

Global Intellectual Property Competition of
The Algae DHA Technology Chain

藻类DHA技术链 与全球知识产权竞争格局

中国科学院武汉情报中心标准分析研究中心 研 发

..... 魏 凤 周 洪 牛振恒 邓阿妹 等 编 著



科学出版社

藻类 DHA 技术链与全球知识产权竞争格局

中国科学院武汉文献情报中心标准分析研究中心 研发

魏 凤 周 洪 牛振恒 邓阿妹 等 编著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书主要基于对藻类（主要是微藻）DHA 技术链的调研，对微藻 DHA 中藻种选育、发酵培养、收集提取、富集纯化、精制及产品技术开展全球知识产权竞争格局分析，包括全球微藻 DHA 专利的发展态势、技术分布、潜在的全球竞争、跨国公司的专利布局、专利申请覆盖国家、技术专利优势、研发重点、产品布局等，分析了印度、巴西、俄罗斯和澳大利亚等国的微藻 DHA 专利保护状况，尤其是针对我国微藻 DHA 专利申请机构做了详细分析，最后提出微藻 DHA 技术研发方向和知识产权保护的建议。

本书对布局微藻 DHA 技术研发、产品生产、市场开发等有重要的参考价值，适合政府部门、规划机构、管理机构、科研机构、产业部门、企业等决策人员、研发人员参考。

图书在版编目（CIP）数据

藻类DHA技术链与全球知识产权竞争格局/魏凤等编著. — 北京：科学出版社, 2018.2

ISBN 978-7-03-055342-3

I. ①藻… II. ①魏… III. ①藻类-资源开发-生物技术产业-高新技术企业-知识产权-关系-市场竞争-研究-世界 IV. ①F416.77②D913.404

中国版本图书馆CIP数据核字(2017)第277154号

责任编辑：王 倩 / 责任校对：彭 涛
责任印制：张 伟 / 封面设计：无极书装

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码：100717

<http://www.sciencep.com>

北京京华虎彩印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018年2月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2018年2月第一次印刷 印张：11 3/4

字数：260 000

定价：128.00元

（如有印装质量问题，我社负责调换）

“藻类 DHA 生产技术链与全球知识产权竞争格局”

研 究 组

组 长 魏 凤

副组长 周 洪 牛振恒 邓阿妹 崔 球

成 员 魏 凤 周 洪 邓阿妹 牛振恒

崔 球 宋晓金 吴跃伟 吴 昊

朱壁然 李春美 侯鑫鑫

序

“深海鱼油”大家一定比较熟悉，是从深海冷水鱼类取得，由于它们富含人体不能合成而又必需的多元不饱和脂肪酸 OWEGA-3，其中有效成分主要为 DHA（二十二碳六烯酸，Docosahexaenoic Acid）和 EPA（二十碳五烯酸，Eicosapentaenoic Acid），对人体健康非常有益，尤其对大脑皮层、视网膜、神经细胞和心血管等作用显著，所以经常被公众作为滋补良品使用。但由于以下原因，鱼类来源 OWEGA-3（ ω -3）有逐渐被藻类来源 ω -3 替代的趋势：首先，多项调查发现从海洋鱼类提取的鱼油中能检测到多种陆地的污染物，如有机氯污染物、二噁英（Doixin）和毒杀芬等，随着海洋污染的加剧，公众对其安全性产生了担忧。其次，鱼类来源 OWEGA-3 的不饱和脂肪酸中除 DHA 外还含有 EPA，而后者已被证明应避免用于婴孩和孕妇。再次，由于海洋捕捞的不确定性和资源枯竭，深海鱼类来源 OWEGA-3 越来越难以在可控下大规模工厂化生产。另外，不管如何精炼，鱼类来源 OWEGA-3 产品多少会有一点让一些人不愿接受的“腥味”。而随着技术进步，从藻类直接提取 DHA 的系列技术已经成熟，可完美解决上述不足，使得藻类 DHA 成为可以稳定提供优质 OWEGA-3 的重要来源。

