

发酵法生产多不饱和脂肪酸

张燕鹏^{1,2} 黄凤洪^{2*} 杨湄² 夏伏建²

(1 华中农业大学食品科技学院 武汉 430070 2 中国农业科学院油料作物研究所 武汉 430062)

摘要 简要介绍微生物产多不饱和脂肪酸的生化研究现状,着重从高产菌株的筛选、工程菌株的构建、发酵条件及产业化现状等方面论述微生物发酵生产多不饱和脂肪酸的主要研究进展;概述多不饱和脂肪酸的提取制备技术,并对发酵法生产多不饱和脂肪酸研究目标和发展前景提出了建议。

关键词 多不饱和脂肪酸 微生物 发酵 提取纯化

中图分类号 Q815

多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)一般是指含两个或两个以上双键,碳链长度在十八或十八以上脂肪酸,主要包括 γ -亚麻酸(GLA)、二高- γ -亚麻酸(DHGLA)、花生四烯酸(ARA)、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)等。PUFA具有许多重要生理活性。研究表明PUFA可以转化为前列腺素类化合物(前列腺素PG、凝血烷和环前列腺素)和白三烯等,这些物质具有免疫调节作用^[1]。此外,DHA对脑细胞分裂、增殖和神经传导突触生长、发育发挥着重要作用^[2~3]。有报道还称EPA可以治疗精神分裂症,对癌症患者也有一定疗效^[4~6]。随着人们对PUFA生物活性认识不断提高,市场对PUFA的需求也日益增强,仅仅依靠从月见草、黑加仑等植物籽油中提取PUFA已无法满足。虽然从海洋动物如甲壳类和鱼类中也可提取PUFA,但成本太高。而利用微生物生产PUFA,具有生产周期短、生产所占空间小,不受原料、产地和季节限制等独特优势。因此利用微生物发酵生产PUFA已成为当前研究的热点和发展趋势^[7]。

1 PUFA在微生物中的合成

一般认为PUFA在微生物体内合成是以饱和脂肪酸——硬脂酸为底物,通过脱饱和酶的作用,在特定碳原子处插入双键,然后再由碳链延长系统合成所

需的PUFA。其主要催化酶是结合脱饱和酶系,整个脱饱和酶系由三个酶组成,即尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸-细胞色素b5(NADH:Cytb5)还原酶、细胞色素b5(Cytb5)和末端去饱和酶^[8]。不同脱饱和酶在脂肪酸链中插入双键位置不同,研究其作用机制及活性影响因素有利于高产菌株的筛选及优化发酵工艺。 $\Delta 6$ 脱饱和酶在亚油酸的第6位碳原子引入双键生成GLA,再经碳链延长与 $\Delta 5$ 和 $\Delta 4$ 脱饱和酶的脱氢作用分别插入双键,进一步合成了ARA、EPA和DHA。高糖化合物、果糖、胰岛素等对脱饱和酶合成与活性具有促进作用,低温有利于脱饱和酶活力提高;而环己酰亚胺和三碘甲酰原氨酸等不利于脱饱和酶表达。

最新研究表明,微生物中PUFA的合成尚有其他途径,如真菌中脂肪酸脱饱和酶还可以催化与甘油相连接脂肪酸脱饱和,且所作用的脂肪酸并不一定要与辅酶A(CoA)结合。Jones^[9]认为变形虫*Acanthamoeba castellanii*中的 $\Delta 12$ 脱饱和酶是酯酰-酯脱氢酶类型。Spychalla^[10]在线虫*Caenorhabditis elegans*中发现fat1脱饱和酶是甘油酯脱饱和酶。此外,据Colin Ratledge^[7]报道,在一些微生物如*Schizochytrium* sp.和*Ulkenia* sp.中合成DHA的途径与其他真核真菌不同,是通过类似细菌的多聚乙酰合酶途径(PKS)来合成DHA的。

