

维生素对裂殖壶菌发酵产 DHA 的影响

周立树¹, 沈健增², 蔡宇杰^{*1}, 廖祥儒¹, 张大兵²

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏汉邦科技有限公司, 江苏 淮安 223001)

摘要: 采用单因素研究了 VB₁, VB₃, VB₆, VB₁₂, 生物素 5 种 B 族维生素对裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. JN-168 发酵产 DHA 的影响。实验表明: 适量地添加 5 种维生素中的任一种均可提高 DHA 的产量, 5 种维生素的最适的质量浓度分别为 0.1, 0.005, 0.005, 0.3, 0.05 mg/L, 在各自最适的质量浓度下, VB₁₂ 对 DHA 产量的提高效果最好, VB₆ 和 VB₃ 次之, 生物素和 VB₁ 最差。将 5 种维生素以最适的质量浓度同时添加到发酵培养基中可以大幅度提高 DHA 产量, 与对照相比提高了 53.8%, 亦远高于添加单一维生素的效果。

关键词: 维生素; 裂殖壶菌; 二十二碳六烯酸

中图分类号: Q 815 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)09—0927—06

Effect of Vitamins on DHA Production of *Schizochytrium*

ZHOU Li-shu¹, SHEN Jian-zeng², CAI Yu-jie^{*1}, LIAO Xiang-ru¹, ZHANG Da-bing²

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. Hanbon Science and Technology Co. Ltd, Huaian 223001, China)

Abstract: In the manuscript, the effect of VB₁₂, biotin, VB₁, VB₃, VB₆ on the growth of *Schizochytrium* sp. JN-168 and DHA production were studied with single factor experiment. The results showed that the addition of vitamins could efficiently increase the DHA yield and the optimum concentration were 0.1, 0.005, 0.005, 0.3, 0.05 mg/L, respectively. Amongst them, it was found that the highest DHA yield was achieved by VB₁₂ addition. Then followed by VB₆, VB₃, biotin and VB₁. Furthermore, the simultaneous addition of these five kinds of vitamins with the optimum concentration could greatly improve the DHA yield. The final DHA yield was increased by 53.8% compared to the value of the control.

Keywords: vitamin, *Schizochytrium*, DHA

二十二碳六烯酸英文简称 DHA, 系统名为全顺式 $\Delta^{-4,7,10,13,16,19}$ -二十二碳六烯酸, 是 n-3

系列多不饱和脂肪酸中的重要一员。由于含有 5 个不饱和键的特殊结构, DHA 对于人体的健康具有特

收稿日期: 2013-03-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(21275066); 江苏省科技创新与成果转化项目(重大科技支撑与自主创新专项 BY2010117)。

* 通信作者: 蔡宇杰(1973—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物工程方面的研究。

E-mail: yu_jie_cai@yahoo.com.cn

殊的作用和重要的影响。DHA 主要存在于人体的大脑皮层和视网膜中。研究表明:DHA 在预防脑血栓^[1]、促进婴儿的大脑合成、婴幼儿的智力发育^[2]、消炎^[3]、抗心律失常^[4]等方面具有重要作用,此外目前已有学者致力于 DHA 抗癌的研究,有报道称 DHA 可以诱导癌细胞凋亡,在抗癌药物研发的进程中具有广阔的应用前景^[5]。基于二十二碳六烯酸的这些重要作用,它已经广泛应用于食品、医药、饲料等方面。

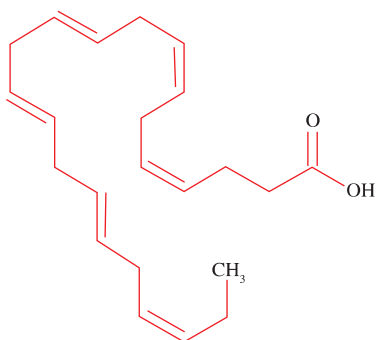


图1 DHA 结构式

Fig. 1 Structure of DHA

目前工业化的 DHA 主要是从深海鱼油中提炼所得,但是从鱼油中提取 DHA 具有诸多弊端,例如腥味重、胆固醇含量高,以及受气候和位置变化的影响,鱼油中 DHA 的含量不稳定。此外鱼油中 DHA 往往与 EPA 同在,分离过程复杂,提取成本较高。这些缺点严重阻碍了 DHA 的工业化发展。利用发酵法生产 DHA 具有含量高、产品质量和产量稳定、脂肪酸组成简单、不含鱼腥味、提取容易等优点,备受国内外学者关注。

