

综 述 ·

真菌发酵生产 EPA 及 DHA 影响因素的研究进展

陈 欣

(华东船舶工业学院 生化系,江苏 镇江 212005)

摘 要 对真菌发酵生产 EPA 及 DHA 的影响因素进行综述,介绍了菌种、碳源、氮源、C/N 比、pH 值、温度、发酵时间、通气量、代谢途径的调控、种龄和接种量等因素对 EPA 及 DHA 产量的影响。

关键词 二十碳五烯酸(EPA);二十二碳六烯酸(DHA);真菌;发酵;多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid , PUFA)

中图分类号 Q939.97 文献标识码 A 文章编号 1005 - 7021(2002)05 - 0037 - 04

多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid , PUFA)中的大多数是生物活性物质的前体,具有抗氧化、抗衰老等作用^[1,2]。如二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid , EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid , DHA)等 ω -3 脂肪酸具有健脑、防治心血管疾病、风湿性关节炎、视力下降、癌症和心脏猝死等作用。尤其是 EPA 和 DHA 可以促进胎儿脑细胞发育、婴儿脑细胞生长,促进青少年提高记忆力,防止老年痴呆等功能,故有“脑黄金”之美称^[3]。天然的 EPA 及 DHA 通常存在于海洋生物中,特别是海洋浮游植物中含量丰富。目前 EPA 及 DHA 的商业来源主要是深海鱼油,由于鱼油资源有限且含量和构成受鱼的种类、季节、地理位置等因素的影响而不能满足人们的需要^[3,4]。某些微生物由于富含多不饱和脂肪酸而且其生产不受季节限制,因而成为多不饱和脂肪酸的新来源之一^[5]。真菌发酵生产

EPA 及 DHA 的质量和产量均受到菌种及发酵条件的影响。以下分别以菌种、碳源、氮源、C/N 比率, pH 值、温度、发酵时间、通气量、种龄、代谢途径的调控和接种量等重要因素讨论对发酵的影响。

1 菌 种

研究表明,能产生 EPA 及 DHA 的微生物主要有真菌和藻类^[6]。真菌含有 EPA 或 DHA 的主要有多种低等菌,如被孢霉、腐霉、虫霉、壶菌等。最近有学者报道,轮梗霉^[7]、毛霉、小克银汉霉也含 EPA^[8],红酵母^[9]、头孢霉也含 DHA^[8]。国外 EPA 和 DHA 最高发酵产量均已达到 1 g/L 以上,国内 EPA 发酵产量最高为 253.7 mg/L^[10],DHA 为 63.4 mg/L^[8],离国际水平尚有一定差距。产 EPA 及 DHA 的菌种及产量见表 1。

在菌种的改良方面,张羽航等已经成功构建了

表 1 国内、国际真菌产 EPA 和 DHA 产量比较

		菌种	产量/(mg/L)	文献来源
EPA	国内	<i>Mortierella</i> SD-95	微量	[11]
		<i>Mortierella</i> sp SM481	127	[12]
		<i>Diasporangium</i> sp.	253.7	[7]
	国际	<i>Saprolegnia</i> sp 28 YTF-1	176.4	[13]
		<i>Saprolegnia delica</i> CBS345.62	12.7	[13]
		<i>Saprolegnia delica</i> CBS534.67	15.6	[13]
		<i>Saprolegnia ferax</i> CBS534.67	30.2	[13]
		<i>Saprolegnia hypogyna</i> CBS869.72	40.6	[13]
		<i>Saprolegnia lapponica</i> CBS284.38	29.4	[13]
		<i>Saprolegnia litralis</i> CBS535.67	31.0	[13]
		<i>Saprolegnia parasitica</i> CBS540.67	36.6	[13]
		<i>Saprolegnia tuotosa</i> CBS313.81.67	22.2	[13]
		<i>Saprolegnia</i> sp 28 GTF	104.4	[13]
		<i>Mortierella elongata</i> IS-4	500	[14]
		<i>Pythium ultimum</i>	383	[15]
		<i>Mortierella</i> sp	1 350	[16]
	DHA	<i>Rhodotorula gutinis</i> GLR ₅₁₃	未列出 ¹⁾	[9]
		<i>Cephalosporium</i> sp.	63.4	[8]
		<i>Thraustochytrium aureum</i>	269.6	[17]
		<i>Schizochytrium</i> sp	2 000	[18]
		<i>Schizochytrium</i> sp SR21	3 300	[19]
DHA	国内	<i>Thraustochytrium roseum</i>	1 011	[4]
	国际			

