

文章编号:1005-8737(2001)03-0090-04

·综述·

利用海洋微藻生产DHA和EPA的研究现状及前景

Progress and prospect of production of DHA and EPA from oceanic microalgae

古绍彬, 虞龙, 向砥, 于洋, 余增亮

(中国科学院等离子体物理研究所 离子束生物工程学实验室, 安徽 合肥 230031)

GU Shao-bin, YU Long, XIANG Di, YU Yang, YU Zeng-liang

(Center of Ion Beam Bioengineering, Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

关键词:微藻;二十二碳六烯酸;二十碳五烯酸

Key words: microalgae; DHA; EPA

中图分类号:TS254.1

文献标识码:A

在哺乳动物体内 EPA 和 DHA 等高度不饱和脂肪酸 (PUFA) 表现出的独特生理功效早已受到科学界、医学界、健康食品业及消费者的重视^[1~6]。在英、美、日等发达国家, 健康部门推荐每个成人 $\omega-3$ 型多不饱和脂肪酸的摄入量应为 1.0~1.5 g/d; 有关 DHA 的产品, 如 DHA 保健胶囊、DHA 婴儿奶粉、DHA 微胶囊制品、DHA 饮料及 DHA 食品也已相继诞生, 而 EPA 也在 90 年代初就被日本正式批准用于治疗心血管疾病的药物。水产养殖学家们也发现 PUFA (尤其是鱼虾体内自身不能合成或合成速度缓慢的 PUFA, 如亚油酸、亚麻酸、EPA、DHA 等) 在鱼虾生长及发育过程中发挥着重要的功能^[7~8], 在水产养殖中适量投放富含 PUFA 的生物饵料已经成为增产增收的一个重要手段。

随着研究的继续深入, EPA 和 DHA 新的生理功效及作用机理将不断被发现和揭示, 然而短缺的 PUFA 生物资源却始终制约着 EPA 和 DHA 的广泛应用, 积极寻找廉价的 DHA 和 EPA 生物资源已成为一种迫切的要求。国外较早就开展了 PUFA 生物资源开发和利用的研究工作, 尤其是 DHA 和 EPA 生物资源, 发现海洋微藻具有大规模生产 PUFA 的潜力; 到目前为止, 国内外已经在这方面进行了比较广泛的研究, 并取得了不少成就。

1 培养海洋微藻生产 PUFA 研究背景

传统上工业鱼油是 DHA 和 EPA 等多不饱和脂肪酸的主要来源, 尤其是深海鱼油。然而从鱼油中提取 PUFA 时却

经常面临着这样的问题: (1) 鱼油中的 $\omega-3$ 型 PUFA (主要是 DHA/EPA) 的构成和含量随着鱼的种类、季节、地理位置等变化而变化; (2) 从鱼油中提取的 PUFA 胆固醇含量高, 并带有腥味, 极大地影响了产品的品质; (3) 在鱼油加工过程中的氢化处理工艺降低了鱼油中的 PUFA 产量; (4) 复杂的加工处理过程, 使得 PUFA 的价格极为昂贵。研究人员近年来也发现许多真菌中有积累 DHA 和 EPA 的现象。在高山被孢霉 (*Motierella alpina*)、樟疫霉 (*Phytophthora cinnamomi*)、终极腐霉 (*Pythium ultimum*)、长孢被孢霉 (*M. elongata*)、畸雌腐霉 (*P. Irregular*) 等真菌中发现了 EPA 的存在^[4], 在破囊壶菌 (*Thraustochytrium* sp.) 和裂殖壶菌 (*Schizochytrium* sp.) 等海洋微生物中发现了 DHA 积累^[9], 最近 X Guo 和 Y ota^[10] 甚至在酵母 FO726A 中也发现了 DHA 和 EPA 的积累。利用真菌生产 DHA 和 EPA 的工作还处于尝试和探索阶段, 如果仅采用现有的真菌菌种和技术生产 DHA 和 EPA 仍然存在成本偏高, 工艺流程不成熟, 对外界因子干扰敏感, 产量有限等问题。因此, 积极开发和利用廉价的 EPA 和 DHA 生物资源和研究便捷的培养和生产方式便成为了广大商家和科学工作者们共同关心的问题^[11~13]。

研究发现, 鱼类并不是 PUFA 的真正生产者, 它是通过吞食富含 PUFA 的藻类 (海洋微藻 → 浮游动物 → 鱼) 后在体内实现 PUFA 的积累, 因此微藻才是 PUFA 真正的生产者。培养海洋微藻生产 $\omega-3$ 型多不饱和脂肪酸理论上讲应该是一条更为直接的途径。一方面, 海洋微藻可以快速生长繁殖, 自身合成并富集高浓度的 PUFA, 在某些微藻体内 PUFA 的含量高达细胞干重的 5%~6%, 其相对含量远远高于鱼体内 PUFA 的含量^[14] (表 1)。另一方面, 从藻体内提纯 PUFA 较从鱼油中提取工艺更为简单, 并且不带腥味, 适合于作优质食品添加剂。同时, 它不含胆固醇成分, 避免了服

