

文章编号:1672-058X(2012)05-0100-06

利用微藻生产 ω -3 多不饱和脂肪酸的研究进展*

苏翔¹, 周晓琴¹, 王涛¹, 郭祥²

(1. 重庆工商大学环境与生物工程学院, 重庆 400067, 2. 西南大学化学化工学院, 重庆 400715)

摘要:介绍了 ω -3 多不饱和脂肪酸的相关概念, 进而对微藻生产 ω -3 多不饱和脂肪酸的国内外研究进展进行了研究; 探讨了微藻细胞内 ω -3 多不饱和脂肪酸合成的主要途径, EPA 和 DHA 组成及含量, 菌种的筛选, 微藻的培养方式以及 EPA 和 DHA 的提取等; 最后提出了优化微藻生产 ω -3 多不饱和脂肪酸技术的建议。

关键词: ω -3 多不饱和脂肪酸; 微藻; EPA; DHA; 筛选; 培养; 提取

中图分类号: Q89

文献标志码: A

多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA s) 是指含有 2 个或 2 个以上双键且碳链长 18-22 个碳原子的直链脂肪酸。功能性 PUFAs 根据结构分为两大类: 一类是 ω -3PUFAs, 在多不饱和脂肪酸分子中, 距羧基最远端的双键在倒数第 3 个碳原子上的称为 ω -3PUFAs, 主要包括二十碳五烯酸 (EPA)、二十二碳六烯酸 (DHA) 和 α -亚麻酸 (ALA); 另一类是 ω -6PUFAs, 在第 6 个碳原子上, 则称为 ω -6PUFAs, 主要包括亚油酸 (LA)、7-亚麻酸 (7-LJNA) 和花生四烯酸 (AA)。日常摄入的脂肪一般是动物油脂和植物油脂, 其中动物油脂以饱和脂肪酸为主, 而植物油脂主要以 ω -6PUFAs 为主, ω -3PUFAs 的含量甚微。经过研究发现, PUFA 中的双键愈多, 不饱和程度愈高, 同时其营养价值也愈高^[1], 因此以 EPA 和 DHA 为代表的 ω -3PUFA 是近年来人们研究的热点。然而, ω -3PUFA 的来源比较少, 传统上深海鱼油是其主要来源之一, 陆地上动植物中其含量甚少。随着全球社会经济的发展, 这些传统的 PUFA 资源已经不能满足当前日益扩大的市场需求, 开发 PUFA 新生物资源是当今许多研究学者关心的热点课题之一。

科学家们经过多年的探索, 认识到微藻的营养价值极高, 含有非常丰富的生物活性物质, 它具有合成 ω -3PUFA 的能力。鱼类本身并不能合成 ω -3PUFA^[2], 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 原始的生产者。海洋微藻藻体中 PUFA 的含量远远高于鱼油中的含量, 在某些藻体内 PUFA 含量高达 5% ~ 6% 细胞干重。利用微藻提取 PUFA 工艺简单, 不带腥味, 不含胆固醇成分。海洋微藻能快速生长繁殖, 自身合成并富集高浓度的 PUFA, 具有大规模生产 PUFA 的潜力, 是 EPA 和 DHA 的廉价生物资源。因此利用微藻生产 ω -3PUFA 是一个非常具有前途的研究方向。

收稿日期: 2011-09-18; 修回日期: 2011-11-15.

* 基金项目: 重庆市科学技术委员会项目资助 (CSTC, 2009AD7204); 重庆市环保局重大科技攻关项目——梁滩河鸭粪治理关键技术与示范 (环科字 2008 第 18 号); 重庆市城乡建设委员会 (城科字 2009 第 119 号)。

