

n-3 多不饱和脂肪酸 DHA、EPA 研究进展

Advances in n-3 polyunsaturated fatty acids DHA and EPA

朱路英^{1,2}, 张学成¹, 宋晓金¹, 况成宏¹, 孙远征¹

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264025)

中图分类号: Q58

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096 (2007) 11-0078-08

以 DHA 和 EPA 为代表的多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 是指碳原子数多于或等于 18 且含有两个或两个以上双键的一类脂肪酸。通常按照第一个双键的位置把多不饱和脂肪酸分为 3 类: n-3 PUFAs, 即从甲基端数第 1 个双键的位置在第 3 碳位的多不饱和脂肪酸, 如二十二碳六烯酸 (22:6 n-3, DHA) 和二十碳五烯酸 (20:5 n-3, EPA); n-6 PUFAs, 指第一个双键的位置在从甲基端数的第 6 碳位, 如花生四烯酸 (20:4 n-6, AA) 和 γ -亚麻酸 (18:3 n-6, GLA); 另外还有第 1 个双键的位置在第 9 碳位的 n-9 类 PUFAs。我们日常摄入的脂肪主要是动物油脂和植物油脂。其中, 动物油脂中的脂肪酸以饱和脂肪酸为主; 植物油脂主要包括 n-6 类的饱和脂肪酸, 而 n-3 类的饱和脂肪酸含量甚微。然而, 研究发现, 以 DHA 和 EPA 为代表的 n-3 类多不饱和脂肪酸在人体的营养、发育和健康等方面起着重要作用^[1-5]。这一研究的发现, 引起了人们对 n-3 多不饱和脂肪酸特别是 DHA 和 EPA 的高度重视, 世界各国的研究人员围绕 DHA 和 EPA 作了大量的研究工作。在前人研究的基础上, 作者拟对 DHA 和 EPA 的生理功能、合成途径及生物资源等方面做一简要综述。

1 DHA 和 EPA 的生理功能

20 世纪 80 年代, 丹麦的科学家发现格陵兰岛上的爱斯基摩人的心血管发病率明显低于周边国家居民与他们饮食中含有丰富的 n-3 PUFAs 有关^[1]。这一发现引起了人们对 n-3 PUFAs 的高度重视。随着医学等相关学科的发展, 人们对 n-3 PUFAs 特别是 DHA 和 EPA 的生理和药理功能有了进一步的了解。

1.1 防治心血管疾病

EPA 和 DHA 可以抑制内源性胆固醇和甘油三酯的合成, 增加脂蛋白脂酶的活性, 促进周围组织对极低密度脂蛋白的清除, 降低血清中甘油三酯、胆固醇和低密度脂蛋白的含量, 提高高密度脂蛋白的含量; 同时, EPA 和 DHA 还通过调节血小板和血管壁的前列腺素 (PGs) 的产生而发挥抗血栓作用。这些作用均能降低心血管疾病的发病率^[2,3]。

1.2 抗癌作用

EPA 和 DHA 具有良好的免疫调节作用。研究表明, DHA 能促进 T 淋巴细胞的增殖, 提高细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的转录, 而这些细胞因子表达的提高可以促进免疫系统的功能, 从而提高免疫系统对肿瘤细胞的杀伤力^[4]。另外, DHA 和 EPA 结构中含有多个双键, 是脂质过氧化的天然底物。脂质过氧化产生的活性氧能提高肿瘤细胞对治疗药物的敏感性^[5], 产生的自由基和脂质过氧化物则可抑制肿瘤细胞的表达, 缩短染色体的端粒, 促进肿瘤细胞的凋亡^[6]。

1.3 抗炎作用

EPA 和 DHA 具有抗炎症的作用。机理如下: 花生四烯酸 (AA) 通过环氧化酶可产生前列腺素 (PGs), 特别是 PGE₂, 是炎症发生的介质。同时, AA 还通过白细胞的 5-脂氧化酶产生白三烯 (LTs), 如 LTA₄、

收稿日期: 2006-02-26; 修回日期: 2006-06-08

基金项目: 青岛市科技局项目 (02-4-HH-76)

作者简介: 朱路英 (1974-), 女, 山东聊城人, 博士, 讲师, 研究方向: 生化与分子生物学, E-mail: lyzhu@126.com; 张学成, 通讯作者, E-mail: xc Zhang@ouc.edu.cn

