

# 高产 DHA 裂壶藻突变株发酵条件的优化

丁云朋<sup>1</sup>, 吕小义<sup>1</sup>, 李恒彬<sup>1</sup>, 杨永<sup>2,3</sup>, 张寒<sup>1</sup>, 胡博<sup>1</sup>,  
高盼<sup>1,3,4</sup>, 胡传荣<sup>1,3</sup>, 何东平<sup>1,3,4</sup>, 钟武<sup>1,3,4</sup>

(1. 武汉轻工大学 食品科学与工程学院, 武汉 430023; 2. 武汉食品化妆品检验所, 武汉 430012;  
3. 国家市场监督管理总局重点实验室(食用油质量与安全), 武汉 430023;  
4. 大宗粮油精深加工教育部重点实验室, 武汉 430023)

**摘要:** 为了进一步提高裂壶藻突变株的 DHA 产量, 以经过<sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线辐照诱变后所得高产 DHA 裂壶藻突变株 1.6-7-1 为研究对象, 通过 Plackett-Burman 实验、最陡爬坡实验和响应面实验对其发酵培养基进行优化, 同时通过发酵罐发酵培养研究不同溶氧水平对突变株代谢的影响。结果表明: 葡萄糖、C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NNaO<sub>4</sub> 和 NaCl 添加量对该突变株产 DHA 具有显著影响, 其最佳添加量分别为葡萄糖 125.46 g/L、C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NNaO<sub>4</sub> 12.44 g/L、NaCl 4 g/L, 在此条件下该突变株 DHA 产量达 6.01 g/L, 相较于原始菌株提升了 49.88%; 在高溶氧水平下, 突变株生物量高但油脂产量和 DHA 产量较低, 可能是因为细胞优先用营养物质进行自身的生长繁殖, 而过低的溶氧水平会抑制能量代谢, 减慢细胞繁殖速度。综上, 优化发酵条件可以提高突变株 DHA 产量。

**关键词:** DHA; 裂壶藻; 突变株; 发酵条件优化

中图分类号: TS222; TQ92

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2023)12-0128-06

## Optimization of fermentation conditions of

### *Schizochytrium* sp. mutant with high DHA yield

DING Yunpeng<sup>1</sup>, LYU Xiaoyi<sup>1</sup>, LI Hengbin<sup>1</sup>, YANG Yong<sup>2,3</sup>, ZHANG Han<sup>1</sup>,  
HU Bo<sup>1</sup>, GAO Pan<sup>1,3,4</sup>, HU Chuanrong<sup>1,3</sup>, HE Dongping<sup>1,3,4</sup>, ZHONG Wu<sup>1,3,4</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;  
2. Wuhan Institute for Food and Cosmetic Control, Wuhan 430012, China; 3. Key Laboratory of Edible Oil Quality and Safety for State Market Regulation, Wuhan 430023, China;  
4. Key Laboratory for Deep Processing of Major Grain and Oil of Ministry of Education in China, Wuhan 430023, China)

**Abstract:** In order to further increase the DHA yield of *Schizochytrium* sp. mutant, the *Schizochytrium* sp. mutant 1.6-7-1 with high yield DHA obtained by <sup>60</sup>Co- $\gamma$  radiation mutagenesis was used as research object, and the fermentation medium of DHA production by the *Schizochytrium* sp. mutant was further optimized by Plackett-Burman experiment, steepest ascent experiment and response surface methodology. In addition, the effects of different dissolved oxygen levels on the metabolism of the mutant strain were investigated through fermentation cultivation in fermentation tank. The results showed that the dosages of glucose, sodium glutamate and NaCl had significant effects on the DHA production of the mutant strain, and their optimum dosages were glucose 125.46 g/L, sodium glutamate 12.44 g/L and

NaCl 4 g/L. Under the optimum conditions, the DHA production could reach 6.01 g/L, which increased by 49.88% compared with the original strain. Under high dissolved oxygen conditions, the mutant strain exhibited higher biomass accumulation but lower oil and DHA production,

收稿日期: 2022-07-01; 修回日期: 2023-09-14

基金项目: 2023 武汉轻工大学校立科研项目(01500001)

作者简介: 丁云朋(1999), 男, 硕士研究生, 研究方向为油脂及植物蛋白工程(E-mail) dyp99112@163.com.

