

微生物发酵法生产 DHA 的研究

杜冰¹, 刘长海¹, 姚汝华²

(1.仲恺农业技术学院食品系, 广东 广州 510225;

2.华南理工大学食品与生物工程学院, 广东 广州 510640)

摘要: DHA 是一种人体必需多不饱和脂肪酸, 对人体健康有重要意义, 微生物发酵法生产 DHA 具有稳定性好、易于分离纯化和工业化等优点, 是近年来研究的热点。本文通过对破囊壶菌 ATCC34304 等四株菌的发酵液的分析, 发现 ATCC34304 易于培养且 DHA 含量高, 对 ATCC34304 的发酵培养基组分和发酵条件进行进一步研究后得出, 在以淀粉为碳源的培养基中, 28℃ 170r/min 摇床光照培养 6d, DHA 含量达 320.1mg/L。

关键词: 微生物; 二十二碳六烯酸; 破囊壶菌; 发酵

Study of DHA Production by Microorganism Fermentation

DU Bing¹, LIU Chang-hai¹, YAO Ru-hua²

(1.Department of Food Science, Zhongkai Agricultural Technology College, Guangzhou 510225, China; 2.College of Food Engineering and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: DHA is one kind of essential polyunsaturated fatty acids, and it has important effect on body health. The production of DHA by microorganism fermentation has many superiorities such as good stability, being prone to separation, purification and industrialization. It was a research hotspot in recent years. By analyzing the fermentation product of the *Thraustochytrium aureum* ATCC34304 and other four strain, it showed that the ATCC34304 could be cultured more easily and the content of DHA was high. When the composition of medium and the fermentation condition of *Thraustochytrium aureum* ATCC34304 were further studied more, it was found that when the ATCC34304 was cultivated in the medium in which the starch was used as carbon source and at 28℃ with 170r/min for six days, the yield of DHA was highest, 320.1mg/L.

Key words: microorganism; DHA; *Thraustochytrium aureum*; fermentation

中图分类号: Q546

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)03-0128-03

多价不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids PUFA)是指含有两个或两个以上双键, 且碳链长为 16~22 个碳原子的直链脂肪酸, 它主要包括二十碳五烯酸(EPA), 二十二碳六烯酸(DHA)等, 具有降血脂、抗血栓和抗炎等生理作用, 是很好的医药和营养食品成分, 尤其是 DHA, 目前广泛受到医疗界和食品界的关注^[1,2]。目前 DHA 的商业来源是从深海鱼油中进行分离, 但由于这种海洋资源十分有限, 而且鱼油中 DHA 的含量随鱼种类、季节、地理位置等变化而变化, 不能满足社会的需求^[3]。因此, DHA 生产研究逐渐向利用生物技术合成方向发展。利用生物技术合成 DHA 具有周期短, 脂肪酸构成简单及有较大的生产潜力等优点, 而且不受原料的限制, 微生物发酵法生产的 DHA 不具有从鱼油中

提纯的 DHA 的鱼腥味, 更有利于 DHA 的应用, 日本、美国等纷纷对发酵法生产 DHA 进行了研究^[4], 而国内在这一领域的研究则少见报道。本文就 DHA 高产菌株的选育及发酵培养基的选择等作了一系列的研究, 旨在为生物技术合成 DHA 奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

海洋小球藻(*C. minutissima*), 等鞭金藻(*Isochrysis sp.*), 由中国科学院南海海洋所提供, 隐甲藻 ATCC50051(*Cryptocodinium cohnii*), 由香港大学陈峰博士提供, 破囊壶菌 ATCC34304(*Thraustochytrium aureum*), 购自 ATCC(American Type Culture Collection)。

收稿日期: 2004-02-26

基金项目: 国家“九五”科技攻关项目(96-C03-01-04)

作者简介: 杜冰(1973-), 男, 工程师, 研究方向为生物工程和发酵食品。

1.2 培养基

1.2.1 固体斜面培养基 谷氨酸钠 2g/L, 维生素 B₁ 10 μg/L, 维生素 B₁₂ 1 μg/L, 葡萄糖 20g/L, 酵母粉 2g/L, 琼脂 20g/L, 用人造海水配制。

1.2.2 液体培养基 谷氨酸钠 2g/L, 维生素 B₁ 10 μg/L, 维生素 B₁₂ 1 μg/L, 葡萄糖 20g/L, 酵母粉 2g/L, 用人造海水配制。

1.2.3 Porphyridium 培养基^[5]。

1.3 方法

1.3.1 发酵条件

海洋小球藻和等鞭金藻在人造海水中光照下进行自养发酵, 隐甲藻 ATCC50051 在 Porphyridium 培养基中以 5% 的接种量接种, 在 25℃、150r/min 摇床培养 4d。破囊壶菌 ATCC34304 在液体培养基中以 5% 的接种量接种, 在 28℃、170r/min 摇床光照培养 6d。

