

doi: 10.3969/j.issn.1672-3678.2013.04.013

微生物发酵法生产花生四烯酸油脂的研究进展

周正雄¹, 卢英华², 班甲¹, 陈骏佳¹(1. 广州甘蔗糖业研究所 广东省甘蔗改良与生物炼制重点实验室, 广州 510316;
2. 厦门大学 化学化工学院 化学工程与生物工程系, 厦门 361005)

摘要: 花生四烯酸(ARA)是一种重要的脂肪酸,现在主要由生物法生产,本文综述了高山被孢霉发酵生产花生四烯酸油脂的菌落形态控制及其代谢途径,以期为相关的研究者提供参考。

关键词: 花生四烯酸油脂;高山被孢霉;形态优化;限速步骤;苹果酸酶

中图分类号: TS201; Q815

文献标志码: A

文章编号: 1672-3678(2013)04-0072-07

Arachidonic acid oil production by microbial fermentation

ZHOU Zhengxiong¹, LU Yinghua², BAN Jia¹, CHEN Junjia¹

(1. Guangdong Key Lab of Sugarcane Improvement and Biorefinery, Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangzhou 510316, China; 2. Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Arachidonic acid (ARA) is a very important fatty acid, and mainly produced by biological method. In this paper, production of ARA by *Mortierella alpina* and the involved metabolic pathways were reviewed, in order to provide references for relative research.

Key words: arachidonic acid oil; *Mortierella alpina*; morphology optimization; rate-limiting step; malic enzyme

目前花生四烯酸(arachidonic acid, ARA)油脂主要从动物肝脏、猪肾上腺、沙丁鱼中提取获得。然而动物组织中 ARA 的含量基本都低于 5%, 细胞干质量中 ARA 的质量甚至低于 0.2%^[1]。由于 ARA 为细胞膜磷脂的重要组成成分,因此,自从 20 世纪 80 年代,研究者开始寻求通过微生物发酵法生产 ARA, 并发现丝状真菌高山被孢霉具有大量积累花生四烯酸油脂的能力^[2-3]。

以往的研究热点主要集中于高产 ARA 高山被孢霉的菌株筛选、高山被孢霉发酵生产花生四烯酸

油脂的发酵工艺等方面^[4-5]。而本文主要综述高山被孢霉深层培养过程中菌丝形态的控制及高山被孢霉合成 ARA 的代谢通路、限速步骤及将来的研究方向。

1 花生四烯酸的性质及其应用

花生四烯酸,系统命名为全顺 $\Delta^5, 8, 11, 14$ -二十碳四烯酸,其碳链中具有 4 个顺式双键。由于第一个双键位于羧基端的第六个碳原子处,所以 ARA 属于 ω_6 型不饱和脂肪酸。鉴于其特殊的生物学性

收稿日期: 2012-09-11

基金项目: 广东省工业技术研究院生物工程研究所科技基金(B201301)

作者简介: 周正雄(1986—),男,湖北公安人,助理工程师,研究方向:丝状真菌代谢工程改造及发酵过程优化;陈骏佳(联系人),教授, E-mail: gzsircjj@163.com

质,ARA被广泛应用于食品、医药、制药、化妆品及农业等行业中^[6-7]。

ARA是人体中前列腺素、前列环素、血栓烷、白三烯等一系列重要的二十碳酸的前体物质,适量摄取有助于婴幼儿大脑细胞及神经系统发育^[7]。因此ARA在婴幼儿奶粉中具有不可替代的强化营养的作用。2012年,卫生部正式发文批准ARA可用于儿童用乳粉及婴幼儿谷类辅助食品,规定使用量必须分别低于总脂肪酸含量的1%和2300 mg/kg^[8]。

作为大脑及眼睛中重要的脂肪酸组成成分,ARA具有传递神经信号的作用,可提高婴幼儿的感光及认知能力^[7]。ARA亦可作为一种经济型化妆品添加剂,具有调节细胞膜渗透性、保湿肌肤等功能^[9],因此它常作为改善皮肤的护肤用品。除此之外,ARA还可以添加到护发素等洗发产品中,能够促进头发生长,改善发质^[10]。ARA还具有降低机体内胆固醇含量的功效^[11],因此,它也是一种饲料添加剂,可用于改善银狐皮毛光滑度及舒适度^[12]。