LTB₄等。其中 LTB₄具很强的白细胞趋化性,在炎症的发生中起重大作用;而 LTC₄和 LTD₄也通过增加血管的通透性参与炎症过程。而 EPA 可通过白细胞的 5-脂氧化酶产生一类几乎无生理活性的物质 LTA₅、LTB₅等,从而竞争抑制 LTB₄等的合成,同时, LTA₅还可阻碍 LTA₄转化成 LTB₄。并且, EPA 还可通过竞争性抑制作用使 AA 合成 PGE₂减少,降低急性炎症的严重性,因而具有抗炎作用^[7]。DHA 是哺乳动物生物合成 PGs 的强烈抑制剂,也具有抗炎作用^[8]。

1.4 促进神经系统和视觉系统的发育

DHA 是存在于人类乳汁中的一种多不饱和脂肪酸。研究表明, DHA 能促进婴幼儿的神经和视觉系统的发育^[9,10];另外,在胎儿的大脑形成以及心血管系统的生成中也具有重要作用。而胎儿和婴幼儿合成的 DHA 远远不能满足大脑迅速发育的需要^[11],必须从食物中得以补充。因此,母乳哺育和为孕妇和婴幼儿补充适量的 DHA 被提倡和鼓励。

1.5 生物体的重要组成成分

DHA 在大脑和视网膜组织的细胞膜中含量丰富。在视网膜的棒状外侧部分的细胞中, DHA 可达细胞总脂的 60%以上^[12];在人脑组织的细胞中, DHA 占总脂的 10 %左右。因此是人体视觉和神经系统细胞膜的重要组成成分。

另外, DHA 和 EPA 是许多鱼、虾、贝类幼体所必需的脂肪酸,因此可作为水产养殖饵料的添加剂。研究表明,饵料中添加一定比例的 DHA 和 EPA,可显著提高海水鱼、虾及贝类幼仔的成活率和生长速率^[13-15]。另外, DHA 还影响色素的形成和沉淀,因而在防止白化方面也有重要作用^[15]。水产饵料中 DHA 和 EPA 含量的高低已成为评价该种饵料营养价值高低的重要指标^[16]。目前,市场上供应的来自鱼油的 DHA 和 EPA 制品中的 70%被用作水产养殖饵料的添加剂^[17]。

正是由于 n-3 PUFAs 具有诸多生理功能,一些国家和科研机构已建议人们提高膳食中 n-3 PUFAs 的比例,成人每天最好能摄入 1.0~1.5 g 的 n-3 PUFAs^[18]。国际上对 n-3 PUFAs 保健食品和药品的研制与开发十分重视。1991 年日本批准 DHA 作为高血脂症的临床用药。目前,国外市场上销售的 DHA 和 EPA 产品已有几十种,涉及奶粉、饮料、面包类以及水产养殖业的饵料等,商业价值巨大。

2 DHA 和 EPA 的合成途径

在自然界中, n-3 多不饱和脂肪酸一般是由饱和脂肪酸硬脂酸(18:0)在脱氢酶和延长酶交替作用下,经一系列的脱氢和碳链延长后形成。具体过程见图 1^[19]。在动物体内,由于缺乏 Δ -12 油酸脱氢酶,不能形成亚油酸(18:2 $\Delta^{9,12}$)和 α -亚麻酸(18:3 $\Delta^{9,12,15}$),所以这两种脂肪酸必须从食物中得以补充,为必需脂肪酸。亚油酸和 α -亚麻酸再分别作为底物,进一步合成 n-6 和 n-3 类的多不饱和脂肪酸。在高等植物体中,硬脂酸在脱氢酶作用下最终形成亚油酸或 α -亚麻酸,没有更长碳链的多不饱和脂肪酸生成。微生物体内多不饱和脂肪酸的合成机制一般与高等动物基本一致,即先由硬脂酸(18:0)脱氢后形成油酸(18:1 Δ^{12})和亚油酸(18:2 $\Delta^{9,12}$),然后亚油酸再分别进入 n-6 和 n-3 两个不同的途径,最终分别形成花生四烯酸(AA)和 EPA、DHA。

然而,最近研究者在富含 DHA 的海洋真菌裂殖壶菌(*Schizochytrium limacinum*)和 EPA 的生产者海洋细菌 *Shewanella* 体内发现了一条新奇的 n-3 多不饱和脂肪酸的合成途径。该途径不需要多种脱氢酶和碳链延长酶的参与,而是由一个类似聚酮合成酶的基因簇控制合成 DHA 和 EPA^[20]。尽管对这个类聚酮合成酶的催化机制尚未搞清,但是可以推测,在其催化合成 DHA 和 EPA 的过程中,可能涉及到一系列的精确的顺-反双键异构化^[20]。这个新奇的相对简化的 n-3 多不饱和脂肪酸合成体系的发现为通过转基因手段获得 n-3 多不饱和脂肪酸产品带来了新的希望。