2 PUFA的微生物发酵生产

微生物发酵生产PUFA的基础研究主要集中在高产菌株的筛选、工程菌株的构建和发酵工艺的改进等

收稿日期:2006-10-31 修回日期:2007-01-30

* 通讯作者,电子信箱:huangfh@oilcrops.cn

三大方面,旨在提高 PUFA 产量,降低成本,更好地推动微生物发酵生产 PUFA 的产业化。

2.1 高产菌株的筛选与工程菌株的构建

菌株的选择直接关系到油脂产量和目的多不饱和脂肪酸含量,选择具有工业化生产价值的菌株必须具备以下几个条件:(1)油脂含量丰富,油脂中目的 PUFA 含量较多;(2)生长繁殖速度快,杂菌污染困难;(3)能适应工业化深层培养,装置简单;(4)风味良好,安全无毒,易消化吸收^[11]。目前在 PUFA 生产中具有开发潜力主要有霉菌和藻类。藻类中可以用来生产 PUFA 主要有螺旋藻(*Spirulina* spp.)、小球藻(*Chlorella* spp)、紫球藻(*Porphyridium cruentum*)、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)、隐甲藻(*Cryptocodinium cohnii*)、绿光等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)等^[12]。它们生产的目的 PUFA 含量最高可以达到总脂肪酸的 50%;常见产油霉菌有:土霉菌(*Aspergillus terreus*)、紫梗麦角菌(*Claviceps purpurea*)、高粱褶抱黑粉菌(*Tolyposporium ehrenbergii*)、高山被孢霉(*Mortierella alpina*)、深黄被孢霉(*Mortierella isabellina*)、拉曼被孢霉(*Mortierella ramanniana*)、雅致小克银汉霉(*Cunninghamella elegans*)等^[13]。

高产菌株的筛选可以采用物理和化学诱变法及利用基因工程和原生质融合技术进行菌种改造等以获得高产工程菌株。张道海等^[14]利用高山被孢霉(*M. alpina*)经钴 60、 γ -射线诱变得到突变株 MA-90,在最佳培养条件下 GLA 的产量达到 1.157g/L。黄建忠等^[15]以深黄被孢霉(*M. isabellina*) AS313410 为出发菌株,经紫外线(UV)、二巯酸(DES)和亚硝基胍(NTG)等复合诱变选育得到 M018 突变株,通过在 60L 发酵罐中三级发酵可使生物量达到 37.8g/L,油脂含量高达 79.2%,油酸、亚油酸、GLA 总量达到 68.4%。袁成凌等^[16]采用低能离子注入法对高山被孢霉(*Mortierella alpina*)进行诱变选育,经连续诱变处理,最终获得一株 ARA 稳定高产菌株 I49-N18,其 ARA 得率高达 4.66g/L。该技术通过微生物发酵法实现了 ARA 规模化生产,在 50t 发酵罐中生产 ARA 产量平均达 5.11g/L。

通过对微生物合成 PUFA 途径的研究,还选育了某些特定位置的脱饱和缺陷菌株来发酵生产高含量的 PUFA。为提高高山被孢霉中 EPA 含量, Jareonkitmongkol 等^[17]筛选出一株 Δ -12 脱饱和缺陷菌株,培养 10 天后,其 EPA 含量达到 1.0g/L,生物量达到 6.4g/L。Kawashima 等^[18]同样利用高山被孢

霉选育出一株 Δ -5 脱饱和缺陷型菌株,发酵培养 12 天后,其 DHGLA 含量提高到 7.0g/L,占总脂肪酸含量的 43.9%,油酸和亚油酸含量分别为 7.5%和 4.4%, GLA 含量为 3.2%,显示了良好的 DHGLA 生产能力。

近年来国内外在分子水平上对微生物脱饱和也展开了大量研究,旨在通过基因工程手段来改造传统产油微生物,以提高其合成 PUFA 能力,使微生物来源的 PUFA 在经济上更具有竞争力。1999 年 Eiji Sakurada 等^[19]从高山被孢霉 IS-4(*Mortierella alpina* IS-4)中分离克隆了 Δ 6 脱饱和酶基因,在米曲霉中进行了表达, GLA 在总脂肪酸中的含量达到了 25.2%。同年 Huang 等^[20]从高山被孢霉中克隆了 Δ 12 和 Δ 6 脱饱和酶基因,并分别在酵母中得到表达,结果发现 Δ 12 脱饱和酶基因在合适的培养条件下产生亚油酸达到总脂肪酸的 25%; Δ 6 脱饱和酶基因在添加外源亚油酸的基础上产生 GLA 含量可达到总脂质量的 10%;当同时在酵母菌中表达 Δ 12 和 Δ 6 脱饱和酶基因时,其产生的 GLA 达总脂肪酸含量的 8%。米曲霉和酵母是很早被用作食品生产的菌种,因此构建米曲霉和酵母工程菌在食品生产应用中具有良好前景。最近 Seiki Takeno 等^[21]又报道在高山被孢霉 IS-4(*Mortierella alpina* IS-4)中转入 Zeocin 抗性基因,通过抗性筛选得到菌株 pDZeoGLELO transformant #63,其 ARA 产量较原始菌株有很大提高,为进一步提高和控制真菌脂肪酸的产量和组成建立了一个良好的转化体系。国内在这方面也积极展开了研究。张羽航等^[22]成功建立了被孢霉基因文库,并开始筛选包括脂肪酸脱饱和酶在内有关脂肪酸合成途径的基因。南开大学较早进行了脱饱和酶分子生物学研究,2001 年刘宁和等^[23]报道把高山被孢霉 ATCC16266 Δ 6-脂肪酸脱饱和酶基因在酿酒酵母中表达,构建了酵母工程菌 YMAD6,可以把底物亚油酸转化为 GLA,其含量占总脂肪酸的 31.6%,随后李明春等^[24]将从高山被孢霉中克隆得到的 Δ 6-脂肪酸脱饱和酶基因同源重组整合到毕赤酵母菌中,生成的 GLA 占总脂肪酸含量的 12.6%。总之,利用基因工程技术构建产 PUFA 的工程菌,主要是把具有产 PUFA 能力,但生长缓慢的菌株的基因克隆到生长迅速可高密度培养的微生物如酵母菌中,以降低生产成本。也有人提出可以通过增加编码脱饱和酶基因拷贝数来提高微生物的产量而提高 PUFA 产量^[25]。

