

产DHA南极细菌的筛选及其培养条件

张波涛¹, 缪锦来², 古颖春³, 麻金海¹, 郑 洲^{1,2}, 王国栋², 李光友²

(1. 中国海洋大学 生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003; 2. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061; 3. 青岛市胸科医院, 山东 青岛 266101)

摘要: 南极地区独特的地理环境和气候特点造就了南极微生物特殊的生物学特征, 产DHA或EPA是其对南极极端环境的适应性功能。本实验从第十九次南极科学考察过程中所采集的海冰和海泥中分离得到约200株菌株, 以鱼油为对照, 通过气相色谱(GC)方法初筛, 得到7株含有DHA或EPA的细菌, 其中一株(N-6)的DHA含量最高。以气相色谱-质谱(GC-MS)对其DHA成分进行鉴定。N-6的脂肪酸分析表明, 其总脂肪酸含量占菌体干重的22.54%, DHA占总脂肪酸的8.72%。就3种主要的环境因子(温度、pH值、盐度)对于该菌生长情况及DHA含量的影响进行探讨, 结果发现, 该菌属于嗜冷菌, 其DHA含量随温度、盐度升高而降低, 随pH的增加而升高。从南极微生物中筛选产DHA或EPA细菌, 可为南极微生物资源的应用开发开拓新途径。[中国水产科学, 2006, 13(1): 79-84]

关键词: 南极; 细菌; 气质联用; 不饱和脂肪酸

中图分类号: Q938; Q503; Q547 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)01-0079-06

南极地区由于其独特的地理环境和气候特点, 如寒冷、低光照、强辐射等, 造就了南极微生物特殊的生物学特征^[1]。为适应低温环境, 南极细菌会积累多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acids, PUFAs)来保持其细胞膜的流动性; 也就是说, 南极的低温环境对那些通过生成PUFAs以保持细胞膜脂质流动性的菌株进行了自然选择^[2]。PUFAs通常指十八碳以上, 含有两个或两个以上不饱和双键的脂肪酸, 其中比较有代表意义的是EPA(二十碳五烯酸)和DHA(二十二碳六烯酸)。EPA和DHA都属于 ω -3系列不饱和脂肪酸, 具有许多对人体有益的作用, 对于动脉粥样硬化、心血管疾病、癌症和糖尿病等都具有有效的预防或治疗作用^[3-8]。目前, 其主要的商业来源为深海鱼油。由于渔业资源的日益枯竭, 加之鱼油产品难以去除的腥味等, 使得人们把目光转向新的DHA、EPA资源。迄今为止, A-CAM(澳大利亚南极微生物菌种库)专门收集从南极地区分离纯化得到许多菌株, 其中有很多具有产生PUFAs特性的菌株^[9]; 而中国对南极地区微生物的研究则主要集中在低温脂肪酶、低温蛋白酶等方面, 对其他活性物质的研究较少, 尤其是南极细菌产PUFAs的研究开发在国内尚未见报道。

本研究从南极海冰及海泥中分离纯化出约200株细菌, 利用气相色谱(GC)分析方法进行初筛, 得到7株含有DHA或EPA的菌株, 对其中一株DHA含量较高的菌株N-6进行气相色谱-质谱联用(GC-MS)分析, 进一步确认其DHA成分。此外, 还测定了该菌株干燥菌体的总脂含量, 并探讨了几种主要的环境因子对该菌的生长及其DHA含量的影响, 旨在为该菌的进一步研究开发提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 GC-14C气相色谱仪, 日本岛津公司; 色谱柱: HP-WAX, 30 m $\times$ 0.25 mm ID $\times$ 0.25 μ m, 配FID检测器; 6890N气相色谱-质谱联用仪(6890N GC-5973N MS), 美国Agilent公司; 色谱柱: HP-5 MS, 30 m $\times$ 0.25 mm ID $\times$ 0.25 μ m, 配FID检测器, NIST谱库; 恒温摇床(HZ-9301), 江苏太仓科教仪器公司; 冷冻干燥机(GJ-10), 北京四环实验仪器公司。

1.1.2 试剂 鱼油, 由山东海洋神公司提供; 蛋白胨、酵母提取物均为Merck(Germany)公司出品; 氯仿、甲醇、盐酸等及其他常规试剂均为分析纯。

收稿日期: 2005-02-02; 修订日期: 2005-06-16.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40206022; 40406003).

