FID 检测器进行检测; 色谱柱条件: DB-WAX(毛细管柱), 进样量为 1 μL, 进样口温度 250 ℃, 检测器温度 275 ℃, 采用程序升温法, 起始温度为 80 ℃, 保持 5 min, 然后以 20 ℃/min 升至 200 ℃, 在此温度下保持 23 min, 再以 10 ℃/min 升到 250 ℃, 保持 5 min。载气: N_2 (纯度 99.99%), 流速为 1 mL/min, 分流比 1∶50。$V(H_2)$∶$V(O_2)$∶$V(N_2)$ = 40∶450∶30。脂肪酸的转化率与 ω-羟基脂肪酸的得率由以下公式表示[9]。

$$转化率(\%) = \frac{\omega\text{-羟基脂肪酸生成质量}}{消耗油酸质量} \times 100\%$$

$$得率(\%) = \frac{\omega\text{-羟基脂肪酸生成质量}}{油酸添加总质量} \times 100\%$$

1.3.4 *单因素实验* 将种子液以体积分数 4% 的接种量接入发酵培养基中, 并将底物油酸在发酵后期(约 30 h 左右) 加入培养基中, 研究装液量、培养温度和 pH 对 BP M-F641 生长以及油酸转化率的影响。

1.3.5 *响应面分析实验* 依据装液量、温度、pH 值等单因素对油酸转化发酵工艺条件的影响, 并根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理, 以 A (装液量)、B(温度) 和 C(pH) 为自变量, 以油酸转化率为响应值, 设计了 3 因素 3 水平的响应面分析实验; 实验因素和水平设计见表 1。

表 1 响应面实验因素水平表

Tab.1 Factors and levels of RSM

水平	因素		
	装液量 A/mL	温度 B/℃	pH 值 C
-1	30	28	7.2
0	50	30	7.4
1	70	32	7.6

2 结果与讨论

2.1 摇瓶培养条件下细胞生长曲线的测定

为研究 BP M-F641 在摇瓶培养条件下, 碳源种类及其浓度对菌株生长的影响情况, 通过测定 A 值得到发酵过程生长曲线, 其结果如图 1 所示, 由结果可知 BP M-F641 在培养至 6 h 左右开始进入对数生长期, 在 20~30 h 时处于稳定期, 30 h 以后开始进入衰亡期。

2.2 碳源种类对菌体生长及油酸转化率的影响

由于微生物对不同碳源的代谢能力不相同, 不同的碳源对菌体的生长和产物的合成会有很大影响, 足量的微生物细胞是获得高油酸转化率的必要条件。因此, 选择合适的碳源对微生物生长和发酵

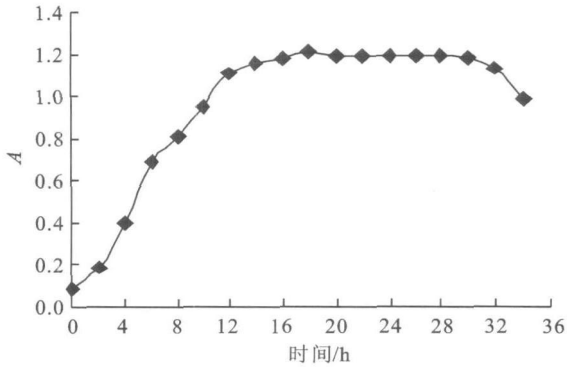


图 1 BP M-F641 的细胞生长曲线

Fig.1 Cell growth curve of BP M-F641

积累目标代谢产物是十分有用的。分别选择质量浓度为 20 g/L 的葡萄糖、麦芽糖、果糖和可溶性淀粉作为碳源, 考察了不同碳源对 BP M-F641 细胞生物量以及转化油酸生成 ω-羟基脂肪酸产量的影响, 其结果如表 2。

表 2 碳源种类对菌体生长和 ω-羟基脂肪酸产量的影响

Tab.2 Effects of carbon source on the bacteria growth and ω-HFA production

碳源	$A_{560\,nm}$	ω-羟基脂肪酸得率/%	油酸转化率/%
葡萄糖	1.226	19.7	71.1
果糖	0.680	11.1	58.0
麦芽糖	0.618	14.2	64.3
可溶性淀粉	0.345	8.87	43.7

