

文章编号: 1003 - 7969(2007)06 - 0032 - 03

中图分类号: TS202

文献标识码: A

Schizochytrium sp. 发酵生产 DHA 培养基的优化

周 林¹, 卢英华^{1, 2}, 何 宁¹

(1. 厦门大学化学工程与生物工程系, 361005福建省厦门市;

2. 厦门大学福建省化学生物学重点实验室, 361005福建省厦门市)

摘要:以筛选得到的 *Schizochytrium* sp. 菌株作为研究对象, 考察了培养基碳源、氮源对该菌株生物量的影响, 通过响应面法建立了菌体生物量与葡萄糖、酵母粉以及玉米浆浓度之间的关系, 得到较佳培养基组成为: 126 g/L 葡萄糖、10 g/L 酵母膏、2 g/L 玉米浆、5 g/L 蛋白胨、0.5倍浓度自然海水 1 L。摇瓶发酵结果表明: 在 5 d 培养时间, *Schizochytrium* sp. 生物量、积累油脂以及 DHA 分别可达 42.9、34.1、13.8 g/L。

关键词: *Schizochytrium* sp.; DHA; 培养基; 响应面法; 生物量

Medium optimization for *Schizochytrium* sp. to produce docosahexaenoic acid (DHA)

ZHOU Lin¹, LU Ying-hua^{1, 2}, HE Ning¹

(1. Department of Chemical and Biochemical Engineering, Xiamen University, 361005 Fujian Xiamen, China;
2. Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen University, 361005 Fujian Xiamen, China)

Abstract: One strain of *Schizochytrium* sp. was selected as the mode microorganism to evaluate the influences of carbon and nitrogen resource on the biomass. By employing response surface method, the relationship between biomass and nutrients was founded and the optimized culture medium for *Schizochytrium* sp. was determined. The optimized medium consisted of 126 g/L glucose, 10 g/L yeast extract, 2 g/L corn steep liquor, 5 g/L soy peptone and half the salt concentration of seawater 1 L. The maximum biomass, total fatty acid and DHA reached 42.9 g/L, 34.1 g/L and 13.8 g/L on the optimized culture medium after 5 days incubation, respectively.

Key words: *Schizochytrium* sp.; DHA; medium; response surface method (RSM); biomass

二十二碳六烯酸 (DHA) 是一种极其重要的 $n-3$ 系列高度不饱和脂肪酸, 具有多种重要生理功能^[1, 2], 已被开发成各种药物、功能食品和化妆品等^[3~5], 呈现巨大的市场。

目前, 深海鱼油是 DHA 的主要来源。由于鱼油 DHA 含量相对较低、油的品质不稳定、易受捕捞时间和地域等诸多因素的影响, 不能满足日益增长的市场需求, 探求新的 DHA 资源就显得十分迫切。微生物因其生长易于调控、易于大规模培养等优点, 有望成为高纯度 DHA 的又一有效来源。不足之处是生物量相对较低。

本研究从筛选得到的 *Schizochytrium* sp. 入手,

通过考察培养基中主要成分对其生物量的影响, 设计适合 *Schizochytrium* sp. 发酵的培养基, 以期微生物来源 DHA 的工业化生产打下一定的基础。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

Schizochytrium sp. 系本课题组筛选所得。种子培养基: 30 g/L 葡萄糖, 10 g/L 酵母膏, 0.5倍浓度自然海水。发酵培养基: 葡萄糖、酵母膏、大豆蛋白胨以及玉米浆, 其用量由实验确定, 其他成分组成为 0.5倍浓度自然海水。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 种子培养: 将保藏于 -71°C 的菌种转接于平板加适量海水封盖, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4~5 d。然后取 3~5 mL 经活化的菌种, 接入装有 100 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 2 d。

摇瓶发酵: 取 5 mL 种子液接入装有 50 mL 发酵

收稿日期: 2007 - 01 - 22; 修回日期: 2007 - 04 - 09

作者简介: 周 林 (1980 -), 男, 在读硕士; 主要从事生物化工方面的研究工作。

培养基的 250 mL三角瓶, 25 、200 r/min培养 3 d。
 1.2.2 生物量的测定 取一定量的发酵液, 8 000 r/min, 4 冷冻离心 10 min后移至已知恒重的平板, 于 - 0.09 ~ - 0.1 MPa, 55 ~ 65 真空干燥 24 h, 称重计数。

