

生物工程

Schizochytrium sp. S31 生产 DHA 底物流加策略及呼吸特性分析

孙俊文, 丁 健, 贾禄强, 陈珊珊, 槐强强, 史仲平

(江南大学 生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 考虑到培养液内的碳源和氮源质量浓度及其比例关系对细胞生长以及油脂积累的特性有明显的影响, 采用分批补料、间歇流加方式考察底物流加策略对 *Schizochytrium* sp. S31 生产 DHA 的影响, 同时对发酵尾气 CO₂ 释放与 DHA 含量的相关性进行分析。结果表明: 通过分批培养的方式确定最佳的初始碳氮比为 7:1, 此条件下最终的 DHA 含量达到 2.66 g/L; 最佳的底物流加策略为培养 80 h 内间歇流加酵母提取物使培养液中酵母提取物质量浓度达 5 g/L, 同时将葡萄糖质量浓度控制在 30 g/L 的恒定水平, DHA 含量最终提高至 16.75 g/L; 分析呼吸特性发现, 氮源耗尽后平均 CO₂ 释放速率与 DHA 的积累量之间存在正相关性。

关键词: 裂殖壶菌; 底物流加; DHA; CO₂ 释放速率

中图分类号: TS222; Q815

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2018)02-0110-05

Substrate flow strategy for producing DHA by *Schizochytrium* sp. S31 and respiration characteristics analysis

SUN Jiaowen, DING Jian, JIA Luqiang, CHEN Shanshan,
HUAI Qiangqiang, SHI Zhongping

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology,
Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Considering that the mass concentrations of carbon and nitrogen in culture medium and their proportion had a significant effect on cell growth and oil accumulation, the effect of substrate flow strategy on production of DHA by *Schizochytrium* sp. S31 was studied using batch culture and intermittent flow method, and the correlation between CO₂ release in fermentation tail gas and the accumulation of DHA was analyzed. The results showed that the optimal initial C/N ratio was 7:1 by batch culture, and the final DHA content was 2.66 g/L under this condition. The optimal substrate flow strategy was that the yeast extract was intermittently fed in the first 80 h to make sure the mass concentration of yeast extract in culture medium reaching 5 g/L, and the glucose mass concentration was controlled at a constant level of 30 g/L, and the DHA content finally increased to 16.75 g/L. The respiration characteristics analysis results showed that there was a positive correlation between the average CO₂ release rate and the accumulation of DHA after depletion of nitrogen.

Key words: *Schizochytrium* sp. S31; substrate flow; DHA; CO₂ release rate

二十二碳六烯酸(DHA)是一种重要的 ω -3

多不饱和脂肪酸, 因对人体健康有多种益处而备受瞩目。已有研究表明 DHA 可以治疗如阿尔茨海默病的神经失调, 对心血管健康, 胎儿、婴幼儿的大脑、视网膜的发育都有显著贡献^[1]。随着在食品、保健品和医药行业中的应用增加以及水产业的快速发展, 市场对 DHA 的需求迅速增加。若单以深海鱼油

收稿日期: 2017-07-13; 修回日期: 2017-11-29

基金项目: 江南大学自主科研计划项目(JUSRP11536)

作者简介: 孙俊文(1993), 女, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程(E-mail)18051372665@163.com。