3 DHA 和 EPA 的生物资源

3.1 鱼油

目前,商业上 DHA 和 EPA 的来源主要是脂肪含量高的海洋鱼类。在这些鱼油中, DHA 和 EPA 的质量分数可达到 20%~30%。现在海水鱼油的年产量大约为 1.1×10^6 t^[17]。然而,鱼油的质量会随着鱼的种类、捕鱼季节和地点的不同而不同;环境污染、含有不希望的脂肪酸及鱼腥味也影响着鱼油的质量;另外,鱼油还具有加工成本高、易氧化等缺点;并且随着渔业资源的日益紧张,鱼油将很难满足人们对 DHA 和 EPA 等 n-3 多不饱和脂肪酸的市场需求。因此,人们一方面努力发展精炼鱼油的技术,另一方面也在积极开发 n-3 多不饱和脂肪酸的新资源。

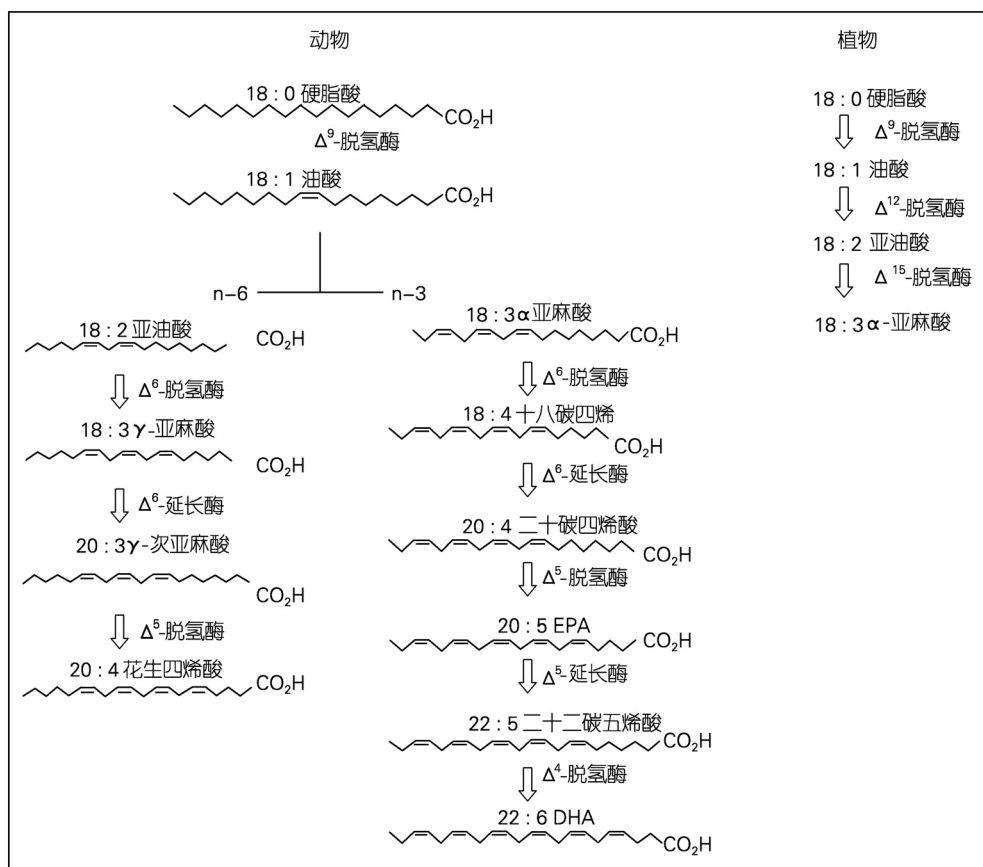


图 1 高等植物和哺乳动物体内多不饱和脂肪酸的合成途径

3.2 海洋微生物

研究发现，尽管一些海洋鱼类自身能够合成 DHA 和 EPA 等 n-3 多不饱和脂肪酸，但是，它们体内积累的 DHA 和 EPA 主要来源于他们的食物。而海洋食物链中的初级生产者——海洋微生物才是 n-3 多不饱和脂肪酸的原始生产者^[21]。因此，在海洋微生物中寻找 n-3 多不饱和脂肪酸的新资源逐渐成为新的研究热点。“微生物油”、“单细胞油”的概念开始被提到。目前，已分离出了多种富含 DHA 和 EPA 的海洋微生物，主要是一些低等的海洋真菌和微藻。与鱼油相比，微生物油具有一些鱼油不可比拟的优点：(1) 筛选出的产油微生物都含有相当高的 PUFAs 含量；(2) 微生物油的氧化稳定性较好；(3) 产油微生物一旦被分离，即可通过生物技术手段扩大培养，不必有资源紧

