

微藻二十二碳六烯酸菌种选育和发酵培养 技术研究

魏 凤^{1,2,3}, 段力萌^{1,2,3*}

(1. 中国科学院武汉文献情报中心, 武汉 430071; 2. 中国科学院大学经济与管理学院图书情报与档案管理系, 北京 100190; 3. 湖北省科技大数据重点实验室, 武汉 430071)

摘 要: 微藻二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)作为新一代功能食品药物保健因子, 成为全球科研和产业研究的热点。菌种选育技术是微藻 DHA 提取的前提和基础, 发酵培养是直接决定微藻 DHA 产量的核心技术, 因此对微藻 DHA 菌种选育和发酵培养技术进行研究对微藻 DHA 的产量发展具有重要意义。本文主要分析了微藻 DHA 菌种选育和发酵培养的技术链, 比较了微藻 DHA 菌种选育各种方法的优缺点, 对菌种选育和发酵培养的重要技术进行研究, 以期能够为微藻 DHA 菌种选育和发酵培养技术的优化、创新和发展提供相关的理论和技术基础, 从而有效提高微藻 DHA 的产量。

关键词: 微藻二十二碳六烯酸; 菌种选育; 发酵培养

Study on breeding and fermentation technology of microalgae docosahexaenoic acid strain

WEI Feng^{1,2,3}, DUAN Li-Meng^{1,2,3*}

(1. Wuhan Library, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430071, China; 2. Department of Library, Information and Archives Management, School of Economics and Management, University of Chinese Academy of Sciences Beijing 100190, China; 3. Hubei Key Laboratory of Science and Technology Big Data, Wuhan 430071, China)

ABSTRACT: As a new generation of functional food and medicine health care factor, microalgae docosahexaenoic acid (DHA) has become a hotspot in global scientific research and industrial research. The breeding technology of strains is the premise and basis of DHA extraction of microalgae. Fermentation culture is the core technology that directly determines the yield of microalgae DHA. Therefore, it is important to study the breeding and fermentation culture techniques of microalgae DHA strains for the development of microalgae DHA. This paper mainly analyzed the technology chain of microalgae DHA strain breeding and fermentation culture, compared the advantages and disadvantages of various methods of microalgae DHA strain breeding, and studied the important techniques of strain breeding and fermentation culture, in order to provide relevant theoretical and technical basis for the optimization, innovation and development of microalgae DHA strain breeding and fermentation culture technology, thus effectively increasing the yield of microalgae DHA.

KEY WORDS: microalgae docosahexaenoic acid; strain selection; fermentation culture

*通讯作者: 段力萌, 主要研究方向为情报理论与方法。E-mail: duanlimeng@mail.las.ac.cn

*Corresponding author: DUAN Li-Meng, Wuhan Library, Chinese Academy of Sciences, No. 25, Xiaohongshan West District, Wuchang District, Wuhan, 430071, China. E-mail: duanlimeng@mail.las.ac.cn

1 引言

二十二碳六烯酸(docosahexenoic acid, DHA), 是一种 ω -3 系列多不饱和脂肪酸。目前, DHA 从形态上进行划分可以分甘油三酯型、甲酯型、乙酯型和卵磷脂型 4 个类型。DHA 是保持人体健康的重要营养成分之一, 对人体具有极其重要的生理功能, 被俗称为脑黄金, 具有辅助脑细胞发育、促进光感细胞的成熟、抗过敏、增强免疫、抗氧化、抗衰老、抗癌、预防和治疗心血管疾病等功效^[1-4]。

微藻 DHA 生产涉及多个复杂的流程, 其生产技术链大致主要分为如下 6 个阶段: 菌种选育、发酵培养、分离提取(破壁萃取)、纯化、精制、改性。其中菌种选育技术是微藻 DHA 提取的前提和基础, 在微藻 DHA 提取过程中发挥了关键的作用; 发酵培养是微藻 DHA 生产的关键环节, 直接决定了 DHA 的产量。因此, 对微藻菌种选育和发酵培养技术进行研究, 能够为技术的优化、创新和发展提供基础, 有效提高微藻 DHA 的产量。

本文主要分析了微藻 DHA 菌种选育和发酵培养的技术链和影响因素, 总结了微藻 DHA 菌种选育各种方法的优缺点, 以期对未来菌种选育和发酵培养技术产生指导意义, 推动微藻 DHA 产量的增长。

2 DHA 的产生与发展

深海鱼油是 DHA 的传统来源, 鱼体内的 DHA 以甘油三酯形态存在, 但是, 随着海水污染的程度在不断加重、渔业资源面临枯竭、DHA 含量和纯度较低、鱼腥味较重、二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA, 一种抑制婴幼儿生长发育的物质)含量较高等因素决定了鱼油 DHA 无法满足市场对 DHA 的旺盛需求, 而且还限制了鱼油 DHA 在食品和保健品中的进一步的应用。因此, 鱼油 DHA 被称为“第一代 DHA”。

利用微生物生产 DHA 是产生于上世纪九十年代的一项技术。该技术利用自然界中一些微生物具有合成 DHA 这一功能, 通过对微生物的发酵培养, 经过分离、提取、纯化等工艺获得 DHA。利用微生物法生产 DHA 具有微生物生长快易培育、DHA 含量高、提取工艺相对简单、无污染等优点。目前市场上, 通过微藻生产藻油 DHA 是最常见的 DHA, 被称为“第二代 DHA”。

蛋黄中的 DHA 是卵磷脂与 DHA 的有机结合体, 因此被称为“卵磷脂型 DHA”, 被称为“第三代 DHA”。

相比较而言, 藻油 DHA 具备易吸收、食用安全、无异味且无污染等优点。蛋黄中的 DHA 具备纯天然的特性。但是就目前而言, DHA 市场上藻油 DHA 的市场占有率最高, 开发工艺最为完整, 也得到了广大研究者的关注^[5]。