作者简介: 苏翔 (1986-), 女, 广西南宁人, 硕士研究生, 从事水处理方面的研究。

1 国内外研究现状

ω -6 PUFAs 的重要性,早在 20 世纪 50 年代就开始研究,而 ω -3 PUFAs 的生理调节功能和保健作用,是在近 20 年才被人们逐渐认识并做了大量的研究工作。药理实验证明^[3],EPA 和 DHA 等 ω -3 PUFAs 都具有降血脂、降血压、促进脂肪代谢、于治疗和防治心血管系统疾病;(Makrides 等,1995; Ghys 等,2002; Wroble 等人,2002 年)报道,对人类来说, ω -3 PUFAs,尤其是 DHA,是婴儿大脑和视网膜发育必不可少的营养之一;(Carlson,1999 年)研究发现, ω -3 PUFAs 是母乳中非常重要的脂肪酸。因此,目前许多国家都在开发以 EPA 和 DHA 为主要成分的保健食品和医疗药品。Omega Tech、Martek、Nilssin Oilssin oilMills 等公司利用微藻培养生产 EPA 和 DHA, Martek 公司以 *Nitzschia alba* 作为 EPA 的生产藻种, Nilssin Oilssin oilMills 公司以 *Crythecodinium cohnii* 作为 DHA 的生产藻种;我国也有利用球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 和紫球藻 (*Porphyridium* sp.) 生产 EPA 和 DHA 的研究。国际上对 ω -3 PUFA 保健食品的开发十分重视,市场上销售的 DHA 保健营养品有 30 多种, DHA 保健胶囊、DHA 婴儿奶粉、DHA 饮料等已相继诞生。EPA 在 20 世纪 90 年代初就被日本正式批准用于治疗心血管疾病的药物。我国科学院海洋研究所研制出富含 EPA 或 DHA 的海洋微藻胶囊(片)。目前,日本 DHA 保健食品的应用在世界上居领先地位,我国只有小规模生产,对利用微藻生产多不饱和脂肪酸的研究还大多处于实验室和试生产阶段,还需进行更进一步的研究开发^[4]。

2 ω -3 PUFA 的合成

经大量的研究认为,微藻细胞内的 ω -3 PUFA 简单的合成路线为:

- (a) 单不饱和脂肪酸(油酸) $\xrightarrow[\text{延长酶}]{\text{碳链延长作用}}$ ω -3 PUFA;
(底物)
- (b) 单不饱和脂肪酸(油酸) $\xrightarrow[\text{脱饱和酶}]{\text{脱饱和作用}}$ ω -3 PUFA。
(底物)

而具体的合成途径见图 1。

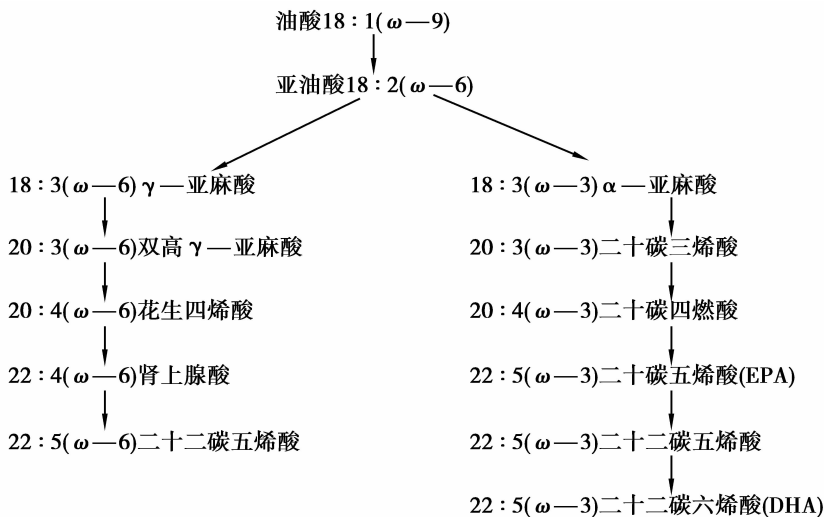


图 1 微藻细胞体内 ω -3 PUFA 合成途径^[5]

3 藻种的 EPA 和 DHA 含量及其筛选

经大量研究结果表明,不同的藻种其不饱和脂肪酸的组成具有较大的差异。各种常见的藻类中包括硅藻(Diatom)、甲藻(Dinoflagellate)、绿藻(Chlorophyta)、蓝藻(Cyanophyte)、红藻(Rhodophyta)、金藻(Chrysophyta)和隐藻(Cryptophyta)等,其脂肪酸的组成特点见表 1。

表 1 主要微藻类群的脂肪酸组成特点

种类	主要 SFA	主要 MUFA	主要 PUFA
蓝藻	14:30、 16:30	16:31($n-7$), 18:31($n-9$)	a. PUFA 含量低,如聚球藻(<i>Synechococcus</i>)品系 6301、7003 等; b. PUFA 含量高,以 C18 PUFAs 为主,如聚球藻品系 7001、7002 等和 <i>Microcystis aeruginosa</i> 等; c. PUFA 含量高,除 C18 PUFAs 含量高外,C16:32 含量也较高,如 <i>Gloeocapsa alpicola</i> 等。
绿藻	16:30、 18:30	16:31($n-7$), 18:31($n-9$)	16:34($n-3$)、18:33($n-3$)、C16 和 C18 PUFAs 含量较高,小球藻(<i>Chlorella</i> spp)等绿藻,EPA 含量较高,DHA 含量低。
硅藻	16:30、 18:30	16:31($n-7$), 18:31($n-9$)	EPA 含量普遍较高,DHA 含量很少或不含,多数硅藻 16:33($n-4$)含量也较高。
甲藻	16:30	18:31($n-9$)	18:34($n-3$)、18:35($n-3$)和 DHA,($n-3$)PUFA 含量较高,C18 PUFAs 和 DHA 比其他类群含量高。
红藻	16:30	16:31($n-7$), 18:31($n-9$)	以紫球藻(<i>Porphyridium cruent</i>)为例,AA(20:34($n-6$),Arachidonic Acid,)和 EPA 含量高,C16 PUFAs 和 C18 PUFAs 的含量很少。其特点是具有高含量的 AA,而脂肪酸在其他藻类中一般含量较低。
金藻	14:30、 16:30	18:31($n-9$)	18:34($n-3$)和 DHA 含量较高。(n-3) PUFAs 含量较为丰富,而且含有 22:35($n-6$)这个在其他藻类中少见的脂肪酸。
隐藻	16:30	18:31($n-9$), 18:31($n-7$)	18:33($n-3$)、18:34($n-3$)、EPA 含量高,有些种类还含有大量的 20:31($n-3$),含有丰富的 C18 PUFAs 和 EPA,而 C16 PUFAs 缺乏。

