

补料分批发酵对隐甲藻生长和积累 DHA 的影响^{*}

肖尚¹ 孙立洁^{1,2} 姚黎明¹ 吴金勇¹ 卢诗瑶¹ 李俊² 姚建铭¹

1(中国科学院等离子体物理研究所 安徽 合肥 230031)

2(中科光谷绿色生物技术有限公司 湖北 武汉 430070)

摘要 研究发酵方式对隐甲藻生长和积累 DHA 的影响,从而为工业化生产提供参考。对分批发酵初始葡萄糖浓度进行优化,得到最佳葡萄糖浓度为 60 g/L。在此条件下培养 9 d 后 DHA 的产量为 0.8 g/L。在分批发酵的研究基础上,在稳定期补加一次葡萄糖,每升培养基补加 30 g,培养 9 d 后 DHA 产量达到 1.27 g/L。如果每隔 24 h 补加 1 次葡萄糖使培养基中葡萄糖的浓度恢复到 20 g/L,培养 9 d 后 DHA 产量达到 1.72 g/L。结果表明,在隐甲藻产 DHA 实验中补料分批发酵要优于分批发酵。

关键词 隐甲藻 分批发酵 分批补料发酵 DHA

全顺式-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid,简称 DHA),俗称脑黄金,是一种对人体有着非常重要作用的多不饱和脂肪酸,是 ω -3 不饱和脂肪酸家族中的重要成员,动物和人本身不能合成,必须从外界摄入^[1]。DHA 具有重要的生理作用:与抗癌免疫有关,同时具有补脑健脑、提高视力、降血脂、降血压、抗动脉粥样硬化、抗炎等作用,有很大的应用价值^[2]。目前 DHA 的常规来源是鱼油产品,但鱼油来源的产品腥味较大,同时含有较高的 EPA,EPA 能够抑制婴儿的正常发育^[3-5]。欧美发达国家已通过微生物发酵法获得 DHA^[6],同鱼油产品相比,微生物发酵所得产品具有更高的品质,非常适用于婴幼儿食品的添加。

隐甲藻是一种海生藻,是 DHA 良好的微生物来源^[7],其脂肪酸组成简单,主要含有 C10:0、C12:0、C14:0、C16:0、C16:1、C18:0、C18:1 和 C22:6,其中 DHA 含量可高达 50% 以上^[8]。这个特点使得 DHA 纯化变得较简单。同时,隐甲藻是异养需氧型微生物,解决了光限制和氧积累的问题^[9],可以实现高密度、大规模的生产。目前国内外有许多高校和科研机构从事隐甲藻发酵生产 DHA 的研究,主要从优化碳源和氮源、发酵条件、诱变等角度来实现高产,但效果不理想。王永华等^[10]对碳源和氮源进行优化后得到 DHA 产量不到 0.6 g/L。Jiang 和 Chen^[11]研究了温度对隐甲藻积累 DHA 的影响,发现低温适合积累油

脂,高温适合生长。孙中贯等^[12]利用亚硝基胍对隐甲藻 ATCC30556 进行诱变筛选,获得 1 株 DHA 产量比出发菌株提高了 121.59% 的菌株,最后的产量达到 1.057 g/L。

由于隐甲藻发酵周期比较长,而且 DHA 主要是在稳定期合成,所以发酵方式对隐甲藻生长和 DHA 积累的影响非常大,在许多发酵产品中得到分批补料发酵优于分批发酵的实验结果^[13-14],故本实验欲通过比较这两种发酵方式,为工业化生产提供参考。