3 微藻 DHA 生产关键技术的相关研究

微藻生产藻类 DHA 包含多个复杂的程序, 其中主要包括以下 6 个阶段: 菌种选育、发酵培养、分离提取、纯化、精制以及改性。其中菌种选育技术是微藻 DHA 提取的前提和基础, 在微藻 DHA 提取过程中发挥了基础性的作用; 发酵培养是微藻 DHA 生产的关键环节, 发酵培养的结果能够直接决定微藻 DHA 的产量, 是微藻 DHA 提取过程中的重要部分。

3.1 菌种选育技术

目前, 国内外生产微藻 DHA 所用到的微藻种类有裂殖壶菌(*Schizochytrium* sp.)、破囊壶菌(*Thraustochytrium*)和隐甲藻等, 其中裂殖壶菌和破囊壶菌的应用最为广泛^[6,7]。在菌体内, DHA 均以甘油三酯的形式存在, 但 DHA 的生物合成途径却不相同。破囊壶菌是通过碳链延长、脱氢的生化反应步骤来合成高度不饱和脂肪酸, 而裂殖壶菌的多不饱和脂肪酸是在聚酮合酶(lyketide synthase, PKS)催化作用下形成的。裂殖壶菌和破囊壶菌的优势明显, 培养都比较简单、生长的速度比较快, 而且脂肪酸组成都相对简单^[8]。在适当的培养条件下, 菌体的生物量、总脂含量和 DHA 产量可以达到很高的程度, 是发酵生产 DHA 的理想菌种。

针对 DHA 生产而言, 要想获得较高的效率, 则需要保持菌体内的 DHA 含量比较高或者菌体的生物量很高。因此, 必须对自然界存在的微藻进行选育和种质改良, 以获得在同一环境下的高 DHA 含量以及高菌体生物量都能满足的优良菌种。目前, 对微藻的选育一般采用物理、化学或生物学的手段, 引起细胞核染色体断裂、缺失、碱基置换、基因重组等生物学效应, 从而使后代的性状发生变异。在利用微藻生产 DHA 的菌株选育过程中, 主要技术分为 3 大类: 物理学方法、化学方法、生物学。技术图如图 1 所示, 根据菌种选育的技术层级图以及对菌种选育技术的调研开展对关键技术的研究。

3.1.1 物理方法

物理诱变育种主要采用激光、离子束、射线辐照等手段来获得优良的突变品种^[9]。微藻选育常用的技术有激光诱变技术、射线辐射诱变技术、离子束诱变技术和紫外线照射诱变技术等。其中, 应用最为广泛的为射线辐射育种^[10]。诱变育种的目标主要包括提高微藻的生长速率、抗逆性和含脂量^[11-13]。

激光诱变育种被广泛应用于多种微生物中^[14,15], 使用激光育种, 会对生物的细胞和细胞壁造成不同程度的损坏, 考虑到存在的问题, 则需要对激光诱变育种的波长、功率以及时间因素进行充分的考虑。

离子束诱变技术自从 20 世纪 80 年代开始被广泛应用于金属材料, 主要用于材料的表面改性^[16]。该诱变技术与其他诱变源相比较, 具有损伤轻、突变率高和突变谱广等

特点, 还具有一定的方向性和可控性, 是人工诱变方法的一个新发展。但是因为离子诱变技术中能对生物的诱变效率造成影响的是注入工艺和参数, 所以需要在利用离子束诱变技术进行微藻菌种选育的过程中, 需要充分了解注入剂量以及注入离子的种类。对这些进行充分的实验和了解能够对今后的微藻选育研究提供有价值的依据。

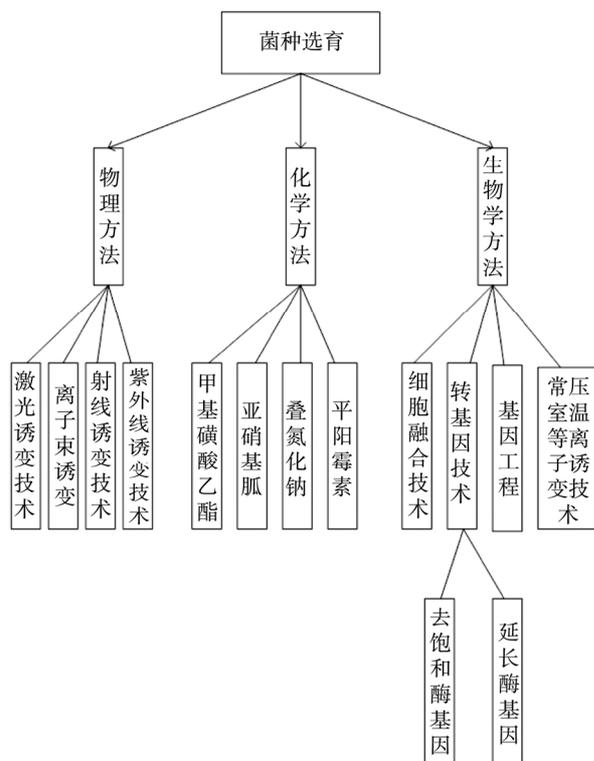


图 1 菌种选育技术层级图

Fig.1 Technical level of strain selection

射线辐照诱变育种的剂量对微藻细胞的生长有至关重要的作用, 除此之外, 不同的藻种对射线的敏感度会因为形态的不同存在着差异, 控制好射线辐照诱变育种的剂量对微藻育种至关重要。低剂量的射线辐照可以刺激藻细胞生长^[17]。

