

裂殖壶菌产脂肪酸和二十二碳六烯酸的研究进展

郭 姝 何万领* 李晓丽

河南科技大学动物科技学院微量元素与生物健康实验室,河南洛阳 471023

摘要 随着二十二碳六烯酸(DHA)在食品和畜牧业上优势的日益体现,人们投入大量的人力与技术在其来源及其一系列相关的研究方面。本文就二十二碳六烯酸含量较高的裂殖壶菌的菌种诱变及提取脂肪酸的工艺(破壁和发酵)进行综述,阐述了裂殖壶菌发酵产DHA的研究进展,并指出了微量元素对裂殖壶菌产DHA的影响,以期裂殖壶菌工业化生产DHA并在饲料中推广使用提供参考。

关键词 裂殖壶菌;二十二碳六烯酸;诱变;破壁;发酵

二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)是一种重要的 ω -3脂肪酸,由于可以促进大脑发育、减少产后抑郁、治疗癌症、抑制发炎、改善老人痴呆等,被用于保健品和食品中。同时因为对于婴幼儿智力及视力发育尤其重要,成为某些品牌奶粉的最大卖点。近年来研究发现,DHA可以改善畜禽的生产性能,产出含DHA的畜产品,对畜牧业也有着深远的影响。海洋微藻是DHA的直接来源且经济环保。现阶段微藻的培养技术日益成熟,不仅油脂含量高而且产量稳定,通过发酵微藻来提取油脂制备DHA已经成为了研究的热点方向。其中,裂殖壶菌因为可以生产多种不饱和脂肪酸,并具有非常高的脂质百分比而成为获取DHA的最佳选择。关于裂殖壶菌产脂肪酸的研究主要涉及诱变、破壁、发酵、金属离子的影响、培养条件和提取技术几个方面,但总结性报告较少。为此,本文梳理概述裂殖壶菌在生产脂肪酸方面的相关技术,以期海洋微藻的研究和DHA行业的后续发展提供参考。

1 裂殖壶菌的诱变

诱变是指通过控制外部环境条件诱使遗传基

因随之变异,然后在产生的变异株中选出实验所需要的优良品种。诱变通常可以大致分为物理诱变和化学诱变。物理诱变指利用射线、微波或激光等来处理菌株,因此也称为辐射育种。在物理诱变中,应用最广泛的2种方法是紫外诱变和常压室等离子体诱变。化学诱变是使用一些化学药物促使菌株的遗传物质发生改变,这些化学药物也称为诱变剂。化学诱变的诱变剂主要包括某些烷化剂、抗生素、碱基类似物等,常见的诱变剂有硫酸二乙酯、甲基磺酸乙酯、乙烯亚胺和叠氮化钠等。

1.1 常压室等离子体(ARTP)诱变

常压室等离子体(ARTP)是近几年新提出的一种大气压辉光放电冷等离子体源。它能够在大气压下产生温度在25~40℃的、具有高活性粒子浓度的等离子体射流,可以在与组织或者细胞之间发生如催化、诊断、激发反应等复杂而可控的生化过程,因而广泛应用于诱变育种。ARTP在生物领域的应用有如下优点:效率高,成本低,操作简单,绿色环保等优点^[1]。

研究表明,ARTP诱变可用于苏云金芽孢杆菌及其他菌种提高高产率^[2]。袁军等^[3]将编号为

收稿日期:2021-04-02

*通讯作者

郭 姝,女,1996年生,硕士。

ATCC20888 原始裂殖壶菌菌株的悬浮液经过 ARTP 处理后,在 2,2'-联吡啶平上板培养,发酵培养所有突变菌株并通过磷酸香草醛油脂快速检测法和气相色谱分析,最后选育出的 DHA 高产菌株油脂中的主要饱和脂肪酸含量明显下降,而不饱和脂肪酸含量明显增加。

1.2 紫外诱变

紫外线是一种非电离辐射,可以通过促使 DHA 分子形成嘧啶二聚体,减弱双键间氢键的作用,并引起双螺旋结构扭曲变形,还可以引起碱基转换、颠换、移码突变或缺失^[4]。目前紫外诱变已经广泛用于多种菌种。高若珊等^[5]通过紫外诱变的方式获得了 4 株比原始菌株耐热性、产酸性更好的菌株,可以在 75 °C 的温度 30 min 以后依然保持较好的活力和产酸能力,其中编号为 1.1801-1912Z 的菌株比原菌种产酸量提高了 31.05 g/L。田磊等^[6]紫外诱变筛选小柴旦盐湖盐单胞菌得到产量超过原始菌株 2 倍的正向突变菌株。刘荟^[7]经 38 W 的紫外灯下,诱变距离 20 cm 对小球藻 CS-510 进行紫外诱变,筛选得到的藻株发酵以后的生物量和油脂含量分别比出发菌株提高了 11.3% 和 34.3%。许永等^[8]通过采用紫外诱变选育出的两株突变裂殖壶菌的菌株,其生物量和 DHA 含量分别较对照组高 8.08%、11.57% 和 13.74%、28.75%。