1.2.3 DHA的测定

1.2.3.1 油脂的提取 取一定量的发酵液 8 000 r/min, 4 冷冻离心 10 min得湿菌体, 加入 CH₃Cl₃ - CH₃OH (2:1) 10 mL抽提油脂。重复 2 ~ 3次直到抽提液无色, 然后于 - 0.09 ~ - 0.1 MPa 45 ~ 50 真空干燥 5 ~ 6 h, 称重。

1.2.3.2 甲酯化处理 取一定量的油脂和花生酸, 置于 50 mL的磨口三角瓶中, 分别加入 10 mL 0.8 mol/L的 KOH - CH₃OH 溶液和 (C₂H₅)₂O - BF₃ 溶液, 于 65 水浴回流 10 min进行皂化, 冷却后加入 15 mL正己烷振荡, 然后加入足量的饱和食盐水, 静置分层后取上层正己烷相, 抽取上层, 并加入无水硫酸钠脱水。

1.2.3.3 气相色谱分析^[6] 选用 Agilent DB - WAX色谱柱 (30 m ×0.25 mm)。采用程序升温: 初始温度 180 , 保持 2 min, 然后按 6 /min升到 240 , 保持 15 min。柱压 100 kPa, 进样口温度 220 , 检测器温度 240 。用内标法定量, 内标为花生酸。

2 结果与讨论

2.1 培养基中不同成分对 *Schizochytrium* sp. 生物量的影响

以基础发酵培养基为初始培养基, 以葡萄糖 (x₁)、酵母粉 (x₂)、玉米浆 (x₃)、蛋白胨 (x₄) 为实验因子, 生物量 (y) 为响应值, 进行部分因子实验, 对实验结果进行一元线性回归可得如下方程:

$$y = 13.286 + 2.688x_1 + 0.309x_2 - 0.364x_3 + 0.136x_4 \quad (1)$$

由该方程的方差分析得, $F = 78.389 > F_{4, 15, 0.01} = 4.89$, 说明该模型的概率在 $\alpha = 0.01$ 的水平上差异显著, 复相关系数 $R^2 = 0.954$, 表明近 95.4% 的实验数据可以用该模型解释。4个实验因子对菌体生长的影响依次是 $x_1 > x_3 > x_2 > x_4$, 其中 x_4 (Sig = 0.392) 较其他因子对菌体生物量的影响较小, 将其含量固定在 5 g/L 进行最陡爬坡实验。

2.2 最陡爬坡路径的选择

在 2.1 回归得到的模型基础上, 进行爬坡实验。葡萄糖 (x₁) 和酵母膏 (x₂) 系数为正, 所以增加两者的浓度, 而玉米浆 (x₃) 系数为负, 减少玉米浆的用量。实验设计及结果见表 1。

表 1 爬坡路径及结果

| 实验号 | 葡萄糖 x ₁ (g/L) | 酵母粉 x ₂ (g/L) | 玉米浆 x ₃ (g/L) | 生物量 y (g/L) |
|-----|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------|
| 1 | 30 | 5 | 5 | 14.182 |
| 2 | 60 | 6 | 4 | 23.926 |
| 3 | 90 | 7 | 3 | 32.129 |
| 4 | 120 | 8 | 2 | 33.936 |
| 5 | 150 | 9 | 1 | 28.361 |
| 6 | 180 | 10 | 0 | 16.522 |

由表 1 可知, 随着培养基中各成分含量的改变, 菌体生物量也随之改变。实验 4 对应的菌体生物量达到最大, 随后菌体量又有所降低, 说明该范围已接近最优的浓度范围, 确定以实验 4 中各成分的浓度进行下面的优化实验。