作者简介: 张波涛(1973-), 男, 博士研究生, 主要从事极端环境微生物活性物质的研究. E-mail: qdzbta@163.com

1.2 菌种与培养条件

1.2.1 南极细菌菌种 从2002~2003年南极第十九次科学考察所采南极海冰和海泥中分离纯化出约200株菌,现存放于国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室。

1.2.2 培养基

(1)普通培养基:分离纯化、斜面保种和摇瓶发酵所用培养基,均为2216E固体或液体培养基^[10]。

(2)pH梯度培养基:培养基内pH值分别为5.0、6.0、7.0、7.5和8.0,其他成分与普通培养基相同。

(3)盐离子浓度梯度培养基:培养基内盐离子浓度分别为普通培养基的1/2倍、3/4倍、1倍、3/2倍和2倍(将海水适当用蒸馏水稀释或减压浓缩后即得不同盐离子浓度;该盐离子不仅仅是指海水内的 Na^+ 、 Cl^-),其他成分与普通培养基相同。

1.2.3 普通培养条件 采用2216E培养基,250 mL三角瓶,将20 mL对数生长期的南极细菌接种于150 mL的培养基中,然后将其转移至恒温摇床中发酵培养,转速为120 r/min,培养温度为6.5℃,培养至对数生长期末期,以9 000 r/min转速离心10 min,用蒸馏水洗涤3~4次,于-50℃冷冻干燥24 h,得干燥菌体,放入洁净自封口袋中于-20℃冷冻存放。

1.2.4 培养条件对N-6号菌株生长和DHA含量的影响

(1)不同温度培养条件:N-6菌株活化后接种于普通2216E液体培养基,分别于0℃、5℃、10℃、15℃、20℃培养,其余步骤与1.2.3同。

(2)不同pH值培养条件:N-6菌株活化后分别接种于1.2.2所述的pH值分别为5.0、6.0、7.0、7.5和8.0的梯度培养基中培养,其余步骤与1.2.3同。

(3)不同盐离子浓度培养条件:N-6号菌株活化后分别接种于1.2.2所述的1/2倍、3/4倍、1倍、3/2倍和2倍海水盐离子浓度梯度的培养基中培养,其余步骤与1.2.3同。

1.3 实验方法

1.3.1 脂肪酸提取 采用改良的一步反应法抽提脂肪酸^[11-12],以氯仿-甲醇-盐酸混合液为提取液,其体积比为1:10:1,将40 mg干燥菌体放入螺口试管中,加入5 mL提取液,充氮,密封后于75℃水浴中反应1 h,冷却,加入等体积的水终止反应,用1 mL正己烷萃取脂肪酸,蒸馏水洗涤3次,每次

3 mL。以上过程中包括了抽提以及甲酯化,因此正己烷萃取后的样品可以直接进行GC、GC-MS分析。

1.3.2 气相色谱、气相色谱-质谱联用分析 取200 μL 正己烷提取液稀释到1 mL正己烷中,进行GC和GC-MS分析,在完全相同分析条件下,以鱼油作为对照,与鱼油中的EPA甲酯和DHA甲酯的出峰时间相同的,则初步认定为EPA或DHA成分,以此对南极菌株进行初筛。

(1)气相色谱条件:进样器温度250℃,柱温220℃,检测温度260℃,载气为高纯氮,流速3 mL/min,分流比5.5,进样量为1 μL 。

(2)气相色谱-质谱条件:气化室温度250℃;色谱柱升温程序为初温50℃,以25℃/min升至250℃并保持7 min。载气为高纯氮(99.99%),流速1 mL/min。进样方式为分流进样,分流比100:1。进样量1 μL 。

(3)质谱条件:电离方式EI,电离能量70 eV,连接杆温度280℃,离子源温度200℃,溶剂延迟时间5 min,使用选择离子法(SIM),选择的离子为 m/z 60和 m/z 150。

1.3.3 总脂含量测定^[13] 作3个平行样,各称取干燥菌体1 g,并作空白对照,放入索氏提取器的抽提管内,各加入乙醚约200 mL,通冷凝水,45℃左右水浴12 h,用滤纸条将抽提管内氯仿滴在滤纸上,待乙醚挥发后观察滤纸上无油迹存在,说明提取完全。