藻类 DHA 目前主要从微藻制取，其生产过程包括：藻种的筛选分离、培养，大规模发酵培养，DHA 提取、纯化，以及 DHA 的精炼、改性等，形成了藻类 DHA 生产完整的技术链。随着需求的增长，围绕藻类 DHA 生产技术专利与市场已经出现知识产权方面的激烈竞争。调研发现，欧美国家的相关企业巨头们通过掌握藻类 DHA 生产的完整技术链、严密的知识产权保护链和完善的 DHA 产品链，在全球藻类 DHA 市场竞争中占据了先机。为此，为推动我国研发机构和企业创新性技术的研发，突破国外知识产权保护链和绕开技术围堵，争取在国际竞争中占据一席之地，急需能有一本好的参考书籍能对目前全球藻类 DHA 生产的技术链及知识产权竞争格局提供权威的信息。

该书作者借助数据情报方面的专业优势，收集了丰富的有关藻类 DHA 的技术链信息与专利数据，并对两者作了权威的综合分析。在概要介绍藻类 DHA 生产兴起的缘由，以及全球藻类 DHA 知识产权的总体发展态势后，该书将主要篇幅集中在藻类 DHA 生产的专利分析上。这些专利分析非常专业与详细，按照藻类 DHA 生产技术链的每一个环节，从藻种选育、发酵培养、收集提取、精制、改性及衍生化等逐一分章节介绍了该环节目前的专利分布、专利持有人、专利成熟度以及最近年新出现的专利技术等。并在后面三个章

节分别对新兴市场、跨国企业和在华企业的 DHA 专利情况进行了深入分析。

该书几乎囊括了目前国内外藻类 DHA 生产技术与专利的有用信息，写作布局合理、行文流畅、通俗易懂，是从事藻类 DHA 研究、生产与市场开拓等方面的人员以及相关专业大专院校师生一本实用的参考书。

中国科学院海洋研究所

周加江

2017 年 11 月

前 言

2016年10月25日，中共中央、国务院发布《“健康中国2030”规划纲要》，提出要把人民健康放在优先发展战略地位，标志着我国已经将健康中国上升到了国家发展战略高度。DHA（二十二碳六稀酸），俗称脑黄金，是一种重要的 ω -3多不饱和脂肪酸，具有健脑益智、促进神经核视觉系统发育、抗癌、抗炎、预防和治疗心血管疾病和延缓衰老等多种功效，在医药、食品、饲料等行业具有广阔的应用前景，对保障人们健康具有重要作用。

藻类DHA的整个技术链条（藻种选育—发酵培养—收集提取—富集纯化—精制—改性及衍生—产品应用）已为全球所关注。本报告以全球藻类（主要是微藻）DHA专利为研究对象，分析藻类DHA各环节的关键技术的知识产权问题、潜在竞争对手的技术研发趋势与市场竞争战略，研究当前藻类DHA关键技术知识产权战略、专利布局及空白点，挖掘国内外主要专利权人的技术趋势、竞争优势、研发重心、产品布局、专利保护、研发合作等，尤其是针对我国藻类DHA知识产权的发展情况，分析其在国内外市场的机遇和挑战，并提出对策建议。

目前，国外机构已经具有全链条的技术、市场开拓能力。例如，帝斯曼和马泰克的专利已覆盖藻类DHA生产的全链条；杜邦公司在菌种选育、收集提取方面具有领先优势；巴斯夫在菌种选育、发酵培养、精制方面具有领先优势等。相比之下，我国的研发机构由于起步较晚，专利主要集中于产品的应用形式、改性及衍生化方面，在藻类DHA生产技术上专利较为分散，需要加大研究和创新。

