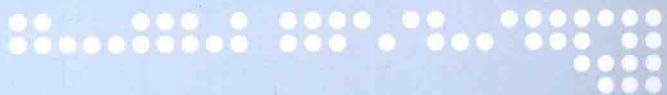


花生四烯酸新型 生产技术研究

HUASHENG SIXISUANXINXING
SHENGCHANJISHUYANJIU



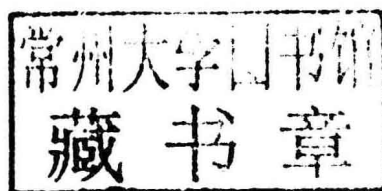
于长青 陈洪生 张丽媛 著



HEUP 哈尔滨工程大学出版社

花生四烯酸 新型生产技术研究

于长青 陈洪生 张丽媛 著



 哈尔滨工程大学出版社

内 容 简 介

随着人们生活水平的提高,安全、营养、保健已成为功能性食品开发的主题。花生四烯酸等多不饱和脂肪酸被誉为“21 世纪功能性食品的主角”,具有改善人类膳食结构和增强机体免疫力的功效。研究花生四烯酸的安全、高效生产技术已经成为当前功能性食品领域的研究热点。

本书主要介绍国内外花生四烯酸的研究现状、高产花生四烯酸菌种的选育、高产菌种的关键酶、高产菌种差异基因的筛选、生产工艺条件优化及高纯度花生四烯酸分离制备技术,内容全面、理论联系实际,具有很强的指导性和前瞻性。

本书适合作为食品相关专业及从业人员参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

花生四烯酸新型生产技术研究/于长青,陈洪生,
张丽媛著. —哈尔滨:哈尔滨工程大学出版社,2015.7
ISBN 978-7-5661-1084-8

I. ①花… II. ①于… ②陈… ③张… III. ①花生油
—不饱和脂肪酸—生产工艺—研究 IV. ①TQ225.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 159876 号

策划编辑 刘凯元

责任编辑 刘凯元

封面设计 恒润设计

出版发行 哈尔滨工程大学出版社

社 址 哈尔滨市南岗区东大直街 124 号

邮政编码 150001

发行电话 0451-82519328

传 真 0451-82519699

经 销 新华书店

印 刷 哈尔滨市石桥印务有限公司

开 本 787mm×1 092mm 1/16

印 张 13

字 数 330 千字

版 次 2015 年 7 月第 1 版

印 次 2015 年 7 月第 1 次印刷

定 价 28.00 元

<http://www.hrbeupress.com>

E-mail:heupress@hrbeu.edu.cn

前 言

花生四烯酸作为一种人体必需的多不饱和脂肪酸,对于维持人体正常的生理活动有着十分重要的作用,目前已经广泛应用于食品、医药及保健品、化妆品、饲料等领域。而且仅就婴幼儿配方奶粉这一行业来讲,花生四烯酸就已经处于供不应求的状态,由此可见花生四烯酸的市场前景十分乐观。目前最高效、最实用的花生四烯酸生产手段是采用微生物发酵的方法。但我国在花生四烯酸方面的研究起步较晚,能够大规模生产花生四烯酸的企业并不多,并存在菌体产率及花生四烯酸产量较低、问世产品较少等问题。本书以深黄被孢霉为出发菌种,采用培养条件优化、菌种的诱变选育、基因工程以及模拟移动床色谱分离等方法,研究了高产花生四烯酸的新途径。同时本书总结了国内外近期的研究成果,对相关领域的科研、生产单位从业人员和企业决策者具有重要的参考价值。

全书共分七章,由黑龙江八一农垦大学于长青、陈洪生和张丽媛合著而成,其中:第一章主要介绍了花生四烯酸的研究现状及进展,由陈洪生编写;为了获得更高产、高效的花生四烯酸菌株,第二章介绍了高产花生四烯酸菌种的诱变选育,由陈洪生编写;为了从分子水平认识高产花生四烯酸的产生酶,第三章介绍了高产菌种关键酶与花生四烯酸产量的关系,由于长青编写;第四章介绍了高产菌种差异基因的筛选及定量分析,由张丽媛编写;第五章介绍了利用玉米黄浆水生产花生四烯酸工艺条件优化,由于长青编写;为了使花生四烯酸的生产实现高效、连续化的分离,第六章介绍了高纯度花生四烯酸的制备技术,由张丽媛编写;第七章介绍了模拟移动床色谱分离制备花生四烯酸甲酯,由于长青编写。在试验研究及撰写过程中得到了姚笛、姜楠、张天然、王丹枫等教师和研究生的大力帮助,在这里一并表示感谢。

本书是以国家自然科学基金项目“深黄被孢霉高产花生四烯酸功能基因的筛选及分子机理研究”、中国博士后科学基金“ $\Delta 5$ -脱饱和酶调控花生四烯酸产量的机理研究”和黑龙江省教育厅重点攻关项目“利用玉米黄浆水深层发酵产业化生产高纯度花生四烯酸及其软胶囊”为依托,以花生四烯酸的生产研究为基础,重点介绍了高产花生四烯酸菌株的诱变选育及工业化高纯度花生四烯酸的制备技术等,总结了系列课题的研究成果。本书突出了系统性、科学性、先进性和实用性的特点,在参考了前人工作的基础上,重点反映了著者在花生四烯酸生产方面的研究工作和科学研究成果,具有很强的参考价值。

基于著者水平有限,在撰写过程中难免出现疏漏和不妥之处,敬请学术界同仁和读者在阅读本书过程中,能够提出宝贵意见。

著 者

2015 年 4 月于大庆

目 录

第1章 花生四烯酸研究现状及进展	1
1.1 花生四烯酸概述	1
1.2 花生四烯酸生产研究现状	10
参考文献	23
第2章 高产花生四烯酸菌种的诱变选育	29
2.1 材料与方法	31
2.2 实验结果	35
2.3 本章讨论	65
2.4 本章结论	66
参考文献	67
第3章 高产菌种关键酶与花生四烯酸产量的关系	70
3.1 $\Delta 5$ -脱饱和酶、 $\Delta 6$ -脱饱和酶基因的克隆及序列分析	75
3.2 脱饱和酶的活性及 mRNA 表达量与 ARA 产量的关系	83
3.3 本章结论	98
参考文献	99
第4章 高产菌种差异基因的筛选及定量分析	102
4.1 深黄被孢霉高产诱变菌株消减 cDNA 文库的构建	105
4.2 深黄被孢霉高产诱变菌株差异表达基因的筛选、鉴定及序列分析	117
4.3 深黄被孢霉高产花生四烯酸功能基因的定量研究	125
4.4 本章讨论	138
4.5 本章小结	139
参考文献	139
第5章 利用玉米黄浆水生产花生四烯酸工艺条件优化	143
5.1 利用玉米黄浆水发酵生产花生四烯酸培养基优化	144
5.2 利用玉米黄浆水生产花生四烯酸培养条件优化	153
参考文献	159
第6章 高纯度花生四烯酸制备技术	162
6.1 花生四烯酸提取技术的研究	165
6.2 柱色谱法分离纯化花生四烯酸甲酯	173
参考文献	182