裂殖壶菌是隶属于真菌门、卵菌纲、水霉目、破囊壶菌科的一类海洋真菌,由于其具有生长迅速、DHA 含量高、易于培养等优点,是研究 DHA 发酵的最佳菌株。目前国内已有学者致力于通过优化发酵培养基来提高 DHA 的产量,朱路英等研究了碳、氮源浓度和培养时间对裂殖壶菌发酵产 DHA 的影响^[6]。夏小乐等通过分批发酵探求初始碳氮比对 *Schizochytrium* sp.JN-3 发酵产 DHA 的影响,优化后 DHA 产量达到 7.4 g/L^[7]。在菌体生长和代谢过程中,微生物对碳、氮源的需求量大,但是有些生长因子如维生素,微生物对它的需求量较小,但是由于它参与微生物的生长和代谢产物合成,它们的作用也不能忽略。作者研究了 5 种常用维生素对裂殖壶菌发酵产 DHA 的影响,以期为裂殖壶菌高产量发酵

产 DHA 提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. JN168, 由作者所在实验室保存。

1.2 培养基

保藏培养基(g/L):葡萄糖 5,酵母粉 1,蛋白胨 1,琼脂 20;人工海水 1L,pH 自然。

种子培养基(g/L):葡萄糖 40,酵母粉 5,NaNO₃ 1,KH₂PO₄ 1,NaCl 9,MgSO₄·7H₂O 2.6,KCl 0.6,CaCl₂·2H₂O 0.6。

发酵培养基(g/L):葡萄糖 40,酵母粉 5,CH₃COONH₄ 5,NaNO₃ 1,KH₂PO₄ 1,NaCl 9,MgSO₄·7H₂O 2.6,KCl 0.6,CaCl₂·2H₂O 0.6。

以上培养基均在 121 °C 下灭菌 20 min。

1.3 方法

1.3.1 菌种保藏 将制备好的斜面放置在 4 °C 冰箱中保藏,每隔 15 d 转接一次。

1.3.2 种子制备 将保藏在 4 °C 冰箱中的斜面接种到装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 容量三角瓶中,每瓶一环。25 °C、200 r/min 培养 42 h。

1.3.3 摇瓶培养 种子液以 10%的接种量接入到装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 容量三角瓶中,25 °C、200 r/min 培养 96 h。

1.3.4 生物量的测定 发酵结束后,将培养物 7 500 r/min 高速离心 10 min,倾去上清液,用去离子水重复洗涤沉淀 3 次,收集沉淀在-80 °C 下冷冻干燥至恒重。用分析天平准确称得其质量。

1.3.5 维生素的添加 在培养基中分别加入维生素 VB₁、VB₃、VB₅、VB₆、VB₁₂ 以及生物素。VB₁、生物素加入的质量浓度(mg/L):0.05,0.1,0.15,0.2;VB₁₂ 的质量浓度(mg/L):0.1,0.2,0.3,0.4,0.5;VB₃、VB₆ 添加质量浓度(mg/L):0.005,0.05,0.5,1.0。每种维生素每个质量浓度设 3 个水平进行实验。

1.3.6 油脂提取 采用改进的酸热法提取:向 0.5 g 烘干至恒重的菌体中加入 4 mL 6 mol/L 的盐酸,于 80 °C 水浴中保持 50 min。冷却至室温后向其中加入 4 mL 氯仿甲醇的等体积混合液抽提油脂,重复抽提直至氯仿层无色,合并氯仿层,挥发去除有机溶剂。

1.3.7 DHA 检测 称取 50 mg 粗油脂加入到 50 mL 的离心管中,以 2 mg 十九酸作为内标,混合均匀后

向其中加入0.4 mol/L的氢氧化钾-甲醇溶液 5 mL,在 50 ℃水浴中皂化 1 h。冷却至室温后再向其中加入 5 mL 质量分数 14%的三氯化硼-甲醇溶液,于 50 ℃水浴中维持 1 h 进行甲基化。衍生化完成后加入 5 mL 正己烷和 2 mL 饱和氯化钠萃取,静置分层,小心移取上层溶液检测。