未来，藻类DHA的生产技术向着提高DHA的纯度、稳定性、产量的方向发展，产品形式日益多样化，并向日常消费品方向扩展。通过对藻类DHA生产技术的专利的分析，发现除了DHA的生产技术得到不断创新和优化外，利用基因工程的手段，通过转基因技术，DHA已实现了从微藻到微生物（细菌、酵母等）再到高等植物的跨物种生产。就微藻DHA的生产技术来说，选育性状更加优良的微藻品种仍是提高DHA产量的关键因素；收集提取技术向着无污染、低残留、无溶剂的方向发展；富集纯化技术由单一技术向多种技术联合使用的复合技术方向发展；精制技术也由物理和化学方法向着酶和生物学方法的方向发展，以满足DHA的高纯度和高品质要求；DHA的衍生物形式趋于多样化，磷脂型DHA的制备技术日趋成熟；DHA产品形式逐渐多样化，DHA包埋技术不断得到优化，在食品、医药、保健品和饲料等领域的应用不断深入；DHA在食品领域的应用已由在奶制品（婴幼儿配方奶粉、液态奶）领域向着饮料、面包、烘焙食品等日常消费品的方向发展。

虽然藻类DHA专利已覆盖整个藻类DHA技术链，但仍存在一些技术专利的空白点。

菌种选育方面的专利空白点为离子相关诱变技术、除草剂（啶禾灵等）诱变技术等；发酵培养方面的专利空白点为添加有植物激素的微藻培养基和微藻的流加培养技术；纯化富集方面的专利空白点为银离子改性分子筛技术和超临界流体色谱法技术；改性及衍生化方面的专利空白点为适合工业化生产高纯度 DHA 乙酯的方法。目前，在精制和产品应用方面还未发现存在专利的技术空白点。

根据上述研究结论，本书提出我国研发藻类 DHA 技术领域的主要建议：抓住当前藻类 DHA 专利布局的缺陷和空白，加快藻类 DHA 空白点技术研发和国内市场的专利战略布局；加大对国内市场和部分国外市场的开发；丰富产品形式和类型，向传统食品和保健品拓展；加强对藻类 DHA 的新生产和应用技术的研发和优化等。

由于 DHA 技术涉及多学科，综合性和创新性较强，本书的编著者专业和水平有限，对诸多问题理解难免不尽准确，如有不妥之处，恳请各位专家和读者提出宝贵意见和建议，以便进一步修改和完善。

本书的完成得到了中国科学院重大科技任务局任小波先生、中国科学院武汉文献情报中心张智雄主任、陈丹书记，以及众多专家的指导和支持，在此一并表示衷心感谢。

中国科学院武汉文献情报中心标准分析研究中心

魏 风

2017 年 11 月

目 录

序

前言

第 1 章 藻类 DHA 生产的关键技术链	1
1.1 DHA 技术概述及分类	1
1.2 DHA 的来源	1
1.3 藻类 DHA 生产的关键技术链	2
1.4 DHA 相关的衍生产物	9
1.5 DHA 的用途广泛	9
1.6 藻类 DHA 生产的技术链及关键技术	11
第 2 章 藻类 DHA 全球知识产权总体发展态势	13
2.1 分析方法	13
2.2 数据库和检索式构建	13
2.3 全球 DHA 知识产权总体发展态势	16
第 3 章 菌种选育专利分析	19
3.1 专利技术分布状况	19
3.2 主要专利权人的竞争格局	21
3.3 全球主要发明人的竞争优势	31
3.4 基于专利的技术成熟度分析	33
3.5 近期新出现的专利技术	34
3.6 本章小结	35
第 4 章 发酵培养专利分析	37
4.1 专利技术分布状况	37
4.2 主要专利权人的竞争格局	39
4.3 全球主要发明人的竞争优势	45
4.4 基于专利的技术成熟度分析	46
4.5 近期新出现的专利技术	48