注:1)该菌种 DHA 产量该文未说明,DHA 占总脂肪酸 3.6 %
收稿日期:2002 - 02 - 26
作者简介:陈欣 男,助教。现从事生物技术教学及研究工作。

被孢霉基因文库,并开始筛选包括脂肪酸脱饱和酶在内的有关脂肪酸合成途径酶基因,迈出了改造生产菌株的第一步,基因工程菌株的获取使大幅度提高菌株不饱和脂肪酸合成能力的愿望成为可能^[20]。

2 碳 源

不同的碳源及同一碳源的不同浓度对真菌发酵所产生的油脂成分及 PUFA 有极大的影响^[3]。戴传超等分别以麦芽糖、葡萄糖、淀粉、甘油、玉米粉、蔗糖作为碳源发酵培养头孢霉,发现以麦芽糖作为碳源时,菌丝体干重最大,而以葡萄糖作为碳源时 PUFA 的含量最高,因此认为菌丝体生长和 PUFA 积累可以分别选择麦芽糖和葡萄糖作为碳源^[5]。刘吉华等用轮梗霉发酵生产 EPA 时发现,单独以蔗糖、麦芽糖和葡萄糖作为碳源时既不利于生物量的积累,也不利于获取高产 EPA,而认为将玉米粉和葡萄糖按 1:1 混合作为碳源最为合适,能获取高产量的不饱和脂肪酸^[21]。研究 *Thraustochytrium aureum* ATCC34303 等菌株时表明,葡萄糖是较佳碳源,并认为葡萄糖能有效地转化为油脂,但同时也发现碳源浓度一般对脂质 DHA 的含量影响不明显^[4]。

3 氮 源

氮的数量和来源对真菌合成 PUFA 有重要的影响,一般来说,无机氮源有利于 PUFA 的合成^[3]。戴传超等用 3 种无机氮源和 3 种有机氮源培养头孢霉发现:以 NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和蛋白胨作为氮源均有利于 PUFA 的产生, KNO_3 、酵母膏及蛋白胨作为氮源时饱和脂肪酸的比例较高,并认为菌丝体生长可选用 KNO_3 作为氮源,积累 PUFA 宜选用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NH_4Cl 作氮源^[5]。杨革用不同的氮源培养被孢霉 SD-95 发现, NH_4Cl 和尿素抑制菌丝生长, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 虽然利于菌丝的生长和油脂的积累,但其油脂的碘值较低, KNO_3 、蛋白胨和酵母膏则被认为是良好的氮源,若从经济角度考虑,以 KNO_3 较好,因为 KNO_3 增加了油脂中 PUFA 的含量^[11]。对于 *Thraustochytrium* sp. ATCC20892 来说胰酪、蛋白胨和酪蛋白水解物是良好氮源,谷氨酸钠为最佳氮源^[4]。

4 C/ N 比率

除了碳源和氮源以外,培养基中的碳氮比也影响着真菌合成 EPA 和 DHA,一般情况下,高的 C/N 比利于脂质的积累和促进菌体的生长,但如果 C/N

比过高则脂质中的 DHA 含量会下降^[4]。

5 温 度

温度对真菌生产 EPA 及 DHA 有着极其重要的影响。许多研究表明低温能促进微生物合成不饱和脂肪酸,这是由于低温能增加氧的可溶性,产生大量胞内分子氧,这有利于需氧参与的长链脂肪酸的去饱和作用^[4]。Murata 等对 PCC1803 野生株及突变株的研究发现 PUFA 在对低温下保护光合机构有重要作用^[22],而 EPA 及 DHA 的产生也保持了微生物细胞膜低温流动性,从而维持了细胞正常的生理功能。杨革等对被孢霉 SD-95 的研究发现,低温有利于 PUFA 的形成,但不利于油脂的积累。而且低温延长了发酵周期,提高了成本,故以 20℃ 为最适培养温度^[11]。头孢霉的最适菌体生长温度为 25℃,10℃ 是积累 PUFA 的最佳温度^[5],轮梗霉也在 10℃ 时 EPA 的产量最高^[10]。

6 发酵周期

一般微生物的 PUFA 和脂肪酸的含量变化符合 S 型曲线,大约在生长的对数期末尾或稳定期的开始含量达到最大值,随后逐渐减少^[3]。被孢霉 SD-95 在培养 160 h 时菌体得率较高,而碘值在 178 h 时较高,菌丝的老化有利于 PUFA 的生成^[11]。*Thraustochytrium* 和 *Schizochytrium* 在发酵初期的生物量和脂质量呈线性增加,至对数期达到最高,此后生物量保持平稳,而脂质量下降,DHA 含量随培养时间变化并不明显^[4],对头孢霉来说,10 d 是获取最大菌丝体的最佳时间^[5]。轮梗霉则在发酵 6 d 时 EPA 及 AA(arachidonic acid,花生四烯酸)产量达到最高^[10]。