第7章 模拟移动床色谱分离制备花生四烯酸甲酯.....	185
7.1 材料和设备	185
7.2 试验方法	186
7.3 试验结果与讨论	190
7.4 本章结论	200
参考文献.....	201

第 1 章 花生四烯酸研究现状及进展

油脂是构成和维持细胞生命的重要大分子物质,也是重要的工业原料。随着人们对组成油脂的不饱和脂肪酸生理功效的深入了解,寻求富含不饱和脂肪酸的新油源,就显得尤为重要和迫切。多价不饱和脂肪酸由于其独特的生物活性,引起了人们的极大兴趣。花生四烯酸(Arachidonic acid, ARA),系统名为 5,8,11,13-全顺-二十碳四烯酸,属于 ω -6 系列的一种多不饱和脂肪酸。它不仅作为一种极为重要的结构脂类广泛存在于哺乳动物的组织(特别是神经组织)器官中,而且还是许多二十碳衍生物如前列腺素 E_2 、前列环素、血栓烷 A_2 和白三烯等物质的前体,具有广泛的生物活性和重要的营养作用,如益智健脑,提高视敏度,影响婴幼儿生长发育,预防和治疗高血压、高血脂、糖尿病等疾病。人体一旦缺乏 ARA 就会引起机体生理功能失调,目前,ARA 已经在保健食品、化妆品、医药等领域得到广泛应用。

1.1 花生四烯酸概述

1.1.1 花生四烯酸的性质

ARA 分子式为 $C_{20}H_{32}O_2$, 化学式为 $CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_4CH_2CH_2COOH$, 结构式如图 1.1 所示。

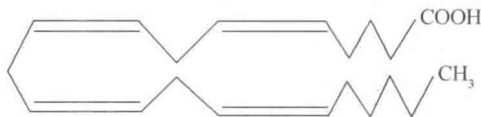


图 1.1 ARA 的分子结构式图

从图 1.1 中可见,ARA 含有 20 个碳原子,4 个双键,其中第一个双键起始于从甲基端起第 6 个碳原子上,属于 ω -6(或 n -6)系列的多不饱和脂肪酸(PUFAs),简记为 20:4(ω -6)。ARA 相对分子质量为 304.5,在室温下呈液体,熔点为 $-49.5\text{ }^{\circ}\text{C}$,沸点为 $245\text{ }^{\circ}\text{C}$,溶解于醇、醚和水中,碘值为 $333.50\text{ gI}/100\text{ g}$,紫外吸收峰为 257 nm , 268 nm , 315 nm ,折射率 1.482 4,中和值为 184.20。ARA 主要以磷脂的形式存在于机体各个组织的细胞膜上,浓度通常小于 10^{-6} mol/L ,决定着细胞膜的一些重要生物活性。

1.1.2 花生四烯酸的分布

在植物油中,绝大多数都不含有 ARA,这可能与植物不需要 ARA 的代谢产物(前列腺素)有关。仅有少数植物油如十字花科植物荒野独行菜油、北美独行菜油等中含有 ARA,另

外, Sohlek 等从苔藓和蕨类植物中检测到了 ARA, 但其含量极低。

ARA 广泛存在于动物的组织中, 如动物肝脏、猪肾上腺、血液、鱼油和蛋黄等。各种动物油脂, 如猪脂、牛脂、羊脂等都含有少量的 ARA。动物的内脏中 ARA 含量一般较高, 如猪肝的脂肪成分中, ARA 含量约为 11.2%, 猪心的脂肪成分中 ARA 含量可达 15.9%, 而在人的胎盘组织中, ARA 的含量更是高达 20% ~ 25%。早期实验用的 ARA 试剂一般都是从猪肝中提取, 鱼油中也含有少量的 ARA, 一般在 0.2% 左右, 在日本沙丁鱼油中也分析到它的存在。

在人体中, ARA 是含量最高、分布最广的一种 PUFA。尤其在人脑和神经组织中, ARA 含量一般占总 PUFA 的 40% ~ 50%, 在神经末梢甚至高达 70%, 肾上腺磷脂脂肪酸中含量约为 15%, 在正常人的血浆中 ARA 的含量也高达 400 mg/L, 而 DH- γ -亚麻酸为 100 mg/L, γ -亚麻酸仅为 25 mg/L。与其相应的是 ARA 的代谢产物 PGI_2 和 TXA_2 , 也是 PG 和 TX_2 中最主要的种类。仅从这个角度来说, ARA 必然对人体的健康具有极为重要的意义。

在母乳中, 天然存在着丰富的 ARA、 γ -亚麻酸和 DH- γ -亚麻酸。一般母乳脂质中 ARA 含量为 0.6% ~ 3%, DHA 含量为 0.3% ~ 1%。不同泌乳期母乳的多不饱和脂肪酸含量有所变化。ARA 和 DHA 在初乳前两天含量最高, 以后逐渐下降。足月母乳中的 ARA 从初乳时的 3.0% 下降至成熟时的 0.7%, DHA 从 0.7% 下降至 0.4%。 ω -6 与 ω -3 多不饱和脂肪酸的比例对婴幼儿的健康成长也是十分重要的。通常母乳中二者的比值在初乳前三天较大, 2 ~ 3 月以后稳定在 1.8% 左右。作为自然界生物长期进化的结果, 这种现象提示: ARA 对婴幼儿正常发育有重要意义。

1.1.3 花生四烯酸在生物体内的合成途径

ARA 及二十碳五烯酸 (Eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA) 都是人体所必需的多不饱和脂肪酸, 在体内不能合成, 必须由食物供给, 也可在相应的前体脂肪酸、亚油酸和 α -亚麻酸的基础上经过脱氢和碳链的延长作用转化而来。ARA 的合成代谢途径主要包括如下两个方面。

1. 微生物体内 ARA 的合成代谢途径

如图 1.2 所示, ARA 合成途径主要包括糖酵解途径、TCA 循环途径、丙酮酸/苹果酸循环途径、脂肪酸合成途径等。首先, 葡萄糖经糖酵解途径合成丙酮酸, 丙酮酸一部分进入线粒体中的三羧酸循环, 另一部分留在胞液中进入丙酮酸/苹果酸循环; 三羧酸循环过程中产生的柠檬酸穿过线粒体膜进入胞液中, 并在 ATP-柠檬酸裂解酶作用下形成乙酰-CoA; 在乙酰-CoA 羧化酶作用下, 合成丙二酰-CoA; 之后在一系列酶的催化作用下得到棕榈酰-CoA, 棕榈酰-CoA 与乙酰-CoA 相互作用后得到硬脂酰-CoA, 然后 Δ^9 -脱饱和酶作用于硬脂酰-CoA 得到不饱和的油酰-CoA, 在脂肪酸中引入第一个双键, 接着在一系列脂肪酸延长酶、脂肪酸脱饱和酶作用下得到 ARA (如图 1.2 和图 1.3 所示)。