收稿日期: 2001-01-15

基金项目: 国家自然科学基金重大资助项目 (19890300)

作者简介: 古绍彬 (1975-), 男, 硕士研究生, 从事离子束生物工程技术有限公司进行海洋微藻育种的研究。

Tel: 0551-5591327, E-mail: sbgu@china.com

用鱼油胶囊时摄入大量胆固醇的缺点。有些微藻还可以直接食用,大大减少了 PUFA 在提纯过程中的氧化分解。

表 1 微藻及鱼油中 DHA 和 EPA 含量的比较

Table 1 The comparison of DHA and EPA content in fish oil and microalgae

微藻及鱼油 Microalgae or fish	PUFA	DHA	EPA
小环藻 <i>Cyclotella cryptica</i>	10.6	—	23.8
三角褐指藻 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	9.2	—	26.9
硅藻 MK8620 <i>Diatom</i>	40.1	—	12.6
球等鞭金藻 3011 <i>I. galbana</i>	26.5	22.0	1.5
小新月菱形藻 2034 <i>N. closterium</i>	8.8	0.5	35.2
绿色巴夫藻 3012 <i>P. viridis</i>	10.2	12.6	27.9
竹荚鱼 <i>Bluefish</i>	3.9	—	3.4
大麻哈鱼 <i>Salmon</i>	19.0	—	9.6
海鲑鱼 <i>Seatrout</i>	9.1	—	4.3

注:脂肪酸—占生物干重百分比; EPA—占总脂肪酸百分比; DHA—占总脂肪酸百分比。

2 培养海洋微藻生产 PUFA 的现状

利用海洋微藻生产多不饱和脂肪酸的研究始于 80 年代初期,并且多以自养微藻生产 DHA 和 EPA 为主,其中的三角褐指藻(*P. tricornutum*)、紫球藻(*Porphyridium cruentum*)、盐生微小绿藻(*Nannochloropsis salina*)、球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)、硅藻(*Diatom*)等当时被认为最有可能实现微藻产业化。美国、日本、以色列等曾率先采用户外开放大池培养这些自养微藻用以生产 PUFA,其结果并不尽人意。Cohen 和 Heimer 报道^[15],户外培养红藻(*Porphyridium cruentum*)的 EPA 产量冬天为 0.5 mg/(L·d),夏天为 1.0 mg/(L·d)。Barelay 等据 Richmond 和 Vonshak 1982 年报道户外培养微藻的最高产量 50 g/(m²·d),和 Lopez Alonso 等 1992 年实验研究中报告的自养微藻品系中 $\omega-3$ 型多不饱和脂肪酸最高含量值(在 *Isochrysis galbana* 中占干重 6.7%),对户外培养积累多不饱和脂肪酸的光合自养微藻最高产量进行了理论推断,其值也仅为 16.7 mg/(L·d)。我国微藻养殖方面发展较快,养殖方式也比较一致,都是采用开放式或半开放式的培养方式,培养一些可以作为生物饵料或者食品添加剂的藻种^[16];对于开放大池培养微藻用以生产 PUFA 研究得不多,戴俊彪等^[17]曾对开放大池培养球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)生产 DHA 和 EPA 进行过初步的探讨。其间,人们也对影响微藻生长繁殖、藻体生化组成和 PUFA 积累的稀释速率、光照强度、光质及光周期、温度、pH、盐度、氮源及浓度和磷源及浓度、NaCl 浓度、微量元素、微生物及二氧化碳等影响因子也进行了深入探讨,并拟定了不少自养微藻高产 PUFA 的最佳培养方式和培养条件。这些工作从一定程度上弥补了户外开放大池培养微藻的一些不足,在一定范围内提高了微藻培养过程中的单位面积上单位时

间的生物产量及产物的积累,然而这仍不能从根本上克服户外培养海洋微藻的诸多不利因素。

开放大池培养微藻其极低的产量和难以对一些高纯度、高价值的产品进行纯种培养的缺陷,使其在推广微藻大规模培养上受到诸多因素的限制。首先,能适应于大池培养的微藻藻种必须是在极端环境下能快速生长的藻种,然而能满足这些条件的藻种目前并不是太多。其次,培养过程受光照、温度等自然环境影响较大,并且易被真菌、原生动物和其他杂藻污染,同时水分蒸发严重,二氧化碳供给不足。这些因素最终都将导致细胞培养密度偏低,PUFA 含量不高,使得采收成本过高。后来,人们又设计出密闭光生物反应器,基本上可以解决上述问题,并通过控制培养液浓度实现了连续培养。现在的光生物反应器已经发展为柱式光照发酵罐、管式及板式恒化反应器,以及可实现培养条件计算机在线控制的光纤式光生物反应器等多种类型。

