

doi:10.3969/j.issn.1672-3678.2012.01.008

添加生物素和浅蓝菌素对裂殖壶菌 发酵产 DHA 的影响

任路静, 魏萍, 冯云, 纪晓俊, 黄和

(南京工业大学生物与制药工程学院, 南京 210009)

摘要:为提高发酵产量,根据裂殖壶菌生物合成二十二碳六烯酸(DHA)的途径,考察添加代谢途径关键酶的辅酶及酶的抑制剂对发酵裂殖壶菌的影响。结果表明:添加生物素可促进油脂积累,添加浅蓝菌素有利于DHA及不饱和脂肪酸含量的提高。添加生物素0.3 mg/L时,DHA占细胞干质量分数达11.26%,相对于对照提高了13%;当添加浅蓝菌素0.1 mg/L时,DHA占细胞干质量分数可达12.2%。

关键词:生物素;浅蓝菌素;裂殖壶菌;DHA

中图分类号:Q815

文献标志码:A

文章编号:1672-3678(2012)01-0042-04

Effect of biotin and cerulenin addition on DHA production by *Schizochytrium* sp.

REN Lujing, WEI Ping, FENG Yun, JI Xiaojun, HUANG He

(College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: To improve the DHA productivity, effects of biotin and cerulenin addition on DHA production were investigated based on DHA synthesis pathway of *Schizochytrium* sp. The results showed that the biotin addition could enhance the lipid accumulation, while the cerulenin addition could increase DHA and polyunsaturated fatty acid content. The percentage of DHA in cell dry weight reached 11.26% at 0.3 mg/L biotin addition, thus it was 13% higher than that of the control. When 0.1 mg/L cerulenin was added, DHA content reached 12.2%.

Key words: biotin; cerulenin; *Schizochytrium* sp.; DHA

长链多不饱和脂肪酸,特别是二十二碳六烯酸(C22:6, $n-3$, DHA)是功能性油脂中备受瞩目的产品之一。临床研究表明DHA在促进脑细胞发育、提高视力以及预防心脑血管疾病等方面作用显著^[1],已广泛应用于婴幼儿食品和医药行业。目前,利用海洋微生物发酵制备DHA已成为研究的热点,其中裂殖壶菌以其高生长速率和高效的产油效率,被一

致认为是具有工业化应用潜力的DHA生产菌^[2]。

DHA的合成可分为2个阶段,第一阶段,是从葡萄糖通过糖酵解、三羧酸循环(TCA)、柠檬酸裂解途径生产乙酰CoA和NADPH^[3];第二阶段是乙酰CoA和NADPH通过延长去饱和途径或PKS途径合成长链不饱和脂肪酸^[4]。但复杂的合成途径导致DHA发酵过程难以控制,定向调控DHA合成困难。

收稿日期:2011-06-09

基金项目:江苏省高校产业化推进项目(JH09-30);江苏省六大高峰人才项目(2008-D-63);教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET-09-0157);霍英东教育基金资助项目(123014)

作者简介:任路静(1983—),女,山东嘉祥人,博士研究生,研究方向:微生物发酵及代谢工程;黄和(联系人),教授,E-mail:biotech@njut.edu.cn

因此,笔者从DHA合成的代谢途径出发,通过添加乙酰辅酶A羧化酶的羧基载体生物素调控DHA合成的第一阶段,通过添加脂肪酸合成酶的抑制剂浅蓝菌素调控第二阶段。以期从代谢途径的角度探讨调控DHA发酵的方法,为提高裂殖壶菌的油脂积累量以及油脂中DHA的含量提供指导,亦为脂肪酸代谢机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

裂殖壶菌(*Schizochytrium* sp.)HX-308^[5],笔者所在实验室自主筛选获得,由中国典型培养物保藏中心保藏(CCTCC M 209059)。