紫外线是应用广泛的多功能物理诱变剂^[18,19]。利用紫外线进行育种的突变株生长速率高, 海藻酸的纯度也比较高, 诸多参数都比较理想。但是紫外线诱变后会出现生长抑制状况, 因此可结合其它诱变方式进行刺激和调整。

3.1.2 化学方法

化学诱变方法主要是采用诱变剂^[20]。化学诱变是一种迅速发展的育种途径, 具有很多优点^[8]: 诱变突变率较高, 具有位点特异性; 染色体畸变的比例相对较少, 很少有致死型发生, 对处理材料损伤轻; 有迟效作用, 即诱变引起的损伤和染色体断裂, 但有的并不立即断开; 引起的突变范围广, 后代选择需要足够大的群体; 价格便宜, 操作简单, 不需要特殊设备。但是也存在诸多的缺点, 主要表现

为: 突变频率尚不够高; 突变方向难以掌握, 具有很大的随机性; 对后代突变体的鉴定所需工作量大; 化学诱变剂毒性大, 具有残留效应。

3.1.3 生物学方法

生物学的方法主要有细胞融合技术、转基因技术、基因工程和常压室温等离子诱变技术等。

近些年来, 生物诱变育种是利用最多的技术。黄和科研团队率先开展了从裂殖壶菌的海藻里提取高品质 DHA 油脂的研究^[21]。经过十多年的技术研究, 科研团队攻克了 DHA 高产菌株选育困难、脂肪酸延长和去饱和过程的定向调控方法有限、不饱和脂肪酸油脂加工过程复杂且易氧化等微生物发酵法制备不饱和脂肪酸油脂的国际共性难题, 发明了基于酶法的无溶剂油脂提炼技术和配套装备, 去饱和酶基因和延长酶基因方法得到了广泛的应用^[22]。

细胞融合是指在人工诱导下两个或多个细胞的原生质体融合成一个杂种细胞的过程。虽然细胞融合法的育种周期比较短, 变异率比较高, 但是还存在一些缺陷, 比如: 变异稳定性较差。目前细胞融合技术已经开始用于微藻改造, 但进展较为缓慢^[23]。

微藻基因工程主要包括一些外源基因在原藻株系中的高表达和基因沉默技术, 以及通过对碳水化合物合成、脂肪代谢途径中起作用的一些转录因子的调控的应用, 主要包括去饱和酶基因和延长酶基因方法。由于一些传统的菌种选育技术存在藻株生长速度和油脂含量出现负相关曲线的问题, 从而使用基因工程手段进行微藻菌种选育^[24]。基因工程方法可以有效提高微藻脂肪酸的合成能力, 甚至对微藻进行分子生物学的改造^[25,26]。

常压室温等离子诱变技术 (atmospheric and room temperature plasma, ARPT) 是一种危险小, 污染小, 应用方便的新型诱变育种技术^[27,28]。相对于其他传统诱变技术, ARPT 诱变育种技术的显著特点是在满足安全简便、设备简单、条件温和、诱变快速的基础上, 一次诱变操作 (几分钟内) 可以获得 2 万个以上突变体, 突变率高、突变库大^[29,30]。现在已经存在的 ARPT 诱变育种仪已成功应用于多种微生物, 并且显示出了较高的突变率和正突变率, 发生突变的生物遗传稳定性良好^[31,32]。

3.2 发酵培养技术

微藻的发酵培养过程对于整个微藻 DHA 提取至关重要。在整个的培养过程中, 能够影响微藻 DHA 产量的主要因素包括培养基成分、培养条件和培养方式。发酵培养技术层级图如图 2 所示, 然后根据发酵培养的技术层级图涉及到的内容对发酵培养技术展开了详细研究。

3.2.1 培养基成分及优化

微藻一般是通过自养方式进行光合作用来积累生物量^[33]。但是也存在着诸多的微藻具有混合营养生长的能力, 这些微藻可以同时利用光和 CO₂ 进行代谢^[34,35]。同时, 微

藻培养基的要素包括碳源、氮源、碳氮比(C/N)、无机盐、微量元素及其它外源添加物等,选择不同的要素种类会对微藻 DHA 的产量产生不同的影响^[36]。

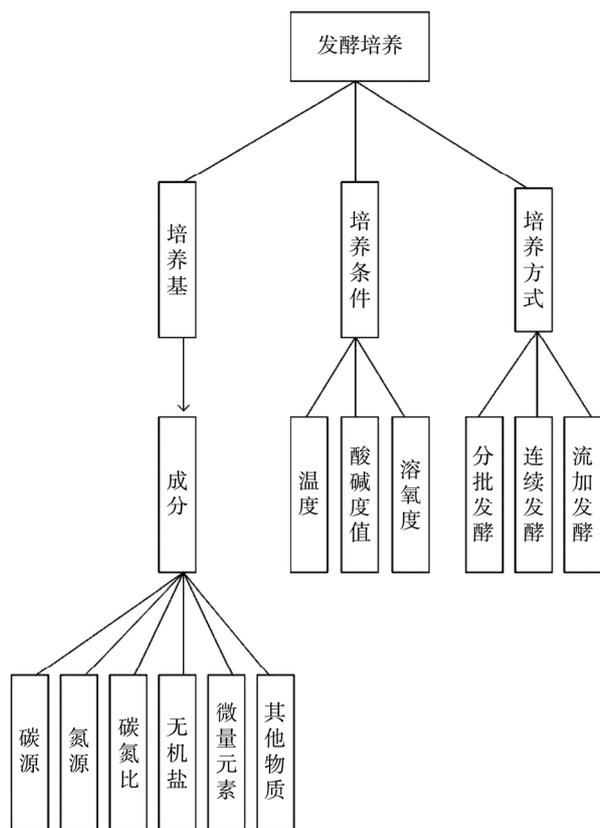


图 2 发酵培养技术层级图

Fig.2 Fermentation culture technology level map

①碳源

种类不同的微藻会对碳源有着不一样的利用效率。由于微藻 DHA 不仅需要在生长的时候需要有足够的碳源,还需要再油脂合成和积累阶段有足够的碳源。普遍的微藻能够利用的碳源是葡萄糖。除此之外,麦芽糖、蔗糖、果糖、淀粉、亚麻籽油等也可作为微藻的碳源。

