

# 利用 *Cryptocodinium cohnii* 高密度发酵生产 DHA 的流加策略研究\*

任路静, 金明杰, 纪晓俊, 高 振, 黄 和

(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏南京, 210009)

**摘 要** 利用流加策略实现了隐甲藻 (*Cryptocodinium cohnii*) 生产 DHA 的高密度发酵。根据隐甲藻间歇式发酵的特性, 探讨最佳补料时间及流加液中最佳碳氮比, 结果表明, 在葡萄糖浓度降至 4 g/L 左右时流加碳氮比为 30:1 的营养液对隐甲藻的生长和脂肪酸积累最有利。根据以上结果, 初始葡萄糖浓度 25 g/L, 采用 5 d 连续发酵多次流加策略, 细胞干重达 6.37%, DHA 产量为 4.08 g/L。

**关键词** *Cryptocodinium cohnii*, docosahexaenoic acid (DHA), 高密度发酵, 流加

DHA (docosahexaenoic acid, 二十二碳六烯酸) 是一种重要的多不饱和脂肪酸, 属  $\omega$ -3 系列, 具有增强记忆, 提高智力, 降低血脂, 调节免疫系统等功效<sup>[1]</sup>。较传统鱼油来源的 DHA, 生物法合成的 DHA 无鱼腥味, 油脂中基本不含 EPA, 更适合作婴幼儿食品添加剂。近年来, 利用微生物发酵生产 DHA 已成为一大热点。生产 DHA 常用微生物<sup>[2,3]</sup>有: 隐甲藻、破囊壶菌 (*Thraustochytrium* sp.)、裂殖壶菌 (*Schizochytrium* sp.) 等。其中, 隐甲藻是一种可利用葡萄糖为底物异养生长的海洋微藻, 脂肪酸积累量高于 20%, DHA 含量 30% ~ 50%, 是一种高效的 DHA 生产菌<sup>[3,4]</sup>。

目前, 利用隐甲藻发酵产 DHA 普遍存在菌体密度较低, 脂肪酸含量不高等问题<sup>[3,5,6]</sup>, 如何实现隐甲藻的高密度发酵是 DHA 高量生产的关键。文中针对此项问题, 探讨采用流加策略进行半连续发酵, 通过控制底物浓度, 得到较高的生物量和脂肪酸含量, 为进一步的工业化生产奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌 株

隐甲藻 (*Cryptocodinium cohnii*) ATCC 30556, 由南京工业大学代谢工程实验室保藏。

### 1.2 培养基组成

基础培养基: Porhyridium 培养基。培养基组成: 葡萄糖 25 g/L, 酵母膏 4 g/L, NaCl 16 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 g/L, KNO<sub>3</sub> 5 g/L,

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 g, V<sub>H</sub> 6m g/L, V<sub>B<sub>12</sub></sub> 1μg/L, 采用蒸馏水定容, 调整 pH 值为 6.5。

### 1.3 培养方法

种子培养: 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 摇瓶中, 25℃, pH 6.50, 150 r/min 摇床中培养 3~4 d 得一级种子液; 按 10% 的接种量将所得菌液接入装有 100 mL 种子培养基的 500 mL 摇瓶中, 25℃, pH 6.50, 150 r/min 摇床中培养 3~4 d 得二级种子液, 进入 5 L 发酵罐培养。

5 L 反应器间歇式发酵: 葡萄糖、人工海水分开灭菌, 加入 5 L 发酵罐中, 按照 10% 的接种量将二级种子液接入发酵罐中, 每 12 h 取样, 测定葡萄糖浓度、氮源浓度、生物量和脂肪酸含量 (发酵初期由于菌体量过小, 从 24 h 开始测生物量)。发酵过程中, 初始转速在 100 r/min, 通气为 1.0 L/min, 通过控制转速使溶氧控制在 30% 以上。通过自动添加 2 mol/L HCl, 维持 pH 在 6.5 ± 0.1, 消泡剂选用 50 g/L silicone SE-2。初始葡萄糖浓度为 25 g/L。

5 L 反应器半连续发酵: 发酵条件同间歇式发酵, 以葡萄糖浓度为重要参数决定流加时间和流加量。在探讨最佳流加时间实验中, 分别在 54 h、60 h、72 h 流加 50% 的葡萄糖至初始浓度, 比较 3 种流加策略对生物量的影响。确定最适碳氮比实验中, 将葡萄糖液和酵母膏按质量比配成不同比例的营养液 (选用碳氮比为 10:1、20:1、30:1、40:1), 从 60 h 开始添加比较不同碳氮比对生物量及脂肪酸含量的影响。

