

26  
海洋微生物 DHA 研究概况

温少红

(烟台大学 海洋生化工程研究所, 山东 烟台 264005)

**摘要:**利用海洋微生物生产 DHA 是近年来海洋活性物质开发的一个热点。本文综述了高产 DHA 的海洋微生物的分布、DHA 的合成机理以及影响因素、工业化生产所面临的问题及解决途径。

**关键词:**海洋微生物; DHA; 大规模生产

**中图分类号:**R931.77 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-3461(2002)01-0049-04

## The study survey of DHA in marine microorganism

WEN Shao-hong

*(Institute of Marine Biochemical Engineering, Yantai University, Yantai 264635, China)*

**Abstract:** The research of DHA production by marine microorganism culture is active in marine bioactive substances exploitation. The marine microorganism species rich of DHA, the mechanism and influencing factors of DHA synthesizing, the questions and solving method of large scale production are reviewed in this article.

**Key words:** marine microorganism; DHA; large scale production

以 DHA 和 EPA 为代表的高不饱和脂肪酸(PUFA)在人和动物的生理活动中起着重要的作用。研究表明, PUFA 是人类及动物生长发育所必需的物质, 具有抗血栓、降血脂、防止血小板聚结、舒张血管等功能<sup>[1]</sup>, 用于预防和治疗癌症、炎症、风湿性关节炎、肾炎、糖尿病等疾病<sup>[2-4]</sup>, DHA 还能促进脑细胞的生长发育, 改善大脑机能, 用于中枢神经疾病的预防和治疗<sup>[5]</sup>。人及其它高等生物自身不能合成 DHA, 而海洋微藻、海洋真菌等低等生物则具有合成 DHA 的能力, 它们是 DHA 的原始生产者, 并且在某些种类海洋微生物中含量丰富, 鱼类等海洋动物体内的 PUFA 即是依靠食物链通过吞食藻类及浮游生物才得以积累的。传统的 DHA 是从鱼油中获得, 随着渔业资源的日渐紧缺以及从鱼油中分离 DHA 成本高、具有鱼腥味、产品来源不稳定等缺点, 以生物工程手段培养海洋微生物, 从中获取 DHA, 满足人类日益增长的需求, 已成为世界各国竞相研究的热点。

### 1 富含 DHA 的海洋微生物

较之其它高不饱和脂肪酸如 EPA、AA 来说, 能够产生 DHA 的微生物种类要少得多, 而 DHA 含量丰富的微生物种类就更少, 多集中于海水金藻、甲藻、隐藻、硅藻以及海洋真菌中的破囊壶菌和裂殖壶菌中。表 1 列出了 DHA 含量丰富的一些海洋微生物<sup>[6-13]</sup>。

### 2 DHA 合成影响因素

DHA 的合成除了受基因组的精细控制以外, 环境因素如温度、光照、培养基组成甚至培养方式(微藻的自养、异养和混合培养)、培养液的 pH 值、搅拌等也在一定程度上影响着细胞的生长、脂类含量以及脂肪酸组成。并且这种影响还会因微生物种属甚至品系的不同而有较大差异, 不能一概而论。应当指出的是, 在研究这些影响因素时, 不仅要考虑其对脂类物质中 DHA 含量的影响, 同时也要

考虑对细胞脂类含量以及最终生物量的影响,从获得高产量 DHA 及产率的角度出发,综合考虑各种影响因素,优化培养条件。

### 2.1 温度

温度对海洋微生物的生长以及脂肪酸组成都有着显著影响。每种微生物都有其生长的最适温度,并且温度也影响着细胞的生化

组成。研究表明,对于绝大多数海洋微生物而言,温度降低,细胞内的脂类物质中高不饱和脂肪酸的含量增加。当培养温度由 36℃ 降至 15℃ 时,海洋真菌 *Thraustochytrium aureum* 脂类物质中 DHA 含量由 22% 上升到 58%,增加了两倍多<sup>[14]</sup>;

表 1 富含 DHA 的海洋微生物

	微生物名称	EPA(占总脂肪酸的%)	DHA(占总脂肪酸的%)
金藻类	<i>Isochrysis galbana</i> (Tahitian)	0.2~12.8	3.7~19.4
	<i>Isochrysis</i> sp.	0.2~4.1	5.3~10.3
	<i>Isochrysis</i> sp. (Tahitian)	0.5~0.8	6.8~10.2
	<i>Pavlova lutheri</i>	16.2~28.3	3.6~15.5
	<i>Pavlova lutheri</i> (CS-182)	20.4~22.4	9.7~10.7
	<i>Pavlova salina</i> (CS-49)	25.4~28.2	10.2~11.0
甲藻类	<i>Amphidinium</i> sp.	8.0	17.4
	<i>Gymnodinium</i> sp.	13.3~13.7	31.9~32.3
硅藻类	<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	7.7~20.3	1.1~12.6
	<i>Thraustochytrium aureum</i>	6	34
海洋真菌	<i>T. roseum</i>	6	11
	<i>Schizochytrium aggregatum</i>	4	11
	<i>E. obscura</i>	0	24