有的研究者利用粗粮或生物的废料作为底物来生产发酵 DHA, Chi 等^[37]利用生物柴油生产过程的副产物甘油作为裂壶藻的碳源,通过对发酵条件的优化,最终获得的结果是生物量达 22.1 g/L, DHA 产量 4.91 g/L。王灿等^[38]研究了不同碳氮源成分和浓度对裂壶藻生长代谢的影响,结果表明葡萄糖是最佳碳源,最佳浓度为 120 g/L。

②氮源

微藻的氮源包括有机氮源和无机氮源。有机氮源主要包括玉米浆、蛋白胨等;无机氮源包括硫酸铵、乙酸铵、硝酸铵、硝酸钠等。用于充足的氮源能够促进细胞的生长以及菌种的增殖,同时过多的氮源也会抑制生物体内油脂的合成和积累。康晶等考察氮源限制条件对裂壶藻 DHA

合成的影响,研究发现 0.4 g/L(以氮元素计)最适合油脂的合成和 DHA 的积累^[39]。

③碳氮比

合适的碳氮比有助于产生最佳的菌体生物量,培养基中氮元素含量过低可导致菌体生物量减少,从而影响 DHA 的产量。

④无机盐

在微藻的培养基中,最常用的无机盐为氯化钠(NaCl)。向微藻培养基中添加无机盐可以维持培养基的渗透压,从而有利于微藻的生长以及 DHA 的累积。王灿等^[38]选用 6 种无机盐作均匀设计,考察其对裂壶藻产 DHA 的影响,得到最优配方为 KH_2PO_4 4.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, CaCO_3 5.0 g/L, Na_2SO_4 3.0 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/L。

⑤其它成分

培养基中的其它添加成分还包括微量元素、激素、维生素等。

为了提高微藻 DHA 的产量,存在研究者对培养基成分进行了优化。金文翔等^[40]利用响应面法对裂殖壶菌 DHA 的发酵培养基进行了优化,葡萄糖、酵母浸出粉和磷酸二氢钾优化后浓度分别为 69.66、6.93、1.29 g/L, DHA 的产量较优化前提高了 62.04%。Sahin 等^[41,42]重点研究了不同培养基添加物对裂殖酵母 DHA 生产的优化作用,研究结果表明蛋白胨和甘油分别作为氮源和碳源,并在适当的时间添加乙醇将有助于获得更高的 DHA 产量。杨浩等^[43]研究表达聚酮合成酶(polyketide synthase, PKS)和脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)途径中的关键作用酶基因与改变培养条件(如碳源、氮源、温度、无机盐、微量元素、前体物质及生物促进剂等),均可显著提高 DHA 产量。

3.2.2 培养条件

微藻的培养条件包括温度、pH 值、溶氧度等。

①温度

温度是 DHA 生物合成的重要影响因素。一般而言,将微藻置于最适宜的温度下可培养出最可观的生物量,但是油脂含量并不一定达到最大。有研究表明,冷处理可在一定程度上增加 DHA 的含量^[44]。

②pH 值

对菌体的生长最有利的是中性 pH 值,但是较低的 pH 能够有效增加 DHA 的含量。pH 值的变化是通过 H^+ 浓度的改变而影响细胞生理代谢过程,进而影响 DHA 等多不饱和脂肪酸的合成。破囊弧菌类微生物细胞生长和 DHA 生产的 pH 范围为 5~8。

③溶氧

微生物合成多不饱和脂肪酸时,需要氧参与去饱和和反应,氧分子还可以促进菌体的生长以及维持细胞的代谢。在发酵过程中,需要提高培养基中溶氧水平以促进不饱和脂肪酸的合成,从而提高 DHA 的产量。

吕小艺^[45]利用响应面法优化裂壶藻产 DHA 的发酵条件, 建立主要因素影响 DHA 的二次多项回归模型, 并利用统计学的方法找出最佳值。最后得出生产 DHA 的最佳发酵条件: 接种量为 10.5%, 温度为 26.5 °C, 初始 pH 为 6.5, 在优化条件下连续 3 批次实验验证得到裂壶藻的产脂水平达到与预测值相近。探索了高溶氧有利于菌体的生长和油脂积累, 而低溶氧对裂壶藻胞内 DHA 合成更有利^[45]。

3.2.3 培养方式

微藻的发酵培养主要有分批发酵、连续发酵和流加发酵 3 种方式。

①分批发酵

分批发酵又称分批培养, 是传统的微生物发酵方式, 是指发酵过程中营养物和菌种一次性加入进行培养, 直到结束放出^[46]。该培养模式具有成本低廉、操作简单的特点^[47], 对于研究不同培养条件对微藻生长产生的影响有着很重要的意义。现阶段的微藻培养多是采用这种研究模式^[48-50]。

②连续发酵

连续发酵又称连续培养, 连续发酵过程是当微生物培养到对数时期, 在发酵罐中一方面以一定速度连续不断地流加新鲜液体培养基, 另一方面又以同样的速度连续不断地将发酵液排出, 使藻细胞处于恒定的生长状态, 始终保持旺盛的稳定状态^[51]。

Zhu 等^[52]研究表明, 杜氏盐藻在稀释率为 0.15 d⁻¹ 的条件下, 所得的生物量最大; 栅藻的最佳稀释率为 0.31 d⁻¹, 在此条件下, 藻细胞生长最快^[45]。