脂肪酸甲酯采用配有 FID 检测器和 CP-WAX (30 m×0.32 mm)色谱柱的气相色谱仪 GC-2010 进行分析。分流方式进样,进样量 0.8 μL,分流比 1:4;载气为氮气;检测过程采用程序升温,初始柱温 120 ℃保持 3 min 后,以 5 ℃/min 升温到 180 ℃保持 1 min,再以 3 ℃/min 升温到 220 ℃,保持 12 min。进样口和检测器温度均为 250 ℃。

2 结果与分析

2.1 VB₁₂ 对 *Schizochytrium* sp. JN168 发酵产 DHA 的影响

在基础发酵培养基中单独添加 VB₁₂,使得其终质量浓度梯度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/L,对照为不添加任何维生素。菌体培养 96 h 后检测菌体生物量、菌体中油脂含量、油脂中 DHA 含量。VB₁₂ 对裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. JN168 生长和 DHA 积累的影响如图 2 所示。

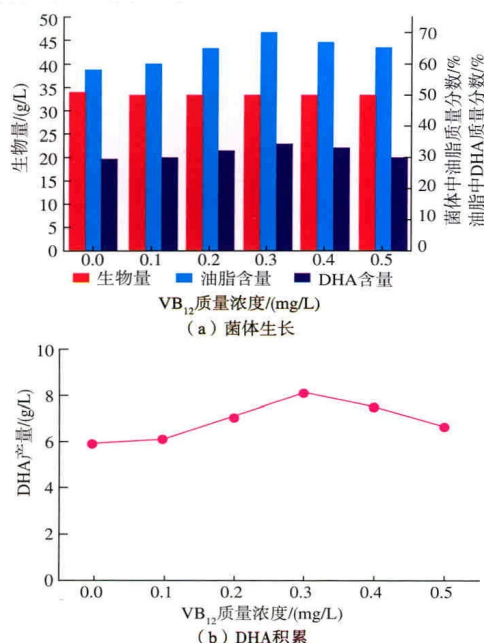


图 2 VB₁₂ 对裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. JN168 发酵产 DHA 的影响

Fig. 2 Effect of VB₁₂ on the DHA production of *Schizochytrium* sp. JN168

从图 2 可知,向基本发酵培养基中添加 VB₁₂ 对菌体的生物量没有明显影响,但是却能显著提高菌体中油脂的含量和油脂中 DHA 的含量。当 VB₁₂ 质量浓度为 0.3 mg/L 时菌体中油脂质量分数、油脂中 DHA 质量分数以及 DHA 产量同时达到最大,分别为 70.02%、34.4%、8.05 g/L,与对照相比分别提高了 16.5%、13.4%、37.4%。此后随着 VB₁₂ 质量浓度的增加,菌体中油脂的含量和油脂中 DHA 的含量随之下降。

分析 VB₁₂ 促进油脂和 DHA 比例提高的原因,可能是基于其可以作为脂肪酸合成过程中一些特异性酶的辅酶这一特性。例如:VB₁₂ 可以作为脱氢酶的辅酶^[8]。另外,生物在代谢过程中会产生甲基丙二酰-CoA,它与脂肪酸合成底物丙二酰-CoA 的结构相似,它的存在会使脂肪酸合成代谢异常,而 VB₁₂ 作为甲基丙二酰-CoA 变位酶的辅酶,可以与甲基丙二酰-CoA 变位酶共同作用将甲基丙二酰-CoA 转变为琥珀酰-CoA,使脂肪酸的代谢途径恢复正常。

2.2 生物素和 VB₁ 对 *Schizochytrium* sp. JN168 发酵产 DHA 的影响

在基础发酵培养基中单独添加生物素,使得其终质量浓度梯度为 0.05、0.1、0.15、0.2 mg/L。同理,设计同样的质量浓度梯度考察 VB₁ 对 *Schizochytrium* sp. JN168 发酵产 DHA 的影响。对照为不添加任何维生素。菌体培养 96 h 后检测菌体生物量、菌体中油脂含量、油脂中 DHA 含量。VB₁ 和生物素对裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. JN168 生长和 DHA 积累的影响分别如图 3、图 4 所示。