由表 2 结果可知, 以葡萄糖、果糖、麦芽糖和可溶性淀粉分别作为碳源的培养基中, BPM-F641 的最大细胞生物量(A 值) 分别为 1.226、0.680、0.618 和 0.345, 可以看出在以葡萄糖作为碳源的培养基中菌株生长最好, 此时油酸的转化率也达到最大为 71.1%。这可能与葡萄糖的性质有关, 因为葡萄糖是最易为微生物所利用的碳源, 它可以加速微生物的生长, 另外, 细胞色素 P450 单氧酶系在羟基化油酸生成 ω-羟基脂肪酸的过程中需要 NADPH 的参与, 而菌体在消耗葡萄糖的过程中正好能提供充足的 NADPH 来满足其需要; 其它的碳源可能不易为短小芽孢杆菌所利用, 油酸的转化率也较低。

2.3 初始葡萄糖质量浓度对菌体生长及油酸转化率的影响

由 2.2 结果可知, 葡萄糖是 BP M-F641 生长最佳碳源, 进一步采用不同的葡萄糖初始质量浓度来考察其初始质量浓度对 BP M-F641 细胞生物量及转化油酸生产 ω-羟基脂肪酸产量的影响, 结果如表 3。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3　葡萄糖初始质量浓度对菌体生长和 ω-羟基脂肪酸产量的影响

Tab. 3　Effects of glucose concentration on the bacteria growth and ω-HFA production

初始葡萄糖质量浓度/(g/L)	$A_{560\ nm}$	ω-羟基脂肪酸得率/%	油酸转化率/%
10	0.786	11.5	58.4
20	1.212	21.5	73.2
30	0.831	15.8	65.7
40	0.766	10.4	48.4

由表 3 结果可知, 在初始葡萄糖质量浓度为 20 g/L 的培养基中, BP M-F641 有最大的细胞生物量, 此时的 A 值为 1.212, 并且在此培养条件下, ω-羟基脂肪酸得率和油酸转化率也都达到最大分别为 21.5% 和 73.2%; 当初始葡萄糖质量质量浓度为 40 g/L 时, 可能由于渗透压增大, 不利于提高氧的传递速度, 对菌体生长不利, 羟基化反应也受阻遏; 当初始葡萄糖浓度过低(10 g/L)时, 葡萄糖消耗迅速, 同样不利于菌体的大量生长, 也影响到油酸的转化率。

2.4　培养温度对菌体生长及油酸转化率的影响

采用不同的培养温度(28、30、32、34 ℃)来考察温度对 BP M-F641 细胞生长及 ω-羟基脂肪酸转化率的影响, 结果如表 4。

表 4　培养温度对 ω-羟基脂肪酸产量影响

Tab. 4　Effects of temperature on the bacteria growth and ω-HFA production

培养温度/℃	$A_{560\ nm}$	ω-羟基脂肪酸得率/%	油酸转化率/%
28	1.105	12.4	63.0
30	1.232	18.5	69.4
32	0.763	15.7	67.8
34	0.658	12.3	62.9

由表 4 结果可知, 当培养温度由 28 ℃提高至 30 ℃时候, 菌体的最大 A 值也由 1.105 增加至 1.232, 但随着培养温度的进一步上升, 此时的 A 值开始逐渐减小; 同时随着温度的上升, ω-羟基脂肪酸得率和油酸转化率先提高后呈下降趋势, 因此, 采用 30℃的培养温度有利于菌体的生长, 在此温度下 ω-羟基脂肪酸得率和油酸转化率也分别达到最大值为 18.5%和 69.4%。

2.5　培养基初始 **pH** 值对菌体生长及油酸转化率的影响

初始 pH 值影响菌体对基质的利用速率和细胞结构状态, 以致影响菌体生长速度和代谢产物的变化。检测不同初始 pH 值(7.2、7.4、7.6、8.0)条件下 BP M-F641 的生长情况以及转化油酸生成 ω-羟基脂肪酸转化率的影响, 其结果如表 5。

表 5　培养基初始 pH 值对 ω-羟基脂肪酸产量影响

Tab. 5　Effects of the initial pH on ω-HFA production

初始 pH 值	$A_{560\ nm}$	ω-羟基脂肪酸得率/%	油酸转化率/%
7.2	1.102	12.8	63.8
7.4	1.234	19.3	70.2
7.6	0.773	16.5	68.4
8.0	0.747	11.2	57.9

