

海水中 DHA 产生菌的筛选及一株高产菌的鉴定*

赵玉巧** 杜云建 王丽燕

(淮海工学院海洋学院 连云港 222005)

摘要 从海水中筛选产 DHA 的微生物,共采集海水样品 280 余份,用苏丹黑染色法得到 160 株产油脂菌株,在对 60 株脂肪粒较大的微生物用索氏抽提法提取油脂后,初筛得到油脂含量高于 8% 的菌株 7 株。对 10 株油脂产量较高的菌株进行复筛,编号 7-3 的菌株油脂含量达到 15.9%,DHA 在油脂中的含量达到 45.2%,选用 7-3 作为目的菌株。对 7-3 进行形态特征、培养特征及生理生化特征鉴定,初步判定菌株 7-3 为酒香酵母属(*Brettanomyces* sp.)。

关键词 酒香酵母, DHA, 分离筛选, 鉴定

中图分类号:Q93-3 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0749-04

Screening of the Microbe Producing Docosahexaenoic Acid from Seawater and Identification on a Strain of High Yield*

ZHAO Yu-Qiao** DU Yun-Jian WANG Li-Yan

(School of Marine Science and Technology Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005)

Abstract Microbes that produce Docosahexaenoic Acid were isolated from seawater. 160 strains capable of producing lipids were screened out using Sudan Black B dyeing method from 280 seawater samples. From 60 strains of microorganisms producing bigger lipid particles, 7 strains of them capable of producing lipids more than 8% were obtained with Soxhlet abstracting method in the first screening. In the secondary screening from 10 strains with high lipids yield, strain 7-3 capable of producing 15.9% lipids was obtained, in which the content of DHA(Docosahexaenoic Acid) is 45.2%. Strain 7-3 was identified as *Brettanomyces* based on its morphological properties, cultural characteristics, physiological and biochemical properties.

Key words *Torulopsis*, Docosahexaenoic Acid, Screening, Identification

DHA(Docosahexaenoic Acid 二十二碳六烯酸)是人体必需 ω -3 型长链多烯不饱和油脂酸。人们摄食含有 DHA 的食物后,首先是在十二指肠中经由胰脂解酶将其水解产生单甘油酯及游离油脂酸,再与胆汁形成乳糜胶粒,而这些胶粒将进入小肠表皮细胞形成甘油酯后进入淋巴系统。摄食较多的 DHA 可提高血液中 DHA 的浓度,同时脑部 DHA 的浓度也可提高,这样可提高脑部神经细胞的功能性^[1]。由于 ω -3 型高度不饱和油脂酸经一系列代谢路径,其最终产物如前列腺素 PG13 及 FXA3,具有抗血小板凝集及血管扩张作用,因此,DHA 具有改善心脑血管及高血脂疾病等作用。DHA 还有保护视力、增强智力、健脑、抗癌、降低胆固醇,对血小板活化因子(PAF)的抑制等作用^[2],广泛应用在保健食品,强化

食品、化妆品、饲料、医药等中^[3]。

目前商业上不饱和油脂酸主要来源于海洋鱼类,大多数来自海洋鱼油。而研究表明,某些低等海洋真菌具有合成多不饱和脂肪酸的能力,且微生物培养具有发酵周期短,不受条件限制等优点,故成为近年来人们研究的热点^[4]。隐甲藻是一种海洋微藻,它富含 DHA,其含量高达总脂肪酸的 50%^[5]。2002 年吴克刚等用破囊壶菌发酵生产 DHA,其产量达到 1242mg/L^[6]。1997 年日本学者 Yaguchi 等对其从 Yap 珊瑚礁区域分离的一株 *Schizochytrium* sp. SR21 进行培养,5d 发酵生物量和 DHA 产量分别达到 59.2g/L 和 15.5g/L^[7]。

本文报道从海水中分离筛选到产 DHA 的酵母,通过对该酵母进行形态鉴定和生理生化鉴定,确定

* 江苏省教育厅项目(No.04KJD240024)

