

植物激素对破囊壶菌生长与产 DHA 的影响

吴克刚¹ 柴向华² 杨连生³

(¹ 汕头大学海洋生物研究所 汕头 515063)

(² 汕头市农业科学研究所 汕头 515021)

(³ 华南理工大学食品生物工程学院 广州 510641)

摘 要 研究了植物激素对破囊壶菌(*Thraustochytrium roseum*) MF2 产 DHA 的影响作用。实验结果表明 植物激素对 *T. roseum* MF2 的生长和产 DHA 有很大影响,赤霉素(GA)能促进 DHA 的合成,β-苯基腺嘌呤(BA)能显著促进 *T. roseum* MF2 的生长,二者的配合使用能明显增加 DHA 的产量,培养基中适宜的添加量为 2mg/L GA 和 3mg/L BA,可使 DHA 产量达到 982mg/L。

关键词 植物激素,破囊壶菌,DHA

中图分类号:Q939.9 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2003)01-0111-05

DHA 是二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid),属 ω-3 系多不饱和脂肪酸(ω-3 polyunsaturated fatty acids, ω-3PUFAs)。DHA 是维持大脑和视力正常功能所必需的脂肪酸,对胎儿及婴幼儿大脑及视觉的生长发育有促进作用,对老年人大脑和视觉功能的衰退也有延缓作用^[1,2]。另外 DHA 等 ω-3PUFAs 在防治心血管疾病、调节免疫功能、抑制肿瘤、防治炎症性疾病、缓解心理和行为异常疾病等方面也有积极的作用^[3-6]。在膳食中补充 DHA 已受到人们的关注,我国在 2000 年已批准 DHA 作为营养强化剂^[7]。目前 DHA 的商业资源主要是鱼油。近年来利用微生物生产的单细胞 DHA 油引人注目,因为这种单细胞 DHA 油没有鱼腥味、DHA 含量高、脂肪酸组成简单、纯化容易。破囊壶菌(*Thraustochytrium*)是国外研究较多的、被认为是极具潜力工业化生产 DHA 的微生物,为了提高 DHA 的产量,国外在菌种的筛选、营养需求以及培养条件等方面作了不少的研究,取得很大进展^[8-10]。但总之由于菌体生长缓慢,生物量低,限制了 DHA 的产量。有研究发现新鲜海洋藻类的植物生长素含量约为高等植物的 1/10,海藻生长茂盛海域的海水比海藻生长不茂盛海域的海水富含细胞分裂素,用前者培养海藻比后者生长茂盛^[11]。破囊壶菌属海生低等藻状真菌,有报道认为破囊壶菌是一种海洋微藻,研究植物激素对破囊壶菌的影响作用是十分必要的^[12]。从生理作用来看,可能对破囊壶菌有影响的植物激素主要是生长素类、细胞分裂素类和赤霉素类,本文将着重探讨它们对破囊壶菌生长与产 DHA 的影响作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 破囊壶菌(*Thraustochytrium roseum*) MF2 汕头大学海洋生物重点实验室收

作者简介:吴克刚(1969-)男(苗族),贵州省松桃县人,汕头大学海洋生物研究所助理研究员,博士,主要从事海洋生物活性物质的研究。E-mail:kgwu@stu.edu.cn

收稿日期:2002-02-06,修回日期:2002-08-05

藏。

1.1.2 培养基 :基本培养基组成 :葡萄糖 20g (NH₄)₂SO₄ 0.2g ,谷氨酸钠 2.0g ,KH₂PO₄ 0.1g ,NaCl 25g ,KCl 1.0g ,CaCO₃ 0.2g ,NaHCO₃ 0.1g ,MgSO₄ ·7H₂O 5.0g ,Thiamine ·HCl 10μg ,VB₁₂ 1μg ,蒸馏水定容到 1L。pH 值为 6.0 55kPa 灭菌 15min。

1.1.3 主要试剂 :脂肪酸甲酯标准品(纯度 ≥99%)为美国 Sigma 公司产品 ,植物激素 :吲哚乙酸(IAA)、萘乙酸(NAA)、吲哚丁酸(IBA)、6-苄基腺嘌呤(BA)、糠基腺嘌呤(KT)、赤霉素(GA)均为生物试剂。

