

# 硅藻变温发酵生产二十碳五烯酸的研究\*

曹小红\*\* 赵玉华 鲁梅芳 雷 静 王春玲

(天津科技大学 食品工程与生物技术学院 天津市食品营养与安全重点实验室 天津 300457)

**摘要** 考察不同温度(10℃~30℃)对硅藻(*Nitzschia laevis*)合成二十碳五烯酸(EPA)的影响,对不同温度下的发酵过程进行动力学特性分析。在此基础上,提出了EPA合成的变温培养方法:延滞期及对数期初期温度控制在25℃,从对数期中期开始在20℃条件下进行培养。采用此变温培养进行发酵,EPA的含量和产量分别达到了6.00%和291.60 mg/L,较采用单一温度(25℃)发酵的最大值分别提高了24.07%和18.81%。

**关键词** 二十碳五烯酸 EPA 硅藻 *Nitzschia laevis* 变温发酵

**中图分类号** Q93-335

二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)对防治心血管疾病、动脉硬化、癌症、风湿性关节炎、气喘和糖尿病等人类病症有明显效果<sup>[1,2]</sup>,成为 $\omega$ -3高度不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFA)领域研究的焦点<sup>[3,4]</sup>。由于深海鱼油生产PUFA的高成本、产量不稳定<sup>[5,6]</sup>等问题,人们将研究方向转至微生物生产PUFA,尤其是海洋微藻。深海鱼类是通过摄食微藻获得PUFA<sup>[7-9]</sup>,微藻是PUFA的最直接生产者,用微藻生产PUFA具有组成单一,提取较容易,无腥臭味,不含胆固醇等优点<sup>[10-12]</sup>。

硅藻(*Nitzschia laevis*)是一种单细胞藻类,属于硅藻门(*Bacillariophyta*),羽纹硅藻纲(*Pennaeae*),双菱藻目(*Surirellales*),菱形藻属(*Nitzschia*)<sup>[13]</sup>,是迄今为止人们发现的唯一一种能在异养条件下产出比自养条件下更多EPA的海洋微藻<sup>[14]</sup>。近年来,对于在异养条件下影响其细胞生长和EPA产量的因素已被较深入地研究<sup>[15-17]</sup>。

本论文以*Nitzschia laevis* UTEX 2047为藻种,考察了不同温度条件对硅藻*Nitzschia laevis*合成EPA的影响,对不同温度下的发酵过程进行动力学特性分析,综合考虑温度对细胞生长和EPA合成的影响,提出了变温发酵生产EPA的方法,为发酵生产工艺的设计提供了理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 藻种 硅藻(*Nitzschia laevis* UTEX 2047),购于美国德克萨斯大学藻种库。

1.1.2 培养基 参考LDM培养基并有所改进: Glucose 15g/L, NaNO<sub>3</sub> 1.5g/L, NaSiO<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O 0.15g/L, P<sub>IV</sub> metal solution (Na<sub>2</sub>EDTA 0.75 g/L, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 97mg/L, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 41mg/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5mg/L, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 2mg/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 4mg/L) 6ml, Bristol solution (NaNO<sub>3</sub> 0.25g/L, CaCl<sub>2</sub> 18.8mg/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 75 mg/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 75 mg/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.175g/L, NaCl 25mg/L) 100ml。培养基在121℃下灭菌20min。

1.1.3 EPA标准样品 购自美国Sigma公司。

### 1.2 方法

1.2.1 培养方法 (1)种子培养 将藻种从斜面接入种子培养基中,制备三级种子液,25℃,120r/min,避光培养。(2)摇瓶发酵培养 以10%(V/V)接种量接种于发酵培养基中,500ml三角瓶中装200ml发酵液,120r/min,发酵过程中,延滞期及对数期初期温度控制在25℃,从对数期中期开始将温度调至20℃,避光培养。

1.2.2 分析方法 (1)藻细胞生物量的测定 取10ml发酵液,于4000 r/min离心10min,弃上清液,离心洗涤两次,收集藻泥,25℃鼓风干燥12h,以干藻粉重量计算细胞

收稿日期:2007-08-09 修回日期:2007-10-26

\* 天津市应用基础研究项目基金资助项目(05YFJJC00700)