由表 5 结果可知, 在初始 pH 由 7.2 上升至 7.4 的过程中, BP M-F641 菌体生物量增加, 在 pH 为 7.4 时细胞生长良好, 此时菌体有最大 A 值为 1.234, 并且 ω-羟基脂肪酸得率和油酸转化率也达到最大值, 分别为 19.3% 和 70.2%, 但随着 pH 的不断增大, 细胞最大 A 值和油酸转化率都呈现下降趋势, 这可能是 pH 值的增加对菌体的生长和相关酶的活性产生了比较明显的抑制作用, 从而对油酸的转化率产生较大的影响。

2.6　装液量对菌种转化油酸生成 ω-羟基脂肪酸得率的影响

利用 BP M-F641 生产 ω-羟基脂肪酸过程中溶氧是一个重要的条件, 作者通过装液量来调节摇瓶发酵中的溶氧量, 考察了溶氧条件对细胞生长、NADPH 生成及目标产物生成的影响。摇瓶(250 mL)装液量分别为 30、50、70、90 mL, 按相同的实验条件, 测定 BP M-F641 生物量、辅酶 NADPH 含量以及转化油酸生成 ω-羟基脂肪酸转化率的影响, 实验结果如表 6。

表 6　装液量对细胞生长 NADPH 含量及 ω-羟基脂肪酸产量的影响

Tab. 6　Effects of the medium size on cell growth, NADPH content and ω-HFA production

装液量/mL	$A_{560\ nm}$	NADPH 浓度/(mmol/L)	ω-羟基脂肪酸得率/%	油酸转化率/%
30	1.346	0.0161	13.1	65.0
50	1.166	0.0268	20.1	71.5
70	0.748	0.0170	11.4	58.5
90	0.536	0.0146	9.58	42.4

由表 6 结果可知, 当装液量由 30 mL 增大至 90 mL 时, 细胞的最大生物量 A 值逐渐减小, 从最初的 1.346 降至 0.536, 这可能是因为随着装液量的增

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

加,溶氧量逐渐减小。虽然在 30 mL 装液量细胞有最大生物量,但从实际工业化生产的角度来考虑,减小装液量显然是不经济的,综合考虑,选定以 50mL 装液量进行发酵实验。而且在此装液量下,ω-羟基脂肪酸得率和油酸转化率也有最大值,分别是 20.1%和 71.5%。

根据对测定的 NADPH 浓度变化规律进行分析可知,在以葡萄糖为底物进行发酵的过程中,NADPH 的生成主要在 HMP 途径的氧化阶段,需要经过葡萄糖脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶等 3 种脱氢酶的催化反应[18],从这个角度出发,NADPH 的生成应该在高溶氧水平进行,实验结果与该观点基本一致。

2.7 响应面分析实验结果

2.7.1 *回归方程的建立与分析* 响应面分析的结果见表 7,采用 Design-Expert 7.0.0 Trial 软件的 ANOVA 程序,进行二次回归分析,计算出上述方程各项系数并进行方差分析(见表 7-表 9),得到油酸转化率 Y 对装液量、温度以及 pH 的标准回归方程为:

$$Y = 73.50 + 5.28A + 1.50B - 0.079C + 1.93AB - 0.030AC - 2.06BC - 6.83A^2 - 7.85B^2 - 6.59C^2$$

式中,Y 为油酸转化率的预测值,A、B、C 为上述 3 个自变量的编码值。

表 7 响应面设计方案和实验结果

Tab.7 Design program and experimental results of RSM

序号	装液量	温度	pH	Y/%
1	-1	1	0	53.21
2	1	0	-1	65.62
3	-1	-1	0	54.08
4	-1	0	-1	54.8
5	0	-1	1	59.59
6	0	0	0	73.11
7	0	0	0	73.52
8	0	0	0	73.87
9	1	-1	0	60.58
10	0	-1	-1	55.52
11	0	1	1	58.47
12	0	1	-1	62.65
13	1	1	0	67.42
14	-1	0	1	54.6
15	1	0	1	65.3

