

# 培养海洋微藻 *Isochrysis galbana* 生产 EPA 和 DHA \*

## EPA AND DHA PRODUCTIVITY BY MARINE MICROALGA *Isochrysis galbana*

戴俊彪 吴庆余

(清华大学生物科学与技术系 北京 100084)

某些海洋鱼油是 EPA(廿碳五烯酸)和 DHA(廿二碳六烯酸)等  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸( $\omega$ -3 PUFA)的主要来源。由于鱼油资源有限,且鱼油中  $\omega$ -3 PUFA 的构成和含量随鱼的种类、季节、地理位置等不同而变化,利用海洋鱼油来生产  $\omega$ -3 PUFA 受到了很大的限制。另外,利用鱼油生产的 EPA 和 DHA 产品带有无法去除的鱼腥味,大大影响了产品的质量。随着人类对自身健康要求的提高,人们对这两种具有良好生理效果的脂肪酸的需求越来越多,仅仅依靠原有的鱼油资源已无法满足日益扩大的市场需求,开发 EPA 和 DHA 新生物资源已成为一个受到诸多学者关心的重要课题<sup>[1,2]</sup>。

海洋单细胞金藻 *Isochrysis galbana* 在国内被称为球等鞭金藻,是一种无壁的单细胞微藻,双顶生鞭毛,可在环境中作快速的游动,营光合自养生长。*I. galbana* 细胞可合成并富集含量高达总脂肪酸 40 % 的  $\omega$ -3 PUFA,其中 EPA 和 DHA 占总脂肪酸的 25 % 和 8.5 %,是良好的 EPA 和 DHA 生物资源<sup>[12]</sup>。培养海洋单细胞金藻 *I. galbana* 生产 EPA 和 DHA 具有很好的应用前景。

### 1 影响球等鞭金藻生长及脂肪酸组成的因子

环境因子对于微生物无论是在生长还是在生化组成上都起着十分重要的作用,而且各种不同的微生物对环境因子的要求也各不相同。对于环境因子的影响作用研究往往集中在两个方面:首先要寻求最佳的培养条件,提高生物量及细胞内特定生化组分的含

量<sup>[4]</sup>;其次对于要求获得高活性物质的细胞,必须考虑生长和积累的关系,寻求两者的最佳结合点,不仅要有快的生长速率,而且要有该物质高的胞内含量,从而获取较高的终产量<sup>[5]</sup>。

光照 光照是影响球等鞭金藻生长及富集  $\omega$ -3 PUFA 的一个十分重要的因素,包括光照强度和光暗周期两方面。光暗周期与球等鞭金藻生长及富集  $\omega$ -3 PUFA 的关系往往易被忽略,一般采用的都是连续光照。光强对藻类的生长及生化成分的影响较大。一般来说,在光强  $< 466 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  下,藻细胞的生长可用 Oorcsnot 1955 年的指数增长模式来加以拟合:

$$\mu = \mu_m(1 - e^{-I_0/I_k})$$

其中,  $\mu$  为特定生长速率;  $\mu_m$  为最大特定生长速率;  $I_k$  为  $\mu_m$  在光曲线上所对应的  $I$  值。Molina, E. M. 等人的研究表明,在低于  $466 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  的光照下, *Tetraselmis* sp. 及 *Isochrysis galbana* Parke 的生长是满足上述方程的。随着光强的进一步增加,藻的生长达到光饱和,特定生长速率保持恒定,别的环境因子如营养盐浓度等成为生长的限制因素。光强  $> 1015.9 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  则开始抑制藻细胞的生长<sup>[6]</sup>。

光照对于球等鞭金藻生化组分,特别是脂肪酸的影响受到了普遍关注<sup>[5]</sup>。随着光照强度的上升,细胞内的叶绿素含量、蛋白质含量等均呈下降趋势,但脂肪酸的含量却相对上升到一基本稳定的量。在脂肪酸组分中,当光强从  $197.6 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  上升到  $1017.7$

\* 国家自然科学基金资助项目 49525205, 39870064 号。

收稿日期:1998-06-05;修回日期:1998-09-18

$\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时,EPA 含量从总脂肪酸的 23.08 %下降到了 10.46 %,而 DHA 含量仅略有下降。低光照条件有利于 EPA 和 DHA 等  $\omega$ -3 PUFA 的合成与积累。

光照对球等鞭金藻生化组分的影响,一种可能的解释是在低光强条件下,细胞内光合作用比较弱,积累的糖类营养物质较少,因而作为能量储存物质的脂类合成较少。随着光强的增加,细胞光合作用越来越旺盛,合成糖类的量相对增加较多,因而脂肪合成也相对增加。此时,在细胞内相对较为恒定的色素和蛋白等物质由于脂类的增加,其相对含量下降。随着光强的进一步增加,细胞光合作用速率相对恒定,从而胞内各种组分的含量也就相对恒定了。

