

亚铁离子和吡啶丁酸促进裂殖壶菌产 DHA 及发酵验证

李亚妃^{1,2}, 赵 犇^{1,2}, Martha Daniel Mbifile^{1,2}, 杨海麟^{1,2}, 王 武^{*1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业微生物教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为提高裂殖壶菌产 DHA 的生产强度, 筛选比较出对裂殖壶菌生长和产油有显著影响的促进因子, 发现 Fe^{2+} 对 *Schizochytrium* sp. AB-610 生长有显著的促进作用, 吡啶丁酸 (IBA) 对裂殖壶菌生长和产油有双重促进作用。在此基础上进行了两因素 (Fe^{2+} 和 IBA)、三水平响应面实验, 通过响应模型得到最优添加方案。在摇瓶发酵中得到验证后, 继而在 NBS 7.5 L 发酵罐内测定对照组 *Schizochytrium* sp. AB-610 的发酵特性曲线, 依据其发酵规律, 将发酵周期分为菌体适应期、快速生长期、油脂快速积累期、油脂返耗期。测定了 Fe^{2+} 和 IBA 对 7.5 L 发酵罐中裂殖壶菌培养和发酵的特征曲线, 并与对照组进行多参数对比, 发现添加双促进因子可加大快速生长期的细胞生长速率, 延长生物量增长的时间, 生物量和 DHA 产量皆得到提高。最终使 *Schizochytrium* sp. 的 DHA 生产强度提高了 51.22%。

关键词: *Schizochytrium* sp.; 二十二碳六烯酸 (DHA); 发酵; 亚铁离子; 吡啶丁酸; 响应面

中图分类号: Q 815 文章编号: 1673-1689(2019)11-0100-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.11.014

Enhancing DHA Production by Supply FeSO_4 and IBA to the Fermentation of *Schizochytrium* sp.

LI Yafei^{1,2}, ZHAO Ben^{1,2}, Martha Daniel Mbifile^{1,2}, YANG Hailin^{1,2}, WANG Wu^{*1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To enhance DHA production by *Schizochytrium* sp. AB-610, several promoting factors on growth and DHA synthesis were selected and compared. Fe^{2+} was found with great enhancing effect on the growth of *Schizochytrium* sp., and indolebutyric acid (IBA) enhanced both of growth and synthesis of DHA. Based on the above results, supplement of 0.95mM FeSO_4 and 6.5 mg/L IBA in 500 mL flask was brought about by the test of Center Composite Design (CCD). Fermentation parameters and cell morphology in control group were both tested and observed every 12 h during fed-batch cultivation of *Schizochytrium* sp. AB-610 in 7.5 L fermentor. The fermentation period was divided into 4 phases: adapt phase, balanced growth phase, lipid accumulation phase and lipid

收稿日期: 2017-01-10

基金项目: 国家 863 计划项目 (2014AA021702)。

* 通信作者: 王 武 (1952—), 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物工程方面的研究。E-mail: wangwu@jiangnan.edu.cn

引用本文: 李亚妃, 赵犇, Martha Daniel Mbifile, 等. 亚铁离子和吡啶丁酸促进裂殖壶菌产 DHA 及发酵验证[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(11): 100-107.

turnover phase. Supplement of both FeSO_4 and IBA was also scaled up in NBS 7.5 L fermentor. It showed that adding of both promoting factors improved the growth rate and elongated the stage of cell growth obviously, and the final DHA productivity of *Schizochytrium* sp. increased by 51.22%.

Keywords: *Schizochytrium* sp. AB-610, docosahexenoic acid, fermentation, Fe^{2+} , indolebutyric acid, center composite design

二十二碳六烯酸 (docosahexenoic acid, 简称 DHA), 属于 $\omega-3$ 型长链多不饱和脂肪酸, 对婴儿视力发育和儿童智力发育起重要作用, 对高血压、关节炎、成人糖尿病、抑郁、动脉粥样硬化、血栓形成和某些癌症有预防效果^[1-5]。作为 DHA 生产菌株, 裂殖壶菌(破囊壶菌科, *Schizochytrium* sp.) 生长快, 产油高, DHA 含量高, 菌体是一种安全的食品添加剂, 已成为工业化生产 DHA 的优秀菌种之一^[6-10]。无机盐中的金属离子是微生物体内一些酶的辅基, 参与调节酶的结构和活性, 调节细胞膜通透性, 对于属于海洋真菌的裂殖壶菌有明显影响^[11]。生长素是一类能以极低的浓度来调节植物的生理过程的微量活性物质, 对破囊壶菌(*T. roseum* MF2) 和裂殖壶菌的生长和产 DHA 有很大影响^[12-13]。作者首先分别研究了无机盐和生长素类植物激素对裂殖壶菌生长和产油的影响, 确定 FeSO_4 对裂殖壶菌的生长有显著促进作用, 吲哚乙酸(Indolebutyric acid, 简称 IBA) 则对裂殖壶菌生长和产 DHA 有明显提高。在此基础上进行了 FeSO_4 和 IBA 的两因素、三水平的响应面中心组合试验设计, 旨在探究 FeSO_4 和 IBA 的组合添加对裂殖壶菌生长、产油和 DHA 含量的影响, 得到组合添加 FeSO_4 和 IBA 培养裂殖壶菌产 DHA 的最佳培养方案。最后在 7.5 L 发酵罐中分别进行了对照组和优化后发酵策略的放大实验, 探究 FeSO_4 和 IBA 对裂殖壶菌发酵周期中各阶段的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种

裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. AB-610, 由作者所在实验室 ARTP 诱变获得, 于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存于 20% 甘油管中。

1.2 培养基

种子培养基: 30 g/L 葡萄糖, 10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 溶于 50% 人工海水中。人工海水配方由作者所在实验室在基础上优化所得: 11 g/L

NaCl , 0.8 g/L KCl , 1.22 g/L MgCl_2 , 0.71 g/L CaSO_4 , 0.93 g/L MgSO_4 。

发酵培养基: 100 g/L 葡萄糖, 4 g/L 胰蛋白胨, 18 g/L MgSO_4 , 20 g/L 谷氨酸钠, 2.5 g/L KH_2PO_4 , 0.4 g/L CaCl_2 , 蒸馏水与人工海水按体积比 1:1 混合。

1.3 培养方法

1.3.1 摇瓶种子培养 接种 1 mL 甘油管菌种于种子培养基中, 200 r/min、 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 48 h 为一级种子液。将一级种子液以 10% 接种体积分数接入 100 mL 种子培养基中, 200 r/min、 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h 为二级种子液。

1.3.2 摇瓶发酵方法 将一级种子液以 10% 接种体积分数接入 100 mL 发酵培养基中, 200 r/min、 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 5 d。

1.3.3 补料分批发酵方法 将二级种子液以 10% 接种体积分数接入载有 3 L 发酵培养基的 NBS110 型 7.5 L 发酵罐中, 中后期维持葡萄糖质量浓度在一定范围内, 调控 pH 为 6.8, 400 r/min、 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 5 d, 进行补料分批发酵。

1.4 测定方法

1.4.1 菌体干质量测定 取 10 mL 发酵液于已称质量的离心管中, 于 8 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 再以去离子水清洗菌体, 置于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥箱中烘干至恒质量, 称质量。

$$\text{DCW}(\text{g/L}) = \frac{(\text{烘干质量} - \text{离心管质量}) \times 1\,000}{10}$$

1.4.2 裂殖壶菌油脂提取 取 20 mL 发酵液于旋塞离心管中, 于 8 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 再以去离子水清洗菌体。以去离子水定容至 5 mL, 加入 8 mL 盐酸, 加入玻璃珠混匀, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h。加入 20 mL 正己烷, 混匀, 取上层有机层于已称质量的蒸馏瓶中, 于 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空旋转蒸发至恒质量, 称质量。

$$\text{油脂质量浓度} = \frac{(\text{恒重质量} - \text{蒸馏瓶质量}) \times 1\,000}{20}$$

1.4.3 油脂中脂肪酸组成测定 脂肪酸甲酯化及脂肪酸组成测定参照文献[9]。

1.4.4 发酵液中葡萄糖质量浓度测定 取发酵液1 mL,于8 000 r/min 离心 15 min,取上清液用去离子水稀释至适当质量浓度,利用 SBA-40B 型生物传感分析仪测定葡萄糖质量浓度。

2 结果与讨论

2.1 无机盐分别对 *Schizochytrium* sp.AB-610 生长和产 DHA 的促进作用

分别选择了 ZnSO₄、MnCl₂、FeSO₄ 进行实验,三组实验所得结果中以生物量为标准所确定的最优添加量及其对应的发酵结果见表 1。

表 1 ZnSO₄、MnCl₂、FeSO₄ 对 *Schizochytrium* sp.AB-610 生长和产油的影响

Table 1 Effects of ZnSO₄、MnCl₂、FeSO₄ on DCW/lipids/DHA in *Schizochytrium* sp.AB-610

实验组别	CDW/(g/L)	油脂产量/(g/L)	DHA 质量浓度/(g/L)	油脂中 DHA 质量分数/%
对照组	32.8	11.42	4.91	43.05
ZnSO ₄ (22 mg/L)	29.84	10.2	4.39	43.03
MnCl ₂ (48 mg/L)	34.24	10.48	4.98	47.6
FeSO ₄ (1 mmol/L)	44.55	15.93	7.1	44.56

