

环境条件对隐甲藻生长及 DHA 产量的影响 *

王菊芳¹ 梁世中¹ 陈 峰²

(¹ 华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510640)

(² 香港大学植物学系)

提要 研究了环境条件对隐甲藻 (*Cryptocodinium cohnii* ATCC30556) 生长及 DHA 产量的影响。结果表明, 隐甲藻生长及 DHA 积累的适宜环境条件为: 培养温度采用温度转换设置为 30 °C 培养 32 h 后转为 20 °C 培养, pH 7.0, 黑暗培养, 装液量 50 ml/500 ml, 接种量 5%。

关键词 隐甲藻, 环境条件, DHA, 生物量

微藻能生产多种多不饱和脂肪酸^[1,2], 其中的二十碳五烯酸 (EPA) 和二十二碳六烯酸 (DHA) 在疾病预防及治疗方面已引起了人们广泛的兴趣, 利用微藻工业化生产多不饱和脂肪酸是一个非常有前景的商业领域。经研究发现, 隐甲藻 (*Cryptocodinium cohnii* ATCC30556) 具有较高的生产 DHA 的能力^[3]。本研究探讨了环境条件对隐甲藻 (*C. cohnii* ATCC30556) 生长及 DHA 累积的影响, 以期优化环境培养条件, 降低成本, 为工业化培养隐甲藻生产 DHA 提供依据。

1 材料与方法

1.1 藻种及其培养

隐甲藻 (*Cryptocodinium cohnii* ATCC30556) 由香港大学植物学系陈峰博士筛选。采用 50 g/L 接种量, 在 25 °C、170 r/min 条件下摇瓶培养。

1.2 基础培养基组成

采用 Starr 等 1993 年报道的 Porphyridium 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 细胞干重的测定

100 ml 样液装入预先称重的离心管中, 4 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用蒸馏水洗涤 3 次, 50 °C 真空干燥, 在干燥器内冷却后称重, 直至恒重。

1.4 脂质提取

采用 Chen Feng 1991 年报道的改进的 Bligh 和 Dyer 法提取脂质。

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, DB5 毛细管柱, 0.35 mm×15 m。载气为氦气, 流速 20 ml/min, 初温 170 °C, 保留 2 min, 升温速率 8 °C/min, 终温 235 °C, 保留 8 min, 汽化室温度及检测器温度均为 265 °C。

2 结果与分析

2.1 温度对隐甲藻生长和 DHA 累积的影响

2.1.1 温度对 *Cryptocodinium cohnii* 生长和 DHA 累积的影响 实验选择 15~35 °C 研究 *C. cohnii*

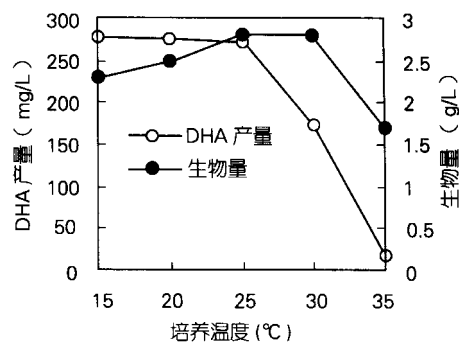


图1 培养温度对 *Cryptocodinium cohnii* ATCC 30556 生长及 DHA 产量的影响

Fig.1 The effects of culture temperature on biomass and DHA yield by *C. cohnii* ATCC30556

* 广东省自然科学基金资助项目 970486 号。

第一作者: 王菊芳, 出生于 1973 年, 博士, 讲师, 主要从事利用海洋微生物生产药物的研究。联系电话: (020) 87113841。E-mail: jufwang@163.net

收稿日期: 2000-11-06; 修回日期: 2001-03-20

ATCC 30556 生长的温度需求。设置 5 个温度:15,20,25,30,35℃,不同温度对该藻生长及 DHA 累积的影响见图 1。

结果表明,25~30℃培养时获得的生物量最高,35℃培养生物量最低。这是由于随着温度的升高,虽然生长速率升高,藻细胞的死亡速率也随之升高,很快进入细胞衰亡期。采用 15,20,25℃3 种不同温度培养,DHA 产量差别不大;而 30℃和 35℃培养 DHA 产量下降幅度较大。

虽然由于较低温度下培养获得的隐甲藻生物量偏低,但低温造成的逆境却有利于 DHA 积累,藻体中 DHA 含量高于较高温度培养的隐甲藻中 DHA 含量,故 DHA 产量仍高于较高温度条件下培养。据此可推知,藻体内 DHA 积累的温度可能低于生长的最适温度。DHA 产量在 15,20,25℃3 种温度培养下相差不大,但由于 25℃培养延滞期短,且达到最大生物量的时间短,生产上该种温度比稍低的温度 15,20℃容易达到,因此选择 25℃为培养温度较为合适。

