

# 利用海洋微藻生产二十二碳六烯酸的研究进展

何东平<sup>1,2</sup>, 江小明<sup>2,3</sup>, 胡传荣<sup>1,2</sup>, 田华<sup>1</sup>, 高盼<sup>1,2,4</sup>, 陈科名<sup>1</sup>,  
赵康宇<sup>1</sup>, 陈哲<sup>2,3</sup>, 王澍<sup>2,3</sup>, 钟武<sup>1,2</sup>

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 武汉 430023; 2. 国家市场监督管理总局重点实验室(食用油质量与安全), 武汉 430023;  
3. 武汉食品化妆品检验所, 武汉 430040; 4. 大宗粮油精深加工教育部重点实验室, 武汉 430023)

**摘要:**二十二碳六烯酸(DHA)是一种 $\omega-3$ 系多不饱和脂肪酸,对人体生长发育和健康具有重要作用,但其传统来源并不稳定且会引入鱼腥味,因此积极开发DHA新来源具有重要的研究价值和市场潜力。介绍了DHA的结构、理化性质、功能特性和来源,并从微生物产DHA途径,高产DHA藻种裂壶藻和寇氏隐甲藻的特点、诱变选育种情况、摇瓶培养条件和发酵工艺优化等方面阐述了微生物发酵生产DHA的研究情况。另外,从食用油和乳液两个方面对DHA藻油在食品中的应用情况进行了介绍。目前以裂壶藻和寇氏隐甲藻发酵生产DHA已取得初步成功,可以为现有生产提供理论基础,但有关胞内合成DHA和精准调控实现DHA增产还有待进一步研究。

**关键词:**二十二碳六烯酸;寇氏隐甲藻;裂壶藻;突变株

中图分类号:TS222;Q936

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2022)11-0115-07

## Research progress on production of docosahexaenoic acid by utilizing marine microalgae

HE Dongping<sup>1,2</sup>, JIANG Xiaoming<sup>2,3</sup>, HU Chuanrong<sup>1,2</sup>, TIAN Hua<sup>1</sup>,  
GAO Pan<sup>1,2,4</sup>, CHEN Keming<sup>1</sup>, ZHAO Kangyu<sup>1</sup>, CHEN Zhe<sup>2,3</sup>,  
WANG Shu<sup>2,3</sup>, ZHONG Wu<sup>1,2</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;  
2. Key Laboratory of Edible Oil Quality and Safety for State Market Regulation, Wuhan 430023, China;  
3. Wuhan Institute for Food and Cosmetic Control, Wuhan 430040, China; 4. Key Laboratory for Deep Processing of Bulk Grain and Oil (Wuhan Polytechnic University) of Ministry of Education, Wuhan 430023, China)

**Abstract:** Docosahexaenoic acid (DHA) is a kind of  $\omega-3$  polyunsaturated fatty acids, playing an important role in human physical development and health. However, the traditional sources for DHA are unstable and introduce the fishy smell for the products. Therefore, developing new sources for DHA actively shows important research value and market potential. The structure, physicochemical properties, functional properties and sources of DHA were introduced. The research on the production of DHA by microbial fermentation was described in terms of synthesis pathway of DHA, the characteristics, the mutagenesis breeding situation, the optimization of shake flask culture conditions and fermentation process of the high DHA-producing algae strains *Schizochytrium* and *Cryptocodinium cohnii*. In addition, the application of DHA algal oil was introduced from two aspects of edible oils and emulsions. At present, the production of DHA by fermentation with *Schizochytrium* and *Cryptocodinium cohnii* has achieved initial success, which can provide a theoretical basis for the production. However, the intracellular

synthesis of DHA and the precise regulation of DHA production need further research.

**Key words:** docosahexaenoic acid; *Cryptocodinium cohnii*; *Schizochytrium*; mutant

收稿日期:2022-05-23;修回日期:2022-08-09

作者简介:何东平(1957),男,教授,博士生导师,主要从事微生物油脂的开发与利用(E-mail)hedp123456@163.com。

二十二碳六烯酸(DHA)是一种 $\omega-3$ 系多不饱和脂肪酸(PUFA),因其对脑细胞的生长发育具有促进作用,对人体大脑和视网膜的构成具有重要作用<sup>[1]</sup>,也被称为“脑黄金”。另外,DHA还可以预防心脑血管疾病和调节中枢神经功能<sup>[2-4]</sup>。然而人体内由 $\alpha$ -亚麻酸转化而来的DHA仅有0.3%,不能满足人体日常所需,需要通过膳食进行补充<sup>[5]</sup>。近年来,DHA已被广泛添加于多种食品如婴幼儿奶粉<sup>[6]</sup>、保健品和其他种类加工食品<sup>[7]</sup>中。