③流加发酵

流加发酵也被称作半连续发酵, 是指在微生物分批

发酵中, 以某种方式向培养系统补加一定物料的培养技术^[53], 这种培养模式可以避免一次性加入过多的营养元素从而对微藻的生长造成一定的抑制作用, 使得微藻长期处于对数期^[54]。

在发酵调控方面, 分批补料发酵可以有效缓解高浓度底物的抑制作用, 从而提高生产效率。分批补料发酵也是最常见的手段。其中碳源是最常规的材料^[55]。胡学超等^[55]考虑到裂殖壶菌的微藻属性, 用一些植物激素像是茉莉酸、萘氧基乙酸来调控裂殖壶菌的生长, 提高油脂产率。

4 微藻 DHA 菌种选育技术和发酵培养技术分析

4.1 菌种选育技术分析

通过对菌种选育常用技术进行优缺点的比较与分析, 以期能够为微藻 DHA 菌种选育技术的优化、创新和发展提供基础。通过对比, 如表 1 所示, 可以发现, 物理诱变育种中的激光诱变技术、离子束诱变技术、紫外线诱变以及化学诱变和生物诱变都能够有效取得较高的诱变率, 唯有物理诱变育种的射线诱变技术中的微藻诱变率比较低。

物理诱变相对于化学诱变和生物诱变而言, 物理诱变是最稳定的、容易把控的诱变技术, 而化学诱变则容易造成诱变方向难以把控的局面。除此之外, 化学诱变育种毒性大, 对整个的微藻 DHA 生产都会带来影响。相较于物理诱变和生物诱变育种, 化学诱变育种最大的优势就是价格便宜、易操作, 但是由于 DHA 的主要用途体现在食品行业、医疗保健品行业和饲料行业, 化学诱变育种则变得不可取。

表 1 菌种选育技术优缺点对比分析

Table 1 Comparative analysis of advantages and disadvantages of strain breeding technology

技术类型	技术名称	优点	缺点
物理诱变育种	激光诱变技术	操作简单、诱变率高	半导体激光辐射对细胞和细胞壁都有一定程度的损伤
	离子束诱变技术	集束性好、损伤轻, 突变率高和突变谱广、具有一定的方向性和可控性	对离子注入工艺要求高
	射线诱变技术	刺激藻细胞生长	存活率低、突变谱窄、重复性、方向性差和诱变效率低
	紫外线诱变技术	突变株生长速率高、海藻酸的纯度高	抑制生长
化学诱变育种	甲基磺酸乙酯、亚硝酸基、叠氮化钠、平阳霉素	突变率高、损伤轻、价格便宜、操作简单	突变频率不高、方向难把控、对后代鉴定工作量大、毒性大
生物诱变育种	细胞融合技术		
	转基因技术	育种周期短、变异率高	变异不稳定
	常压室温等离子体生物诱变技术	对操作者安全、环境友好、操作简便、突变快速、突变率高、获得的突变体性状稳定	

物理诱变育种和生物诱变育种都具有变异率高的优势,但是物理诱变育种的激光诱变会对细胞和细胞壁都有一定程度的损伤,离子束诱变技术对离子注入工艺要求高,射线诱变则会影响诱变的效率,紫外线诱变会抑制藻类的生长,相较而言,生物诱变育种的育种周期短、变异率高能有效保证菌种选育的质量和安全性。ARPT作为一种新兴的高效生物突变手段,具有放电均匀、活性粒子浓度高、化学活性物种可调控性好、操作简单、安全性高、环境友好、突变速率快、突变率高、突变多样性大等特点,在整个生物技术领域具有广阔的应用前景^[56]。目前,生物诱变育种是最常用的藻类DHA菌种选育技术。

4.2 发酵培养技术分析

通过对发酵培养技术的优缺点进行分析,得出分批发酵对温度的要求低、工艺操作比较简单,比较容易解决杂菌污染和菌种退化等问题;但是存在人力、物力、动力消耗比较大,生产周期短和生产效率低等问题。连续和流加发酵则可以提高设备的利用率和单位时间产量,只保持一个相对稳定的状态,而且发酵中的各参数都是趋于一个恒值的;但是也存在一定的缺陷,对设备的合理性和加料设备的精确性要求比较高,营养成分的利用较分批发酵而言,也比较差,产物浓度也没有分批发酵得到的浓度高,同时还存在一定的杂菌污染机会。

5 结论和建议

通过对微藻DHA菌种选育和发酵培养技术的研究,可得出如下结论:对微藻的选育一般采用物理、化学或生物学的手段。应用最为广泛的物理学手段是射线辐射育种,化学诱变是一种迅速发展的育种途径,具有很多优点,但是也存在诸多缺点。近来多利用的是生物学方法技术,并且出现了新的生物学诱变技术-ARTP诱变育种技术,该技术突变率高、突变库容大。分批发酵操作简单、投资少、运行周期短、染菌机会少、生产过程和产品质量较易控制是适合发展的,是应用最广泛,性价比最高的微藻DHA发酵技术。

针对以上结论,提出对微藻DHA菌种选育和发酵培养技术的建议:

1) 现阶段的藻种选育技术比较成熟,但是仍然存在可同时评价多指标的选育方法。将生物技术与化学诱变育种相结合,微藻DHA选育的遗传研究和定位突变会更加有效和准确;进行基因组学、基因工程等方法先对微藻的藻细胞进行深度分析,减少微藻菌种选育过程中的冗余工作。

2) 应积极优化和完善微藻菌种选育和发酵培养中出现的新技术,比如ARTP诱变育种技术,提高DHA产量的同时进一步降低生产成本;通过研发与其匹配的高通量选育技术,结合系统生物学方法,加速微藻DHA菌种选育和发酵培养领域新技术的研究。

