

破囊壶菌 *Thraustochytrium roseum* 产 DHA 的营养条件研究

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 华南理工大学食品学院, 广州 510641)

摘 要 探讨了碳源、氮源、碳氮比、不饱和脂以及植物激素等营养条件对破囊壶菌 *Thraustochytrium roseum* MF2 产 DHA 的影响。实验结果表明, 葡萄糖是 *T. roseum* MF2 产 DHA 的理想碳源, 适宜的葡萄糖浓度为 40 g/L; 谷氨酸钠是 *T. roseum* MF2 产 DHA 的理想氮源; 适宜的碳氮比为 70 左右; 紫苏油、BA 和 GA 配合使用使 DHA 产量提高 106%, 达到 1 242 mg/L。

关键词 破囊壶菌, DHA, 营养条件

DHA (docosahexaenoic acid, 二十二碳六烯酸) 属 ω -3 系多不饱和脂肪酸 (ω -3 polyunsaturated fatty acids, ω -3PUFAs), 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, 对老年人的大脑和视觉功能衰退也有延缓作用^[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、防治炎性疾病、缓解心理和行为异常等方面也有积极的作用^[3~5]。目前, DHA 的商业资源主要是鱼油。不过, 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^[6]。破囊壶菌属海生低等真菌, 是国外研究较多的产 DHA 微生物, 被极具工业化生产潜力。本文主要研究了破囊壶菌 *Thraustochytrium roseum* MF2 产 DHA 的营养条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌 种

破囊壶菌 *Thraustochytrium roseum* MF2, 汕头大学海洋生物所收藏。

1.1.2 培养基

基本培养基组成(1 L): 葡萄糖 20 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2 g, 谷氨酸钠 2.0 g, KH_2PO_4 0.1 g, NaCl 25 g, KCl 1.0 g, CaCO_3 0.2 g, NaHCO_3 0.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 g, V_{B_1} 10 μg , $V_{B_{12}}$ 1 μg , 蒸馏水 1 L。配制好后, 用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调节 pH 值为 6.0, 然后高压蒸汽灭菌, 灭菌条件为 121℃、15 min。

1.2 试验仪器

HZQ-F 全温立式振荡培养器, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司; JY92-II 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝科器研究所; C011 光学显微镜, OLYMPUS; 5890A 型气相色谱仪, Hewlett Packar。

1.3 试验方法

1.3.1 种菌的培养

在 250 mL 三角瓶中装入 50 mL 基本培养基, 接入斜面菌种, 于 25℃, 200 r/min 摇瓶培养 48 h, 作为种菌。

1.3.2 摇瓶培养

摇瓶培养条件为: 在 500 mL 三角瓶中装入 100 mL 培养基, 接入 5% 种菌, 于 25℃,

200 r/min 摇瓶培养。

1.3.3 生物量的测定^[7]

1.3.4 菌体脂质的提取与含量分析^[7]

1.3.5 脂肪酸分析

气相色谱分析^[7]。

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 结果与讨论

2.1 碳源对 *T. roseum* MF2 生长与产 DHA 的影响

试验主要研究了摇瓶培养时几种碳水化合物(20 g/L)为碳源对 *T. roseum* MF2 生长与产 DHA 的影响,结果见图 1、图 2、图 3 和图 4。