2 传统工艺制备花生四烯酸油脂

花生四烯酸油脂广泛存在于猪肝脏、猪肾上腺、蛋、牛脑、鱼油等组织中。目前,主要通过尿素包合法从动物组织中提取,而此方法仅能得到粗品,花生四烯酸油脂的含量仅为50%,且其中还有

大量的二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid,EPA)油脂。而婴幼儿乳品中如存在过量的EPA,会抑制ARA的吸收和合成,从而降低细胞中ARA水平,导致婴幼儿大脑发育不成熟,甚至性早熟^[13]。因此,传统工艺生产ARA不宜再进行工业化生产;微生物法生产ARA的研究则更有必要开展。

3 微生物发酵法制备花生四烯酸油脂

鉴于动物组织来源的ARA产品中含有大量的EPA,而EPA含量超标又会给婴幼儿身体健康带来隐患。因此,从20世纪80年代起,研究者开始利用微生物发酵法生产ARA,相关生产菌株及生产技术的专利由此先后问世。例如,Barclay等^[1]为采用复杂N源培养*M. sect. schmuckeri*生产ARA的常规培养方式申请了专利。Akimoto等^[14]就降低 ω 3脱饱和酶活性提高ARA积累量的发酵方法申请专利。自1983年Ahern等^[15]发现红藻(*Porphyridium cruentum*)具有合成ARA的能力后,一大批微生物也被发现能够合成ARA,主要集中在被孢霉属与耳霉属。表1列出了几种菌株的ARA积累情况,其中高山被孢霉积累ARA的能力最强。此外,有研究发现,通过在高产油脂的解脂亚洛酵母中过量表达ARA合成的 Δ 6脱饱和酶/ Δ 6延长酶及 Δ 9延长酶/ Δ 8脱饱和酶途径中的关键酶,可实现ARA的大量积累^[30]。

表1 不同菌株积累花生四烯酸油脂的能力比较

Table 1 Literature data on arachidonic acid oil production by different strains

| 菌株 | 发酵规模 | 底物 | 产量/ (g·L ⁻¹) | ARA 占总油脂 百分比/% | 发酵周期/d | 文献 |
|---|---------|---------|-----------------------------|-------------------|--------|------|
| <i>M. alpina</i> ME-1 | 机械搅拌罐 | 葡萄糖、乙醇 | 19.80 | 75.0 | 11 | [16] |
| <i>M. alliacea</i> YN-15 | 50 L 罐 | 葡萄糖 | 7.10 | 36.4 | 7 | [17] |
| <i>M. alpina</i> LPM 301 | 100 L 罐 | 葡萄糖 | 4.50 | 60.4 | 8 | [18] |
| <i>M. alpina</i> ME-1 | 5 L 罐 | 葡萄糖、乙醇 | 19.02 | — | 5.6 | [19] |
| <i>M. alpina</i> | 摇瓶 | 葡萄糖 | 7.74 | — | — | [20] |
| <i>M. alpina</i> | 12 L 罐 | 葡萄糖 | 18.80 | — | 12.5 | [21] |
| <i>M. alpina</i> M6 | 摇瓶 | 葡萄糖 | 4.82 | 72.3 | 8~14 | [22] |
| <i>M. alpina</i> IS-4 | 摇瓶 | 葡萄糖 | 0.41 | — | 10 | [23] |
| <i>M. alpina</i> | 摇瓶 | 玉米淀粉水解液 | 1.87 | 17.3 | 7 | [24] |
| <i>M. alpina</i> CCF | 固体发酵 | 大米、小麦等 | 0.24 | — | 7 | [25] |
| <i>M. alpina</i> LPM 301 | 机械搅拌罐 | 葡萄糖 | 4.50 | 60.4 | 8 | [26] |
| <i>M. schmuckeri</i> | 摇瓶 | 葡萄糖 | 2.30 | 20.0 | — | [1] |
| <i>M. alpina</i> I ₄₉ -N ₁₈ | 摇瓶 | 葡萄糖 | 4.55 | 70.2 | 10~13 | [27] |
| <i>Aureispira maritima</i> | 摇瓶 | 葡萄糖 | 0.04 | — | 3 | [28] |
| <i>Conidiobolus nanodes</i> | 摇瓶 | 葡萄糖 | 2.55 | 16.0 | — | [29] |