1.3 复合诱变

在长期使用诱变剂之后,菌株很容易产生“疲劳效应”。这种效应会延长菌株的生长周期、减少孢子量、减慢代谢等,对发酵工艺的控制极其不利。为了避免这种情况的产生,在实验过程中可以采用几种诱变剂复合处理或者交叉处理菌株的方法进行诱变。复合诱变包括:先后使用两种及以上诱变剂,重复使用同一种诱变剂和同时使用两种及以上的诱变剂。一般认为,复合诱变可以产生协同效应,假如使用两种及以上诱变剂进行合理搭配使用远比一种诱变剂的诱变效果好。

李慧玲等^[9]通过对裂殖壶菌进行紫外线和硫酸二乙酯的复合因素的诱变,通过筛选培育以后获得一株正向突变的优势菌株,在相同的条件下发酵培养,比原始菌种的生物量、油脂和 DHA 产量分别提高了 7.54%、16.65%、48.79%。赵犇等^[10]对裂殖壶菌的原始菌株进行甲基磺酸乙酯和 ARTP 复合诱变,并将通过 2 种因素复合诱变选育出来的菌株与 2 种

单因子分别诱变筛选出来的菌株进行比较。结果显示,复合诱变的正突变率达到 32.2%,远高于 2 种单因子诱变;复合诱变选育出的裂殖壶菌菌株,其 DHA 产量和 DHA 在油脂中的比例比原始菌株分别高 35.6% 和 19.2%。李悦明等^[11]用化学试剂亚硝基胍和紫外线相结合的方式对生产用裂殖壶菌进行诱变,筛选得到一株优势突变菌株。其油脂含量和 DHA 含量比出发菌株分别提高 17% 和 14%。

2 裂殖壶菌的破壁与油脂提取

裂殖壶菌的细胞壁很难被破碎,因此发酵培养以后的油脂提取率较低^[12]。在科学实验或者生产实践的过程中,选择哪种方法来破碎裂殖壶菌的细胞壁,对油脂的得率和品质有着重大影响,同时也决定油脂提取的生产成本。因而找出高效、便捷和绿色环保的细胞破碎方法,对 DHA 产业未来的发展具有深远的意义。

目前,破壁的方法主要有酸热法、生物酶法、均质法、蒸爆法、超声法、反复冻融法、微波法、真空冷冻干燥后提取和喷雾干燥后提取法。研究表明,与其他方法相比,酸热法和生物酶法不仅操作便捷,而且提取的油脂含量和 DHA 含量也最高,但是缺点是若大规模使用酸热法提取油脂较为耗能;生物酶解法不仅破壁效果好,油脂得率高,还具有比其他方法明显的优越性,在酶解过程中,成本较低,绿色环保,因此,适宜进行大规模油脂提取^[13-14]。均质法、蒸爆法和超声法提取的油脂含量与酸热法和酶解法相比较低。从工业化的角度来看,超声法破壁提取油脂对于设备要求比较高,蒸爆法则耗能耗时,相比之下均质法则较为理想,油脂中 DHA 含量仅次于酸热法和酶解法。其他的破壁方法如反复冻融法、喷雾干燥法和真空冷冻干燥的破壁效果均不理想。

3 裂殖壶菌的发酵

发酵指通过微生物在有氧或无氧条件下的生长发育来制备菌体自身或代谢产物的过程。微生物发酵的生产水平依赖于菌种自身的特性、发酵培养基组成和发酵的环境条件^[15]。现阶段国际上对于裂殖壶菌的研究主要集中在发酵条件的优化,如碳源、氮源、碳氮比、无机盐以及溶氧量、pH 等方面的研究^[16-18]。裂殖壶菌的培养主要分为细胞生长、分

裂阶段和脂质积累阶段,因此采用两步发酵法即采用分批发酵培养和培养条件改变,可以实现高密度发酵和油脂的大量积累^[19]。在细胞生长、分裂阶段需要提供足够的营养以满足细胞生长繁殖的蛋白质、核苷等的合成。