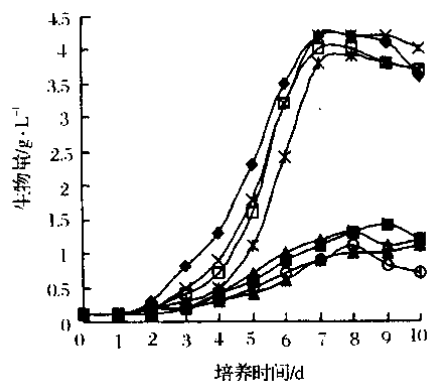


图 1 碳源对 *T. roseum* MF2 生长情况的影响

—◆—葡萄糖; —■—果糖; —○—半乳糖; —×—麦芽糖;
—△—蔗糖; —▲—乳糖; —*—可溶淀粉; —□—糊精

试验结果表明,葡萄糖、麦芽糖、糊精、淀粉为碳源时, *T. roseum* MF2 生长周期短,生物量高,在培养第 7 d 达到最高,菌体脂质含量、DHA 产量都比较高;而果糖、半乳糖、蔗糖、乳糖为碳源时, *T. roseum* MF2 生长缓慢,生长周期延长,生物量培养 8 d 以后才达到最高,而且仅为前者的 1/3 左右,菌体脂质含量以及 DHA 的产量也很低。可见,葡萄糖、麦芽糖、糊精和可溶淀粉不仅有利于 *T. roseum* MF2 生长,也有利于脂质的积累与 DHA 的生产,是 *T. roseum* MF2 生产

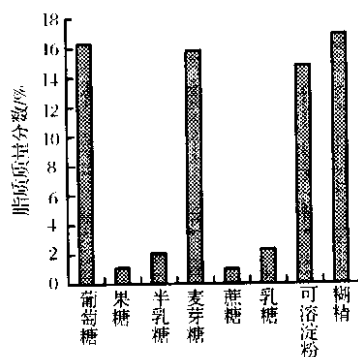


图 2 碳源对 *T. roseum* MF2 脂质含量的影响

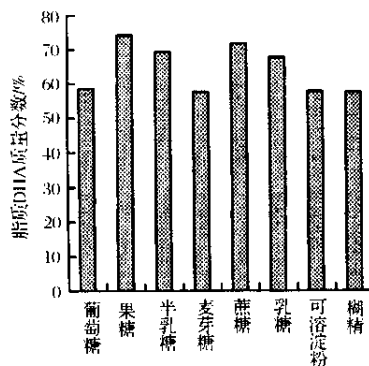


图 3 碳源对 *T. roseum* MF2 脂质 DHA 含量的影响

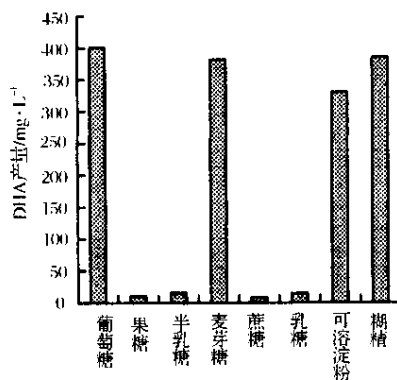


图 4 碳源对 *T. roseum* MF2 DHA 产量的影响

DHA 的理想碳源,其中以葡萄糖最佳,其 DHA 产量高达 401 mg/L。不过,值得注意的是,以果糖、半乳糖、蔗糖和乳糖为碳源时,脂质中 DHA 含量较高,为 67% ~ 74%;而葡萄糖、麦芽糖、糊精和可溶淀粉为碳源时,脂

质 DHA 含量稍低,为 57%~59%。

Bajpai 等人培养 *T. aureum* ATCC34304 产 DHA 时也发现类似的结果^[8]。而在 Singh 等人研究 *Thraus-tochytrium* sp. ATCC20892 合成 DHA 的试验结果中,蔗糖和麦芽糖明显不利于脂质的积累,淀粉和蔗糖为碳源时,脂质 DHA 含量明显较低,从最终 DHA 产量来看,葡萄糖的产量最高^[9]。Yokochi 等人的研究,产 DHA 的 *Schizochytrium limacinum* SR21 以果糖为碳源时较葡萄糖更有利于脂质的合成和 DHA 的生产,但果糖并没有提高脂质 DHA 的含量,麦芽糖和淀粉明显不利于脂质的合成^[10]。这些研究结果表明,糖类对破囊壶菌目真菌生长与产 DHA 的影响情况是不一样的。