从图 3 可知,向基本发酵培养基中添加生物素可以明显促进菌体的生长,但是对菌体中油脂的含量以及油脂中 DHA 含量没有明显的影响。在生物素终质量浓度为 0.05 mg/L 时,菌体生物量达到最大为 37.8 g/L,与对照相比提高了 11.6%。基于添加生物素后菌体的大量积累,DHA 的产量也随之增加,DHA 产量的最高点亦出现在生物素浓度为 0.05 mg/L 处,此时 DHA 产量为 6.6 g/L,与对照相比提高了 11.6%。随着生物素浓度的进一步增加,生物量增加的幅度开始减弱,DHA 产量的增幅随之减小,但是在选定的浓度范围内始终高于对照。

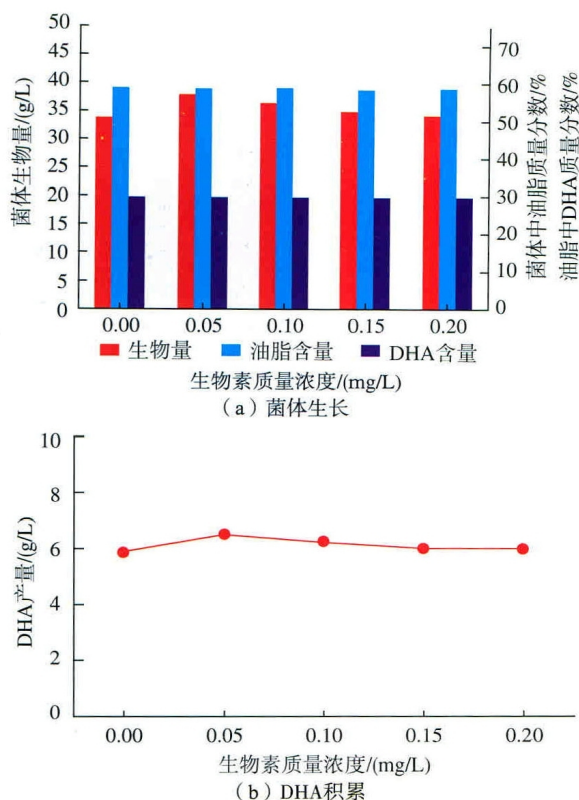


图3 生物素对裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. JN168 发酵产 DHA 的影响

Fig. 3 Effect of Biotin on the DHA production of *Schizochytrium* sp. JN168

向发酵培养基中添加生物素有利于菌体生长的这一结论已经有过许多文献报道。例如:李剑研究 *L.delbrueckii* 发酵产乳酸时发现,向培养基中添加生物素后,可以大幅度提高菌体的生物量^[9]。王宝贝研究维生素对红法夫酵母产虾青素的影响时发现生物素添加量为 0.5 mg/L 时,生物量浓度较对照提高 31.1%^[10]。生物素对菌体具有明显的促进作用,可能是因为生物素是生物体内多种酶如脱羧酶、羧化酶以及脱氢酶的辅酶、参与生物体内的新陈代谢。

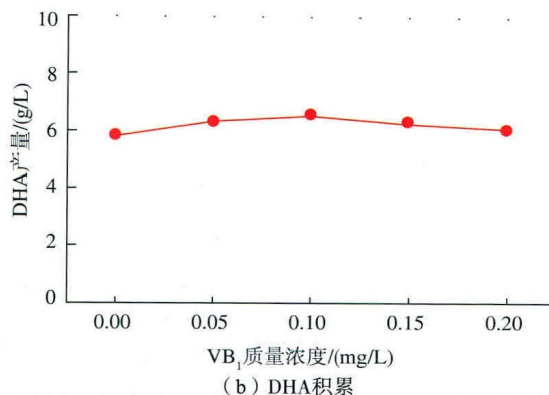
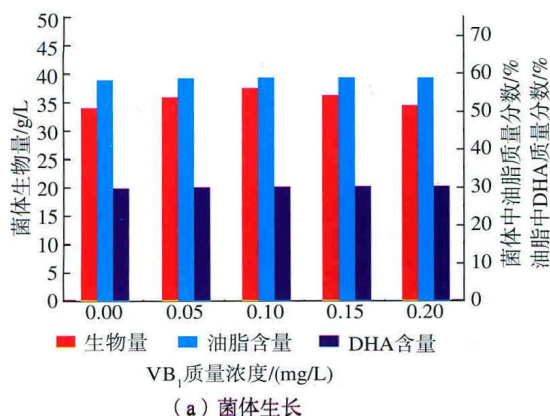