1.2 培养基

种子培养基(g/L): MgCl₂ 3、CaCl₂·2H₂O 1、KH₂PO₄ 4、酵母膏 2、谷氨酸钠 10、KCl 2、NaCl 15、FeCl₃ 0.1、MgSO₄·7H₂O 5、葡萄糖 40; 121℃、30 min 条件下灭菌,并以体积分数为0.2%的量向培养基中分别添加维生素B₁、B₆、B₁₂。

发酵培养基(g/L): MgCl₂ 3、(NH₄)₂SO₄ 6、KH₂PO₄ 4、酵母膏 2、谷氨酸钠 10、KCl 2、NaCl 15、FeCl₃ 0.1、MgSO₄·7H₂O 5、葡萄糖 100; 121℃、30 min 条件下灭菌,并以体积分数为0.2%的量向培养基中分别添加维生素B₁、B₆、B₁₂。

1.3 培养方法

种子培养:将甘油管中保存的种子接入装有种子培养基的带凹槽的三角摇瓶中进行活化,按体积分数为5%的接种量连续培养3代,培养时间20~

24 h,温度25℃,转速150 r/min。

摇瓶发酵培养:按10%的接种量将种子培养液接入发酵培养基中,摇床培养至糖耗尽,培养温度25℃,转速150 r/min。

1.4 分析方法

细胞干质量和油脂提取方法参照文献[6];脂肪酸甲酯制备及气相色谱分析参照文献[7]。

2 结果与讨论

2.1 添加生物素对DHA发酵的影响

2.1.1 生物素对细胞生长、油脂量和DHA含量的影响

在脂肪酸的合成途径中,乙酰辅酶A羧化酶是重要的脂肪酸合成酶^[8],能够催化乙酰辅酶A转化为丙二酸单酰-CoA,从而进入脂肪酸的合成。该反应既是脂肪酸合成的限速步骤,也是脂肪酸合成的关键所在。

生物素质量浓度对DHA发酵指标的影响如表1所示。由表1可知:细胞可以在无生物素添加的条件下正常生长,说明生物素并不是裂殖壶菌生长的必需因子。但在添加0.3 mg/L生物素后,油脂量由22.57 g/L左右增加至(28.87±0.87)g/L。DHA占细胞干质量的分数的分数达到(11.26±0.32)%,比对照增加了13%,同时DHA产量由6 g/L左右提高至(8.00±0.22)g/L,说明添加低浓度的生物素有利于DHA的合成。这种促进作用与生物素是乙酰辅酶A、羧化酶的羧基载体^[9]有密切关系,与Baez-Saldana等^[10]的研究结果一致。

表1 生物素添加量对细胞干质量、油脂及DHA量的影响

Table 1 Effects of biotin concentrations on parameters in DHA fermentation *Schizochytrium* sp. HX-308

$\rho(\text{生物素})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho(\text{细胞干质量})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho(\text{总油脂})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$m(\text{DHA})(\text{细胞干质量})^{-1}/\%$	$\rho(\text{DHA})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$
对照	60.00±1.81	22.57±0.67	10.00±0.30	6.00±0.15
0.1	63.32±1.89	24.26±0.73	10.27±0.20	6.50±0.12
0.2	66.66±1.82	26.45±0.80	10.44±0.15	6.96±0.20
0.3	71.01±2.13	28.87±0.87	11.26±0.32	8.00±0.22
0.4	65.33±1.95	24.81±0.74	9.09±0.27	5.94±0.20
0.6	62.00±1.85	22.60±0.67	7.17±0.21	4.50±0.15

2.1.2 生物素对脂肪酸分布的影响

生物素的添加导致细胞脂肪酸分布发生了明显的变化,结果见图1。由图1可知:当添加0.3 mg/L生物

素时,胞内豆蔻酸(C14:0)和油酸(C18:1)呈现下降趋势,分别由11.94%和0.43%降至8.07%和0.13%。但二十碳五烯酸(EPA)和DHA含量由1.3%和45.6%分

