

(华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510641)

吴克刚 杨连生:

利用海生真菌发酵生产 DHA 研究概况

REVIEW ON THE PRODUCTION OF DOCOSAHEXAENOIC ACID BY MARINE FUNGI

二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, 简称 DHA) 属 ω -3 系多不饱和脂肪酸, 由于其具有改善大脑功能、维持正常视力、降低血脂、抑制血小板聚集、抗炎、抗癌及调整免疫功能等作用, 受到世人的极大关注^[1]。目前, DHA 的主要来源是海产鱼油, 但鱼油中 DHA 的含量并不稳定, 受鱼的品种、季节及地理位置的影响。鱼油

中 DHA, EPA 往往是同时存在, 有研究发现 EPA 使幼儿体重增加缓慢, 因此高纯度 DHA、低含量 EPA 的油脂用于幼儿的脑力发育尤为重要。一般鱼油中的 DHA 含量不是很高, 同时还含有大量其他饱和及低不饱和的脂肪酸, 因而浓缩较为困难, 使得高纯度 DHA 十分昂贵。研究表明, 许多海洋微生物脂质含有 EPA, DHA, 它们可能是鱼油中

EPA, DHA 的初始来源, 特别某些海生真菌合成 DHA 含量较高, 而且 EPA 和其他的饱和及低不饱和脂肪酸含量较低, 因而适合用来制备高纯度 DHA、低含量 EPA 的油脂。

1 产生 DHA 的真菌

1.1 筛选产生 DHA 的真菌

能产生 DHA 的真菌主要是较低级真菌中的藻状菌(见表 1)。

表 1 藻状菌中产生 DHA 的真菌及其多不饱和脂肪酸 (PUFAs)

名称	PUFAs (占总脂肪酸的 wt %)					EPA	DHA	DHA: PUFAs
	18: 2	18: 3	18: 4	20: 3	20: 4			
Class Chytridomycetes 壶菌纲								
<i>Dermocystidium</i> sp.	2	0	24	2	2	5	2	0.06
Class Oomycetes 卵囊菌纲								
Order Peronosporales 霜霉目								
<i>Pythium debaryanum</i>	16	5	0	1	4	0	7	0.27
<i>Phytophthora infestans</i>	5	0	0	2	10	0	8	0.47
Order saprolegniales 水霉目								
<i>Schizochytrium aggregatum</i>	3	0	2	2	4	4	11	0.73
<i>Thraustochytrium aureum</i>	2	0	0	0	5	6	34	2.62
<i>T. roseum</i>	3	1	0	0	2	6	11	0.92
Class Zygomycetes 接合菌纲								
Order Entomophthorales 虫霉目								
<i>Entomophthora</i> sp.	1	2	0	3	14	0	7	0.35
<i>E. obscura</i>	0	0	0	1	4	0	24	4.80

为了利用真菌制备高纯度 DHA, 筛选时除了考虑高 DHA 含量外, 还应考虑低 EPA 含量及低的 DHA: PUFAs 比例。因为在分离浓缩 DHA 时, 主要是利用不同脂肪

酸链中碳原子数和不饱和双键数的差异, 多不饱和脂肪酸与饱和及低不饱和脂肪酸的分离容易, 但多不饱和脂肪酸之间, 特别是 DHA 与 EPA 的分离较为困难。由表可

见, *Schizochytrium aggregatum*, *Thraustochytrium aureum*, *T. roseum*,

收稿日期: 1999-06-16;

修回日期: 1999-12-21

Entomophthom obscurum 是生产 DHA 的理想真菌。

1.2 产生 DHA 真菌的研究现状

利用真菌发酵生产 DHA 的研究主要集中在破囊壶菌 *Thrustochytrium* 和裂殖壶菌 *Schizochytrium*, 二者均来自海洋, 是有色素和具光刺激生长特性的海生真菌。

1991 年加拿大学者 Bajpal 等摇瓶培养 *Thrustochytrium aureum* ATCC34304 生产 DHA, 在最佳条件培养 6 d 后, DHA 产量达到 511 mg/L, 脂质 DHA 含量为 51 %^[2]。1994 年 Li Zuyi 和 Ward 在优化培养基上培养 *T. roseum* ATCC28210 5 d 的生物量和 DHA 产量分别为 10.4 g/L 和 1.011 g/L, 若采用中间补料工艺培养 12 d, 生物量和 DHA 产量可达到 17.1 g/L 和 2 g/L^[2]。1997 年日本学者 Yaguchi 等对其从 Yap 珊瑚礁区域分离的一株 *Schizochytrium* sp. SR21 进行培养, 5 d 发酵生物量和 DHA 产量达到 59.2 g/L 和 15.5 g/L^[3, 4]。