在 ARA 合成的过程中, TCA 循环提供耗能代谢过程中所需的 ATP 及柠檬酸。柠檬酸则在 ATP-柠檬酸裂解酶的作用下, 分解成可供脂肪酸合成所需的乙酰-CoA。丙酮酸/苹果酸循环能够提供胞内脂肪酸合成所需的还原力 NADPH。降低该过程的苹果酸酶活性, 会显著降低 ARA 的积累量。所以, 丙酮酸/苹果酸循环被认为是最重要的 NADPH 供体。Zhang 等认为苹果酸酶是脂肪酸积累的限速酶, 丙酮酸/苹果酸循环是脂肪酸积累的限速步

骤,过量表达苹果酸酶后,卷枝毛霉中脂肪酸的积累量增加了2.5倍。

2. 哺乳动物及人体内 ARA 的合成代谢途径

在哺乳动物及人体内,由于缺乏引入双键的 $\Delta 9$ -脱饱和酶和 $\Delta 12$ -脱饱和酶,所以不能利用饱和脂肪酸为底物合成 PUFAs,只能通过从外界食物中获取的亚油酸代谢得到 ARA,具体途径如图 1.3 所示。

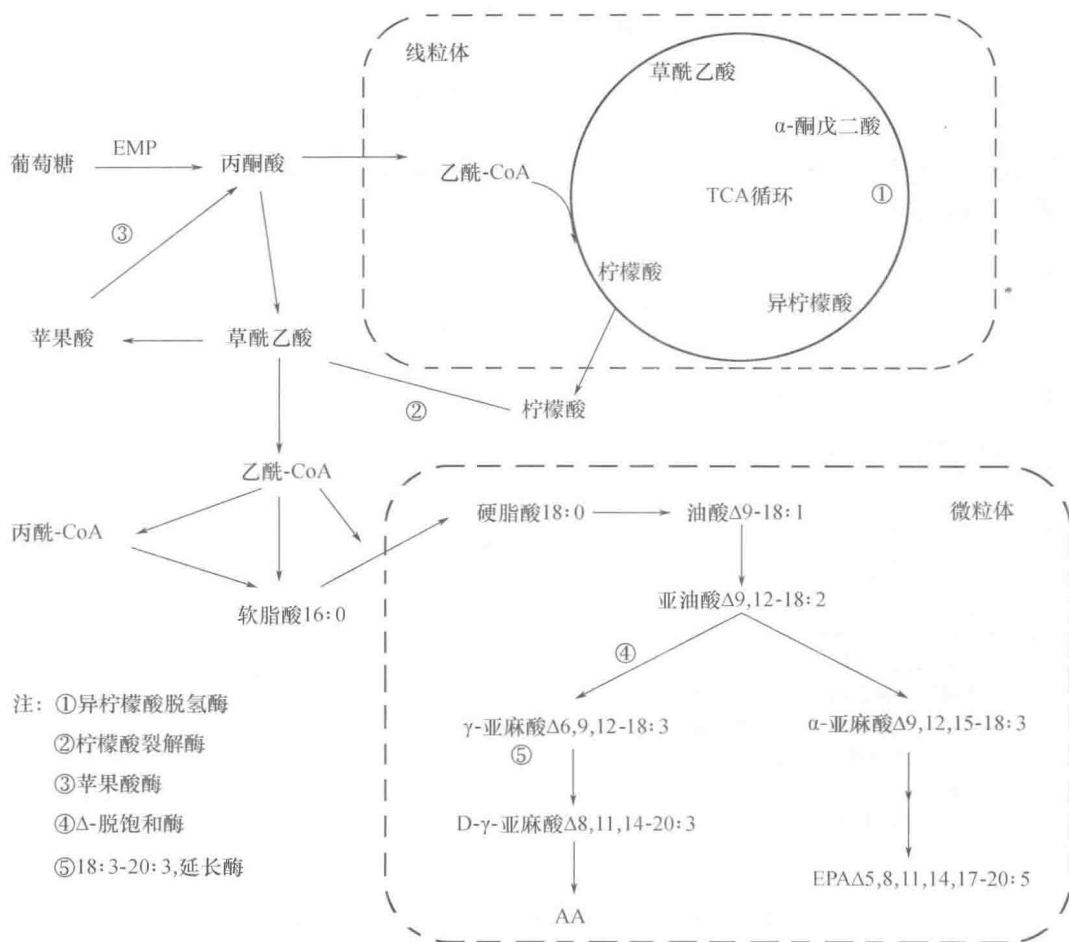


图 1.2 微生物体内 ARA 的合成代谢途径示意图

ARA 在细胞内的代谢主要是在代谢酶的作用下转化为其他产物(如图 1.4 所示)。

- ①环(加)氧化酶(Cyclooxygenase, COX)途径:该酶催化 ARA 生成前列腺素(Prostaglandins, PGs)和血栓素(Thromboxanes, TXs)。
- ②脂(加)氧化酶(Lipoxygenase, LPO)途径:该酶催化 ARA 生成羟基二十碳四烯酸(Hydroxyl-eicosatetraenoic acid, HETEs)、白三烯(Leukotrienes, LTs)和脂氧素(Lipoxins, LXs)。
- ③细胞色素 P-450 单氧化酶(Cytochrome P-450 monooxygenase)途径:该酶催化分解 ARA 生成环氧化二十碳四烯酸(Epoxyeicosatrienoic acids, EETs)和 HETEs 等。
- ④非脂质过氧化作用:自由基损伤细胞膜脂质,使 ARA 发生脂质过氧化作用,生成 8-异前列腺素 F₂ α (Iso-prostaglandin),此过程不经过环氧化酶催化。