用NADPH 和乙酰辅酶 A 通过不同的代谢途径合成饱和脂肪酸和与多不饱和脂肪酸 (DHA、DPA、EPA)^[3]。基于此,作者推测 Mn²⁺对 *Schizochytrium* sp.AB-610 中饱和脂肪酸的合成有明显抑制作用,而对其多不饱和脂肪酸的合成无明显影响。

FeSO₄ 对细胞的生长有显著促进作用,添加量为 1 mmol/L 时菌体生物量较对照组提高了 35.7%,FeSO₄ 组实验结果见图 1。通过分析发现,FeSO₄ 对细胞生长和产油的促进作用不同步,1 mmol/L 时对细胞的促进最大,而在 1.5 mmol/L 油脂内 DHA 质量分数促进最大,为 46.13%,此时生物量为 41.03 g/L。

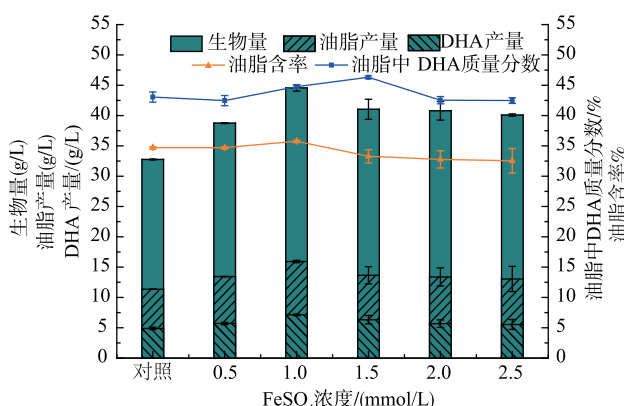


图 1 FeSO₄ 对裂殖壶菌生长和产油的影响

Fig. 1 Effect of FeSO₄ on biomass, lipids, DHA in *Schizochytrium* sp.AB-610

ZnSO₄ 抑制了 *Schizochytrium* sp.AB-610 生长,在添加了 ZnSO₄ 的实验中,菌体生物量下降了 10.7%,油脂产量和 DHA 产量亦有所下降。Zn²⁺对包括糖酵解途径中的一些重要酶促反应有抑制^[14],推测可能是 Zn²⁺影响了 *Schizochytrium* sp.AB-610 中的能量代谢,从而影响了细胞的生长和产油。

MnCl₂ 对细胞生长和 DHA 产量无明显影响,而对胞内油脂产量有所抑制,使得油脂内 DHA 质量分数提高了 10.6%。根据 MnCl₂ 组实验数据分析发现添加量在 24~48 mg/L 时,胞内油脂含率逐渐降低,而油脂内 DHA 质量分数逐渐提高。裂殖壶菌利

基于此,可在后期利用裂殖壶菌发酵周期中发酵特性的变化开展分阶段补加 Fe²⁺的研究。Fe²⁺作为辅基参与多种酶促反应,而其对 *Schizochytrium* sp.AB-610 生长的高效促进作用可能是由于其参与了细胞生长、产油中的某些代谢途径,促进了能量代谢。后续可通过分子生物学手段如转录组学等方法进行 Fe²⁺高效促进 *Schizochytrium* sp.AB-610 细胞生长的机理研究。

2.2 生长素对 *Schizochytrium* sp.AB-610 生长和产油的影响

分别选择了吲哚乙酸(IAA)、萘乙酸(NAA)、吲哚丁酸(IBA)进行实验,三组实验所得结果中以生物量为标准所确定的最优添加量及其对应的发酵结果见表 2。

吲哚乙酸对 *Schizochytrium* sp.AB-610 的生长有一定的抑制,添加 IAA 后菌体生物量略有下降,油脂含率和 DHA 产量变化不明显,说明 IAA 对 *Schizochytrium* sp.AB-610 的生长和产油并无促进作用,不适用于后续研究。

萘乙酸为类生长素,可促进植物细胞分裂与扩大。实验结果表明,它对 *Schizochytrium* sp.AB-610 的生长有一定促进作用,在添加量为 1 mg/L 时生物量达到最大,为 37.35 g/L,较对照组提高了 13.6%。实验同时表明,NAA 对细胞产油和产 DHA 产量并

表 2 IAA、NAA、IBA 对 *Schizochytrium* sp.AB-610 生长和产油的影响
Table 2 Effects of IAA/NAA/IBA on DCW/lipids/DHA in *Schizochytrium* sp.AB-610