4.6 本章小结	49
第 5 章 收集提取专利分析	50
5.1 专利技术分布状况	50
5.2 主要专利权人的竞争格局	52
5.3 全球主要发明人的竞争优势	56
5.4 基于专利的技术成熟度分析	57
5.5 近期新出现的专利技术	59
5.6 本章小结	60
第 6 章 精制专利分析	61
6.1 专利技术分布状况	61
6.2 主要专利权人的竞争格局	62
6.3 全球主要发明人的竞争优势	68
6.4 基于专利的技术成熟度分析	69
6.5 近期新出现的专利技术	70
6.6 本章小结	71
第 7 章 改性及衍生化专利分析	73
7.1 专利技术分布状况	73
7.2 主要专利权人的竞争格局	75
7.3 全球主要发明人的竞争优势	82
7.4 基于专利的技术成熟度分析	84
7.5 近期新出现的专利技术	85
7.6 本章小结	86
第 8 章 产品应用形式专利分析	88
8.1 专利技术分布状况	88
8.2 主要专利权人的竞争格局	90
8.3 全球主要发明人的竞争优势	97
8.4 基于专利的技术成熟度分析	99
8.5 近期新出现的专利技术	100
8.6 本章小结	102
第 9 章 新兴市场的专利布局现状	104
9.1 巴西市场专利分析	104
9.2 印度市场专利分析	112
9.3 俄罗斯市场专利分析	125

9.4 澳大利亚市场专利分析	131
9.5 本章小结	146
第 10 章 跨国企业专利态势与优势技术	148
10.1 美国马泰克生物科学有限公司	148
10.2 荷兰帝斯曼知识产权资产管理有限公司	150
10.3 美国雅培实验室	151
10.4 日本持田制药公司	153
10.5 挪威阿克海洋生物公司	155
10.6 瑞士雀巢公司	157
10.7 德国巴斯夫集团	158
10.8 美国 Solazyme 公司	160
第 11 章 在华企业的专利申请及技术优势	162
11.1 广东慧尔丹营养品科技有限公司	162
11.2 广东润科生物工程有限公司	162
11.3 韩国大象株式会社	163
11.4 湖南佳格生物技术有限公司	164
11.5 嘉必优生物技术(武汉)有限公司	164
11.6 罗盖特生物营养品(武汉)有限公司	165
11.7 厦门金达威集团有限公司	165
11.8 三得利股份有限公司	166
11.9 湖北福星生物科技有限公司	167
11.10 青岛琅琊台集团股份有限公司	168
11.11 澳优乳业(中国)有限公司	168
11.12 内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司	169
第 12 章 总结与建议	170
12.1 总结	170
12.2 建议	174

|第 1 章| 藻类 DHA 生产的关键技术链

1.1 DHA 技术概述及分类

二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic Acid, DHA), 分子式是 $C_{22}H_{30}O_2$, 分子量为 328.48, 分子结构中第一个不饱和双键位于甲基端的第三个碳上, 含有 6 个双键, 具有 22 个碳原子, 是一种 ω -3 系列多不饱和脂肪酸。

目前, DHA 分为甘油三酯型、甲酯型、乙酯型和卵磷脂型 4 种类型, 其中, DHA 甘油三酯型和卵磷脂型属于天然存在形式, 甲酯型和乙酯型 DHA 是人们通过化学手段所获得, 目的是方便提取, 从而获得大量的高纯度 DHA, 但是, 天然存在形式的 DHA 更利于人体的消化吸收。人体对乙酯型 DHA 的吸收率仅有 20%, 对甘油三酯型 DHA 的吸收率约为 50%, 对卵磷脂型 DHA 的吸收率接近 100%^①。

DHA 对人体具有极其重要的生理功能, 俗称“脑黄金”, 具有健脑益智、促进神经核视觉系统发育、抗癌、抗炎、预防和治疗心血管疾病及延缓衰老等功效。由于具有上述诸多功能, DHA 作为新一代功能食品药物保健因子, 成为全球科研人员关注的热点。

1.2 DHA 的来源

传统来源——深海鱼油。深海鱼油是 DHA 的传统来源。然而, 海水污染程度不断加重, 渔业资源日益枯竭, DHA 含量和纯度较低, 鱼腥味较重和二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA, 一种抑制婴幼儿生长发育的物质) 含量较高等因素, 决定了深海鱼油 DHA 不仅无法满足市场对 DHA 的旺盛需求, 而且还限制了其在食品和保健品中的进一步的应用。