别升高到 1.8% 和 50%, 表明生物素对不饱和脂肪酸 (PUFAs) 的积累有适当的促进作用。

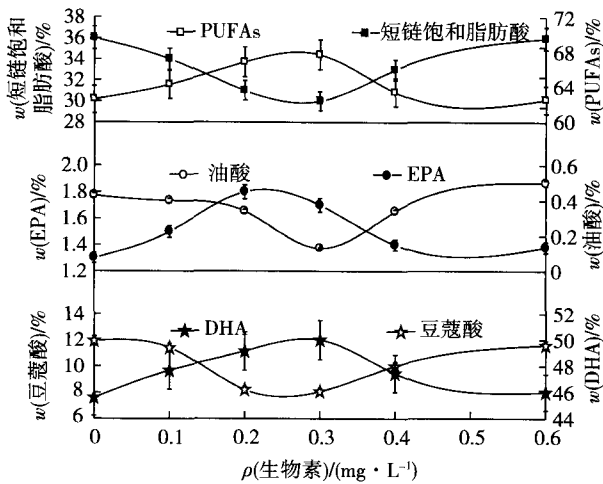


图1 生物素添加量对脂肪酸的影响

Fig. 1 Effects of biotin concentrations on fatty acid composition *Schizochytrium sp.* HX-308

2.1.3 生物素对裂殖壶菌发酵产角鲨烯的影响

添加生物素对裂殖壶菌发酵产角鲨烯的影响结果见图2。由图2可知:低质量浓度的生物素添加量(0.1 mg/L),并未引起角鲨烯含量显著的变化;当质量浓度增加到0.3 mg/L时,每克干细胞中含角鲨烯0.57 mg,相比对照提高了30%,且角鲨烯产量由对照的26.68 mg/L提高到40.98 mg/L。

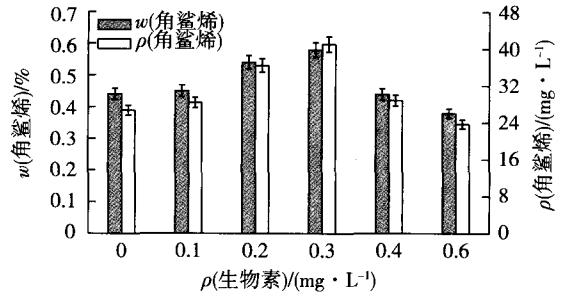


图2 生物素添加量对角鲨烯含量的影响

Fig. 2 Effects of biotin addition on squalene content and yield by *Schizochytrium sp.* HX-308

2.2 添加浅蓝菌素对 DHA 发酵的影响

2.2.1 浅蓝菌素对细胞生长、油脂和 DHA 含量的影响

浅蓝菌素是一种真菌抗生素,能够抑制脂肪酸合成途径中的 β -酮酰-ACP合成酶系和角鲨烯合成途径中的HMG-CoA合成酶。裂殖壶菌胞内的饱和脂肪酸合成需要通过脂肪酸合成酶途径,而不饱和脂肪酸的积累则通过PKS途径合成^[4]。

浅蓝菌素对DHA发酵的影响如表2所示。由表2可知:浅蓝菌素的添加对细胞干质量和油脂含量影响较小。但当质量浓度为0.1 mg/L时,DHA含量由(6.00 ± 0.15) g/L提高至7.31 g/L左右,此时DHA占细胞干质量的分数为(12.20 ± 0.36)%,相对于对照提高了24%。而当浅蓝菌素质量浓度进

表2 浅蓝菌素对细胞生长、总油脂和DHA含量的影响

Table 2 Effects of different cerulenin concentrations on parameters in DHA fermentation by *Schizochytrium sp.* HX-308