裂殖壶菌的生物量、油脂产量及 DHA 的积累受到多方面发酵因素的影响。碳源和氮源的添加量和添加比例对油脂的合成有重要影响。研究显示,在发酵过程中补糖可以提高发酵后裂殖壶菌的生物量,促进油脂和 DHA 的积累,但糖浓度不宜太高,否则会抑制裂殖壶菌的发酵^[20-22]。在裂殖壶菌的发酵过程中,溶氧量也是生产油脂、积累 DHA 的重要影响因素之一。在裂殖壶菌合成不饱和脂肪酸的过程中,氧的有效供给促进不饱和脂肪酸代谢过程中的去饱和反应,从而直接决定油脂中脂肪酸的组成和含量^[23]。但是为获取足够的溶氧量生产 DHA 而在发酵过程中采取通气培养,也会产生大量泡沫,添加消泡剂可以解决这个问题,但会在一定程度上抑制菌体生长^[24]。研究表明,在转速和装液量都相同的条件下,在挡板三角瓶中进行发酵比在普通三角瓶,溶氧量更高,因而在挡板摇瓶中发酵的裂殖壶菌的油脂含量更高,发酵时间更短^[25]。另外,pH 也是研究最多的影响发酵效果的关键因素之一^[26],发酵培养基的酸碱度将直接影响菌体的生长及代谢产物的合成。有研究发现,前 4 d 的发酵培养基的 pH 值控制在 3,后 2 d 控制为 5 时,总脂肪酸和 DHA 的产量较大^[27]。除此之外,还有很多添加剂对裂殖壶菌的发酵具有促进作用。任路静等^[28]的实验表明,在裂殖壶菌的发酵培养基中添加生物素,可以有效促进油脂积累,浅蓝菌素可以提高 DHA 及不饱和脂肪酸含量,适当添加 VB₁、VB₃、VB₆、VB₁₂ 对 DHA 积累也有促进作用,与生物素复合使用以后促进作用更加明显。VB₁₂、生物素、VB₁、VB₆、VB₃ 按照一定的质量浓度加入发酵培养基中,96 h 以后生物量和 DHA 产量分别比对照组提高了 16.4% 和 53.8%^[29]。此外,柠檬酸和苹果酸也对 DHA 的产量有积极影响^[30]。

研究表明,微量元素大都对微生物生产性能有所影响。曹宪周等^[31]发现,Ca²⁺、Fe²⁺和 Cu²⁺可以促进酵母的生长。而裂殖壶菌自身不仅含有丰富的 Mg、Ca、Na、Fe 等元素,并含有少量的 Cu、Mn、K、Zn、Al^[32],可见微量元素是裂殖壶菌生长过程中必不可

少的因素。金属离子可以直接影响菌体中合成脂肪酸的酶的活性,因此对金属离子的研究具有很重要的现实意义。但是现阶段关于金属离子对裂殖壶菌发酵生产 DHA 影响的研究仍然较少。

4 研究展望

随着生活水平的提高,人们越来越注重营养和保健,而 DHA 可以促进大脑发育,改善视力,具有广阔的应用前景和发展潜能。目前的研究结果表明,我国在裂殖壶菌油脂产量和 DHA 含量方面的研究成果与国外相比仍有很大差距。因此,今后应当重点诱变选育高产量的菌株,深入优化裂殖壶菌的发酵工艺,提高生物量、油脂产量和 DHA 含量。同时尽快推广应用于食品和饲料,最大地发挥其市场价值。

参 考 文 献

- [1] 李翔. 等离子体诱变微生物育种[J]. 现代商贸工业, 2017 (35): 195-196.
- [2] 廖先清, 周荣华, 刘芳, 等. 常压室温等离子体(ARTP)诱变快速选育对亚洲玉米螟高毒的苏云金芽孢杆菌突变株[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(21): 235-238.
- [3] 袁军, 赵彝, 孙梦玉, 等. 常压室温等离子体(ARTP)诱变快速选育高产 DHA 的裂殖壶菌突变株[J]. 生物技术通报, 2015, 31(10): 199-204.
- [4] 韩丽丽, 刘敏. 诱变方法在微生物育种中的应用[J]. 酿酒, 2008(3): 16-18.
- [5] 高若珊, 王冰, 范洪臣, 等. 酸浆豆腐中产酸菌的耐高温紫外诱变[J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(1): 137-143.
- [6] 田磊, HALOMONAS S P.XH26 菌株紫外诱种及 Ectoïne 高效积聚基因簇分子差异分析[D]. 西宁: 青海大学, 2020.
- [7] 刘荟. 一株小球藻的育种及内置光源型生物反应器扩大培养[D]. 石家庄: 河北经贸大学, 2020.
- [8] 许永, 臧晓南, 徐涤, 等. 裂殖壶菌诱变筛选的研究[J]. 中国海洋大学学报, 2012, 42(12): 54-58.
- [9] 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.
- [10] 赵彝, 王武, 李昌灵, 等. EMS-ARTP 复合诱变选育高产 DHA 裂殖壶菌[J]. 食品与机械, 2018, 34(2): 19-24.
- [11] 李悦明, 徐建春, 孙慧彬, 等. 利用胞内核磁共振法快速筛选高产 DHA 裂殖壶菌的研究[J]. 发酵科技通讯, 2015, 44(2): 20-23.
- [12] 刘俊果, 董尧坤, 张园园. 微藻细胞破壁方法研究进展