2.2 葡萄糖浓度对 *T. roseum* MF2 生长与产 DHA 的影响

不同葡萄糖浓度对 *T. roseum* MF2 生长与产 DHA 的影响见表 1。

表 1 葡萄糖浓度对 *T. roseum* MF2 生长和产 DHA 的影响

葡萄糖质量 浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	生物量 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	脂质含量 /%	脂质 DHA 含量/%	DHA 产量 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
10	1.8	11.7	42.3	89.1
20	4.2	16.1	58.2	393.5
30	4.6	18.2	59.6	499.0
40	4.9	18.7	60.8	557.1
50	5.0	18.6	55.2	513.4
60	4.5	18.7	50.7	426.6

试验结果表明,提高葡萄糖浓度能促进 *T. roseum* MF2 的生长,但超过 50g/L 会抑制生长,细胞脂质含量随葡萄糖浓度提高而增加,但高至 30g/L 后,不再增加,脂质 DHA 含量在 20~40g/L 葡萄糖浓度范围较高,为 60%左右,过低或过高 DHA 含量均较低。DHA 产量受葡萄糖浓度的影响较大,浓度提高到 40g/L 时,DHA 产量增加到最大,此时继续提高葡萄糖浓度 DHA 产量反而明显减少。

2.3 氮源对 *T. roseum* MF2 生长与产

DHA 的影响

以蛋白胨、鱼蛋白胨、酵母浸膏、谷氨酸钠和明胶水解物为氮源(2g/L)时,对 *T. ro-seum* MF2 生长与产 DHA 的影响情况见图 5、图 6、图 7 和图 8。

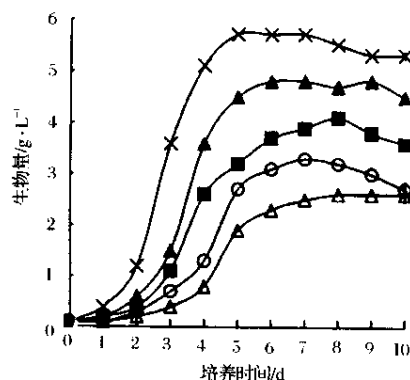


图 5 氮源对 *T. roseum* MF2 生长情况的影响

—▲—谷氨酸钠 ; —■—蛋白胨 ; —○—鱼蛋白胨 ;
—×—酵母浸膏 ; —△—明胶水解物

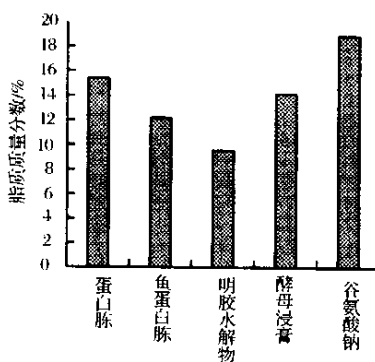


图 6 氮源对 *T. roseum* MF2 脂质含量的影响

从试验结果可见,不同氮源对 *T. roseum* MF2 生长、脂质含量、DHA 产量均有明显影响,而对脂质的 DHA 含量影响不大,基本在 60%左右,酵母浸膏最有利于 *T. roseum* MF2 生长,生长速度快,生长周期短,生物量高,培养 5 d 就达到最大生物量;谷氨酸钠也有利于 *T. roseum* MF2 生长,培养 6 d 达到最大生物量,但比酵母浸膏低;而蛋白