缺的担忧；(4) 从微生物中提取的 PUFAs 没有鱼腥味，且有些微生物所含的不饱和脂肪酸成分单一，减少了分离过程中相互间的干扰。另外，还可通过生物技术手段对产油微生物的基因组加以改造，进一步提高其生产 PUFAs 的能力。因此，利用微生物生产 DHA 和 EPA 具有广阔的前景。

在已分离的产油的海洋微生物中，金藻纲 (Chrysophyceae)、黄藻纲 (Xanthophyceae)、硅藻纲 (Centricae)、红藻纲 (Rhodophyceae)、绿藻纲 (Chlorophyceae) 和隐藻纲 (Cryptophyceae) 中都有富含 EPA 的藻类。其中有些微藻，如 *Skeletonema costatum*，所含的 EPA 占细胞总脂的 40% 以上^[22]。富含 DHA 的海洋藻类相对较少，主要集中在甲藻、金藻和硅藻中。不过，一些光养型的微藻在工业化生产中存在一些问题

题：培养在开放水体中的微藻一方面容易受到细菌的污染和原生动物的掠食，另一方面其产量受到季节和气候的限制；并且，由于微藻的生长速度较慢，生物量低而使得采收成本相对提高。密闭的光反应器可以提供适合微藻的生长条件，提高微藻的产量，并且使污染的问题得以解决，但是光养型微藻对反应器中光强的要求限制了其培养规模，从而提高了应用光反应器培养微藻的成本^[23]。与光养型的微藻相比，能利用有机碳作为唯一碳源和能源进行生长的异养微生物更容易通过生物反应器进行大规模培养且产量较高，它们作为微生物油的新资源更被人们所看好。已发现的能生产 EPA 和 DHA 的异养微生物主要有：一些能够异养生长的微藻和虫霉目和水霉目的几种低等海洋真菌。不过，对于用异养微生物生产 DHA 和 EPA 也面临一些问题：（1）至今已分离的可生产 DHA 和 EPA 的微生物种类有限，需进一步开发新的富含 DHA、EPA 的异养微生物资源；（2）因为异养微生物生长需要丰富的培养基，加之其生长速率相对较低（相对细菌而言），培养过程中容易受到细菌的污染。因此，需要严格控制无菌化操作；（3）对于新分离的用于生产 DHA、EPA 的海洋微生物，需要对其进行安全性评价^[17]。

目前，商业上用于生产 DHA 的海洋微生物主要有裂殖壶菌（*Schizochytrium limacinum*）和隐甲藻（*Cryptocodinium cohnii*）。

3.2.1 裂殖壶菌

裂殖壶菌是属于水霉目、破囊壶菌科的一类类藻的海洋真菌。单细胞，球形（图 2）。细胞内积累了大量的油脂，可占其细胞干质量的 70% 以上，总脂肪酸中 DHA 的质量分数达 30%~40%，且细胞中 90% 以上的油脂以人体易吸收的中性油脂——甘油三酯（TG）的形式存在^[24]。最早将裂殖壶菌应用于商业化生产的是美国的 Omega 生物技术公司。早在 1991 年，该公司即研究出了一套裂殖壶菌的培养工艺，培养 48 h 后，菌体的生物量可达 20 g/L，DHA 达细胞干质量的 10%^[25]。几年后，日本的 Nagase 生化公司的研究人员对分离自西太平洋 Yap 岛的裂殖壶菌 SR21 的培养条件进行了优化，在生物反应器中培养 4 d 后，菌体生物量和 DHA 产量分别高达 48.1 g/L 和 13.3 g/L^[26]。最近，又有几株生产 DHA 的裂殖壶菌被分离出^[27,28]，这些菌株所产生的 DHA 的量从 0.328 g/L

（培养 4 d）到 2.7 g/L（培养 52 h）不等。

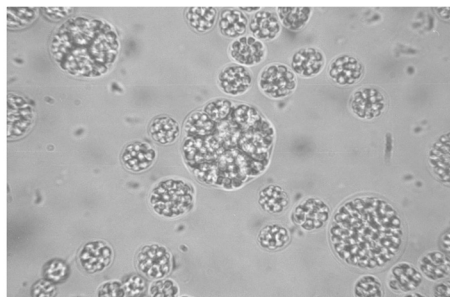


图 2 富含 DHA 的海洋真菌裂殖壶菌

对于裂殖壶菌的安全性评价，Hammond 等^[29]做了全面、详细的研究，包括对大鼠的亚急性毒性实验、对大鼠和兔子发育的毒性实验^[30]、对大鼠生殖影响的实验^[31]、对大鼠的诱变实验^[32]以及对猪发育的安全性评价^[33]，均未发现有任何毒副作用。这证明使用裂殖壶菌作为食品添加剂饲喂大鼠、兔和猪是安全可靠的，其安全性已得到美国食品和药品局（Food and Drug Administration）的认可。