虽然借助现代分子生物学技术构建工程菌株有利于推进 PUFA 的发酵生产,但其基因表达受到宿主中底物的影响,并且宿主较低的油含量以及遗传稳定性也都会影响工程菌构建研究和推广的进一步发展。而且发酵生产的 PUFA 大多应用于食品行业,构建的工程菌的毒理安全性尚需实验研究,因此利用基因工程菌发酵生产 PUFA 仍需要深入的研究。

2.2 发酵条件对 PUFA 产量的影响

同一种微生物在不同发酵条件下,其生物量、油脂产量、油脂组成成分也会不同。对 PUFA 产量产生影响的主要因素有培养基组成和培养条件。其中培养基组成包括碳源、氮源、C/N 比、无机盐、微量元素等,培养条件包括发酵温度、pH、通气量等。

2.2.1 培养基组成

培养基组成对菌体生物量、油脂含量以及 PUFA 产量有很大影响。微生物可以利用的碳源很多,如葡萄糖、果糖、麦芽糖、淀粉、甘油等。无论是提高微生物生物量还是油脂含量以及 PUFA 产量,葡萄糖都是比较理想的碳源。复合碳源的利用可以在某些方面弥补单一碳源的不足,如吴克刚^[26]在利用破壶蕈霉 *roseum* ATCC28210 产 DHA 研究中发现,果糖和半乳糖能够促进 DHA 的合成,增加 DHA 在油脂中的含量,但并不利于微生物生长和油脂的积累,在整体上不如葡萄糖作为碳源时 DHA 的产量高。随后吴克刚又发现破壶蕈霉 *roseum* ATCC28210 以葡萄糖为主要碳源,分别添加果糖和半乳糖构成复合碳源,对其生物量和油脂含量几乎没有影响,但 DHA 含量分别提高 10.7% 和 7.3%,从而使 DHA 产量每升分别提高了 75mg 和 45mg。王菊芳等^[27]在研究隐甲藻 (*Cryptocodinium cohnii* ATCC30556) 悬浮培养生产 DHA 时,同样采用了葡萄糖/甘油 (1:1, w/w) 复合碳源,生物量上与单一使用葡萄糖没有区别,但 DHA 产量为 0.54g/L,高于单一使用葡萄糖时的 0.28g/L。此外,碳源添加量也会影响 PUFA 的产量,合适的碳源浓度可以得到最大的生物量和 PUFA 产量,但当浓度超过最佳适量时,生物量和 PUFA 产量反而会下降。被孢霉 *M. alpina* ATCC32222 以葡萄糖为单一碳源,在浓度为 6.0% 时有最高的生物量和 PUFA 产量,但当葡萄糖浓度增加到 8.0% 时生物量和 PUFA 产量均会随之下降^[28]。为减少在工业化生产中使用葡萄糖作为碳源的成本,可以利用一些廉价碳源作为底物。据报道,用亚毒水平乙酸钠 (2g/L) 为碳源,卷枝毛霉 (CBS203.28) 能积累粗油脂达 28%,其中 91% 为中性甘油三酯,

GLA 产量为 40mg/g 细胞^[29]。咸漠等^[30]利用深黄被孢霉以十八醇为底物合成不饱和脂肪酸,经研究发现在优化培养基中于 23℃ 培育 5 天,获得的生物量为 9.1g/L,油脂含量为干燥菌丝的 47%,十八醇的转化率为 67.2%,展示了微生物催化烷烃合成不饱和脂肪酸的良好前景。

不同氮源对不同菌体的生物量以及油脂含量影响也不同。赵人俊等^[31]在研究被孢霉 M14 菌株产脂条件时,认为无机氮有利于不饱和脂肪酸产生,有机氮有利于细胞增殖,低 C/N 比有利于菌丝体产量的提高,高 C/N 比则促进菌体细胞内油脂的合成。Hung-Der Jang 等^[28]用高山被孢霉 *M. alpina* ATCC32222 发酵生产 PUFA 时认为当硝酸钾和酵母产以 2:1 (w/w) 混合使用时其 PUFA 产量最高。