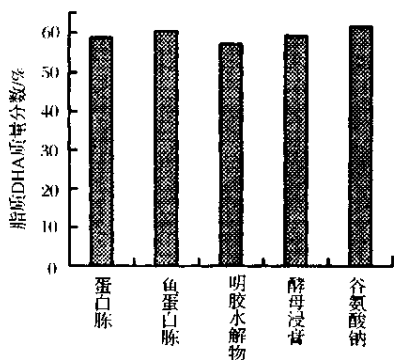


图 7 氮源对 *T. roseum* MF2 脂质 DHA 含量的影响

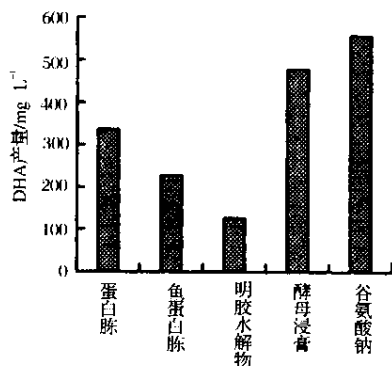


图 8 氮源对 *T. roseum* MF2 DHA 产量的影响

胨、鱼蛋白胨和明胶水解物为氮源时, *T. roseum* MF2 生长缓慢, 生长周期延长, 生物量也低; 从脂质含量来看, 谷氨酸钠 > 蛋白胨 > 酵母浸膏 > 鱼蛋白胨 > 明胶水解物; 从最终 DHA 产量来看, 谷氨酸钠 > 酵母浸膏 > 蛋白胨 > 鱼蛋白胨 > 明胶水解物。可见, 虽然谷氨酸钠为氮源时生物量较酵母浸膏低, 但由于谷氨酸钠最利于 *T. roseum* MF2 的脂质积累, 脂质含量高, 因此 DHA 产量较酵母浸膏高。

2.4 碳氮比对 *T. roseum* MF2 生长与产 DHA 的影响

以浓度为 40 g/L 的葡萄糖为碳源, 以谷氨酸钠为氮源, 通过改变其在培养基中的浓度来研究不同碳氮比对 *T. roseum* MF2 生长与产 DHA 的影响作用, 结果见图 9、图 10 和图 11。

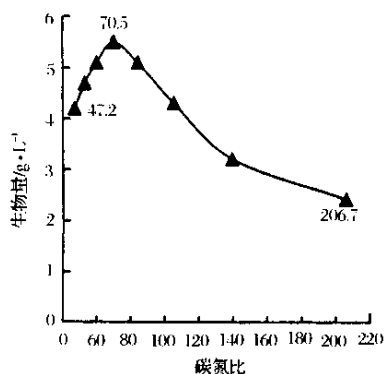


图 9 碳氮比对 *T. roseum* MF2 生物量的影响

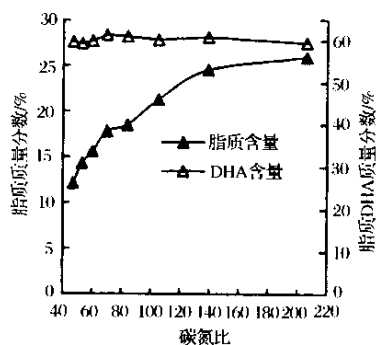


图 10 碳氮比对 *T. roseum* MF2 脂质与 DHA 含量的影响

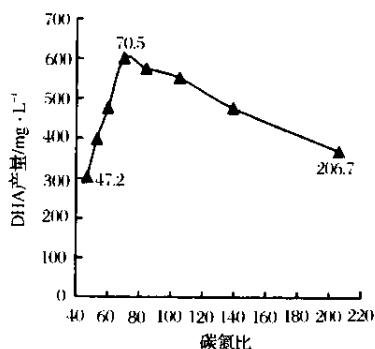


图 11 碳氮比对 *T. roseum* MF2 DHA 产量的影响

试验结果表明, 碳氮比为 70 左右时, 生物量和 DHA 产量最高; 细胞脂质含量随碳氮比的提高而升高, 表明高的碳氮比有利于 *T. roseum* MF2 积累脂质, 而碳氮比对脂质 DHA 含量影响不大, 在碳氮比 40 ~ 220 的范围内 DHA 含量几乎维持在 60% 左右。

2.5 添加不饱和脂对 *T. roseum* MF2 生长与产 DHA 的影响

2.5.1 添加不饱和脂对 *T. roseum* MF2 生长与产 DHA 的影响

试验以葡萄糖(40 g/L)为主要碳源时,探讨添加各种不饱和脂(10 g/L)对 *T. roseum* MF2 生长和产 DHA 的影响作用,结果见表 2。

表 2 添加各种不饱和脂对 *T. roseum* MF2 生长和产 DHA 的影响

不饱和脂	生物量 /g·L ⁻¹	脂质质量 分数/%	脂质 DHA 质 量分数/%	DHA 产量 /mg·L ⁻¹
对 照	5.4	18.4	61.5	611.1
茶 油	5.5	17.5	62.3	599.6
红花油	5.5	19.1	68.8	722.7
紫苏油	5.7	18.6	70.1	743.2
浓缩鳗鱼油	3.4	16.7	36.2	205.5

