

利用海洋微藻培养生产  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸THE PRODUCTION OF  $\omega$ -3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS BY MICROALGAE姜悦<sup>1</sup> 陈峰<sup>2</sup> 梁世中<sup>1</sup><sup>1</sup> 华南理工大学生物工程系 广州 510641)<sup>2</sup> 香港大学植物学系)

传统上工业鱼油是 EPA 及 DHA 等多元不饱和脂肪酸的主要来源, 尤其以深海鱼种中的含量较高, 但是从鱼油中提取的多不饱和脂肪酸(PUFA) 存在腥臭味, 加工过程中的氢化处理工艺, 降低了鱼油中 PUFA 的产量, 且后处理过程要经油水分离、浓缩、蒸馏、精制、脱臭等步骤, 工艺复杂, 导致 99% DHA 每克售价达 144 美元, 而 99% EPA 则高达 2 000 美元<sup>[3]</sup>, 因此, 鱼油资源已无法适应商品市场不断增大的需要。

## 1 海洋微藻培养生产 PUFA

## 1.1 海洋微藻培养生产 PUFA 的现状

微藻是海洋中的初级生产力, 具有合成 EPA 和 DHA 的能力。鱼通过吞食藻类(海洋微藻→浮游动物→鱼), 其体内才得以积累 PUFA。藻体内 EPA 和 DHA 的相对含量远远高于鱼油中的含量, 从藻细胞中提取的 PUFA 产品没有腥臭味, 不含胆固醇成分, 避免了服用鱼油胶囊时摄入大量胆固醇的缺点, 在某些藻类中分别含有较高含量的 EPA 和 DHA, 减少了 EPA 和 DHA 在提取过程中的相互干扰。同时, 有些藻类可以直接食用, 避免了提纯过程的氧化分解。因此, 利用微藻来生产 EPA 和 DHA 被公认为很有前途的研究方向。

利用微藻培养生产多不饱和脂肪酸的研究始于 80 年代初期, 其中以自养方式生产 EPA 和 DHA 的藻种以海产藻居多, 有: *Phaeocystis tricornutum*, *Amphidinium carterae*, *Skkeletonema costatum*, *Nannochloropsis oculata*, *Porphyridium cruentum*, *Chaetoceros calcitrans*, *Isocrysis galbana* 等, 其中的三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)、紫球藻(*Porphyridium cruentum*)、盐生微小绿藻(*Nannochloropsis salina*)、黄绿等鞭金藻(*Isocrysis galbana*)、硅藻(*Diatom*) 最有可能被工业化生产采用。

开放式大池培养是即传统又简单的微藻培养系统, 可在大池中进行培养的藻类均具有一种极端的生长条件, 从而避免其他微生物或浮游动物的污染, 但是生产某些高值产品, 如多糖、PUFA、虾青素、生物活性物质等的藻类, 大池培养无法保证其生长条件, 主要由于开放式大池培养系统中存在二氧化碳供给不足、难于进行温控、水份蒸发严重以及易染菌、生产不稳定等问题, 如 Cohen 报道<sup>[4]</sup>80 年代初, 大池培养的 *Porphyridium cruentum*, EPA 产量冬天为 20.83  $\mu\text{g/L}\cdot\text{h}$ , 夏天为 41.67  $\mu\text{g/L}\cdot\text{h}$ , 因此在 PUFA 的研究中多采用密闭式光照反应器, 通过控制培养液的浓度, 实现连续培养。经常采用的光照反应器有柱式光照发酵罐、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照反应器<sup>[5,6]</sup>。

在已有的工作基础上, 主要包括三个研究方面:

(1) 选育生长速度快、PUFA 产量相对较高的藻种; (2) 研究影响藻细胞生长速度、细胞生化组成的各种环境因素, 确立合适的环境条件; (3) 建立藻细胞生长动力学模型。在环境因素中主要从稀释速率、光照强度、温度、氮源和磷源的浓度、NaCl 的浓度、二氧化碳供给量等条件出发, 控制藻细胞在合适的生长速度和生长阶段, 可人为控制藻体内 PUFA 的合成量及其在总脂、总生物量中所占的比例。如: Grima E. G. 在研究 *Isocrysis galbana* Parke 时发现, 在低生长速率时, EPA 含量在藻体内相对较高; 光强对于不同藻体内 PUFA 的合成有种属特异性; 并且指出该种藻体内蛋白质含量与多不饱和脂肪酸的含量成反比, 静止期内蛋白含量下降, 不饱和脂肪酸的含量则上升。在 20  $^{\circ}\text{C}$ ,  $D=0.0355/\text{h}$ , 氮源浓度 2  $\mu\text{mol/m}^3$ , EPA 和 DHA 的产量分别达到 300  $\mu\text{g/L}\cdot\text{h}$  和 130  $\mu\text{g/L}\cdot\text{h}$ , 在  $D=0.0208/\text{h}$  时, EPA 的产量为 635.83  $\mu\text{g/L}\cdot\text{h}$ <sup>[7]</sup>。对于