3.2.2 隐甲藻

Cryptocodinium cohnii 是一种富含 DHA 的海洋甲藻，细胞中 DHA 可达细胞总脂的 25%~60%，而其它多不饱和脂肪酸的总和还不到总脂的 1%^[34-36]，因此，是一种理想的富含 DHA 的新资源。在 20 世纪初，美国的 Market 生物科学公司在大型的生物反应器中培养 *C. cohnii* 用于商业化生产 DHA。De Swaaf 等^[34]用葡萄糖作碳源在生物反应器中培养 *C. cohnii* ATCC 30772，74 h 后，生物量达 27.7 g/L；91 h 后，总脂和 DHA 的产量分别达 3.7 g/L 和 1.6 g/L。与葡萄糖相比，用醋酸或乙醇作碳源对 *C. cohnii* 中 DHA 的产生更有效^[35-38]。De Swaaf 等^[39]使用纯的乙酸作碳源并延长 *C. cohnii* ATCC 30772 的培养时间，得到了 109 g/L 的生物量，61 g/L 的总脂和 19 g/L 的 DHA 产量。其中，总脂和 DHA 的产率分别为 152 mg/(L·h) 和 48 mg/(L·h)。不过这种高密度的培养需要剧烈的搅拌才能维持培养基中的供氧水平，而剧烈搅拌往往会使细胞产生一种粘性的胞外多糖，增加培养物的黏度，不利于后期的细胞收集，需加入多糖水酶降解胞外多糖，降低细胞的粘性。

4 影响微生物 DHA 和 EPA 合成的因素

微生物体内 DHA 和 EPA 的合成除了受到基因组的精细调控外,环境因子如营养源、温度、pH 等也极大地影响细胞中脂肪酸的合成和积累。因此,综合考虑各种因素对微生物进行优化培养以达到最高的 DHA 和 EPA 产量,具有重要意义。

4.1 碳源和氮源

碳源的种类对微生物发酵产生的细胞生物量、总脂含量以及 DHA 和 EPA 的产量均有重要影响。总的来说,葡萄糖、果糖和蔗糖是常用的有机碳源,NaHCO₃ 和 CO₂ 是培养微藻常用的无机碳源。其中,葡萄糖是多种异养微藻和真菌的最佳碳源和能源物质,加之其价格相对低廉,故常应用于 DHA 和 EPA 的工业化生产中。但是,碳源对细胞生物量的影响与对细胞中 DHA 和 EPA 含量的影响并不一致。比如马铃薯粉对裂殖壶菌 OUC88 的生长最有利,但用葡萄糖作碳源收获的 DHA 产量最高^[40]。

氮源的种类同样也影响着微生物细胞的生长和 DHA 和 EPA 的合成。NaNO₃、NH₄Cl 和尿素是培养微藻常用的氮源物质,它们对微藻脂质的合成及 DHA、EPA 含量的影响因藻种而异。酵母提取物是常用的有机氮源^[27,28],在培养裂殖壶菌时,玉米浆和豆粕水解物对于 DHA 的合成是最有效的^[26,40];不过也有人认为无机氮源更利于真菌中 PUFAs 的积累^[41,42]。

培养基中碳源和氮源的浓度主要通过影响微生物的生长量而影响着 DHA 和 EPA 的产量。一般来说,细胞生物量随着碳、氮源浓度的升高而增加,但过高的碳、氮源浓度会抑制细胞生长^[26,40]。另外,培养基中的碳氮比也影响着微生物细胞中 DHA 和 EPA 的合成,适当地提高碳氮比有利于细胞中脂质的积累^[26,40]。

4.2 温度

温度对微生物的生长以及细胞的生化组成都有显著的影响。大量实验表明,温度在 PUFAs 的合成过程中起主导作用。温度降低微生物细胞中脂肪酸不饱和度增加。Makoto 等^[43]研究表明,低温能够诱导 *Marchantia polymorpha* EPA 的积累。在 25 °C 时,EPA 在总脂肪酸中的比例为 3%,15 °C 时,上升至 9%。菱形藻 (*Nitzschia paleacea*) 的 EPA 含量与温度呈负相关,当温度从 10 °C 上升到 25 °C 时,EPA 含量由 28.4% 下降至 18.1%,DHA 也呈相同的趋势^[44]。微生

物通过提高细胞中脂肪酸的不饱和度来增加细胞膜的流动性,以适应低温环境,保证细胞进行正常的生理活动^[45,46]。不过,每种微生物都有其生长的最适温度,温度过低不利于细胞的生长。因此,应综合考虑,找出一个 DHA、EPA 产量最高的温度。