DHA早期来源主要为深海鱼油,其源头是鱼类所食用的海洋微藻<sup>[8]</sup>。从鱼油中提取DHA过程繁杂,产品鱼腥味较重,且供应量无法满足市场需求,极大地限制了DHA产业的发展<sup>[9-10]</sup>。藻油中DHA含量高达35%,具有巨大的市场优势,因此DHA藻油的加工生产受到越来越多的关注。2010年我国卫生部批准DHA藻油作为新资源食品,2013年将其调整为新食品原料,2011年卫生部颁布GB 26400—2011《食品安全国家标准 食品添加剂 二十二碳六烯酸油脂(发酵法)》,这标志着DHA藻油可以进行批量化生产,可以食用油的身份出现在餐桌上。

我国新食品原料规定,DHA藻油是由裂壶藻(*Schizochytrium* sp.)、吾肯氏壶藻(*Ulkenia amoeboida*)和寇氏隐甲藻(*Cryptocodinium cohnii*)藻种为原料,经生物发酵、分离、提纯等工艺生产的。本文从产DHA的主要菌种裂壶藻和寇氏隐甲藻出发,对其产DHA途径、菌种选育、摇瓶培养条件优化、发酵工艺条件优化及其应用等多角度进行阐述,以期DHA藻油生产加工提供理论基础与新思路。

## 1 DHA 概述

### 1.1 DHA 的结构与理化性质

根据系统命名法,DHA又称为顺-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸,其化学分子式为 $C_{22}H_{32}O_2$ ,相对分子质量为328.49。

DHA常温下以液体形式存在。DHA性质不稳

定,在外界光、热环境刺激下易发生氧化酸败等不良化学反应,储藏时需置于低温避光环境中<sup>[11]</sup>。

### 1.2 DHA 功能特性

DHA对维持人体健康及生长发育有着重要作用,主要体现在:①促进并保护视网膜发育,改善视力,缓解视觉疲劳,预防视力障碍<sup>[12]</sup>;②健脑益智,DHA参与人脑细胞形成及发育,约占人脑脂质的10%<sup>[12]</sup>;③预防心血管疾病,DHA可以保障心肌细胞膜上 $Ca^{2+}$ 通道的畅通及动态平衡,同时抑制 $Na^+$ 电流,延缓 $K^+$ 电流,从而使心肌膜电位稳定,减少血液流动过程中的阻力<sup>[13]</sup>;④抑制炎症,DHA可提高自身免疫力,降低炎症因子NF- $\kappa$ B细胞的活性和COX-2的表达作用<sup>[14-15]</sup>;⑤抗癌作用,DHA可以促进T淋巴细胞增殖及在促进癌细胞凋亡中发挥有益作用<sup>[16-17]</sup>;⑥改善肥胖,DHA可以调节机体免疫稳态,在一定程度上缓解肥胖问题<sup>[18]</sup>;⑦预防老年性痴呆,人体中的DHA含量随着年龄的增加而减少,日常饮食补充DHA可改善老年性痴呆病人的状况;⑧提高机体抗氧化能力,DHA可清除自由基,保护机体<sup>[19]</sup>。

### 1.3 DHA 来源

DHA的来源主要分为三类:①传统来源,以甘油酯的形式存在于深海鱼油中,由于资源有限且易受环境影响,产量无法满足市场需求;②微生物来源,微藻类中DHA的含量高于鱼油<sup>[20]</sup>,同时微生物发酵生产DHA可以不受季节、产地、底物等外界环境的限制;③转基因来源,利用转基因技术在油料作物中合成PUFA,但是PUFA产率还有待进一步提高。

## 2 微生物发酵生产 DHA

### 2.1 微生物产 DHA 途径

海水金藻、隐藻、硅藻、甲藻及海洋真菌等微生物中DHA含量丰富<sup>[21]</sup>。目前聚酮合成酶(PKS)途径和脂肪酸合成酶(FAS)途径是利用海洋微藻合成DHA的两种主要途径,分别见图1和图2。