2 结果

2.1 产PUFAs南极菌株的初筛

通过对200株南极细菌脂肪酸的气相色谱分析,筛选出7株EPA或DHA含量较高的细菌。从表1中可以看出菌株17-1既含EPA又含DHA,但其含量不高;而菌株N-6的DHA含量达到了8.72%(相对含量,下同),明显高于其他菌株。图1中,保留时间为12.615 min的峰与鱼油中DHA甲酯(图2)的峰保留时间(12.982 min)基本一致。因此,初步断定菌株N-6含有DHA,其含量占该菌总脂肪酸的8.72%。

由于EPA和DHA都属于长链多不饱和脂肪酸,极易氧化,氧化后的EPA和DHA成分复杂影响分析结果,因此EPA和DHA甲酯化反应在密闭条件下进行,并且充 N_2 ,防止不饱和脂肪酸被氧化^[14]。

表1 7株南极细菌的EPA和DHA相对含量

Tab.1 Relative contents of DHA and EPA in 7 strains of Antarctic bacteria

%

脂肪酸 Lipid acid	菌株 Strain					
	N-4	N-6	12-3	262	18	82
DHA	—	8.72	—	1.55	—	—
EPA	0.24	—	1.68	—	0.25	0.68

注:“—”表示EPA或DHA含量极低,或不含EPA和DHA。

Note: “—” means the content of EPA or DHA is extremely low (or without EPA and DHA).

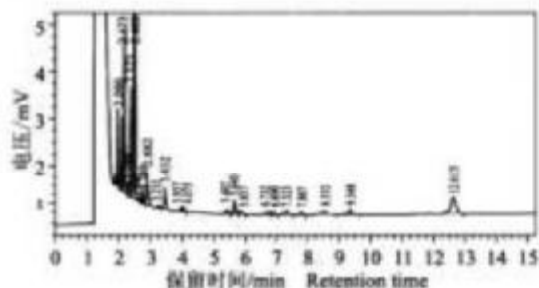


图1 N-6菌株部分脂肪酸甲酯气相色谱图

Fig.1 GC chart of fatty acid methyl ester of No. N-6 bacterium

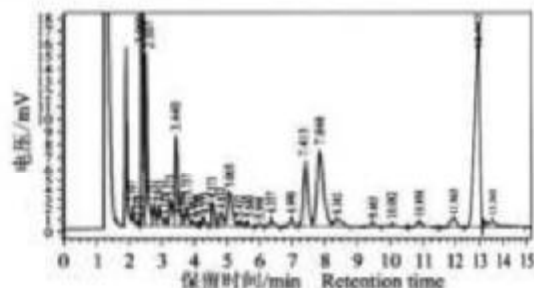


图2 鱼油部分脂肪酸甲酯气相色谱图

Fig.2 GC chart of fish oil fatty acids methyl ester

2.2 菌株N-6 DHA的GC-MS分析

通过GC-MS分析,比较图1中12.615 min峰的质谱图(图3)与图2中12.982 min峰的质谱图(图4),可以看出两者基本一致;再与NIST谱库(Agilent GC-MS标准化化合物图谱资料库)中的DHA甲酯标准

谱图(图5)对比,图1中N-6的12.615 min峰的质谱图与NIST中DHA甲酯质谱图主要的碎片离子峰完全一致。可以确定,图1中12.615 min峰为DHA甲酯峰。