** 通讯作者 Tel 0518-5857648, E-mail zhaoyq20@sina.com.cn

收稿日期:2006-10-18,修回日期:2007-02-02

其属于酒香酵母属(*Brettanomyces* sp.)。用微藻生产DHA的研究已比较普遍,但用海洋中酒香酵母生产DHA尚无报道。

1 材料与方法

1.1 试剂

DHA、DHA 甲酯、DHA 乙酯标样购自 Sigma;十八烷酸乙酯购于东京化成工业株式会社。

1.2 海水样与培养基

1.2.1 水样 菌种筛选过程中所用的海水水样主要来自连云港、赣榆、日照、青岛等地。

1.2.2 斜面培养基 马铃薯 200g,蔗糖 20g,酵母浸膏 1g,蛋白胨 0.3g,谷氨酸钠 0.5g, K_2HPO_4 0.6g, $ZnSO_4$ 0.01g,乙二胺四乙酸二钠 0.1g,琼脂 15g~20g,用海水定容至 1L,pH 自然。

1.2.3 筛选培养基 葡萄糖 5g,酵母浸膏 1g,蛋白胨 3g, $ZnSO_4$ 0.01g, $NaHCO_3$ 1g,乙二胺四乙酸二钠 0.1g,谷氨酸钠 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.08g,柠檬酸铁 0.01g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1g, K_2HPO_4 0.6g,用海水定容至 1L,pH 7.6~7.8。

1.2.4 种子与发酵培养基 葡萄糖 10g,酵母浸膏 2g,蛋白胨 5g, $(NH_4)_2SO_4$ 2g, $NaHCO_3$ 1g,柠檬酸铁 0.01g, K_2HPO_4 0.06g,油脂 0.5g, $ZnSO_4$ 0.01g,乙二胺四乙酸二钠 0.1g, $MgSO_4$ 0.01g, $CaCl_2$ 0.05g,用海水定容至 1L,pH 7.6~7.8。

1.3 菌株分离筛选

1.3.1 水样采集及处理 把采集来的新鲜海水离心(4000r/min,10min),倒出上层清液得到沉淀物。

1.3.2 菌株分离培养 把离心后的海水沉淀物用灭菌的牙签挑取少许接种到液体培养基中培养(温度 25℃,摇床转速 140r/min,在光照条件下培养 2d)得到一定浓度的菌悬液。挑取菌悬液在平板培养基上划线分离纯化,获得纯菌落。

1.3.3 苏丹黑染色法^[8]筛选 经苏丹黑染色法染色后,菌体内的脂肪粒呈现黑色,而菌体为红色,根据脂肪粒的大小可初步判断油脂含量的多少。

1.4 分析方法

1.4.1 油脂的测定 在 500mL 三角瓶中装入 150mL 种子培养基,接入 2~3 环活化后的斜面菌种,在 27℃~28℃,140r/min 的条件下,摇瓶培养 1d 左右,作为种子。在 500mL 三角瓶中装入 200mL 发酵培

养基,按 10% 的接种量接入液体种子,然后在 25℃~26℃,160r/min 的条件下,摇瓶培养 2d~4d(不同的菌株培养时间不同)后收集湿菌体,烘干称重,用索氏抽提法提取并测定干菌体中油脂含量。