通信作者: 史仲平, 教授(E-mail)jnbioprocess@163.com。

为主要原料提取 DHA,产量和质量均无法满足市场的需求。因此,需要寻求新的方法来生产 DHA。

裂殖壶菌(*Schizochytrium* sp.),作为一种海洋真菌,具有大量合成微生物油脂的能力,是生产 DHA 的理想菌种。由于缺少有效的分子改造手段,优化培养基和培养条件是近年来提高裂殖壶菌积累 DHA 水平的主要方法。培养液中的氮源和碳源浓度是影响裂殖壶菌细胞生长和 DHA 积累水平的重要因素。比较公认的结论是氮源充足条件有利于细胞生长,氮源受限条件则促进油脂和 DHA 的积累^[2],而碳源充足是大量积累 DHA 的必要条件^[3]。除此以外,也有研究认为,发酵液中的碳氮比对细胞生长和 DHA 的积累有明显的影 响^[4]。因此,本研究首先采用分批补料的方式确定生产 DHA 的最佳初始碳氮比,并在此基础上探讨不同氮源和碳源流加条件下的 DHA 生产性能^[5]。最终,通过对发酵尾气成分的分析,阐明 CO₂ 释放量与 DHA 含量之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. S31,购自美国菌种收藏中心(ATCC),该菌株保存于甘油管(5 g/L 葡萄糖,1.0 g/L 酵母提取物和 1.0 g/L 蛋白胨,人工海水)中。

1.1.2 培养基

菌种活化平板:葡萄糖 5 g/L,酵母提取物 1 g/L,蛋白胨 1 g/L,海盐 40 g/L,琼脂 20 g/L,高温蒸汽灭菌(121 °C,20 min)。种子培养基:葡萄糖 5 g/L,酵母提取物 1 g/L,蛋白胨 1 g/L,海盐 40 g/L,pH 用氢氧化钾调节至 7.0 左右,高温蒸汽灭菌(121 °C,20 min)。发酵初始培养基:葡萄糖 100 g/L,酵母提取物按照实验设计的需求添加,(NH₄)₂SO₄ 1 g/L,K₂HPO₄ 3 g/L,Na₂SO₄ 12 g/L,MgSO₄ 5 g/L,K₂SO₄ 7 g/L,KCl 2 g/L,pH 用氢氧化钾调节至 7.0 左右,高温蒸汽灭菌(121 °C,20 min)。微量元素母液:CaCl₂ 500 mg/L,MnCl₂ 52 mg/L,ZnSO₄ 52 mg/L,CuSO₄ 8 mg/L,Na₂MoO₄ 0.16 mg/L,NiSO₄ 8 mg/L,FeSO₄ 0.1 mg/L,CoCl₂ 0.66 mg/L,维生素 B₁ 7.6 mg/L,维生素 B₁₂ 12 mg/L,C₁₈H₃₂CaN₂O₁₀ 256 mg/L,采用过滤除菌。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵培养

将保藏于 -80 °C 条件下的菌种转接于菌种活

化平板上,28 °C 培养 3 d。接种环挑取活化的菌种,接入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶,28 °C、220 r/min 摇床培养 36 h。以 10% 的接种量接 5 L 发酵罐(百仑生物科技有限公司,BLBIO-5GJ-3-H)进行培养,初始装液量 3 L。整个培养过程中,温度维持在 28 °C,添加磷酸或 NaOH 将 pH 维持在 6.8,通气量为 4 L/min,搅拌转速为 400 r/min。发酵培养过程中,按照具体的实验设计需求补加酵母提取物和葡萄糖。

1.2.2 生物量、葡萄糖质量浓度和氨基氮质量浓度的测定

取 4 mL 发酵液 10 000 r/min 离心 5 min,将上清液与菌体沉淀分离。将菌体真空冷冻干燥至恒重后称重。利用生物传感仪(SBA-40C,山东省科学院生物研究所)测定上清液中的葡萄糖质量浓度,甲醛滴定法测定氨基氮质量浓度^[6]。

1.2.3 DHA 含量测定

油脂提取和脂肪酸甲酯制备方法参照文献[3],气相色谱分析 DHA 含量选用日本岛津(Shimadzu)GC-2010,DB-WAX 色谱柱(30 m × 0.32 mm × 0.25 μm)。采用程序升温,初始温度 100 °C 保持 3 min,然后按 10 °C/min 升温至 180 °C 保持 1 min,最后按 3 °C/min 升温至 240 °C 保持 9 min;进样口温度和检测器温度均为 250 °C;进样量 1 μL。用内标法定量,内标为十九烷酸。