由试验结果可见,添加茶油、红花油和紫苏油对 *T. roseum* MF2 的生物量、脂质含量均无明显影响,添加红花油和紫苏油使脂质 DHA 含量分别提高 7.3% 和 8.6%,从而使 DHA 产量分别提高 112 mg/L 和 132 mg/L,添加茶油对脂质 DHA 含量和 DHA 产量均无明显影响,添加浓缩鳗鱼油后,生物量减少 37%、脂质 DHA 含量降低 25%、DHA 产量减少 66%,可见添加浓缩鳗鱼油对 *T. roseum* MF2 的生长和产 DHA 产生了强烈的抑制作用。

2.5.2 红花油和紫苏油添加量对 *T. roseum* MF2 生长与产 DHA 的影响

试验进一步研究了红花油和紫苏油添加量对 *T. roseum* MF2 的生长和产 DHA 的影响,结果见图 12、图 13、图 14 和图 15。

由试验结果可见,脂质含量受红花油和紫苏油添加量的影响较小,低浓度时,红花油和紫苏油添加量对生物量影响也不大,而脂质 DHA 含量及 DHA 产量均随二者添加量增加而提高;高浓度时,生物量、脂质 DHA 含量及 DHA 产量均随添加量增加而降低,因为过多的加入这些植物油可能影响溶氧水平从而会抑制菌体的生长及 DHA 的合成。