在海生真菌和藻类的培养中还需加入一定量的无机盐离子。Weete 等^[32]发现在培养破壶蕈霉 *Thraustochytrium* sp. ATCC26185 时,如不添加矿物盐,菌体生物量和油脂含量均大幅下降。微量金属离子如 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 的适量添加同样可以提高产油速度和产油量。酵母产油试验表明,在培养基中增加铁离子浓度可以加快油脂合成的速度,增加 Zn^{2+} 浓度可提高积累量。还有研究表明, Mg^{2+} 在 2~500mg/L 浓度范围内有利于 PAR 的积累^[33]。这些可能与金属离子对微生物体内酶的激活有一定关系,甚至某些金属离子就是某些酶的组成部分。

2.2.2 培养条件

培养条件主要包括 pH、温度、通气量等。不同种类的微生物适宜的培养基 pH 范围不同,酵母菌为 3.5~6.0,霉菌为中性至偏碱性,藻类一般适宜中性或微碱性。发酵培养时均应保持 pH 在菌体最适范围内,但随着发酵培养的进行,其 pH 会发生变化,不利于微生物的生长和油脂的积累,因而经常加入缓冲液来调节和保持最适 pH。

温度对于菌体的生长和油脂积累以及 PUFA 的合成同样起着重要作用,每种微生物都有其最适生长温度。许多研究表明低温培养有利于 PUFA 的形成,这是因为微生物为适应低温环境要增加细胞膜的流动性,而不饱和脂肪酸越多,细胞膜的流动性就越大;其次是低温下细胞的溶氧量会增加,而生成 PUFA 的脱氢反应由需氧酶所催化。但低温不利于油脂积累并会延长发酵周期,从而增加成本。为解决这一矛盾,可采用变温的方法培养微生物。Singh 等^[34]在培养破壶蕈霉 *Thraustochytrium* sp. ATCC20892 时采用变温培养,菌体

先在 25℃ 培养 1 天, 然后升温至 15℃ 培养 3 天, 结果 DHA 含量大幅增加。

微生物中的油脂是由基质中糖类还原而成, 当微生物合成油脂时需供给大量氧气, 且在脱饱和作用时也需要分子氧参与, 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气含量有利于不饱和脂肪酸的合成。对于海生真菌和藻类, 光照强度对其生长速率和 PUFA 生产都有一定影响。破伤菌 *Clostridium ATCC34304* 在 33w 荧光灯光照下, 生物量和 DHA 产量都比黑暗培养时高^[35]。

2.3 发酵法生产 PUFA 的产业化现状

微生物发酵法生产 PUFA 具有生产周期短、生产所占空间小、不受原料、产地和季节限制等独特优势, 因此国内外许多国家已经开始了发酵法生产 PUFA 的产业化。1986 年以来, 英国和日本相继实现了 PUFA 的规模化生产, 英国 John & Sturge 公司发酵法生产 GLA 的年产量为 100t 以上。国内武汉烯王生物工程有限公司在 2000 年引进中国科学院等离子物理研究所的 ARA 高产菌发酵技术, 利用 50m³ 发酵罐生产时, ARA 在总脂肪酸中的含量达到 50% 以上, 干菌体得率超过 3%, 总油脂含量超过 30%。2004 年, 烯王公司又与美国嘉吉公司合作共同开发生产 ARA, 其产品已经进入美国和欧洲市场。意大利 DSM 公司利用 100m³ 的发酵罐, ARA 占总脂肪酸的 49%, 油脂含量超过 40%, 2003 年 ARA 产量达到 480t, 主要用作婴儿食品添加剂。Martek 公司利用 100m³ 的发酵罐主要生产 DHA, 油脂含量超过 40%, DHA 占总脂肪酸的 39%, 年产 DHA 240t, 并且与 DSM 公司合作把 DHA 与 ARA 以 1:2 (v/v) 的比例混合专用于婴儿食品。与国外相比我国 PUFA 发酵研究比较晚, 规模和产量不如国外。目前欧美和日本等经济发达国家对发酵法生产 PUFA 的开发和应用正处于快速增长的阶段, 而我国目前仅有武汉烯王生物工程有限公司等少数企业进行了工业化生产。因此我们要加快工业化进程抢占此类食品在国内市场。

3 PUFA 的提取与纯化

PUFA 的提取与纯化是微生物发酵工业化生产中的关键技术。PUFA 在原料中的浓度一般不太高, 且在提取纯化过程中, 易受氧、光、热等影响而发生氧化、聚合、降解等反应。此外, 作为医药和保健食品原料, 还要求在提取纯化过程中不能含有色素、臭味以及残

