

# 隐甲藻深层培养产生二十碳五烯酸的研究

杨 革 徐承水

(山东曲阜师范大学生物系 曲阜 273165)

关键词 隐甲藻, 深层培养, 二十碳五烯酸

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0221-03

二十碳五烯酸(C20:5, Eicosapentaenoic acid, 简称 EPA) 是一种重要的  $\omega$ -3 系列人体必需多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acids, PUFA)<sup>[1-2]</sup>。自从 Dyerberge 等人报道了二十碳五烯酸对防止和治疗血栓、动脉硬化、抗炎症、抗癌、促进脑组织发育等方面具有明显效果以来, 人们对它的营养和医药价值及生产方法进行了广泛的研究<sup>[3-6]</sup>。目前, 二十碳五烯酸主要来源于深海鱼油, 但其产量不稳定, 纯化工艺复杂且含有难以消除的鱼腥味, 难以满足市场的需求。

由于二十碳五烯酸属于多不饱和脂肪酸, 化学方法无法合成, 而某些微藻具有一种特异的氧化能力, 能够从头合成二十碳五烯酸, 因此可用异养微藻进行深层培养, 生产二十碳五烯酸。国外利用微藻培养生产多不饱和脂肪酸的研究始于 20 世纪 80 年代, 发现 *Nannochloropsis salina*, *Diatom*, *Cryptocodinium cohnii*, *Porphyridium Cruentum* 等微藻中多不饱和脂肪酸的含量较高<sup>[7-9]</sup>。目前国内在这方面的研究还未见文献报道。本文对一株隐甲藻产生二十碳五烯酸的培养基组成、培养条件及摇瓶深层培养进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验藻种

隐甲藻(*Cryptocodinium cohnii* C98), 山东曲阜师范大学生物系保存。

### 1.2 培养基

斜面培养基: Kuh1 培养基<sup>[10]</sup>。

种子培养基: 每升培养基含葡萄糖 20g, 酵母膏 1.0g, 蛋白胨 1.0g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{NaCl}$  2.0g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.2g, pH6.0。

基础培养基: 每升培养基含葡萄糖 40g, 酵母膏 0.5g,  $\text{KNO}_3$  2.0g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{NaCl}$  3.0g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.2g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5.5mg,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  16mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.4mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.3mg, pH6.0。

### 1.3 微藻的培养与收集

1.3.1 藻种活化: 将保存藻种转移至斜面培养基上, 自然光照下 25℃ 培养 5d。

1.3.2 种子液制备: 用 5mL 无菌水将斜面微藻洗入装有 50mL 种子培养基的 250mL 三角瓶中, 25℃, 150r/min 下摇瓶培养 5d。

1.3.3 摇瓶培养: 取 6mL 种子液于装有 100mL 培养基的 500mL 三角瓶中, 25℃, 150r/min 下摇瓶培养 6d。

1.3.4 微藻的收集及冷冻干燥: 用布氏漏斗对培养液进行减压抽滤, 藻体用蒸馏水洗 3 次后, 湿藻体用冷冻干燥机在 -10℃, 真空度大于 0.92MPa 下干燥至恒重, 得藻细胞干重(DC)。

### 1.4 主要分析方法

1.4.1 培养液残糖的测定: DNS 定糖法<sup>[11]</sup>。

1.4.2 藻体油脂的抽提: 采用 Soxhlet 提取法<sup>[12]</sup>。

1.4.3 油脂中二十碳五烯酸含量的气相色谱测定:

采用氢氧化钾—甲醇酯交换法<sup>[13]</sup>处理样品, 用岛津 GC-9A 气相色谱仪, C-RIB 数据处理, 白色酸洗单体 60~80 目 Chromoborb W, 固定液为 3%(W/W)的丁二酸二乙醇酯(DEGS)载体  $\text{N}_2$  流量 50mL/min, 氢焰离子检测器(ID), 柱温 200℃, 检测器及进口温度 250℃。以高纯度的二十碳五烯酸(Fluka 产品, 纯度 99%)作为标准品。

## 2 结果与讨论

### 2.1 温度对微藻产生二十碳五烯酸的影响

温度是影响微藻生长及二十碳五烯酸产量的重要因素, 结果如图 1。微藻 *Cryptocodinium cohnii* C98 在 25℃ 时生长适宜, 此时培养液细胞干重为 11.8g/L, 二十碳五烯酸产率为 0.724g/L。温度过高或过低, 都不利于微藻生长和二十碳五烯酸的积累。

### 2.2 初始 pH 对微藻产生二十碳五烯酸的影响

培养基 pH 改变影响了细胞内外的离子平衡, 细胞的渗透性及有关膜的结构组成, 从而对微藻的生产和长链多不饱和脂肪酸的合成产生影响。将微藻 *Cryptocodinium cohnii*