从 DHA 产量来看,二者的添加量为 4~12 g/L 较为适宜,在此范围紫苏油优于红花油。

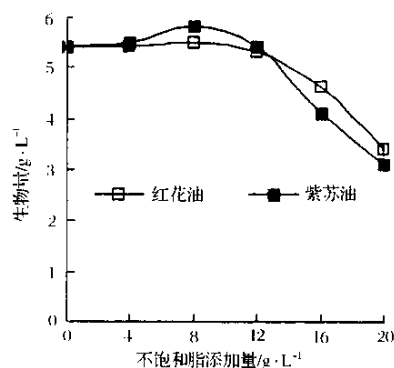


图 12 红花油和紫苏油添加量对 *T. roseum* MF2 生物量的影响

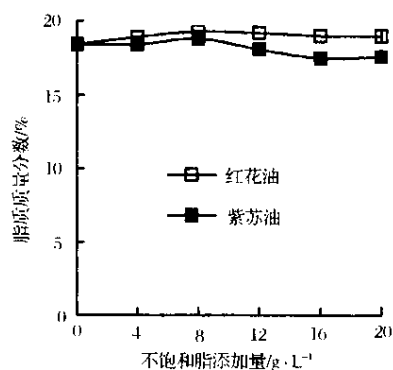


图 13 红花油和紫苏油添加量对 *T. roseum* MF2 脂质含量的影响

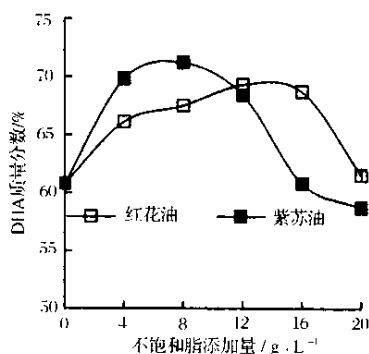


图 14 红花油和紫苏油添加量对 *T. roseum* MF2 DHA 含量的影响

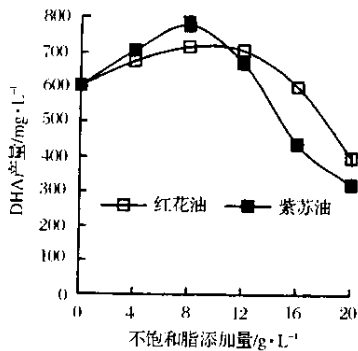


图 15 红花油和紫苏油添加量对 *T. roseum* MF2 DHA 产量的影响

2.6 植物激素对 *T. roseum* MF2 生长与产 DHA 的影响

T. roseum MF2 培养 4 d ,比较各种植物激素对 *T. roseum* MF2 生长与产 DHA 的影响 ,结果见表 3。

表 3 植物激素对 *T. roseum* MF2 生长和产 DHA 的影响

植物激素	生物量 /g·L ⁻¹	脂质含量 /%	脂质 DHA 含量/%	DHA 产量 /mg·L ⁻¹
对照	3.6	18.0	61.7	399.8
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
GA	2.5	18.3	71.5	327.1

由试验结果可见 ,添加 GA 对脂质含量影响不大 ,而且能使脂质 DHA 含量提高 9.8% ,但 GA 对 *T. roseum* MF2 生长有抑制作用 ,使生物量有所减少 ,结果 DHA 产量也有所降低 ;其他几种植物激素均能不同程度提高生物量 ,特别是 KT 和 BA 最为明显 ,其分别使生物量提高了 106%和 153% ,除了 GA 外 ,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 ;从最终 DHA 产量来看 ,仅 KT 和 BA 能明显提高 DHA 产量 ,分别提高了 57%和 68% ,以 BA 的 DHA 产量最高 ,为 673 mg/L。

2.7 植物激素与紫苏油的协同增效效应

前面的试验结果表明 ,BA 对 *T. roseum* MF2 有显著的促生长效应 ,GA 和紫苏油能促进 *T. roseum* MF2 合成 DHA ,基于此将 3 者配合使用 ,探讨协同增效效应 ,结果见表 4。

表 4 植物激素与紫苏油的协同增效效应

编 号	1	2	3	4	5	6
紫苏油/g·L ⁻¹	0.0	0.0	0.0	0.0	8.0	8.0
BA/mg·L ⁻¹	0.0	5.0	0.0	3.0	0.0	3.0
GA/mg·L ⁻¹	0.0	0.0	5.0	2.0	0.0	2.0
生物量/g·L ⁻¹	5.5	9.1	2.5	9.1	5.9	10.1
脂质质量分数/%	17.8	12.3	18.3	15.4	18.4	16.8
DHA 质量分数/%	61.5	60.1	71.5	70.2	71.1	73.2
DHA 产量/mg·L ⁻¹	602	673	327	987	772	1 242

试验结果表明 ,培养基中同时添加 BA、GA 和紫苏油 ,能明显提高生物量、DHA 含量和产量 ,DHA 产量提高了 106% ,可见 3 者有显著的协同增效作用。

3 结 论

DHA 是一种具有多种生理活性的高度不饱和脂肪酸 ,目前其主要商业资源是鱼油。与之比较 ,微生物来源的 DHA 油具有含量高、纯化容易、无鱼腥异味等优点 ,成为当今研究的热点 ,特别是破囊壶菌发酵生产 DHA 极具有工业规模化生产的潜力。本文主要研究了 *T. roseum* MF2 产 DHA 的营养条件。试验结果表明 ,葡萄糖是 *T. roseum* MF2 产 DHA 的理想碳源 ,适宜的葡萄糖浓度为 40 g/L ;谷氨酸钠是 *T. roseum* MF2 产 DHA 的理想氮源 ,适宜的碳氮比为 70 左右 ,紫苏油、BA 和 GA 配合使用使 DHA 产量提高 106% ,达到 1 242 mg/L。

参 考 文 献

- 1 Mitchell D C , Gawrisch K , Litman B J et al. Biochem. Soc. Trans. , 1998 ,26 365 ~ 370
- 2 Neuringer M. Am. J. Clin. Nutr. , 2000 ,71 256 ~ 267
- 3 McLennan P P , Abbeywardena M , Muggle R et al. Eur. J. Pharmacol. , 1996 ,300 83 ~ 89