由图 1.3 可知,在 ARA 合成过程中涉及的脱氢酶有 $\Delta 6$ -去饱和酶、 $\Delta 5$ -去饱和酶和

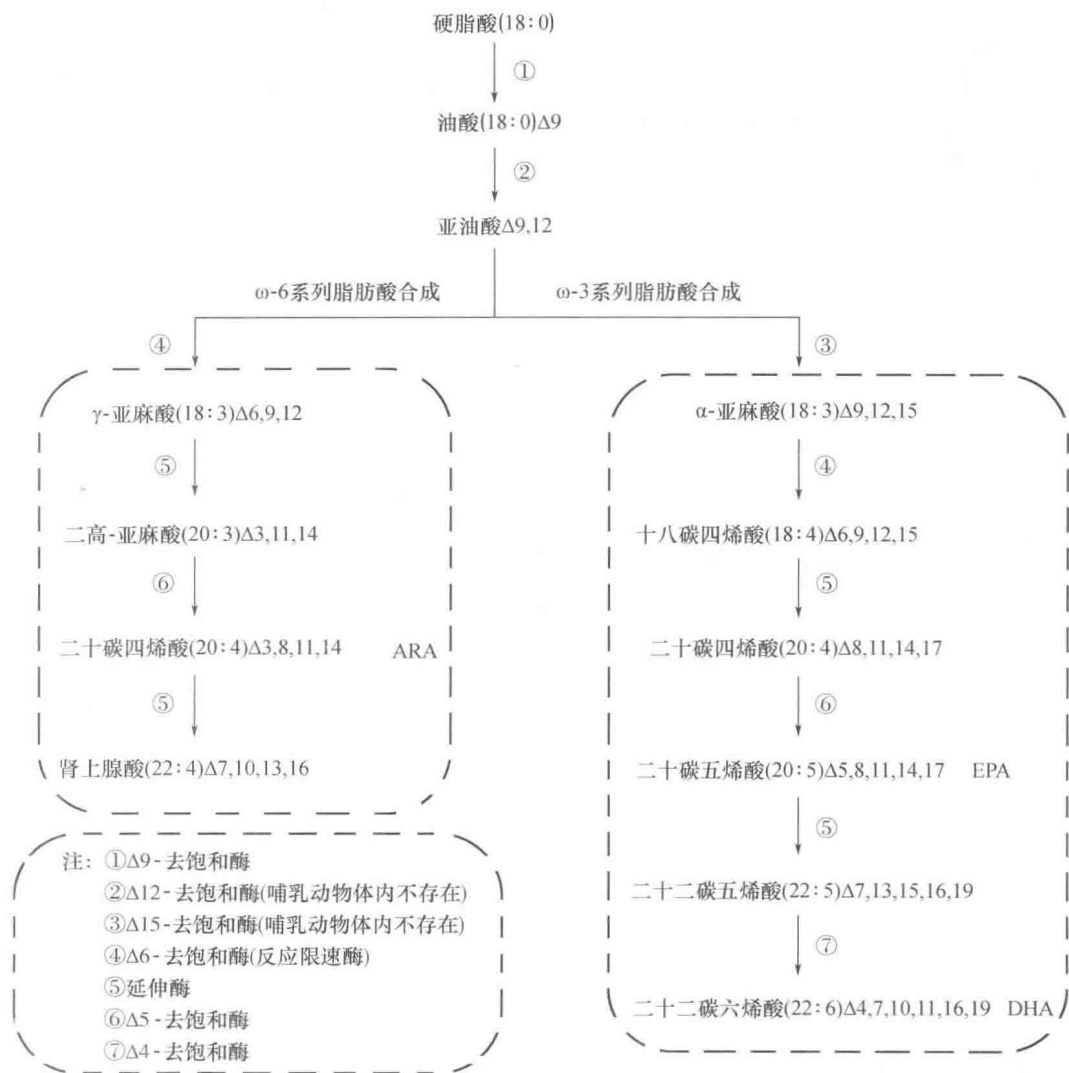


图 1.3 哺乳动物及人体内 ARA 的合成代谢途径

Δ₄-去饱和酶。其中 Δ₆-去饱和酶是反应的限速酶,该酶系可同时催化 ω-3 PUFAs 和 ω-6 PUFAs 分别在 6,5,4 碳原子位置形成双键,但酶对底物脂肪酸的亲合力不同,该酶系则对 ω-3 PUFAs 亲合力大于对 ω-6 PUFAs 的亲合力。因此,在 ARA 合成过程中,存在 ω-3 PUFAs 对酶的竞争性抑制。在正常情况下,人体从食物中摄取亚油酸在 Δ₆-脱饱和酶作用下转化为 γ-亚麻酸(18:3 ω-6),从而代谢为二高-γ-亚麻酸(20:3 ω-6),再转化成前列腺素 E₁(PGE₁),或经 Δ₅-脱饱和酶转化为 ARA。油酸(Oleic acid, LA)和 α-亚麻酸(Allcis-Octadecatrienoic acid, ALA)代谢的三条途径的详细分支尚不清楚,大部分研究者认为,当能量供应不足时,膳食中的 LA,ALA 优先进入氧化供能途径,以满足膳食能量的需要,而衍生为 ARA 和 DHA 的则相应减少,因此膳食中的 ARA 和 DHA 是更为直接可取的 PUFAs 的来源。关于脱氢酶 Δ₆-去饱和酶和 Δ₅-去饱和酶的研究进展将在第 3 章详细介绍。

1.1.4 花生四烯酸的保健功能

如图 1.4 所示,ARA 及其代谢衍生物具有很强的生物活性,它能益智健脑、酯化胆固醇、增加血管弹性、治疗糖尿病、抗炎症,并在许多疾病的病理生理过程中起着重要的作用。同时 ARA 是许多二十碳衍生物如前列腺素 E_2 、前列环素、血栓烷 A_2 和白三烯等物质的前体,也是人体前列腺素合成的重要前体物质,因此 ARA 具有广泛的生物活性和重要的营养作用。1999 年我国卫生部正式批准 ARA 为新型的营养强化剂,到 2001 年底,已有近百个国家批准了 ARA 可在婴幼儿食品中添加。

