

文章编号 :1009 - 038X(2002)04 - 0344 - 03

## 隐甲藻(*Crypthecodinium cohnii*)悬浮 培养生产 DHA

王菊芳<sup>1</sup>, 梁世中<sup>1</sup>, 陈峰<sup>2</sup>

(1. 华南理工大学 食品与生物工程学院, 广东 广州 510640; 2. 香港大学 植物学系, 香港 薄扶林道)

**摘要:**研究了培养温度、初始 pH、碳源及氮源等对隐甲藻(*Crypthecodinium cohnii* ATCC30556)悬浮培养生产 DHA 影响。通过正交试验得到的优化培养基组成为(g/L):葡萄糖 20,甘油 20,蛋白胨 5, KNO<sub>3</sub> 5, NaCl 6, MgSO<sub>4</sub> 1.6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, VH 0.006, VB<sub>12</sub> 0.001, 另外添加 1 mL/L 橄榄油, 6 mL/L 丙酮酸。优化培养条件为:5%接种量, 初始 pH 7.0。黑暗条件培养, 装液量为 500 mL 三角瓶装 50 mL 培养基, 30 °C 培养 32 h 后转到 20 °C 培养直至收获。在优化培养基配方和培养条件下, 隐甲藻悬浮培养 64 h 后, 生物量和 DHA 产量分别为 10.78 g/L 和 1.21 g/L。

**关键词:**隐甲藻; 悬浮培养; 二十二碳六烯酸(DHA)

中图分类号:Q 949.241

文献标识码:A

## Studies on Docosahexaenoic Acid Production by Suspension Culture of *Crypthecodinium cohnii* ATCC30556

WANG Ju-Fang<sup>1</sup>, LIANG Shi-Zhong<sup>1</sup>, CHEN Feng<sup>2</sup>

(1. College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China; 2. Department of Botany, HongKong University, Hongkong, China)

**Abstract:** The effects of the culture temperature, initial pH of medium, carbon source and nitrogen source on the production of docosahexaenoic acid by *Crypthecodinium cohnii* ATCC30556 were studied. Through orthogonal experiments, the optimum culture medium was obtained(g/L): glucose, 20; glycerol, 20; peptone, 5; KNO<sub>3</sub>, 5; NaCl, 6; MgSO<sub>4</sub>, 1.6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0; vitamin H, 0.006; vitamin B<sub>12</sub>, 0.001 as well as 1 mL/L olive oil and 6 mL/L pyruvic acid. Optimum culture conditions were followings: 5% inoculum, initial pH 7.0, culture in dark, 50 mL medium in 500 mL flask, after culturing at 30 °C for 32 h, then shifting into 20 °C until harvesting. Under the optimal conditions, dry biomass and DHA yields were 10.78 g/L and 1.21 g/L respectively after 64 hours' suspension culture in flask.

**Key words:** *Crypthecodinium cohnii*; suspension culture; docosahexaenoic acid

收稿日期 2001 - 12 - 24; 修订日期 2002 - 04 - 28.

基金项目 广东省自然科学基金项目资助课题(970486).

作者简介 王菊芳(1973 - ),女,湖北松滋人,工学博士,讲师.

微藻能生产多种多不饱和脂肪酸<sup>[1,2]</sup>,其中的二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid,简称 DHA)对智力发育、治疗心血管疾病、抗肿瘤、防治老年痴呆以及抑制癌变等方面有着重要的生理调节功能和保健作用,在疾病预防及治疗方面已引起了广泛的兴趣<sup>[3]</sup>.由于化学方法无法合成 DHA,目前 DHA 主要来源于深海鱼油,但存在着产量不稳定、分离提纯困难以及产品有鱼腥味等缺点.

利用微藻培养生产 DHA 可克服以上不足,不仅可全年进行生产,还可通过控制培养环境及营养方式控制脂质产量和组成,而且脂质组成简单,DHA 含量高,分离提纯简便.目前,我国在利用海洋微生物生产 DHA 方面的研究工作刚刚起步.经过多年研究,作者筛选得到的一株隐甲藻(*Cryptocodium cohnii* ATCC30556)异氧培养具有较高的产 DHA 能力<sup>[4]</sup>,其脂肪酸组成的 30% 以上是 DHA,而其他的多不饱和脂肪酸不超过 1%,是生产 DHA 的良好藻种.

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种

隐甲藻(*Cryptocodium cohnii* ATCC30556)由香港大学植物学系陈峰博士筛选,作者所在实验室保存.