图4 VB₁ 对裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. JN168 发酵产 DHA 的影响

Fig. 4 Effect of VB₁ on the DHA production of *Schizochytrium* sp. JN168

从图 4 可知,VB₁ 对 *Schizochytrium* sp. JN168 发酵产 DHA 的影响与生物素类似,它们都只能对菌体的生长起到一定的促进作用,对菌体中的油脂含量和油脂中的 DHA 含量的影响很小。在 VB₁ 质量浓度为 0.1 mg/L 时,菌体生物量和 DHA 产量同时达到最大,分别为 37.28 g/L 和 6.6 g/L,与对照相比分别提高了 10.1%和 12.6%。

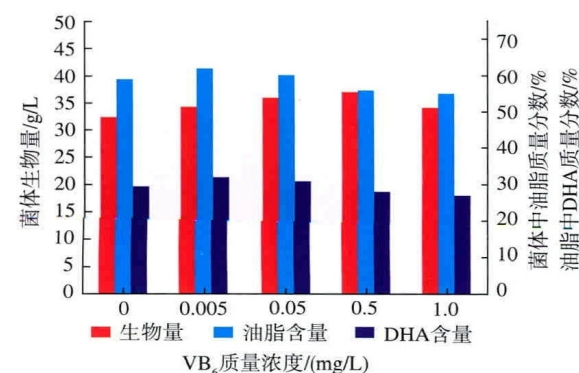
VB₁ 是脱羧酶的辅酶,参与体内糖代谢的过程,对菌体的生长具有促进作用。Tuttle 在考察 *Cryptocodinium cohnii* 的培养基组成时,发现在培养基中添加 VB₁ 和生物素时菌体生物量增加显著^[11]。与作者的研究结果相符。

2.3 VB₃ 和 VB₆ 对 *Schizochytrium* sp. JN168 发酵产 DHA 的影响

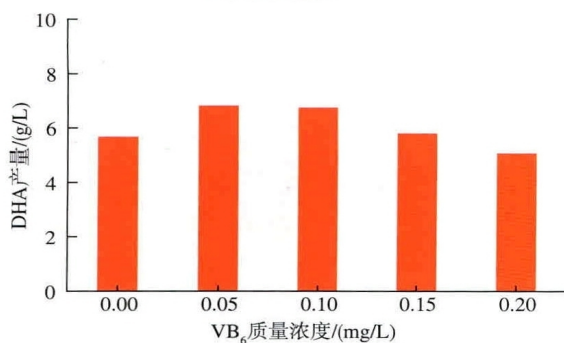
在基础发酵培养基中单独添加 VB₆, 使得其终质量浓度梯度为 0.005、0.05、0.5、1.0 mg/L。同理,设计同样的浓度梯度考察 VB₃ 对 *Schizochytrium* sp. JN168 发酵产 DHA 的影响。对照为不添加任何维生素。菌体培养 96 h 后检测菌体生物量、菌体中油脂含量、油脂中 DHA 含量。VB₆ 和 VB₃ 对裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. JN168 生长和 DHA 积累的影响分别如图 5、图 6 所示。

VB₆ 同样是生物体内许多酶系的重要辅酶。除了参与机体的转氨基反应影响菌体的生长外,它还参与多不饱和脂肪酸的代谢。从图 5 可知,向基本发酵培养基中添加 VB₆ 可以促进菌体生长,在 VB₆ 的终质量浓度为 0.5 mg/L 时,菌体生物量达到最大,相比对照提高了 14.0%。但是只有低质量浓度的 VB₆ 才能促进菌体中油脂的含量和油脂中 DHA 含

量的提高,当VB₆的质量浓度为0.005 mg/L时,菌体中油脂的含量和油脂中DHA含量同时达到最大,与对照相比分别提高了5%和8%。此后随着VB₆质量浓度的进一步提高,菌体中油脂的含量和油脂中DHA含量开始呈现下降趋势,并逐渐降低到对照以下。由于VB₆对*Schizochytrium* sp. JN168的菌体生长的影响程度要小于对其菌体中油脂的含量和油脂中DHA含量的影响程度,所以DHA的产量的最高点与后两者一致,也出现在VB₆质量浓度为0.005 mg/L处,此时的DHA产量与对照相比提高了20.0%。