新型来源——微藻。利用微生物生产 DHA 是产生于 20 世纪 90 年代的一项技术。该技术利用自然界中一些微生物具有合成 DHA 这一功能, 通过对微生物的发酵培养, 经过分离、提取和纯化等工艺获得 DHA。利用微生物法生产 DHA 具有微生物生长快易培育、DHA 含量高、提取工艺相对简单和无污染等优点。自然界中具有合成 DHA 功能的微生物有微藻、真菌和细菌等, 其中, 对微藻的研究最为集中。目前, 利用微藻的发酵培养生产藻类 DHA 已实现了工业化和规模化生产。

和深海鱼油 DHA 相比, 藻类 DHA 更容易被人体吸收及代谢, 且食用更加安全, 无异味、

^① http://baike.baidu.com/link?url=AS9YH3LMd6fcS046erYSP4tYiFicqHClGjEP3QXZKIv1mhP5jZBjp_m0W7m-q8Uz8r6M-3plaGZ2n7BmerRDhdZtnk0Rf4CJrBBxbC1tpsu

无污染。全球的 DHA 市场上已呈现藻类 DHA 逐渐取代鱼油 DHA 的发展趋势。

1.3 藻类 DHA 生产的关键技术链

利用微藻生产藻类 DHA 涉及多个复杂的流程，其生产技术链大致可分为如下六个阶段：菌种选育、发酵培养、分离提取（破壁萃取）、纯化、精制、改性。

1.3.1 菌种选育技术

目前，国内外生产藻类 DHA 所用到的微藻种类有裂殖壶菌（*Schizochytrium* sp.）、破囊壶菌（*Thraustochytrium*）和隐甲藻等，其中，裂殖壶菌和破囊壶菌的应用最为广泛。裂殖壶菌和破囊壶菌均属于真菌门（Eumycota）、卵菌纲（Oomycetes）、水霉目（Saprolegiales）、破囊壶菌科（Thraustochytriaceae），是一类生产 DHA 的类藻海洋真菌。在它们体内，DHA 均以甘油三酯的形式存在，但 DHA 的生物合成途径却不相同。破囊壶菌是通过碳链延长、脱氢的生化反应步骤来合成高度不饱和脂肪酸，而裂殖壶菌的多不饱和脂肪酸是在聚酮合酶（polyketide synthase, PKS）催化作用下形成的。裂殖壶菌和破囊壶菌都具有培养简单、生长速度快、脂肪酸组成简单且易分离纯化等特点。在适当的培养条件下，菌体的生物量、总脂含量和 DHA 产量可以达到很高的程度，是发酵生产 DHA 的理想菌种。

对 DHA 的生产来说，只有菌体内 DHA 含量和菌体生物量都高时，才能获得较高的 DHA 生产效率。因此，必须对自然界存在的微藻进行选育和种质改良，以获得在同一环境中高菌体生物量与高 DHA 含量能够同时满足的优良菌种。目前，对微藻的选育一般采用物理、化学或生物学的手段，引起细胞核染色体断裂、缺失、碱基置换和基因重组等生物学效应，从而使后代的性状发生变异。物理诱变育种主要采用激光、离子束和射线辐照等手段来获得优良的突变品种。在微藻选育中常用的技术有射线辐射诱变技术、激光诱变技术、离子束诱变技术和紫外线照射诱变技术等。化学诱变方法主要是采用诱变剂。在诱变育种方面应用较为广泛的化学诱变剂有甲基磺酸乙酯（ethyl methanesulfonate, EMS）、亚硝基胍（*N*-methyl-*N'*-nitrosoguanidine, MNNG）、叠氮化钠（NaN）、平阳霉素（PYM）等。生物学的方法主要有细胞融合技术和转基因技术等。

1.3.2 发酵培养技术

微藻的发酵培养过程是决定微藻 DHA 产量的关键环节。发酵培养过程中，影响微藻 DHA 产量的因素有培养基成分、培养条件和培养方式等。

1. 培养基成分

微藻培养基的成分包括碳源、氮源、碳氮比（C/N）、无机盐及其他外源添加成分等，

选择不同的要素种类会对微藻 DHA 的产量产生重要影响。

(1) 碳源

不同种属的微藻对不同碳源的利用效率差别很大。葡萄糖是微藻普遍能够利用的碳源。另外,果糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉、甘露糖、粗甘油和亚麻籽油等也可作为微藻的碳源。