1 材料和方法

1.1 菌种

隐甲藻(*Cryptocodinium cohnii* ATCC30772)从广东微生物菌种保藏中心购买所得。

1.2 培养基组成

种子培养基:葡萄糖 9 g/L,酵母膏 2 g/L,海盐 25 g/L。

发酵培养基:碳源采用葡萄糖,除葡萄糖浓度不同外其他成分都相同,如下:蛋白胨 15 g/L,海盐 25 g/L,NiSO₄·6H₂O 20 mg/L,CuSO₄·5H₂O 20 mg/L,Na₂MoO₄·2H₂O 0.4 mg/L,MnCl₂·4H₂O 30 mg/L,CoCl₂·6H₂O 0.4 mg/L,ZnSO₄·7H₂O 30 mg/L,Fe-SO₄·7H₂O 100 mg/L,维生素 B₁(VB₁) 95 mg/L,维生素 B₁₂(VB₁₂) 1.5 mg/L,D-泛酸钙 32 mg/L,D-生物素 0.06 mg/L。

1.3 仪器与设备

722s 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);DZF-6030B 真空干燥箱(东莞市豪邦工业设备有限公司);GC-14C 气相色谱仪(配有氢火焰离子

第一作者:硕士研究生(姚建铭研究员为通讯作者,E-mail:jmyao@ipp.ac.cn)。

* 武汉东湖新技术开发区科技创新基金资助项目(20120223)

收稿日期:2013-05-10 改回日期:2013-08-22

化检测器(FID)和N2000色谱工作站(日本岛津公司)。

1.4 培养方法

将斜面保藏的藻种活化后接入装有50 mL种子培养基的250 mL的三角瓶中,在25 °C,90 r/min下培养3d,然后按10%的接种量接种到装有100 mL发酵培养基的500 mL的三角瓶,在20 °C,150 r/min下培养9d。

1.5 细胞干重的测定

样液装入预先称重的离心管,4 000 r/min离心10 min,沉淀用蒸馏水清洗3次,在80 °C烘箱中干燥,定期取出,在干燥器内冷却后称重,直至恒重。

1.6 脂质提取

改进的Bligh-Dyer法^[15]。

1.7 脂肪酸组成测定

取50 mg油脂,置于100 mL的磨口烧瓶中,加入0.5 mol/L的KOH甲醇溶液2 mL,于60 °C水浴30 min进行皂化,冷却后加入2 mL三氯化硼-甲醇(体积比为1:1)溶液,60 °C水浴30 min,冷却后加入5 mL正己烷振荡,然后加入5 mL饱和食盐水,静置分层后取上层正己烷相,抽取上层可直接进样。

气相色谱法,色谱条件为:FID检测器,毛细管色谱柱DB-23(30m×0.32mm),载气为纯度为99.99%的氮气,分流比1:50。进样口温度200 °C,检测器温度250 °C,进样量1 μL。采用程序升温,140 °C保持3min,10 °C/min升温,升温至250 °C,保持15min,每个样29min,为保持数据的准确性,每个样品进样两次,取平均值。