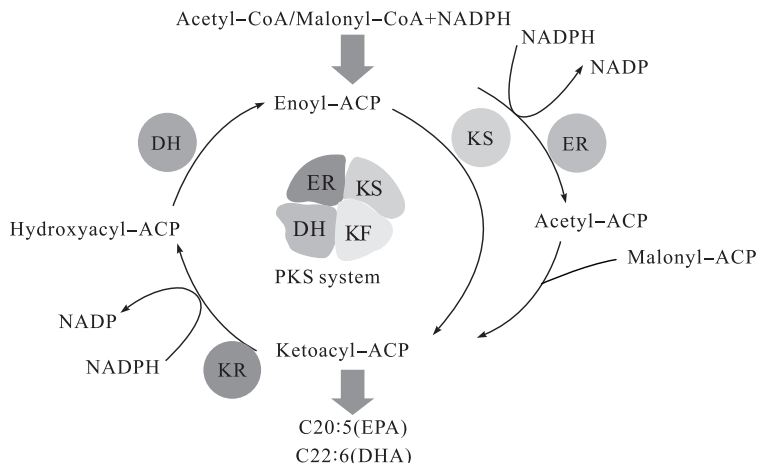


图1 微生物体内DHA的PKS合成途径

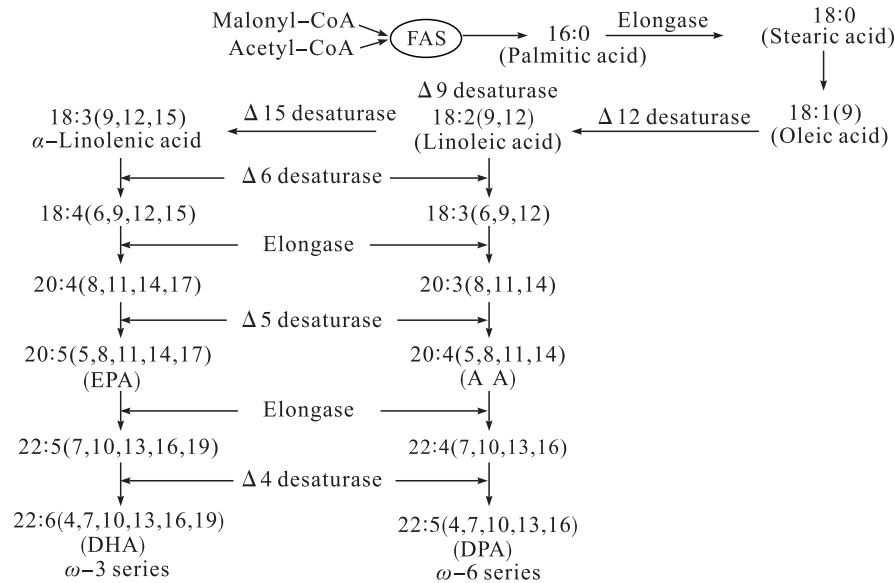


图 2 微生物体内 DHA 的 FAS 合成途径

PKS 途径在碳链延长过程中可以直接生成双键<sup>[22]</sup>; FAS 途径合成 DHA 是通过去饱和酶及脂肪酸延长酶相互交替作用,使脂肪酸碳链不断延长及脱氢<sup>[23]</sup>。

## 2.2 高产 DHA 的藻种裂壶藻(裂殖壶菌)和寇氏隐甲藻

裂壶藻和寇氏隐甲藻是目前研究较多的两种高产 DHA 藻种。裂壶藻隶属于 Chromista 界、Harosa 亚界、Stramenopiles 门、Labyrinthulomycetes 纲、Thraustochytriales 目、Thraustochytriaceae 科<sup>[24]</sup>。裂壶藻生长繁殖速度快,在合适的条件下培养时, DHA 含量可达总脂肪酸的 35% 以上,此外由于其发酵过程相对简单,总脂肪酸中 PUFA 种类相对较少,易于分离纯化,适合 DHA 的工业化生产<sup>[25]</sup>。寇氏隐甲藻在适宜的条件下能积累其细胞干重 40% 以上的脂质,并且能在快速生长的同时积累 DHA 为唯一的 PUFA。此外,寇氏隐甲藻还能利用多种碳源,如短链脂肪酸、乙醇和糖作为底物发酵生产 DHA<sup>[26-28]</sup>。

国内外学者对裂壶藻和寇氏隐甲藻展开了大量研究,发现其细胞代谢活性较高,具有重要的工业化生产价值<sup>[29]</sup>。

## 2.3 高产 DHA 藻种的诱变选育

为了进一步提高裂壶藻和寇氏隐甲藻的 DHA 产量,可对其进行诱变以得到性能优良的藻种。吕小义<sup>[30]</sup>和付杰<sup>[31]</sup>分别利用 <sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线辐照和低能氮离子注入技术诱变裂壶藻,发现突变株较出发菌株 DHA 产量分别提高了约 40% 和 57%,且遗传性能稳定。和俊豪等<sup>[32]</sup>利用常压室温等离子体(ARTP)诱变筛选出了裂壶藻突变株 I-F-9,其 DHA 产量较原始菌株增加了 61.17%。张梦娣

等<sup>[33]</sup>通过紫外线对原始菌株 B4D1 进行诱变,筛选出了高产菌株 11-9E,其 DHA 含量较原始菌株提高了 11.70%,占总油脂含量的 41.24%,此外其 EPA 含量较原始菌株提高了 46.88%。Zeng 等<sup>[34]</sup>利用 ARTP 结合碘乙酸和脱氢表雄酮对裂壶藻 ATCC 20888 进行了诱变,最终得到的菌株 DHA 含量较出发菌株提高了 60.8%。袁军等<sup>[35]</sup>在气流量 10 L/min、照射距离 2 mm、功率 100 W、等离子体温度低于 35℃ 的条件下对裂壶藻 ATCC 20888 诱变处理 15 s,最终获得的菌株 DHA 产量较对照提高了 29.8%。Zhao 等<sup>[36]</sup>利用 ARTP 结合丙二酸和 zeocin 抗性筛选对裂壶藻 ATCC 20888 进行诱变筛选,得到突变株 mz-17,其 DHA 产量较原始菌株提高了 80%,同时在摇瓶培养中补充  $Fe^{2+}$ , DHA 平均产量达到 14.0 g/L。