7 通气量

按 Brown et al. 1969 年报道(转引自文献[3]),增加细胞间的可用分子氧将助于催化长链不饱和脂肪酸的去饱和作用,有利于 PUFA 的合成,也能提高菌体的比生长率。但是溶解氧过高反而不利于 EPA 产量的提高,这可能是菌丝中产生的 EPA 被氧化破坏。用机械搅拌可以增加培养基中的含氧量,但是对于那些缺乏细胞壁、富含不饱和脂肪酸、细胞脆性大的菌体,机械搅拌抑制其生长^[4]。

8 起始 pH 值

真菌生产 EPA 及 DHA 时,选择合适的起始 pH 值也十分重要。中性 pH 利于菌体的生长和油脂的积累,较低的 pH 则利于 PUFA 在油脂中相对含量

的增加,但是不利于菌体的生长,所以为了获取大量的 PUFA,起始 pH 在 4.5 左右,待获得最多菌丝后,使 pH 降低至 4.0^[11]。头孢霉在 pH 6.0 时能获得最大菌丝干重(7.13 g/L),在 pH 4.0~5.0 时为积累 PUFA 的最佳起始 pH 值,pH 7.0 时 PUFA 比值最低,而碱性条件时 PUFA 又有所增高^[5],轮梗霉在中性培养基中菌丝 EPA 产量达到最高^[10]。

9 种龄和接种量

种龄显著影响 *Thraustochytrium aureum* ATCC34304 的脂质积累和 DHA 的产量,对生物量和脂质 DHA 含量影响不大,种龄 24 h 和 5 % 的接种量为宜^[4]。被孢霉 M14 的种龄以 49 h 最为适宜,菌体生物量、油脂的产量和产率都是最佳,延长或缩短种龄对生物量、油脂的产量和产率将有不同程度的影响^[2]。头孢霉发酵时,10 %~20 % 的接种量其 PUFA 的比例处于较高值,为最佳接种量^[5]。刘吉华等则认为较大的接种量能抑制轮梗霉的繁殖生长,使菌丝更早地进入油脂的积累阶段,有利于菌丝 PUFA 和脂肪酸的产生^[10]。菌种储藏温度、菌种储藏时间及发酵前菌种是否活化都极大地影响着脂肪酸组成和产量^[23]。

10 对代谢途径的研究

发酵条件的改进与优化在一定程度上可以提高真菌 EPA 及 DHA 的产量,但是这是极其有限的。除了与菌种有关以外,对 EPA 及 DHA 产量起重要作用的是对真菌代谢途径的调控,不少学者已经开始了对真菌代谢途径调控的研究。丝状真菌利用葡萄糖合成不饱和脂肪酸的代谢途径为:葡萄糖 磷酸烯醇式丙酮酸 丙酮酸 己酰 COA 丙二酸单酰 COA 硬脂酸(18:0) 油酸(18:1, 12) 亚油酸(18:2, 9, 12),然后经过 -3 和 -6 两种脱饱和方式分别生成 -亚麻酸(18:3, 9, 12, 15)和 -亚麻酸(18:3, 6, 9, 12), -亚麻酸经过脱饱和及碳链延长生成 EPA(20:5, 5, 8, 11, 14, 17)及 DHA(22:6, 4, 7, 10, 13, 16, 19), -亚麻酸经过脱饱和生成 AA(20:4, 5, 8, 11, 14),戴传超等在研究碳源对头孢霉发酵的影响时认为,油酸含量高往往转化的多不饱和脂肪酸含量低,说明在这条代谢途径中 18:1 向 18:2 的转化是关键步骤,这一步骤控制着由单不饱和脂肪酸向多不饱和脂肪酸转化的效率,由此提出了“库-流-产”的观点:总脂肪酸是库,库高,流(转化)顺,则产高^[5]。研究表明,产量高意味着生物量大,积累的油脂多,但是这并不意味着产 PUFA 也多,如果在发酵过程中不适当的改变培养条件,

PUFA 的产量仍然不会高。针对这一点,戴传超等又提出了“二步法生产 PUFA”的观点,第一步首先配置合适的发酵液获得较大的菌丝产量,第二步则改变培养条件:温度降低, pH 降低,添加碳源、氮源使积累的油脂向 PUFA 转化^[5]。目前 9 硬脂酰 COA 脱饱和酶基因和 *C. ELEGANS* 的基因被克隆, Thiede 等采用差减杂交方法分离了 9 硬脂酰 COA 脱饱和酶的 cDNA, Avery 等发现氧可以单独调节 *A. castellanii* 原位 12 脱饱和酶的合成,并可以限制已存在的 12 脱饱和酶的活力^[22]。