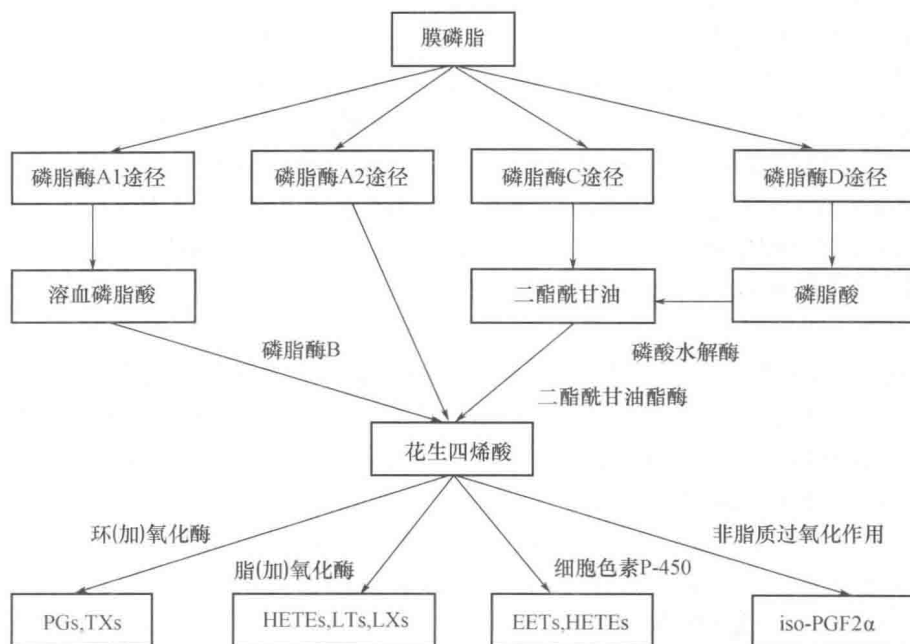


图 1.4 哺乳动物及人体内 ARA 的生理代谢途径图

1. 益智健脑,提高视敏度

ARA 和 DHA 是大脑中最丰富的两种 PUFAs,从妊娠期的第 26 周起至出生后两岁在婴儿前脑中持续增加。ARA 是胎儿和婴幼儿大脑发育的物质基础,是构成大脑皮质区磷脂质的主要长链多不饱和脂肪酸之一,对大脑发育起着关键作用。一些动物实验显示,在脑发育期,膳食中缺乏 ARA 和 DHA 会引起智力、认知功能、视觉功能的损伤。

2000 年 3 月发表的美国西南视网膜基金会 Birch 等对婴儿进行的人工喂养试验的研究结果则更加有力地证明了 ARA 和 DHA 对婴儿智力的促进作用和在婴儿配方食品中添加 ARA 和 DHA 的重要性和必要性。试验对参与的新生儿进行随机分组,采用不同的配方奶进行四个月的喂养试验,不同组配方奶的不同之处在于对照组不含 ARA 和 DHA,另两个试验组分别添加 0.35% 的 DHA 和 0.36% 的 DHA + 0.72% 的 ARA。在这些婴儿 18 月龄时进行智力测验,结果显示添加 DHA + ARA 组的婴儿平均智力水平比对照组高出 7 分,比 DHA 组高出 3 分。这一试验目前还在继续进行中,以考查这些受试婴儿的后续的发育情况。

2. 第二信使作用

ARA 及其代谢物具有第二信使作用,在神经传导过程中起着重要作用,如调整神经元的跨膜信号、神经元之间有效信号传递、神经递质的释放以及葡萄糖的摄取等。陈丁丁研究发现海绵的感觉神经元对神经活性肽四肽 FMRF 酰胺的抑制性应答,是以 ARA 脂氧合酶代谢物为第二信使介导的。这类新的第二信使既可在胞内也可在胞外传递信号。ARA 亦能促进或放大其他第二信使系统,如 cAMP 和 cGMP,并且细胞内形成的 ARA 及其代谢物还可以作为第一信使作用于产生它们的细胞或邻近细胞,通过另外的第二信使产生效应。

3. 影响婴幼儿生长发育

ARA 缺乏对于人体组织器官的发育,尤其是大脑和神经系统的发育会产生不良影响,并且还容易引起一些疾病。ARA 能促进婴儿的生长发育,尤其对早产儿更为重要。由于早产儿发育快,在胎儿期未能充分积累 DHA 和 ARA,出生后需要量大,且酶尚未发育健全,在体内合成 ARA 的能力较差,故易造成 ARA 和 DHA 的缺乏,所以早产儿的配方奶中应添加 DHA 和 ARA。但二者添加的比例要合适,因摄入 DHA 高时,组织中 ARA 的水平则下降,ARA 的减少不仅对膜功能有影响,而且对合成前列腺素和血栓素也有影响,从而影响婴儿许多器官的发育及细胞功能的完善;而当 ARA 的比值高时,又会抑制 DHA 的合成,所以 $\omega-6$ 和 $\omega-3$ 系脂肪酸的供给要平衡,ARA 和 DHA 的比值合理,对婴儿,尤其早产儿是非常重要的。

Sanders 等报道在印度素食妇女的乳汁、脐血磷脂以及脐动脉壁磷脂中的长链多不饱和脂肪酸(LCP)都低于杂食者,刚出生的婴儿往往体重较轻、身材较短、头围较小。Businco 等报道婴儿患特异性湿疹可能与母亲乳汁中的 LCP 较低有关。Stevans 等对 6~12 岁的多例儿童的行为、学习能力、健康状态进行对比研究,发现 ARA 缺乏的儿童,血浆磷脂 $\omega-3$ 或 $\omega-6$ 脂肪酸水平低,临床症状表现为口渴、尿频、皮肤干燥、易患感冒,常用抗生素,过度敏感,较难入睡和早起。教师评价这些儿童是:整体学习能力,特别是数学的分数明显较低。

4. 降血脂与对心血管的保健作用

ARA 具有促进生物体内脂肪代谢,降低血脂、血糖、血液黏度,降低 LDL-C、VLDL-C、脂化胆固醇,升高 HDL-C 和 apoA,提高血管弹性,调节血细胞等功能。有学者研究了花生四烯酸对高脂大鼠血脂及抗氧化指标的影响,发现 ARA 不仅能有效降低高脂大鼠的血脂,还可以降低血中丙二醛(MDA)含量($P < 0.01$),提高肝组织超氧化物歧化酶(SOD)含量和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。且 ARA 的降血脂、降血压和降血胆固醇的效果均强于亚油酸和亚麻酸,对氯化钡、乌头碱等引起的心律不齐具有不同程度的抵御作用。ARA 对血清甘油三酯的降脂作用,是目前报道的治疗高血脂疗效较佳和安全性最高的物质,对降低血清胆固醇效果也很好。研究表明 ARA 降低血胆固醇的效果比亚油酸和亚麻酸高 4 倍,其降血脂和降血压的作用也比亚油酸和亚麻酸强;ARA 对心律不齐具有对抗作用,其作用效果也强于亚油酸和亚麻酸。

ARA 对心脑血管疾病的预防具有重要的作用,代谢物 PG-II 可以直接降低血管张力,对高血压病人的收缩压和舒张压有明显的降压作用。ARA 及其代谢产物能引起血管舒张,某些血管含有 LPO,ARA 需经 LPO 代谢后发挥作用,离体和整体实验都发现 5,6-环氧化物具有扩张血管作用。

丁国良等用膜片钳全细胞记录技术记录应用花生四烯酸前后人心房肌细胞钠电流的方法,发现 ARA 对冠心病患者心房肌细胞钠电流具有抑制和延长复活时间作用,从而达到

抗心律失常作用。1998年中科院等离子体物理研究所与北京农业大学合作,用ARA油脂进行动物实验,对血浆分析的结果表明,ARA能降低血糖、血脂和血胆固醇,同时降低LDL-C和VLDL-C,升高HDL-C。LDL-C水平升高是冠心病发病的一个重要指标,降低LDL-C是膳食干预降低冠心病发生发展的首选指标。HDL-C作为对心脑血管疾病的一个重要保护因子,升高HDL-C能有效预防动脉粥样硬化。VLDL-C能造成对血管内皮细胞的损伤,降低VLDL-C能降低对血管内皮细胞的损伤程度,增加血管弹性。