(2) 氮源

微藻可以利用酵母浸出液、玉米浆及蛋白胨等有机氮源和硫酸铵、乙酸铵、硝酸铵、硝酸钠与谷氨酸钠等无机氮源。

(3) 碳氮比

合适的碳氮比有助于产生最佳的菌体生物量,培养基中氮元素含量过低可导致菌体生物量减少,从而影响 DHA 的产量。

(4) 无机盐

微藻培养基中常用的无机盐为氯化钠(NaCl)。向培养基中添加无机盐有两方面的作用:①微藻细胞内 DHA 的合成需要一些酶的参与,酶的最佳活性需要金属离子作为辅助,在培养基中添加一定量的无机盐可以为微藻提供所需的金属离子;②向微藻培养基中添加无机盐可以维持培养基的渗透压,有利于微藻的生长和 DHA 的积累。

(5) 其他外源添加成分

培养基中的其他外源添加成分还包括微量元素、激素和维生素等。

为进一步提高微藻 DHA 的产量,许多研究者关注利用响应面法对微藻培养基的成分进行优化。华南理工大学的梅志刚等利用响应面法对隐甲藻的培养基进行了优化,优化后的培养基组成为葡萄糖 30.54 g/L,胰蛋白粉 5.03 g/L,酵母粉 4 g/L,甘油 20 g/L,不添加 MgCl_2 和维生素溶液,其他组分同 460 培养基,在此培养基条件下,DHA 产量达 $(907.54 \pm 1.02) \text{ mg/L}$,是优化前产量的 2.48 倍^①。上海交通大学的金文翔等利用响应面法对裂殖壶菌 DHA 的发酵培养基进行了优化,葡萄糖、酵母浸出粉和磷酸二氢钾优化后浓度分别为 69.66 g/L、6.93 g/L、1.29 g/L,DHA 的产量较优化前提高了 62.04%^②。

2. 培养条件

微藻的培养条件包括温度、pH 和溶氧度等。

(1) 温度

温度是 DHA 生物合成的一个非常重要的环境因素。一般情况下,微藻在最适的温度条件下培养可获得最大的生物量,但是,油脂含量并不一定达到最大。有研究表明,冷处理可在一定程度上增加 DHA 的含量^③。

(2) pH

裂殖壶菌和破囊壶菌生长的 pH 范围较广。中性 pH 有利于菌体的生长和脂肪酸的积累,

① 梅志刚,王菊芳.响应面法优化隐甲藻产 DHA 的培养基.中国酿造,2010,(11): 84-87.

② 金文翔,戈梅,钱秀萍.响应面法优化裂殖壶菌 DHA 发酵培养基.食品与发酵科技,2015,51(4): 13-16+33.

③ 刘静,高媛媛,江贤章,等.低温胁迫对裂殖壶菌 DHA 生物合成及 SOD 表达的影响.药物生物技术,2010,17(1): 50-55.

pH 较低时不利于菌体的生长,但对 DHA 相对含量的增加有利。pH 的变化是通过 H^+ 浓度的改变而影响细胞生理代谢过程,进而影响 DHA 等多不饱和脂肪酸的合成。破囊壶菌类微生物细胞生长和 DHA 生产的 pH 范围为 5~8。

(3) 溶氧度

产油微生物合成多不饱和脂肪酸时,需要氧参与去饱和反应,氧分子还可以促进菌体的生长及维持细胞的代谢。氧的有效性决定微生物合成脂肪酸的不饱和度。在发酵过程中,需要提高培养基中溶氧度以促进不饱和脂肪酸的合成,从而提高 DHA 的产量。通气和机械搅拌有利于氧的传递和利用。