3) 结合未来市场需求加大对DHA提取后的抗氧化性技术、加工稳定性技术等应用技术的研发,掌握核心技术,抢占市场先机。

参考文献

- [1] 周洪,魏凤,邓阿妹,等.基于专利分析的藻油DHA技术发展研究[J].中国油脂,2017,42(11):1-7.
Zhou H, Wei F, Deng AM, *et al.* Development of algae oil DHA technology based on patent analysis [J]. *Chin Oils Fats*, 2017, 42(11): 1-7.
- [2] 魏凤,侯鑫鑫,邓阿妹.基于专利的全球微藻DHA发酵培养技术发展态势研究[J].食品科技,2017,42(6):116-121.
Wei F, Hou XX, Deng AM. Development trend analysis of global microalgae DHA fermentation culture technology based on patents [J]. *Food Sci Technol*, 2017, 42(6): 116-121.
- [3] 杨浩,金小婉,唐嘉洪,等.裂殖壶菌合成二十二碳六烯酸机理研究进展[J].中国油脂,2019,44(8):109-115.
Yang H, Jin XW, Tang JQ, *et al.* Progress in mechanism of docosahexaenoic acid synthesis by *Schizomyces* [J]. *Chin Oils Fats*, 2019, 44(8): 109-115.
- [4] Samar A, Tolbatao S, Andrew D, *et al.* Supplemental docosahexaenoic-acid-enriched microalgae affected fatty acid and metabolic profiles and related gene expression in several tissues of broiler chicks [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(23): 6497-6507.
- [5] 钟惠昌.以乳清分离蛋白为主壁材制备DHA藻油微囊粉的研究[J].食品工业科技,2015,17:224-228.
Zhong HC. Study on the preparation of DHA algal oil microcapsule powder using whey isolate protein as main wall [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2015, 17: 224-228.
- [6] 胡本涛.DHA固体脂质纳米颗粒(SLN)制备、性质及应用[D].哈尔滨:东北农业大学,2013.
Hu BT. Preparation, Properties and Application of DHA Solid Lipid Nanoparticles (SLN) [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013.
- [7] Liu J, Pei GS, Diao JJ, *et al.* Screening and transcriptomic analysis of *Cryptocodinium cohnii* mutants with high growth and lipid content using the acetyl-CoA carboxylase inhibitor sethoxydim [J]. *Appl Microbiol Bio-technol*, 2017, 101(15): 6179-6191.
- [8] 赵爱娟.海洋微藻的诱变育种及其脂肪酸的测定[D].南京:南京理工大学,2005.
Zhao AJ. Mutation breeding of marine microalgae and determination of fatty acids [D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2005.
- [9] 刘振华,王燕,李英波.多粘菌素菌种选育和发酵技术研究进展[J].基因组学与应用生物学,2016,35(7):1662-1667.
Liu ZH, Wang Y, Li YB. Research progress of strain breeding and fermentation of polymyxin [J]. *Genom Appl Biol*, 2016, 35(7): 1662-1667.
- [10] 张学成,时艳侠,孟振.小球藻紫外线诱变及高产藻株筛选[J].中国海洋大学学报,2007,(5):749-753.
Zhang XC, Shi YX, Meng Z. Ultraviolet mutagenesis of *Chlorella* and screening of high-yielding algae [J]. *Period Ocean Univ China*, 2007, (5): 749-753.
- [11] Wang ZP, Zhao Y. Morphological reversion of *Spirulina (arthrospira) platensis* (cyanophyta): From linear to helical [J]. *J Phycol*, 2005, 41(3):