通信作者: 钟武, 讲师(E-mail) zhongwu@whpu.edu.cn.

which possibly caused by the preferential use of nutrients for the own growth and reproduction of cells. Conversely, low dissolved oxygen inhibited energy metabolism and slowed down cell proliferation. Therefore, optimizing fermentation conditions can increase the DHA yield of the mutant strain.

**Key words:** DHA; *Schizochytrium* sp.; mutant strain; optimization of fermentation conditions

二十二碳六烯酸(DHA)是一种含有22个碳原子和6个双键的直链脂肪酸。DHA有利于脑和神经的健康发育,被称为“脑黄金”,其作为视网膜的组成成分之一,还可进一步提高视网膜的反射性,受到广大消费者的青睐<sup>[1-4]</sup>。Hussein等<sup>[5]</sup>指出,人体所需DHA仅有0.3%来自 $\alpha$ -亚麻酸的转化,因此需要通过膳食补充。

目前,市场上主要的DHA来源为磷虾油以及深海鱼油,其作为DHA的传统来源,可持续性较差,容易受到品种及捕捞季节的影响,导致DHA供应量很难满足全球日益增长的营养需求<sup>[6]</sup>。因此,开发新的安全性高且成本较低的DHA来源成为全球相关研究者的研究方向。1990年至今,科研人员已经做了诸多关于微生物生产DHA的研究,并取得了一定的成果,如郭姝等<sup>[7]</sup>通过控制营养组成和发酵条件利用裂壶藻、寇氏隐甲藻等真菌生产富含DHA的油脂。利用微生物生产DHA不仅周期短,产量大,而且基本不受外部环境变化的影响,近年来得到大力推广。

裂壶藻是一种来自沿海海域的真核生物,其在海洋、盐水湖和红树林地区分布广泛。裂壶藻拥有比吾肯氏壶藻和寇氏隐甲藻更高的DHA积累量和更快的生长繁殖速度,因此被视为工业化生产DHA的最佳选择<sup>[8]</sup>。Nakahara等<sup>[9]</sup>于1996年分离出了一株菌株,该菌株几乎是同时代DHA产量和生产率最高的菌株,被命名为*Schizochytrium* sp. SR21。张梦娣等<sup>[10]</sup>以裂殖壶菌B4D1作为原始菌株,经过紫外线辐照,得到了DHA和EPA产量分别提高了11.70%和46.88%的突变株,且该突变株具有较好的遗传稳定性。

本研究在通过诱变育种获得高产DHA裂壶藻突变株的基础上,通过实验设计和数据处理对发酵培养基进行优化,并探究不同溶氧水平对突变株代谢的影响,为工业化生产裂壶藻DHA提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

裂壶藻 ATCC20888 (*Schizochytrium* sp.), 购自广东微生物菌种保藏中心, 经过<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线诱变

获得突变株 1.6-7-1, 保存于武汉轻工大学食品科学与工程学院。

葡萄糖、乙醇、钨酸、环氧树脂、戊二醛、SrCl<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O、C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NNaO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、MnCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>, 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 石油醚、乙醚、正己烷、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NaHCO<sub>3</sub>、CaCl<sub>2</sub>, 天津市广成化学试剂有限公司; 氯化锌、KOH、BF<sub>3</sub>、氯化铁、CH<sub>3</sub>OH, 天津市天力化学试剂有限公司; 酵母膏, 北京奥博星生物技术有限公司; 纤维素酶(50 U/mg)、碱性蛋白酶(200 U/mg)、CoCl<sub>2</sub>、KCl, 上海麦克林生化科技有限公司。