笔者从以下几个方面对发酵法生产 ARA 进行综述。

3.1 微生物发酵所需营养物质及发酵工艺

目前,高山被孢霉发酵 ARA 可以利用的 C 源包括葡萄糖、淀粉及大豆油等,而葡萄糖是利用最广泛的 C 源。以 NH_4NO_3 、 NaNO_3 、 NH_4AC 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等无机氮为 N 源时,菌体生长量偏低,因此,高山被孢霉应以蛋白质、氨基酸等有机氮为 N 源^[31-32]。

作为多种酶类的辅因子, Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 PO_3^{3-} 等离子的添加,极大地促进了 ARA 的积累^[33-34]。溶氧是影响高山被孢霉菌体生长、产物积累的重要因素之一,Peng 等^[35]通过两阶段控制溶氧,最终将 ARA 的积累量提高了 50.3%。

实验室规模,高山被孢霉积累 ARA 的发酵及提取工艺流程如图 1 所示。由图 1 可知,发酵结束后,经真空过滤、离心收集菌体;之后经过氯仿、甲醇抽提可得到 ARA。工业化规模,发酵结束后,菌体经真空过滤、去离子水清洗后,105 °C 干燥至恒质量,之后菌体经甲醇盐酸溶液处理、*n*-己烷萃取可得到 ARA。

3.2 菌丝形态对 ARA 积累的影响

丝状真菌培养过程中,溶氧不足是目标产物大量积累的主要瓶颈之一。目前针对此问题的解

决方案有:①在培养基中添加氧载体;②通入高浓度氧的空气;③控制菌丝形态增加菌体与氧气的接触面积。前两种方案在成本上都比较昂贵,无法适用于大规模的发酵生产。此外,研究表明对于一定浓度、黏度的发酵液,发酵液中氧气浓度达到饱和时,菌体颗粒内部某点的溶氧即降低至零,即菌体内部氧气浓度随菌体直径增大而迅速降低^[36],Shu 等^[37]研究裂褶菌时同样也发现颗粒内部溶氧传质困难。因此,目前解决丝状真菌深层培养过程中溶氧问题较为行之有效的方法为控制菌丝形态。

其次,菌丝形态还能影响发酵液的流体性能。研究表明,在氧气充足的条件下,土曲霉发酵液怜指数(flow index)与稠度系数的影响因素之一为颗粒直径大小,其中怜指数随颗粒直径增加而降低,而稠度系数随颗粒直径增大而增大^[38]。Teng 等^[39]通过控制培养基中的接种量控制菌体形态,并测定发酵液中的怜指数及稠度系数,计算得到团状菌体的发酵液流体表观黏度大于颗粒状菌体发酵液流体表观黏度。而表观黏度越大,流体中的物质交换、溶氧传递越困难,由此可以得知,颗粒状菌体发酵液中的物质交换、溶氧传质较团状发酵液容易。

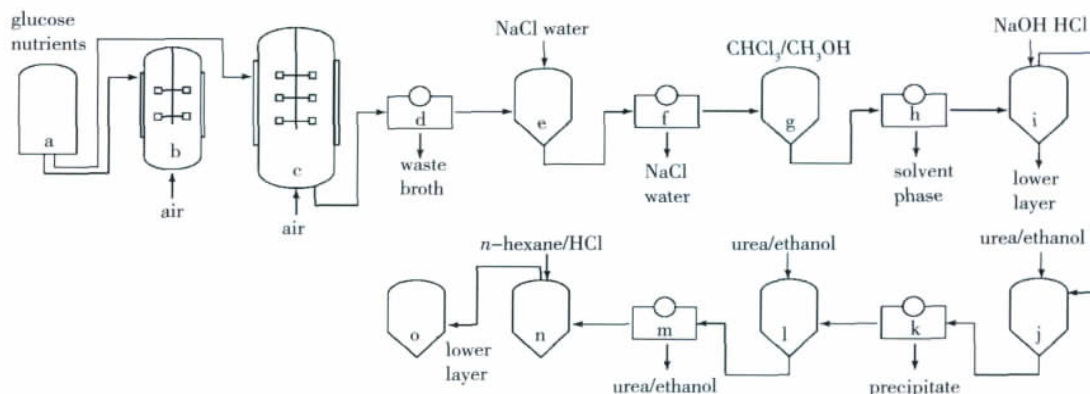


图 1 高山被孢霉发酵及提取 ARA 的工艺流程

Fig. 1 Flow-sheet for arachidonic acid production via fermentation by *M. alpina*