1.8 葡萄糖浓度测定

葡萄糖浓度测定采用3,5-二硝基水杨酸法^[16]。获得的标准曲线如图1所示。

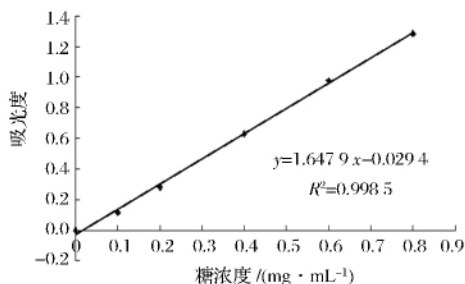


图1 葡萄糖标准曲线

Fig. 1 The standard concentration curve of glucose

2 结果和讨论

2.1 分批发酵

选择不同的葡萄糖质量浓度梯度:40,50,60,70 g/L,每组3个平行。培养9d后测量其生物量,细胞油脂含量和DHA量,如图2所示。

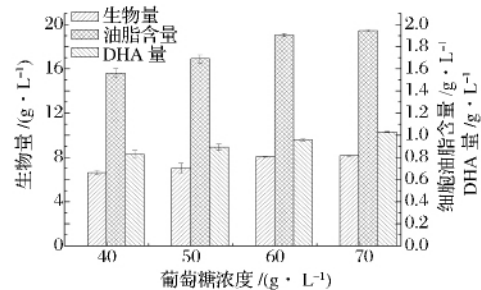


图2 葡萄糖浓度对发酵的影响

Fig. 2 The effect of glucose concentration on fermentation

结果表明,随着葡萄糖浓度的增高,生物量也在增高,当葡萄糖质量浓度为70 g/L时获得最高生物量10.3 g/L,说明隐甲藻能耐受较高的葡萄糖浓度。当葡萄糖质量浓度达到60 g/L时,随着葡萄糖质量浓度的再增加,其细胞油脂含量和DHA量基本上保持不变,可能是由于隐甲藻消耗葡萄糖的速度有限,不需要太高的浓度。考虑经济效益故分批发酵时葡萄糖采用60 g/L即可,其生物量为9.6 g/L,细胞油脂产量为1.9 g/L, DHA量为0.8 g/L,转化率为13.3 g(DHA)/1 kg(葡萄糖)。其生长曲线、DHA合成速率如图3所示。

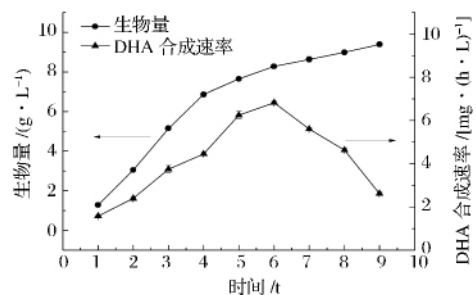


图3 分批发酵生长曲线和DHA合成速率

Fig. 3 Growth curve and DHA accumulative rate of batch fermentation

从图3可以看出前4d生物量增加的速度比较快,而DHA合成速率比较小。4d后进入稳定期,生物量增加很缓慢,但DHA合成速率比对照期高很多。DHA的合成速率在第6天达到最大值6.4 mg/h, L,

之后合成速率下降,可能是由于营养物质含量下降以及细胞开始衰老的缘故。从 DHA 合成速率曲线可以看出 DHA 主要在稳定期合成,为次级代谢产物。

2.2 分批补料发酵

2.2.1 一次补料分批发酵

初始培养基含葡萄糖 60 g/L,在 2.1 的图 3 中可以看出发酵第 5 天达到稳定期,故选择在第 5 天补加葡萄糖溶液。选择每升发酵液补加的葡萄糖质量从 20 g 到 60 g,每 10 g 为一个梯度,对照组初始培养基也含葡萄糖 60 g/L,但在培养过程中不补加葡萄糖(即分批发酵)。培养 9 d 后的生物量、细胞油脂含量、DHA 量如图 4 所示。

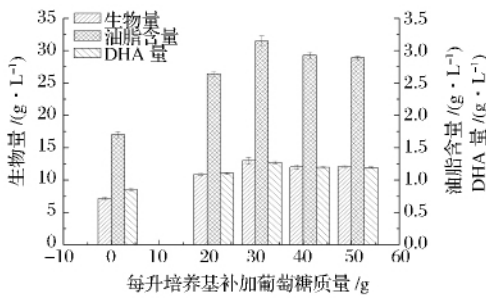


图 4 补料量对隐甲藻发酵的影响

Fig. 4 The effect of added mass of glucose on fermentation of *C. cohnii*

从图 4 中可以看出一次补料对生物量、细胞油脂含量、DHA 量都有很好的提高作用。当每升培养基补加 30 g 葡萄糖时获得最好的效果,最终的生物量达到 12.7 g/L,比对照提高了 54.5%,细胞油脂含量达到 3.1 g/L,比对照提高了 90.3%,DHA 量达到 1.27g/L,比对照提高了 85.3%。其生长曲线、DHA 合成速率如图 5 所示。