固体培养基: 配方为维生素混合液 2.5 g/L、葡萄糖 50.0 g/L、NaCl 8.0 g/L、酵母膏 6.0 g/L、MgSO<sub>4</sub> 6.0 g/L、C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NNaO<sub>4</sub> 30.0 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 g/L、琼脂 20.0 g/L、金属离子混合液 2.0 mL/L, 121 °C 高温灭菌 20 min, 冷却后使用。

液体培养基: 配方为维生素混合液 2.5 g/L、葡萄糖 85.0 g/L、NaCl 20.0 g/L、酵母膏 6.0 g/L、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 g/L、MgSO<sub>4</sub> 22.0 g/L、C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NNaO<sub>4</sub> 60.0 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.0 g/L、金属离子混合液 2.0 mL/L, 121 °C 高温灭菌 20 min, 冷却后使用。

发酵培养基: 配方为葡萄糖 75.0 g/L、金属离子混合液 2.8 mL、NaCl 2.4 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.8 g/L、C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NNaO<sub>4</sub> 15.0 g/L、MgSO<sub>4</sub> 6.0 g/L、酵母膏 6.0 g/L、维生素混合液 2.0 g/L, 121 °C 高温灭菌 20 min, 冷却后使用。

VWD-0.15/7 箱式静音全无油空压机, 鞍山佳诚空压机有限公司; TDL-5A 台式低速离心机, 杭州川一实验仪器有限公司; Agilent 7890A 气相色谱仪, 安捷伦科技(中国)有限公司; GRJ-50B 型发酵罐(50 L), 镇江格瑞生物工程有限公司; SF1M 储气罐, 青岛双峰压力容器有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 菌种活化

参照文献[11]的方法进行菌种活化。将突变株单菌落接种至装有50 mL液体培养基的250 mL锥形瓶中, 在26 °C避光静置培养48~72 h。然后取适量菌液于固体平板划线, 在26 °C下避光倒置培养48 h。重复以上操作3次, 得到高活性的突变株单菌落。

### 1.2.2 菌种液体培养

挑取高活性的突变株单菌落接种于装有 50 mL 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,在 26 °C、180 r/min 下避光培养 48 h,得到突变株菌液。

### 1.2.3 摇瓶发酵培养

将突变株菌液与发酵培养基按体积比 1:9 混合,取 100 mL 混合液于 500 mL 锥形瓶中在 26 °C、180 r/min 下避光培养 5 d。

### 1.2.4 发酵罐发酵培养时溶氧水平对突变株代谢的影响

在 500 mL 摇瓶中加入 100 mL 液体培养基,接入菌种于培养箱中 26 °C、180 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 为 2.4,随后取 1 mL 菌液接种至 50 L 发酵罐中。将发酵罐的装液量设定为 30 L,在 26 °C、pH 为 6.5 的条件下,分别设定 20%、40%、60%、80% 4 个溶氧水平(Dissolved oxygen level, DO),发酵 6 d,通过突变株的 DHA 产量、生物量和油脂产量来确定溶氧水平对该突变株代谢的影响。

### 1.2.5 生物量的测定

生物量以单位体积发酵液中突变株细胞的干质量表示。在离心管中加入一定量的发酵液后离心(4 000 r/min, 5 min),得到的细胞沉淀用无菌水重复洗涤 3 次,最后将细胞沉淀干燥至恒重,按公式(1)计算生物量。

$$A = m/V \quad (1)$$

式中:A 为生物量,g/L;m 为细胞沉淀质量,g;V 为发酵液体积,L。

### 1.2.6 油脂产量的测定

取一定体积发酵液,按 1.2.5 方法离心洗涤后得到细胞沉淀,将其与水以体积比 1:1 混合,依次加入 0.025% 的纤维素酶和 0.5% 的碱性蛋白酶,在 60 °C 下反应 6 h。反应完成后干燥至恒重,将细胞沉淀研磨成粉,使用乙醚作为提取剂,采用索氏提取法将样品抽提至无色,利用旋转蒸发器旋蒸抽提液中残留的乙醚,得到油脂,放入烘箱中干燥至恒重。油脂产量及含油率的计算公式如下。