### 1.4 测定及分析方法

糖浓度的测定: 采用 SBA-40C 生物传感分析仪 (山东省科学院生物研究所生产) 测定。

菌体干重的测定: 干重法。将一定量的培养液装

第一作者: 硕士研究生 (黄和教授为通讯作者)。

\* 江苏省博士后科研资助计划, 江苏省自然科学基金 (BK2005114) 资助项目

收稿日期: 2006-09-15, 改回日期: 2006-11-06

入预先称重的离心管中,3 500 r/min,离心 8 min,沉淀后用去离子水清洗 3 次,置于真空干燥箱中 50℃干燥,定期取出,冷却后称重,直至恒重。

脂肪酸的提取:改进的 Bligh-Dyer 法<sup>[7]</sup>。

油脂预处理:取 20 mg 油脂,加入 1 mg 十七烷酸,置于 50 mL 的磨口烧瓶中,加入 0.5 mol/L 的 KOH 甲醇溶液 2 mL,于 65℃ 水浴皂化 15~20 min,冷却后加入 2 mL 甲酯化液(30 mL, 47% BF<sub>3</sub> 乙醚溶液与 70 mL 甲醇混合),65℃ 水浴回流 5 min,冷却后加入正己烷 1 mL、饱和 NaCl 溶液 2 mL,摇匀后以 3 000 r/min 的转速离心 5 min。取上清液封存,以备气相色谱分析用。

脂肪酸检测:气相色谱法,采用 Agilent 6890N 气相色谱仪, FID 检测器, DB-5MS 毛细管柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm);载气为 N<sub>2</sub>,进样口温度 250℃,检测温度 260℃;程序升温,150℃ 保温 1 min,以 5℃/min 升温到 280℃ 保温 1 min,然后 10℃/min 到 300℃,保温 3 min,总运行时间 33.00 min。

## 2 结果和讨论

### 2.1 间歇式发酵

采用 1.3 及 1.4 中所述方法进行菌体培养和分析检测,发酵结果如图 1 所示。

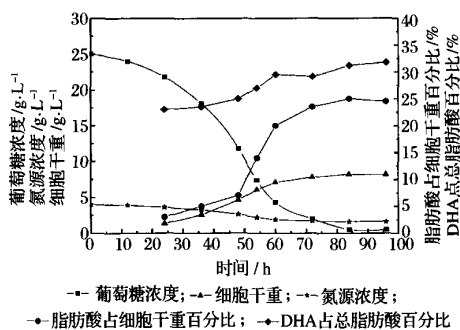


图 1 间歇式发酵中葡萄糖消耗、菌体生长、脂肪酸及 DHA 含量随时间变化曲线

结果表明,在以 25 g/L 葡萄糖为底物的隐甲藻培养过程中,随着葡萄糖的消耗,菌体干重逐渐增加,具有明显的迟滞期、指数生长期和稳定期;脂肪酸的含量随菌体干重增加而增加,尤其在指数生长期后期和稳定期前期,脂肪酸含量增长显著,是脂肪酸积累的重要时期;DHA 占总脂肪酸的含量基本维持在 20%~33%,并且在稳定期,菌体干重恒定和脂肪酸含量有稍许降低的前提下,DHA 含量有所提高,说明在该阶段有其他类的脂肪酸转变为 DHA。

间歇式发酵中,发酵结束时生物量为 8.2 g/L,转化率为 335 g(细胞干重)/kg(葡萄糖),脂肪酸含量为 2 g/L,rDHA 为 6.65 mg/(h·L)。如图 1 所示,当菌体达到稳定期时葡萄糖已消耗殆尽,而氮源仍处于较高的水平,此时葡萄糖很可能成为菌体生长的限制因子。而若在初始发酵时便加入较多葡萄糖,高浓度的葡萄糖必然对菌体生长产生抑制<sup>[8]</sup>,故需向培养液中补加一定量的底物以延长菌体的生长期而得到较高的生物量,下面将探讨在发酵过程中分批补料策略的应用。

### 2.2 流加策略研究

#### 2.2.1 流加时间的确定

结合他人研究成果,文中以葡萄糖浓度为基准,取初始葡萄糖浓度 25 g/L,采用补料的方式向培养液中添加葡萄糖液,避免生长抑制的同时尽量延长菌体的生长期。

为了探索最佳的流加时间,本试验分别在 54 h、60 h、72 h 流加 50% 的葡萄糖液至初始浓度,3 种流加方案中,补料时葡萄糖残余浓度分别为 7.4、4.3、2 g/L。

