

金黄色破囊壶菌发酵生产 DHA 的研究^{*}

黄惠琴 鲍时翔

(中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室 海口 571101)

关键词 金黄色破囊壶菌, 发酵, DHA, 多不饱和脂肪酸

中图分类号: TQ92 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2002)04-0498-04

顺-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid,简称 DHA)是 ω -3 系列多不饱和脂肪酸。近年的研究表明,DHA 是组成大脑和视网膜的重要结构物质,如大脑灰质结构脂质中 60% 的脂肪酸均为 DHA^[1]。DHA 对人体健康有益的生理功能主要表现在^[2]调节中枢神经系统功能,预防和治疗心血管疾病,治疗气喘、关节炎等,预防和治疗乳腺癌、结肠癌等。由于 DHA 具有上述生理功能,已在医药、食品、保健品等领域得到广泛应用。目前,商品 DHA 主要来源于深海鱼油,如沙丁鱼、金枪鱼等鱼油,由于鱼油资源有限,DHA 很难满足社会的需求。因此寻找 DHA 的新来源受到国内外学者的广泛关注。

研究发现,某些海洋微生物和藻类富含 DHA。由于微生物具有生长速度快、培养简单等特点,所以研究人员转而寻求利用微生物发酵生产 DHA。Delong^[3]、Yano^[4]等分别从深海和深海鱼肠道中分离到积累 DHA 的弧菌,但 DHA 产量较低。Li 等^[5]对 *Thraustochytrium roseum* ATCC28210 发酵生产 DHA 进行了研究。尽管如此,国内外利用微生物发酵生产 DHA 仍处于实验室阶段。本文对金黄色破囊壶菌(*Thraustochytrium aureum*) H0 发酵生产 DHA 进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 菌株

金黄色破囊壶菌(*Thraustochytrium aureum*) H0,热带作物生物技术国家重点实验室保存。

1.2 培养基

基础培养基:每升培养基含葡萄糖 10g,谷氨酸钠 1g,酵母膏 1g,蛋白胨 1g,维生素 B₁ 0.1g,维生素 B₁₂ 0.01g,泛酸钠 0.14g。以海水配制,pH5.5,0.07MPa 灭菌 20min(维生素类过滤除菌)。

1.3 菌种培养

菌种活化:将保存菌种转接 25℃斜面培养 4d。

种子液制备:取一勺经斜面培养的活化菌种,接入装有 50mL 培养基的 250mL 三角瓶中,25℃、200r/min 下培养 2~3d。

摇瓶培养:取 10mL 种子液接入装有 200mL 培养基的 1000mL 三角瓶中,25℃、200r/min 下培养 4d。

1.4 菌体收集

8 000r/min 离心收集菌体,再用生理盐水洗一次,称湿重,冷冻干燥至恒重,称细胞干重(DC)。

1.5 油脂成分分析

采用 Soxhlet 法^[6]抽取菌体总脂。取 0.1g 样品置于 10mL 刻度试管中,加入 1mL 乙醚/正己烷(2:1)摇

^{*} 中国热带农业科学院科技基金资助项目

作者简介:黄惠琴(1971-)女,安徽桐城人,中国热带农业科学院助理研究员,主要从事海洋微生物和海洋药物等领域的研究。

收稿日期:2001-10-24,修回日期:2002-01-24

匀,再加入 0.8mol/L KOH-CH₃OH 溶液 1mL 摇匀,反应 5min,加水至刻度,取上清液进样。用岛津 GC-14B 气相色谱仪分析油脂组成,CPB-20 毛细管柱,柱长 25m,内径 0.33mm,液膜厚 0.5μm。测定条件为:柱前压 0.15MPa,柱温 180℃,然后以 1℃/min 程序升温至 230℃。气化室温度为 240℃,检测器温度 280℃。

2 结果和讨论

2.1 碳源对 DHA 产量的影响

基础培养基中,分别以 1% 的葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉等成分作为碳源,摇瓶培养,测发酵液细胞干重及 DHA 产量,结果如表 1。由表 1 可知,葡萄糖是金黄色破囊壶菌发酵生产 DHA 的最佳碳源,麦芽糖和蔗糖次之。

表 1 碳源对 DHA 产量的影响

碳源	葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	可溶性淀粉
DC(g/L)	2.11	1.89	1.96	0.76
DHA(g/L)	0.189	0.164	0.170	0.056