$$P = D/V \quad (2)$$

$$O = P/A \times 100\% \quad (3)$$

式中:P 为油脂产量,g/L;D 为油脂质量,g;O 为含油率。

### 1.2.7 DHA 含量的测定

精确称取 0.1 g 油脂与 2 mL 0.5 mol/L KOH - CH<sub>3</sub>OH 溶液,在 60 °C 水浴反应 20 min 直至油脂完全溶解,然后冷却至室温;再与 2 mL 25% 的 BF<sub>3</sub> -

CH<sub>3</sub>OH 溶液于 60 °C 水浴反应 30 min,随后冷却至室温;加入 2 mL 正己烷和少量的无水硫酸钠,摇匀,静置直到溶液分层,取上层液体用于气相色谱分析。

气相色谱条件:Agilent SP - 2560 (100 m × 25 μm × 0.2 μm);升温程序为初始温度 100 °C,保持 4 min,然后以 3 °C/min 的速度升温至 230 °C,保持 20 min;载气为 N<sub>2</sub>,流速 25 mL/min,压力 2.4 kPa;进样量 1 μL;分流比 15:1。

按下式计算 DHA 产量。

$$H = P \times B \quad (4)$$

式中:H 为 DHA 产量,g/L;B 为 DHA 含量。

### 1.2.8 数据分析

采用 Excel 2019 和 Design 8.0.6 对数据进行整理、分析和绘图,使用 SPSS 17.0 软件对数据进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 裂壶藻原始菌株与突变株产 DHA 能力对比

以原始菌株裂壶藻 ATCC20888 为对照,按 1.2.1、1.2.2、1.2.3 方法进行菌种活化、液体培养和发酵培养后,测定裂壶藻原始菌株与突变株产 DHA 能力,结果如表 1 所示。

表 1 裂壶藻原始菌株与突变株产 DHA 能力

菌株	生物量/ (g/L)	含油率/ %	油脂产量/ (g/L)	DHA 含量/ %	DHA 产量/ (g/L)
原始菌株	42.25	28.03	11.84	33.88	4.01
突变株	47.37	31.41	14.88	37.97	5.65

由表 1 可知,突变株的生物量、含油率和 DHA 产量均高于原始菌株。其中突变株的生物量、含油率和 DHA 含量分别比原始菌株高 12.12%、12.06% 和 12.07%,油脂产量和 DHA 产量则分别比原始菌株高 25.68% 和 40.90%。李慧玲等<sup>[12]</sup>通过紫外线、硫酸二乙酯复合诱变并利用丙二酸、碘乙酸复合平板筛选出突变株 XN001,其 DHA 产量为 5.55 g/L。许永<sup>[13]</sup>采用紫外诱变和喹禾灵筛选出菌株 OUC007,其 DHA 产量为 1.2 g/L。龚定芳<sup>[14]</sup>利用 ARTP 诱变结合丙二酸筛选出突变株 NA2,其经过稳定传代后 DHA 产量为 6.10 g/L。本研究通过诱变方法筛选得到的突变株具有较高的产 DHA 能力,经过发酵条件优化有望进一步提高其产 DHA 的能力。

### 2.2 发酵培养基优化

采用 Plackett - Burman (PB) 实验设计,从所有发酵培养基的组成成分添加量中选取高(1)、低(-1)两个水平,添加 3 个虚拟因素作为空白因素

误差,最后以 DHA 产量( $Y$ )为目标值,使用 Design Expert 8.0 软件中的 PB 功能对所得实验数据进行计算,得到各个因素的显著性,排除对目标值无显著