1.2 实验仪器

HZQ-F 全温立式振荡培养器为哈尔滨东联电子技术开发有限公司产品 ,JY92-II 超声波细胞粉碎机为宁波新芝科器研究所产品 ,5890A 型气相色谱仪为 Hewlett Packar 产品。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种培养 :在 250mL 三角瓶中装 50mL 基本培养基 ,接入斜面菌种 ,25℃、200r/min 培养 48h ,作为种菌。

1.3.2 发酵培养 :除葡萄糖为 40g/L、谷氨酸钠为 2.5g/L 外 ,发酵培养基同基本培养基 ,发酵条件为 500mL 三角瓶中装 100mL 培养基 ,接入 5% 种菌 ,于 25℃、200r/min 培养。

1.3.3 生物量的测定 :取 2~5mL 发酵液于恒重的离心管中 ,4 200r/min 离心 4min ,蒸馏水洗涤两次 ,4 200r/min 离心 10min ,沉淀经 105℃ 干燥 3h 称重。若培养基含有油脂 ,发酵液离心后 ,菌体需用 50mL 乙醚(0.5mL 2mol/L 盐酸酸化)洗涤 ,然后再用蒸馏水洗涤两次 ,离心、干燥。

生物量(g/L) = 细胞干燥后的重量 × 1000 / 所取发酵液体积

1.3.4 菌体脂质的提取与含量分析 :量取一定体积发酵液 ,离心分离菌体 ,于真空度 0.07 MPa ~ 0.09MPa、55℃ ~ 65℃ 的真空干燥箱中真空干燥 24h。准确称取研细的真空干燥菌体 0.05g ~ 0.15g 于小试管中 ,加入 0.6mL 蒸馏水湿润 ,再加入 2.25mL 氯仿/甲醇(1:2)混合液 ,摇匀 ,超声波破碎 5min ,加入 0.75mL 氯仿振荡 30s ,再加入 0.75mL 蒸馏水振荡 30s ,静置几分钟使完全分层 ,吸出氯仿层于恒重的小试管中 ,于真空度 0.07 MPa ~ 0.09MPa、45℃ ~ 50℃ 的真空干燥箱中真空脱溶干燥 3 ~ 4h 称重计算。

脂质含量(%) = 氯仿提取物重量 × 100 / 干菌体重量

1.3.5 气相色谱分析脂肪酸 :准确称取脂质及内标物(十七烷酸)于带螺帽的 10mL 试管中 ,加入 1mL 氯仿 ,振荡 5 ~ 10s ,使脂质溶解 ,然后加入 1mL 1mol/L 甲醇钠/甲醇溶液 ,振荡 5 ~ 10s ,静置 30min ,加入 2 ~ 3mL 氯仿 ,振荡 5 ~ 10s ,然后离心 5min ,收集氯仿层 ,于真空度 0.07 MPa ~ 0.09MPa、40℃ ~ 45℃ 真空脱溶干燥 3 ~ 4h ,正己烷定容至 1mL ,然后进行气相色谱分析。

1.3.6 DHA 产量计算 :DHA 产量(mg/L) = 脂质 DHA 含量 × 菌体脂质含量 × 生物量 × 1 000。

2 结果和讨论

2.1 植物激素对 *T. roseum* 生长的影响

实验主要研究了 IAA、NAA、IBA、KT、BA、GA(5mg/L) 对 *T. roseum* MF2 生长的影响 结

果见图 1。

实验结果可见,除了 GA 外,其它几种植物激素对 *T. roseum* MF2 生长均有不同程度的促进作用,特别是 KT 和 BA 的促生长作用最为显著。KT 和 BA 的促生长作用主要表现在不仅提高了最大生物量,而且缩短了 *T. roseum* MF2 的生长周期,二者生物量达到最高时的培养时间分别为 5d 和 4d,比对照和其它几种植物激素提前 1~2d。其它几种植物激素主要提高生物量,对 *T. roseum* MF2 的生长周期无明显影响。从最大生物量来看,几种植物激素促生长效应大小依次是:BA > KT > IBA > NAA > IAA,其中 BA 和 KT 的最大生物量分别是 9.1g/L 和 8.7g/L。