3 培养海洋微藻产 DHA 和 EPA 的前景

利用密闭式光生物反应器培养微藻,能够最大限度的控制养殖环境,减少污染发生,提高产量。据 Cohen 和 Arad^[18]报道,利用这一技术可使 *Porphyridium* 的产量增加 60%~300%,同时还可以降低收获成本。然而利用光生物反应器依然存在着许多不足:如培养后期,由于细胞浓度的升高,限制光的穿透,降低了光照效率;在培养过程中由于水压增加,使细胞受到损伤;反应器内容易累积氧气,降低脂肪酸的去饱和程度;反应器和生物传感器上易发生附着;此外这种培养技术成本较高。

如果能实现异养培养,像许多工业微生物一样在发酵罐里实行工业化生产,则可以避免上述问题。早在 60 年代异养培养和混合培养技术就应用于健康食品、动物饲料、虾青素和抗坏血酸的生产。另外,Khozin I 等^[19~22]也对 $\omega-3$ 型 PUFA 的合成代谢途径进行了研究,发现 $\omega-3$ 型 PUFA 的合成过程并不需要光照;Johns 等^[22]则先后从众多积累 PUFA 的微藻中也筛选出能异养藻种,如:群孢小球藻(*Chlorella sorokinana*),小球藻(*C. saccharophila*),柯氏隐甲藻(*Crypteodinium cohnii*),菱形藻(*Nitzschia alba*),卡德藻(*Tetraselmis suecica*),单衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)。因此,选育富集 DHA 和 EPA 的异养藻种,设计适合的培养基及选择恰当的培养条件,实现微藻大规模异养培养生产 PUFA 是完全可能,而且也是可行的。这样一来便可以做到:(1)以现有的发酵设备进行微藻纯种培养制造高值产品,减少设备投资;(2)实现培养条件自动化控制,使藻细胞快速生长繁殖,提高培养基单位容积的产率;(3)达到高效利用底物,提高细胞密度,利用现有的分离设备降低采收和产物提纯等下游技术的成本。与自养微藻培养、采收和其最终产物的分离纯化等工艺相比,异养培养的确更为有效可行。

如今,国外异养微藻藻种选育工作已经取得了一定的进展。美国 Martek 公司筛选出硅藻种 *Nitzschia alba* 作为

EPA 生产藻种,其 EPA 的最终产量为 $0.25 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$;筛选出的 DHA 生产藻种 *Cryptocodinium cohnii*,其 DHA 的产率为 $1.2 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$,该公司已建成 150 m^3 规模的工业化异养培养设备,生产富含 DHA 的微藻饲料。日本川崎制铁公司筛选出 DHA 生产藻种 *Cryptocodinium* sp. 并申请了专利。国内在这方面工作还处于尝试阶段,如研究人员曾考虑试图通过细胞融合技术将海洋小球藻与不含 EPA 但生长快速的淡水小球藻进行融合获得能快速合成 DHA 和 EPA 的新型杂合小球藻^[23],或者通过探索其他技术或者新的方法以期获得一些生产 PUFA 的新型藻种。

此外,研究人员对异养培养方法进行了研究。Chen, Michael R 和 Johns 等^[24-26]发现以发酵技术为基础,采用恒化培养、分批流加培养和膜过滤细胞循环系统进行微藻异养培养,不仅可以降低初始底物浓度过高或者过低对藻细胞生长的抑制或限制作用,而且可以排除培养液中影响藻细胞生长的有毒物质和细胞溶出物,保证藻细胞高密度培养的顺利进行。同时,进行培养基的彻底灭菌、严格无菌操作及优化培养条件,也可解决异养培养系统容易污染细菌等微生物的问题。最近一项由中山大学和香港大学联合研制开发的深海植物生物反应器高密度深层培养技术,已被汕头润科生物工程公司成功用于生产 DPA(二十二碳五烯酸)和不含 EPA 的 DHA 长链多不饱和脂肪酸。

众所周知,并不是所有微藻都能以有机碳源为底物进行异养生长,且对微藻异养机理的研究也还不够深入。对于那些只能自养,还没有发现其异养或者兼养现象的微藻,人们推测其可能是由于酶缺陷机制、膜障碍机制和异养代谢能量不足机制所致。