试验结果显示,在 54、60、72 h 分别向培养液中添加葡萄糖,菌体量均有所增加。但是在 54 h 流加后对菌体量影响不大,菌体量也不高,考虑到经济效益,不予采用。菌体对外界环境的改变存在一定的响应期,尤其针对生长缓慢脂肪酸合成复杂的微生物更为显著,在 72 h 流加后,84 h 的菌体量仅有少量增加,虽然后续时间菌体量接近 60 h 流加的水平,但此策略增加了发酵时间,同样经济效益不高。60 h 流加效果较明显,且菌体干重达到 12.3 g/L。因此,在 60 h 左右(葡萄糖浓度降至 4 g/L 左右)开始流加葡萄糖对菌体生长较为有利。

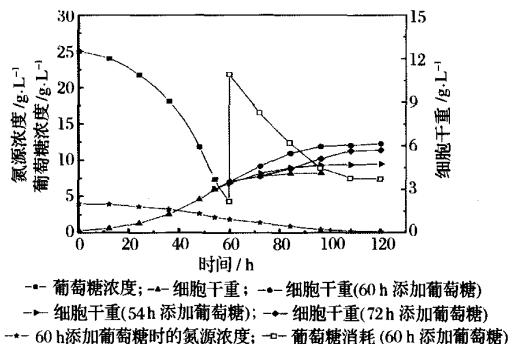


图 2 不同流加时间对细胞干重的影响

#### 2.2.2 最佳流加碳氮比确定

在流加研究中<sup>[9]</sup>,若仅向培养液中添加碳源,随着发酵的不断进行,葡萄糖的限制被解除,转入氮源

限制,不利于菌体的生长(如图2所示),因此,流加过程中除了向培养液中添加葡萄糖外,还需补充一定量的氮源(本文采用酵母膏)。为方便流加操作,采用流

加具有一定碳氮比的营养液。实验中探讨在60 h流加不同比例的葡萄糖酵母膏混合液,以寻求适当的添加比例,结果如表1。

表1 不同碳氮比流加液对细胞干重、脂肪酸含量、DHA产量的影响

序号	碳氮质量比	细胞干重 /g·L <sup>-1</sup>	脂肪酸含量 (占细胞干重)/%	DHA	
				占细胞干重百分比/%	产量/mg·L <sup>-1</sup>
0	—	12.3±0.12	27.1±0.14	8.67±0.05	1066.7±0.62
1	10:1	14.3±0.18	20.3±0.39	6.5±0.12	929.5±1.17
2	20:1	15.9±0.21	26.1±0.28	8.35±0.09	1327.7±1.75
3	30:1	16.5±0.27	28.3±0.21	9.06±0.07	1494.9±2.45
4	40:1	13.6±0.13	30.2±0.11	9.66±0.04	1313.8±1.26

注:序号0流加的营养液中不含氮源。

由表1结果得知,在流加碳氮比为30:1的营养液时,DHA产量较高,为1494.9 mg/L;10:1时,碳氮源都比较充足,菌体生长较快,但很快达到最大量,以后恒定,氮源充足却抑制了脂肪酸的积累,其含量仅占细胞干重的20%左右;40:1时,氮源受限制,虽然菌体量仅13.6 g/L,但此种情况有利于脂肪酸积累,其含量达30.2%;20:1和30:1情况下,菌体量均较高,考虑到DHA产量以及经济效益,选用碳氮比为30:1的流加方案。

2.2.3 全程连续流加策略

以葡萄糖浓度为主要参考因素,当浓度降至4 g/L左右时向反应液中添加营养液至葡萄糖浓度达25 g/L,流加5次,连续发酵135h,总糖量达140 g/L,生物量达6.37%,转化率为455 g(细胞干重)/kg(葡萄糖),脂肪酸占细胞干重的28.9%左右,DHA占总脂肪酸含量的32%左右,DHA含量达到4.08 g/L,转化率接近30 g(DHA)/kg(葡萄糖),结果如图3。且总脂肪酸中大部分为饱和脂肪酸,其他类多不饱和脂肪酸总量仅占1%左右,有利于DHA的分离提取。

达6.37%,基本实现了隐甲藻的高密度发酵,DHA含量达4.08 g/L,转化率达30 g(DHA)/kg(葡萄糖),为DHA的工业化生产提供了技术指导。

参 考 文 献

1 Lloyd A Horrocks, Young K Yeo. Health benefits of doco-hexaenoic acid(DHA) [J]. Pharmacological Research, 1999, 40(3):211~225

2 刘燕琳,石 峰,尹 玲,等. 利用海洋微藻发酵生产二十二碳六烯酸的研究[J]. 药 学 进 展, 2005, 29(12):544~549

3 Sijsma L, M E de Swaaf. Biotechnological production and applications of the w-3 polyunsaturated fatty acid docosa-hexaenoic acid[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64: 146~153

4 Colin Ratledge. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production[J]. Biochimie, 2004, 86: 807~815

5 王菊芳,梁世中,陈 峰. 隐甲藻(*Cryptocodium cohnii*)悬浮培养生产DHA[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(4):244~246