1.2.4 呼吸参数的测定及计算

利用尾气分析仪在线检测尾气中 CO₂ 的分压,从而计算 CO₂ 生成速率(CER),CO₂ 释放总量(ω)和平均 CO₂ 释放速率(v),参照文献[7]计算。

2 结果与讨论

2.1 不同碳氮比下的 DHA 发酵性能比较

在培养 *Schizochytrium* sp. S31 的过程中,氮源充足(低碳氮比)条件有利于细胞的快速生长^[8],限制培养液中的氮源(高碳氮比)则有利于胞内总油脂和 DHA 的积累^[9]。在 5 个批次的分批培养实验中(批次#1~#5),葡萄糖初始质量浓度均为 100 g/L(葡萄糖中有结晶水高温灭菌后会降低),初始酵母提取物质量浓度分别为 33.34、20.00、14.4、11.11 g/L 和 9.09 g/L,即碳氮比分别为 3:1、5:1、7:1、9:1 和 11:1。酵母提取物中的主要氮源形式为氨基氮,随着发酵的进行,不断取样并离线测定培养液中的氨基氮质量浓度和葡萄糖质量浓度,当二者均被耗尽时,结束发酵。批次#1~#5 的发酵性能如图 1 所示。从图 1 可以看出,当碳氮比为 3:1 时,葡萄糖和氨基氮的消耗速度缓慢,细胞生长缓慢,培养

至 64 h 时,胞内几乎没有 DHA 积累,这说明氮源质量浓度过高也会抑制 *Schizochytrium* sp. S31 细胞的生长。当碳氮比为 7:1 时,葡萄糖消耗速度最快,细胞生长速度与碳氮比为 5:1 时相当,培养结束时的

DHA 含量达到 2.66 g/L,远高于其他批次同一时间的 DHA 含量。因此,将 7:1 确定为最佳的初始碳氮比。

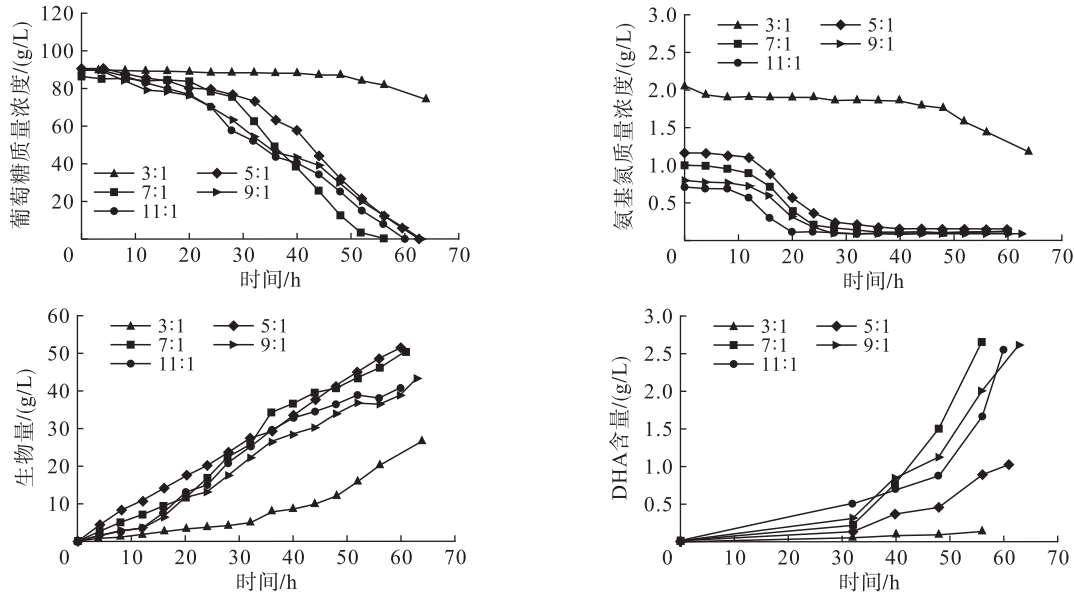


图 1 不同碳氮比、分批发酵条件下的 DHA 发酵性能

2.2 分批补料培养、底物间歇流加条件下的 DHA 发酵性能

在初始碳氮比确定为 7:1 的基础上,进一步探讨分批补料条件下的 DHA 生产性能。在批次#6 中,葡萄糖初始质量浓度为 100 g/L,以 7:1 的碳氮比起始发酵,不补加氮源,当葡萄糖耗尽后,采用间歇流加的方式补加葡萄糖^[10],发酵性能如图 2 所