- 622–628.
- [12] 梁英, 陈书秀. 微藻育种的研究现状及前景[J]. 海洋通报, 2008, 27(3): 88–94.
Liang Y, Chen SX. Current status and prospect of studies on microalgal breeding [J]. Mar Sci Bull, 2008, 27(3): 88–94.
- [13] 刘红全, 林小园, 李洁琼, 等. 三角褐指藻的诱变育种及产 EPA 的条件研究[J]. 生物技术通报, 2014, (9): 114–119.
Liu HQ, Lin XY, Li JQ, et al. The research on mutagenesis breeding of phaeodactylum tricornutum and the condition of EPA producing [J]. Biotechnol Bull, 2014, (9): 114–119.
- [14] 刘振华, 王燕, 李英波. 多粘菌素菌种选育和发酵技术研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(7): 1662–1667.
Liu ZH, Wang Y, Li YB. Research progress of strain breeding and fermentation of polymyxin [J]. Genom Appl Biol, 2016, 35(7): 1662–1667.
- [15] Park S, Kim K, Han S, et al. Organic solvent-free lipid extraction from wet *Aurantiochytrium* sp. biomass for co-production of biodiesel and value-added products [J]. Appl Biol Chem, 2017, 60(2): 101–108.
- [16] 卢佳琦, 李市场, 刘永康, 等. 普鲁兰酶产生菌的诱变选育及其发酵工艺的优化[J]. 核农学报, 2019, 33(4): 705–712.
Lu JQ, Li SC, Liu YK, et al. Research on mutation and breeding and optimization of fermentation process of pullulanase producing [J]. J Nucl Agric Sci, 2019, 33(4): 705–712.
- [17] 王丽. 有关微生物菌种选育技术的探索[J]. 生物技术世界, 2014, (1): 9.
Wang L. Exploration on the breeding technology of microbial strains [J]. Biotech World, 2014, (1): 9.
- [18] 张云野, 王轶男, 凌宏志, 等. 不同物理诱变方式对休哈塔假丝酵母产乙醇的影响[J]. 中国酿造, 2019, 38(2): 92–98.
Zhang YY, Wang YN, Ling HZ, et al. Effects of different physical mutagenesis methods on ethanol production by *Candida albicans* [J]. China Brew, 2019, 38(2): 92–98.
- [19] Kuo C, Liao H, Wang Y, et al. Highly efficient ex-raction of EPA /DHA-enriched oil from cobia liver u-sing homogenization plus sonication [J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2017, 119(10): 1600466.
- [20] 刘振华, 王燕, 李英波. 多粘菌素菌种选育和发酵技术研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(7): 1662–1667.
Liu ZH, Wang Y, Li YB. Research progress of strain breeding and fermentation of polymyxin [J]. Genom Appl Biol, 2016, 35(7): 1662–1667.
- [21] 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.
Wei P, Ma XC, Ren LJ, et al. Advances in research on fermentation of DHA by *Schizochytrium* [J]. Sci Technol Food Ind, 2010, 31(10): 398–401.
- [22] 朱婧瑶, 张红漫, 胡耀池, 等. 面向工业化的裂殖壶菌 DHA 油脂提取方法研究[J]. 食品科技, 2011, (9): 32–35.
Zhu JY, Zhang HM, Hu YC, et al. Comparison on lipid extraction methods of *Schizochytrium* sp. for industrialization [J]. Food Sci Technol, 2011, (9): 32–35.
- [23] 季方. 能源微藻选育及基于厌氧发酵液培养的生物质生产研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
Ji F. Breeding of energy microalgae and biomass production based on anaerobic fermentation broth culture [D]. Beijing: China Agricultural University, 2015.
- [24] Moellering ER, Benning C. RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Eukaryotic Cell, 2010, 9(1): 97–106.
- [25] Li Y, Han D, Hu G, et al. *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol [J]. Metabol Eng, 2010, 12(4): 387–391.
- [26] Carvalho AP, Meireles LA, Malcata FX. Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances [J]. Biotechnol Prog, 2006, 22(6): 1490–1506.
- [27] 郑宇, 谢三款, 于松峰, 等. 中国传统发酵调味品微生物功能分析与菌种选育技术[J]. 生物产业技术, 2017, (1): 82–90.
Zheng Y, Xie SK, Yu SF, et al. Functional analysis and breeding methods of microorganisms for Chinese traditional fermented condiments [J]. Biotechnol Bus, 2017, (1): 82–90.
- [28] 张雪, 张晓菲, 王立言, 等. 常压室温等离子体诱变育种及其应用研究进展[J]. 化工学报, 2014, 65(7): 2676–2684.
Zhang X, Zhang XF, Wang LY, et al. Advances in biological mutation breeding and its application in atmospheric pressure room temperature plasma [J]. J Chem Ind Eng, 2014, 65(7): 2676–2684.
- [29] 孔帅, 陈敏, 郑美娟, 等. 常温常压等离子体诱变选育高产 L-异亮氨酸谷氨酸棒杆菌[J]. 中国酿造, 2019, 38(7): 76–79.
Kong S, Chen M, Zheng MJ, et al. Mutation breeding of high-yield L-isoleucine *Corynebacterium glutamicum* by atmospheric and room temperature plasmas mutagenesis [J]. China Brew, 2019, 38(7): 76–79.
- [30] Rodriguez-Herrera M, Khatri Y, Marsh SP, et al. Feeding microalgae at a high level to finishing heifers increases the long-chain n-3 fatty acid composition of beef with only small effects on the sensory quality [J]. Int J Food Sci Technol, 2017, 53: 1619.
- [31] 李小坤, 王旺, 林影, 等. 常压室温等离子体(ARTP)诱变选育高核酸酿酒酵母[J]. 现代食品科技, 2018, 34(12): 137–144, 238.
LI XK, Wang W, Lin Y, et al. Screening of high-yield nucleic acid *saccharomyces cerevisiae* strain by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) technique [J]. Mod Food Sci Technol, 2018, 34(12): 137–144, 238.
- [32] 唐鑫, 陈海琴, 姚青蔚, 等. 高产花生四烯酸高山被孢霉的诱变育种研究[J]. 中国油脂, 2018, 43(8): 104–108.
Tang X, Chen HQ, Yao QW, et al. Mutation breeding of high arachidonic acid – producing strain in *Mortierella alpina* [J]. China Oils Fats, 2018, 43(8): 104–108.
- [33] Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products [J]. Renew Sustain Energy Rev, 2010, 14(2): 557–577.
- [34] Falkowski PG, Raven JA. Aquatic photosynthesis [M]. Princeton: Princeton University Press, 2013.
- [35] Lee RE. Phycology [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.
- [36] Mata TM, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review [J]. Renew Sustain Energy Rev, 2010, 14(1): 217–232.
- [37] Chi ZY, Lin Y, Frear C. Study of a two-stage growth of DHA-producing marine algae *Schizochytrium* sp limacinum SR21 with shifting dissolved oxygen level [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 81: 1141–1148.
- [38] 王灿, 张伟, 张明亮, 等. 裂壶藻产 DHA 发酵培养基的优化[J]. 食品工业科技, 2015, 36(4): 171–174, 179.