余隽<sup>[15]</sup>采用 <sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线辐照诱变育种技术对寇氏隐甲藻进行诱变处理,并对诱变条件进行优化,所获突变株生长速度加快,且其 DHA 产量较出发菌株提高了 56.92%。Lv 等<sup>[37]</sup>利用 ARTP 诱变技术筛选出了一株淀粉缺陷,但生长不受影响的寇氏隐甲藻 16D,其 DHA 产率和得率分别较出发菌株提高了 70% 和 30%,油脂得率提高了 50%。刘晶<sup>[38]</sup>利用 ARTP 诱变结合稀禾定,经过两轮诱变获得了突变株 M-1-2,其油脂产量较出发菌株提高了 7.05%,且乙酰辅酶 A 羧化酶活性提高了 16.15%,证明了基于稀禾定筛选的有效性。张雨<sup>[39]</sup>分别利用紫外诱变法、化学诱变法(诱变剂为 NTG)和 ARTP 诱变技术对寇氏隐甲藻进行了诱变,最终通过 ARTP 诱变得到了最优突变株 AZ-14,其生物量、油脂产量和 DHA 产量较出发菌株分别增加了 14.99%、21.96% 和 23.52%。

ARTP 诱变技术操作便捷、安全高效和正向突变率高,近年国内外关于裂壶藻和寇氏隐甲藻诱变育种基本采用 ARTP 技术,少部分的研究仍采用紫外诱变。ARTP 技术能获得生长速度与 DHA 产率均有明显提高的菌株,但其发酵稳定性与安全性仍需要进一步的验证。

#### 2.4 高产 DHA 藻种摇瓶培养条件优化

通过对碳/氮源、pH、温度和化学诱导剂等外界宏观条件的改变可优化微藻产 DHA 的培养条件。吕小义<sup>[30]</sup>通过 Plackett - Burman (PB) 试验对培养基进行优化,筛选出对裂壶藻产 DHA 有显著影响的 3 个关键因素,即葡萄糖、谷氨酸钠和 NaCl,然后通过对这 3 个因素的优化确定了最佳培养基组成,最终 DHA 产量可达 6 g/L。付杰<sup>[31]</sup>发现葡萄糖、谷氨酸钠、酵母膏和海水晶对裂壶藻产 DHA 有显著影响,优化培养基组成可使 DHA 产量达到 6.67 g/L。Sahin 等<sup>[40]</sup>发现在以蛋白胨和甘油分别作为氮源和碳源时,适时加入乙醇有利于提高 DHA 的产量。林源锋<sup>[41]</sup>发现在裂壶藻突变株发酵过程中外源添加 150 mg/L 乙醇胺(ETA)、10 mg/L 萘氧乙酸(BNOA)和 1 mg/L 水杨酸(SA),可提高裂壶藻突变株合成 DHA 的能力,相比于对照组提高了 12.77%。Kujawska 等<sup>[42]</sup>以废弃甘油作为有机碳源,蛋白胨作为氮源,采用 PB 试验和响应面法优化裂壶藻发酵工艺,结果表明,在甘油质量浓度 149.99 g/L、蛋白胨质量浓度 2.21 g/L、发酵温度 26℃和氧气体积分数 30%的最优条件下,所得 DHA 产量为 17.25 g/L。

段愿<sup>[43]</sup>以葡萄糖、谷氨酸钠、酵母膏、金属组合液和维生素组合液对寇氏隐甲藻突变株的培养基进行优化,优化后 DHA 含量为 39.2%。王澍<sup>[44]</sup>对培养基组成进行了优化,发现硫酸镁对于寇氏隐甲藻突变株的培养具有重要作用,并进一步优化得到最佳培养条件,即接种量 9.2%、初始 pH 6.9、装液量 65 mL/500 mL,此时 DHA 产量可提高 13.28%。赵书林<sup>[45]</sup>在优化的培养温度 26℃下培养 7 d 后,寇氏隐甲藻突变株生物量达到 52.40 g/L,油脂产量为 16.54 g/L,DHA 产量为 6.23 g/L。适当添加芝麻酚等外源物质对 DHA 生产也有较好的促进作用<sup>[46]</sup>。

摇瓶培养过程中葡萄糖、果糖、酵母膏、蛋白胨等优势碳/氮源会加快藻株生长,但也会使 DHA 藻油成本过高,影响产业扩大化发展,因此从木质素和工业废液出发寻找低成本碳源和氮源作为发酵底物也成为国内外研究热点。通过优化培养条件可以提高藻株中目标产物的含量,降低有害物质的积累,让筛选后的藻株可以更好地满足人类生产、生活的需要。同时藻株处于不断进化之中,因此不存在一个