- 4 薛英本. 国外医学卫生学分册 2000 27(3):165 ~ 171
- 5 Levine B, Bell R Te. Patient Care, 1998 32(2): 87 ~ 92
- 6 Yongmanitchai W, Ward O P. Process Biochem., 1989 24(8):117 ~ 125
- 7 吴克刚,柴向华,杨连生. 湛江海洋大学学报, 2002 22(4):24 ~ 32
- 8 Bajpai P K, Bajpai P, Ward O P. JAOCS, 1991, 68(7):509 ~ 514
- 9 Singh A, Wilson S, Ward O P. World J. Microbiol. Biotechnol., 1996 12 :76 ~ 81
- 10 Yokochi D, Honda D, Higashihara T et al. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1998 49 :72 ~ 76

Nutrition Requirement for DHA Production by *Thraustochytrium roseum*

Wu Kegang¹ Chai Xianghua² Yang Liansheng³

¹C Marine Biological Laboratory, Shantou University, Shantou, 515063)

²Shantou Agricultural Scientific Institute, Shantou, 515021)

³Food and Biotechnological College, South China University of Technology, Guangzhou, 510641)

ABSTRACT In this paper, effects of carbon source, nitrogen source, C/N, unsaturated lipids and phytohormone on DHA production by *Thraustochytrium roseum* MF2 were studied. Results showed that the optimal carbon source for DHA production by *T. roseum* MF2 was glucose of 40g/L, sodium glutamate was the optimal nitrogen source and the optimum C/N was about 70. DHA yield was higher by 106% and reached to 1 242 mg/L with the addition of perillaseed oil, BA and GA into the medium.

Key words *Thraustochytrium roseum*, DHA, nutrition requirement

2002 年我国啤酒产量跃居世界第一

日前,从国家统计局获得的信息得知,中国啤酒产量在持续 9 年位居世界第 2 后,2002 年以 2 386.83 万 t 的产量超过美国居世界第 1。有关负责人表示:尽管中国啤酒产量已跃居世界第 1,但中国的啤酒市场仍有很大空间。目前我国啤酒主要在我国各大中型城市销售,农村市场还未完全开发出来,而这几年农村经济大发展,农民的生活水平也有了很大提高。因此,若把农村市场充分开发出来,就我国啤酒现有的产量还不够。在市场方面,竞争更加激烈,而价格仍是竞争的焦点之一,也是在竞争中运用最多的手段。但啤酒行业经过近几年的竞争,价格空间已经不大,啤酒企业要在产品品种、质量及售后服务方面下工夫;“重视产品的差异化和个性化”将会成为当前啤酒企业的共识。

2002 年我国啤酒产量(万 t)

省市区名	2002 年产量	2001 年产量	省市区名	2002 年产量	2001 年产量	省市区名	2002 年产量	2001 年产量
北 京	131.16	124.39	天 津	14.51	13.59	河 北	128.52	134.86
山 西	16.73	14.87	内 蒙 古	41.10	40.69	辽 宁	137.07	144.17
吉 林	85.74	84.79	黑 龙 江	175.32	139.65	上 海	39.31	36.21
江 苏	102.13	90.78	浙 江	174.25	165.38	安 徽	121.05	124.94
福 建	113.85	115.25	江 西	40.61	40.96	山 东	310.35	296.51
河 南	112.19	118.63	湖 北	104.95	103.07	湖 南	37.90	27.98
广 东	188.62	170.73	广 西	36.89	33.01	海 南	4.57	4.62
重 庆	41.77	40.31	四 川	84.46	79.86	贵 州	10.86	9.47
云 南	18.47	17.92	西 藏	2.91	2.75	陕 西	60.89	51.69
甘 肃	21.66	20.68	青 海	0.29	0.42	宁 夏	7.40	56.31
新 疆	21.30	20.32				全国总计	2 386.83	2 273.81