Park 等^[40]研究发现,表面非光滑颗粒积累 ARA 的量是光滑颗粒表面的 2 倍,达到菌体干质量的 14%。Higashiyama 等^[41]研究表明,菌体形态由丝状转变成团状时,营养物质及代谢废物在细胞与发酵液间传递难度增大,ARA 积累量下降。Zhou

等^[42]研究表明,颗粒状德氏根霉积累延胡索酸能力最强,且其积累能力随颗粒直径变小而增大。Feng 等^[43]研究金龟子绿僵菌发酵生产腐败菌素 B 时发现,腐败菌素 B 的积累量随金龟子绿僵菌颗粒直径增大而降低。Sitanggang 等^[44]研究曲霉发酵生产葡

糖胺时也得到相似的结论。Shu 等^[37] 研究裂褶菌生产抗肿瘤多糖裂褶菌素时同样也发现, 颗粒直径越小, 目的产物积累量越高。对高山被孢霉而言, Higashiyama 等^[45] 将发酵液中的菌体分成丝状部分和颗粒部分, 并发现丝状部分积累的 ARA 含量偏低。同时, Chung 等^[46] 利用抗体间接荧光染色分析粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*) 中转化酶活性位点, 得出对数生长后期转化酶活性位点位于年轻菌丝细胞膜(顶端细胞)上的结论。

换言之, 从微观角度来说: 同等质量的菌体, 顶端细胞越多, 合成目标产物的能力越强; 从宏观角度来说: 比表面积越大, 菌体合成目标产物的能力越强。由此可以推断, 对高山被孢霉而言颗粒直径较小, 目标产物的积累量越大。

目前, 丝状真菌形态主要包括丝状、团状、颗粒状 3 种。影响菌丝形态的主要因素包括 C 源、N 源、无机盐、pH、表面活性剂等培养基组分以及剪切力、温度、接种量等培养方式。对于不同的丝状真菌, 显著影响其形态的因素也不一样。

对高山被孢霉而言, 在培养基中仅添加 KH_2PO_4 一种无机离子(盐)时, 菌体成丝状; 同时添加 Na_2SO_4 、 CaCl_2 、 MgCl_2 3 种无机离子(盐)时, 菌体主要呈现大颗粒状(2~3 mm); 而同时添加以上 4 种无机离子(盐)时, 菌体主要呈现小颗粒状(1~2 mm)^[47]。C/N 比作为重要的影响因素, 可以直接影响菌体颗粒直径的大小。C/N 比 > 20 时, 颗粒直径大小随着 C/N 比升高而增加; C/N 比 < 20 时, 颗粒直径几乎不发生改变^[48]。同时, 不同溶氧条件下, 高山被孢霉呈现的形态也有所不同。溶氧浓度控制在 $(2.0 \sim 5.0) \times 10^{-7}$ 时, 随溶氧浓度升高, 菌体形态由丝状逐渐向颗粒状转变; 溶氧浓度控制在 $(1.5 \sim 2.0) \times 10^{-7}$ 时, 菌体形态几乎不发生改变^[49]。此外, Park 等^[40] 研究表明, 以酵母粉、谷朊、玉米浆为 N 源时, 深层培养过程中 *M. alpina* 呈颗粒状; 而以 Pharmamedia、鱼粉、大豆粉为 N 源时, 菌体呈丝状。与此同时, 研究表明, 高浓度的葡萄糖溶液不仅抑制菌体生长, 而且可以诱导高山被孢霉形成丝状菌体^[50]。

3.3 ARA 代谢途径

如图 2 所示, ARA 合成途径主要包括糖酵解途径、TCA 循环途径、丙酮酸/苹果酸循环、脂肪酸合成途径等。其中, 葡萄糖经糖酵解途径合成丙酮酸, 丙酮酸一部分进入线粒体中的三羧酸循环, 另