影响的因素。PB 实验因素与水平如表 2 所示。PB 实验设计及结果如表 3 所示。

表 2 PB 实验因素与水平

因素	水平		因素	水平	
	低(-1)	高(1)		低(-1)	高(1)
$\text{KH}_2\text{PO}_4(X_1)/(\text{g/L})$	4.8	7.2	维生素混合液( $X_5$ )/(g/L)	2.0	3.0
$\text{NaCl}(X_2)/(\text{g/L})$	2.4	3.6	$\text{C}_5\text{H}_8\text{NNaO}_4(X_6)/(\text{g/L})$	15.0	22.5
$\text{MgSO}_4(X_3)/(\text{g/L})$	6.0	9.0	酵母膏( $X_7$ )/(g/L)	6.0	9.0
金属离子混合液( $X_4$ )/(mL/L)	2.8	4.2	葡萄糖( $X_8$ )/(g/L)	75.0	120.0

表 3 PB 实验设计及结果

实验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	$X_8$	DHA 产量/(g/L)
1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	5.31
2	1	-1	1	1	-1	1	1	1	4.97
3	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	5.02
4	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	5.21
5	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	5.42
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	5.38
7	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	5.08
8	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	5.33
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	5.17
10	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1	4.87
11	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	5.38
12	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	4.94

由表 3 中数据计算可得一阶回归模型: $Y=5.173 3+0.025 0X_1+0.048 3X_2-0.026 7X_3-0.001 7X_4+0.040 0X_5-0.158 3X_6+0.003 3X_7+0.058 3X_8$ 。PB 实验方差分析如表 4 所示。

表 4 PB 实验方差分析

因素	自由度	平方和	均方	$F$	$p$
模型	8	0.405 1	0.050 6	26.34	0.011 *
$X_1$	1	0.007 5	0.007 5	3.90	0.143
$X_2$	1	0.028 0	0.028 0	14.58	0.032 *
$X_3$	1	0.008 5	0.008 5	4.44	0.126
$X_4$	1	0.019 2	0.019 2	0.02	0.904
$X_5$	1	0.000 0	0.000 0	9.99	0.051
$X_6$	1	0.300 8	0.300 8	156.50	0.001 **
$X_7$	1	0.000 1	0.000 1	0.07	0.809
$X_8$	1	0.040 8	0.040 8	21.24	0.019 *

注: \* 表示差异显著( $p < 0.05$ ), \*\* 表示差异极显著( $p < 0.01$ )。下同

由表 4 可知,该模型在 95% 概率水平下显著。另外模型的决定系数( $R^2$ )为 0.986 0,表明 98.60% 的因变量变化可以由该回归模型解释,可信度较高。所有因素中  $X_2$ 、 $X_8$  对 DHA 产量有显著影响( $p < 0.05$ ), $X_6$  对 DHA 产量有极显著影响( $p < 0.01$ ),其

他因素对 DHA 产量无显著影响。由回归模型的因素系数可知: $X_8$ 、 $X_2$  为正相关因素,在接下来的最陡爬坡实验中应提高两者的添加量; $X_6$  为负相关因素,后续实验中应降低其添加量。

### 2.3 最陡爬坡实验和响应面实验

由 PB 实验结果可知,DHA 的产量变化和  $X_2$ 、 $X_6$  及  $X_8$  的添加量之间有显著关系,由此使用 Design Expert 8.0 软件设计最陡爬坡实验,实验设计及结果如表 5 所示。

表 5 最陡爬坡实验设计及结果

实验号	$X_2$ /(g/L)	$X_6$ /(g/L)	$X_8$ /(g/L)	DHA 产量/(g/L)
1	3.0	18.75	100	5.08
2	3.2	17.50	105	5.23
3	3.4	16.25	110	5.40
4	3.6	15.00	115	5.55
5	3.8	13.75	120	5.61
6	4.0	12.50	125	5.88
7	4.2	11.25	130	5.76