4.3 光照

光照是影响自养型微藻生长的重要因素,同时还影响着脂质中不饱和脂肪酸的水平。光照对微藻脂肪酸组成的影响具有种间差异性。一般认为低光强更利于微藻积累 PUFAs^[47-49],如三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) 和角刺藻 (*Chaetoceros simplex*) 中 EPA 占总脂肪酸的含量均随光强的增加而降低^[47,48];然而,巴夫藻 (*Pavlova lutheri*) 的 DHA 含量和紫球藻 (*Porphyridium cruentum*) 的 EPA 含量却随光强的增加而增加^[48,50];小球藻 (*Chlorella minutissima*) 的总脂含量和脂肪酸组成受光强的影响不大,EPA 含量随光强的增加略有上升^[51]。

4.4 通气量

微生物 PUFAs 的合成过程需要分子氧的参与,氧的利用率通常决定了脂肪酸的不饱和程度。分子氧对隐甲藻的生长和脂肪酸合成影响较显著。培养液中氧浓度的提高能够促进隐甲藻 DHA 的合成^[52]。同时,CO₂ 浓度对微藻的生长和 PUFAs 的合成有重要影响。主要表现在两个方面:一是光合作用无机碳吸收方面。实验证明天然海水中的无机碳无法满足微藻光合作用的需要,在培养液中充以不同浓度的 CO₂ 有利于提高微藻的光合作用,促进微藻的生长;二是 CO₂ 进入水体后会形成水合形式 (H₂CO₃),H₂CO₃ 解离产生 H⁺ 从而改变培养液中的 pH 值^[16]。

4.5 pH

培养基 pH 的改变能够影响微生物对环境中营养物质的吸收、膜结合蛋白的生物活性以及细胞膜的功能,从而影响微生物脂肪酸的组成和含量^[53]。王秀良等^[54]发现,在 pH 为 9.8 的条件下,眼点拟绿球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 的总脂明显下降,EPA 占总脂肪酸的比例最低;pH 为 6.8 时最高。后棘藻 (*Ellipsoidion* sp.) 70-01 的总脂在 pH 为 8.5 时最高,但 EPA 和 PUFAs 在 pH 为 7.5 时最高,并随 pH 的升高而降低^[49]。裂殖壶菌 (*S. limacinum*) OUC88 在 pH 为 7.0 时细胞中 DHA 含量最高^[40]。