一部分留在胞液中进入丙酮酸/苹果酸循环; 三羧酸循环过程中产生的柠檬酸穿过线粒体膜进入胞液中, 并在 ATP-柠檬酸裂解酶作用下形成乙酰-CoA; 在乙酰-CoA 羧化酶作用下, 合成丙二酰-CoA; 之后在一系列酶的催化作用下得到棕榈酰 CoA (图 3)。棕榈酰-CoA 与乙酰-CoA 相互作用后得到硬脂酰-CoA, Δ^9 脱饱和酶作用于硬脂酰 CoA 得到不饱和的油酸酰 CoA, 在脂肪酸中引入第一个双键; 接着在一系列脂肪酸延长酶、脂肪酸脱饱和酶作用下得到 ARA。

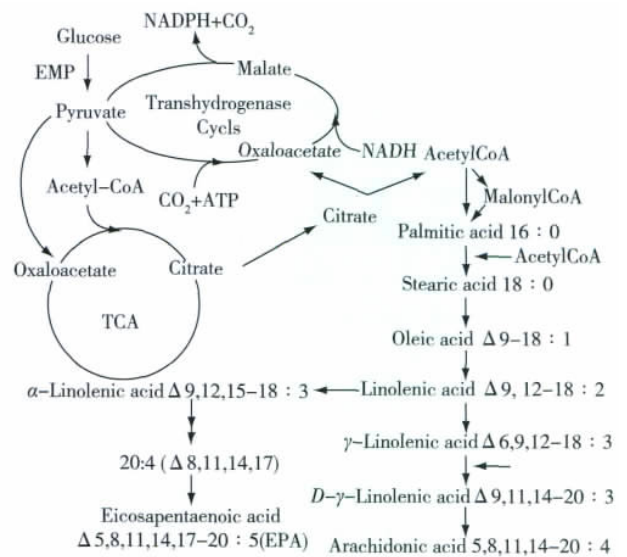


图 2 高山被孢霉细胞中花生四烯酸合成的代谢流

Fig. 2 Metabolic distribution of arachidonic acid synthesis by *M. alpina*

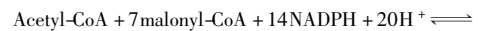


图 3 棕榈酰-CoA 的合成反应

Fig. 3 The biosynthesis of palmityl-CoA

在 ARA 的合成过程中, TCA 循环提供耗能代谢过程中所需的 ATP 及柠檬酸。而柠檬酸在 ATP-柠檬酸裂解酶作用下分解成供脂肪酸合成所需的乙酰 CoA。丙酮酸/苹果酸循环提供胞内脂肪酸合成所需的还原力 NADPH。降低此过程中的苹果酸酶活性, 会显著降低 ARA 的积累量^[51]。因此, 丙酮酸/苹果酸循环被认为是最重要的 NADPH 供体。Zhang 等^[52] 推断苹果酸酶是脂肪酸积累的限速酶, 丙酮酸/苹果酸循环是脂肪酸积累的限速步骤, 过量表达苹果酸酶后, 卷枝毛霉中脂肪酸的积累量增

加了2.5倍。

Song等^[53]研究表明,产油丝状真菌卷枝毛霉中发现苹果酸酶存在6种亚型,并且也只有一种亚型(亚型4)与脂肪酸的积累有关,其他亚型均在厌氧条件下而非N源耗尽条件下发挥作用(除亚型3以外),亚型3为组成型,在菌体生长时具有较高的活性。在高山被孢霉中,苹果酸酶存在7种亚型(A~G),通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳测定其中特定酶活性,在培养基中N源耗尽即脂肪酸积累时,发现仅有苹果酸酶E具有活性,而苹果酸酶A、B、C、F、G则是溶氧关联型^[54]。