### 1.2 培养基组成

采用 Porphyridium<sup>[5]</sup>培养基,每升基础培养基含:人造海水 500 mL,蒸馏水 400 mL,泥土浸出液 100 mL,胰蛋白胨 1 g,酵母抽提物 1 g,葡萄糖 5 g.

### 1.3 藻种细胞干重的测定

100 mL 藻种细胞装入预先称重的离心管中,4 000 r/min 离心 10 min,沉淀后用蒸馏水清洗 3 次,50 ℃下真空干燥,定期取出,在干燥器内冷却后称重,直至恒重(DC).

### 1.4 脂质提取

改进的 Bligh 和 Dyer 法提取脂质<sup>[6]</sup>.

### 1.5 DHA 含量测定

脂质成分加入一定量内标物(十七烷酸),用甲醇钠/甲醇溶液甲酯化,用正己烷多次萃取,收集后用氮气吹干,重新定容后用毛细管气相色谱法分析.色谱条件:热导池检测器,DB-5 毛细管柱(0.35 mm × 15 m),载气为氦气,体积流量 20 mL/min,初温 170 ℃,保留 2 min,升温速率 8 ℃/min,终温 235 ℃,保留 8 min,汽化室温度及检测器温度均为 265 ℃.万方数据

## 2 结果与分析

### 2.1 培养温度对隐甲藻产生 DHA 的影响

对微藻体内脂肪酸的代谢途径而言,培养温度较高有利于细胞生长,培养温度较低则有利于脂肪酸的累积<sup>[7]</sup>.实验设计 5 种培养温度:15,20,25,30,35 ℃及 3 种温度转换处理:30 ℃(24 h)→20 ℃,30 ℃(32 h)→20 ℃和 30 ℃(40 h)→20 ℃,从培养 0 h 开始,每 8 h 取样 1 次,摇瓶测定培养温度、隐甲藻生长和 DHA 产量的影响,结果见表 1.隐甲藻体内 DHA 积累的温度低于生长的最适温度,15,20,25 ℃ 3 种培养温度时 DHA 产量接近,30 ℃(32 h)→20 ℃处理可获得最大的 DHA 产量(0.29 g/L).温度转换处理的最佳时间为培养 32 h,太早或太晚进行温度转换,最终获得的 DHA 产量都偏低.

表 1 培养温度对隐甲藻生产 DHA 的影响

Tab.1 Effect of culture temperature on the production of DHA by *Cryptocodium cohnii* ATCC30556

培养温度/℃	细胞干重/(g/L)	DHA 产量/(g/L)
15	2.29	0.26
20	2.48	0.26
25	2.80	0.26
30	2.81	0.17
35	1.70	0.018
30(24 h)→20	2.21	0.20
30(32 h)→20	2.74	0.29
30(40 h)→20	2.81	0.19

### 2.2 初始 pH 对隐甲藻产生 DHA 的影响

研究了 6 种初始 pH 值对隐甲藻产生 DHA 的影响,结果见表 2.初始 pH 为 7.0 时,生长最快,DHA 产量也最高.

表 2 初始 pH 值对隐甲藻生产 DHA 的影响

Tab.2 Effect of initial pH on the production of DHA by *Cryptocodium cohnii* ATCC30556

初始 pH	细胞干重/(g/L)	DHA 产量/(g/L)
5.0	0.41	0.0089
5.5	1.65	0.056
6.0	1.90	0.098
6.5	2.70	0.24
7.0	3.06	0.29
7.5	2.79	0.25

2.3 碳源对隐甲藻产生 DHA 的影响

在基础培养基中,以相同的含碳量选用 4 种单一氮源:葡萄糖、甘油、糖蜜、乙酸钠,4 种复合碳源(1:1):葡萄糖/甘油,葡萄糖/乙酸钠,葡萄糖/糖蜜,糖蜜/甘油.摇瓶培养测定隐甲藻生物量和 DHA 产量,结果见表 3.对隐甲藻生长最有利的单一碳源是葡萄糖,最大生物量为 3.06 g/L,以甘油为单一碳源培养 DHA 产量最高为 0.33 g/L.隐甲藻培养最佳复合碳源为 1:1 的葡萄糖/甘油,DHA 产量为 0.54 g/L.