实验组别	CDW/(g/L)	油脂产量/(g/L)	DHA 产量/(g/L)	油脂中 DHA 质量分数/%
对照组	32.8	11.42	4.91	43.05
IAA (0.5 mg/L)	32.41	10.74	4.76	44.3
NAA (1 mg/L)	37.35	13.37	6.03	45.12
IBA (7 mmol/L)	36.1	12.56	6.45	47.53

无明显影响。

吡啶丁酸对 *Schizochytrium* sp.AB-610 的生长和产油均有明显促进作用,添加量为 7 mg/L 时生物量、油脂产量和 DHA 产量均达到最大值,结果见图2。推测 IBA 不仅促进了细胞的增殖和生长,同时与胞内多不饱和脂肪酸合成途径中的相关酶系有影响,促进了多不饱和脂肪酸的合成,从而提高了胞内油脂中的 DHA 质量分数,后续将选择 IBA 进一步研究。

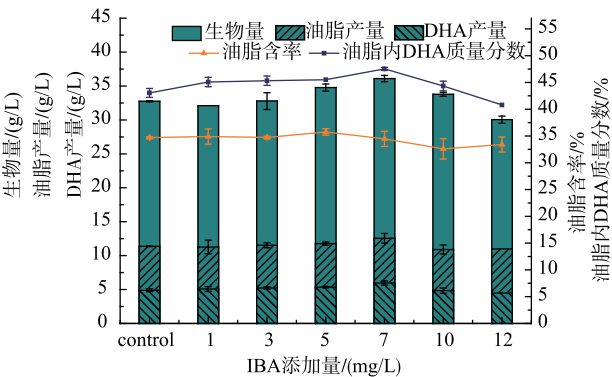


图 2 IBA 对裂殖壶菌生长和产油的影响

Fig. 2 Effect of IBA on biomass,lipids,DHA in *Schizochytrium* sp.AB-610

2.3 促进因子应用于发酵的响应面法优化

在单因素实验中裂殖壶菌的生物量、油脂产量和油脂中 DHA 的质量分数有所提高。为了进一步提高 DHA 生产水平,在单因素研究的基础上,以 FeSO_4 、IBA 的最佳点作为中心点,在 500 mL 摇瓶中进行两因素、三水平的响应面优化实验,利用 Design-Expert.V8.0.6.1 软件中 Center Composite Design 进行实验设计。设计因素包括 A: FeSO_4 添加浓度、B:IBA 添加质量浓度,因变量包括 DCW、油脂产量、DHA 产量,实验方案与结果见表 3。

利用 Design-Expert.V8.0.6.1 软件分别对油脂产量和 DHA 产量进行回归分析与拟合。油脂产量的回归模型及方差结果见表 4。模型的 $F=19.9$, $P=0.000\ 5$ 。一般认为当 P 值小于 0.05 时,模型显著,因此该模型显著。模型失拟项 $F=1.28$, $P=0.408\ 9$ 。一般认为 P 值大于 0.05 时,不显著,因此模型失拟项不显著。模型中 B 、 AB 、 AC 和 A^2 的 P 值小于 0.05,说明这些因素显著, A 的 P 值大于 0.1,说明不显著。多元二次回归模型为:

$$\text{油脂产量} = -1.473\ 63 + 20.504\ 67 * \text{FeSO}_4 + 2.919\ 09 * \text{IBA} - 10.037\ 47 * \text{FeSO}_4^2 - 0.244\ 63 * \text{IBA}^2$$

表 3 中心试验设计与结果

Table 3 Experiment design and results of center composite design

实验号	A FeSO_4 浓度/(mmol/L)	B IBA 质量浓度/(mg/L)	DCW/(g/L)	油脂产量/(g/L)	DHA 产量/(g/L)
1	1.00	4.17	45.25	16.19	7.37
2	1.71	7.00	39.44	12.72	5.88
3	1.50	9.00	38.80	13.05	5.98
4	1.00	7.00	48.89	17.74	8.52
5	1.50	5.00	42.78	15.52	7.06
6	0.50	9.00	38.80	13.12	6.31
7	1.00	7.00	48.90	17.70	8.50
8	0.29	7.00	43.51	11.36	5.20
9	1.00	7.00	44.89	16.27	7.83
10	0.50	5.00	43.98	15.65	7.31
11	1.00	7.00	48.88	17.79	8.56
12	1.00	7.00	48.90	17.70	8.51
13	1.00	9.83	42.67	14.00	6.62

表 4 油脂产量二次响应面回归模型方差分析

Table 4 Analysis of Variance for quadratic response surface regression model of the lipids yield