5 问题和展望

目前,通过生物技术手段生产多不饱和脂肪酸已成为世界各国生物领域的重要课题。在日本和一些欧美国家,应用微生物生产 DHA 和 EPA 已进入工业化生产阶段, DHA 和 EPA 作为药品、营养保健品以及水产养殖业的饵料添加剂供应上市,取得了巨大的经济效益。国内也开始了对 DHA 和 EPA 的研究开发工作,但目前还仅限于实验室培养阶段。因此,还有待于进一步筛选高产 DHA、EPA 的菌种和探讨最佳的发酵条件,以早日实现工业化大规模的生产。总之,随着水产养殖业的迅速发展和 DHA、EPA 在食品和药品上的应用,人们对 n-3 多不饱和脂肪酸的需求将不断扩大。通过生物技术手段培养海洋微生物生产 DHA、EPA 作为一项新兴的产业,将具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Dyerberg J, Bang H O. Observations on populations in Greenland and Denmark, in nutritional evaluation of long-chain fatty acids[M]. New York: Academic Press, 1981.
- [2] Kang J X, Leaf A. The cardiac antiarrhythmic effects of polyunsaturated fatty acid [J]. **Lipids**, 1996, 31: 41-44.
- [3] Nordoy A, Marchioli R, Arnesen H, *et al.* n-3 polyunsaturated fatty acid and cardiovascular disease [J]. **Lipids**, 2001, 36: 127-129.
- [4] 马栋柱, 孙克任, 赵丽. 药物 AC-88 的抗肿瘤作用和对荷瘤小鼠 T 细胞的 Fas, NF-KB/I-KB 的影响[J]. 免疫学杂志, 2002, 22(4): 246-249.
- [5] 陈爱军, 朱耀明, 杨振华. DHA 在人乳腺癌中对阿霉素活性的影响与脂质过氧化作用的关系[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2002, 9(4): 22-29.
- [6] Das U. A radical approach to cancer [J]. **Med Sci Monit**, 2002, 8: 79-92.
- [7] Gill I, Valivety R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications [J]. **Trends Biotechnol**, 1997, 15: 401-409.
- [8] James M J, Beringer C, Kless T. Dietary polyunsaturated fatty acid and inflammatory mediator production [J]. **Clin Nutr**, 2000, 71: 343-348.
- [9] Nettleton J A. Are n-3 fatty acids essential nutrients for fetal and infant development [J]. **J Am Diet Assoc**, 1993, 93: 58-64.
- [10] Das U N, Fams M D. Long-chain polyunsaturated fatty acids in the growth and development of the brain and memory [J]. **Nutrition**, 2003, 19: 62-65.
- [11] Crawford M A. The requirements of long-chain n-6 and n-3 fatty acids for the brain [J]. **Proc Am Oil Chem Soc**, 1987, 24: 270-295.
- [12] Giusto N M, Pasquare S J, Salvador P I, *et al.* Lipid metabolism in vertebrate retinal rod outer segments [J]. **Prog Lipid Res**, 2000, 39: 315-391.
- [13] Koueta N, Boucaud C E, Noel B. Effect of enriched natural diet on survival and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* [J]. **Aquaculture**, 2002, 203: 293-310.
- [14] Song X J, Zhang X C, Zhu L Y, *et al.* Evaluation of a DHA-rich *Schizochytrium* sp. as a diet enrichment for larval of marine aquaculture[J]. **Fisheries Science**, 2007, 73(3):171-175.
- [15] Copeman L A, Parrish C C, Brown J A. Effects of docosa-hexaenoic, eicosapentaenoic and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellow-tail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment [J]. **Aquaculture**, 2002, 210: 285-304.
- [16] 蒋汉明. 优化海产微藻多不饱和脂肪酸生产条件的研究[D]. 汕头, 汕头大学, 2003.
- [17] Sijsma L, Sweaf M E. Biotechnological production and applications of the omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2004, 64: 146-153.
- [18] Barclay W R, Meager K M, Abril J R. Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms [J]. **J Appl Phycol**, 1994, 6: 123-129.
- [19] Johnathan A N. Plumbing the depths of PUFA biosynthesis: a novel polyketide synthase-like pathway from marine organisms [J]. **Trends in Plant Science**, 2002, 7: 51-54.
- [20] Metz J G, Roessler P, Facciotti D, *et al.* Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthetases in both prokaryotes and eukaryotes [J]. **Science**, 2001, 293: 290-295.
- [21] Achman R G, Jangaard P M, Hoyle R J, *et al.* Origin of marine fatty acids. Analysis of the fatty acids produced by

- the diatom *Skeletonema costatum* [J]. **J Fish Res Board Can**, 1964, 21: 747-756.
- [22] Servel M O, Claire C, Derrien A, *et al*. Fatty acid composition of some marine microalgae [J]. **Phytochemistry**, 1994, 36: 691-693.
- [23] Barclay W R, Meager K M, Abril J R. Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms [J]. **J Appl Phycol**, 1994, 6: 123-129.
- [24] Yaguchi T, Tanaka S, Yokochi T, *et al*. Production of high yields of docosahexaenoic acids by *Schizochytrium* sp. strain SR21 [J]. **J Am Oil Chem Soc**, 1997, 74: 1 431-1 434.
- [25] Barclay W R. Process for the heterotrophic production of products with high concentrations of omega-3 highly unsaturated fatty acids[P]. America, World patent WO91/07498, 1991.
- [26] Yokochi T, Honda D, Higashihara T, *et al*. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21 [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1998, 49: 72-76.
- [27] Fan K W, Chen F, Jones E B G, *et al*. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids production by okara utilizing potential of traustochytrids [J]. **J Ind Microbiol Chem**, 2001, 27: 199-202.
- [28] Wu S T, Yu S T, Lin L P. Effect of culture conditions on docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp.S31[J]. **Process Biochem**, 2005, 40: 3 103-3 108.
- [29] Hammond B G, Mayhew D A, Naylor M W, *et al*. Safety assessment of DHA-Rich microalgae from *Schizochytrium* sp.: I. Subchronic rat feeding study [J]. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 2001, 33: 192-204.
- [30] Hammond B G, Mayhew D A, Holson, J F, *et al*. Safety assessment of DHA-Rich microalgae from *Schizochytrium* sp.: II. Developmental toxicity evaluation in rats and rabbits [J]. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 2001, 33: 205-217.
- [31] Hammond B G, Mayhew D A, Robinson K, *et al*. Safety assessment of DHA-Rich microalgae from *Schizochytrium* sp.: III. Single-generation rat reproduction Study [J]. **Journal of Archaeological Science**, 2001, 33: 356-362.
- [32] Hammond B G, Mayhew D A, Kier L D, *et al*. Safety assessment of DHA-Rich microalgae from *Schizochytrium* sp.: IV. Mutagenicity studies [J]. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 2002, 35: 255-265.
- [33] Abril R, Garrett J, Zeller S G, *et al*. Safety assessment of DHA-rich microalgae from *Schizochytrium* sp. Part V: Target animal safety/toxicity study in growing swine [J]. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 2003, 37: 73-82.
- [34] Swaaf M E, Rijk T C, Eggink G, *et al*. Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii* [J]. **J Biotechnol**, 1999, 70: 185-192.
- [35] Ratledge C, Kanagachandran K, Anderson AJ, *et al*. Production of docosahexaenoic acid by *Cryptocodinium cohnii* grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source [J]. **Lipids**, 2001, 36: 1 241-1 246.
- [36] Swaaf M E. Docosahexaenoic acid production by the marine alga *Cryptocodinium cohnii* [D]. Delft, Delft Technical University, PhD thesis, 2003.
- [37] Swaaf M E, Sijtsma L, Pronk J T. High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* [J]. **Biotechnol Bioeng**, 2003, 81: 666-672.
- [38] Swaaf M E, Pronk J T, Sijtsma L. Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2003, 61: 40-43.
- [39] Swaaf M E, Grobden G J, Eggink G, *et al*. Characterisation of extracellular polysaccharides produced by *Cryptocodinium cohnii* on ethanol [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2001, 57: 395-400.
- [40] Zhu L Y, Zhang X C, Song X J, *et al*. Effect of temperature, salinity, pH, carbon and nitrogen sources on the growth and docosahexaenoic acid production of *Schizochytrium limacinum*[J]. **Process Biochem**, 2007, 42(2): 210-214.
- [41] 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].微生物杂志,1997,17:52-55.
- [42] 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,2001,41:87-93.
- [43] Makoto S, Takio S, Kanji O. Low temperature-induced accumulation of eicosapentaenoic acid in *Marchantia polymorpha* cells[J]. **Phytochem**, 1999, 52: 367-372.