由表 5 可以看出,第 6 组实验得到的 DHA 产量最高,为 5.88 g/L。因此,以该组所对应的 3 个培养

基组成成分的添加量为 0 水平,以 DHA 产量为响应值,使用 Design Expert 8.0 软件设计三因素五水平的响应面实验,响应面实验因素水平如表 6 所示,响应面实验设计及结果如表 7 所示。

表 6 响应面实验因素水平

水平	$X_2/(g/L)$	$X_6/(g/L)$	$X_8/(g/L)$
-1.682	3.663	10.397	116.590
-1	3.8	11.3	120.0
0	4.0	12.5	125.0
1	4.2	13.8	130.0
1.682	4.336	14.603	133.410

表 7 响应面实验设计及结果

实验号	$X_2$	$X_6$	$X_8$	DHA 产量/(g/L)
1	0	0	0	5.89
2	0	-1.682	0	5.62
3	-1	1	1	5.71
4	1	-1	1	5.68
5	-1.682	0	0	5.60
6	-1	-1	1	5.71
7	-1	-1	-1	5.66
8	1	1	-1	5.65
9	0	1.682	0	5.61
10	0	0	1.682	5.62
11	1	-1	-1	5.70
12	-1	1	-1	5.55
13	0	0	0	6.11
14	0	0	0	5.89
15	0	0	0	5.97
16	0	0	-1.682	5.57
17	1.682	0	0	5.53
18	1	1	1	5.68
19	0	0	0	6.06
20	0	0	0	6.03

使用 Design Expert 8.0 对表 7 数据进行拟合,得到二次多元回归模型: $Y = 5.98843 - 0.00276X_2 - 0.01295X_6 + 0.02227X_8 + 0.00750X_2X_6 - 0.02500X_2X_8 - 0.12973X_2^2 - 0.11205X_6^2 - 0.11912X_8^2$ 。

回归模型的方差分析如表 8 所示。

由表 8 可知,该模型  $p$  小于 0.01,说明此模型极显著。 $X_2$ 、 $X_6$  及  $X_8$  的一次项和因素之间的交互作用对 DHA 产量均无显著影响,但各因素的二次项对 DHA 产量均有极显著影响。该模型的决定系数为 87.37%,表明 87.37% 的因变量变化可以由

该回归模型解释,拟合度良好,该模型分析预测的突变株发酵培养基优化的实验结果值得信赖。该模型方差失拟项不显著,因此不必对该二次回归模型精选调整<sup>[15]</sup>。

表 8 回归模型的方差分析

来源	自由度	平方和	均方	$F$	$p$
模型	9	0.5427	0.0603	7.69	0.002*
$X_2$	1	0.0001	0.0001	0.01	0.910
$X_6$	1	0.0023	0.0023	0.29	0.601
$X_8$	1	0.0068	0.0068	0.86	0.375
$X_2X_6$	1	0.0005	0.0005	0.06	0.815
$X_2X_8$	1	0.0050	0.0050	0.64	0.443
$X_6X_8$	1	0.0032	0.0032	0.41	0.537
$X_2^2$	1	0.2425	0.2425	30.95	0.000**
$X_6^2$	1	0.1809	0.1809	23.09	0.001**
$X_8^2$	1	0.2045	0.2045	26.09	0.000**
残差	10	0.0783	0.0078		
失拟项	5	0.0370	0.0074	0.90	0.545
纯误差	5	0.0413	0.0083		
总和	19				