当前,研究人员对微藻异养机理、生长动力学模型、培养条件等工作继续进行深入细致地研究的同时,对异养藻种的选育工作也正紧张开展。微藻藻种的选育方法很多,如选择育种、诱变育种、基因工程和细胞工程育种等^[23,27,28],而对于异养微藻藻种选育工作来说,后 3 种方法却还处于尝试和探索阶段。目前中国科学院等离子物理研究所离子束生物工程中心正拟定利用离子束生物工程开展微藻育种工作,离子束生物技术是一项颇受国内外学者和育种专家关注的新兴生物工程技术^[29-30],它以其独特的生物学效应已成功地在陆地生物育种中开展了许多突出的卓有成效的工作。研究人员将首次采用离子束诱变育种技术和离子束介导转基因技术,构建和选育高产 PUFA 的异养工程微藻。如果这项工作取得成功,不仅为海洋微藻,甚至可能将会为整个海洋生物育种工作注入新的活力,带来新的希望。

随着对藻种选育研究的继续深入,培养条件和培养方法的不断改进,解决 PUFA 生物资源短缺的问题将成为可能;培养海洋微藻生产 DHA 和 EPA,不仅具有重要的科学意义,更具有潜在的应用前景。

参考文献:

[1] 李 勇,苏世彦. DHA 的功效及其在食品工业中的应用[J]. 食

品工业,1996,3:12-14.

- [2] Daniel R, Michael Pantze, Heinrich Bachmann, et al. n-3 polyunsaturated fatty acids and cytokine production in health and disease [J]. Annual of Nutrition & metabolism, 1997, (4):203-214.
- [3] 陈 水,韩艳霞,曹红霞. 人体必须脂肪酸的功效及开发利用[J]. 开封大学学报,1998, (2):28-31.
- [4] 戴传超,袁 生,刘吉华. DHA 和 EPA 的生理功能及其应用[J]. 微生物学杂志,1998, (4):48-51.
- [5] Simopoulos A P. Essential fatty acids in health and chronic disease [J]. American journal in health and disease, 1999, 70(33):560-562.
- [6] Conquer J A, Holub B J. Supplementation with an algae source of Docosahexaenoic acid increase (n-3) fatty acids status alter selected risk factors for heart disease in vegetarian subjects[J]. J Nutr, 1996, 126(12):3 032-3 039.
- [7] Silva A. Effect of microalgae *Isochrysis galbana* on the early Larval culture of paralichthys adspersas[J]. Ciencias Marine, 1999, 25 (2):267-276.
- [8] Nanto D A, Castell J D. The effects of temperature and dietary fatty acids on the fatty acid composition of *Harpacticoid* copepods for use as a live food for marine fish Larvae[J]. Aquaculture, 1999, 175:167-181.
- [9] 张羽航,黄惠琴,鲍时翔,等. 海洋微生物发酵生产二十二碳六烯酸[J]. 海洋通报,1999, (1):89-92.
- [10] Guo X, Ota Y. Incorporation of eicosapentaenoic acid docosahexaenoic acids by yeast(FO726A)[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 89:107-115.
- [11] 王菊芳,梁世中. 海洋微藻在医药上的应用[J]. 广州医学院学报,1999, (3):303-306.
- [12] Ronald Osinga, Johannes T, Rene H, et al. Marine bioprocess engineering: from ocean to industry[J]. Trends in Biotechnology, 1999, 17:303-304.
- [13] Lorenz R T, Gerald R, Cysewski. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as natural source of astaxanthin[J]. Trends in Biotechnology, 2000, 18:160-167.
- [14] 李荷芳,樊云真,刘发义. 海洋微藻高度不饱和脂肪酸研究 I. 几种常用海洋微藻的脂类和脂肪酸组成[J]. 海洋科学集刊, 1998, 40:149-153.
- [15] Cohen Z, Heimer Y M. Production of polyunsaturated fatty acids (EPA, ARA, and GLA) by the microalgae *Porphyridium* and *Spirulina* [J]. Industrial application of single cell oil[C]. Champaign Illinois: American Oil Chem Soc, 1992.243-273.
- [16] 梁 英,麦康森,孙世春. 微藻应用概述[J]. 海洋湖沼通报, 1999, (2):70-82.
- [17] 戴俊彪,吴庆余. 外培养海洋单细胞微藻的生长及生化组成[J]. 海洋科学,2000, 6:29-32.
- [18] Cohen E, Arad(Malis) S. A closed system for outdoor cultivation of *Porphyridium cruentum* [J]. Biomass, 1989, 18:59-67.
- [19] Khozin I, Adlerstein D, Bigongo C. Elucidation of the biosynthesis of Eicosapentaenoic acid in the microalgae *Porphyridium cruentum* [J]. Plant Physiol, 1997, 114:223-230.