采用不同浓度的葡萄糖进行发酵实验,研究碳源浓度对菌体生长和 DHA 合成的影响,结果如表 2。当葡萄糖浓度为 30g/L 时,细胞干重和 DHA 产量达到最大值。

表 2 葡萄糖浓度对 DHA 产量的影响

c(葡萄糖)(g/L)	10	15	20	25	30	35	40
DC(g/L)	2.110	2.640	3.760	3.990	4.160	4.020	3.530
DHA(g/L)	0.189	0.219	0.300	0.324	0.352	0.330	0.312

2.2 谷氨酸钠浓度对 DHA 产量的影响

Singh 等^[7]研究表明,谷氨酸钠是破囊壶菌发酵生产 DHA 的有效氮源,为此,考察了谷氨酸钠浓度对菌体生长和 DHA 合成的影响。除谷氨酸钠外,培养基成分同基础培养基,实验结果如表 3。由表 3 可知,当谷氨酸钠浓度达到 5g/L 时细胞干重和 DHA 达到最大值。

表 3 谷氨酸钠浓度对 DHA 产量的影响

c(谷氨酸钠)(g/L)	1	3	5	7	9
DC(g/L)	2.11	2.81	3.90	3.68	3.75
DHA(g/L)	0.189	0.242	0.341	0.318	0.334

2.3 盐浓度对 DHA 产量的影响

金黄色破囊壶菌分离于海洋,实验研究了盐浓度对金黄色破囊壶菌生长和 DHA 产量的影响。以海口西海岸海水盐浓度为标准,20℃时测定其比重为 1.01(设为 1),实验结果如图 1。从图中可以看出,低盐浓度下菌体量和 DHA 产量随盐浓度增加而增加,高盐浓度下菌体量和 DHA 产量随盐浓度增加反而减小。当培养基盐浓度等于自然海水盐浓度一半时,菌体量和 DHA 产量达到最大值。

2.4 温度对 DHA 产量的影响

温度是影响菌体生长及 DHA 产量的重要因素。实验考察了温度对 DHA 产量的影响,培养基为基础

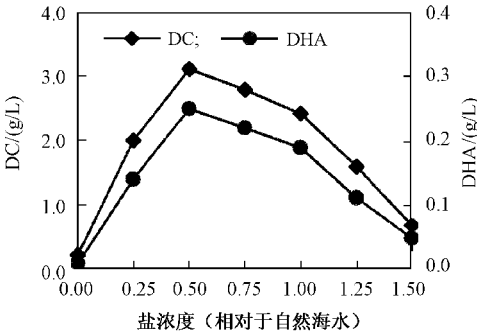


图 1 盐浓度对细胞生长和 DHA 产量的影响
其中,横坐标起始点 0 表示纯蒸馏水,0.5 代表海水/蒸馏水各一半,1.25、1.5 分别表示海水蒸发至盐浓度为原海水的 1.25 和 1.5 倍。

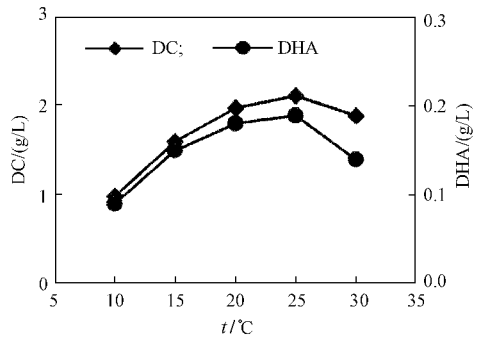


图 2 培养温度对细胞生长和 DHA 产量的影响

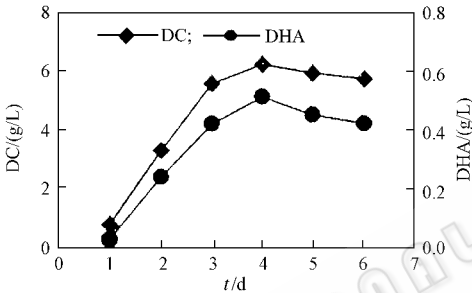


图 3 金黄色破囊壶菌生长曲线

培养基,结果如图 2。金黄色破囊壶菌的最适生长温度为 25℃,此时发酵液细胞干重为 2.11g/L,温度过高或过低,都不利于菌体生长和 DHA 合成。

2.5 金黄色破囊壶菌发酵生长曲线

每升发酵培养基含葡萄糖 30g,谷氨酸钠 5g,盐浓度为自然海水盐浓度的一半,其它成份同基础培养基。发酵温度 25℃。金黄色破囊壶菌发酵生长曲线如图 3,由图可知,摇瓶发酵 4d,菌体量和 DHA 产量分别达到 6.2g/L 和 0.51g/L。