5. 预防与治疗糖尿病

金开山等探讨了ARA对链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠的糖化血清蛋白、丙二醛和总抗氧化能力的影响,发现ARA能降低糖尿病大鼠糖化血清蛋白、丙二醛,提高糖尿病大鼠的抗氧化能力。另外ARA可以调节胰岛素活性,改善胰岛素抵抗。血液中升高的游离脂肪酸与胰岛素抵抗的发生和乙型糖尿病的发病有密切关系。Wu等分别检测了正常喂养的小鼠、高脂肪食物喂养的小鼠以及添加了ARA的高脂食物喂养的小鼠的胰岛素感性情况,发现ARA对改善因血液中升高的脂肪酸引起的胰岛素抵抗有显著性的效果,从而避免了由此引起的肝糖输出升高与体内代谢紊乱。近年又发现了ARA的一些新的代谢产物——前列腺素物质,如8-表氧-PGF_{2a}, DH-TXB₂, TXB₂,其生理、病理与药理意义已被逐渐认识。8-表氧-PGF_{2a}可作为一个衡量脂质过氧化反应的特有的可靠指标,而DH-TXB₂能准确地反映体内血小板活化。专家推测这些物质可能会造成糖尿病微血管内皮细胞化学和机械损伤,使内皮素等促血管收缩物质增加,从而导致糖尿病血管病变。

6. 免疫调节

在人体免疫细胞的磷脂中,ARA的含量高达15%~25%,ARA在T淋巴细胞、B淋巴细胞与单核细胞中的含量比为70:20:10。

ARA的代谢产物PG对免疫性细胞能产生不同作用,即双向功能,主要表现为:对MΦ吞噬作用的促进与抑制;巨噬细胞抗肿瘤作用的抑制与恢复;对抗体产生的抑制与促进作用;对Tc细胞活性的抑制与增加;对NK细胞活性的抑制与增加。PG_s对血红素造血干细胞增殖分化也有明显的促进作用。ARA的代谢产物LPO对免疫细胞和免疫反应有抑制作用,外源性的HPETE_s有直接损伤细胞的作用,而且在体内还可抑制淋巴因子产生LTB₄, LTD₄和LTE₄,在浓度非常低时,就可抑制免疫功能,抑制淋巴细胞对有丝分裂刺激的反应及抗体产生。LTB₄可诱导抑制性T细胞和NK细胞活性增强。因此,ARA可以调节人体的免疫力。

7. 抑制血小板凝集

研究表明,血小板中CO的活性很高,当血小板受胶原、血栓素等激活时,能释放ADP和5-HT,增加TXs合成,从而引起聚集作用。而LPO代谢物则能抑制血小板CO活性,减少TXs产生,从而抑制血小板聚集,这样LPO代谢物可能与其他抗血小板聚集因子如PGD₂和PGI₂有协同作用,而与促血小板聚集因子达成平衡。

TXA₂是血小板中ARA的一种主要代谢产物,具有促进血小板聚集和诱发血栓形成的作用。TXA₂能促使致密管系统中Ca²⁺的游离,引起致密体收缩,并释放出ADP和5-HT,使附近的血小板发生聚集。PGI₂是血管壁中ARA代谢的主要产物,是一种对血小板聚集最有效的内源性抑制剂。在正常的生理状态下,循环血中TXA₂和PGI₂的水平处于相对平衡状态,这是维持血液循环畅通的重要因素之一。TXA₁-PGI₂失衡可导致血栓形成和组织缺血等一系列生理机能的改变。血栓形成时,通常TXA₂产生增加或PGI₂产生减少。尽管

TXA₁-PGI₂ 失衡只能部分解释血栓栓塞倾向,但 TXA₁-PGI₂ 这对相互作用的因子为有关的药理学研究提供了重要的指标。

8. 抗炎症

炎症肿胀是各种炎症介质产生的血管扩张和血浆渗出相互作用的结果。ARA 的代谢物 PGE₂, PGI₂ 和 LTs 是一类重要炎症介质,它们引起的血浆渗出和白细胞趋化正是炎症的两个重要特征。LTA₄ 为不稳定的环氧化物,可被转变为其他 LT,LT 为致炎症介质,其中 LTB₄ 是重要的血细胞活化物质,使血细胞趋化、聚集、黏附于血管内皮细胞,脱颗粒,释放氧自由基及溶酶体酶,还可增加血管通透性,刺激支气管黏液分泌。LTC₄ 及 LTD₄ 可收缩小动脉、支气管及胃肠道平滑肌,收缩肾小球毛细血管及系膜细胞,增加血管壁通透性。而 LTB₄ 无收缩血管及系膜细胞的作用。除此之外,ARA 还具有很多其他重要的保健功能,如降低血液黏度,调节血细胞功能,保护皮肤等。ARA 还可以辅助抑制肿瘤,预防癌变,调节神经功能,治疗糖尿病和病毒感染等疾病。因此,对 PGEs、LTs 前体物环氧化酶及 5-脂氧醇同时具有抑制作用的新型非甾体抗炎药的研究,是近年来开发非甾体抗炎药的新方向。

9. 营养与保护皮肤

ARA 在许多皮肤病的病理生理过程中起重要作用。如在银屑病、荨麻疹、痤疮、异位性皮炎及接触性皮炎病中,ARA 及其衍生物(尤其是 LTs)都发挥着重要的作用。Land 等对海洋鱼研究发现缺乏 ARA 的海洋鱼,色素不能沉着,导致了白化病,并且生长速度缓慢,不能完成整个回游活动。由此可以推断,干预 ARA 代谢的物质对皮肤病具有极大的治疗潜能。ARA 对人体皮肤的影响有待进一步研究。

此外,ARA 还能预防癌变,PGs 具有抗癌活性。在日本,癌症研究的一个分支就是以 PGD₂(PGJ₂)的抗癌效果为基础,寻求 PGs 系列的抗癌剂。ARA 还参与形成视网膜的感光体,对视力发育非常重要,并且在肥胖症、病毒感染等方面也有独特的活性。