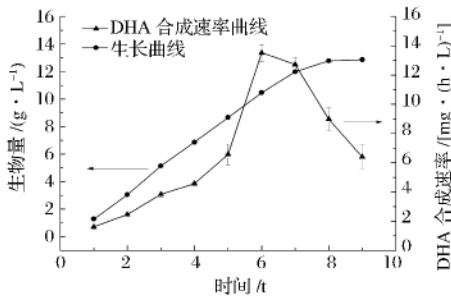


图 5 一次补料分批发酵生长曲线和 DHA 合成速率

Fig. 5 Growth curve and DHA accumulative rate of single fed-batch fermentation

比较图 3 和图 5 可以发现,补料可以延长对数

期,生长曲线不再是典型的 S 型曲线。不补料时培养 4 d 后生物量基本不再增加,补料后,生物量一直在增加,直到 8 d 后才不再增加进入稳定期。并且补料后 DHA 的合成速率大大提高,在第 6 天获得最大 DHA 合成速率 13.4 mg/h·L,是对照的 2.1 倍。

2.2.2 多次补料分批发酵

设置初始葡萄糖质量浓度从 10 g/L 到 35g/L,每 5 g/L 一个梯度,培养基其余成分如 1.2.2 所示。每隔 24 h 测量一次葡萄糖质量浓度,然后流加高浓度的葡萄糖溶液使培养基中葡萄糖质量浓度恢复到初始水平,培养 9 d。最终实验结果如图 6 所示。

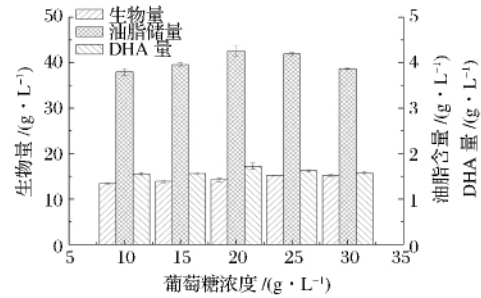


图 6 初始葡萄糖浓度对产 DHA 的影响

Fig. 6 The effect of initial concentration of glucose on accumulating DHA

实验结果表明当葡萄糖保持在 25 g/L 时获得最高的生物量 15.20 g/L。但当葡萄糖浓度保持在 20 g/L 时获得最高的细胞油脂含量和 DHA 量,分别为 4.26 g/L 和 1.72 g/L,说明太高的葡萄糖浓度不利于细胞油脂合成。多次补料时获得的 DHA 最高产量分批发酵提高了 115%,说明多次补料对积累 DHA 有更好的效果。葡萄糖质量浓度为 20 g/L 这组每天的残糖浓度和流加的葡萄糖质量如表 1 所示,其生长曲线和 DHA 合成速率如图 7 所示。

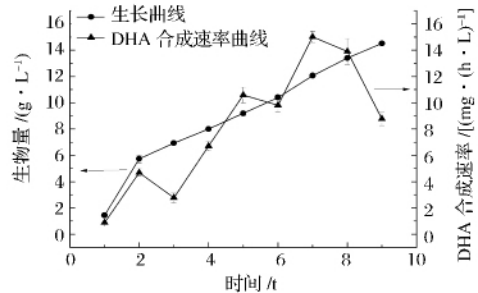


图 7 多次补料分批发酵生长曲线和 DHA 合成速率

Fig. 7 Growth curve and DHA accumulative rate of multiple fed-batch fermentation

表1 每天残糖浓度和流加量

Table1 Concentration of residual sugar and mass of feeding glucose every 24 hours

时间/h	24	48	72	96	120	144	168	192
残糖浓度/(g · L ⁻¹)	13.6	10.6	14.0	13.3	12.8	13.9	14	13.8
葡萄糖流加量 g/(g · L ⁻¹)	6.4	9.4	6.0	6.7	7.2	6.1	6.0	6.2

9 d 一共补料 8 次,每升培养基液共补加 54 g 葡萄糖。从表 1 中可以看出第二天消耗的葡萄糖量最多,每升培养基消耗 9.4 g,从图 7 中可以看出其生长速率也是最快的。之后的几天中每天消耗的葡萄糖质量变化幅度很小。在 9 d 的发酵周期中生物量一直在增加,说明多次补料可以推迟稳定期的到来。DHA 在第 2 d 的合成速率要明显高于第 3 d,可能是由于第 2 d 隐甲藻生长速率非常快的缘故。第 8 d 获得最大的 DHA 合成速率 15 mg/h · L,是分批发酵的 2.34 倍,是一次补料分批发酵的 1.12 倍。多次流加分批发酵的生长曲线也不是典型的 S 型曲线。