- Wang C, Wang W, Zhang ML, *et al.* Optimization of fermentation medium for DHA production from *Chlamydomonas* SPP [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2015, 36(4): 171–174, 179.
- [39] 康晶, 郑志永, 詹晓北, 等. 氮源和溶氧限制对裂殖壶菌 (*Schizochytrium limacinum*)SR21 合成二十二碳六烯酸的影响[J]. *工业微生物*, 2013, 43(02): 58–63.
- Kang J, Zheng ZY, Zhan X, *et al.* Effects of nitrogen source and dissolved oxygen limitation on the synthesis of docosahexaenoic acid from *Schizochytrium limacinum* SR21 [J]. *Ind Microbiol*, 2013, 43(2): 58–63.
- [40] 金文翔, 戈梅, 钱秀萍. 响应面法优化裂殖壶菌 DHA 发酵培养基[J]. *食品与发酵科技*, 2015, 51(4): 13–16, 33.
- Jin WX, Ge M, Qian XP. Medium optimization for DHA production in *Schizochytrium* sp. using response surface methodology [J]. *Food Ferment Technol*, 2015, 51(4): 13–16, 33.
- [41] Sahin D, Tas E, Altindag, *et al.* Enhancement of docosahexaenoic acid (DHA) production from *Schizochytrium* sp. S31 using different growth medium conditions [J]. *AMB Express*, 2018, 8(1): 7.
- [42] Chauton MS, Reitan KI, Norsker NH, *et al.* A techno-economic analysis of industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA-rich raw material for aquafeed: Research challenges and possibilities [J]. *Aquaculture*, 2015, 436: 95–103.
- [43] 杨浩, 金小碗, 唐嘉淇, 等. 裂殖壶菌合成二十二碳六烯酸机理研究进展[J]. *中国油脂*, 2019, 44(8): 109–115.
- Yang H, Jin XW, Tang JQ, *et al.* Progress in mechanism of docosahexaenoic acid synthesis by *Schizomycetes limacinum* [J]. *China Oils Fats*, 2019, 44(8): 109–115.
- [44] 刘静, 高媛媛, 江贤章, 等. 低温胁迫对裂殖壶菌 DHA 生物合成及 SOD 表达的影响[J]. *药物生物技术*, 2010, 17(1): 50–55.
- Liu J, Gao YY, Jiang XZ, *et al.* Effects on docosahexaenoic acid biosynthesis and expression of superoxide dismutase in *Schizochytrium* at low temperature [J]. *Pharm Biotechnol*, 2010, 17(1): 50–55.
- [45] 吕小义. 高产 DHA 裂殖壶菌突变株的选育与发酵工艺研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2016.
- LV XY. Breeding and fermentation technology of high DHA production *Schizochytrium* sp. [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2016.
- [46] 钟丘实, 李莉, 陈新丹, 等. 2 株乳杆菌全发酵培养物及其组分的抗氧化能力分析[J]. *生物技术进展*, 2019, 9(3): 290–295.
- Zhong QS, Li L, Chen XD, *et al.* Antioxidant ability analysis of all fermented cultures and their ingredients of two strains of *Lactobacillus* [J]. *Current Biotechnol*, 2019, 9(3): 290–295.
- [47] 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, (12): 544–549.
- Liu YL, Shi F, Yin L, *et al.* Studies on DHA production from marine microalgae [J]. *Prog Pharm Sci*, 2005, (12): 544–549.
- [48] Gentili FG. Microalgal biomass and lipid production in mixed municipal, dairy, pulp and paper wastewater together with added flue gases [J]. *Biores Technol*, 2014, 169: 27–32.
- [49] Yang L, Tan X, Li D, *et al.* Nutrients removal and lipids production by *Chlorella pyrenoidosa* cultivation using anaerobic digested starch wastewater and alcohol wastewater [J]. *Biores Technol*, 2015, 181: 54–61.
- [50] 蒋礼玲, 张亚杰, 李潇萍, 等. 微藻培养模式研究进展[J]. *可再生能源*, 2010, (1): 56–62.
- Jiang LL, Zhang YJ, Li XP, *et al.* Research developments in cultivation modes for microalgae [J]. *Renew Energy Res*, 2010, (1): 56–62.
- [51] Marsot P, Pelletier E, St-Louis R. Effects of triphenyltin chloride on growth of the marine microalga *pavlova lutheri* in continuous culture [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1995, 54(3): 389–395.
- [52] Zhu YH, Jiang JG. Continuous cultivation of *dunaliella sauna* in photobioreactor for the production of carotene [J]. *Eur Food Res Technol*, 2008, 227(3): 953–959.
- [53] 王玉, 黄亮, 彭明梦, 等. 白色金针菇液体发酵培养条件的优化[J]. *北方园艺*, 2018, (20): 148–153.
- Wang Y, Huang L, Peng MM, *et al.* Optimal liquid fermentation conditions of white flammulina velutipes [J]. *Northern Hort*, 2018, (20): 148–153.
- [54] Rodrigues MS, Ferreira LS, Converti A, *et al.* Fed-batch cultivation of *arthrosira(spirulina) platensis*: Potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources [J]. *Biores Technol*, 2010, 101(12): 4491–4498.
- [55] 胡学超, 任路静, 胡耀池, 等. 裂殖壶菌制备二十二碳六烯酸油脂的研究历程及发展前景[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(11): 307–312.
- Hu XC, Ren LJ, Hu YC, *et al.* Research progress and prospect of docosahexaenoic acid-rich oil production by *Schizochytrium* sp. [J]. *Food Ferment Ind*, 2018, 44(11): 307–312.
- [56] 吴亦楠, 邢新会, 张翀, 等. ARTP 生物育种技术与装备研发及其产业化发展[J]. *生物产业技术*, 2017, (1): 37–45.
- Wu YN, Xing XH, Zhang C, *et al.* Recent progress on atmospheric and room temperature plasma(ARTP) biobreeding technology, instrumentation and its industrialization [J]. *Biotechnol Bus*, 2017, (1): 37–45.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

魏凤, 博士, 研究员, 主要研究方向为标准信息研究和应用相关等方面。
E-mail: weif@mail.whlib.ac.cn



段力萌, 硕士研究生, 主要研究方向为情报理论与方法等方面。
E-mail: duanlimeng@mail.las.ac.cn