Wynn等^[55]分别以葡萄糖和吐温-20、吐温-40、吐温-80为C源(主要成分分别为C14、C16、C18等)时,发现ARA的积累量具有差异性;以吐温为C源时,C18:2、C18:3积累量相较于以葡萄糖为底物时偏多,而C20:3、C20:4的含量却没有区别;这可以解释为 $\Delta 12$ 脱饱和酶作用于C18:1生成C18:2及 $\Delta 6$ 脱饱和酶作用于C18:2生成C18:3的产量,随着底物中C18:1或者C18:2含量的增加,产物积累量也增加;而转化C18:3成C20:3的反应速度较慢,且为脂肪酸合成过程中的限速步骤,所以ARA的积累量没有明显变化。另外,在产油型酵母解脂亚洛酵母中表达植物来源的 β -酮酰基合成酶基因的研究表明 β -酮酰基合成酶催化C4至C14化合物加乙酰基延长碳链。延长超过18个碳的脂肪酸碳链时,需要脂肪酸延长酶催化4个酶反应,因此,以C16和C18为底物时,与合成C20的速率基本一致^[56]。因此,可以推论脂肪酸延长酶催化 γ -亚油酸酰CoA合成双高 γ -亚油酸酰CoA是ARA积累过程中的限速步骤,这为进一步提高ARA的产量提供了可行的代谢工程改造方案。

4 结论与展望

由于动物组织中ARA的含量偏低,因此,研究者期待以微生物发酵法生产ARA,得到更可能应用于工业化的ARA生产方法。从已有的研究成果可知,高山被孢霉积累ARA的能力最强。高山被孢霉胞内可以经过糖酵解途径、丙酮酸/苹果酸循环、脂肪酸合成途径等步骤积累ARA;且对丝状真菌而言,优化深层培养过程中的菌丝形态有助于提高菌体与发酵液中的物质及气体交换,进而提高ARA产量;通过代谢工程的手段,提高苹果酸酶、脂肪酸延

长酶活性也不失为一种有效的方法。

参考文献:

- [1] Barclay W R. Method for production of arachidonic acid: US, 6541049 [P]. 2003-04-01.
- [2] Totani N, Oba K. The filamentous fungus *Mortierella alpina* high in arachidonic acid [J]. *Lipids*, 1987, 22(12): 1060-1062.
- [3] Bajpai P K, Bajpai P, Ward O P. Arachidonic acid production by fungi [J]. *Appl Environ Microb*, 1991, 57(4): 1255-1258.
- [4] Dedyukhina E G, Chistyakova T I, Vainshtein M B. Biosynthesis of arachidonic acid by micromycetes (review) [J]. *Appl Biochem Microbiol*, 2011, 47(2): 109-117.
- [5] Dedyukhina E G, Chistyakova T I, Kamzolova S V, et al. Arachidonic acid synthesis by glycerol-grown *Mortierella alpina* [J]. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2012, 114(7): 833-841.
- [6] Kerkhoff C, Sorg C, Tandon N N, et al. Interaction of S100A8/S100A9-arachidonic acid complexes with the scavenger receptor CD36 may facilitate fatty acid uptake by endothelial cells [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(1): 241-248.
- [7] Hoffman D R, Boettcher J A, Diersen-Schade D A. Toward optimizing vision and cognition in term infants by dietary docosahexaenoic and arachidonic acid supplementation: a review of randomized controlled trials [J]. *Prostag Leukotr Essent Fatty Acids*, 2009, 81(2/3): 151-158.
- [8] 全国量和单位标准化技术委员会. GB 3100~3102—1993—量和单位[S]. 北京: 中国标准出版社, 1994: 40-42.
- [9] Krumbholz R, Lembke P. Component of a skin care agent: US, 6042840 [P]. 2000-03-28.
- [10] Sato N, Yamauchi M. Covering sheet for skin and hair: EP, 1068853 [P]. 2001-01-17.
- [11] Duarte A, Castillo AF, Castilla R, et al. An arachidonic acid generation/export system involved in the regulation of cholesterol transport in mitochondria of steroidogenic cells [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(21): 4023-4028.
- [12] Wang X Q, Yao J M, Yuan C L, et al. The property and application of arachidonic acid [J]. *Plasma Sci Technol*, 2002, 4(5): 1505-1510.
- [13] Kyle D J, Reeb S E, Sicotte V J. Infant formula and baby food containing docosahexaenoic acid obtained from dinoflagellates: US 5397591 [P]. 1995-03-14.
- [14] Akimoto K, Higashiyama K, Shimizu S. Process for producing arachidonic acid-containing lipid and dihomo- γ -linolenic acid-containing lipid: EP, 1035211 [P]. 1999-08-27.
- [15] Ahern T J, Katoh S, Sada E. Arachidonic acid production by the red alga *Porphyridium cruentum* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1983, 25(4): 1057-1070.
- [16] Jin M J, Huang H, Xiao A H, et al. A novel two-step fermentation