3. 培养方式

微藻的发酵培养主要有分批发酵、连续发酵和流加发酵三种方式。

(1) 分批发酵

分批发酵也称间歇发酵,是微生物发酵的传统方式,是指在发酵过程中将营养物和菌种一次性加入进行培养,直到结束放出,中间除了空气进入和尾气排出,与外部没有物料交换。分批发酵的优点是操作简单、投资少、运行周期短、染菌机会少、生产过程和产品质量较易控制,缺点是发酵初期营养物过多会抑制微生物的生长,而发酵的中后期又因为营养物减少而降低培养效率。

(2) 连续发酵

连续发酵是指以一定的速度向发酵罐内添加新鲜培养基,同时以相同的速度流出培养液,从而使发酵罐内的液量维持恒定,使微生物在稳定状态下生长。与分批发酵相比,连续发酵的优点主要表现在可长期连续进行、生产能力高,缺点是操作控制要求高、投资高、杂菌污染和微生物菌种变异等。

(3) 流加发酵

流加发酵也称补料分批发酵或半连续发酵,是指在微生物分批发酵中,以某种方式向培养系统补加一定物料的培养技术。它是介于分批发酵和连续发酵之间的一种发酵技术,同时具备两者的部分优点,是一种在工业上较常用的发酵工艺。流加发酵通过向培养系统中补充物料,可以使培养液中的营养物浓度较长时间地保持在一定范围内,既保证微生物的生长需要,又不造成不利影响,从而达到提高培养效率的目的。流加发酵较分批发酵 DHA 产量高很多,这主要是因为流加培养可以有效地减少发酵液黏度升高引起的传质效率低、降解物的阻碍效应及底物的反馈抑制现象,很好地控制代谢流向,提高菌体生物量、油脂含量及增加 DHA 的积累。

1.3.3 分离提取技术

裂殖壶菌和破囊壶菌等产 DHA 微生物具有较为坚韧的细胞壁,在油脂提取前应对藻体进行破壁处理。常见的破壁处理方法主要有研磨、酸热法、藻体自融法、蛋白质溶剂变

性法、反复冻融法、超声波破碎法、微波破壁法和高压均质法等,其中,超声波破碎法适合对大多数微藻细胞进行破碎,超声波对细胞破碎的效率与细胞种类、时间、浓度和超声波的声频及声能有关。

微藻油脂的分离提取方法与大多数油类植物的提取方法相似,主要有物理压榨法、有机溶剂提取法和超临界 CO_2 萃取法等。

(1) 物理压榨法

在微藻油脂的制取中,借助机械外力的作用,将其从微生物发酵菌中提取出来的取油方法称为物理压榨法。物理压榨法具有配套设备少、生产灵活、油品质量好、色泽浅和风味纯正等优点,但同时也具有物料变形、水分蒸发、蛋白质变性、榨饼残油量高及动力消耗大等缺点。

(2) 有机溶剂提取法

有机溶剂提取法是目前国内外应用较为广泛的微藻油脂提取法。用于脂类提取的有机溶剂具有对油脂有较好溶解度、化学性质稳定、容易与油脂分离和安全性能好等特点。实验室常用的抽提溶剂主要有石油醚、己烷、丙酮、氯仿、乙醇和甲醇等。有机溶剂提取法按操作形式又可分为浸出法、搅拌热回流法和索氏提取法等。有机溶剂提取法的优点是出油率高、生产过程可以控制在较低温度下进行、动力消耗小、容易实现大规模和自动化生产,缺点是所用溶剂大多易燃、溶剂蒸气具有一定的毒性,以及提取的油脂中因残留溶剂不能直接食用。

(3) 超临界 CO_2 萃取法

超临界 CO_2 萃取法 (supercritical CO_2 extraction, SC- CO_2) 是近二三十年发展起来的一种新型分离技术,其综合了溶剂萃取和蒸馏两种功能。由于其萃取温度低、不易破坏被萃取物的生理活性、选择性好、无溶剂残留、避免产物氧化、不影响萃取物有效成分、萃取速度快、使用安全和不污染环境等优势,特别适用于热敏物质和易氧化物质的分离,可有效分离链长差别较大的脂肪酸,但若将碳链长度相近的脂肪酸分开,还必须结合其他分离技术。