ρ (浅蓝菌素)/ (mg·L ⁻¹)	ρ (细胞干质量)/ (g·L ⁻¹)	ρ (总油脂)/ (g·L ⁻¹)	m (DHA)(细胞干质量) ⁻¹ /%	ρ (DHA)/ (g·L ⁻¹)
对照	60.00 ± 1.81	22.57 ± 0.67	10.00 ± 0.30	6.00 ± 0.15
0.10	59.93 ± 1.80	21.97 ± 0.66	12.20 ± 0.36	7.31 ± 0.21
0.25	59.81 ± 1.89	21.98 ± 0.56	10.30 ± 0.30	6.16 ± 0.18
1.0	59.83 ± 1.79	20.58 ± 0.61	7.89 ± 0.23	4.72 ± 0.14
2.5	59.48 ± 0.78	19.75 ± 0.59	6.72 ± 0.20	4.02 ± 0.12
5.0	57.77 ± 1.73	19.07 ± 0.57	6.40 ± 0.19	3.70 ± 0.11

一步升高到5.0 mg/L时,DHA产量降至(3.70 ± 0.11)g/L,总油脂降为(19.07 ± 0.57) g/L,表明高浓度的浅蓝菌素对油脂积累DHA合成不利。

2.2.2 浅蓝菌素对脂肪酸分布的影响

浅蓝菌素的添加对脂肪酸分布的影响如图3所示。由图3可知:添加低浓度的浅蓝菌素(0.1 mg/L)会抑制豆蔻酸(C14:0)和棕榈酸(C16:0)的合成,从

而提高不饱和脂肪酸的含量,DHA质量分数亦由46%提高到51%。但当质量浓度进一步升高至1 mg/L时,DHA的质量分数降至41%。添加0.1 mg/L的浅蓝菌素将DHA的质量分数由46%提高到51%,这与Allen等^[11-13]的研究结果相似,说明浅蓝菌素可以有效促进不饱和脂肪酸的合成。高浓度的浅蓝菌素抑制了多不饱和脂肪酸(PUFAs)及DHA的合成,

可能是浅蓝菌素在抑制脂肪酸合成酶途径的同时也扰乱了 PKS 途径的合成。

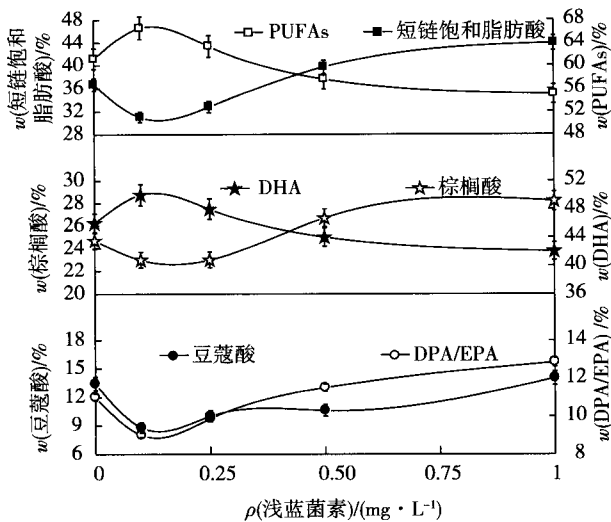


图 3 浅蓝菌素对脂肪酸分布的影响

Fig. 3 Effects of cerulenin concentrations on fatty acid composition in *Schizochytrium* sp. HX-308

2.2.3 浅蓝菌素对角鲨烯含量的影响

由图 4 可知:随着浅蓝菌素添加量的升高,角鲨烯含量逐渐降低。当浅蓝菌素的质量浓度为 5 mg/L 时,角鲨烯含量和产量由对照的 0.44 mg/g 和 26.68 mg/L 分别下降至 0.18 mg/g 及 10 mg/L。角鲨烯含量的降低可能与浅蓝菌素抑制了 HX-308 甾醇合成过程中的 HMG-CoA 合成酶有关,因此,浅蓝菌素亦可能会降低 HX-308 细胞内胆固醇的含量。