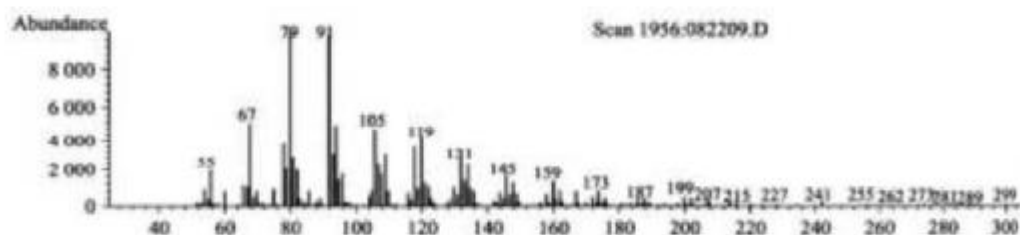


图3 N-6菌株中DHA甲酯的GC-MS谱图

Fig.3 GC-MS chart of DHA methyl ester in No. N-6 bacterium

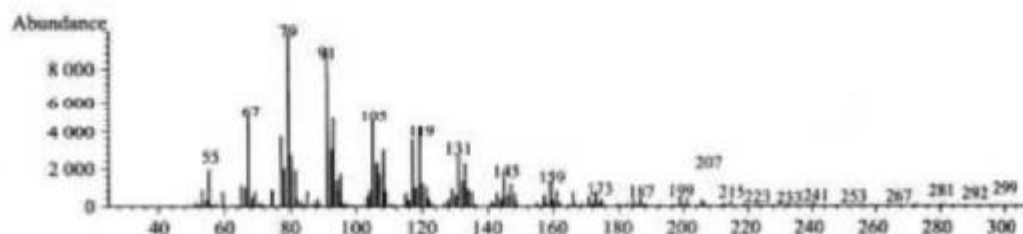


图4 鱼油中DHA甲酯GC-MS谱图

Fig.4 GC-MS chart of DHA methyl ester in fish oil

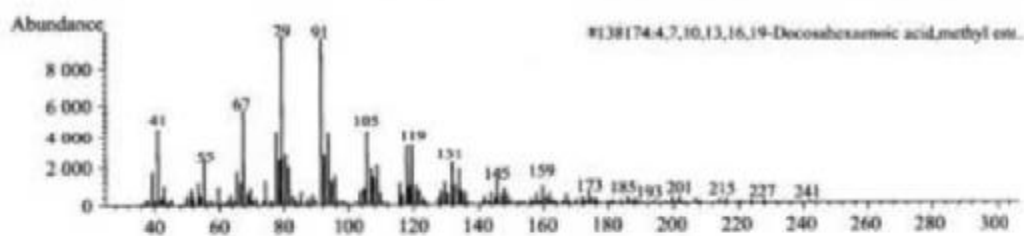


图5 NIST 谱库中的 DHA 甲酯标准图谱

Fig.5 GC-MS chart of DHA methyl ester in NIST

2.3 菌株 N-6 的总脂含量

采用索氏抽提法测得,菌株 N-6 总脂含量占菌体干重的 22.54%,而 DHA 占总脂肪酸的 8.72%,所以 N-6 干菌体的 DHA 含量为 19.6 mg/g。

2.4 培养条件对菌株 N-6 生长和 DHA 含量的影响

不同培养条件下生长的菌株用分光光度计法测 560 nm 的光吸收值(OD_{560});以取样时间为横坐标, OD_{560} 为纵坐标绘制生长曲线,并测定相应的 DHA 含量,具体结果见图 6~8。

3 讨论

在一定程度上,南极嗜冷细菌是通过在其质膜含有大量的不饱和脂肪酸来适应其严酷的低温环境的。对南极细菌细胞质膜组成成分的研究表明,它们含有大量的不饱和脂肪酸,这些不饱和脂肪酸使细胞质膜在低温下也能保持半流动状态;某些嗜冷细菌的膜脂组成中还含有多不饱和脂肪酸和含多个双键的碳氢化合物^[15]。