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值>F 可能性	显著性
模型	55.36	5	11.07	19.90	0.000 5	significant
A-FeSO ₄	0.37	1	0.37	0.76	0.409 1	
B-IBA	8.19	1	8.19	16.81	0.003 4	
A ²	43.80	1	43.80	89.97	< 0.000 1	
B ²	6.66	1	6.66	13.68	0.006 1	
残差	3.90	8	0.49			
失拟性	2.19	4	0.55	1.28	0.408 9	not significant
纯误差	1.71	4	0.43			
总差	59.26	12				
R ² =0.934 3		Adj R ² =0.901 4		C.V. %=4.56		

DHA 产量的回归模型及方差结果见表 5。模型的 $F=25.82, P=0.000 1$ 。该模型显著,失拟项不显著。模型中 B 、 AB 、 AC 和 A^2 的 P 值小于 0.05,说明这些因素显著, A 的 P 值大于 0.1,说明不显著。多元二次回归模型为:

$$\text{DHA 产量} = -2.917 66 + 10.660 87 * \text{FeSO}_4 + 1.887 51 * \text{IBA} - 5.280 94 * \text{FeSO}_4^2 - 0.148 83 * \text{IBA}^2$$

通过所获模型方程对油脂产量和 DHA 产量进行整理,得到 $A:0.95 \text{ mmol/L}$, $B:6.5 \text{ mg/L}$,细胞生物量为模型预测值为 48.38 g/L ,油脂产量 17.59 g/L ,DHA 产量 8.43 g/L ,油脂中 DHA 质量分数为 47.9% 。在该条件下进行三次平行试验,实验结果为

生物量(49.23 ± 0.25) g/L ,油脂产量(17.73 ± 0.13) g/L ,DHA 产量(8.11 ± 0.23) g/L ,油脂中 DHA 质量分数(47.6 ± 0.2)%。实验结果与预测值相吻合,见图 3。

2.4 添加促进因子后裂殖壶菌发酵的特性

2.4.1 对照组中裂殖壶菌细胞形态变化走势 裂殖壶菌生殖方式包括二分裂生殖、孢子生殖和异形体增殖,作者所在实验室菌株 *Schizochytrium* sp. AB-610 以连续二分裂为主要生殖方式^[14]。在 NBS 7.5 L 发酵罐中补料分批发酵下培养 *Schizochytrium* sp. AB-610 5 d,初始装液量 3 L,接入体积分数 10% 预培养的种子液,28 °C、通气量 3 vvm, pH 6.8 条件下对裂殖壶菌进行发酵培养,48 h 开始补加一定葡

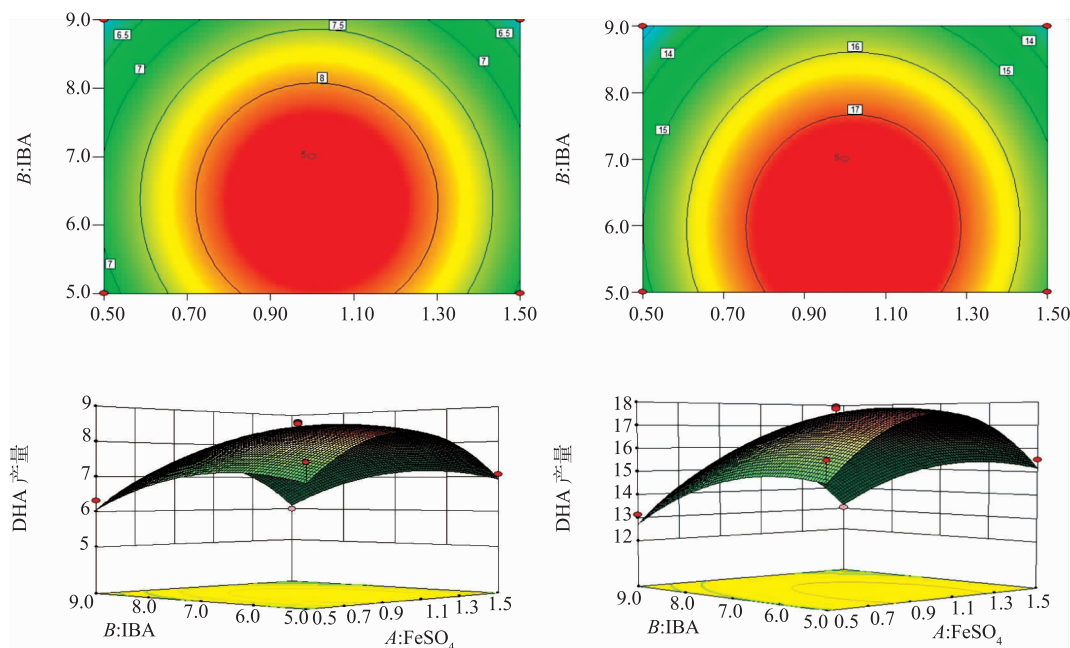
表 5 DHA 产量二次响应面回归模型方差分析

Table 5 Analysis of Variance for quadratic response surface regression model of the DHA yield