以传统的 DHA 合成途径是 18:2 向 18:3 转化时由 -3 和 -6 分别生成 -亚麻酸和 -亚麻酸,戴传超等在研究 1 株头孢霉时发现 18:1 的变化和 DHA 相反,这就暗示十八碳单烯酸向二烯酸的转化可能是合成 DHA 的枢纽,合成 18:2 后可顺利地合成 ALA(-linolenic acid, -亚麻酸),而其另一条支路 GLA(-linolenic acid, -亚麻酸)(-6)途径则很少进行。同时也发现,发酵产物中 16:1 的组分变化和 DHA 明显一致,从该菌发酵时的特征推测在此条件下可能存在第二条途径合成 DHA,即在液体内部先由 16:1 合成 18:1(转引自文献[8]),在液体外部从 18:1 再合成 18:2 18:3 22:6^[8]。

此外,AA 与 EPA 在一定条件下可以相互转化,诱变菌株被孢霉 SD-95 发酵液油脂的脂肪酸成分分析结果表明,经过冬化处理后菌丝中含 EPA,说明低温能诱导 AA 向 EPA 转化^[11]。对于生产 EPA 及 DHA 等 -3 脂肪酸的菌种,18:3(-3)/18:2 可以作为合成 EPA 和 DHA 能力的重要参考指标^[24],杨革^[10]及 Sakayu S^[16]添加富含 18:3(-3)的亚麻子油到发酵培养基中,获得了较高的 EPA 产量。

11 小 结

利用真菌发酵生产 EPA 及 DHA 可以克服由鱼油中获取 EPA 及 DHA 的不足,能人为地控制不利因素,保持 EPA 及 DHA 产量及含量的稳定。但是目前用真菌发酵生产 EPA 及 DHA 的研究大多数停留在实验室摇瓶培养阶段,并且多数产 DHA 的真菌的产量并不高^[4]。在研究中,不能误将油脂的含量与总脂肪酸的含量相提并论,而人为地提高了 EPA 及 DHA 的产量(在油脂中,脂肪酸总量一般仅占总脂肪酸含量的 50 %~60 %)。此外,另一些因素如实验中使用的摇瓶之间的差异,也不同程度地影响着实验的结论,这些都成为实现大规模生产 EPA 及 DHA 的障碍。对于微生物产生不饱和脂肪酸的研究已经进入了基因水平。脱饱和酶是微生物

脂肪酸代谢途径中的关键因素,脱饱和酶分为脂酰 CoA 脱饱和酶、脂酰 ACP 脱饱和酶和脂酰脂脱饱和酶三类,在真菌中普遍存在的是脂酰 CoA 脱饱和酶,它受到多种因素的调节,如果糖、胰岛素、维生素 A 以及过氧化物酶体等。已经证明,低温能够增强脂酰脱饱和酶的活力,在正常生长温度以下,膜中硬脂酸比例上升将减少膜流动性或导致凝脂相脂质的结构域的形成^[22],这将有助于我们对于真菌发酵中温度影响的研究。在对几种原生动物硬脂酰 CoA 脱饱和酶的研究时发现,在脱饱和酶的 N 端和 C 端并不存在同源性,高度的同源性存在于酶的内部。随着近年来分子生物学与基因工程技术的发展,人们已经基本上弄清了植物脂肪酸代谢的途径,还分

离出许多关键酶的基因,使得利用遗传工程手段调控脂肪酸代谢途径,改变脂肪酸成分成为可能。有人设想利用基因工程手段把微生物的某些酶基因转入植物(油菜)中,使植物(油菜)超表达已有的酶基因来提高某种脂肪酸的含量,或经过反义 RNA 及共抑制作用减少某些酶基因的表达来控制某种脂肪酸的含量。

目前从酵母和小鼠中分离出的硬脂酸 CoA 脱饱和酶基因已被转化到烟草中,转基因植物的饱和脂肪酸含量明显降低^[22],而不饱和脂肪酸含量则大大提高。我们期待着利用类似的手段改变植物的某些代谢途径,以便利用廉价的太阳能生产出更多的 EPA 及 DHA。