2.1.2 温度转换对隐甲藻细胞生长和 DHA 累积的影响 对藻体内 DHA 的代谢途径而言,较高的初始培养温度可在较短的时间内将细胞培养至生长旺盛期并达到较高的生物量,然后将培养温度降低,进行 DHA 的累积,这样不仅可以缩短培养周期,又可提高最终 DHA 产量。为了研究温度转换对 *C.cohnii* ATCC 30556 细胞生长和 DHA 累积的影响,作者设计了温度转换试验,3 种温度转换实验组分别为 A:30℃(培养 24 h)→20℃;B:30℃(培养 32 h)→20℃;C:30℃(培养 40 h)→20℃,对照为保持 25℃培养。从培养开始,每 8 h 取样 1 次,测定各实验组对 *C.cohnii* ATCC 30556 细胞生长和 DHA 产量的影响,取样至培养 72 h 结束。图 2 显示了温度转换处理的效果。

结果可见,实验组 B、C 最终获得的最大生物量与 CK 相近,但温度转换实验组 B 可获得最大的 DHA 产量。太早或太晚进行温度转换,难以兼顾藻体生长和 DHA 含量两个方面,最终获得的 DHA 产量都不如实验组 B。因此,在 30℃培养 32 h 后转入 20℃培养既有利于藻体生长,又有利于 DHA 积累,因而是较佳的温度转换处理。

2.2 pH 对 *Cryptocodinium cohnii* 藻细胞生长和 DHA 累积的影响

pH 的变化主要是通过培养基中氢离子浓度的改变影响藻细胞的生理代谢过程。此外,pH 值还与细胞的信号传导以及膜上的离子通道有关,培养基酸碱

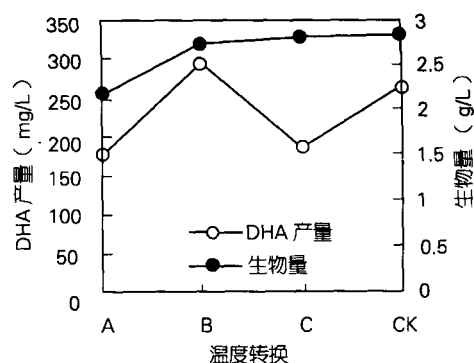


图 2 温度转换对隐甲藻 *C.cohnii* ATCC 30556 生长及 DHA 产量的影响

Fig.2 Effects of temperature shift on biomass and DHA yield by *C.cohnii* ATCC 30556

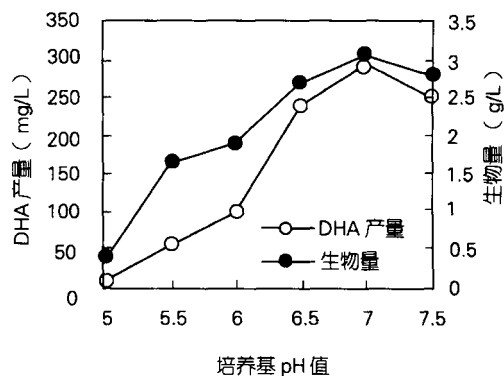


图 3 pH 对隐甲藻 *C.cohnii* ATCC 30556 生长及 DHA 产量的影响

Fig.3 Effects of initial pH on biomass and DHA yield by *C.cohnii* ATCC 30556

度的改变影响了细胞外离子的运输传导过程,直接影响细胞的渗透性和细胞呼吸速率。作者研究了培养液初始 pH 为 7.5,7.0,6.5,6.0,5.5,5.0 6 个梯度下细胞的生长和 DHA 的累积情况。

从图 3 可见,初始 pH 为 7 时,生长最快,生物量最大,DHA 产量也最大;其次是 pH 7.5。然后随 pH 值的下降,DHA 产量下降比较明显,pH 值为 5 时,DHA 产量只有 8.9 mg/L。

2.3 光强对 *Cryptocodinium cohnii* 细胞生长和 DHA 累积的影响

光照和光强对异养藻类体内化学组成的影响现在还知之甚少。一般认为缺乏光照可有利于 $\alpha 6$ 多不饱和脂肪酸的合成,同时降低 $\alpha 3$ 多不饱和脂肪酸的

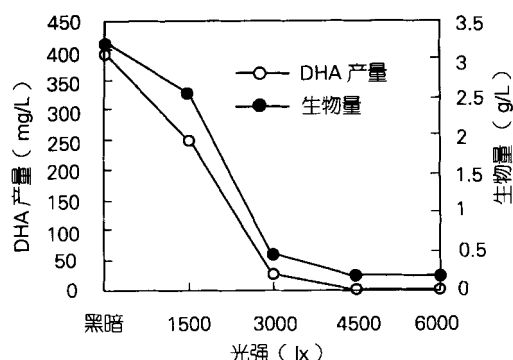


图4 光强对 *C. cohnii* ATCC 30556 生长及 DHA 产量的影响

Fig.4 Effects of light intensity on biomass and DHA yield by *C. cohnii* ATCC 30556