3 讨论

对于微生物发酵生产 DHA 进行了大量探索,但仍未能进行大规模工业化生产。提高发酵产量,降低生产成本是关键,主要表现在优良菌种的选育、发酵条件的优化和 DHA 合成酶系的研究等方面。目前,合成 DHA 的途径已很清楚,从葡萄糖经丙酮酸生成乙酰辅酶 A,乙酰辅酶 A→各种饱和脂肪酸如棕榈酸(16:0)→硬脂酸(18:0)→油酸(18:1)→亚油酸(18:2)→α-亚麻酸(18:3)→→EPA(20:5)→DHA(22:6)。合成 DHA 等的 ω-3 酶系主要为碳链延长酶和脱饱和酶系。其中,△-6 脱饱和酶是关键酶,目前我室正在对这一酶基因进行克隆,力求通过基因工程的方法来增加 DHA 的产量。有关研究结果以后报道。

参 考 文 献

[1] Conner W E, Neuringer M, Reisbick S. *Nutr Rev*, 1992, **50** 21 ~ 29.
[2] Leaf A, Weber P C. *New England Journal of Medicine*, 1988, **318** 549 ~ 551.
[3] Delong E F, Yayanos A A. *Appl Environ Microb*, 1986, **51**(4) 730 ~ 737.
[4] Yano Y, Nakayama A, Saito H, et al. *Lipids*, 1994, **29**(6) 527 ~ 528.
[5] Li Z Y, Ward O P. *J Indust Microbiol*, 1996, **16**(6) 370 ~ 373.
[6] 天津轻工业学院,大连轻工业学院,无锡轻工业学院,等.工业发酵分析.北京:轻工业出版社,1994.41 ~ 42.
[7] Singh A, Wilson S, Ward O P. *Microbiol Biotech*, 1996, **12** 76 ~ 81.

Studies on Production of Docosahexaenoic Acid
by *Thraustochytrium aureum*

Huang Huiqin Bao Shixiang
(Chinese Academy of Tropical Agricultural Science , Haikou 571101 ,China)

Abstract : The effects of carbon source , Na-glutamate , salinity , and incubation temperature on the growth of *Thraustochytrium aureum* H0 and the production of docosahexaenoic acid were studies . The time course of the cell growth of *Thraustochytrium aureum* H0 was determined . The results show that glucose is the optimum carbon source and the optimum concentrations of glucose and Na-glutamate are 30 g/L and 5 g/L , respectively . The suitable salinity is half of salinity of sea water . Under the optimum culture conditions , 6.2g/L of the dry cell weight and 0.51g/L of the docosahexaenoic acid were obtained .

Key words : *Thraustochytrium aureum* , Fermentation , Docosahexaenoic acid , Polyunsaturated fatty acid



2002 下半年中国微生物学会及各专业委员会学术活动

会议名称	筹办单位	时间	人数	地点	联系人	电话
第 13 届全国干扰素与细胞因子学术讨论会	中国微生物学干扰素专业委员会	8 月	120	贵阳	焦炳华	021-65493936
医学微生物学与免疫学新进展	中国微生物学会真菌专业委员会与医学微生物学与免疫学专业委员会	9 月	100	天津	李若瑜 关显智	010-66171122-2350 0431-5645911-6574
第七届中日国际酶工程会议	中国微生物学会酶工程专业委员会	9 月 21 ~ 26	150	西安	黎高翔	010-62554677
第四届青年微生物学者学术交流会	中国微生物学会基础微生物专业委员会	9 月	100	上海	袁正宏	021-64041900-2572
全国第八届分析微生物学术讨论会(分析微生物技术的现状及展望)	中国微生物学会分析微生物专业委员会	10 月	120	未定	杨瑞馥 周 方	010-66948595 010-66948605
中国微生物学会成立五十周年纪念大会及学术年会	中国微生物学会	11 月	200 ~ 300	北京	肖昌松	010-62554677
第九届杀虫微生物学术研讨会	中国微生物学会农业微生物专业委员会	未定	100	湖南	李 俊	010-68918702