- process for improved arachidonic acid production by *Mortierella alpina* [J]. *Biotechnol Lett* 2008, 30(6): 1087-1091.
- [17] Aki T ,Nagahata Y ,Ishihara K ,et al. Production of arachidonic acid by filamentous fungus *Mortierella alliacea* strain YN-15 [J]. *J Am Oil Chem Soc* 2001, 78(6): 599-604.
- [18] Eroshin V ,Satroutdinov A ,Dedyukhina E ,et al. Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* with growth-coupled lipid synthesis [J]. *Process Biochem* 2000, 35(10): 1171-1175.
- [19] Jin M J ,Huang H ,Xiao A H ,et al. Enhancing arachidonic acid production by *Mortierella alpina* ME-1 using improved mycelium aging technology [J]. *Bioproc Biosys Eng* ,2009, 32(1): 117-122.
- [20] Zhu M ,Yu L J ,Li W ,et al. Optimization of arachidonic acid production by fed-batch culture of *Mortierella alpina* based on dynamic analysis [J]. *Enzyme Microb Technol* ,2006, 38(6): 735-740.
- [21] Hwang B H ,Kim J W ,Park C Y ,et al. High-level production of arachidonic acid by fed-batch culture of *Mortierella alpina* using NH_4OH as a nitrogen source and pH control [J]. *Biotechnol Lett* , 2005, 27(10): 731-735.
- [22] Zhu M ,Yu L J ,Liu Z ,et al. Isolating *Mortierella alpina* strains of high yield of arachidonic acid [J]. *Lett Appl Microbiol* 2004, 39(4): 332-335.
- [23] Certik M ,Shimizu S. Kinetic analysis of oil biosynthesis by an arachidonic acid-producing fungus *Mortierella alpina* 1S-4 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000, 54(2): 224-230.
- [24] Zhu M ,Yu L J ,Wu Y X. An inexpensive medium for production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2003, 30(1): 75-79.
- [25] Shinmen Y ,Yamada H ,Shimizu S. Process for production of arachidonic acid: US 5204250 [P]. 1993-04-20.
- [26] Eroshin V ,Satroutdinov A ,Dedyukhina E G ,et al. Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* with growth-coupled lipid synthesis [J]. *Process Biochem* 2000, 35(10): 1171-1175.
- [27] Yuan C ,Wang J ,Shang Y ,et al. Production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* I₄₉-N₁₈ [J]. *Food Technol Biotech* 2002, 40(4): 311-316.
- [28] Saelao S ,Kanjana-Opas A ,Kaewsuwan S. Optimization of biomass and arachidonic acid production by *Aureispira maritima* using response surface methodology [J]. *J Am Oil Chem Soc* 2011, 88(5): 619-629.
- [29] Kendrick A ,Ratledge C. Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids [J]. *Lipids* , 1992, 27(1): 15-20.
- [30] Damude H G ,Gillies P J ,Macool D J ,et al. High arachidonic acid producing strains of *Yarrowia lipolytica*: US 7588931, B2 [P]. 2009-09-15.
- [31] Aki T ,Nagahata Y ,Ishihara K ,et al. Production of arachidonic acid by filamentous fungus *Mortierella alliacea* strain YN-15 [J]. *J Am Oil Chem Soc* 2001, 78(6): 599-604.
- [32] Shinmen Y , Shimizu S , Akimoto K , et al. Production of arachidonic acid by *Mortierella fungi*: selection of a potent producer and optimization of culture conditions for large-scale production [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* ,1989, 31: 11-16.
- [33] Šajbidor J ,Koželouhová D ,Čertík M. Influence of some metal ions on the lipid content and arachidonic acid production by *Mortierella* sp [J]. *Folia Microbiol* ,1992, 37(6): 404-406.
- [34] Kyle D J. Arachidonic acid and methods for the production and use thereof: EP ,1801226 [P]. 2011-05-18.
- [35] Peng C , Huang H , Ji X , et al. Effects of n-hexadecane concentration and a two-stage oxygen supply control strategy on arachidonic acid production by *Mortierella Alpina* ME-1 [J]. *Chem Eng Technol* 2010, 33(4): 692-697.
- [36] Huang M Y. Microprobe measurements of oxygen concentrations in mycelial pellets [J]. *Biotechnol Bioeng* ,1973, 15(6): 1193-1197.
- [37] Shu C H ,Chou P F ,Hsu I. Effects of morphology and oxygen supply on schizophyllan formation by *Schizophyllum commune* using a pellet size controlling bioreactor [J]. *J Chem Technol Biotechnol* 2005, 80(12): 1383-1388.
- [38] Rodríguez Porcel E M ,Casas López J L ,Sánchez Pérez J A ,et al. Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of *Aspergillus terreus* [J]. *Biochem Eng J* 2005, 26(2): 139-144.
- [39] Teng Y ,Xu Y ,Wang D. Changes in morphology of *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation and their effect on production of mycelium-bound lipase [J]. *Bioproc Biosyst Eng* ,2009, 32(3): 397-405.
- [40] Park E Y ,Koike Y ,Higashiyama K ,et al. Effect of nitrogen source on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina* [J]. *J Biosci Bioeng* 1999, 88(1): 61-67.
- [41] 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 [J]. *Biotechnol Bioeng* , 2000, 63(4): 442-448.
- [42] Zhou Z ,Du G ,Hua Z ,et al. Optimization of fumaric acid production by *Rhizopus delemar* based on the morphology formation [J]. *Bioresour Technol* 2011, 102(21): 9345-9349.
- [43] Feng K C ,Rou T M ,Liu B L ,et al. Effect of fungal pellet size on the high yield production of destruxin B by *Metarhizium anisopliae* [J]. *Enzyme Microb Tech* 2004, 34(1): 22-25.
- [44] Sitanggang A B ,Wu H S ,Wang S S ,et al. Effect of pellet size and stimulating factor on the glucosamine production using *Aspergillus* sp. BCRC31742 [J]. *Bioresour Technol* , 2010, 101(10): 3595-3601.
- [45] Higashiyama K ,Fujikawa S ,Park E Y ,et al. Image analysis of morphological change during arachidonic acid production by