含量。在本实验中,设置5个光照强度,即黑暗培养,1 500, 3 000, 4 500 和 6 000 lx, 研究其对异养藻 *C. cohnii* ATCC 30556 细胞生长和目标产物 DHA 累积的影响,结果如图4所示。黑暗对隐甲藻的生长最有利,获得的生物量最高;黑暗培养同样也有利于 DHA 在体内的积累, DHA 产量也最高。而在 4 500 lx 和 6 000 lx 的强光下,细胞不能生长,细胞从培养初始时的泥土色变至无色,萎缩,鞭毛脱去,死亡。随光强的升高, DHA 产量均下降趋势。

此外,作者还研究了摇瓶装液量及接种量对隐甲藻生长及 DHA 积累的影响,结果表明:隐甲藻生长需要较高浓度的氧,在4种不同装液量组合中,50 ml/ 500 ml 的装液量组合对生长最有利,细胞延滞期最短,生物量最高, DHA 产量也最高,故500 ml 体积的摇瓶中装培养基50 ml 是较好的装液量组合。在培养基中分别接入10,30,50,70,90 g/L 的对数生长期的藻液,结果发现接种量越大,隐甲藻生长周期越短。1%的接种量下藻体基本不生长。3%接种量可视为隐甲藻生长的低限接种密度。5%的接种量是生产 DHA 的适接种量,高于或低于此接种量 DHA 产量都呈现下降趋势。

根据上述试验结果,得到隐甲藻生长及产 DHA 的较为优化的环境条件为:温度转换设置为30℃培养32 h后转入20℃培养,pH 7.0,黑暗条件,装液量50 ml/ 500 ml 三角瓶,接种量5%。采用上述优化条

件摇瓶培养观察隐甲藻生长及 DHA 积累情况,培养48 h后得到的生物量为10.78 g/L, DHA 产量为1.21 g/L, DHA 的产量在国际上仅次于 Martek 公司^[3]。

3 讨论

隐甲藻 *Cyrtocodinium cohnii*, 隶属于隐甲藻门 (Pyrophyta) 甲藻纲,该藻最初由 Javornicky 于1962年在 Seligo 海边采集,是一种海生、无色、非光合的藻,营养方式为吞噬性营养,由于其特征脂肪酸是二十二碳六烯酸 (DHA),含量达到30%~50%甚至更高,且体内其他多不饱和脂肪酸的含量不超过1%,因而该藻迅速成为生产 DHA 的优势藻种,日本和美国都先后发明了专利,目前美国已利用该藻实现了商业化生产。

与从鱼油中提取 DHA 相比,利用微藻培养生产 DHA 有如下优点:(1)可整年进行生产;(2)环境及营养方式极易控制,从而能控制 DHA 合成;(3)脂质组成简单, DHA 含量高,简化了提纯。作者筛选出的隐甲藻 (*C. cohnii* ATCC30556) 具有较高的产 DHA 能力,对其培养条件进行优化可进一步提高 DHA 产率,有利于工业上开发利用。

参考文献

- 王菊芳,梁世中. 产多不饱和脂肪酸的海洋微生物的培养,湛江海洋大学学报,1999,19(3):80~85
- Henderson R. . The production of ω 3 polyunsaturated fatty acids in marine organisms, *J. Lipid Technology*, 1999, 11(1):5~10
- Jiang Y., Chen F., Liang S. Z. . Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cyrtocodinium cohnii*, *Process Biochemistry*, 1999, 34:633~637

辅助参考文献

- Chen Feng, Johns R. M. . Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*, *Journal of Applied Phycology*, 1991, 3:203~209
- Gill I., Valivety R. . Polyunsaturated fatty acids, part I: occurrence, biological activities and applications, *ITTECH*, 1997, 15:401~409
- Starr R. C., Zeikus J. A. . UTEX the culture collection of algae at the university of Texas Austin, *J. Phycol*, 1993, suppl, 29:94

研究报告 *REPORTS*

EFFECTS OF ENVIRONMENTAL CONDITIONS ON GROWTH AND DHA YIELD OF *Cryptocodinium cohnii*

WANG Jufang¹ LIANG Shi-zhong¹ CHEN Feng²

(¹ College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, 510640)

(² Department of Botany, Hong Kong University)

Received: Nov., 6, 2000

Key Words: *Cryptocodinium cohnii*, Environmental condition, DHA, Biomass

Abstract

The effect of environmental conditions on growth and DHA yield was determined in *Cryptocodinium cohnii* ATCC30556. The results showed the optimal conditions were the following: temperature shift was shifting to 20 °C after culturing at 30 °C for 32 h, pH 7.0, 50 ml/500 ml volume of fermentation medium in flask and 5 % inoculum size . .

(本文编辑 :张培新)