留有机溶剂等物质。大多数从鱼油中提取 PUFA 的方法也可用于微生物脂质中 PUFA 的提取。

3.1 油脂提取

微生物油脂存在于细胞内, 其中有些油脂与蛋白质或糖类呈结合状态, 且细胞壁较坚韧, 因此在使用有机溶剂浸提前, 必须对菌体细胞进行预处理。常用的预处理方法主要有 (1) 干菌体粉碎法: 将菌体与细砂一起粉碎; (2) 菌体稀盐酸共煮法; (3) 菌体自溶法: 菌体在 50℃ 下保温 2~3d; (4) 菌体变性法: 用乙醇或丙酮使结合蛋白质变性。常用于微生物油脂浸提的有机溶剂主要有乙醚、石油醚、异丙醚、氯仿、乙醚-乙醇、氯仿-甲醇、己烷等。但通常干菌体由于颗粒较细, 浸提时溶剂渗透性差, 油脂不易浸出, 因此可在浸提前对干菌体进行造粒处理, 以提高浸提设备利用率。随着科技的发展, 一些高新技术也逐渐应用到微生物油脂的提取中。例如超声波的空化效应和机械振动等作用在细胞壁破碎方面显示了良好的效果。临界流体细胞破碎技术、超声波萃取技术以及微波萃取技术将逐渐应用于微生物油脂领域, 这些技术的应用将会大大提高微生物油脂提取的效率。

3.2 PUFA 的纯化

微生物油脂中的 PUFA 往往需进行分离和纯化。用于 PUFA 纯化的方法有很多种, 但目前仅有少量几种方法适合于大规模工业化生产。主要包括低温结晶法、临界流体萃取法、尿素包合法、吸附分离法、分子蒸馏法以及膜分离法等。

低温结晶法是利用低温下不同脂肪酸或脂肪酸盐在有机溶剂中溶解度不同来进行分离纯化。一般情况下脂肪酸在有机溶剂中的溶解度随碳链长度的增加而减小, 随双键数的增加而增加, 这种溶解度差异随温度降低表现更为显著。Yokochi 等^[36]发现从被孢霉油脂中提取 GLA 时, 使用不同溶剂和在不同温度下提取效果不同, 当使用丙酮溶剂在 -20℃ 进行提取时效果明显优于使用丙酮在 4℃ 和石油醚在 -20℃ 时的提取效果。尿素包合法是按饱和度不同来分离脂肪酸, 是一种比较常用的分离纯化的方法, 但难以将双键脂肪酸分开。周建建^[37]采用尿素包合法对被孢霉产生 γ -6 系列 PUFA 进行分离纯化, 其纯度由最初的 20% 提高到了 80%, Zhu 等^[38]同样用尿素包合法对高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) 油脂中的 ARA 进行了富集纯化, ARA 的含量达到了 57.1%。临界

CO₂ 超临界流体是利用各组分分子极性不同, 在 CO₂ 中溶解度不同而进行分离的, 它可以有效分离链长差别大的脂肪酸, 但难以分离碳数相近但饱和度不同的脂肪酸。禹慧明等^[39] 研究夹带剂对超临界 CO₂ 萃取被孢霉中 GLA 油脂的影响发现, GLA 油脂的提取宜用较低极性溶剂。溶剂极性过高时, 虽然可以降低操作压力, 但 GLA 含量大幅度降低; 溶剂极性太低时, 油脂萃取量减少, GLA 含量不变, 但总量下降。脂肪酶可以对多种脂肪酸的甘油三酯进行选择性的水解, 利用脂肪酶的这一性质, 可以高度富集 PUFA 甘油三酯。此外, 还可利用脂肪酶在有机相介质中进行转酯和酯化合成反应来提高 PUFA 在甘油三酯中的含量。Mukherjee^[40] 分别利用 *R. miehei* 和 *C. rugosa* 脂肪酶通过正丁醇酯化反应, 将真菌油脂中 GLA 含量从 10% 分别提高到 47% 和 69%。然而, 上述每一种方法单独使用都很难得到高纯度的 PUFA, 如何将两种或多种方法结合分离提纯 PUFA 已成为今后研究的重点。

4 问题与建议

利用微生物发酵法生产 PUFA 是继动物和植物来源后的又一个新兴的开发途径, 其优势十分明显, 针对目前的研究现状与存在问题, 对发酵法生产 PUFA 的研究目标建议如下: (1) 充分利用现代生物技术选育高产稳定的菌种; (2) 研究 PUFA 的合成途径和代谢调控机制; (3) 开展发酵动力学研究与优化控制; (4) 改进生物反应, 提高发酵速率; (5) 建立简单高效的 PUFA 提取纯化系统; (6) 探索微生物可以利用的廉价底物, 以降低生产成本。