C98 接种于不同初始 pH 的培养基上,摇瓶培养,结果如图 2。初始 pH 为 6.0 时,培养液细胞干重和二十碳五烯酸产量分别达 12.1g/L 和 0.715g/L。

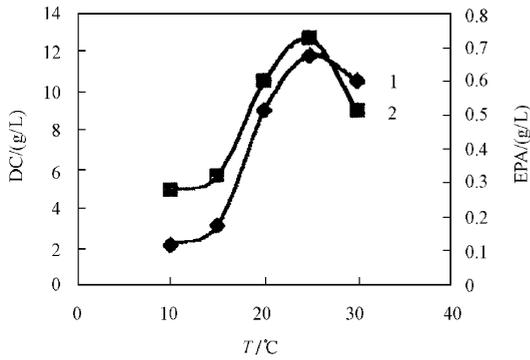


图 1 温度对微藻产生二十碳五烯酸的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the production of EPA by microalgae  
1. DC 2. EPA

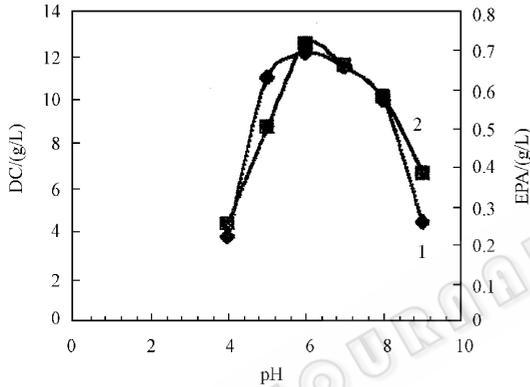


图 2 初始 pH 对微藻产生二十碳五烯酸的影响

Fig. 2 Effect of initial pH on the production of EPA by microalgae  
1. DC; 2. EPA

### 2.3 碳源对微藻产生二十碳五烯酸的影响

在基础培养基中,分别以 3% 的葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、甘油、醋酸钠和可溶性淀粉等成分作为碳源,摇瓶培养,测培养液细胞干重及二十碳五烯酸产量,结果如表 1。葡萄糖是隐甲藻 *Cryptocodinium cohnii* C98 深层培养生产二十碳五烯酸的最有效碳源。

表 1 碳源对微藻产生二十碳五烯酸的影响

Table 1 Effect of carbon source on the production of eicosapentaenoic acid by microalgae

Carbon source	Glucose	Maltose	Sucrose	Glycerim	CH <sub>3</sub> COONa	Soluble starch
DC(g/L)	11.4	8.5	3.2	8.1	7.7	1.3
EPA(g/L)	0.68	0.57	0.14	0.52	0.48	0.06

### 2.4 氮源对微藻产生二十碳五烯酸的影响

在基础培养基中,分别以 0.2% 的蛋白胨、玉米浆、尿

素、硝酸铵、硝酸钾、硫酸铵等成分作为氮源,摇瓶培养,测培养液细胞干重和二十碳五烯酸产量,实验结果如表 2。硝酸钾、蛋白胨是 *Cryptocodinium cohnii* C98 生长和产酸的最佳氮源。

表 2 氮源对微藻产生二十碳五烯酸的影响

Table 2 Effect of nitrogen source on the production of eicosapentaenoic acid by microalgae

Carbon source	Peptone	Corn steep liquer	Urea	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
DC(g/L)	12.5	6.1	4.6	5.2	12.3	4.8
EPA(g/L)	0.65	0.44	0.18	0.39	0.70	0.27

### 2.5 最适培养基组分的确定

利用正交试验法考察了葡萄糖、酵母膏、硝酸钾、磷酸二氢钾、金属离子浓度等对培养的影响,其最佳培养基组成为(g/L):葡萄糖 65,酵母膏 2.0, KNO<sub>3</sub> 3.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.6, NaCl 5.8, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0067, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.014, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.0004, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.0002。以此培养基摇瓶培养,细胞干重,二十碳五烯酸产量分别为 17.8g/L 和 0.84g/L。