- [J].河北科技大学学报,2020,41(3):257-267.
- [13] 朱婧瑶,张红漫,胡耀池,等.面向工业化的裂殖壶菌 DHA 油脂提取方法研究[J].食品科技,2011(9):32-35.
- [14] 王勇.裂殖壶菌 DHA 油脂分离提取技术研究[D].武汉:华中科技大学,2014.
- [15] 王岳五,陈宁.微生物遗传学实验方法和技术[M].天津:南开大学出版社,1989.
- [16] GANUZA E, ANDERSON J, RATLEDGE C. High-cell-density cultivation of *Schizochytrium* sp.in an ammonium/pH-auxostat fedbatch system[J]. Biotechnol Lett, 2008(30):1559-1546.
- [17] UNAGUL P, ASSANTACHAI C, PHADUNGRUENGLUI S, et al. Biomass and docosahexaenoic acid formation by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02 at low salt concentrations [J].Botanica marina, 2006(48):182-190.
- [18] ZHOU L, LU Y H, ZHOU M H. Enhanced production of docosahexaenoic acid using *schizochytrium* sp.by optimization of medium components[J].Journal of chemical engineering of Japan, 2007, 40(12):1093-1100.
- [19] 魏萍,马小琛,任路静,等.裂殖壶菌发酵生产 DHA 的研究进展[J].食品工业科技,2010(10):398-404.
- [20] 赵书林,蔡双山,夏木阳,等.裂殖壶菌补糖发酵研究[J].中国油脂,2017,42(2):113-115.
- [21] 陈丽珠,凌雪萍,敬科举,等.流加培养裂殖壶菌发酵生产二十二碳六烯酸[J].厦门大学学报(自然科学版), 2009,48(1):84-88.
- [22] 班甲,陈俊佳,付尽国,等.裂殖壶菌高密度发酵生产 DHA[J].广东化工,2016,43(22):63-66.
- [23] CHANG G F, WU J, JIANG C H, et al. The relationship of oxygen uptake rate and KL a with rheological properties in high cell density cultivation of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp.S31[J].Bioresource technology, 2014(152):234-240.
- [24] 黎丽,窦光鹏,霍文严,等.裂殖壶菌发酵产 DHA 油脂的生产工艺优化[J].中国油脂,2015,40(6):77-81.
- [25] 廖利民,曾娟,杜雪莉,等.基于裂殖壶菌发酵培养的小试反应器比较[J].食品研究与开发,2016,37(22):102-105.
- [26] SHAFIQ M, ZEB L, CUI G, et al. High-Density pH-Auxostat Fed-Batch culture of *Schizochytrium limacinum* SR21 with acetic acid as a carbon source[J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2020, 192(4):138-145.
- [27] 贾俊乾,张秋红,陆向红,等.pH 值对裂殖壶菌发酵生产二十二碳六烯酸的影响[J].生物学杂志,2015,32(4):16-19.
- [28] 任路静,魏萍,冯云,等.添加生物素和浅蓝菌素对裂殖壶菌发酵产 DHA 的影响[J].生物加工过程,2012,10(1):42-45.
- [29] 周立树,沈健增,蔡宇杰,等.维生素对裂殖壶菌发酵产 DHA 的影响[J].食品与生物技术学报,2013,32(9):927-932.
- [30] 张明亮,江贤章,吴松刚,等.裂殖壶菌高密度培养生产 DHA 的发酵工艺研究[C]//华东六省一市生物化学与分子生物学学会.华东六省一市生物化学与分子生物学学会 2014 年学术交流大会暨浙江省第十一届学会会员代表大会论文集.温州:大会组委会,2014:32.
- [31] 曹宪周,杨兆明,刘长虹,等.不同微量元素对酵母菌在玉米糖化液中生长的影响[J].河南工业大学学报(自然科学版),2008,29(2):27-29.
- [32] 宋泽,彭雍博,宋悦凡,等.裂殖壶菌营养成分及其多糖特征分析[J].大连海洋大学学报,2019,34(2):247-251.

【责任编辑:刘少雷】