从表 1 可以看出,绿藻、硅藻、红藻、隐藻等微藻类都能产生高产量的 EPA,且经研究发现其中 Rhodoniaceae 中的 EPA 含量高达 50% 左右,而甲藻和金藻具有高含量的 DHA。

因此并不是所有的藻类都适合生产 $\omega-3$ PUFA,筛选高产 EPA 和 DHA 藻株是非常有必要的。大量实验研究表明,三角褐指藻、中肋骨条藻、新月菱形藻、球等鞭金藻、小球藻、盐藻、微绿球藻等生产多不饱和脂肪酸的潜力最大。张秋会等^[6]对 8 种海洋微藻进行培养,提取脂肪所用的微藻为 1 号三角褐指藻、2 号中肋骨条藻、3 号新月菱形藻、4 号等鞭金藻、5 号绿色巴夫藻、6 号小球藻、7 号微拟球藻、8 号紫球藻。经皂化、酯化

处理后用气相色谱测定 EPA, DHA 含量。结果表明, EPA 高产藻株为新月菱形藻, 产量为 16 mg/L, 占粗脂肪重的 26%, 占细胞干重的 3.3%; 等鞭金藻为 DHA 高产株, DHA 产量为 3.2 mg/L, 占粗脂肪重的 9.1%, 占细胞干重的 5.2%。

4 藻株的培养

4.1 光合作用方式的培养

传统的藻类生产, 主要以室外池塘或室内人工光照两种方式进行。影响藻类生产的因素比较多, 诸如光照, 营养盐, 温度, pH 等因素, 其中光是主要限制因素, 池塘生产微藻的主要问题就是透过水层的光不多, 另外, 由于藻类生长后自身也挡光。利用光合作用生产方式提高藻类产量其效果不太明显。Barclay 等从理论上计算, 室外池塘每天可生产 ω -3PUFA 为 4~8 mg/L, 但处理大量池塘水收获藻类的费用可达总费用的 33%。Gladue 等报道, 利用光合作用生产微藻, 每升水含有干物质达不到 0.5 g 生物量。因此, 人们对微藻培养方式的研究渐渐转向了异养式培养。

4.2 异养生产方式

由于 PUFA 的合成主要与细胞膜的极性脂肪酸组成有关, 在藻细胞内的合成过程不需要光照, 因此利用异养培养微藻生产 PUFA 成为可能^[7]。异养化培养微藻, 可以克服光合作用自养的诸多缺陷, 具有生长速度更快、能实现纯种培养、单位体积产率高、便于自动化控制、产品质量稳定等优势, 是提高微藻产量的有效途径, 比封闭式光生物反应器系统更具有优势。

异养生长 (heterotrophic growth) 即是在自养培养基中加入有机碳源或有机氮源, 在黑暗的条件下进行的需氧发酵生长, 这样消除了光对细胞生长的影响。但是, 并不是所有的微藻都具有异养条件的。目前发现可以异养的微藻数量不多, 仅有一些微藻能利用有机物 (葡萄糖、醋酸盐等) 作为唯一的碳源和能源进行异养生长。但是异养方式培养微藻已成为微藻大规模高效工业化生产的重点发展趋势。美国的 Martek 公司已建成 150 m³ 规模的工业化异养培养设备, 生产富含 DHA 的微藻饲料。Tan 等^[8] 利用葡萄糖对光滑菱形硅藻 (*Nitzschia laevis*) 进行异养培养, 结果表明 EPA 产量在异养条件下可以达到 23.2%。