固定的培养方式,需进行不断调整和完善,以期更好地满足藻株生长的需要,从而提高 DHA 的产量。

#### 2.5 DHA 生产发酵工艺优化

吕小义<sup>[30]</sup>构建了裂壶藻突变株发酵动力学模型并优化了补料发酵工艺,确定 72 h 和 96 h 为较合适的补料时间点。吕小义<sup>[30]</sup>还发现发酵过程中的氧气含量对于藻种的生长和 DHA 产量同样有着明显的影响,裂壶藻在高溶氧条件下生长增殖更快,低溶氧条件下 DHA 的产生和积累更快。Guo 等<sup>[47]</sup>同样确定了连续补料能为裂壶藻提供较优的发酵环境。

Liu 等<sup>[48]</sup>建立了寇氏隐甲藻发酵过程中 4 周期重复补料分批培养策略,结果表明,葡萄糖质量浓度为 15~27 g/L 和培养基替换效率 80% 时可有效促进寇氏隐甲藻 M-1-2 的生长。赵书林<sup>[45]</sup>发现寇氏隐甲藻生长的重要时期为前 3 d,当氮碳比为 1:15 时补糖最佳,氮源耗尽时补糖可促进 DHA 的形成。王澍<sup>[44]</sup>建立了寇氏隐甲藻发酵产 DHA 藻油的动力学模型,确定培养 54 h 时补糖可提高 DHA 产量,并建立变温培养的发醇调控策略,前 48 h 在 27℃下培养,接着在 21℃下继续培养,可使油脂产量达到 14.44 g/L,DHA 产量达到 5.77 g/L。Karnaouri 等<sup>[28]</sup>利用木质素酶解后的产物作为底物培养寇氏隐甲藻,并优化了氮元素的初始含量,最终在氮元素含量为 0.66 g/L 时采用分批补料添加碳源,使寇氏隐甲藻的 DHA 含量达 43.5%。Chalima 等<sup>[49]</sup>将发酵生产氢气的废液作为底物供给寇氏隐甲藻发酵生产 DHA,结果表明,硫酸铵具有极大的可能替代酵母膏作为氮源,此时 DHA 含量达到 34.2%。

对于发酵工艺的优化本质上也是探寻菌株细胞在产油与产 DHA 生理代谢过程中的关键控制点,这是一个需要长期验证与探索的过程,合适的发酵工艺不仅可以缩短发酵周期,还可以提高底物的利用率,降低生产成本,进一步提高菌株的 DHA 水平。发酵工艺的优化是从宏观上调节细胞代谢过程,对于 DHA 产率的提高是有限的,后续研究可从基因层面进一步深入寻找细胞代谢合成 DHA 的关键途径。

### 3 DHA 藻油在食品中的应用

以微藻生产的 DHA 较鱼油 DHA 纯化更为简便,也不会引入鱼腥味,还能在一定程度上缓解鱼油 DHA 压力。DHA 藻油具有污染小、纯度高、性质稳定的特点,同时还具有独特的海藻风味<sup>[50-51]</sup>,目前多用于营养强化剂,其应用研究也在向食用油和乳液等方向延伸。食用油品种繁多,但一般食用油 DHA 含量很低<sup>[52]</sup>。曹维<sup>[53]</sup>以 DHA 藻油为原料通过分级添加、混合调配的方法制备了 DHA 藻油食用油,产品具有良好的稳定性。徐娜<sup>[54]</sup>开发 DHA 藻

油口服液,在选用酪蛋白酸钠作为乳化剂时,DHA藻油口服液的脂肪酸释放率达到78.79%,生物可接受率为90.57%。付冬文<sup>[55]</sup>基于酪蛋白酸钠纳米粒子稳定的Pickering型乳液开发了口感良好、储藏性稳定的DHA藻油乳液。张程超<sup>[56]</sup>基于DHA藻油双层纳米乳液制备了一种DHA藻油饼干,该饼干在25℃储藏35d后DHA保留率为65.83%,预测货架期为246d。

目前,我国在DHA的生产和应用技术方面还存在诸多问题,但科技的迅速发展以及市场的需要都将促进DHA藻油的进一步研究。

### 3 结 语

相较于传统鱼油DHA,藻油DHA因其产量稳定、受限小而成为DHA的主要来源之一。具有发酵生产DHA能力的海洋真菌如裂壶藻、寇氏隐甲藻及吾肯氏壶藻等成为研究热点,其中裂壶藻和寇氏隐甲藻中DHA均能占到总脂肪酸的30%以上。以多种方法对裂壶藻和寇氏隐甲藻进行诱变处理均能获得DHA产量明显提高的突变株,其中以ARTP技术获得的突变株性能最佳,但突变株遗传和发酵稳定性均有待进一步研究。通过对摇瓶培养条件和发酵工艺条件进行优化可以在一定程度上提高DHA产率,其中优质碳、氮源具有关键的影响,并且菌株在发酵生产DHA的不同阶段对于碳、氮的需求也是不一样的。生长稳定期是藻类生成DHA的主要时期,应及时通过补糖以及添加外源化学剂的方法来延长生长稳定期以提高DHA产率,还可通过变温调节和调整发酵液等方式优化发酵工艺。DHA作为配方产品及功能营养强化剂,在食品行业有着很高的应用价值,应加大DHA藻油产品的研制。