通过 Excel 的规划求解,对所得的二次回归模型进行最佳条件预测,规划求解的结果为  $X_2 = -0.021$ ,  $X_6 = -0.051$ ,  $X_8 = 0.092$ ,最大响应值为 5.99,即 NaCl 添加量 4 g/L,  $C_5H_8NNaO_4$  添加量 12.44 g/L,葡萄糖添加量 125.46 g/L 时,DHA 产量最大,为 5.99 g/L。在最佳条件下进行 3 次摇瓶发酵实验,最终得到的 DHA 平均产量为 6.01 g/L,与理论计算结果非常接近,表明二次多元回归模型拟合情况良好。最佳条件下突变株的 DHA 产量比原始菌株裂壶藻的 DHA 产量提高了 49.88%。

### 2.3 发酵罐发酵培养时溶氧水平对突变株代谢的影响

裂壶藻是一种需氧真核生物,氧气含量会极大程度影响发酵过程中细胞生长繁殖速度和代谢速率。按 1.2.4 方法采用优化的发酵培养基对突变株进行发酵培养,考察溶氧水平(20%、40%、60%、80%)对发酵过程的影响,结果如图 1 所示。由图 1 可以看出,突变株在溶氧水平为 80% 下培养 6 d 时,其生物量稳定在 45.5 g/L 左右,比溶氧水平为 20% 时高了 14.3 g/L。此外,溶氧水平为 80% 和 60% 时,突变株生物量在 1~4 d 时的增长速率明显比溶氧水平为 20% 和 40% 时的要大,但溶氧水平为 80% 时的最终油脂产量和 DHA 产量却远低于溶氧水平为 40% 和 60% 时的,这可能是因为突变株在氧气充足的情况下会将大量的营养物质用于自身生长繁殖,而不是用于产生油脂和 DHA,因此一旦停止

了营养物质的供应,或者是未能及时补充营养物质,都会极大程度地降低油脂和 DHA 产量。其次,溶氧水平过低也会对生物量、油脂产量和 DHA 产量造成

影响,这是因为低溶氧水平会影响三羧酸循环,导致葡萄糖氧化生成三磷酸腺苷(ATP)的过程受到抑制,最终使细胞因能量代谢不足而减慢繁殖的速度<sup>[16]</sup>。

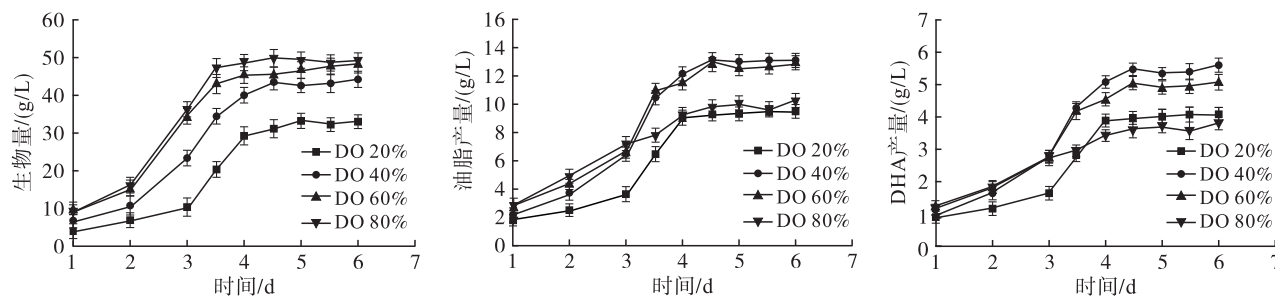


图1 溶氧水平对发酵过程的影响

### 3 结论

本研究通过 PB 实验、最陡爬坡实验和响应面实验优化发酵培养基配方,并通过发酵罐发酵培养研究了溶氧水平对裂壶藻突变株代谢的影响。确定了发酵培养基中显著影响 DHA 产量的 3 个组成成分的添加量,即  $C_5H_8NNaO_4$  12.44 g/L、NaCl 4 g/L、葡萄糖 125.46 g/L,在此条件下 DHA 产量达到 6.01 g/L。溶氧水平实验结果表明,低溶氧水平更有利于胞内合成 DHA,高溶氧水平量则有利于细胞生长繁殖。本研究表明,优化发酵条件可以提高突变株 DHA 产量。