参考文献

- [1] Owen P Ward, Ajay Singh. Omega-3/6 fatty acid: Alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 2005, 1 ~ 26
- [2] 缪兵, 张安中. Omega-3 多不饱和脂肪酸与生长发育. *中国药理学报*, 1995, 11(1): 5
Miu B, Zhang A Z. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 1995, 11(1): 5
- [3] 杨晓, 戴有盛, 陈洪. 鱼油对小鼠脑磷脂中脂肪酸组成的影响. *营养学报*, 1994, 16(2): 164
Yang X P, Dai Y S, Chen H. *Acta Nutrimenta Sinica*, 1994, 16(2): 164
- [4] Fenton WS, Hibbeln J, Knable M. Essential fatty acids, Lipid membrane abnormalities, and the diagnosis and treatment of schizophrenia. *Bio-Psychiatry*, 2000, 47(1): 8 ~ 21
- [5] Peet M. Nutrition and Schizophrenia: Beyond omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2004, 70(4): 417 ~ 422
- [6] Tisdale MJ. Wasting in cancer. *Nutr*, 1999, 129(1): 243 ~ 246
- [7] Colin Ratledge. Fatty Acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 2004, 86: 807 ~ 815
- [8] 徐华顺, 罗玉, 李思光, 等. 微生物发酵产油脂的研究进展. *中国油脂*, 1999, 24(2): 34 ~ 37
Xu H S, Luo Y P, Li S G, et al. *China Oils and Fats*, 1999, 24(2): 34 ~ 37
- [9] Jones AL, Lloyd D. Harwood. *Biochem*, 1993, 296: 183 ~ 188
- [10] Spychalla JP, Kinney AJ, Browse J. Identification of an animal ω -3 fatty acid desaturase by heterologous expression in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 1142 ~ 1147
- [11] 颜治, 陈晶. 微生物油脂及其开发利用研究进展. *粮油加工与食品机械*, 2004(3): 43 ~ 44
Yan Z, Chen J. *Machinery for Cereals Oil and Food Processing*, 2004(3): 43 ~ 44
- [12] 吴时敏. 功能性油脂. 北京: 中国轻工业出版社, 2001. 463 ~ 466
Wu S M. *Functional Fats and Oils*. Beijing: China Light Industry Press, 2001. 463 ~ 466
- [13] 蒲海燕, 贺稚非, 刘春芬, 等. 微生物功能性油脂研究概况. *粮食与油脂*, 2003(11): 12 ~ 14
Pu H Y, He Z F, Liu C F et al. *Cereal and Oils*, 2003(11): 12 ~ 14
- [14] 张道海, 王未名, 陆文华, 等. 被孢霉 MA-90 发酵生产 γ -亚麻酸的研究. *生物技术*, 1995, 5(1): 27 ~ 29
Zhang D H, Wang W M, Lu W H, et al. *Biotechnology*, 1995, 5(1): 27 ~ 29
- [15] 黄建忠, 施巧, 周晓兰, 等. 深黄被孢霉高产脂变株的选育及其发酵研究. *微生物学通报*, 1998, 25(4): 187 ~ 191
Huang J Z, Shi Q Q, Zhou X L, et al. *Microbiology*, 1998, 25(4): 187 ~ 191
- [16] 袁成凌, 王纪, 姚建铭, 等. 低能离子注入花生四烯酸产生菌诱变选育及其产业化研究. *高技术通讯*, 2003. 6: 22 ~ 25
Yuan C L, Wang J, Yao J M, et al. *Chinese High Technology Letters*, 2003. 6: 22 ~ 25
- [17] Jareonkitmongkol S, Shimizu S, Yamada H. Production of eicosapentaenoic acid-containing oil by a delta-12 desaturase-defective mutant of *Mortierella alpina* 1S-4. *JAOCS*, 1993, 70: 119 ~ 123
- [18] Kawashima H, Akimoto K, Higashiyama K, et al. Industrial production of dihomogamma-linolenic acid by a delta 5-desaturase-defective mutant of *Mortierella alpina* 1S-4 fungus. *JAOCS*, 2000, 77: 1135 ~ 1138