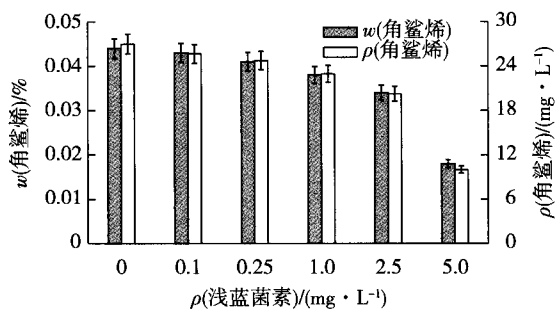


图 4 浅蓝菌素添加量对角鲨烯含量的影响

Fig. 4 Effects of cerulenin addition on squalene content and yield by *Schizochytrium* sp. HX-308.

3 结论

考察了关键酶的辅酶生物素以及酶的抑制剂浅蓝菌素对 *Schizochytrium* sp. HX-308 发酵性能的影响,结果显示:添加 0.3 mg/L 的生物素时,DHA 占细

胞干质量百分比达 11.26%,相对于对照提高了 13%;添加 0.1 mg/L 浅蓝菌素时,DHA 占细胞干质量百分比可达 12.2%,为 DHA 的发酵、调控和含量的提高提供了新的思路,但具体的代谢机制还有待进一步研究。此外,本文采用的 2 种方法,对 DHA 合成有明显的促进作用。因此,可适当使用该工艺来生产高含量的 DHA 产品,但考虑到生产成本较为昂贵,后期可继续拓宽调控思路,开发更为廉价的调控方法。

参考文献:

- [1] Gill I, Valivety R. Polyunsaturated fatty acids: 1. occurrence, biological activities and applications[J]. Trends Biotechnol, 1997, 15(10):401-409.
- [2] Morita E, Kumon Y, Nakahara T, et al. Docosahexaenoic acid production and lipid-body formation in *Schizochytrium limacinum* SR21[J]. Marine Biotechnol, 2006, 8(3):319-327.
- [3] Ratledge C, Wynn J P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms[J]. Adv Appl Microbiol, 2002, 51:1-51.
- [4] Hauvermale A, Kuner J, Rosenzweig B, et al. Fatty acid production in *Schizochytrium* sp.: involvement of a polyunsaturated fatty acid synthase and a type I fatty acid synthase[J]. Lipids, 2006, 41(8):739-747.
- [5] 黄和,任路静,肖爱华,等.一种裂殖弧菌及利用其生产 DHA 油脂的方法:中国,101575584A[P]. 2009-11-11.
- [6] Ren L J, Huang H, Xiao A H, et al. Enhanced docosahexaenoic acid production by reinforcing acetyl-CoA and NADPH supply in *Schizochytrium* sp. HX-308[J]. Bioproc Biosys Eng, 2009, 32(6):837-843.
- [7] Ren L J, Ji X J, Huang H, et al. Development of a stepwise aeration control strategy for efficient docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp.[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 87(5):1649-1656.
- [8] Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production[J]. Biochimie, 2004, 86(11):807-815.
- [9] 王镜岩,朱宝庚,徐长法.生物化学[M].3版.北京:高等教育出版社,2002.
- [10] Baez-Saldana A, Zendejas-Ruiz I, Revilla-Monsalve C, et al. Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects[J]. Am J Clin Nutr, 2004, 79(2):238-243.
- [11] Allen E E, Facciotti D, Bartlett D H. Monounsaturated but not polyunsaturated fatty acids are required for growth of the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9 at high pressure and low temperature[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(4):1710-1720.
- [12] Morita N, Nishida T, Tanaka M, et al. Enhancement of polyunsaturated fatty acid production by cerulenin treatment in polyunsaturated fatty acid-producing bacteria[J]. Biotechnol Lett, 2005, 27(6):389-393.
- [13] Fang J, Kato C, Sato T, et al. Biosynthesis and dietary uptake of polyunsaturated fatty acids by piezophilic bacteria[J]. Compar Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 2004, 137(4):455-461.