### 参考文献:

- [1] ROHMAN F S, ROSLAN M F, MUHAMMAD D, et al. Multi-objective optimal control of docosahexaenoic acid (DHA) production in fed-batch fermentation by *Schizochytrium* sp. [J/OL]. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2022, 45: 102490 [2022-07-01]. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102490>.
- [2] BAO Z D, ZHU Y M, FENG Y M, et al. Enhancement of lipid accumulation and docosahexaenoic acid synthesis in *Schizochytrium* sp. H016 by exogenous supplementation of sesamol [J/OL]. *Bioresour Technol*, 2022, 345: 126527 [2022-07-01]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126527>.
- [3] CHI G X, XU Y Y, CAO X Y, et al. Production of polyunsaturated fatty acids by *Schizochytrium* (*Aurantiocytrium*) spp. [J/OL]. *Biotechnol Adv*, 2022, 55: 107897 [2022-07-01]. <https://doi.org/10.1016/j.biotechav.2021.107897>.
- [4] CHANG M, ZHANG, GUO X, et al. Optimization of cultivation conditions for efficient production of carotenoid-rich DHA oil by *Schizochytrium* sp. S31 [J]. *Process Biochem*, 2020, 94: 190-197.
- [5] HUSSEIN N, AH-SING E, WILKINSON P, et al. Long-chain conversion of [ $^{13}C$ ] linoleic acid and  $\alpha$ -linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men [J]. *J Lipid Res*, 2005, 46(2): 269-280.
- [6] LIU L, BAI M H, ZHANG S, et al. ARTP mutagenesis of *Schizochytrium* sp. PKU # Mn4 and clethodim-based mutant screening for enhanced docosahexaenoic acid accumulation [J/OL]. *Mar Drugs*, 2021, 19(10): 564 [2022-07-01]. <https://doi.org/10.3390/md19100564>.
- [7] 郭姝,何万领,李晓丽.裂殖壶菌产脂肪酸和二十二碳六烯酸的研究进展[J]. *养殖与饲料*, 2021, 20(10): 72-75.
- [8] 魏萍,马小琛,任路静,等.裂殖壶菌发酵生产 DHA 研究进展[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(10): 398-401, 404.
- [9] NAKAHARA T, YOKOCHI T, HIGASHIHARA T, et al. Production of docosahexaenoic and docosapentaenoic acids by *Schizochytrium* sp. isolated from Yap Islands [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1996, 73(11): 1421-1426.
- [10] 张梦娣,赫荣琳,张东远,等.紫外诱变筛选高产 EPA 和 DHA 的裂殖壶菌 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(Z3): 3055-3059.
- [11] ZHANG L, ZHAO H, LAI Y, et al. Improving docosahexaenoic acid productivity of *Schizochytrium* sp. by a two-stage AEMR/shake mixed culture mode [J]. *Bioresour Technol*, 2013, 142: 719-722.
- [12] 李慧玲,刘永梅.诱变选育高产 DHA 裂殖壶菌突变株 [J]. *食品科技*, 2015, 40(9): 12-16.
- [13] 许永.海洋真菌裂殖壶菌诱变筛选及不同生态条件对突变菌株生长和 DHA 含量的影响 [D]. 山东青岛:中国海洋大学, 2012.
- [14] 龚定芳.高产 DHA 裂殖壶菌的诱变选育及转录组分析 [D]. 江苏无锡:江南大学, 2019.
- [15] 吕小义.高产 DHA 裂殖壶菌突变株的选育与发酵工艺研究 [D]. 武汉:武汉轻工大学, 2016.
- [16] ZENG L, BI Y Q, GUO P F, et al. Metabolic analysis of *Schizochytrium* mutants with high DHA content achieved with ARTP mutagenesis combined with iodoacetic acid and dehydroepiandrosterone screening [J/OL]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 738052 [2022-07-01]. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.738052>.