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值>F 可能性	显著性
模型	14.64	4	3.66	25.82	0.000 1	significant
A-FeSO ₄	0.020	1	0.020	0.14	0.719 7	
B-IBA	1.23	1	1.23	8.68	0.018 6	
A ²	12.13	1	12.13	85.53	< 0.000 1	
B ²	2.47	1	2.47	17.39	0.003 1	
残差	1.13	8	0.14			
失拟性	0.75	4	0.19	1.93	0.270 4	not significant
纯误差	0.39	4	0.097			
总差	15.78	12				
R ² =0.928 1		Adj R ² =0.892 2		C.V. %=5.23		

萄糖,维持葡萄糖质量浓度在 $40 \sim 50 \text{ g/L}$,观察 *Schizochytrium* sp. AB-610 发酵周期中各分裂形态细胞(单细胞、二分体、四分体、八分体、多分体和成团细胞)的比例,确定裂殖壶菌发酵周期中细胞所处的时期。

发酵前期,分裂形态细胞占据主体。二分体比例在 6 h 时达到峰值 47.4%,之后八分体细胞则占据主体地位,12~24 h 时,八分裂细胞比例维持在 57%~64%。单细胞比例在前期(6~18 h)有所下降,在 18 h 达到最低值 11.1%,中后期则持续上升。中

图3 Center Composite Design 实验设计下 *Schizochytrium* sp. AB-610 发酵响应面Fig. 3 Results of fermentation of *Schizochytrium* sp. AB-610 with Center Composite Design

期分裂形态细胞比例开始下降,单细胞比例持续增高,至 66 h 时,单细胞比例超过 50%。后期各形态细胞趋于稳定,细胞基本停止分裂活动。作者在观测时未计入异形体、孢子囊等其他增殖方式的细胞形态,见图 4。

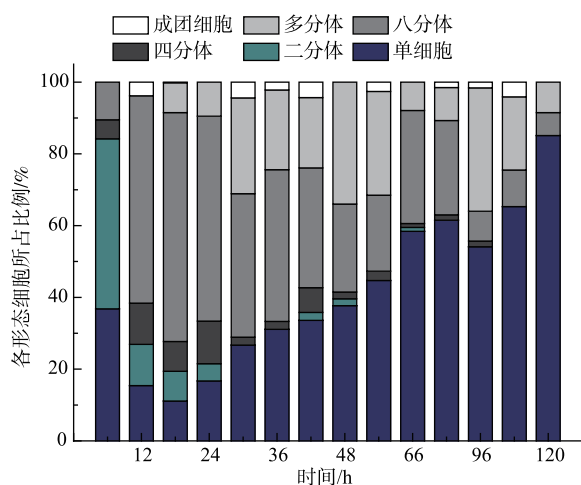


图4 裂殖壶菌发酵周期中各形态细胞比例的变化

Fig. 4 Ratio of different morphologic cells during fermentation of *Schizochytrium* sp. AB-610

由此说明裂殖壶菌发酵过程中,前期菌体以分裂细胞形态为主,细胞快速分裂;中期细胞开始分离,细胞开始变大,逐渐转入产油期,多细胞形态比例减少,细胞分裂速度减慢,至后期细胞基本稳定,

无明显形态变化。

2.4.2 裂殖壶菌发酵特性 在 NBS 7.5 L 发酵罐中补料分批发酵条件下培养 *Schizochytrium* sp. AB-610 5 d,发酵策略同上,每隔 12 小时取样,测发酵液中葡萄糖、生物量、油脂产量、油脂中脂肪酸组成。对照组及添加促进因子后的发酵特性曲线见图 5。

分析对照组发酵特性曲线,*Schizochytrium* sp. AB-610 的补料分批发酵周期中,1) 生物量变化规律:0~24 h 内,菌体量增长缓慢,碳源消耗速率小,24~72 h 菌体量快速增长,特别在 24~48 h 内对碳源的细胞得率(Y_{xs})最大,细胞平均生长速率为 1.19 g/(L·h),80 h 时生物量达到 64.6 g/L,之后生物量缓慢下降。2) 油脂含率变化规律:12~48 h 内菌体内油脂含率缓慢下降,而在 48~96 h 内迅速上升,96 h 时达到最高值 40.5%,之后至发酵结束期间内缓慢下降。发酵伊始生物量和油脂产量均较低,所得油脂含率误差较大,此处并未分析。3) 油脂内 DHA 质量分数:油脂中 DHA 质量分数在 12~60 h 内持续降低,在 60~120 h 内持续缓慢上升,至发酵结束时达到 41.13%。至发酵结束时,菌体生物量为 64.06 g/L,菌体内油脂含率 38.9%,油脂中 DHA 质量分数为 41.13%。