2.2 植物激素对 *T. roseum* 积累脂质与产 DHA 的影响

T. roseum MF2 培养 4d,比较各种植物激素(5mg/L)对 *T. roseum* MF2 积累脂质与产 DHA 的影响,结果见表 1。

表 1 植物激素对 *T. roseum* MF2 积累脂质与产 DHA 的影响

Table 1 Effects of phytohormones on lipids and DHA production by *T. roseum* MF2

Phytohormone	Biomass(g/L)	Lipids in biomass/%	DHA in lipids/%	DHA yield(mg/L)
Blank	3.6	18.0	61.7	399.8
GA	2.5	18.3	71.5	327.1
IAA	4.3	14.4	60.8	376.5
NAA	5.1	13.5	61.1	420.7
IBA	4.7	14.0	61.4	404.0
KT	7.4	13.8	61.6	629.0
BA	9.1	12.3	60.1	672.7

结果可见,添加 GA 对脂质含量影响不大,但能使脂质 DHA 含量提高 10% 左右,不过 GA 对 *T. roseum* MF2 生长有抑制作用,使生物量有所减少,DHA 产量也有所降低;其它几种植物激素均使脂质含量降低,但对脂质 DHA 含量影响不大;DHA 产量仅 KT 和 BA 有明显提高,分别提高了 57% 和 68%,以 BA 的 DHA 产量最高,为 673mg/L,这主要是因为 KT 和 BA 能显著提高生物量。

2.3 BA 与 GA 配合使用对 *T. roseum* 生长与产 DHA 的影响

2.3.1 BA 与 GA 配比的影响:几种植物激素中 BA 的促生长效应最为显著,而 GA 虽然一定程度上抑制了 *T. roseum* MF2 生长,但其能提高脂质 DHA 含量,为此研究二者配合使用的影响情况。实验时固定 BA 和 GA 总添加量为 5mg/L,研究二者不同对比对 *T. roseum* MF2 生长与产 DHA 的影响,实验结果见表 2。

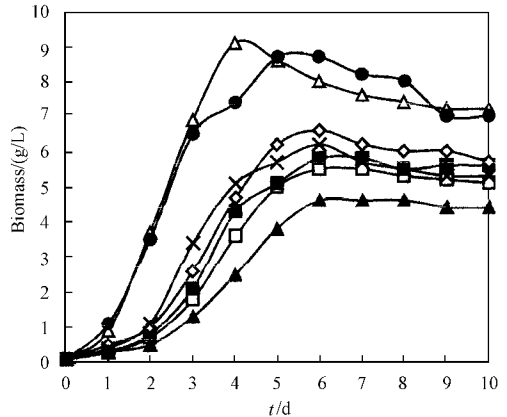


图 1 植物激素对 *T. roseum* MF2 生长的影响

Fig.1 Effects of phytohormones on growth of *T. roseum* MF2

—□—Blank ; —■—IAA ; —◇—IBA ; *—NAA ;
—△—BA ; —●—KT ; —▲—GA.

表 2 GA 与 BA 配比对 *T. roseum* MF2 生长与产 DHA 的影响Table 2 Effects of GA/BA ratio on biomass and DHA production by *T. roseum* MF2

GA/BA ratio BA percentage/%	Biomass(g/L)	Lipids in biomass/%	DHA in lipids/%	DHA yield(mg/L)
0	2.8	18.5	72.1	373.5
20	5.2	17.9	70.9	659.9
40	7.4	16.1	71.1	847.1
60	9.0	15.6	69.5	975.8
80	9.2	14.1	67.4	874.3
100	9.2	12.2	61.4	689.2

结果可见,GA 与 BA 配合使用时在 BA 比例为 60% 的范围内,增加 BA 的比例能显著提高生物量,随后继续增加 BA 比例生物量不再提高;脂质含量和脂质 DHA 含量均随 BA 比例增大而降低,但脂质 DHA 含量受影响相对较小;从 DHA 产量来看,GA 与 BA 配合使用时 BA 比例为 60%,DHA 产量最高,为 975.8mg/L。

2.3.2 BA 与 GA 配合使用量的影响:固定 BA 比例为 60%,研究二者配合使用量对 *T. roseum* MF2 生长与产 DHA 的影响,结果见表 3。

表 3 GA 与 BA 配合使用量对 *T. roseum* MF2 生长与产 DHA 的影响Table 3 Effects of GA/BA concentration on biomass and DHA production by *T. roseum* MF2