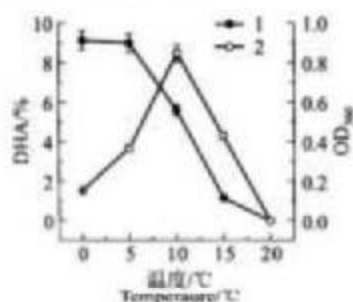


图6 培养温度对 N-6 菌株生长及 DHA 含量的影响结果

1: DHA 含量; 2: OD_{560}

Fig.6 Effect of temperature on growth and DHA content of N-6

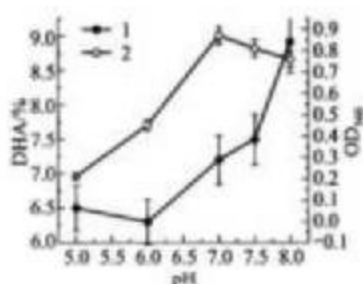
1: DHA content; 2: OD_{560} 

图7 pH 值对 N-6 号菌株生长及 DHA 含量的影响结果

1: DHA 含量; 2: OD_{560}

Fig.7 Effect of pH on growth and DHA content of N-6

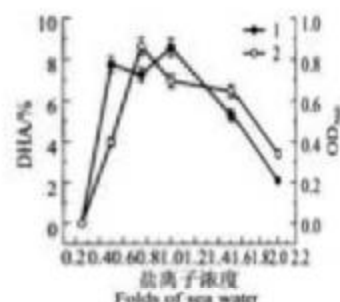
1: DHA content; 2: OD_{560} 

图8 盐离子浓度对 N-6 菌株生长及 DHA 含量的影响结果

1: DHA 含量; 2: OD_{560}

Fig.8 Effect of salinity on growth and DHA content of N-6

1: DHA content; 2: OD_{560}

从培养温度对 N-6 号菌株生长及 DHA 含量的影响可以看出, N-6 号菌株在 0~5℃ 生长缓慢, 最适生长温度为 10℃, 在 20℃ 下不能生长, 为嗜冷菌。通常认为, 绝大多数极地微生物细胞内脂类物质中多不饱和脂肪酸的含量随温度降低而增加, 本实验也证明了这一点。这可能是微生物通过增加细胞生物膜脂肪酸的不饱和程度来提高膜的流动性,

以适应低温环境, 从而保证细胞正常的生理活动, 这是南极微生物长期适应极端寒冷环境而自然选择的结果。

从生长曲线看, N-6 菌株在 pH 值 7.0 时生长最好, 然而从所收集的菌体总量来看, 却是 pH 值 8.0 时最多。其原因可能是 pH 值为 8.0 时, 菌株生长

较 pH 值 7.0 时快,在 210 h 取样测定 OD_{560} 值时,此时的菌已经处于衰亡期。DHA 含量是随 pH 值增加而升高的,这可能是由于过酸的环境不适合 DHA 的产生与积累,其有关的机理还有待于进一步研究。但可以初步判断,N-6 菌株是嗜碱的。

环境中的盐离子浓度可以改变微生物中的脂肪酸组成,但是结果因微生物的种类而异^[16-17]。南极微生物通常生活在低温($-1.8\text{ }^{\circ}\text{C} \sim -2.0\text{ }^{\circ}\text{C}$)和高盐度环境中(南极海水中的盐度一般为 34~35,海冰中的盐囊和盐通道的盐度可达普通海水的 5 倍)。从本实验的结果来看,N-6 菌能够在盐度较高的环境中生长,但是 DHA 含量总的趋势是随盐度的升高而降低的,而生长情况亦是如此,即高盐度环境对其生长不利,这符合一般微生物的生长规律。在相当于四分之一海水浓度的条件下,它也无法存活,说明低盐度对其生长也不利,可能是它需要一定的离子浓度来维持体内外的渗透压平衡,或者具有一定的嗜盐性。

利用细菌发酵生产 DHA 或 EPA 具有成本低、速度快、周期短等特点,不受资源限制,将来完全有可能取代鱼油成为 DHA 和 EPA 的新来源,而细菌发酵生产最重要的一点就是要筛选到高产菌株。目前,国内尚未有研究开发南极高产 DHA 的菌株的研究报道。本实验通过 GC 及 GC-MS 分析,筛选出的 N-6 中 DHA 相对含量达到 8.72%,干菌体的 DHA 含量为 19.6 mg/g,并且经反复传代培养,DHA 含量很稳定,具有工业化生产的潜能,同时丰富了中国南极菌种库资源。目前,诱变筛选等工作正在进行,以进一步提高产量,探索其实现工业化生产的可行性。

参考文献:

- [1] Margolin R, Schinner F. Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology[J]. J Biotechnol, 1994, 33:1-8.
- [2] Russell N J, Nichols D S. Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria—a dogma rewritten[J]. Microbiology, 1999, 145: 767-773.
- [3] Alasalvar C, Taylor K D A, Zubeir E, et al. Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Total lipid content, fatty acid and trace mineral composition[J]. Food Chem, 2002, 79:145-151.
- [4] Dyerberg J, Bang H O, Hørse N. The composition of food consumed by Greenland Eskimos[J]. Acta Med Scand, 1976, 2: 69-75.
- [5] Alexander J W. Immunonutrition: the role of ω -3 fatty acids[J]. Nutrition, 1998, 14:627-633.
- [6] Falestner J S, Ross J A, Fearon K C H, et al. Effect of ω -pentanoic acid and other fatty acids on the growth in vitro of human pancreatic cancer cell lines[J]. Br J Cancer, 1994, 69: 826-834.
- [7] Rose D P, Connolly J M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents[J]. Pharmacol Therap, 1999, 83:217-223.
- [8] Friedberg C E, Janssen M J, Heine R J, et al. Fish oil and glycemic control in diabetes: A meta-analysis[J]. Diabetes Care, 1998, 21:494-500.
- [9] Nichols D S, Sanderson K, Bowman J, et al. Developments with Antarctic microorganisms: PUFA, culture collections, bioactivity screening and cold adapted enzymes[J]. Curr Opin Biotechnol, 1999, 10:240-247.
- [10] Zobell C E. Marine Microbiology[M]. Waltham:Chronica Botanica Co. 1946. 240-256.
- [11] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method for total lipid extraction and purification[J]. Can J Biochem Physiol, 1959, 37:911-919.
- [12] White D C, Davis W M, Nickels J S, et al. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate[J]. Oecologia, 1979, 40:51-62.
- [13] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2000. 23-26.
- [14] 邹耀洪. 邻氨基苯酚化学修饰试剂用于气相色谱/质谱分析脂肪酸酯[J]. 分析化学, 2004(2): 71-77.
- [15] Kenneth R R, Anthony P T, John G S. Membrane fatty acid analysis of Antarctic bacteria[J]. Microbial Letters, 1993, 114 (3): 253-259.
- [16] Teshima Shin-ichi, Yamasaki S, Kanazawa A et al. Effects of water temperature and salinity on ω -pentanoic acid level of marine *Chlorella*[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1983, 49(5):805.
- [17] Cohen Z, Vorshak A, Richmond A. Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red alga *Periphyllium cruentum*: correlation to growth rate[J]. J Phycol, 1988, 24:328-332.

Screening on DHA-producing Antarctic bacteria and its cultural conditions

ZHANG Bo-tao¹, MIAO Jin-lai², GU Ying-chun³, MA Jin-hai¹, ZHENG Zhou¹⁻², WANG Guo-dong², LI Guang-you²

(1. Life Sciences and Technology College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Key Laboratory of Marine Bioactive Substances, State Ocean Administration, Qingdao 266061, China; 3. Qingdao Chest Hospital, Qingdao 266101, China)

Abstract: Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) have remained as a natural product due to the synthetic difficulty of reproducing the methylene interrupted double bond sequence by industrial chemistry. Their significance to animals and humans lies in their biological activity, as precursors for groups of nutritionally important compounds and as essential cellular components. Interest in the production of PUFAs, especially DHA and EPA, from other sources for use in aquaculture feeds and human health supplements has fueled recent researches into the molecular biology of PUFA production in sea ice microorganisms. In Antarctic, the geography and climate differ from those in other places, and the bacteria there have adapted well to the environment there. Two hundred strains of bacteria were isolated from the sea ice in Antarctica (68°30'E, 65°00'S) during the 19th Antarctic Scientific Expedition of China (2001 – 2002). The bacteria were screened for DHA by means of GC, with fish oil as the standard. Seven strains containing DHA or EPA were obtained, among which the strain of No. N-6 was outstanding. And its component of DHA was identified by GC-MS. According to the analysis, the relative content of DHA in N-6 was 8.72%, and total lipids in dry bacteria was 22.54%. The effects of some factors, including salinity, temperature and pH value, on the growth and DHA-content of strain N-6 were studied. The results show that the DHA-content is relatively high when in high salinity, low temperature and high pH, and the bacterium is psychrophilic, alkalophilic and halophilic. As fish oil fails to meet the increasing demand for purified DHA, alternative sources are being sought, and some microalgae containing DHA were screened. But there are some limitations in cultivation on a large scale, including sunlight, growth rate, etc., all of which can be easily solved with the psychrophilic N-6 if cultured in chemostat at a low temperature, and the advantage of running the bioreaction at low temperature is avoiding the risk of contamination by other microorganisms. The purpose of this study on screening DHA-producing Antarctic bacteria is very cheerful, and much more of their talents will be exploited in future. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1): 79 – 84]

Key words: Antarctic; bacteria; GC-MS; unsaturated fatty acids