结合发酵周期中细胞形态变化趋势,0~24 h 内,菌体快速分裂,但代谢速率低,细胞个体仍较

小,生物量上升缓慢。24~48 h内,细胞仍处于旺盛分裂时期,碳源消耗速率高,细胞得率高,生物量快速增长,细胞数量和个体均处于增长时期。48~96 h内,细胞二分裂活动逐渐减缓,开始快速积累油脂,且在前期(48~72 h)以合成饱和脂肪酸为主。96~120 h菌体量和细胞活动都趋于稳定,葡萄糖消耗速率和比消耗速率下降,菌体消耗了自身的一部分油脂,且偏好于消耗饱和脂肪酸。依据上述特点确定:*Schizochytrium* sp.AB-610的补料分批发酵周期中,0~24 h为菌体适应期,24~48 h为菌体快速生长期,48~96 h为油脂快速积累期,96~120 h则为油脂返耗期。

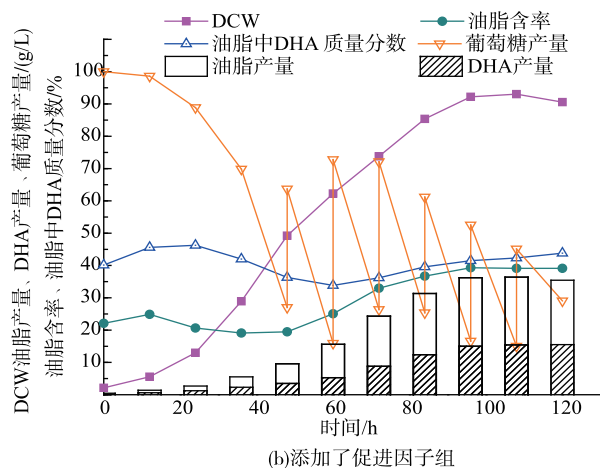
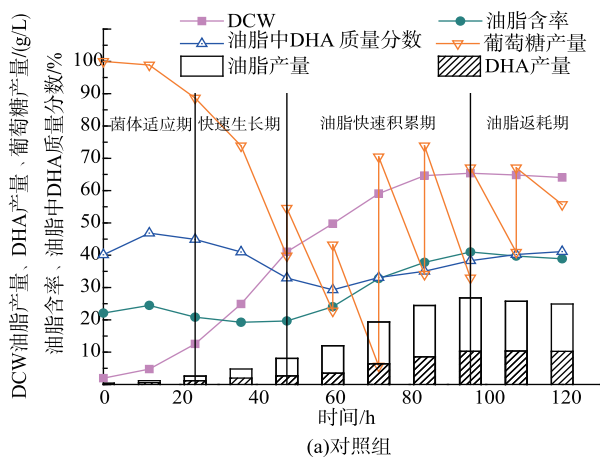


图5 *Schizochytrium* sp.AB-610 发酵特性曲线对照组、添加了促进因子组

Fig. 5 Fermentation characteristic curve of *Schizochytrium* sp.AB-610 with control supply FeSO_4 & IBA

添加促进因子的补料分批发酵中,菌体适应期(0~24 h),添加双促进因子的试验组与对照组并无

明显区别。快速生长期(24~48 h),双促进因子的添加有效促进了菌体的生长,试验组的生长速率达到 $1.51 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{h})$,较对照组提高了 26.7%,至快速生长期结束,试验组的生物量达到 49.23 g/L 。油脂积累期(48~96 h),试验组细胞的油脂含率略低于对照组,分析原因可能是生物量的提高更多地消耗了培养基中营养元素和溶氧等,一定程度上限制了胞内油脂积累。48~84 h为产油旺盛期,试验组的油脂积累速率为 $0.604 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{h})$,高于对照组的 $0.454 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{h})$,这依赖于试验组更高浓度的菌体。产油期结束时,试验组油脂中 DHA 为 41.5%,高于对照组,说明双促的添加有利于细胞中 DHA 的合成。油脂返耗期(96~120 h),生物量至 108 h 时仍有微弱增长,达到最高值 93.03 g/L ,说明双促的添加延长了菌体的生长期,后期试验组生物量消耗较对照组大,这可能是试验组生物量基数较大引起的。至发酵结束时,添加双促进因子的补料分批发酵生物量、油脂产量、DHA 产量分别为 90.56 、 35.42 、 15.52 g/L 。DHA 生产强度为 $3.10 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$,得到了有效提高。