表 8 回归方程系数显著性检验表

Tab.8 Significance test of regression equation module

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	
模型	758.94	9	84.33	1 073.88	< 0.000 1	极显著
A	222.92	1	222.92	2 838.86	< 0.000 1	
B	17.94	1	17.94	228.46	< 0.000 1	
C	0.050	1	0.050	0.63	0.462 7	
$A*B$	14.86	1	14.86	189.25	< 0.000 1	
$A*C$	$3.600E-3$	1	$3.600E-3$	0.046	0.838 9	
$B*C$	17.02	1	17.02	216.69	< 0.000 1	
A^2	172.12	1	172.12	2 191.86	< 0.000 1	
B^2	227.53	1	227.53	2 897.54	< 0.000 1	
C^2	160.47	1	160.47	2 043.57	< 0.000 1	
残差	0.39	5	0.079			
失拟残差	0.10	3	0.034	0.24	0.865 2	不显著
纯误差	0.29	2	0.14			
总和	759.33	14				

从表 8 的方差分析可以看出,所得回归方程极显著($P < 0.000\ 1$),且失拟检验不显著($P = 0.865\ 2$),说明此回归模型理想,可信度较高。用方程 Y 拟合 3 个因素与油酸转化率之间的关系是可行的。模型校正系数(Adj R-Squared)为 0.998 6,说明该模型能解释 99.86%的油酸转化率变化。模型精密度(Adeq Precision)为 89.100> 4,说明实验精度很高。Pred R-Squared = 0.997 0 与 Adj R-Squared= 0.998 6 值较接近,说明实验预测值在可信区间内。综合以上分析得知:该模型与实际情

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

况拟合较好, 可用于预测油酸转化率的变化情况。

回归方程的一次项 A 和 B 均对油酸转化率有极显著影响, C 对油酸转化率有显著影响, 3 个因素的影响顺序依次是 $A > B > C$。此外, 二次项 A^2、B^2 和 C^2 以及交互项中的 $A * B$、$B * C$ 对油酸转化率也有显著的影响, 这表明各个实验因素对转化率的影响呈二次关系, 且 3 个因素之间存在交互作用。

2.7.2 培养因素间交互作用分析与发酵条件的优化　在模型中分别固定装液量(A, mL)、温度(B, ℃) 及 pH(C, pH 值) 中的一个因素在 0 水平, 得到另外两个因素交互作用对油酸转化率(Y) 的子模型, 并根据模型分别绘制三维曲面图及等高线图, 见图 2~ 4。

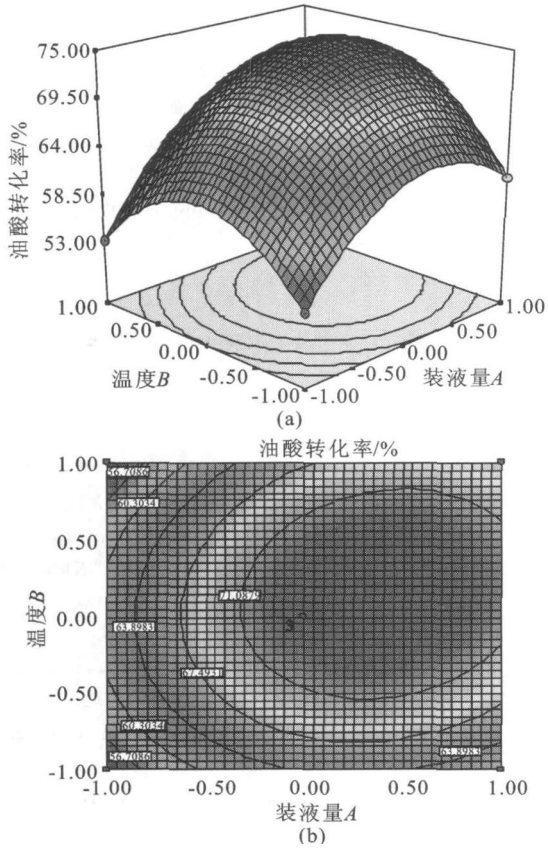


图 2　油酸转化率(Y) 的响应曲面和等高线图 f(A, B)

Fig. 2　Response surface and contour of the bioconversion Y of oleic acid f(A, B)

图 2 是装液量为零水平时, 温度与 pH 交互影响油酸转化率的曲面图及等高线图, 从图中可以直观地看出培养温度与 pH 交互作用显著; 图 3 是温度为零水平时, 装液量与 pH 交互影响油酸转化率的曲面图及等高线图。可以直观地看出装液量与 pH 交互作用显著; 图 4 是 pH 为零水平时, 装液量与温度交互影响油酸转化率的曲面图及等高线图, 可以直观地看出装液量与温度交互作用显著。