通气 由于球等鞭金藻是一种裸露无壁且具有双鞭毛的微生物,通气量过大会导致细胞的损伤。而另一方面,球等鞭金藻的生长要求尽量保持某一恒定的 pH 值(一般认为是 8.0),在光合作用过程中,培养基中的二氧化碳大量消耗(特别是在生长旺盛的情况下),会导致 pH 的上升,因此必须通入足够量的二氧化碳以保证其溶解平衡。在实际的培养过程中,往往需要综合考虑这两方面的因素,以寻求一个最佳的通气速率和通气比例(即空气与二氧化碳的比例)。另外目前已经知道在微生物的 PUFA 合成过程,分子氧在脂肪酸的去饱和机理中起着十分重要的作用,由通气速率而导致的培养基中氧浓度的高低将对藻细胞内脂肪酸的饱和程度有较大的影响。

营养盐浓度 在各种营养盐中,氮源(主要是硝酸钠)是决定球等鞭金藻细胞内脂类含量的一个重要因素,因此以往的研究大多集中在氮源上。Utting 等 1985 年曾报道当氮浓度从 0.613 mg/L(0.04 mmol/L)上升至 9.8 mg/L(0.7 mmol/L)时,脂类含量从总有机质的 31 %下降到 25 %(等价于从干重的 22 %下降至 16.9 %)。而 E. Molina Grima 等人 1992 年的研究则表明在  $\text{NaNO}_3$  浓度较低的情况下( $<2$  mmol/L),细胞内脂类含量从  $\text{NaNO}_3$  浓度大于 2 mmol/L 细胞干重的 30 %降到 0.5 mmol/L 时的 19 %,其中的 PUFA 和 EPA 含量也相应减少。 $\text{NaNO}_3$  浓度同时对藻细胞的生长有着明显的影响。在  $\text{NaNO}_3$  浓度低于 2 mmol/L 时,特定生长速率受到限制,在此浓度以上,恒定为  $0.032 \text{ h}^{-1}$ 。随着  $\text{NaNO}_3$  浓度的增加,藻细胞稳定期浓度也相应增加。当  $\text{NaNO}_3$  初始浓度为 8 mmol/L 时,藻细胞稳定期浓度可达 890 mg/L。

温度 温度无论对哪种生物都是一个非常重要的影响因素,绝大多数微生物都存在一个最佳的生长温度。E. Molina Grima 等人 1992 年的研究显示  $20^\circ\text{C}$

培养条件下球等鞭金藻具有最高的特定生长速率和最大的生物量,尽管此时细胞内脂类、EPA 和 DHA 含量不是最高,但却有最高的 EPA 和 DHA 产量,从而被认为是生产 EPA 和 DHA 的最佳温度条件。

其他环境因素 其他环境因素如 pH、微量元素、维生素等均可以对藻的生长和生理状况起到一定的影响作用。当 pH 值大于 9 时,球等鞭金藻的生长受到抑制,而 pH 低于 8 也会导致延滞期的加长,当 pH 为 8 时,藻具有最快的生长速率和较短的延滞期,是生产 EPA 和 DHA 的最佳 pH 条件。对于微量元素和维生素,由于种类较多,而用量又很少,且一般来说很难对每种元素的影响作用加以研究,因此这方面工作的报道很少见到,区分哪些因子影响球等鞭金藻脂类的含量和组成尚需进一步的研究。

## 2 球等鞭金藻的大规模培养

在目前微藻的培养中,较为常见的有以下两种方式:开放式大池和光生物反应器。开放式大池是传统而又简单的微藻培养模式,也是目前较为成熟的一种微藻培养技术,已成功地应用于螺旋藻、杜氏藻及小球藻的室外大规模培养。大池培养的优点在于结构简单、成本低、易于建造和操作。但利用大池培养蒸发严重、容易污染杂菌且培养条件难以人为控制,因而其使用受到了很大的限制。开放式大池一般只能用于那些生长速度较快的藻细胞的培养。与之相比,尽管光生物反应器造价较高,但由于光能利用率高,对各种生长条件易于控制,因此对于那些对生长条件要求较高,用于生产高值生物活性物质而生长速度又较慢的藻种培养而言较为可取<sup>[7]</sup>。Benjamin Pushparaj 等<sup>[8]</sup>为了克服大池和光反应器的缺点并实现优势互补,设计建造了大池和光反应器相耦合的设备并利用其培养 *Chlorella*, *Dunaliella* 和 *Arthrospira*, 获得了良好的效果。

至今为止,利用球等鞭金藻培养生产 EPA 和 DHA 仍处于科学研究阶段,尚未用于大规模工业化生产。E. Molina Grima 等<sup>[9]</sup>曾报道了利用水平管道式光反应器对球等鞭金藻进行半连续的户外培养,研究了光照、溶氧量及 pH 等因素对藻细胞的生长及胞内脂肪酸组成的影响。虽然球等鞭金藻细胞内含有丰富的 EPA 和 DHA,如果仅仅利用实验室或光反应器来进行藻细胞的培养,投资过大而且得率不高,因此离工业化生产还有相当大的距离,如何利用现代生化及细胞工程技术来提高藻细胞的生物量是以后研究中的一个十分重要的问题。在已有的各种技术中,异