### 参考文献:

- [1] CARLSON S J, FALLON E M, KALISH B T, et al. The role of the  $\omega$ -3 fatty acid DHA in the human life cycle [J]. *J Parenter Enteral Nutr*, 2013, 37(1): 15-22.
- [2] LORENTE-CEBRIÁN S, COSTA A G V, NAVAS-CARRETERO S, et al. Role of  $\omega$ -3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence [J]. *J Physiol Biochem*, 2013, 69(3): 633-651.
- [3] NORDY A, MARCHIOLI R, ARNESEN H, et al.  $n$ -3 Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases: to whom, how much, preparations [J]. *Lipids*, 2001, 36(1): 127-129.
- [4] AJAMI M, EGHTESEADI S, HABIBEY R, et al. Effect of short and long-term treatment with  $\omega$ -3 fatty acids on scopolamine-induced amnesia [J]. *Iran J Pharm Res*, 2012, 11(2): 533-540.
- [5] HUSSEIN N. Long-chain conversion of [ $^{13}\text{C}$ ] linoleic acid and  $\alpha$ -linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men [J]. *J Lipid Res*, 2005, 46(2): 269-280.
- [6] TAI E, WANG X B, CHEN Z Y. An update on adding docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (AA) to baby formula [J]. *Food Funct*, 2013, 4(12): 1767-1775.
- [7] RUSSELL F, BÜRGIN-MAUNDER C S. Distinguishing health benefits of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids [J]. *Mar Drugs*, 2012, 10(11): 2535-2559.
- [8] 潘冰峰, 李祖义. 利用海洋微藻生产富含DHA的单细胞油脂 [J]. *中国生物工程进展*, 2000, 20(6): 43-45.
- [9] SOL A, SMULDERS Y M. Health effects of fish oil and fish oil supplements: consumption advice sustained [J]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 2006, 150(38): 2069-2071.
- [10] BEELEN V, ROELEVELD J, MOOIBROEK H, et al. A comparative study on the effect of algal and fish oil on viability and cell proliferation of Caco-2 cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(5): 716-724.
- [11] GAWRISCH K, ELDHON V, HOLTE L L. The structure of DHA in phospholipid membranes [J]. *Lipids*, 2003, 38(4): 445-452.
- [12] 蔡太生. DHA与人体健康 [J]. *中华医学实践杂志*, 2005, 4(9): 963-964.
- [13] RINALDI B, PIERRO P D, VITELLI M R, et al. Effects of docosahexaenoic acid on calcium pathway in adult cardiomyocytes [J]. *Life Sci*, 2002, 71(9): 993-1004.
- [14] 代荣阳. DHA和EPA的抗炎及免疫调节功能 [J]. *泸州医学院学报*, 2004, 27(1): 83-84.
- [15] 余隽. 高产DHA寇氏隐甲藻诱变选育的研究 [D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2012.
- [16] 许庆文, 刘春安, 何可, 等.  $n$ -3多不饱和脂肪酸对大鼠大肠癌及Caspase-3蛋白表达的影响 [J]. *广东医学*, 2014, 35(13): 1987-1989.
- [17] HOFMANOVÁ J, VACULOVÁ A, LOJEK A, et al. Interaction of polyunsaturated fatty acids and sodium butyrate during apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells [J]. *Eur J Nutr*, 2005, 44(1): 40-51.
- [18] 芦庭秀, 郑征, 张金玉, 等. DHA对机体免疫炎症性肥胖的抑制作用 [J]. *青岛大学医学院学报*, 2015, 51(4): 445-447.
- [19] SHIMAZAWA M, NAKAJIMA Y, MASHIMA Y, et al. Docosahexaenoic acid (DHA) has neuroprotective effects against oxidative stress in retinal ganglion cells [J]. *Brain Res*, 2009, 1251: 269-275.
- [20] 何东平, 陈明锴, 闫子鹏. 微生物油脂发酵与加工技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2016.
- [21] 郑明刚, 刘峰, 王玲, 等. 海洋微生物资源的开发与应用研究 [J]. *海洋开发与管理*, 2010, 27(9): 76-79.
- [22] METZ J G, ROESSLER P, FACCIOTTI D, et al. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes [J].