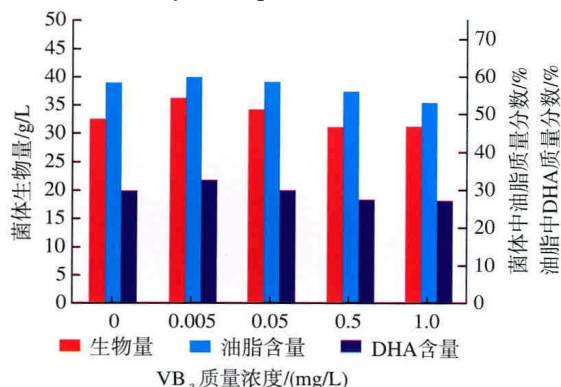
(a) 菌体生长



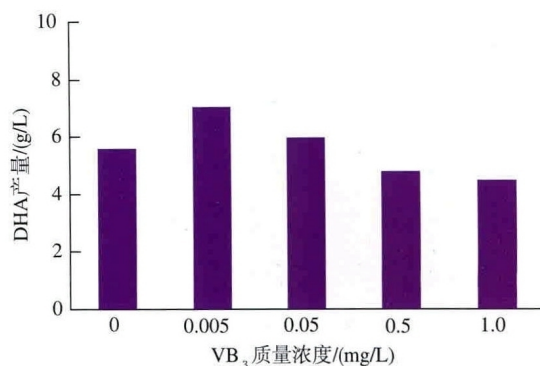
(b) DHA积累

图5 VB₆对裂殖壶菌*Schizochytrium* sp. JN168发酵产DHA的影响

Fig. 5 Effect of VB₆ on the DHA production of *Schizochytrium* sp. JN168



(a) 菌体生长



(b) DHA积累

图6 VB₃对裂殖壶菌*Schizochytrium* sp. JN168发酵产DHA的影响

Fig. 6 Effect of VB₃ on the DHA production of *Schizochytrium* sp. JN168

VB₃是辅酶I和辅酶II的组成部分,在糖酵解和脂质代谢过程中具有重要作用。从图6可知,在基本发酵培养基中添加VB₃对菌体生长、菌体中的油脂含量和油脂中的DHA含量的影响相似,都是低浓度促进,高浓度抑制。在VB₃质量浓度为0.005 mg/L时,菌体生物量、菌体中油脂含量以及油脂中DHA含量同时达到最大,此时所对应的DHA产量为7.08 g/L,与对照相比提高了26.2%。随着VB₃质量浓度的进一步提高,DHA产量开始下降。

2.4 添加5种维生素对*Schizochytrium* sp. JN168发酵产DHA的影响

基于上述单因素实验的结果,将VB12、生物素、VB1、VB6、VB3同时添加到发酵培养基中,使其终质量浓度依次为:0.3,0.05,0.1,0.005,0.005 mg/L,对照为不添加任何维生素,培养96 h后所得结果如图7所示。

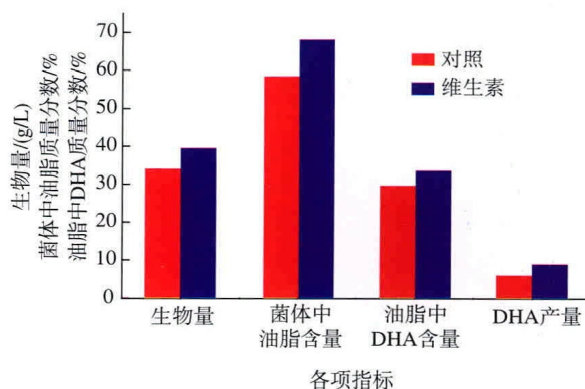


图7 混合维生素对裂殖壶菌*Schizochytrium* sp. JN168发酵产DHA的影响

Fig. 7 Effect of mixed vitamin on the DHA production of *Schizochytrium* sp. JN168

从图 7 可知,向基本发酵培养基中添加 5 种维生素的混合液,无论是对菌体生长还是 DHA 的积累都是十分有利的。在发酵 96 h 后菌体的生物量和 DHA 产量分别为 39.44 g/L 和 9.01 g/L,与对照相比提高了 16.4%和 53.8%。