收稿日期: 1997 年 2 月 10 日

*Nannochloropsis* sp. 细胞的最适生长温度高于 EPA 的合成温度,而在最大生物量得率的条件下获得最高 EPA 产率。在静止期,PUFA 的产率下降,饱和脂肪酸的含量上升,在细胞培养后期,由于氮源、NaCl 等营养盐的缺乏导致极性脂肪酸、PUFA 及蛋白质含量均下降,不同于 *Isochrysis galbana*<sup>[8]</sup>。

## 1.2 微藻培养生产 EPA 和 DHA 的前景

利用密闭式光照反应器进行微藻自养培养生产 EPA 和 DHA 普遍存在以下问题: (1) 培养后期,由于细胞浓度升高,降低了光照效率; (2) 反应器内易于累积氧气,降低脂肪酸的去饱和程度; (3) 反应器内壁易发生附着现象。若以可利用有机碳(葡萄糖、醋酸盐)为唯一碳源和能源的微藻进行异养培养,则可以解决上述问题,具有广阔的研究开发前景。异养培养具有以下优点: (1) 可实现培养条件的自动控制; (2) 易进行纯种培养; (3) 可实现细胞高密度培养,提高底物及设备利用率; (4) 由于实现了细胞高密度培养,可大大降低下游精制工艺消耗。

目前微藻异养培养的研究仍处于实验室阶段,以分批异养培养、分批流加异养培养、恒化异养培养方式为主,研究的藻种有: *Chlorella sorokiniana*, *C. saccharophila*, *Cryptocodinium cohnii*, *Nitzschia alba*, *Tetraselmis suecica*, *Chlamydomonas reinhardtii*<sup>[9,12]</sup>。由于 PUFA 在微藻体内不是光诱导产物,因此,筛选可进行完全异养生长的藻种,选择合适的培养条件,减少有机底物对藻体的抑制作用,在培养过程中防止杂菌的污染,进行微藻大规模异养培养生产 PUFA 是完全可能的。目前 Martek 公司(Columbia, USA) 已筛选出硅藻种 *Nitzschia alba* 作为 EPA 生产藻种, EPA 的最终产量为 0.25 g/L·d; 以 *Cryptocodinium cohnii* 作为 DHA 生产种, DHA 的产率为 1.2 g/L·d。该公司已建成 150 m<sup>3</sup> 规模的工业化异养培养设备,生产富含 DHA 的微藻饲料。Omega Tech 公司(Boulder, USA) 经过育种工作,以 *Thalassiosira weissflogii* sp. 作为 PUFA 的理想生产者。在日本川崎制铁公司已筛选到 DHA 生产藻种 *Cryptocodinium cohnii*, 并申请了专利。可见以发酵技术为基础,采用恒化培养、分批流加培养及膜过滤细胞循环系统进行藻类异养培养,不仅可降低初始底物浓度过高或过低对藻细胞生长的抑制或限制作用,而且可排出培养液中影响藻细胞生长的有毒物质或细胞溶出物,保证藻细胞高密度培养的顺利进行<sup>[1,13]</sup>。此外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易污染细菌等微生物的问题。