另一种海洋真菌 *Thraustochytrium* sp. 脂类物质中不饱和脂肪酸随温度的变化更为明显,当温度由 35℃ 降至 15℃ 时,脂质中 DHA 含量由 18% 增加到 64%,是高温下的 3.6 倍<sup>[15]</sup>;温度为 10~25℃ 时,海洋硅藻 *Nitzschia paleacea* 的 DHA 含量由 1.2% 下降至 0.6%<sup>[10]</sup>;海洋金藻 *Isochrysis* sp.<sup>[16]</sup> 的 DHA 含量也随温度的升高而下降,15℃ 时含量最高,为 1.4%。也发现有的藻类的脂类含量及脂肪酸组成随温度的变化不大。通过对高不饱和脂肪酸合成机理的研究,认为海洋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。这是海洋微生物长期适应极端的海洋环境的结果。

### 2.2 光照

光照是影响 DHA 合成的又一重要因

素。自养生长的微藻依靠光合作用合成细胞组成物质,同时获得细胞代谢活动所需能量,因此光照是影响自养型微藻生长的重要因素,光照同时影响着脂类物质中不饱和脂肪酸的水平。在金藻 *Pavlova lutheri* 的培养过程中,光强由  $6\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  上升至  $225\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  时,细胞脂质 DHA 含量由 3.6% 上升至 9.7%<sup>[9]</sup>。富含 DHA 的海洋破囊壶菌和裂殖壶菌都含有色素并具有光刺激生长特性。破囊壶菌 *Thraustochytrium aureum* 在荧光灯光照下的菌体量、总脂量及 DHA 产量均比黑暗培养要高<sup>[17]</sup>。光照培养的 *Thraustochytrium* sp. 比黑暗条件下细胞生长速度快、菌体量显著提高,但脂质中 DHA 含量无明显变化<sup>[18]</sup>。

### 2.3 培养基组成

培养基中 C 源、N 源、P 源物质的种类及

浓度、C/N 比、N/P 比的大小、无机盐及微量元素添加与否均影响着 DHA 的含量及产量。

微藻培养常用的无机 C 源多为  $\text{NaHCO}_3$  和  $\text{CO}_2$ , 有机 C 源则多为葡萄糖、果糖、蔗糖、酵母浸膏等, 异养培养的微藻最容易利用的是小分子单糖类, 葡萄糖是许多异养微藻的最佳 C 源和能源物质。葡萄糖也是破囊壶菌和裂殖壶菌发酵培养的良好 C 源, *Thraustochytrium* sp. 在以葡萄糖为 C 源时 DHA 产量要明显高于以亚麻籽油为 C 源<sup>[15]</sup>。

$\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和尿素是培养微藻常用的 N 源物质, 它们对微藻脂类合成及 DHA 含量的影响因藻种而异。破囊壶菌和裂殖壶菌发酵培养的 N 源物质为玉米浆、 $\text{NH}_4\text{SO}_4$ 、酵母浸膏等, 在培养基中适当添加谷氨酸钠、精氨酸盐等物质会对菌体的生长、脂类合成及 DHA 产量有一定的促进作用。

#### 2.4 培养时间

不同生长时期的微生物有不同的生化组成。*Phaeodactylum tricornutum* 在对数生长期、静止期早期、静止期末期的脂质 DHA 含量分别是 0.61%、1.1% 和 0.4%, 静止期早期的 DHA 含量较多。*Isochrysis galbana* 的 DHA 含量在静止期晚期达到最大, *Phodomonas* sp. 的 DHA 含量则在对数生长期达到最大<sup>[19]</sup>。说明微生物 DHA 含量随培养时间的变化也具有种属的特异性。

### 3 DHA 合成机理

目前, 对微藻高不饱和脂肪酸合成机理的研究已取得一定进展, 认为微藻细胞从乙酰-CoA 合成十六碳饱和脂肪酸, 然后在碳链延长酶和一系列脂肪酸去饱和酶和脱氢作用下逐步形成十六碳以上的高不饱和脂肪酸。至少在 18:2 $\omega$ -6 的合成途径上与高等植物相似, 更长链脂肪酸的生物合成在不同种类的微藻中有很大的差别且更加复杂, 往往涉及到细胞质膜、叶绿体、内质网、微粒体及细胞质间复杂的相互作用<sup>[20]</sup>。

环境因素对微藻 DHA 含量的影响可以从 DHA 合成机理上得到解释。在微藻的光和膜中, 脂肪酸的不饱和水平决定着膜脂的相转变温度, 即不饱和程度越高, 膜脂的相转变温度越低。通过调节不饱和酶的酶量和活性, 就能够改变膜脂的不饱和度, 直接决定着微藻的耐低温性、低温下光损伤的修复等许多重要生理功能。环境因素(如温度、光照等)正是通过某些分子机理来实现去饱和酶的表达及其活性调控的, 使细胞得以迅速改变脂肪酸的组成来适应环境的变化。