- Science, 2001, 293(5528):290-293.
- [23] 江贤章. 海洋真菌 *Thraustochytrids* DHA 生物合成的分子机理[D]. 福州:福建师范大学, 2006.
- [24] MORABITO C, BOURNAUD C, MAËS C, et al. The lipid metabolism in *Thraustochytrids*[J/OL]. Prog Lipid Res, 2019, 76:101007 [2022-05-23]. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.101007>.
- [25] CHANG M, ZHANG T, GUO X, et al. Optimization of cultivation conditions for efficient production of carotenoid-rich DHA oil by *Schizochytrium* sp. S31 [J]. Process Biochem, 2020, 94:190-197.
- [26] STRAMARKOU M, OIKONOMOPOULOU V, CHALIMA A, et al. Optimization of green extractions for the recovery of docosahexaenoic acid (DHA) from *Cryptocodinium cohnii*[J/OL]. Algal Res, 2021, 58:102374[2022-05-23]. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102374>.
- [27] PEI G, LI X, LIU L, et al. De novo transcriptomic and metabolomic analysis of docosahexaenoic acid (DHA) - producing *Cryptocodinium cohnii* during fed - batch fermentation[J]. Algal Res, 2017,26:380-391.
- [28] KARNAOURI A, CHALIMA A, KALOGIANNIS K G, et al. Utilization of lignocellulosic biomass towards the production of omega - 3 fatty acids by the heterotrophic marine microalga *Cryptocodinium cohnii* [J/OL]. Bioresour Technol, 2020,303: 122889[2022-05-23]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122889>.
- [29] 魏萍, 马小琛, 任路静, 等. 裂殖壶菌发酵生产 DHA 研究进展[J]. 食品工业科技, 2010, 31(10):398-401,404.
- [30] 吕小义. 高产 DHA 裂殖藻突变株的选育与发酵工艺研究[D]. 武汉:武汉轻工大学, 2016.
- [31] 付杰. 高产 DHA 裂殖藻突变株的选育及生物学特性的研究[D]. 武汉:武汉轻工大学, 2017.
- [32] 和俊豪, 付子琳, 丁军, 等. 常压室温等离子体诱变选育高产二十二碳六烯酸裂殖壶菌藻株[J]. 动物营养学报, 2022, 34(7): 4750-4760.
- [33] 张梦娣, 赫荣琳, 张东远, 等. 紫外诱变筛选高产 EPA 和 DHA 的裂殖壶菌[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(Z3): 3055-3059.
- [34] ZENG L, BI Y, GUO P, et al. Metabolic analysis of *Schizochytrium* mutants with high DHA content achieved with ARTP mutagenesis combined with iodoacetic acid and dehydroepiandrosterone screening [J/OL]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9:738052[2022-05-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86377581>.
- [35] 袁军, 赵犇, 孙梦玉, 等. 常压室温等离子体 (ARTP) 诱变快速选育高产 DHA 的裂殖壶菌突变株[J]. 生物技术通报, 2015, 31(10): 199-204.
- [36] ZHAO B, LI Y, LI C, et al. Enhancement of *Schizochytrium* DHA synthesis by plasma mutagenesis aided with malonic acid and zeocin screening [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(5): 2351-2361.
- [37] LV M M, WANG F Z, ZENG L, et al. Identification and metabolomic analysis of a starch - deficient *Cryptocodinium cohnii* mutant reveals multiple mechanisms relevant to enhanced growth and lipid accumulation [J/OL]. Algal Res, 2020, 50: 102001[2022-05-23]. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102001>.
- [38] 刘晶. 利用稀禾定筛选高生长高油脂的寇氏隐甲藻突变株及转录分析[D]. 天津:天津大学, 2018.
- [39] 张雨. 寇氏隐甲藻培养基的优化及诱变育种[D]. 福州: 福建师范大学, 2018.
- [40] SAHIN D, TAS E, AITINDAG U H. Enhancement of docosahexaenoic acid (DHA) production from *Schizochytrium* sp. S31 using different growth medium conditions [J/OL]. AMB Express, 2018, 8(1): 7[2022-05-23]. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0540-4>.
- [41] 林源锋. 裂殖藻突变株高产 DHA 调控研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2018.
- [42] KUJAWSKA N, TALBIERZ S, DĘBOWSKI M, et al. Optimizing docosahexaenoic acid (DHA) production by *Schizochytrium* sp. grown on waste glycerol [J/OL]. Energies, 2021, 14(6): 1685 [2022-05-23]. <https://doi.org/10.3390/en14061685>.
- [43] 段愿. 寇氏隐甲藻 (*Cryptocodinium cohnii*) 突变株培养生产 DHA 的研究[D]. 武汉:武汉轻工大学, 2014.
- [44] 王澍. 寇氏隐甲藻突变株高产 DHA 的集约化研究 [D]. 武汉:武汉轻工大学, 2015.
- [45] 赵书林. 寇氏隐甲藻形态发育的显微观察及发酵工艺的研究[D]. 武汉:武汉轻工大学, 2014.
- [46] LI J, NIU X, PEI G, et al. Identification and metabolomic analysis of chemical modulators for lipid accumulation in *Cryptocodinium cohnii* [J]. Bioresour Technol, 2015, 191: 362-368.
- [47] GUO D S, TONG L L, JI X J, et al. Development of a strategy to improve the stability of culture environment for docosahexaenoic acid fermentation by *Schizochytrium* sp. [J/OL]. Appl Biochem Biotechnol, 2020, 192(3): 881-894.
- [48] LIU L, WANG F, PEI G, et al. Repeated fed - batch strategy and metabolomic analysis to achieve high docosahexaenoic acid productivity in *Cryptocodinium cohnii* [J/OL]. Microb Cell Fact, 2020, 19(1): 91[2022-05-23]. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01349-6>.
- [49] CHALIMA A, TAXEIDIS G, TOPAKAS E. Optimization of the production of docosahexaenoic fatty acid by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* utilizing a dark fermentation effluent [J]. Renew Energ, 2020, 152: 102-109.
- [50] 林武杰, 吴云辉. 海洋微藻多不饱和脂肪酸研究进展 [J]. 渔业研究, 2013, 35(1): 78-82.