1.3.4 纯化技术

目前,用于分离纯化 DHA 的方法主要有低温结晶法、尿素包合法、分子蒸馏法、酶法、吸附分离法、超临界流体萃取法、超临界流体色谱法及上述两种或两种以上方法联合使用的复合法等。

(1) 低温结晶法

低温结晶法又称溶剂分级分离法,该方法利用低温下不同的脂肪酸或脂肪酸盐在有机溶剂中溶解度不同的特性来进行分离纯化。这种溶解度的差异在随温度降低时表现更为显著。根据这一原理,将混合脂肪酸溶于有机溶剂,通过降温可过滤除去其中大量的饱和脂肪酸和部分单不饱和脂肪酸,从而获得所需的多不饱和脂肪酸。丙酮和乙醇为常用的有机溶剂。低温结晶法工艺原理简单、操作方便,但需要回收大量的有机溶剂,且分离效率不

高，通常与其他分离方法联合使用。

(2) 尿素包合法

尿素包合法是一种较常用的分离方法。利用尿素包合法分离饱和脂肪酸、单烯和多烯不饱和脂肪酸已实现商业化，且近年来还在不断改进。该技术的分离原理是尿素分子在结晶过程中能够与饱和脂肪酸形成较稳定的晶体包合物析出，与单不饱和脂肪酸形成不稳定的晶体包合物析出，而多不饱和脂肪酸不易被尿素包合，采用过滤方法除去饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸与尿素形成的包合物，即可得到较高纯度的多不饱和脂肪酸。尿素包合法成本较低，应用较普遍，但难以将双键数相近的脂肪酸分开。

(3) 分子蒸馏法

分子蒸馏法是蒸馏法的一种，其原理是利用混合物组分挥发度不同的特性而实现分离。该方法一般在高度真空条件下进行，在这种条件下，脂肪酸分子间引力减小，挥发度提高，因而蒸馏温度比常压蒸馏大大降低。分子蒸馏时，饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸首先蒸出，而双键较多的不饱和脂肪酸最后蒸出。分子蒸馏法的优点是蒸馏温度较低，可有效防止多不饱和脂肪酸受热氧化分解；缺点是需高真空设备，且能耗较高。

(4) 酶法

近年来，利用微生物酶富集 DHA 的方法逐渐受到人们的重视。与物理和化学方法相比，酶法具有一系列的优点：首先，酶催化效率高，在大规模的生产中用量很少，且固定化酶能多次重复利用；其次，酶催化反应在温和的 pH、温度和压力下进行，这对不稳定的 DHA 来说尤为重要；最后，酶法也避免了长链 DHA 中顺式结构双键被氧化、顺反异构、双键移位和聚合反应等情况的发生。

(5) 吸附分离法

吸附分离法是利用吸附剂选择性吸附分离多不饱和脂肪酸。例如，银离子能与不饱和脂肪酸的双键形成络合物，将银离子固定在吸附剂载体上，不同饱和度的脂肪酸在吸附剂上的分配系数不同因而得以分离。吸附分离法的优点是分离效果好，产品纯度高；缺点是分离规模较小，分离成本高，有些洗脱剂容易污染产品。

(6) 超临界流体萃取法

超临界流体萃取法的基本原理是通过调节温度和压力使原料各组分在超临界流体中的溶解度发生大幅度变化而达到分离的目的。与传统萃取方法相比，超临界流体萃取法具有良好的近于液体的溶解能力和近于气体的扩散能力，萃取效率大大提高。超临界流体萃取法常选用二氧化碳等临界温度低且化学惰性较强的物质作为萃取剂，特别适用于热敏物质和易氧化物质的分离。利用超临界流体萃取法可有效分离链长差别较大的脂肪酸，但若将碳链长度相近的脂肪酸分开，还需结合其他分离技术。

(7) 超临界流体色谱法

超临界流体色谱法 (supercritical fluid chromatography, SFC) 是以超临界流体作为流动相，依靠流动相的溶剂化能力来进行分离、分析的一种色谱方法。该方法对物质的溶解能力比一般气体大得多，相当于有机溶剂，但比有机溶剂的扩散速度快、黏度低、表面张