\*\* 电子信箱: zhyhtsh@163.com

生物量。(2)EPA 产量的测定 用气相色谱法对藻细胞中 EPA 含量进行定量。色谱条件为:毛细管柱 SE-54,柱长 30m,柱温 200℃,FID 检测器,检测器和进样口温度 280℃,进样量 1μl,N<sub>2</sub> 流速 1ml/min,空气流速 400 ml/min,H<sub>2</sub> 流速 30ml/min,尾吹流量 30ml/min。(3)葡萄糖含量的测定 3,5-二硝基水杨酸法,回归方程为  $Y = 1.4386X + 0.0142$  ( $R^2 = 0.9999$ ) 其中  $Y$  为葡萄糖浓度(g/L), $X$  为 OD<sub>540</sub> 值。(4)不同温度下 *Nitzschia laevis* 细胞生长及合成 EPA 的动力学特征 在摇瓶水平考察了不同温度下的细胞生长、底物消耗及产物含量变化,并对发酵过程的动力学参数进行处理,得到了不同温度下的动力学参数变化曲线。细胞比生长速率计算公式为  $K = (\lg x_2 - \lg x_1) / 0.301 \times (t_2 - t_1)$ , EPA 比合成速率计算公式为  $\mu = (\lg P_2 - \lg P_1) / 0.301 \times (t_2 - t_1)$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 温度对藻细胞生长的影响及分析

图 1 显示,当温度控制在 10℃、15℃ 和 30℃ 时,细胞分裂受到严重抑制,几乎停止生长,最大细胞浓度仅为 0.8g/L、0.89g/L 和 1.2g/L。20℃ 和 25℃ 时细胞生长情况相似,前 3 天细胞生长缓慢,第 4 天开始进入对数生长期,第 5 天生长速度最快,第 7 天则进入了稳定期,第 6 天获得最大细胞浓度(20℃ 为 3.3g/L,25℃ 为 4.26g/L)。由此可知,25℃ 最适宜藻细胞生长。图 2 表明,温度对比生长速率影响较大,20℃ 和 25℃ 时  $K$  值随时间变化趋势相似, $K_{max}$  均出现在指数生长期中期,但 25℃ 时  $K$  值较 20℃ 时高。稳定期持续 2 天,比生长速率为零,随后进入衰亡期,因细胞自溶速率大于细胞生长速率, $K$  为负值(负值部分图中未显示)。

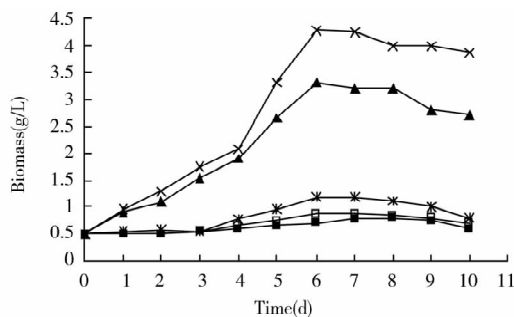


图 1 *Nitzschia laevis* 在不同培养温度下生长情况

—■—10℃ —□—15℃ —▲—20℃ —×—25℃ —\*—30℃

Fig.1 The growth of *Nitzschia laevis* under different cultured temperature

### 2.2 温度对 EPA 合成的影响

图 3 和图 5 表明,不同温度下 EPA 的含量及合成

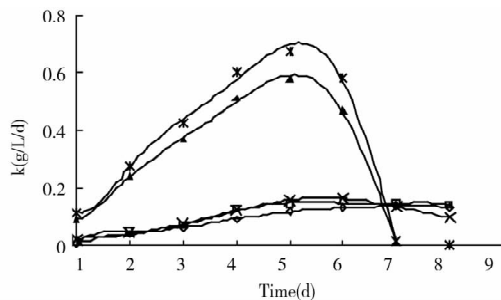


图 2 *Nitzschia laevis* 在不同培养温度下比生长速率的变化情况

—◆—10℃ —□—15℃ —▲—20℃ —\*—25℃ —×—30℃

Fig.2 The compare of specific growth rate of *Nitzschia laevis* under different cultured temperature

速率差别较大,但 20℃ 和 25℃ 培养时变化趋势相似,EPA 含量在对数生长期后期达到最大,稳定期初期基本保持不变,在稳定期后期则开始下降; $\mu_{max}$  则出现在指数生长期中期,20℃ 培养时  $\mu$  和 EPA 含量均较其它温度培养时高。但图 4 显示,EPA 产量的峰值是在 25℃ 培养的指数末期,较 20℃ 时高 13.36%。温度控制在 30℃ 时,EPA 比合成速率最低。结合图 1 与图 2 可知,细胞最高产量及最大生长速率出现在 25℃,而 EPA 最高比合成速率出现在 20℃。

