

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 ω -3 系列人体必需多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acids, PUFA)^[1-2]。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^[3-6]。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^[7-9]。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^[10]。

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, KH_2PO_4 2.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, 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, KNO_3 2.0g, KH_2PO_4 2.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, 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^[11]。

1.4.2 藻体油脂的抽提: 采用 Soxhlet 提取法^[12]。

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^[13]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 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*

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 ,Prمود 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. ω -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. Docosaheaxaenoic 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 **6** (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 ;KNO₃ 3.0 ,KH₂PO₄ 1.0 ,MgSO₄·7H₂O 0.6 ,NaCl 5.8 ,CaCl₂·2H₂O 0.1 ,ZnSO₄·7H₂O 0.0067 ,FeCl₃·6H₂O 0.014 ,CuSO₄·5H₂O 0.0004 ,MnSO₄·H₂O 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