示。从图 2 可以看出,发酵起始后细胞快速生长,但胞内油脂的积累量极少。培养约 35 h 后氨基氮耗尽,胞内油脂开始快速积累。随着葡萄糖的流加,发酵过程被延长直至 123 h,此时 CER 低于 5 mmol/(L·h),认为细胞的代谢活性降至极低水平,可以结束发酵,最终的生物量和 DHA 含量分别达到 86.85 g/L 和 8.876 g/L。

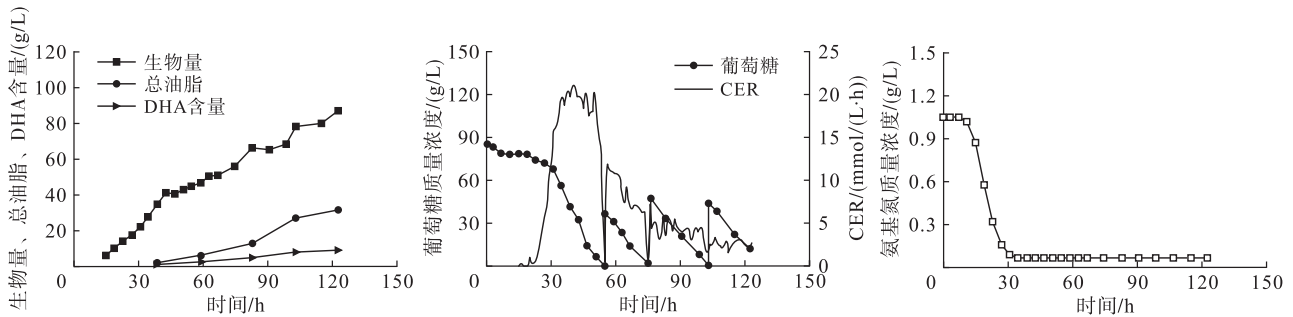


图 2 碳源间歇流加条件下的 DHA 发酵性能

进一步考察氮源流加对 DHA 积累的影响。在批次#7 中和批次#8 中,葡萄糖初始质量浓度和流加策略与批次#6 相同,不同的是当氨基氮耗尽后将多次补加氮源至一定质量浓度:批次#7 中每次将发酵液中酵母提取物质量浓度提高至 2.5 g/L;批次#8 中每次将发酵液中酵母提取物质量浓度提高至 5 g/L。培养 80 h 后,停止流加酵母提取物。批次#7 和批次#8 的发酵性能如图 3、图 4 所示。从图 3、图 4 可以看出,前 80 h 内,细胞快速增殖,但胞内的脂

肪酸积累量较少;培养 80 h 后,由于停止流加氮源,导致氮源受限,胞内的总油脂开始快速积累,这是由于氮限制可以激活胞内的甘油二酯酰基转移酶和脂肪酸酰基辅酶 A,从而生成更多的甘油三酯^[11]。在脂肪酸的合成过程中,前体物质乙酰辅酶 A 进入 PKS(聚酮合成酶)途径,主要生成 DHA,若进入 FAS 途径,则主要生成单不饱和脂肪酸以及饱和脂肪酸^[12]。因此,胞内积累的 DHA 只占总脂肪酸的一部分。发酵结束时批次#7 和批次#8 的 DHA 含量

分别达到 9.50 g/L 和 11.97 g/L, 生物量分别达到 97.21 g/L 和 110.775 g/L。可以看出, 添加氮源时将酵母提取物质量浓度提高至 5 g/L 时更有利于细胞的生长和后期 DHA 的积累。此外, 可以看出, 每