### 4 DHA 的大规模生产

目前利用海洋微生物生产 DHA, 大多数尚处于实验室研究阶段, 但国外已有数家公司已经进行了工业化生产, 如美国的 Martek 公司利用 *Cryptocodinium* 异养培养生产 DHA, 产量达到  $1.2\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}$ , 藻体生物量达到  $40\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的高密度。国内的研究尚未见有工业化生产的报道, 存在的制约因素及解决途径有以下几个方面:

1) 筛选脂质中 DHA 含量高且生长速度快的优良藻种和菌种。

脂质 DHA 含量丰富的微生物种类并不多, 并且由于脂类物质在微生物体内含量本来就低, 使 DHA 产量普遍较低, 这必然增大生产成本以及后面分离提纯工艺的难度。通过调变育种筛选 DHA 高产微生物或将脂肪酸去饱和酶基因克隆并转移到生长速度快的微生物中, 获得高产 DHA 的基因工程藻株或菌株, 是实现工业化生产的先决条件。

2) 加强微生物体 PUFA 代谢方面的基础研究。

只有深入理解 PUFA 的代谢机理, 才能够更有效地通过控制培养条件(温度、光照、培养基组成、培养方式等)来实现对微生物生长及 PUFA 合成的调控, 通过优化培养条件获得高的生物量和 DHA 产量。

3) 开发高效的生物反应器。

海洋微生物要求的生长条件往往与传统微生物有很大区别,这对反应器的设计提出了更高的要求。目前开发的用于微藻培养的光生物反应器有很多类型,分为管道式光生物反应器、平板式光生物反应器、光纤光生物反应器等。存在的问题主要在于当培养后期细胞密度较高时,大部分藻得不到充足的光照,使生长受到抑制,细胞密度难以大幅度提高;某些藻类生长时的附壁现象较为严重,给操作带来困难。只有开发出适用于海洋微生物生长的高效且成本较低的生物反应器,实现高密度培养,才能使利用微生物大规模生产 DHA 真正得以实现,并且增强产品的市场竞争力。

#### 参考文献

- [1] Norday A, Hansen JB.  $\omega$ -3 fatty acids and cardiovascular risk factors[J]. *World rev Nutr Diet*, 1994,76:51.
- [2] Borek C.  $\omega$ -3 fatty acids as anti-carcinogens; Cellular and molecular studies[J]. *World rev Nutr Diet*, 1994, 76:66.
- [3] Robinson DR, Xu LL, et al. Alleviation of autoimmune disease by  $\omega$ -3 fatty acids[J]. *World rev Nutr Diet*, 1994,76:95.
- [4] Popp-Snijders C, Blonk MC.  $\omega$ -3 fatty acids in adipose tissue of obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus reflect long term dietary intake of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid[J]. *Am. J. Clin. Nutr*, 1995,61:360.
- [5] Radwan SS. Sources of  $C_{20}$ -polyunsaturated fatty acids of biotechnological use[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991,35:421.
- [6] Zhukova NU. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae[J]. *Photochemistry*, 1995,39(2):351.
- [7] Reitan KI, Rainuzzo JR, et al. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae[J]. *J Phycol*, 1994,30:972.
- [8] Volkman JK, Dunstan GA, et al. Fatty acids from microalgae of the genus Pavlova [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(6):1855.
- [9] Thompson PA, Harrison PJ, et al. Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton[J]. *J Phycol*, 1990,26:278.
- [10] Renaud SM, Zhou HQ, et al. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia colostereum*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T. ISO)[J]. *J Appl Phycol*, 1995,7:595.
- [11] Volkman JK, Jeffrey SW, et al. Fatty acid and lipid composition and maximization of the in mariculture [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*,1989,128:219.
- [12] Dunstan GA, Volkman JK et al., Changes in the lipid composition and maximization of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture[J]. *J Appl Phycol*, 1993,5:71.
- [13] Bajpai P, Bajpai PK, et al. Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium aureum*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991,35:706.
- [14] Singh A, Ward OP. Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium* ATCC 28210 [J]. *J Indust Microbiol*, 1996,16(6):370.
- [15] Singh A, Wilson S. Docosahexaenoic acid production by *Thraustochytrium* sp. ATCC 20892[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 1996,12(1):76.
- [16] 周洪琪, Renaud SM. 温度对新月芽形藻、铲状菱形藻和巴夫藻的生长、总脂肪含量及脂肪酸组成的影响[J]. *水产学报*,1995,20(3):235.
- [17] Bajpai PK, Bajpai P, et al. Optimization of production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304[J]. *J Am Oil Chem Soc*. 1991,68:509.
- [18] Weete JD, Kim H, et al. Lipids and ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185[J]. *Lipids*,1997,32(8):839.
- [19] Femsodez-Reiriz MJ, Ferreiro MJ. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae[J]. *J Aquac*, 1989,83:17.
- [20] Wichien Y, Ward OP.  $\omega$ -3 fatty acids: alternative sources of production[J]. *Process Biochem*. 1989,8(24): 117.

(收稿日期:2001-06-24)