1.1.5 花生四烯酸的应用

许多研究报告指出,多不饱和脂肪酸有益于人体健康,尤其对心血管疾病的预防和治疗有效果。ARA 作为一种多不饱和脂肪酸,目前主要应用于化妆品、医药、食品等领域。

1. 富含 ARA 的婴幼儿营养食品

出生前后是脑发育的关键时期,DHA 和 ARA 缺乏会对迅速发育的中枢神经系统造成损害。关于早产儿群体的许多研究显示,不含 LCP 的传统配方奶中虽然含有丰富的必需脂肪酸(亚油酸和亚麻酸),但经此喂养的早产儿血浆和红细胞中的 DHA 和 ARA 仍不能维持与母乳喂养儿相当的水平。此外,早产儿体内脂肪储存量少,热量供应不足,加上寒冷、感染等其他因素,为了维持能量的需要,体内 DHA 和 ARA 的前体 α -亚麻酸和亚麻酸易被氧化后用于供能,从而降低了衍生为 LCP 的量;而且,早产儿生长发育快,出生后对于胎期未充分积累的 DHA 和 ARA 的需要量更大。作为人乳汁的天然成分,ARA 对婴儿的神经及其生理的发育必不可少。鉴于 ARA 在人体特别是婴幼儿、青少年生长发育中的作用,世界卫生组织和国际粮农组织委员会(FAO/WHO)针对人类对 ARA 的摄入量不足,于 1995 年在《关于脂肪、油脂与人类营养的报告》中推荐,婴儿配方奶粉应该含有每千克婴儿体重 40 mg 的 DHA 和 60 mg 的 ARA。

只有当 ARA 与 DHA 比例合理时才最有利于婴幼儿生长发育,但目前婴幼儿配方食品中多数只补充了 DHA 而不含 ARA,这主要是由于 ARA 在动植物体内含量极少,资源匮乏,

导致其价格一直居高不下,阻碍了它的应用。ARA 作为营养强化剂添加到婴幼儿奶粉中,可为婴幼儿的身体发育尤其是智力、视力的发育提供必需的营养物质,这已经成为婴幼儿配方食品发展的必然趋势。1997 年 1 月,Novartis 营养制品有限公司在西班牙就率先推出了第一个添加 ARA 的用于早产儿、低出生体重婴儿的配方奶粉。2000 年,美国惠氏公司在中国市场上推出了添加 ARA 的新型婴幼儿奶粉,这一产品的诞生为我国的国产婴幼儿奶粉企业指明了发展方向。2001 年 3 月,青岛圣元乳品有限公司推出了添加 ARA 的优博(SUPER2001)系列奶粉,包括新生儿、较大婴儿以及幼儿配方奶粉。现在我国的知名品牌乳业如光明乳业、青岛圣元、深圳海王、伊利等公司都在生产富含 ARA 的婴幼儿配方奶粉。

2. 富含 ARA 的液态奶

近几年来,我国乳品生产以前所未有的速度高速发展,其中液态奶的发展最迅速。但在现有的液体奶的生产结构中,产品仍以巴氏杀菌奶和超高温灭菌奶为主,营养强化奶的品种所占的比例很低,且品种单一,只有高钙、高锌、高铁等。随着人们生活水平的提高和营养知识的普及,针对不同特殊人群如儿童、中老年、孕产妇、糖尿病患者、高血压病人等的营养奶将快速发展。早在 2000 年 12 月,武汉友芝友保健乳品有限公司就推出了 ARA 配方鲜奶。由于新型营养强化剂的生产应用还不发达,生产成本较高,导致价格较贵,随着生产能力的提高和人们营养知识的普及,富含 ARA 的液体乳制品将有更快的发展和更大的发展空间。

3. ARA 在其他保健食品中的应用

在功能性食品方面,ARA 和其他多不饱和脂肪酸被誉为“21 世纪功能性食品的主角”,可改善人类的膳食结构,增强机体的免疫力。近几年来,国际上对 ARA 保健食品的开发十分重视,尤其是日本,其富含 ARA 的系列保健食品的应用在世界上居领先地位。目前添加有 ARA 的产品除富含 ARA 的婴儿奶粉和液态奶外,国外还有添加了 ARA 的鱼类罐头、乳酸饮料及清凉饮料、鱼肉香肠、火腿肠、汉堡包、饼干、糖果、即食酱菜、豆腐、蛋黄酱、面包、糖果、香口胶及 ARA 鸡蛋等 ARA 强化食品。

4. ARA 在化妆品中的应用

ARA 除了在保健食品中具有广泛的应用,在化妆品中也有广泛的应用。在国外,ARA 及其他多不饱和脂肪酸可作为化妆品的天然原料,具有保护皮肤湿润、延缓皮肤老化以及治疗慢性湿疹,促进血液循环等作用。ARA 在功能上与 γ -亚麻酸相似,但 ARA 的护肤效果比 γ -亚麻酸更好,ARA 可以取代或部分取代 γ -亚麻酸生产高档护肤化妆品。ARA 还具有营养毛囊、促进毛发再生的功能,因此还可以用于开发护发产品,可预防和治疗脱发。日本资生堂在这方面做了大量研究工作,将微生物发酵生产的 PUFA 添加到化妆品中,制成化妆油、润肤乳液、嫩肤霜等护肤用品以及发油、护发素、发膏等护发用品。ARA 广泛用作脸部、身体、手部皮肤保护剂、皮肤水分保护剂、睡前皮肤保护剂、防皱剂等。据 FDA 1992 年报道,有 29 种化妆品中含有 ARA 成分。如 Nioxin 生物营养洗发精、护发素、护发辅助剂(Nioxin bionutrient cleanser, Treatment, Booster), D-care 的 Dandruff 香波, KMS 的 COLOR VITALITY blonde 香波,以及 Labelle 的维生素 F 护肤霜(Vitamin F Creme)等,都添加了一定数量的 ARA。

5. ARA 在生物制药中的应用

许多疾病与缺乏 ARA 有关,例如消瘦、皮肤病、肝病、精神分裂症、苯丙酮尿酸症、慢性记忆障碍等。早在 1971 年,ARA 就与其他脂肪酸一起用于治疗婴儿湿疹和皮炎。ARA 通

常与亚油酸和亚麻酸一起用于预防和治疗动物的湿疹和皮炎,特别是狗、猫和猪。丹麦科学家 Bang, Dyerberh 和 Hjerne 在流行病学的研究中发现,生活在格陵兰的爱斯基摩人的饮食中含有大量的鱼以及鲸鱼和海豹的脂肪,他们患心血管病而导致死亡的可能性比那些已移民到丹麦,已改为摄入很欧洲化饮食的爱斯基摩人患同样病的死亡率低 8 倍。ARA 及其他多不饱和脂肪酸作为具有生理作用的药物已经广泛受到国内外临床的重视,目前主要作为治疗心血管病的药物,制成含多不饱和脂肪酸的软胶囊。心血管疾病是危害人类健康的主要杀手之一,我国每 10 万人中就有 103 人死于心血管疾病,大大超过了死于癌症的人数。

对于婴幼儿和老年人以及某些代谢紊乱的成年人来说,其体内的 $\Delta 6$ -脱饱和酶往往活性较低或受到抑制,从而造成体内前列腺素的缺乏,导致多种疾病的产生,这些人需要补充 ARA。目前,ARA 及其他多不饱和脂肪酸作为具有生理作用的药物已经受到国内外临床的重视,主要作为治疗心血管病的药物。氟化 ARA 衍生物是 5-脂肪氧合酶抑制剂,它作为抗变态反应和抗炎剂具有有效的药用活性,对于治疗如哮喘、过敏、变态反应、类风湿关节炎和牛皮癣等疾病都有疗效。