次葡萄糖质量浓度较低时, 均会出现 CER 急剧下降的现象。虽然添加葡萄糖后 CER 还能有所恢复, 但葡萄糖瞬时匮乏仍然会对细胞生长和油脂积累造成不利的影响, 这是间歇流加方式的最大弊端。

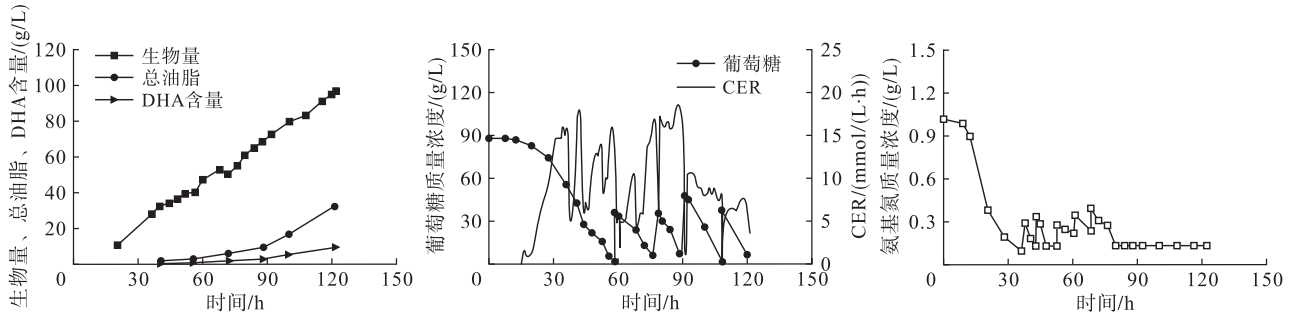


图3 碳源、氮源(2.5 g/L)间歇流加条件下的DHA发酵性能

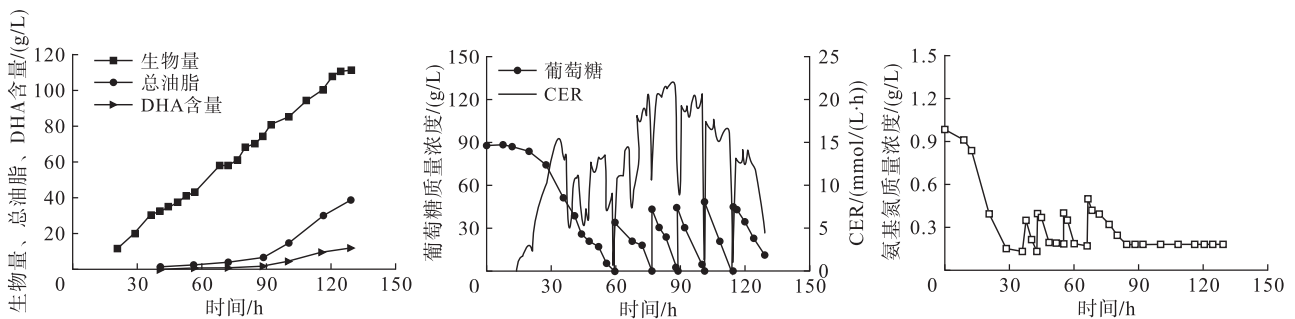


图4 碳源、氮源(5 g/L)间歇流加条件下的DHA发酵性能

2.3 碳源质量浓度恒定条件下的DHA发酵性能

在批次#9中, 初始碳氮比及氮耗尽后氮源流加操作均与批次#8相同, 不同的是葡萄糖流加方式将采用恒定葡萄糖质量浓度流加策略(根据离线测定的葡萄糖质量浓度, 人工调节葡萄糖的流加速度, 力求将发酵罐中葡萄糖质量浓度控制在较稳定的水平)。从批次#7和批次#8的结果中可以看出, 葡萄糖的控制水平不宜过低, 但如果葡萄糖质量浓度过高也不利于DHA的高产。过高的葡萄糖质量浓度会抑制细胞生长、促进细胞自身的裂解、致使饱和脂肪酸大量生成的同时抑制DHA的生成^[13]。有研究