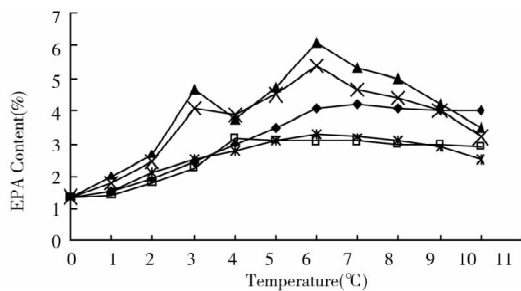


图 3 不同培养温度下 EPA 含量的变化情况

—◆—10℃ —□—15℃ —▲—20℃ —×—25℃ —\*—30℃

Fig.3 EPA content-time curves under different cultured temperature

### 2.3 温度对葡萄糖消耗的影响

图 6 表明,10℃、15℃ 和 30℃ 时葡萄糖消耗相对较少,20℃ 和 25℃ 时葡萄糖浓度变化情况相似,在指数生长中期消耗速度最快,分别从 5.62g/L 和 5.64g/L 降到 1.51g/L 和 1.39g/L,此后葡萄糖浓度变化很小。结合图 1 和图 2 可知,细胞生长和 EPA 合成速度最快时也是葡萄糖消耗速度最大时。

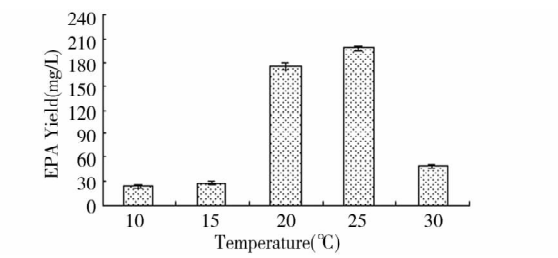


图 4 不同培养温度下 EPA 产量的变化情况

Fig.4 EPA yield under different cultured temperature

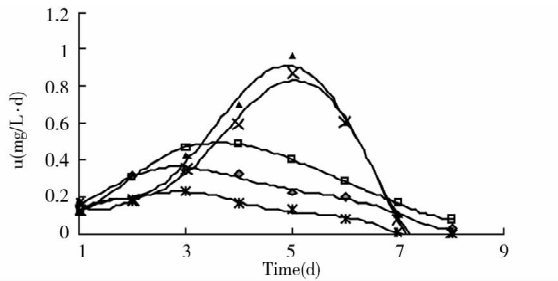


图 5 EPA 比合成速率随培养时间的变化情况

◆:10℃ —□—:15℃ —▲—:20℃ —×—:25℃ —\*—:30℃

Fig.5 Time courses of EPA specific formation rate

2.4 变温发酵方法的提出与验证

一般情况下,最适发酵温度是既适合微生物生长又适合代谢产物合成的温度,但往往最适生长温度和最适生产温度不一致,因此,在不同的发酵阶段控制相

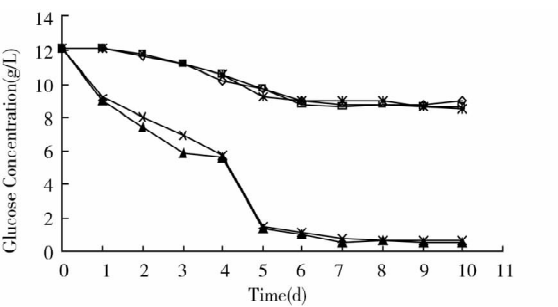


图 6 葡萄糖浓度随培养时间的变化情况

◆:10℃ —□—:15℃ —▲—:20℃ —×—:25℃ —\*—:30℃

Fig.6 Time courses of Glucose concentration

应的最佳温度可以实现促进细胞生长和增加产物合成的统一。

从单一温度控制的 *Nitzschia laevis* 发酵过程来看,发酵前期在 25℃ 培养,有利于藻细胞的生长,可积累较多的细胞。在发酵中后期,可以适当降低培养温度,在维持细胞正常生长代谢的同时促进 EPA 的合成,提高整个发酵过程的生产水平。综合考虑,对 *Nitzschia laevis* 发酵采取以下变温培养方法:延滞期及对数生长期前期温度控制在 25℃,从对数期中期开始温度降至 20℃。故本实验将 *Nitzschia laevis* 在 20℃ 和 25℃ 各培养一个生长周期,并分别于指数生长期前期、中期和后期调整培养温度,结果如表 1 所示。

表 1 不同温度 *Nitzschia laevis* 细胞生物量、EPA 含量及产量情况

Table 1 Cell biomass of *Nitzschia laevis*、EPA content and yield under different temperature

发酵温度 测定指标	20℃		25℃ ~20℃		
			指数期前期	指数期中期	指数期后期
Cell Biomass (g/L)	4.06 ± 0.10	5.05 ± 0.11	4.35 ± 0.09	4.86 ± 0.14	4.95 ± 0.09
EPA Content (%)	5.60 ± 0.04	4.86 ± 0.05	5.29 ± 0.06	6.00 ± 0.04	4.90 ± 0.09
EPA Yield (mg/L)	227.36 ± 2.94	245.43 ± 2.80	230.12 ± 1.97	291.60 ± 2.10	242.55 ± 1.25

从表 1 可以看出,在指数生长期中期改变培养温度 EPA 含量和产量均最高,这说明在获得一定细胞浓度的基础上调整培养温度,既可以保证细胞生物量又可以加速 EPA 合成,有利于提高 EPA 的发酵生产水平。