表4 酯化前后水分、维生素 E、植物甾醇含量的变化 %

项目	水分	维生素 E	植物甾醇
原料	0.16	5.64	5.81
酯化液	0.44	5.27	5.87

实验发现,反应过程中物料没有出现乳化现象,易于分水,表4 水分指标也验证了这一点。由表4 还可知,酯化液中的植物甾醇含量较脱臭馏出物有一定增加,而维生素 E 含量有一定减少,经计算维生素 E 收率达到93%,在可接受范围内。

#### 2.4 生产线应用效果

将固定化脂肪酶催化脱臭馏出物甲酯化工艺在实际生产线上进行了应用,与浓硫酸催化甲酯化工艺相比,新工艺中产品维生素 E(50% 维生素 E)总收率提高了3.47 百分点,植物甾醇总收率提高了3.26 百分点。

### 3 结论

对生物酶法催化脱臭馏出物甲酯化的工艺条件进行了研究,通过单因素实验和响应面实验获得生物酶法催化脱臭馏出物甲酯化反应的最佳工艺条件,并将其应用于实际生产线。结果表明:最佳的生物酶法催化甲酯化反应条件为加水量1%(以脱臭馏出物质量计)、固定化脂肪酶用量0.3%(以脱臭馏出物质量计)、甲醇用量11.5%(以脱臭馏出物质量计)、反应温度35.6℃,在此条件可以在确保维生

素 E 损失较少的前提下使游离脂肪酸和甘油酯甲酯化;与浓硫酸催化甲酯化工艺相比,维生素 E 和植物甾醇总收率均得到了提高。

#### 参考文献:

- [1] 徐世民,李娟,丁辉,等.大豆油脱臭馏出物固体酸催化的甲酯化研究[J].粮油加工,2006(12):50-52.
- [2] 刘军海,李燕.植物油脱臭馏出物生物活性成分提取与纯化技术研究进展[J].粮食与油脂,2010(2):1-7.
- [3] 周秀秀,辛嘉英,陈林林,等.大豆油脱臭馏出物的酶法甲酯化[J].农产品加工,2010(8):53-55.
- [4] 马磊,杨天奎,夏萍,等.固体酸催化大豆油脱臭馏出物甲酯化工艺研究[J].中国油脂,2015,40(3):99-102.
- [5] 胡小泓,刘文涛,刘昌伟,等.从大豆油脱臭馏出物中制备维生素 E 的工艺研究[J].中国油脂,2002,27(2):78-80.
- [6] 唐年初.豆油脱臭馏出物酶法甲酯化纯化 V<sub>E</sub> 的研究[D].江苏无锡:江南大学,2007.
- [7] 张开平,惠明,田青,等.微生物脂肪酶的应用领域及研究进展[J].河南工业大学学报,2012,33(1):90-94.
- [8] 刘虹蕾,缪铭,江波,等.微生物脂肪酶的研究与应用[J].食品工业科技,2015,40(9):70-76.
- [9] 谷克仁,王秀华.脱臭馏出物提取 V<sub>E</sub> 的酶预处理[J].中国油脂,2006,31(2):41-43.
- [10] 曹玉平,宋佳,武文华,等.响应面法优化维生素 E 提取工艺[J].粮食与饲料工业,2019,6:34-37.
- [51] 刘燕琳,石峰,尹玲,等.利用海洋微藻发酵生产二十二碳六烯酸的研究[J].药学进展,2005,29(12):544-549.
- [52] 司华静,彭晓芳,马金余.高含量 DHA 食用油的应用可行性研究[J].中国食品添加剂,2011(3):86-90.
- [53] 曹维.DHA 藻油在食用油中的应用研究[D].武汉:武汉轻工大学,2015.
- [54] 徐娜.氧化稳定型 DHA 藻油新产品的研发[D].南昌:南昌大学,2021.
- [55] 付冬文.Pickering 型和传统剂型 DHA 藻油乳液体系的构建及产品开发[D].南昌:南昌大学,2020.
- [56] 张程超.DHA 藻油双层纳米乳液的制备及应用[D].江苏无锡:江南大学,2021.

(上接第120页)