1.4.2 DHA 的测定 (1)油脂的萃取 按 1.4.1 中方法培养一定量菌体,离心收集湿菌体并干燥。准确称取干菌体于 3 口烧瓶中,加入足量的氯仿、甲醇和水的混合液(1:2:0.8,V/V/V),在 N_2 保护下室温萃取 8h。萃取结束后,加入氯仿、甲醇和水的混合液(1:1:0.9,V/V/V)萃取,静置分层。取下层有机相于预先烘干且称重过的 100 mL 的干烧杯中。用氮气吹去有机相,称重后称重,即可算出油脂的含量。(2)脂肪酸的甲酯化 称取适量油脂加入 1mol/L 的 KOH/甲醇液,于 60℃ 水浴中回流 0.5h~1h,使之完全皂化。分别加入 10mL 和 20mL 石油醚萃取两次,弃去醚层,以除去不皂化物。水层用 3N 的 HCl 酸化至 pH 为 1。用 20mL 石油醚萃取两次,萃取液用无水 Na_2SO_4 干燥,用 N_2 吹去残余的有机溶剂,得混合油脂酸。取一定量的游离油脂酸置于 50mL 的烧瓶中,加入 0.5mol/L 的 KOH/甲醇液于 65℃ 水浴回流皂化 10min,至没有油滴为止,冷却后加入 BF_3 甲醇液继续回流 10min。冷却后加正庚烷振荡,然后加入足量的饱和食盐水,静置分层后取上层正庚烷相,并加入无水硫酸钠脱水,样品冷冻待分析。(3)气相分析条件:日本岛津公司的 GC-17A 气相色谱仪(检测器:FID), sp^{TM} -2380(30mm×0.25mm×0.2 μ m)毛细管色谱柱。载气为 N_2 ,检测器温度 280℃,进样口温度 260℃,柱温 180℃,柱压 70kPa,不分流,进样量 0.6 μ L。

1.5 菌种鉴定

1.5.1 细胞形态鉴定 鉴定方法见参考文献[9][10][11][12]。

1.5.2 生理生化特征鉴定 鉴定方法见参考文献[9][10][11][12]。

2 结果与讨论

2.1 DHA 产生菌的初筛

实验共采集海水样 280 余份,用苏丹黑染色法得到 160 株产油脂菌株。其中细菌占 56.5%,酵母占 13%,藻类占 30.5%。在对 60 株脂肪粒较大的微生物经培养后用索氏抽提法提取油脂,得到油脂

含量高于 8% 的菌株有 7 株 , 高于 10% 的有 4 株 , 最高的一株编号为 7-3 的菌株油脂含量为 17.3% , 大多数菌株的油脂含量在 4% 以下 , 缺乏实际应用价值。

另外 , 在对初筛菌株的种类随气温的变化归纳后发现 , 同一水域随着气温的缓慢回升 , 产脂微生物的种类分布呈现明显的规律 : 初春时节细菌占绝对优势 , 藻类的数量最少 , 随着气温的升高 , 产脂藻类的数量逐渐增多。海水中产脂酵母的数量受季节的影响不大 , 始终维持在一个较低的数量。从初筛实验结果可以看到 , 海水中产油脂微生物种类多、数量大 , 其中具有应用价值的微生物也占有一定的比例。

2.2 DHA 产生菌的复筛

从初筛的菌株中选择 10 株油脂产量较高同时又易于培养的菌株进行复筛 , 用有机溶剂萃取法测定干菌体中油脂含量 , 气相色谱法分析油脂中 DHA 含量。从表 1 的结果可见 , 大多数菌株的油脂含量仍低于 10.0% , 只有 3 株菌的油脂含量高于 10.0% , 其中编号 7-3 的菌株油脂含量仍为最高 , 达到 15.9% , 其次编号为 3-3 的菌株油脂含量为 14.8%。所测菌株的油脂含量与索氏抽提法测得油脂含量基本一致 , 说明初筛采用的索氏抽提法测定的油脂含量结果较为可靠。另外 , 10 株复筛菌株中有 6 株含 DHA , 含 DHA 较高的菌株分别是 7-3、1-7 和 7-75。7-3 的油脂及 DHA 含量均为最高 , 其 DHA 在油脂中的含量高达 45.2% , 综上所述选用 7-3 作为目的菌株。

表 1 复筛菌株产油脂与 DHA 的水平		
菌号	油脂含量(%) (W/W)	油脂中 DHA 含量(%) (W/W)
7-3	15.9	45.2
2-18	9.2	/
3-3	14.8	/
4-47	7.5	1.2
7-75	8.2	12.0
1-7	10.1	24.4
2-32	6.4	2.5
4-40	9.6	/
4-45	6.6	4.6
7-26	8.5	/