2 影响真菌合成 DHA 的因素

2.1 培养基的组成

2.1.1 碳源

真菌发酵生产 DHA 时, 不同的碳源对生物量、菌体脂质量和脂质 DHA 含量都有极大的影响。*Thrustochytrium aureum* ATCC34304 摇瓶培养 6 d 的结果发现, 以果糖、蔗糖和乳糖为碳源时, 生物量为 1~1.5 g/L, 菌体脂质量 1%~2%, 脂质 DHA 含量 65%~75%, DHA 产量 7~14 mg/L, 而葡萄糖、麦芽糖和淀粉为碳源时, 生物量为 4~5 g/L, 菌体脂质量 15%~18%, 脂质 DHA 含量 41%~45%, 生物量 270~334 mg/L。可见葡萄糖、麦芽

糖和淀粉有利于 *T. aureum* ATCC34304 的生长和积累脂质, 虽然脂质 DHA 含量比以果糖、蔗糖和乳糖为碳源时低, 但从 DHA 产量来看, 葡萄糖、麦芽糖和淀粉为碳源明显优于果糖、蔗糖和乳糖。

Thrustochytrium sp. ATCC20892 摇瓶培养 5 d 的结果也有类似发现, 虽然不同的碳源对生物量没有太大影响, 但葡萄糖和淀粉比麦芽糖和蔗糖有利于脂质积累, 而且葡萄糖为碳源时, DHA 含量和产量都是最高的^[5]。

以亚麻籽油为碳源时, 能明显促进 *Thrustochytrium aureum* ATCC34304 和 *Thrustochytrium* sp. ATCC20892 的生长和积累脂质, 但 *T. aureum* ATCC34304 合成 DHA 的能力明显受到抑制, 脂质 DHA 含量仅为 4.8 %^[5]。

总体而言, 葡萄糖是较佳的碳源, 生物量、菌体脂质量、脂质 DHA 含量以及 DHA 产量都是较高的。葡萄糖也是油脂发酵生产中最常使用的碳源而且可被有效转化为油脂。

除了碳源的种类外, 培养基中碳浓度也有很大的影响。提高淀粉的浓度能够促进 *Thrustochytrium aureum* ATCC34304 积累脂质和 DHA 产量。提高葡萄糖的浓度能够促进 *Thrustochytrium* sp. ATCC20892 和 *Schizochytrium* sp. SR21 的生长、脂质积累和提高 DHA 产量。但碳源的浓度一般对脂质 DHA 含量影响并不明显。

2.1.2 氮源

氮的数量和来源对真菌合成多不饱和脂肪酸有着重要的影响。酵母抽提物、谷氨酸钠和胰酪有利于 *Thrustochytrium aureum*

ATCC34304 的生长, 其中以酵母抽提物的生物量最高, 谷氨酸钠还有利于脂质的积累, 各种氮源对脂质 DHA 的含量影响不是十分明显, 从 DHA 的产量看, 酵母抽提物和谷氨酸钠为较好的氮源^[2]。各种氮源对 *Thrustochytrium* sp. ATCC20892 的生物量影响不大, 不过谷氨酸钠、胰酪、蛋白胍和酪蛋白水解物比以麦芽汁为氮源时菌体脂质含量、脂质 DHA 含量和 DHA 产量明显高, 因此、胰酪、蛋白胍和酪蛋白水解物是 *Thrustochytrium* sp. ATCC20892 良好氮源, 以谷氨酸钠最佳^[5]。

2.1.3 碳氮比

除了碳源、氮源外, 培养基中碳氮比也影响真菌合成 DHA。微生物生长于碳源过剩、氮源不足, 或者是剥夺氮源的环境, 便会激发和促进脂质的积累作为碳及能源的备用库。一般情况下高的碳氮比有利于脂质的积累和促进菌体的生长, 但碳氮比过高, 脂质中 DHA 含量将会下降^[5]。

2.1.4 无机盐及微量元素

在培养海洋微生物时, 除非培养基中含有足够的所有必需微量元素, 否则, 最好采用天然海水。由于破囊壶菌和裂殖壶菌均为海生真菌, 因此培养基中添加一定量无机盐是非常必要的。Wete 等在培养 *Thrustochytrium* sp. ATCC26185 发现, 若不添加无机盐, 菌体生物量和脂质量均大幅度下降^[6]。培养 *Thrustochytrium* sp. ATCC20892 时培养基中添加 Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} 和 Zn^{2+} , 生物量、脂质量和脂质 DHA 含量都有较大提高^[5]。

2.1.5 前体促进剂

一些有机酸和维生素对真菌合成 DHA 也是十分有用的。在



Thraustochytrium sp. ATCC20892 培养基中添加柠檬酸、维生素 B₁ 和 B₁₂, 使生物量和脂质 DHA 含量提高近 1 倍^[6]。