2.3 讨论

实验结果可以看出补料分批发酵对隐甲藻的生长和积累 DHA 的效果都比分批发酵好。对分批发酵时的葡萄糖浓度优化后得到最优葡萄糖浓度 60 g/L,在此浓度下培养 9 d 后 DHA 量为 0.8 g/L,转化率为 13.33 g(DHA)/1 kg(葡萄糖)。在分批发酵的研究基础上,在稳定期补加一次葡萄糖,对补加的葡萄糖质量进行优化后,得到每升培养基在稳定期一次补料 30 g 葡萄糖,培养 9 d 后可获得最大 DHA 量 1.27 g/L,转化率为 14.11 g(DHA)/1 kg(葡萄糖)。当采用多次分批补料发酵时,每隔 24 h 补加一次葡萄糖,一共补加 8 次,每升培养基共补加 54 g 葡萄糖。培养 9 d 后 DHA 量为 1.72 g/L,是分批发酵的 2.15 倍,转化率为 23.24 g(DHA)/1 kg(葡萄糖)。如果采用连续发酵,DHA 的产量可能会更高,但由于连续发酵不好控制,操作要求高,易染菌,在工业生产中不常用,所以这里不再做研究。

参 考 文 献

- [1] Ward O P, Singh A. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(12): 3 627 - 3 652.
- [2] 左珊珊,林艳丽,张伟. DHA 和 EPA 的研究进展[J]. *中国生物制品学杂志*, 2012, 11(25): 1 558 - 1 560.
- [3] 肖玫,欧志强. 深海鱼油中两种脂肪酸(EPA 和 DHA)的生理功效及机理的研究进度[J]. *食品科学*, 2005, 26(8): 522 - 524.
- [4] Carlson SE. Arachidonic acid status of human infants: influence of gestational age at birth and diets with very long chain n-3 and n-6 fatty acids [J]. *The Journal of Nutrition*, 1996, 126(4): 1 092 - 1 098.
- [5] Carlson SE, Werkamn SH, Rhodes PG, Tolley EA. Visual-acuity development in healthy preterm infants: effect of marine-oil supplementation [J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1993, 58(1): 35 - 42.
- [6] Behrens P W, Hoeksema S D, Arnett K L, et al. Eicosapentaenoic acid from microalgae. *Novel Microbial Products for Medicine and Agriculture* [M]. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1989: 253 - 259.
- [7] Kyle DJ. Production and use of a single cell oil which is highly enriched in docosahexaenoic acid [J]. *Lipid Technol*, 1996, 8(5): 107 - 110.
- [8] De Swaaf M, Pronk J, Sijtsma L. Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61(1): 40 - 43.
- [9] Molina E, Fernandez J, Acie? n FG et al. Tubular photobioreactor design for algal cultures [J]. *J Biotechnol*, 2001, 92(2): 113 - 131.
- [10] 王永华,梁世中,杨博. 碳氮源对隐甲藻油脂和 DHA 积累的影响[J]. *中国油脂*, 2011, 26(6): 58 - 60.
- [11] Yue Jiang and Feng Chen. Effects of temperature and temperature shift on Docosahexaenoic Acid production by the Marine Microalga *Cryptocodinium cohnii* [J]. *JAACS*, 2000, 77(6): 613 - 617.
- [12] 孙中贯,刘咏,姚建铭等. 二十二碳六烯酸隐甲藻的选育及其发酵条件研究[J]. *食品科学*, 2013, 34(5): 202 - 206.
- [13] 徐达. L-鸟氨酸补料分批发酵的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(4): 117 - 119.
- [14] 龚信芳,李平,梁磊,等. 木薯渣分批补料酶水解及酒精发酵的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(4): 112 - 115.
- [15] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. *Can J Biochem Physiol*, 1959, 37(8): 911 - 917.
- [16] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Anal Chem*, 1959, 31(3): 426 - 428.