2.3 形态特征鉴定

2.3.1 细胞形态 : 细胞呈短杆状 ; 大小为 $4.0\mu\text{m} \times 2.0\mu\text{m}$, 繁殖方式为多边芽殖。

2.3.2 培养特征 : 用葡萄糖 - 蛋白胨 - 酵母粉培养基与麦芽汁培养基进行液体培养 , 培养结果相同 , 均为培养液清 , 可发酵 , 表面有环、底部有沉淀。用上述固体培养基培养 , 培养结果相同 , 菌落为潮湿、透明、颜色淡黄、边缘整齐、表面隆起、易挑起、无假菌丝。用麦氏(McClary)培养基与克氏(Kleyrn)培养基进行子囊孢子的观察实验 , 实验结果均无子囊孢子 , 也无掷孢子形成。

2.4 生理生化鉴定

2.4.1 糖发酵试验结果 : 见表 2。

表 2 糖发酵试验结果			
糖种类	培养时间(h)		
	24	48	72
L-山梨糖	+	++	++
D-半乳糖	++	++	++
L-鼠李糖	+	+	+
D-果糖	+	+	++
葡萄糖	++	++	++
麦芽糖	+	+	++
蔗糖	+	++	++
乳糖	-	-	-
蜜二糖	-	-	-
棉子糖	-	-	-
可溶性淀粉	-	-	-

注 : ++ 阳性明显 , + 阳性但不明显 , - 阴性 , 以下同

2.4.2 糖同化实验结果 : 见表 3。

表 3 糖同化实验结果			
糖种类	结果	糖种类	结果
D-甘露醇	-	葡萄糖	++
L-山梨糖	+	肌醇	-
D-半乳糖	+	蔗糖	+
L-鼠李糖	+	麦芽糖	+
L-阿拉伯糖	-	乳糖	+
D-果糖	++	棉子糖	-

2.4.3 氮同化实验结果 : 见表 4。

2.4.4 其它鉴定结果 : 脲酶测定实验结果为 : 不产生脲酶 , 明胶液化试验结果 : 不能液化明胶 , 37 ℃ 不生长 , 能产酯 , 无维生素不生长 , 自葡萄糖好氧发酵

表 4 氮同化实验结果

氮种类	结果	氮种类	结果
硫酸铵	+	蛋白胨	++
硝酸钾	-	尿素	-
亚硝酸钾	-	肌酸	-

产酸。

根据 7-3 的形态特征、培养特征及生理生化特征,并参考《酵母的特征与鉴定手册》中的有关描述^[11],该菌株与酒香酵母属(*Brettanomyces*)的分类特征最相符,所以判定菌株 7-3 菌为酒香酵母属。

参考文献

- [1] 铃木平光. 中国海洋药物, 1993, 4: 50~52.
 [2] 曾晓雄, 罗泽民. 天然产物研究与开发, 1997, 9(1): 65~70.
 [3] 任颖, 刘静兰, 王秋玉. The Practical Journal of Integrating

Chinese with Modern Medicine, 1997, 10(18): 1730~1731.

- [4] 卞曙光, 张晓昱, 张磊, 等. 微生物学通报, 2001, 28(1): 73~76.
 [5] 王永华, 梁世中, 杨博, 等. 中国油脂, 2002, 27(2): 26~28.
 [6] 吴克刚, 柴向华, 杨连生. 食品与发酵工业, 2003, 29(2): 42~48.
 [7] 吴克刚, 杨连生. 科学视野, 2000, 24(7): 19~21.
 [8] 董欣荣, 曹健, 赵斌, 等. 郑州工程学院学报, 2002, 23(1): 14~18.
 [9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. pp. 364~387.
 [10] 冯克宽, 王明谊, 曾家豫. 西北师范大学学报, 1997, 33(2): 56~59.
 [11] J A 巴尼特. 酵母的特征与鉴定手册. 胡瑞卿译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991. 144~171.
 [12] 中科院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组. 常见与常用真菌. 北京: 科学出版社, 1978. pp. 146~180.