2.2 初始 pH 值

真菌生产 DHA 时, 选择适宜的初始 pH 值也是十分重要的。

Ward 等培养 *Thraustochytrium* sp. ATCC20892 的培养基初始 pH 值为 7.0, Yaguchi 等培养 *Schizochytrium* sp. SR21 时选择初始 pH 值 4.0^[3,5]。培养 *Thraustochytrium aureum* ATCC34304 时, 培养基初始 pH 值从 4.0 升高到 6.0, 生物量、脂质量及 DHA 产量均达到最高, 但脂质中 DHA 含量初始 pH 值 7.0 时最高。

2.3 通气与搅拌

微生物合成多不饱和脂肪酸过程中的去饱和作用需要分子氧的参与, 分子氧的有效性决定其产生脂肪酸的不饱和度。因此, 提高培养基中氧浓度有利于不饱和脂肪酸的合成。

机械搅拌对培养 *Thraustochytrium* 和 *Schizochytrium* 生产 DHA 有不同的影响。由于 *Thraustochytrium* 缺乏细胞壁和富含不饱和脂肪酸, 细胞脆性大, 机械搅拌抑制其生长^[7]。但 *Schizochytrium* 的情况则不同, 适当提高搅拌速度能促进菌体的生长^[3]。另外, 搅拌器的叶轮类型对菌体的生长也有影响。

2.4 温度

温度对 DHA 的生产有着极其重要的影响。嗜冷微生物比嗜温微生物能合成更多的多不饱和脂肪酸。许多研究也表明, 低温能促进微生物合成不饱和脂肪酸。Brown 和 Rose 认为, 由于低温增加氧的可

溶性, 产生大量胞内分子氧, 有利于需氧参与的长链脂肪酸的去饱和作用。另外, 低温下, 微生物产生大量多不饱和脂肪酸也是一种适应低温环境的手段, 因为多不饱和脂肪酸, 特别是 EPA, DHA 能保持微生物细胞膜低温流动性, 从而维持细胞正常功能。

Thraustochytrium aureum ATCC 34304 于 15 °C 培养时脂质 DHA 含量为 58%, 而 36 °C 时仅为 22%; *Thraustochytrium* sp. ATCC20892 于 15 °C 培养时脂质 DHA 含量为 64%, 而 35 °C 时仅为 18%。虽然低温十分有利于提高脂质 DHA 含量, 但不利于菌体的生长和脂质的积累, 从而限制 DHA 的产量。为了提高脂质 DHA 含量, 又不影响 DHA 的产量, Sindgh 等采用变温培养 *Thraustochytrium* sp. ATCC20892, DHA 含量和产量均有较大提高^[5]。

2.5 种龄和接种量

种龄显著影响 *Thraustochytrium aureum* ATCC34304 的脂质积累和 DHA 产量, 对生物量和脂质 DHA 含量影响不大, 种龄 24 h 和 5% 的接种量时脂质积累和 DHA 产量最高^[5]。

2.6 光照

Thraustochytrium 和 *Schizochytrium* 为具有光刺激生长特性的海生真菌, 因此, 光照对其生产 DHA 也有影响。*Thraustochytrium aureum* ATCC34304 在 33 W 荧光灯光照下的生物量、脂质量和 DHA 产量都比黑暗培养时高。

2.7 培养时间

Thraustochytrium 和 *Schizochytrium* 发酵初期的生物量和脂质量

呈线形增加, 至对数生长末期达到最高, 此后, 生物量保持平稳, 而脂质量有所下降。DHA 含量随培养时间变化并不明显。从 DHA 的产量来看, *Thraustochytrium* sp. ATCC 20892 培养 4 d、*Thraustochytrium aureum* ATCC34304 培养 6 d、*Schizochytrium* sp. SR21 培养 5 d 为最好^[3,5]。

3 结论

利用真菌发酵生产 DHA 可以克服从鱼油获取 DHA 的不足, 能够人为控制影响因素, 保持 DHA 产量和含量的稳定。真菌发酵生产 DHA 时, 一般合成 EPA 及其他多不饱和脂肪酸较少, 这有利于 DHA 的分离浓缩, 制备高纯度 DHA。目前, DHA 的真菌发酵研究大多停留在实验室的摇瓶培养, 而且多数产 DHA 的真菌的产量并不高, 因此, 还有待进一步筛选高产菌株和探索发酵罐培养, 以实现工业化大规模生产。

参考文献

- 1 朱燕华. 食品工业月刊(台), 1996, 11:37~41
- 2 Singh, A. and Ward, O. P. J. *Indust. Microbiol.*, 1996, 6:370~373
- 3 Yaguchi, T. and Tanaka, S. *et al.* J. *Am. Oil Chem. Soc.*, 1997, 11: 1 431~1 436
- 4 Nakahara, T. and Yokochi, T. J. *Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, 11: 1 421~1 426
- 5 Singh, A. and Wilson, S. *World J. Microbiol. Biotech.*, 1996, 12:76~81
- 6 Weete, J. D. S. *Lipids*, 1997, 8: 839~845
- 7 Iida, I. and Nakahara, T. *et al.* J. *Ferm. Bioeng.*, 1996, 1:76~78

(本文编辑:张培新)