- [19] Eiji Sakuradani, Michihiko Kobayashi, Sakayu Shimizu. $\Delta 6$ -Fatty acid desaturase from an arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus gene cloning and its heterologous expression in a fungus, *Aspergillus*. *Gene*, 1999, 238(2): 445 ~ 453
- [20] Huang Y S, Chaudhary S, Thurmond J M, et al. Cloning of $\Delta 12$ -and $\Delta 6$ -desaturases from *Mortierella alpina* and recombinant production of γ -linolenic acid in *S. cerevisiae*. *Lipids*, 1999, 34: 649 ~ 659
- [21] Seiki Takeno, Eiji Sakuradani, Akiko Tomi, et al. Transformation of oil-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, using zeocin, and application to arachidonic acid production. *Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100(6): 617 ~ 622
- [22] 张羽航, 林伟铁, 姚汝华, 等. 被孢霉 cDNA 文库构建及 $\Delta 9$ 脱氢酶 cDNA 序列筛选. *微生物学报*, 2000, 40(6): 610 ~ 613
- Zhang Y H, Lin W T, Yao R H, et al. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40(6): 610 ~ 613
- [23] 刘芳, 李明春, 胡国武, 等. 高山被孢霉 ATCC16266 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中表达. *生物工程学报*, 2001, 17(2): 161 ~ 164
- Liu L, Li M C, Hu G B, et al. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001, 17(2): 161 ~ 164
- [24] 李明春, 孙颖, 张琦, 等. 高山被孢霉 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因在毕赤酵母中胞内表达. *生物工程学报*, 2004, 1(1): 34 ~ 37
- Li M C, Sun Y, Zhang Q, et al. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2004, 1(1): 34 ~ 37
- [25] 张鹏, 杨培林, 戴美学. 微生物多不饱和脂肪酸的研究进展. *微生物学杂志*, 2006, 26(1): 101 ~ 105
- Zhang P, Yang P L, Dai M X. *Journal of Microbiology*, 2006, 26(1): 101 ~ 105
- [26] 吴克刚, 培养破产产 *Thraustochytrium roseum* 产 DHA 及其脂质氧化稳定性研究. 广州: 华南理工大学, 2001
- Wu K G. *Studies on Docosahexaenoic Acid production by culture of Thraustochytrium roseum and the oxidative stability of lipids of Thraustochytrium roseum*. Guang Zhou: South China University of Technology, 2001
- [27] 王菊芳, 梁世中, 陈峰, 等. 隐甲藻 (*Cryptocodium cohnii*) 悬浮培养生产 DHA. *无锡轻工大学学报*, 2002, 21(4): 344 ~ 346
- Wang J F, Liang S Z, Chen F, et al. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2002, 21(4): 344 ~ 346
- [28] Hung-Der Jang, Yuh-Yih Lin, Shang-Shyun Yang. Effect of culture media and condition on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*. *Bioresource Technology*, 2005, 96: 1633 ~ 1644
- [29] 吴时敏. 功能性油脂. 北京: 中国轻工业出版社, 2001, 459 ~ 460
- Wu S M. *Functional Fats and Oils*. Beijing: China Light Industry Press, 2001, 459 ~ 460
- [30] 咸漠, 同吉昌, 甄明, 等. 深黄被孢霉催化转化十八醇合成不饱和脂肪酸. *高等学校化学学报*, 2001, 22(11): 1881 ~ 1884
- Xian M, Yan J C, Zhen M, et al. *Chemical Journal of Chinese University*, 2001, 22(11): 1881 ~ 1884
- [31] 赵人俊, 严虹, 郑幼霞, 等. 影响被孢霉产生含 γ -亚麻酸油脂的几种因素. *生物工程学报*, 1995, 11(4): 361 ~ 365
- Zhao R J, Yan H, Zheng Y X, et al. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1995, 11(4): 361 ~ 365
- [32] Weete J. D, Kim H, Gandhi S. R. et al. Lipids and ultra-structure of *Thraustochytrium* sp. ATCC26185. *Lipids*, 1997, 8: 839 ~ 845
- [33] 董欣荣, 曹健. 微生物功能性油脂的研究. *郑州粮食学院学报*, 1999, 20(4): 11 ~ 12
- Dong X R, Cao J. *Journal of Zhengzhou Grain College*, 1999, 20(4): 11 ~ 12
- [34] Singh A, Wilson S, Ward O P. Docosahexaenoic acid production by *Thraustochytrium* sp. ATCC20892. *World J. Microbiol. & Biotech*, 1996, 12: 76 ~ 81
- [35] Bajpai P K, Bajpai P, Ward O P. Optimization of production of DHA by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *Am Oil Chem. Soc*, 1991, 7: 509 ~ 514
- [36] Yokochi T, Usita M T, Kamisaka Y, et al. Increase in the linolenic acid content by solvent winterization of fungal oil extracted from *Mortierella* Genus. *Am Oil Chem Soc*, 1990, 67: 846 ~ 851
- [37] 周萍, 龙江, 朱敏, 等. 被孢霉产 n-6 多不饱和脂肪酸的分离纯化. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2002, 36(3): 341 ~ 344
- Zhou P P, Yu L J, Zhu M, et al. *Journal of Central China Normal University(Nat. Sci.)*, 2002, 36(3): 341 ~ 344
- [38] Zhu M, Zhou P P, Yu L J. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. *Bioresource Technology*, 2002, 84: 93 ~ 95
- [39] 禹慧明, 姚汝华, 林伟铁. 夹带剂对超临界 CO₂ 萃取被孢霉中 γ -亚麻酸油脂的影响. *中国油脂*, 1999, 24(2): 38 ~ 39
- Yu H M, Yao R H, Lin W T. *Chinese Oils and Fats*, 1999, 24(2): 38 ~ 39
- [40] Mukherjee K D, Kiewitt I. Enrichment of γ -linolenic acid from fungal oil by Lipase-catalyzed reactions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, 35: 579 ~ 584