表明, 当发酵液中葡萄糖质量浓度超过 40 g/L 时, *Schizochytrium* sp. S31 脂肪酸合成受阻, 并且会生成过量的有机酸^[14]。因此, 在批次#9中, 葡萄糖质量浓度确定为 30 g/L, 此条件下的DHA发酵性能见图5。从图5中可以看出, 稳定控制葡萄糖质量浓度的目的基本实现。充足的葡萄糖可以为DHA合成提供大量的前体物质乙酰辅酶A, 同时能够保持发酵液渗透压的稳定, 有利于细胞活性的维持。发酵结束时, 最终的生物量达到 118.25 g/L, DHA含量达到 16.75 g/L, 明显高于批次#7和批次#8的发酵水平。

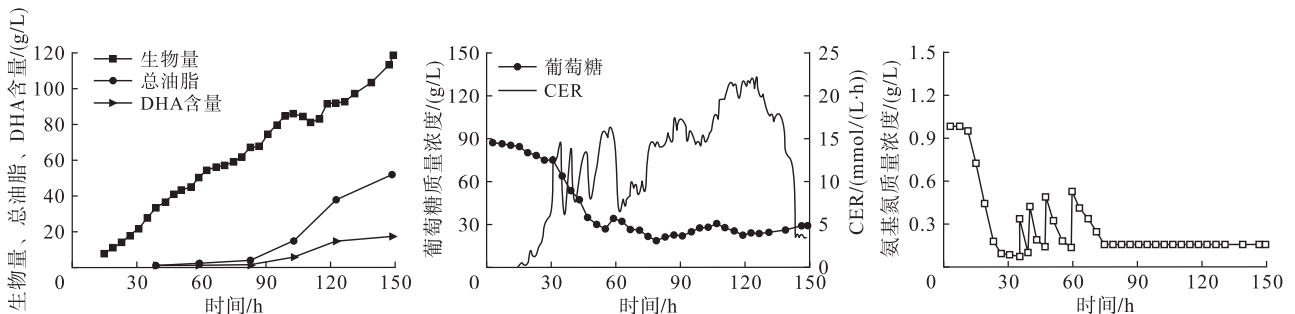


图5 葡萄糖质量浓度恒定条件下的DHA发酵性能

2.4 DHA积累与CO₂释放相关性分析

从以上研究结果中可以看出, 利用 *Schizochytrium* sp. S31 生产DHA的过程可以分为两个阶段:

①发酵前期维持发酵液中的碳源和氮源充足, 细胞快速增殖, 胞内油脂几乎无积累; ②发酵后期维持发酵液中的碳源充足和氮源受限, 胞内油脂大量积累。

在细胞生长阶段,葡萄糖主要通过糖酵解途径和 TCA 循环为细胞组成成分的合成提供前体物质和能量。在供能(生成 ATP)过程中,葡萄糖被完全氧化为 CO₂,排出胞外。在此阶段,细胞释放的 CO₂ 主要来自于葡萄糖在糖酵解途径和 TCA 循环中的完全氧化^[15]。因此,在油脂积累阶段细胞释放的 CO₂

主要来自于 PKS 途径内的脱羧反应。由此可以推测,DHA 的积累量与油脂积累阶段 CO₂ 的释放速率密切相关。在批次#1 ~ #9 中,以氨基氮完全耗尽的时间点作为两个发酵阶段的分界点。表 1 为批次 #1 ~ #9 油脂积累阶段的平均 CO₂ 释放速率以及最终的 DHA 含量。

表 1 不同批次二氧化碳释放速率分析结果

批次	油脂积累阶段/h	CO ₂ 释放总量/(mmol/L)	平均 CO ₂ 释放速率/(mmol/(L·h))	DHA 含量/(g/L)
#1	-	-	-	0.38
#2	25	164	6.560	1.02
#3	32	367	11.469	2.66
#4	37	377	10.200	2.62
#5	41	382	9.317	2.55
#6	88	712	8.091	8.87
#7	46	445	9.674	9.50
#8	49	743	15.163	11.96
#9	70	1375	19.643	16.75