培养技术是一种非常具有发展前途的微藻培养技术,其利用有机碳源如葡萄糖等为唯一碳源,从而可以克服因使用光反应器而造成的培养后期光照效率降低、培养器内壁发生附着等缺点,提高藻细胞的得率并可以实现培养的自动化。

目前藻类的异养培养技术研究主要集中在异养培养对藻细胞生化组成的影响上,所研究的藻种大多为小球藻<sup>[10,11]</sup>。在国内本实验室对原始小球藻 *Chlorella protothecoides* 进行异养转化研究<sup>[3,13]</sup>发现培养基中的有机碳源葡萄糖对 *C. protothecoides* 的生长起着很大的促进作用。在异养培养条件下,藻细胞生长速度很快,培养1周以后浓度就可达到4.0 g/L以上,是自养培养条件下的2~3倍。但是异养培养存在的最大困难是随着培养基内葡萄糖浓度的提高,培养过程中染菌的可能性也大大增加,因而难以应用于室外的开放式培养。通过对藻细胞的生化成分分析,在异养条件下培养的藻细胞内脂类物质的含量较大幅度的提高,可达藻细胞干重的70%以上,由此推断异养培养条件可能有利于藻细胞对脂类物质的积累。如果将该技术能够成功地应用于以生产脂肪酸为目的的球等鞭金藻的培养不仅可以导致藻细胞的快速生长,而且可以提高藻细胞内脂肪酸的含量,由此而产生的经济效益将会是十分巨大的,该方面的研究正在进行之中。

### 3 球等鞭金藻细胞中 EPA 和 DHA 的提取和分离纯化

利用微藻来提取和分离、纯化 EPA 和 DHA 产品的工艺尚处于摸索阶段,主要是借助目前较为成熟的从鱼油中提取和分离、纯化 EPA 和 DHA 的方法,综合萃取(包括超临界萃取)、浓缩、结晶、层析等技术,寻求其最佳组合。

E. M. Grima 等人<sup>[12]</sup>比较了几种常用萃取体系对球等鞭金藻细胞中 PUFA 的萃取效率,从脂肪酸分析结果可以看出,采用氯仿/甲醇/水体系来提取 PUFA 的效率是所有体系中最高的。但是由于氯仿、甲醇均为有毒试剂,不符合食品工业生产标准,故无法用于实际生产。除了氯仿/甲醇/水体系外,正己烷/乙醇体系的提取效率也比较高,同时两者都是符合食品工业溶剂标准的试剂,因而该体系有望为实际生产所

采用。另外从脂类萃取及直接皂化结果来看,两者所获得的 PUFA 的量并没有发生较大的改变,但直接皂化减少了脂类的提取过程,节约了时间和开支,大大地提高了提取分离的效率,不失为一种值得借鉴的好方法。

目前有望在实际中得以应用的,相对比较完整、经济的提取工艺是 A. Robles Medina 和 Cartens, M. 等人<sup>[14,15]</sup>提出的三步法,即首先利用直接皂化法从藻细胞中提取脂肪酸组分,然后用尿素结晶法对 PUFA 进行浓缩,最后利用高压液相色谱进行 EPA 和 DHA 的分离纯化。而此前 Zvi Cohen 等 1991 年提出的方法工艺过程较为复杂,因此没有太大的实际意义。

利用微体浮游藻类来生产 EPA 和 DHA 无论在外国还是国内都是刚刚起步的一个较新的领域。建立一套较为完整、简便有效且适宜工业化生产的从藻细胞的培养到 EPA 和 DHA 提取和分离、纯化的技术,在生物技术领域,既是一种挑战,又具有重要的科学价值和应用前景。

#### 主要参考文献

- 1 姜悦等. 海洋科学, 1997, 6:18~20
- 2 张羽航等. 中国油脂, 1998, 23(1):42~45
- 3 黄璐等. 实验生物学报, 1994, 27(2):275~279
- 4 Ana Otero et al.. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1997, 26(3):171~177
- 5 E. Molina Grima et al.. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994, 41:23~27
- 6 E. Molina Grima et al.. *Process Biochemistry*, 1994, 29:119~126
- 7 Xi Ma et al.. *J. Appl. Phycol.*, 1997, 9:425~430
- 8 Benjamin Pushparaj et al.. *J. Appl. Phycol.*, 1997, 9:113~119
- 9 E. Molina Grima et al.. *J. Biotechnol.*, 1994, 41:23~27
- 10 James C. Ogbonna et al.. *J. Appl. Phycol.*, 1997, 9:359~366
- 11 Yuan-Kun Lee et al.. *J. Appl. Phycol.*, 1996, 8:163~169
- 12 E. Molina Grima et al.. *JAACS*, 1994, 71(9):955~959
- 13 Qingyu Wu et al.. *J. Appl. Phycol.*, 1996, 8:181~184
- 14 A. Robles Media et al.. *JAACS*, 1995, 72(7):575~583
- 15 M. Cartens et al.. *JAACS*, 1996, 73(8):1 025~1 031