综上所述, 由二次多项回归方程得出 3 个因素的最佳值为装液量 58.2 mL/250 mL、温度 30.3 ℃, pH 7.4, 油酸转化率的预测值为 74.69%。

2.7.3 验证实验　采用上述优化后的发酵工艺条件, 选用装液量为 60 mL(近似值) / 250 mL, 温度 30 ℃, pH 值 7.4 进行发酵验证实验, 测得油酸转化率为 74.58% 与预测值(74.69%) 接近, 说明该实验模型可操作性高。

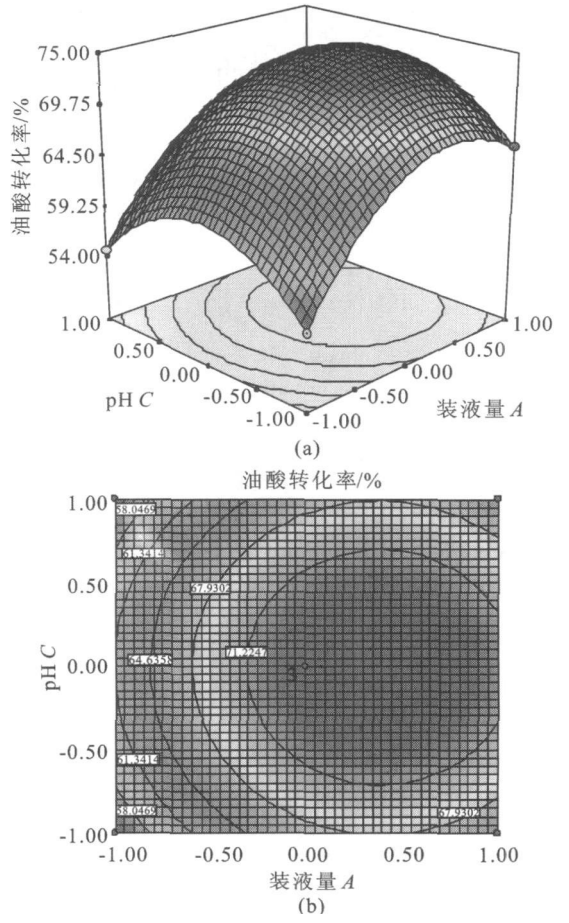
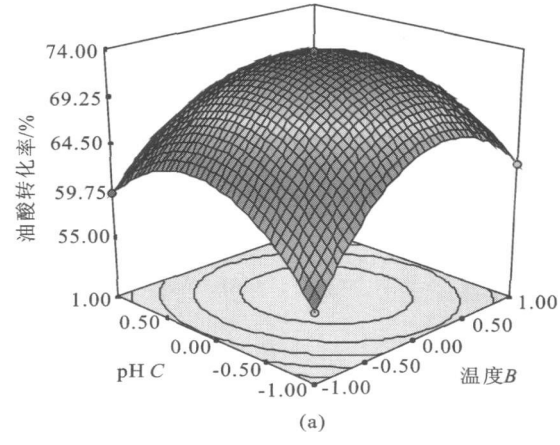


图 3　油酸转化率(Y) 的响应曲面和等高线图 f(A, C)

Fig. 3　Response surface and contour of the bioconversion Y of oleic acid f(A, C)



© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

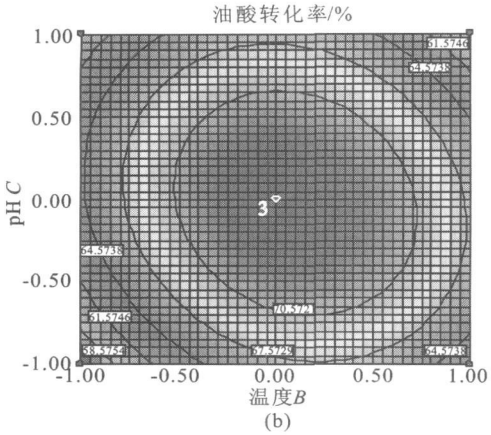


图 4 油酸转化率(*Y*)的响应曲面和等高线图 f(*B*, *C*)

Fig. 4 Response surface and contour of the bioconversion *Y* of oleic acid f(*B*, *C*)

3 结 语

通过单因素实验和响应面优化分析,得出短小芽孢杆菌转化油酸生成 ω-羟基脂肪酸的最佳碳源是葡萄糖,其最佳初始质量浓度为 20 g/ L;最佳发酵条件是:反应温度 30 ℃、pH 值 7. 4,装液量 60 mL,在优化工艺条件下进行的验证实验,油酸的转化率高达 74. 58%;验证实验所得的油酸转化率数值与预测值接近,从而证实了回归方程的有效性。

参考文献(References):

[1] Schneider S, Wubbolts M G, Sanglard D, et al. Production of chiral hydroxy long chain fatty acids by whole cell biocatalysis of pentadecanoic acid with an *E. coli* recombinant containing cytochrome P450BM-3 monooxygenase[J]. **Tetrahedron: Asymmetry,** 1998, 9: 2833- 2844.