2.3 培养基的优化

用中心组合设计对培养基中关键组分葡萄糖 (x₁)、酵母膏 (x₂) 以及玉米浆 (x₃) 浓度进行优化, 实验设计及结果见表 2。

表 2 中心组合设计实验结果以及实验观测值与模型预测值的比较

| 葡萄糖 x ₁ | 酵母粉 x ₂ | 玉米浆 x ₃ | 生物量 y | |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------|--------|
| | | | 实验值 | 预测值 |
| -1 | -1 | -1 | 31.339 | 29.995 |
| 1 | -1 | -1 | 32.864 | 32.566 |
| -1 | 1 | -1 | 33.337 | 32.949 |
| 1 | 1 | -1 | 34.386 | 34.455 |
| -1 | -1 | 1 | 29.838 | 29.393 |
| 1 | -1 | 1 | 31.368 | 31.379 |
| -1 | 1 | 1 | 33.703 | 34.135 |
| 1 | 1 | 1 | 34.598 | 35.565 |
| -1.682 | 0 | 0 | 27.668 | 28.524 |
| 1.682 | 0 | 0 | 31.787 | 31.461 |
| 0 | -1.682 | 0 | 29.300 | 30.653 |
| 0 | 1.682 | 0 | 37.480 | 36.658 |
| 0 | 0 | -1.682 | 32.939 | 34.226 |
| 0 | 0 | 1.682 | 35.409 | 34.653 |
| 0 | 0 | 0 | 36.526 | 36.086 |
| 0 | 0 | 0 | 36.140 | 36.086 |
| 0 | 0 | 0 | 35.760 | 36.086 |
| 0 | 0 | 0 | 35.928 | 36.086 |
| 0 | 0 | 0 | 36.368 | 36.086 |
| 0 | 0 | 0 | 35.886 | 36.086 |

利用 SPSS 12.0 统计软件对表 2 中实验数据进行拟合, 得到以菌体生物量为响应值的多元回归拟合二次模型:

$$y = 36.086 + 0.873x_1 + 1.785x_2 + 0.127x_3 - 2.154x_1^2 - 0.859x_2^2 - 0.582x_3^2 - 0.139x_1x_2 - 0.0186x_1x_3 + 0.447x_2x_3 \quad (2)$$

模型二次项系数为负值, 开口向下。复相关系数达到 0.929, 表明模型数据与实验拟合程度较好。

变量分析和方差分析结果见表 3、表 4。

表 3 实验变量分析

| 项 目 | 系数 | 标准方差 | t | Sig |
|----------|---------|-------|--------|-------|
| 常数 | 36.086 | 0.407 | 88.686 | 0.000 |
| x_1 | 0.873 | 0.270 | 3.235 | 0.009 |
| x_2 | 1.785 | 0.270 | 6.661 | 0.000 |
| x_3 | 0.127 | 0.270 | 0.471 | 0.648 |
| x_1^2 | -2.154 | 0.263 | -8.197 | 0.000 |
| x_2^2 | -0.859 | 0.263 | -3.270 | 0.008 |
| x_3^2 | -0.582 | 0.263 | -2.215 | 0.051 |
| x_1x_2 | -0.139 | 0.353 | -0.394 | 0.702 |
| x_1x_3 | -0.0186 | 0.353 | -0.053 | 0.959 |
| x_2x_3 | 0.447 | 0.353 | 1.267 | 0.234 |

表 4 实验方差分析

| 来 源 | 平方和 | D. F. | 均方 | F | Sig |
|------------|---------|-------|--------|--------|-------|
| Regression | 130.224 | 9 | 14.469 | 14.537 | 0.000 |
| Residual | 9.953 | 10 | 0.995 | | |
| Total | 140.178 | 19 | | | |

注： $R^2 = 0.929$, $F = 14.537 > F_{3,16,0.01} = 5.29$ 。

为更直观地描述培养基中各组分对 *Schizochytrium* sp. 生物量的影响,做出模型 (2) 的二维等高图 (见图 1),另一维变量的编码值取 0 水平。由等高图可以确定最佳发酵培养基为: 126.20 g/L 葡萄糖, 10.08 g/L 酵母膏, 2.06 g/L 玉米浆,考虑到实际配制的方便,得到较佳培养基组成为: 126 g/L 葡萄糖、10 g/L 酵母膏、2 g/L 玉米浆、5 g/L 蛋白胨、0.5 倍浓度自然海水 1 L。