3 结 论

变温培养提高了 EPA 含量(6.00%)和产量(291.60mg/L),较采用单一温度(25℃)发酵的最大值分别提高了 24.07%、18.81%。25℃ 为硅藻 *Nitzschia laevis*

最适生长温度,可积累较高的细胞浓度;20℃ 时氧的溶解性比 25℃ 时高,使得 20℃ 培养时催化长链不饱和脂肪酸脱饱和需氧酶比 25℃ 培养时能获得更多的细胞间分子氧<sup>[18]</sup>,有利于 EPA 的合成。由此可见,采用变温发酵对 EPA 的生产有促进作用。

参考文献

[1] Nettleton J A. Omega-3 Fatty Acids and Health. New York: Chapman and Hall,1995  
[2] Pulz O, Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65

- (6):635~648
- [3] Ackman R G, Stanby M E. Nutritional Evaluation of long-chain Fatty Acids in Fish Oil. London: Academic Press, 1982. 25
- [4] Yongmanitchai W, Ward O P. Omega-3 fatty acids; alternative sources of production. Process Biochem, 1989, 8: 117~125
- [5] 蒋汉明, 张凤珍, 翟静, 等.  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸与人类健康. 预防医学论坛, 2005, 11(1): 65~69  
Jiang H M, Zhang F Z, Zhai J, et al. Preventive Medicine Tribune, 2005, 11(1): 65~69
- [6] 张汐, 曹国峰. EPA 和 DHA 的提取和富集 II 富集方法. 中国油脂, 1998, 23(1): 60~62  
Zhan X, Cao G F. China Oils and Fats, 1998, 23(1): 60~62
- [7] Cohen Z, Ratledge C. Single Cell Oils. America: American Oil Chemists' Society Press, 2005. 1~20
- [8] Cohen Z. Chemicals from Microalgae. London: Taylor and Francis Ltd, 1999. 108~109
- [9] Wen Z Y, Chen F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. Biotechnology Advances, 2003, 21(4): 273~294
- [10] Reitan K I, Rianuaao J R, Olsen Y. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. Journal of Phycology, 1994, 30: 972~979
- [11] 姜悦, 陈峰, 梁世中. 利用海洋微藻培养生产  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸. 海洋科学, 1997, 6: 18~20  
Jiang Y, Chen F, Liang S Z. Ocean Science, 1997, 6: 18~20
- [12] 梁英, 麦康森. 微藻 EPA 和 DHA 的研究现状及前景. 水产学报, 2000, 24(3): 289~296  
Liang Y, Mai K S. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(3): 289~296
- [13] 张培军. 海洋生物学. 山东: 山东教育出版社, 2004. 171~172  
Zhang P J. Ocean Biology. Shandong: Educational Press, 2004. 171~172
- [14] Tan C K, Johns M R. Screening of diatoms for heterotrophic eicosapentaenoic acid production. Journal of Applied Phycology, 1996, 8: 59~64
- [15] Chen G Q, Chen F. Growing phototrophic cells without light. Biotechnology Letters, 2006, 28(9): 607~616
- [16] Wen Z Y, Chen F. Continuous cultivation of the diatom *Nitzschia laevis* for eicosapentaenoic acid production: Physiological study and process optimization. Biotechnology Progress, 2002, 18(1): 21~28
- [17] Chen G Q, Jiang Y, Chen F. Fatty acid and lipid class composition of the eicosapentaenoic acid-producing microalga, *Nitzschia laevis*. Food Chemistry, 2007, 104: 1580~1585
- [18] 刘长海, 杜冰, 姚汝华. 微生物发酵法生产 EPA 及 DHA 的研究进展. 食品科技, 2004, 6: 13~15  
Liu C H, Du B, Yao R H. Food Science and Technology, 2004, 6: 13~15

## Studies of Temperature Shift Fermentation for Eicosapentaenoic Acid Production by *Nitzschia laevis*

CAO Xiao-hong ZHAO Yu-hua LU Mei-fang LEI Jing WANG Chun-ling

(Tianjin Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract** Fermentation for Eicosapentaenoic Acid (EPA) production by *Nitzschia laevis* at various temperature between 10°C and 30°C was investigated and the dynamics characteristics during fermentation process were also analyzed. Based on the results, a varying temperature nursing method of two stage control strategy is proposed: During the first stage, which comprises the delay phase and the initial index phase, the temperature is maintained at 25°C; then the temperature is shifted to 20°C and kept up till the end of the fermentation process. By this method, a EPA content of 6.0% and a yield of 291.60 mg/L have been gained. These are 24.07% and 18.81% higher than that of fixed temperature (25°C) fermentation, respectively.

**Key words** EPA Diatom *Nitzschia laevis* Temperature shift fermentation