[2] Kuo T M, Gardner H W. Microbiological conversions of fatty acids to value-added products[J]. **Lipid Biotechnolog,** 2002, 31: 605- 627.

[3] Jorgen S, Jesper M, Anders B, et al. Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14[J]. **Applied and Environmental Microbiology,** 2003, 69(12) : 7554- 7557.

[4] Kuo T M, Nakamura L K, Lanser A C. Conversion of fatty acids by *Bacillus* sphaericus-Like Organisms[J]. **Current Microbiology,** 2002, 45: 265- 271.

[5] Collins Y F, McSweeney P L, Wilkinson M G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge[J]. **Int Dairy J,** 2003, 13: 841- 866.

[6] Kawagishi H, Ando M, Mizuno T, et al. A novel fatty acid from mushroom *Hericium erinaceum*[J]. **Agri. Biol. Chem.** 1990, 54: 1329- 1331.

[7] Dierig D A, Tomasil P M, Salywon1 A M, et al. Improvement in hydroxy fatty acid seed oil content and other traits from interspecific hybrids of three Lesquerella species: Lesquerella fendleri, L. pallida, and L. lindheimeri[J]. **Kluwer Academic Publishers, Euphytica,** 2004, 139: 199- 206.

[8] Wu Z F, Bajpai R K, Yan W. Screening for ω-hydroxy fatty acid over-producing mutants for bioconversion of oleic acid by combining general mutagenesis and specific selection[J]. **Biocatalysis and Biotransformation,** 2008, 26(5) : 444- 449.

[9] 吴祖芳, 翁佩芳, Bajpai R K. 羟基脂肪酸生产菌对油酸的代谢特性和产物分析[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(1) : 87- 90.
WU Zu-fang, WENG Pei-fang, Bajpai RK. Metabolic characteristic and product analysis for bioconversion of oleic acid by *Bacillus pumilus*[J]. **Journal of the Chinese Cereals and Oils Association,** 2007, 22(1) : 87- 90. (in Chinese)

[10] Lanser A C, Plattner R D, Bagby M O. Production of 15-, 16- and 17-hydroxy-9-octadecenoic acid by bioconversion of oleic acid with *Bacillus pumilus*[J]. **J. Am. Oil Chem. Soc,** 1992, 169: 363- 366.

[11] 翁佩芳, 吴祖芳. 脂肪酸微生物转化生产羟基脂肪酸的研究进展[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(1): 87- 90.
WENG Pei-fang, WU Zu-fang. Advances of Hydroxyl FattyAcids Production by Bioconversion of Fatty Acids with Microbe [J]. **Journal of the Chinese Cereals and Oils Association,** 2008, 23(1): 87- 90. (in Chinese)

[12] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1996.

[13] 桑 丹, 薛耀明, 周琳, 等. 葡萄糖浓度波动对人外周血白细胞 NADPH 及活性氧产生的影响[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(8) : 1189- 1191.
SANG Dan, XUE Yao-ming, ZHOU Lin, et al. Effects of glucose variability on NADPH level and ROS production in healthy human peripheral white blood cells[J]. **The Journal of Practical Medicine,** 2009, 25(8) : 1189- 1191. (in Chinese)

[14] 欧志敏, 吴坚平, 杨立荣, 等. 酵母细胞中辅酶Ⅰ含量的分光光度测定法[J]. 郑州轻工业学院学报: 自然科学版, 2005, 20(2) : 20- 22.
OU Zhi-min, WU Jian-ping, YANG Li-rong, et al. Spectrophotometric method for quantification of nicotinamide adenine dinucleotide in yeast cell[J]. **Journal of Zheng zhou University of light industry : Natural Science,** 2005, 20(2) : 20- 22. (in Chinese)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net