双促进因子的添加可有效地提高 *Schizochytrium* sp. AB-610 快速生长期的生长速率,促进产油期 DHA 的合成,对 DHA 的产量和生产强度有大幅提高,证明双促进因子的添加对高密度发酵产 DHA 同样有显著促进。同时,本研究并未将发酵技术复杂化,有利于放大生产,同时与其他技术手段相结合,进一步提高高密度发酵的生产水平,有望提高大规模发酵产 DHA 的生产强度。

3 结语

作者确定了 FeSO_4 可高效促进 *Schizochytrium* sp.AB-610 的生长,IBA 对 *Schizochytrium* sp.AB-610 生长和产 DHA 均有促进,并利用中心组合实验设计确定了两种促进因子组合添加的最适添加量为 FeSO_4 0.95 mmol/L ,IBA 6.5 mg/L ,摇瓶验证试验中较对照组生物量提高了 50.01%,DHA 产量提高了 65.17%。通过初步放大发酵试验证明,添加两种促进因子高效促进了菌体生长,提高了快速生长期细胞的生长速率,延长了菌体增长的时期,至发酵结束时生物量为 90.56 g/L ,油脂产量为 35.42 g/L ,DHA 产量为 15.52 g/L ,较对照组均有明显提高,且 DHA 的生产强度提高了 51.22%。

参考文献:

- [1] SIRIWARDHANA N, KALUPAHANA NS, MOUSTAID-MOUSSA N. Health benefits of N-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid[J]. **Advances in Food & Nutrition Research**, 2012, 65: 211-222.
- [2] SLAGSVOLD J E, PETTERSEN C H H, STORVOLD G L, et al. DHA alters expression of target proteins of cancer therapy in chemotherapy resistant Sw620 colon cancer cells[J]. **Nutrition & Cancer**, 2010, 62(5): 611-621.
- [3] GLEW R H, VANDERJAGT D J. Does Docosahexaenoic acid play a role in infant malnutrition in the children of fulani nomads in northern nigeria?[J]. **Journal of Medicine in the Tropics**, 2013, 15(2): 69-75.
- [4] WANDERSEE N J, MACIASZEK J L, GIGER K M, et al. Dietary supplementation with docosahexanoic acid(dha) increases red blood cell membrane flexibility in mice with sickle cell disease[J]. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, 2015, 54(2): 183-188.
- [5] EFSA. EFSA assesses safety of long-chain omega-3 fatty acids [EB/OL]. <http://www.efsa.europa.eu/en/press/new/120727.htm>, 2012-04-07.
- [6] ZHOU Lishu, SHEN Jianzeng, CAI Yujie, et al. Effect of vitamins on DHA production of *Schizochytrium*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(9): 927-932. (in Chinese)
- [7] ABRIL R, GARRET J, ZELLER S G, et al. Safety assessment of DHA-rich microalgae from *Schizochytrium* sp. Part V: target animal safety/toxicity study in growing swine[J]. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 2003, 37(1): 73-82.
- [8] ZHANG Qi, LI Lingyan, ZHAO Ruli, et al. Research progress on the enhancement of the production of polyunsaturated fatty acids in microorganisms[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34(8): 785-789. (in Chinese)
- [9] ZHAO Shulin, CAI Shuangshan, XIA Muyang, et al. Feeding glucose fermentation of *Schizochytrium*[J]. **China Oils and Fats**, 2017, 42(2): 113-115. (in Chinese)
- [10] WANG Jiepeng, LUO Yao, XI Daxing. Effects of agitation and aeration on DHA production by *Schizochytrium* LX0809 [J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, 2017, 15(1): 16-19. (in Chinese)
- [11] 陈浩. 裂殖壶菌培养基优化、菌种选育及遗传转化体系的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- [12] WU Kegang, CHAI Xianghua, YANG Liansheng. Effects of phytohormones on growth and DHA production by *Thraustochytrium roseum*[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2003, 43(1): 111-115. (in Chinese)
- [13] YANG Qing, SONG Yimin, FAN Minghao, et al. Effects of plant hormones on growth and DHA content of *Schizochytrium limacinum*[J]. **Periodical of Ocean University of China**, 2011, 41(12): 53-57. (in Chinese)
- [14] YUAN Jun, ZHAO Ben, SUN Mengyu, et al. Rapid mutation breeding *Schizochytrium* strains producing high-yield docosahexenoic acid by atmospheric and room temperature plasmas(ARTP)[J]. **Biotechnology Bulletin**, 2015, 31(10): 199-204. (in Chinese)
- [15] QIN Jianjun, JIANG Jianfei, LIU Changxian. Study on the inhibition of zinc (II) for enzymatic determination[J] **Journal of South-Central University for Nationalities: Natural Science Edition**, 2007, 26(1): 11-13. (in Chinese)
- [16] 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(5528): 290-293.