1.3.2 菌体油脂的提取 Soxhlet 提取法^[6]。

1.3.3 脂酸不饱和度测定 用尤布里 - 瓦列尔碘试剂法^[7]。

1.3.4 DHA 含量的检测 采用气相色谱法测定^[8]。

1.3.5 培养基的选择 分别采用① 2% 葡萄糖 +0.2% 酵母粉; ② 2% 玉米淀粉 +0.2% 酵母粉; ③ 2% 糊精 +0.2% 酵母粉; ④ 2% 麦芽糖 +0.2% 酵母粉; ⑤ 2% 蔗糖 +0.2% 酵母粉, 五种培养基在 28℃ 下 170r/min 振荡培养 6d, 取样检测菌体中的油脂及 DHA 的含量。

1.3.6 发酵条件的确定 用 HCl 和 NaOH 调节培养基的初始 pH, 使之在 4.0~8.0 之间取不同值, 在不同温度下发酵, 接种后每隔 24h 检测菌体中油脂及 DHA 的含量, 从而确定发酵液初始 pH、最适发酵温度和发酵时间。

2 结果与讨论

2.1 不同菌种的发酵结果

采用方法中的培养方法对 4 支不同的菌株进行发酵培养后, 测定菌体内的 DHA 含量, 结果如表 1 所示。

表 1 不同菌体发酵产 DHA 的比较
Table 1 Comparison of DHA production by different initial strains

序号	菌种名称	DHA 含量(mg/L)
1	海洋小球藻	209.58
2	等鞭金藻	259.59
3	隐甲藻 ATCC50051	78.52
4	破囊壶菌 ATCC34304	248.8

从表 1 可以看出, 隐甲藻 ATCC50051 DHA 产量低, 而且对生长温度要求比较严格, 难以培养, 故不适合用作 DHA 的生产菌, 其它三株菌的 DHA 产量均较高,

但海洋小球藻和等鞭金藻均为自养型生物, 生长较慢, 难于调控培养, 也不适于发酵生产, 破囊壶菌 ATCC34304DHA 含量高而且易于培养, 故选破囊壶菌 ATCC34304 为出发菌株进行发酵研究, 以提高其 DHA 的产量。

2.2 发酵培养基的确定

以破囊壶菌 ATCC34304 为出发菌株, 采用方法中的 5 种培养基发酵后, 检测菌体中 DHA 的产量, 结果见表 2, 结果表明培养基④中的菌体 DHA 含量最高, 但在实验中可观察到在培养基②中, 即在以淀粉为碳源的培养基中菌体生长速度最快, 而且经检测可得在其中菌体得率最高, 而且从工业生产的角度出发, 淀粉是最容易获得, 而且是最便宜的原料, 因此可确定淀粉为破囊壶菌 ATCC34304 发酵产 DHA 的最适碳源。

表 2 碳源对 ATCC34304 生产 DHA 的影响
Table 2 Effects of various carbon source on production by ATCC34304

培养基	菌体干重(g/L)	菌体中油脂含量(%,w/w)	DHA 含量(mg/L)
①	3.5	16.1	248.1
②	5.3	15.6	318.9
③	5.0	16.8	327.9
④	4.3	18.5	331.6
⑤	1.6	2.6	77.6

2.3 发酵温度的确定

分别在 20、25、28、30、35℃ 不同温度下进行发酵, 发酵后测菌体中的 DHA 的含量, 结果如表 3 所示。

表 3 温度对 ATCC34304 生产 DHA 的影响
Table 3 Effects of temperature on DHA production by ATCC34304

温度(℃)	20	25	28	30	35
菌体干重(g/L)	3	4.4	5.3	5.4	4.1
DHA 含量(mg/L)	227.4	306.2	319.5	310.7	226.3
DHA 量(mg/g 菌体干重)	75.80	69.59	60.28	57.54	55.20

从表 3 可以看出, 温度愈低, 单位菌体的 DHA 产量愈高, 一方面, 由于低温增加了氧的溶解性, 催化长链不饱和脂肪酸脱饱和的需氧的酶将会获得大量的细胞间的分子氧, 另一方面, 在微生物中与温度相关的多不饱和脂肪酸的合成是一种微生物对环境的适应手段, 微生物通过增加生物膜脂肪酸的不饱和程度提高膜的流动性来抵抗低温环境。故低温有利于 ATCC34304 DHA 的合成, 但在低温下菌体生长缓慢, 菌体在低于 28℃ 时生物量过低, 所以在低温下尽管单位菌体中的 DHA 产量高但不适于生产, 而温度为 30℃, 虽然菌体量较高, 但 DHA 含量却降低, 温度继续升高, 菌体量和 DHA 含量都降低。故发酵温度取 28℃ 最为适宜。

2.4 发酵初始 pH 的确定

选用培养基②为发酵培养基, 调节初始 pH 值为

4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 进行发酵，并于不同时间取样测菌体中的 DHA 的含量，结果如表 4 所示。