Production of Polyunsaturated Fatty Acid by Microbial Fermentation

ZHANG Yan-peng^{1,2} HUANG Feng -hong² YANG Mei² XIA Fu -jian²

(1 College of Food Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(2 Oil Crops Research Institute, CAAS, Wuhan 430062, China)

Abstract This article introduced the biochemical study on producing polyunsaturated fatty acids by microorganism and emphasize the new advance in production of polyunsaturated fatty acid by microbial fermentation. We review the recent progress on studies of screening of high yield mutant strain through induced mutation and gene engineering and discuss the important factors that work during the process in the production of PUFA. The separation, purification of PUFA are also briefly investigated. At last the development prospects of PUFA production by Microbial Fermentation were briefly outlined.

Key words Polyunsaturated fatty acids (PUFA) Microorganisms Fermentation Separation and purification

《中国生物产业发展报告(2006)》简评

受国家发改委高技术产业司委托,中国生物工程学会从2002年起组织专家编写《中国生物产业发展报告》,2002至2005年版的书名是《中国生物技术产业发展报告》,鉴于目前国际上把生物技术产业核定为生物产业,2007年1月1日起报告始用《中国生物产业发展报告》。

生物产业一般被认为是以现代生命科学理论为基础,利用生物体及其细胞、亚细胞和分子等组成部分,结合工程学、信息学等开展研究及制造产品,或改造动物、植物、微生物等并使其具有所期望的品质、特性,进而为社会提供商品和服务手段的综合性技术体系。根据生物产业发展历史、现状及未来趋势,生物产业又分为传统生物产业、现代生物产业和未来生物产业。学术界又将现代生物产业细分为生物农业、生物医药、生物能源、生物制造、生物服务等。

2002至2005年版的报告不仅对现代生物产业进行方方面面不同程度的介绍,对传统生物产业和未来生物产业也作了不同程度的阐述,报告出版后即得到社会各界的广泛关注,对促进我国生物技术产业发展也起到了有益的作用。

2006年版报告汇集了国家发改委在制定《生物产业发展“十一五”规划》和促进生物产业发展的政策过程中的一些研究成果,并请有关专家对生物技术的发展方向、产业发展重点、专利授权和投资情况进行了分析,对生物产业集聚化和国际化发展的有关情况进行了介绍。

2006年版报告还有以下一些特点。“生物产业发展政策研究”一文中,作者用通俗易懂的语言对全球生物产业发展最新态势作了清楚的阐述,在介绍国外生物产业政策的同时对我国生物产业发展政策的制定提出了合理化建议。在生物农业部分,作者在转基因作物方面紧紧围绕着我国抗虫棉以及其他作物产业化情况进行了勾画,对产业化发展态势进行了分析。在动物生物产业方面,作者界定我国动物产业化现状,并对转基因动物制药和克隆动物前景指出了方向。在生物医药产业化部分,作者则指出我国之所以在生物制药领域远远落后于欧美发达国家,主要就是在哺乳动物细胞表达重组蛋白及哺乳动物细胞大规模培养生产药物方面与国外差距太大。生物医药部分还指出我国在抗体药物的产业化方面的问题,故此专门安排章节讨论抗体药物。鉴于国家在“十一五”规划中提出“自主创新、重点跨越、支撑发展、引领未来”,所以报告专门安排了“生物技术知识产权统计分析”等。

当今社会,资源匮乏,能源短缺、环境污染日益严重,应用现代生物技术对传统制造技术进行改造是一种达到高效、节能、低污染或无污染的生产手段,生物制造产业实行工农一体化,可以在源头上消灭工农差别,为根本上解决“三农”问题提供了思路,“生物制造”章节就基于此。

我们相信,关注和支持生物产业的各界人士在阅读本报告后,将会更好地理解我国生物产业发展战略和相关政策,也会有助于科研人员的研究选题以及为企业研发方向的确定提供指导。无疑,这将会对我国生物产业化的进程起到促进和推动作用。

(竹韵)