4.3 兼养培养方式

由于异养和光合自养条件的不同, 会使微藻所含的化学成分发生变化, 产生的活性物质含量降低, 所以自养与异养相结合的兼养培养方式成为一种快速、大量培养微藻的有效方法。所谓的兼养培养就是混合营养培养, 即藻细胞同时利用光和有机物作为能源、同时利用有机物和无机物作为碳源的培养方式。孙灵毅等^[9] 对三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*)、亚心形扁藻、等鞭金藻分别进行自养培养和兼养培养试验, 发现三角褐指藻、等鞭金藻在兼养培养条件下, 其生长速度都不同程度地增加, EPA 和 DHA 含量也显著地提高; 而亚心形扁藻在兼养培养条件下却表现出很大的差别, 生长速度没有改变, EPA 的含量极低, 并且不含 DHA。Ogbonna 等^[10] 研究了一种异养与自养相互交替的养殖系统, 当异养培养结束后, 培养液倒入光反应器中, 在光照和充气充足条件下, 蛋白质和叶绿素含量有很大程度的提高。

5 ω -3PUFA 的提取

5.1 微藻提取 ω -3PUFA 基本工艺流程

从微藻中提取 PUFA 目前主要采取以下工艺流程: 藻体收集→冷冻干燥→脂肪酸萃取→脂肪酸转酯比→分离、纯化。

5.2 提取方法

目前提取方法包括:溶剂法(SE)、超临界流体萃取方法(SFE)、膜分离法、超声强化超临界流体萃取法(USFE)、脂脉酶水解法、硝酸银层析法等。胡爱军等^[11]对海藻中 EPA 和 DHA 的萃取技术进行了研究,即在优化条件下比较了溶剂法(SE)、超声强化溶剂法(USE)、超临界 CO₂法(SFE)及超声强化超临界 CO₂法(USFE)从海藻中提取 EPA 和 DHA。研究表明,超声对溶剂提取和超临界流体萃取过程都具有强化作用。超声强化溶剂提取过程,使提取时间缩短 1 h,提取温度低 10 ℃,EPA,DHA 提取率分别提高 16.61%,16.41%,而且溶剂用量少。超声强化超临界萃取过程,萃取系统的压力降低了 5 MPa、萃取温度和萃取时间分别由 45 ℃,210 min 降至 35 ℃,180 min,EPA 和 DHA 萃取率分别提高 15.09% 和 15.96%。UV 与 GC-MS 分析结果表明,实验条件下,超声场的加入没有改变 EPA,DHA 的结构。

5.3 ω -3PUFA 的分析分离法

ω -3PUFA 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。

6 展 望

通过大量研究表明,利用微藻生产 ω -3 多不饱和脂肪酸,其优势相当明显。针对目前的研究现状与存在问题,对微藻生产 ω -3PUFAs 的研究目标建议如下:(1)充分利用现代生物技术选育构建高产稳定的微藻菌种;(2)研究 PUFAs 的代谢调控方法和最佳培养条件优化;(3)开展发酵动力学研究与优化控制;(4)深入研究简单高效的 PUFA 提取纯化系统;(5)寻找可以利用的廉价底物等。

参考文献:

- [1] SIJTSMA L, SWEAF M E. Biotechnological production and applications of the omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64: 146-153
- [2] 王菊芳. 不饱和脂肪酸的研究[D]. 广州:华南理工大学, 2000
- [3] 吴彩娥. n-3 多不饱和脂肪酸富集纯化研究进展[J]. 中国油脂, 2005, 30(12): 45
- [4] 倪学文. 海洋微藻应用研究现状与展望[J]. 海洋渔业, 2005(3): 29-32
- [5] 徐芳, 蔡昭铃, 丛威, 等. 微藻培养生产多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 重庆工学院学报, 2005(1): 18-21
- [6] 张秋会, 马莺. 高产 EPA 和 DHA 藻株的筛选[J]. 西部粮油科技, 2003(6): 70-82
- [7] JAMES C O, HIROYUKI M, HIDEO T. Sequential heterotrophic/autotrophic cultivation-An efficient method of producing Chlorella biomass for health food and animal feed[J]. Journal of Applied Phycology, 1997, 9(4): 100-103
- [8] TAN C K, JOHNS M R. Screening of diatoms for heterotrophic eicosapentaenoic acid production[J]. J Appl Phycol, 1996(8): 59-64
- [9] 孙灵毅, 王力勇, 赵强. 3 种微藻兼养培养及营养成分的比较[J]. 大连水产学院学报, 2004, 19(2): 146-149
- [10] OGBONNA J C, MASUI H, TANAKA H. Sequential heterotrophic autotrophic cultivation-An efficient method of producing chlorella biomass for health food and animal feed[J]. J Appl Phycol, 1997(9): 359-366
- [11] 胡爱军, 陆海勤, 丘泰球. 海藻中 EPA, DHA 萃取技术的比较研究[J]. 海洋通报, 2005(4): 18-20