此外,ARA 还对肿瘤具有一定的防治作用,它虽不能破坏肿瘤细胞,但能保护正常细胞,对抗常规抗癌疗法的毒副作用,而且,ARA 对艾氏腹水癌和淋巴肉瘤也具有抑制作用。ARA 是前列腺素等多种生物活性物质的直接前体,如果能得到高纯度的 ARA(90% 以上),就可以利用现代酶工程技术,经过化学改造和生物合成实现前列腺素等物质的合成。而前列腺素作为目前已知最强的生物活性物质(浓度低至 1 ng/mL 时,仍能引起动物平滑肌收缩),在医学领域中运用相当广泛,对治疗高血压、阻止受孕、人工流产、缓解支气管哮喘、鼻充血以及消化系统溃疡等疾病疗效十分显著。

6. 富含 ARA 的鱼类饲料

在过去 20 年里,国内外广泛研究了鱼类必需脂肪酸的需求。一般认为,鱼类对 ARA 的需求缓慢,可以由饲料(鱼肉和鱼油)中所含的 ARA 满足,然而在鱼类生活周期的某个特殊阶段,可能需要高水平的 ARA 来适应环境。ARA 有利于鱼类生长、存活及抵抗压力;促进鱼类繁殖,提高卵子、精子和幼苗的质量,调节鱼类的免疫功能。因此,富含 ARA 的鱼类饲料具有广阔的市场前景。

1.2 花生四烯酸生产研究现状

花生四烯酸的传统来源是动物肝脏、猪肾上腺、血液、鱼油和蛋黄等,但动物组织中的 ARA 含量很低,约为 0.2%,并且受来源和季节的限制,因此这种方法制备的 ARA 价格昂贵,不能满足市场的需要。植物来源有十字花科植物荒野独行菜、北美独行菜等。研究人员发现低等真菌,特别是被孢霉属真菌含有大量的 ARA,因此,利用微生物发酵法生产 ARA 是制备 ARA 的新途径。

1.2.1 微生物发酵生产花生四烯酸的研究进展

大量研究表明,微生物发酵得到的含 ARA 的油脂无毒性,无致突变性。生产 ARA 的微生物被孢霉本身不产毒素,无内毒素,无发育和致突变毒性,体外分析也无致突变毒性。微生物发酵法制备 ARA 与传统制备方法相比较,具有很大的优势:

- (1) 生产周期短,繁殖力强;
- (2) 不受气候、场地、季节、资源的影响;
- (3) 可以利用的菌种种类多,而且产量提高空间大;
- (4) 油脂成分更接近母乳。

利用微生物制取 ARA 既可以降低成本,又可以提高 ARA 的产量,弥补动、植物资源的不足,有利于 ARA 大量地被生产和应用,使生产厂家与消费者均可受益。而且,通过微生物的发酵还可以把农副产品及食品工业产生的废弃物加以利用,同时保护了环境,所以发酵法生产 ARA 是一种极具潜力的途径。制取 ARA 的主要的微生物来源有细菌、酵母、藻类和霉菌。细菌是最简单、最小的微生物细胞,以前认为细菌不可能合成多不饱和脂肪酸,但 1986 年研究人员首次从海洋鱼的肠道中分离出产多不饱和脂肪酸的细菌。酵母在脂肪酸的分布模式上相当单纯,绝大多数酵母仅有 C16 和 C18 脂肪酸,多不饱和脂肪酸在酵母中也存在。脂肪酸在油酸中含量一般较丰富,但在亚油酸中含量很少,因此在选择酵母生产脂肪酸时须认真考虑。藻类中的脂肪酸种类非常丰富,微藻中油脂含量有些超过 70%,但在无菌、光照发酵罐中培养海藻成本较高,只有少数微藻可在室外开放环境下商业化生产。霉菌能生产高比例的不饱和脂肪酸,油脂含量超过 25% 的霉菌约有 64 种。很多霉菌油脂含量在 20% ~ 25%,开发潜力很大。

1. 能够产生花生四烯酸的霉菌

能够产生 ARA 的霉菌一般在低等真菌中存在。国内外资料显示,微生物发酵法生产 ARA 最早是在 1979 年, Iizuka 等人发现(青霉菌) *Penicillium cyaneu* 菌体内富含 ARA。在国外研究的菌株有深黄被孢霉(*Mortierella isabellina*)、葡酒色拉曼被孢霉(*M. vinacea*)、拉曼被孢霉(*M. ramanniana*)、矮被孢霉(*M. nana*)、高山被孢霉(*M. alpina*)等,以深黄被孢霉及其突变株研究最多。国内研究的菌株有深黄被孢霉(*Mortierella isabellina*)、高山被孢霉(*M. alpina*)、轮枝霉(*Diasporangium sp.*)等,以高山被孢霉及其突变株研究最多。

2. 发酵法生产花生四烯酸的工艺流程

从 20 世纪 70 年代开始,国外就开始用发酵法生产 ARA。现在英国、加拿大、美国和日本已有 ARA 的发酵商品投放市场。微生物发酵法生产 ARA 的主要过程为:菌种培养→一级发酵→二级发酵→主发酵→菌体过滤→菌体洗涤→菌体干燥→菌体提取→精炼→ARA 油脂。

3. 发酵法生产花生四烯酸的经济效益分析

国内市场上从动物肝脏、猪肾上腺等脏器中提取的保健油产品的市场价格为 83.3 元/100 克净油脂,深海鱼油类的保健油市场价格为 35 元/100 克。而微生物发酵法生产的低浓度 ARA (浓度为 10%) 市场价格为 50 元/100 克,40% 浓度的 ARA 市场价格为 80 元/100 克,90% 纯度的试剂级 ARA 市场价格为 30 元/毫克。以 40% 浓度的 ARA 为例,仅考虑到本产品的成本构成情况,我们认为产品在市场销售定价定在普通色拉油价格(10 元/千克)5 ~ 20 倍的范围内是合理的(在经济效益中取其下限值)。以发酵 ARA 产量在 400 mg/L,提取率 50%,按试剂级售价(30 元/毫克),可以获得 0.6 万元/升的销售额;如果以 70 L 发酵罐进行生产,以装液 50 L 计算,则每罐可以获得 30 万元的售价;如果每 10 d 为一个生产周期,则每月可以获得 90 万元的售价,年销售额可以达到 1 000 万元,利润可以达到 500 万元。即使以获得含有 40% ARA 的油作为终产品,以目前工业生产 10 吨罐为生产罐,每罐 7 t 装液量,每罐发酵产品仍然有 2 万元的售价(以油产量 4 kg/t,油售价 800 元/千克),一个大罐每