3 结 语

通过单因素实验研究了 VB₁₂、生物素、VB₁、VB₆、VB₃ 对 *Schizochytrium* sp.JN168 菌体生长和 DHA 积累的影响。实验表明:VB₁₂ 对菌体内油脂含

量和油脂内 DHA 含量影响较大,而对生物量没有明显影响;生物素和 VB₁ 对菌体生物量影响较大,对菌体内油脂含量和油脂内 DHA 含量没有明显影响;VB₃ 和 VB₆ 则对这三者都有明显影响。适量添加 5 种维生素中的任意一种都能够促进菌体内 DHA 的积累,提高 DHA 产量。

将 5 种维生素的混合液以最佳质量浓度添加到发酵培养基中,可以极大地促进 DHA 的积累,效果好于添加单一维生素。

参考文献:

- [1] 蔡双莲,李敏. 多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 生命科学研究,2003,7(4):289-304.
CAI Shuang-lian,LI Min. Advances in polyunsaturated fatty acids[J]. **Life Science Research**,2003,7(4):289-304. (in Chinese)
- [2] Mitchell D C,Gawrisch K,Litman B J,et al. Why is docosahexaenoic acid essential for nervous system function[J]. **Biochemical Society Transactions**,1998,26(3):365-370.
- [3] 扶志敏,王正. ω -3 多不饱和脂肪酸抗炎机制研究进展[J]. 医药导报,2009,28(9):1174-1176.
FU Zhi-min,WANG Zheng. The research progress of ω -3 Polyunsaturated fatty acids in the anti-inflammatory mechanism[J]. **Herald of Medicine**,2009,28(9):1174-1176. (in Chinese)
- [4] Leaf A,Kang J X,Xiao Y F,et al. Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by N-3 fish oils[J]. **Circulation**,2003,107(21):2646-2652.
- [5] Connolly J M,Gilhooly E M,Rose D P. Effects of reduced dietary linoleic acid intake, alone or combined with an algal source of docosahexaenoic acid, on MDA-MB-221 breast cancer cell growth and apoptosis in nude mice[J]. **Nutrition Cancer**,1999,35(1):44-49.
- [6] 朱路英,张学成,宋晓金,等. 碳、氮源浓度和培养时间对裂殖壶菌生长和脂肪酸组成的影响[J]. 中国海洋大学学报,2007,37(2):293-298.
ZHU Lu-ying,ZHANG Xue-cheng,Song Xiao-jin,et al. Effects of concentration of carbon and nitrogen sources and incubation time on the growth and fatty acid composition of schizochytrium limacinum[J]. **Periodical of Ocean University of China**,2007,37(2):293-298. (in Chinese)
- [7] 夏小乐,杨海麟,李宇佶,等. 碳氮比对 *Schizochytrium* sp.JN-3 发酵产 DHA 的影响及其中试研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(36):22201-22203.
XIA Xiao-le,YANG Hai-lin,LI Yu-Ji,et al. Effect of C/N ratio on DHA production by schizochytrium sp.JN-3 and its pilot fermentation[J]. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**,2011,39(36):22201-22203. (in Chinese)
- [8] Eugene P F,Richard L K. The effect of Vitamin B₁₂ deprivation on the enzymes of fatty acid synthesis[J]. **The Journal of Biological Chemistry**,1973,21(248):7540-7546.
- [9] 李剑,高年发,杨枫,等. 维生素对 *L.delbrueckii* 乳酸发酵的影响及其优化[J]. 广东食品工业科技,2001,17(1):63-67.
LI Jian,GAO Nian-fa,YANG Feng,et al. Effect of Vitamin on lactic acid fermentation of *L.delbrueckii* and its optimization[J]. **Guangzhou Food Science and Technology**,2001,17(1):63-67. (in Chinese)
- [10] 王宝贝,凌雪萍,郑宗宇,等. 维生素对红法夫酵母产虾青素的影响[J]. 厦门大学学报,2011,50(1):111-115.
WANG Bao-bei,LING Xue-ping,ZHENG Zong-yu,et al. Effect of vitamins on astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma*[J]. **Journal of Xiamen University**,2011,50(1):111-115. (in Chinese)
- [11] Tuttle R C,Loeblich A R. An optimal growth medium for the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*[J]. **Phycologia**,1975,14(1):1-8.