参 考 文 献

- [1] 张俊,邢来君,王红梅. -亚麻酸高产菌株的选育及发酵产物的分离提取[J]. 微生物学通报,1993,20(3):140~143.
- [2] 赵人俊,严虹,郑幼霞. 影响被孢霉产生含 -亚麻酸油脂的几种因素[J]. 生物工程学报,1995,11(4):361~365.
- [3] 刘吉华,袁生,戴传超. 影响真菌发酵过程中多不饱和脂肪酸积累的条件[J]. 微生物学杂志,1997,17(4):52~55.
- [4] 吴克刚,杨连生. 利用海生真菌发酵生产 DHA 研究概况[J]. 海洋科学,2000,24(7):19~21.
- [5] 戴传超,袁生,李霞,等. 培养条件对头孢霉菌丝脂肪酸组分的影响[J]. 微生物学报,2001,41(1):87~93.
- [6] 戴传超,袁生,奚洁,等. 单细胞油——一类有待开发的微生物产品[J]. 生物技术,1995,5(6):44~46.
- [7] 刘吉华,袁生,戴传超. 二十碳五烯酸等多不饱和脂肪酸高产菌的筛选[J]. 菌物系统,2000,19(3):407~409.
- [8] 戴传超,袁生,刘吉华,等. 产二十二碳六烯酸等多不饱和脂肪酸真菌的筛选[J]. 菌物系统,2000,19(2):261~267.
- [9] 施安辉,谷劲松,刘淑君,等. 粘红酵母 GLR513 产油脂的条件[J]. 生物工程学报,1998,14(2):230~232.
- [10] 刘吉华,袁生,戴传超. 轮枝霉产生 EPA、AA 发酵条件的初步研究[J]. 食品与发酵工业,2000,26(4):9~12.
- [11] 杨革,王玉萍,李翔太,等. 多价不饱和脂肪酸发酵条件的初步研究[J]. 食品与发酵工业,1997,23(2):8~13.
- [12] 杨革,徐承水. 二十碳五烯酸的菌种选育及发酵条件[J]. 菌物系统,2000,19(3):366~370.
- [13] Shirasaka N and Shimizu S.. Production of eicosapentaenoic acid by *Saprolegnia* sp. 28 YTF-1 [J]. JAOCS,1995,72(12):1545~1549.
- [14] Yamada H,Shimizu S,Shinmen Yet al. Production of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by microorganisms [J]. JAOCS,1987,64(9):1254.
- [15] Gandhi S R,Weete J D. Production of the polyunsaturated fatty acids arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by fungus *Pythium ultimum*[J]. J. of general Microbiol,1991,137,1825~1830.
- [16] Shimizu S,Kawashima H,Akimoto K,et al. Microbial conversion of an oil containing γ -linolenic acid to an oil containing eicosapentaenoic acid[J]. JAOCS,1989,66(3):342~347.
- [17] Baipai P, Baipai P K and Ward O P. Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium aureum*[J]. Applied microbial biotechnol,1991,35,706~710.
- [18] Nakahara T,Yokichi T,Higashihara T,et al. Production of docosahexaenoic acid and docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. isolated from yap Island[J]. JAOCS,1996,73(11):1421~1426.
- [19] Yaguchi T,Tanka,S,Yokochi T et al. Production of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21[J]. JAOCS,1997,74(11):1431~1434.
- [20] 张羽航,林伟铁,姚汝华,等. 被孢霉 CDNA 文库的构建及⁹脂酰脱饱和酶 CDNA 序列的筛选[J]. 微生物学报,2000,40(6):610~613.
- [21] 刘吉华,袁生,戴传超. 轮枝霉产生 EPA、AA 发酵条件的初步研究[J]. 食品与发酵工业,2000,26(4):9~12.
- [22] 张羽航,鲍时翔,郑学勤,等. 脂酰脱饱和酶的研究进展[J]. 生物技术通报,1998,4:1~9.
- [23] 戴传超,袁生,幸定坤,等. 菌种储藏对一株头孢霉菌产 DHA 的影响[J]. 南京师大学报,2000,23(2):90~93.
- [24] 戴传超,袁生,李霞,等. 培养条件对头孢霉脂肪酸长链和⁻³脱饱和的影响[J]. 菌物系统,2001,20(2):201~206.

Factors affect the Production of EPA and DHA by Fungal Fermentation

CHEN Xin

(Dept. of Biochem., Coll. of East China Shipbuilding Industry. Zhenjiang 212005)

Abstract Factors that affect the production of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) by fungi were reviewed. They include carbon and nitrogen sources, C/N ratio, pH, temperature, culture time, inoculation time, ventilation, and metabolic pathway controlling.

Keywords eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), fungi, fermentation, polyunsaturated fatty acid (PUFA).