6 王菊芳. 隐甲藻 *Cryptocodium cohnii* 培养生产DHA的优化及调控研究[D]. 广州:华南理工大学博士学位论文, 2000.5

7 Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of totle lipid extrac-tion and purification[J]. Can J Biochem Phsiol, 1959, 37:911~917

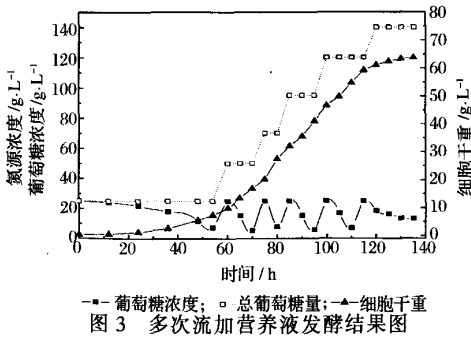
8 Martin E. de Swaaf, Theo C. De Rijk, et al, Optimisation of docosa-hexaenoic acid production in batch cultivations by *Crypthedinium cohnii* [J]. Journal of Biotechnology, 1999, 70: 185~192

9 Wen ZhiYou, Jiang Yue, Chen Feng. High cell density cul-ture of the diatom *Nitzschia laevis* for eicosapentaenoic acid production: fed-batch development [J]. Process Biochem-istry, 2002, 37: 1 447~1 453

(下转第31页)

3 结 论

探讨了 *Crypthecodinium cohnii* 发酵生产DHA的流加策略,通过5 d不间断地流加底物,细胞干重



7 Alonso L, Cuesta E P, Gilliland S E. Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin[J]. Journal of

Dairy Science, 2003, 86: 1 941~1 946

8 张亚刚, 吾满江·艾力, 文彬. 共轭亚油酸几何异构体的形成机制[J]. 新疆大学学报, 2003, 20(4): 386~389

## Optimization of Conditions of a *Lactobacillus acidophilus* Synthesizing Conjugated Linoleic Acid

Xu Fei, Wang Zhigeng, He Junpei, Xia Liming

(Institute of Animal Product Processing, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**ABSTRACT** A high conjugated linoleic acid producing mutant was screened from *Lactobacillus acidophilus* 1. 1854 after UV and abduction. The synthesis conditions were optimized using five factors quadric orthogonal rotatable design. The optimum conditions were reaction temperature 37°C, pH 4.5~5.5, the concentration of LA 0.1%, inoculation dosage 5%~7% and incubation time 24h. Under the optimum conditions the yield of CLA was 31.2%.

**Key words** *Lactobacillus acidophilus*, linoleic acid, conjugated linoleic acid, yield

(上接第 27 页)

## Fed - batch Strategy Study on High Density DHA Fermentation by *Cryptocodinium cohnii*

Ren Lujing, Jin Mingjie, Ji Xiaojun, Gao Zhen, Huang He

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT** A fed - batch process was developed for the high density culture of DHA production by *Cryptocodinium cohnii*. According to the characteristic of batch fermentation of *C. cohnii*, the optimal feeding time and optimal C to N ratio of nutrient fluid were discussed. The results showed that feeding nutrient fluid which C/N ratio was 30:1 when glucose concentration dropped to approximately 4 g/L was the most advantageous for the growth of *C. cohnii* and accumulation of fatty acid. On the basis of results above, when the initial glucose concentration was 25 g/L and feeding nutrient fluid at the period of five days culture, the maximal cell dry weight and DHA yield obtained was 6.37% and 4.08 g/L respectively.

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

市场动态

### 葡萄饮料——法国葡萄业的新出路

在过去的 10 年里,法国葡萄汁的销售额处于不断下滑的趋势。而现在,法国每个月葡萄汁的产量只有 30 000 多百升;因此,成千上万的种植葡萄的果农们,都正需求寻求新的出路。

2006 年在欧盟的赞助下,法国将 300 万 L 未能售出的葡萄酒,转变成工业用酒精;因此法国政府就保证将会提供 7 000 万欧元,用于救济那些葡萄酒的生产者们。

在法国,那些种植葡萄的果农们,正在与农业研究部门(INRA)合作,开发了一些新的葡萄产品,例如碳酸葡萄汁。就是新产品中的一种。

法国的 Pottier 公司,它所生产的葡萄苏打水,既不含酒精,但却含有丰富的丹宁(tannin),略带甜味,每公升含水果糖分少于 15g;产品用 25CL 的金属罐包装,也有密封的桶装产品。

葡萄饮料(nectar,一种汽水)的销售量比较稳定,自 2006 年起至 8 月 31 日,这种产品就已经销售了 190 万 hectolitres。而在 2005 年,这种产品的销售量,总计达 280 万 hectolitres。特别是在最后一季度里,销售情况更为旺盛。