The effect of fed-batch fermentation on growth of *C. cohnii* and accumulation of DHA

XIAO Shang¹, SUN Li-jie^{1,2}, YAO Li-min¹, WU Jin-yong¹,
LU Shi-yao¹, LI Jun², YAO Jian-ming¹

1(Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

2(Zhongke Guanggu Green Biology Co. Ltd., Wuhan 430070, China)

ABSTRACT In order to provide reference for industrialized production of DHA, the effect of fermentation mode on the growth of *C. cohnii* and accumulation of DHA was studied. After optimization of the initial concentration of glucose during batch fermentation, we got the maximal DHA production when the concentration of glucose was 60g/L. Under this condition, the DHA yield reached 0.8g/L after cultivating for 9 days. Based on the research of batch fermentation, 30g glucose per liter of medium was fed once during stationary phase, the DHA yield reached 1.27g/L after cultivating for 9 days. What's more, when glucose was fed once every 24 hours to keep the concentration of glucose at 20g/L, the DHA yield reached 1.72g/L after cultivating for 9 days. Results showed that fed-batch fermentation was superior to batch fermentation in the accumulation of DHA in *C. cohnii*.

Key words *Cryptocodinium cohnii*, batch fermentation, fed-batch fermentation, DHA

《新食品原料安全性审查管理办法》2013年10月1日开始实施

从2013年10月1日起,又一批新规将正式实施:从全国范围看,包括《新食品原料安全性审查管理办法》出台、“老赖”将入最高法院“黑名单”、三峡工程上空禁放风筝、外包非煤矿山也有安全管理要求等都很受关注;云南省范围内的新规也不少,包括省政府参事实行聘任制、少数民族教育从开办双语幼儿园开始等;至于各州市,也出台了涉及民生的新规……它们,将改变我们的生活。

新食品原料审查管理收紧 无毒无害成把关重点 今后,新食品原料应当具有食品原料的特性,符合应当有的营养要求,且无毒、无害,经过国家卫生计生委安全性审查后,方可用于食品生产经营。据国家卫生和计划生育委员会网站消息,《新食品原料安全性审查管理办法》(以下简称《办法》)将于10月1日起施行。在业内看来,随着这一新规的出台,食品原料安全的审查管理将进一步收紧,有效改善国内近年来食品安全形势不容乐观的情况。《办法》实施后,原《新资源食品管理办法》将同时废止。对比原卫生部2007年12月1日公布的《新资源食品管理办法》,《办法》作出的最大改变是:将“新资源食品”修改为“新食品原料”,并对新食品原料定义、范围进行了修改,同时进一步规范了新食品原料应当具有的食品原料属性和特征。

《办法》对新食品原料的定义为:在中国无传统食用习惯的动物、植物和微生物;从动物、植物和微生物中分离的成分;原有结构发生改变的食品成分以及其他新研制的食品原料。

《办法》中说明,新食品原料应当具有食品原料的特性,符合应当有的营养要求,且无毒、无害,对人体健康不造成任何急性、亚急性、慢性或者其他潜在性危害。同时明确,新食品原料不包括转基因食品、保健食品、食品添加剂新品种,上述物品的管理将依照国家有关法律法规执行。

对于公众最关注的监管问题,《办法》也做了明确规定。对于新食品原料申请人隐瞒造假的情况,增加了相应的处理条款。指出申请人隐瞒有关情况或者提供虚假材料申请新食品原料许可的,申请人在一年内不得再次申请该新食品原料许可。

同时,《办法》对国家卫生计生委的职责进行了明确。国家卫生计生委负责新食品原料安全性评估材料的审查和许可工作,不再承担食品安全的具体监管任务等。(来源:食品伙伴网 时间:2013年09月29日)