GA/BA concentration(mg/L)	Biomass(g/L)	Lipids in biomass/%	DHA in lipids/%	DHA yield(mg/L)
0	3.7	18.1	61.4	411.2
5	9.6	15.5	69.6	981.7
10	9.6	13.6	69.7	910.0
15	9.1	13.6	70.5	872.5
20	8.8	13.4	69.8	823.1
25	8.5	13.0	68.7	759.1

结果可见,GA 与 BA 配合使用时,在添加量为 0mg/L~5mg/L 范围,生物量受影响较大,其随二者添加量增加而提高,添加量超过 10mg/L,生物量有所下降,表现出抑制生长的作用;脂质含量在 0mg/L~10mg/L 的添加量范围受影响大,随添加量增加而降低,添加量超过 10mg/L 以后,脂质含量变化不大,基本维持在 13.5% 左右;脂质 DHA 含量在 0mg/L~5mg/L 的添加量范围受影响大,随添加量增加而升高,添加量超过 5mg/L 以后,脂质 DHA 含量变化不大,基本维持在 70% 左右;从最终 DHA 产量来看,二者配合使用时的添加量为 5mg/L 时最高,为 981.7mg/L,比不添加时增加了 139%,此后继续提高添加量,反而使 DHA 产量有所下降,因此认为 5mg/L 添加量是适宜的。

参 考 文 献

- [1] Mitchell D C , Gawrisch K , Litman B J , et al . Why is docosahexaenoic acid essential for nervous system function ? *Biochem Soc Trans* , 1998 **26** 365 ~ 370 .
- [2] Neuringer M . Infant vision and retinal function in studies of dietary long - chain polyunsaturated fatty acids : methods , results , and conclusions . *Docosahexaenoic acid in health and disease* . Ed . by G . S . Getz . Boca Raton : CRC Press , 1997 : 103 - 114 .
- © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

- and implications. *Am J Clin Nutr*, 2000, **71**: 256 ~ 267.
- [3] McLenenan P P, Abbeywardena M, Muggle R, et al. The cardiovascular protective role of docosahexaenoic acid. *Eur J Pharmacol*, 1996, **300**: 83 ~ 89.
- [4] 薛英本. 多不饱和脂肪酸与肿瘤转移的关系及其作用机制. 国外医学卫生学分册, 2000, **27**(3): 165 ~ 171.
- [5] 董伟, 陈泮藻. N-3 多不饱和脂肪酸与炎症疾病. 中国海洋药物, 1997, **4**: 34 ~ 9.
- [6] Levine B, Bell R T. DHA in health and disease. *Patient Care*, 1998, **32**(2): 87 ~ 92.
- [7] 食品添加剂使用卫生标准 GB—2760—1996(2000 年增补品种).
- [8] Li Z Y, Ward O P. Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum*. *J Ind Microbiol*, 1994, **13**(4): 238 ~ 241.
- [9] Sing A, Ward O P. Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum* ATCC 28210. *J Ind Microbiol*, 1996, **16**(6): 370 ~ 373.
- [10] Singh A, Wilson S, Ward O P. Docosahexaenoic acid (DHA) production by *Thraustochytrium* sp. ATCC20892. *World J Microbiol Biotechnol*, 1996, **12**: 76 ~ 81.
- [11] 董定绵编译. 海洋生物的生理活性物质. 第一版. 北京: 海洋出版社, 1984. 186 ~ 190.
- [12] Vazhappilly R, Chen F. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. *J Am Oil Chem Soc*, 1998, **75**(3): 393 ~ 397.

Effects of Phytohormones on Growth and DHA Production by *Thraustochytrium roseum*

Wu Kegang¹ Chai Xianghua² Yang Liansheng³

(¹ Marine biological laboratory, Shantou University, Shantou 515063, China)

(² Shantou Agricultural Scientific Institute, Shantou 515021, China)

(³ Food and biotechnological college, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: In this paper, effects of phytohormones on growth and DHA production by *Thraustochytrium roseum* MF2 were studied. Results showed that phytohormones had significant affect on growth and DHA production by *T. roseum* MF2. GA could promote the synthesis of DHA, and BA could accelerate the growth of *T. roseum* MF2, so the combination of GA and BA could increase DHA yield. The maximum DHA yield of 982mg/L was observed with 2mg/L GA and 3mg/L BA in medium.

Key words: Phytohormone, *Thraustochytrium roseum*, DHA