表 4 初始 pH 对 ATCC34304 生产 DHA 的影响

Table 4 Effects of initial pH on DHA production by ATCC34304

初始 pH	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
菌体干重(g/L)	1.6	3.6	5.2	5.5	5.1
DHA 含量(mg/L)	86.9	248.3	318.1	297.0	214.2

从表 4 可以看出，随着初始 pH 值的增加，ATCC34304 菌体中的 DHA 的含量增加，到 6.0 时达到最大值，但大于 6.0 后开始下降，ATCC34304 的生物量随初始 pH 值的增加而增加，在大于 6.0 后尽管生物量仍然增加，但 DHA 的含量快速下降，所以 6.0 为最适发酵初始 pH 值。

2.5 发酵时间对菌体产生 DHA 的影响

采用上述优化的工艺条件进行发酵，每天取样，测定菌体干重和 DHA 含量，如表 5 所示。

表 5 ATCC34304 在不同培养时间时的 DHA 含量

Table 5 DHA content in different culture time by ATCC34304

培养时间(d)	1	2	3	4	5	6	7
菌体干重(g/L)	0.2	1.1	2.5	3.8	4.9	5.4	5.0
DHA 含量(mg/L)	0	30.2	70.1	109.3	210.5	320.1	304.5

从表 5 可以看出，ATCC34304 在对数生长期的后期开始大量合成 DHA，并在平衡期达到最大值，在衰亡期，DHA 的含量随菌体量的下降而下降。由此可以确

定 ATCC34304 发酵产 DHA 的时间为 6d。

破囊壶菌 ATCC34304 具有很好的生产 DHA 的潜在能力，利用代谢调控及基因工程等手段进一步提高其 DHA 的产量，有望成为微生物发酵生产 DHA 的生产菌株，开发前景十分广阔。

参考文献：

- [1] Horrobin DF. Clinical uses of essential fatty acids[M]. Eden Press Inc, 1982. 3-36.
- [2] Dyerberg. n-3 polyunsaturated fatty acids[J]. J Nutrition Review, 1986, 44(4): 125-138.
- [3] Shimizu S, Kawashima H. Production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella fungi*[J]. Appl Microbial Biotechnol, 1989, 32: 1-4.
- [4] Bajpai P, Pramod K B, Owen P W. Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium aureum*[J]. Appl Microbial Biotechnology, 1991, 35: 706-710.
- [5] 姜悦. 利用隐甲藻 *Cryptocodinium cohnii* 生产 DHA 的研究[C]. 华南理工大学博士学位论文, 1998. 33-38.
- [6] 前田安彦. 实用食品分析方法[M]. 长春: 吉林大学出版社, 1988. 56-58.
- [7] 朱伦编. 生化实验[M]. 上海: 上海科学出版社, 1981. 21-252.
- [8] 蔡心尧, 尹建军. 海藻中多不饱和脂肪酸的测定方法[M]. 无锡轻工大学学报, 1999, 5(18): 60-64.

信息

世界食用油供应过剩

据贸易商称，世界食用油供应过剩，再加上近段时间以来精炼食用油进口大幅提高，结果使得印度国内许多压榨厂和精炼厂闲置。行业人士表示，世界油籽丰产，促使印度提高了精炼食用油进口，这又导致许多新压榨厂和精炼厂闲置。在过去 18 个月里，精炼厂的产能增长 30%，从原来的 900 万吨提高到了 1200 万吨。2003 年印度油籽大获丰收，促使一些压榨厂更新了陈旧的设备，许多公司还增加了新的生产线。印度炼油协会会长 B V 梅赫塔称，新厂大多集中在喀德拉地区。去年一些投产运营的油厂产能在 1000 吨左右。梅赫塔称，由于食用油进口数量大幅提高，目前全国压榨厂和精炼厂的产能利用率估计只有 55%。印度中央油行业贸易组织主席桑迪普·巴约利亚称，由于全球食用油供应过剩，导致国内原材料和压榨产能的关系失衡。古吉拉特邦沿海、马哈拉施特拉邦和旁遮普邦的压榨产能增加，再加上食用油进口量大幅提高，结果导致市场出现失衡。目前产能过大，而原材料非常少。

美国的食品添加剂尤其是防腐剂的繁荣，主要是由于越来越多的美国消费者喜欢有香味的食品。据估计，1999 年通过生产食品添加剂可以获利 30 亿美元。预计到 2006 年将会增加到 50 亿美元。有关专家指出，由于消费者越来越关注化学合成物质的安全性，因此，人们对添加纯天然添加剂和防腐剂食品的需求量呈上升趋势。此外，越来越多的人转向需要无热量的甜味剂，从而使阿斯巴甜和糖精的使用量增加，促进了这些产品的销售量。

美国食品添加剂市场要求高涨