### 2.6 摇瓶深层培养过程分析

采用上述最佳组分培养基及发酵条件,进行摇瓶培养,测定培养过程葡萄糖浓度、细胞干重和二十碳五烯酸含量,结果如图 3。

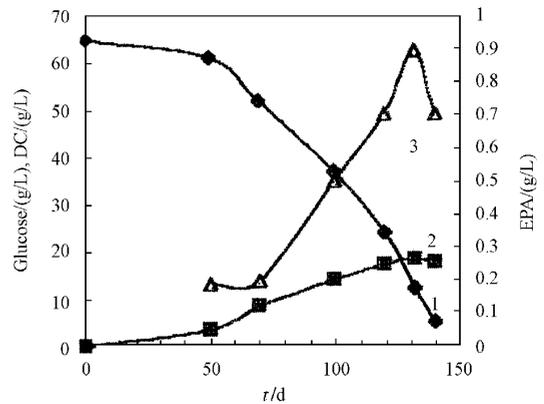


图 3 二十碳五烯酸产生的过程曲线

Fig. 3 Time course of the production of EPA  
1. Glucose; 2. DC; 3. EPA

微藻深层培养过程曲线表明:培养前 48h, *Cryptocodinium cohnii* C98 微藻耗糖较少,微藻生长较慢,产生的二十碳五烯酸也少。48h 后,微藻进入对数生长期,耗糖量急剧增长,菌体内油脂开始大量积累。培养至 132h,细胞干重和二十碳五烯酸含量达最大值,分别为 18.3g/L 和 0.891g/L,接近文献 [9] 报道水平。这样从图 3 中可以看出,微藻细胞内二十碳五烯酸的累积与细胞的生长不同步,其形成曲线呈 S 形,即当细胞生长进入对数后期或稳定期早期时,二十碳五烯酸含量达到最高,而在稳定期后期和衰亡期,二十碳五烯酸的含量逐渐下降。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Pigott G M ,Tucker B W. Seafood effects of technology on nutrition ,New York :Marcel Dekker Inc ,1990 ,pp.262~268
- [ 2 ] Pratima Bajpai ,Pramad K. eicosapentaenoic acid production from microorganisms :a review *J. Biotechnology* ,1993 **30** :161~183
- [ 3 ] Dyerberge J. Observations on populations in greeland and denmark ,in nutritional evaluation of Long-chain fatty acids ,eds. Barlow S. M. and Stanby M. E. ,New York ,Academic Press ,1981
- [ 4 ] Yong manitchai W ,Word O P.  $\omega$ -3 fatty acids :alternative sources of production ,*Process Biochem* ,1989 **24** :117~125
- [ 5 ] Gill I ,Valivety R. ,Polyunsaturated fatty acids ,part I :occurrence ,biological activities and applications ,*Trends in Biotechnology* ,1997 **15** :401~409
- [ 6 ] WANG Z Q (王中奇). Polyunsaturated fatty acids metabolism in body ,*Food Industry*(食品工业) ,1996 **10** :8~15
- [ 7 ] Singh A ,Ward O P. Docosahexaenoic acid production by *Thraus-tochytrium sp.* ATCC20892 ,*Word J. Microbiol Biotechnol* ,1996 **12** :76~81
- [ 8 ] Kyle D. J. Bingham S. ,Radmer R. Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids :prospects for introduction into horticultural food plants. *Hortscience* ,1990 **25** :1524~1525
- [ 9 ] Tan C K ,Johns MR J. Screening of diatoms for heterotrophic eicosapentaenoic acid production and fatty acid production by heterotrophic *chorella saccharophila*. *Appl Phycol* ,1996 **8** :59~64
- [ 10 ] Kuhl A. Zur physiologie der speicherung konder sierter anorganischer phosphate in *chlorrella* ,votr. botan. hrsg. Deut. Botan. Ges Stuttgart :Fischer ,1962
- [ 11 ] Department of Biology ,Beijing University(北京大学生物系). Biochemistry Experiments Guide ,Beijing :Higher Education Publishing ,1988 ,pp.22~24
- [ 12 ] Qian T A Y(前田安彦). Applied Food Analysis Methods ,Changchun :Jilin University Publishing ,1988 :56~58
- [ 13 ] ZHENG Z Q(程志青),TIAN H Q.(天惠勤). Analysis Methods of Eicosapentaenoic Acid ,*Chinese Journal of Analysis* .1989 **8** (6) :49~52

## Studies on Eicosapentaenoic Acid Production by Submersion Culture of *Cryptocodinium cohnii*

YANG Ge XU Cheng-Shui

(Department of Biology ,Qufu Normal University ,Qufu 273165 ,China)

**Abstract** The effects of the incubation temperature ,initial pH of the medium ,carbon source and nitrogen source on the production of *Cryptocodinium cohnii* C98 were studied. Through orthogonal experiments ,the optimum culture medium was obtained (g/L) :Glucose 65 ;Yeast extract 2.0 ;KNO<sub>3</sub> 3.0 ,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 ,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.6 ,NaCl 5.8 ,CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1 ,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0067 ,FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.014 ,CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.0004 ,MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.0002. Under the optimum culture conditions ,the microalgae dry cell weight and eicosapentaenoic acid was 18.3g/L and 0.891 g/L ,respectively. The submersion culture process was analysed.

**Key words** *Cryptocodinium cohnii* submersion culture ,eicosapentaenoic acid

Received :August 8 ,2000

\* Corresponding author :Tel :86-537-4458471 ;E-mail :yangzaimin@163.net

## 重要声明

为适应我国信息化建设需要 ,扩大作者学术交流渠道 ,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入该数据库 ,请在来稿时声明 ,本刊将做适当处理。

《生物工程学报》编辑部