- [44] Renaud S M. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp.[J]. **J Appl Phycol**, 1995, 7: 595-602.
- [45] Suutari M, Laakso S. Microbial fatty acids and thermal adaptation [J]. **Crit Rev Microbiol**, 1994, 20: 285-328.
- [46] Sajbidor J. Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids [J]. **Crit Rev Biotechnol**, 1997, 17: 87-103.
- [47] 廖启斌, 李芊, 李文权, 等. 光辐射对海洋微藻脂肪酸含量的效应[J]. 海洋技术, 2002, **21**(1): 46-48.
- [48] Thompson P A, Harrison P J, Whyte J N C. Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton[J]. **J Phycol**, 1990, 26: 278-283.
- [49] 徐年军, 张学成. 温度、光照、pH 值对后棘藻生长及脂肪酸含量的影响[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, **31**(4): 541-547.
- [50] 温少红, 李叙凤, 鞠宝, 等. 微藻高度不饱和脂肪酸的研究[J]. 海洋通报, 2000, **19**(4): 86-91.
- [51] Steo A, Wang H L, Hessenline C W. Cultured conditions affect eicosapentaenoic acid content of *Chlorella minutissima*[J]. **J Am Oil Chem Soc**, 1984, **61**(5): 892-894.
- [52] 徐天宇. 利用生物技术生产二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸[J]. 食品与发酵工业, 1995, 1: 56-64.
- [53] Shu C H, Lung M Y. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorate* in batch cultures [J]. **Process Biochem**, 2004, 39: 931-937.
- [54] 王秀良, 刘晨临, 张学成. pH 对眼点拟绿球藻的生长、总脂含量及脂肪酸组成的影响[J]. 海洋科学, 2002, **26**(5): 63-67.

(本文编辑: 张培新)

(上接第 18 页)

Effects of temperature, pH value and metal ions on protease activities in the digestive tract from sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)

WANG Ji-qiao¹, TANG Li^{1,3}, XU Chong¹, CHENG Jun-chi¹, WANG Nian-bin²

(1. School of Life Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China; 2. Liaoning Marine Fisheries Research Institute, Liaoning Open Laboratory of Applied Marine Biology, Dalian 116023, China; 3. School of animal science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Received: Apr., 26, 2005

Key words: sea cucumber (*Apostichopus japonicus*); protease; temperature; pH value; metal ions

Abstract: Effects of temperature, pH and metal ions on protease activities in the digestive tract were studied in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) with body length of 24.2 cm±0.7 cm by means of spectrophotometer. The results showed that the optimum temperature and pH value are 40℃ and 7.20, respectively. The metal ions including Hg²⁺, Mn²⁺, Ag⁺, Pb²⁺, Ba²⁺, and Ca²⁺ were found to inhibit the protease activities while the Cu²⁺, Zn²⁺, and Mg²⁺ promote the activities.

(本文编辑: 刘珊珊)