- Mortierella alpina* 1S-4 [J]. J Biosci Bioeng ,1999 ,87(4) : 489-494.
- [46] Chung P L Y ,Trevithick J R. Biochemical and histochemical localization of invertase in *Neurospora crassa* during conidial germination and hyphal growth [J]. J Bacteriol ,1970 ,102(2) : 423-429.
- [47] Higashiyama K ,Yaguchi T ,Akimoto K ,et al. Effects of mineral addition on the growth morphology of and arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4 [J]. J Am Oil Chem Soc , 1998 ,75(12) : 1815-1819.
- [48] Koike Y ,Jie Cai H ,Higashiyama K ,et al. Effect of consumed carbon to nitrogen ratio of mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina* [J]. J Biosci Bioeng 2001 ,91(4) : 382-389.
- [49] 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 [J]. Biotechnol Bioeng , 1999 ,63(4) : 442-448.
- [50] Higashiyama K ,Fujikawa S ,Park E Y ,et al. Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi [J]. Biotechnol Bioprocess Eng 2002 ,7(5) : 252-262.
- [51] Wynn J P ,Bin Abdul Hamid A ,Ratledge C. The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi [J]. Microbiology ,1999 ,145(8) : 1911-1917.
- [52] 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 [J]. Microbiology 2007 ,153(7) : 2013-2025.
- [53] Song Y ,Wynn J P ,Li Y ,et al. A pre-genetic study of the isoforms of malic enzyme associated with lipid accumulation in *Mucor circinelloides* [J]. Microbiology 2001 ,147(6) : 1507-1515.
- [54] Zhang Y ,Ratledge C. Multiple isoforms of malic enzyme in the oleaginous fungus *Mortierella alpina* [J]. Mycol Res ,2008 ,112(6) : 725-730.
- [55] Wynn J P ,Ratledge C. Evidence that the rate-limiting step for the biosynthesis of arachidonic acid in *Mortierella alpina* is at the level of the 18:3 to 20:3 elongase [J]. Microbiology ,2000 ,146(9) : 2325-2331.
- [56] Jaworski J G ,Post-Beittenmiller M A ,Todd J. Fatty acid elongases: US ,7038112 [P]. 2006-05-02.