## 2 EPA 和 DHA 的提纯及精制工艺

随着对海洋动植物脂肪酸及其分析分离研究的深入,以及柱层析、薄层层析、气相色谱、液相色谱的出现,为 PUFA 从甘油三酯中分离、提纯、精制 PUFA 提供了基础。

PUFA 分离的基本操作步骤主要是脂肪酸的预浓缩和分离制备两步。浓缩方法应用最早、最广泛的有尿素沉淀法、低温结晶分离技术。尿素沉淀法主要是依据脂肪酸的不饱和度而将饱和与不饱和脂肪酸分离,利用该方法制备的 EPA 和 DHA 产品浓度达到 69%~85%,收率为 17%~20%<sup>[15]</sup>。低温结晶技术主要是利用不同的脂肪酸在低温的有机溶剂中依其溶解度的不同而加以晶析分离。此外,近几年还出现了超临界 CO<sub>2</sub> 萃取技术、脂肪酶水解技术、膜分离法、硝酸银层析法,同时为进一步提高 EPA 和 DHA 的浓度,上述方法经常和溶剂提取、真空蒸馏、分馏、甲酯化蒸馏等方法结合使用。如单独采用超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法时, EPA 和 DHA 的浓度为 57.4%; 而和尿素沉淀法结合使用, EPA 和 DHA 的浓度达 90% 以上<sup>[16]</sup>。PUFA 的分析分离方法主要有制备薄层色谱(TLC)、硅胶吸附柱色谱、DEAE 纤维素离子交换色谱、高压液相色谱(HPLC)、反相高压液相色谱(RP-HPLC)等。目前商业化生产中主要从鱼油中提纯 PUFA,一般是在没有氧化、异构化反应发生的条件下,将这些物质甲酯化或乙酯化,再采用一定的方法进行高效分离。Hidayat 等报道,利用尿素沉淀法和 RP-HPLC 相结合的方式,鱼油中 EPA 和 DHA 的分纯率分别达到 96.7% 和 92.4%<sup>[17]</sup>。在微藻体内 PUFA 的分析主要采取以下步骤:藻体收集→冷冻干燥→脂肪酸萃取→脂肪酸转酯化→分离、纯化。因为不同的藻体内 PUFA 在脂肪中的分布部位不同,如 *Isochrysis galbana* 细胞中 EPA 和 DHA 分布在极性和中性脂肪中,而 *Phaeodactylum tricorutum* 细胞中 EPA 和 DHA 则只分布于极性脂肪中,故对于不同的藻种所采用的萃取溶剂及纯化试剂有所差异<sup>[18]</sup>。

从微藻体内提纯 PUFA 的工艺尚处于实验室阶段,其中 PUFA 的氧化稳定性是目前研究的难点。在选择分离方法时,除考虑成本、效果等因素外,应以反应条件温和、不会造成油脂的氧化为原则;在选择萃取溶剂时应避免使用氯仿、甲醇等有毒试剂(虽然其萃取效率相对较高),而选用符合食品工业溶剂标准的如乙醇、正己烷等溶剂。因此,研究出一套简便有效、可用于工业化大量制备的提纯方法有待进一步研究。

### 3 结语

EPA, DHA 是对婴儿大脑发育及成人心血管系统疾病有治疗、预防效果的重要物质。但在我国, 人们对于这两种多不饱和脂肪酸的摄入量并未满足人体的需要, 若能以现有的发酵设备, 利用海洋微藻培养生产 PUFA, 改进上、下游工艺, 提高经济效益, 是很有发展前景的生物产业生长点, 有望实现商业化生产。

#### 参考文献

- [1] Chen F., 1995. 华人老年保健食品国际学术研讨会论文集. 华南理工大学出版社, 10~13.
- [2] Paul W. B. and Hoeksema S. O. *et al.*, 1989. *Products for Medicine & Agriculture* 253-259.
- [3] Barclay W. R. and Meager K. M. *et al.*, 1994. *J. Appl. Phycol* 6: 123-129.
- [4] Cohen Z. and Heimer Y. M., 1992. Industrial Application of Single Cell Oils, *Am. Oil Chem. Soc.*, Illinois, 243-273.
- [5] Grima E. M., and Perez J. A. S. *et al.*, 1995. *Process Biochemistry* 30(8): 711-719.
- [6] Burgess J. G., Iwamoto K. *et al.*, 1993. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 39: 456-459.
- [7] Grima E. M., Camacho F. G. *et al.*, 1994. *Process Biochem* 29: 119-126.
- [8] Dunstan G. A., Volkman J. K. *et al.*, 1993. *J. Appl. Phycol* 5: 71-83.
- [9] Chen F. and Johns M. R., 1991. *J. Appl. Phycol* 3: 203-209.
- [10] Chen F. and Johns M. R., 1996. *Bioresour. Technol* 55: 103-110.
- [11] Chen F. and Johns M. R., 1994. *Process Biochem* 29: 245-252.
- [12] Chen F. and Johns M. R., 1996. *Process Biochemistry* 31(6): 601-604.
- [13] Chen F. and Johns M. R. 1995. *J. Appl. Phycol* 7: 43-46.
- [14] Chen F., 1996. *Trends in Biotechnol* 14: 421-426.
- [15] Yongmitchai W. and Ward O. P., 1992. *Phytochemistry* 31(10): 3405-3408.
- [16] Nisson W. B. and Gauglitz E. J. *et al.*, 1989. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66(11): 1596-1600.
- [17] Hidayat K. and Ching C. B. *et al.*, 1995. *J. of Chromatography* 702: 215-221.
- [18] Medina A. R. and Gimenez A. G. *et al.*, 1995. *J. Am. Oil Chem. Society* 72(5): 575-583.