表 3 碳源对隐甲藻生产 DHA 的影响

Tab.3 Effect of carbon source on the production of DHA by *Cryptocodinium cohnii* ATCC30556

碳 源	细胞干重/(g/L)	DHA 产量/(g/L)
葡萄糖	3.06	0.28
甘油	1.49	0.33
糖蜜	1.67	0.21
乙酸钠	1.24	0.14
葡萄糖/甘油	3.06	0.54
葡萄糖/乙酸钠	2.80	0.20
葡萄糖/糖蜜	3.16	0.25
糖蜜/甘油	3.47	0.50

2.4 氮源对隐甲藻产生 DHA 的影响

在基础培养基中,保持总含氮量为 0.34 g/L,选用 6 种单一氮源:胰蛋白胨、蛋白胨、硝酸钾、硝酸钠、硝酸铵、尿素及 5 种蛋白胨/硝酸钾比例复合氮源:蛋白胨-氮与 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 分别为 3:1,2:1,1:1,1:2,1:3.摇瓶培养结果见表 4.当复合氮源中蛋白胨-氮与 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 为 1:2 时,隐甲藻有着最大的生物量和 DHA 产量,分别为 2.98 g/L 和 0.53 g/L.

表 4 氮源对隐甲藻产生 DHA 的影响

Tab.4 Effect of nitrogen source on the production of DHA by *Cryptocodinium cohnii* ATCC30556

氮源	细胞干重/(g/L)	DHA 产量/(g/L)
胰蛋白胨	2.78	0.31
蛋白胨	2.70	0.33
硝酸钾	2.50	0.29
硝酸钠	1.82	0.28
硝酸铵	1.42	0.13
尿素	1.80	0.19
蛋白胨-氮:硝酸根-氮 = 3:1	2.77	0.37
蛋白胨-氮:硝酸根-氮 = 2:1	2.85	0.40
蛋白胨-氮:硝酸根-氮 = 1:1	2.88	0.46
蛋白胨-氮:硝酸根-氮 = 1:2	2.98	0.53
蛋白胨-氮:硝酸根-氮 = 1:3	2.80	0.45

2.5 最适培养基组成及培养条件的确定

利用正交试验考察了培养基中碳源、氮源、无机盐以及培养条件等对隐甲藻产生 DHA 的影响,其最适培养基组成为(g/L):葡萄糖 20,甘油 20,蛋白胨 5, KNO<sub>3</sub> 5, NaCl 6, MgSO<sub>4</sub> 1.6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, VH 0.006, VB<sub>12</sub> 0.001.另外每升培养基添加橄榄油 1 mL,丙酮酸 6 mL.优化培养条件为:采用 5%接种量,初始 pH 7.0,黑暗条件培养,装液量为 500 mL 三角瓶装培养基 50 mL,30 ℃培养 32 h 后转到 20 ℃培养直至收获.在优化培养基配方和培养条件下,隐甲藻悬浮培养 64 h 后生物量和 DHA 产量分别为 10.78 g/L 和 1.21 g/L,DHA 产率和底物转化系数分别为 0.489 g/(L·d)和 0.359 g/g. DHA 产量同优化前相比有大幅度的提高,DHA 产量仅次于 Martek 公司产品<sup>[4]</sup>.

参考文献:

[1] COHEN Z. Production potential of eicosapentanoic acid by *Monodus subterraneus*[ J ]. **JAOCS**, 1994, 71(9): 941 - 945.  
 [2] BEHRENS P W, HOEKSEMA S D, ARNETT K L, et al. Novel microbial products for medicine and agriculture[ M ]. Amsterdam :Elsevier Science Publishers, 1989. 253 - 259.  
 [3] GILL I, VALIVETY R. Polyunsaturated fatty acids, Part I: Occurrence, biological activities and applications[ J ]. **TITECH**, 1997, 15: 401 - 409.  
 [4] JIANG Y, CHEN F, LIANG S Z. Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*[ J ]. **Process Biochemistry**, 1999, 34: 633 - 637.  
 [5] STARR R C, ZEIKUSI J A. UTEX-the culture collection of algae at the university of Texas Austin[ J ]. **J Phycol**, 1993, 29 (suppl): 94.  
 [6] 王菊芳, 梁世中, 陈峰. 碳源对隐甲藻 (*Cryptocodinium cohnii*) 生长及 DHA 产量的影响[ J ]. **中国油脂**, 2000, 25(6): 209 - 211.  
 [7] SUUTARI M, PRIHA P, LAAKSO S. Temperature shifts in regulation of lipids accumulated by *Lipomyces starkeyi*[ J ]. **JAOCS**, 1999, 76(9): 891 - 894.

(责任编辑:李春丽)