从表 1 可以看出,油脂积累阶段的 CO₂ 释放速率与 DHA 积累量呈现正相关性,平均 CO₂ 释放速率越高的批次其最终的 DHA 含量越高,平均 CO₂ 释放速率越低的批次其最终的 DHA 含量越低。

3 结 论

本实验首先通过上罐培养研究了裂殖壶菌分批发酵中最适碳氮比,其最适碳氮比为 7:1。然后通过分批实验表明前期发酵过程中间歇流加 5 g/L 的氮源、后期恒定碳源质量浓度在 30 g/L 更有利于菌体生长和 DHA 合成,生物量可达到 118.25 g/L、DHA 含量为 16.75 g/L。通过对裂殖壶菌产 DHA 发酵过程的呼吸参数进行分析可知脱羧反应释放的 CO₂ 越多,不饱和脂肪酸合成的越多。分析呼吸特性后发现,氮源耗尽后平均 CO₂ 释放速率与 DHA 的积累量之间存在正相关性。

参考文献:

[1] 王申强. 裂殖壶菌产 DHA 的发酵工艺研究及高产菌株选育[D]. 江苏 无锡:江南大学, 2013.
 [2] 王灿. 高产 DHA 的裂殖壶菌高密度培养发酵工艺的研究[D]. 福州:福建师范大学, 2015.
 [3] LING X, GUO J, LIU X, et al. Impact of carbon and nitrogen feeding strategy on high production of biomass and docosahexaenoic acid (DHA) by *Schizochytrium* sp. LU310[J]. *Bioresour Technol*, 2015, 184: 139-147.
 [4] RATLEDGE C, WYNN J P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms[J]. *Adv Appl Microbiol*, 2002, 51: 1-51.
 [5] 王澍, 吕小义, 张静雯, 等. 不同碳氮源浓度和培养温度对裂殖壶菌产 DHA 的影响[J]. *中国油脂*, 2015, 40

(10): 74-77.

[6] SPENCER J F T, SPENCER A L D R. *Food microbiology protocols*[M]. Clifton: Humana Press, 2001.
 [7] 史仲平, 潘丰. 发酵过程解析、控制与检测技术[M]. 2 版. 北京:化学工业出版社, 2010.
 [8] 黎丽, 窦光鹏, 霍文严, 等. 裂殖壶菌发酵产 DHA 油脂的生产工艺优化[J]. *中国油脂*, 2015, 40(6): 77-81.
 [9] HUANG T Y, LU W C, CHU I M. A fermentation strategy for producing docosahexaenoic acid in *Aurantiochytrium limacinum* SR21 and increasing C22:6 proportions in total fatty acid[J]. *Bioresour Technol*, 2012, 123: 8-14.
 [10] 赵书林, 蔡双山, 夏木阳, 等. 裂殖壶菌补糖发酵研究[J]. *中国油脂*, 2017, 42(2): 113-115.
 [11] HSIEH C H, WU W T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation[J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100(17): 3921-3926.
 [12] METZ J G, ROESSLER P, FACCIOTTI D, et al. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes[J]. *Science*, 2001, 293: 290-293.
 [13] REN L J, FENG Y, LI J, et al. Impact of phosphate concentration on docosahexaenoic acid production and related enzyme activities in fermentation of *Schizochytrium* sp. [J]. *Bioproc Biosyst Eng*, 2013, 36(9): 1177-1183.
 [14] WU S T, YU S T, LIN L P. Effect of culture conditions on docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. S31[J]. *Process Biochem*, 2005, 40(9): 3103-3108.
 [15] GUO D S, JI X J, REN L J, et al. Development of a real-time bioprocess monitoring method for docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. [J]. *Bioresour Technol*, 2016, 216: 422-427.