

pH对眼点拟微绿球藻的生长、总脂含量及脂肪酸组成的影响*

王秀良¹ 刘晨临² 张学成¹¹ 青岛海洋大学海洋生命学院 266003)² 国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266061)

摘要 pH对眼点拟微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*)的生长、总脂含量及脂肪酸组成有明显影响。研究表明,眼点拟微绿球藻的生长对pH有较强的适应性,在pH 6.2~9.8的范围内均能较好的生长,但在pH 5.5的条件下生长受到较强的抑制。在不同pH条件下,在同一细胞周期内总脂含量及脂肪酸组成均有相同的变化规律,即总脂含量在对数初期略有下降然后逐渐上升,在稳定期达到最大值。16:0,18:1n9的含量在稳定期显著升高,而EPA的含量在稳定期明显下降。在对数初期,藻细胞在pH 6.8的条件下含有较高的EPA含量,而在pH 9.8的条件下,藻细胞的EPA含量明显降低。

关键词 眼点拟微绿球藻,EPA,总脂,脂肪酸,pH,光合生物反应器

摘要 ω -3长链多饱和脂肪酸(主要为 α -亚麻酸、EPA和DHA)是重要的一类生物活性物质,具有很高的营养价值和多种保健功能。海洋微藻具有非常高的合成 ω -3长链多饱和脂肪酸的能力,日渐成为 ω -3长链多饱和脂肪酸的新来源。因此,有关利用微藻积累 ω -3长链多饱和脂肪酸的理论研究和开发应用倍受人们关注。

眼点拟微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*)是一种重要的海产经济微藻,其脂肪酸组成简单,富含EPA^[5]。目前,日本、澳大利亚等国家已实现了大规模养殖,国际市场供不应求^[6,7]。研究者发现在富含氮、磷的培养基中,该藻EPA的含量可以达到总脂肪酸的35%^[1];眼点拟微绿球藻的总脂含量在稳定期含量最高,占干重的43.3%,在生长对数早期,EPA与总不饱和脂肪酸的比例最高,可达27.7%^[2]。而有关pH对该藻的影响规律少有报道。本文利用封闭式光合生物反应器研究了pH对该藻的生长、总脂含量及脂肪酸组成的影响规律,为更好地进行生态调控,提高EPA的含量提供了依据。

1 材料与方 法

1.1 藻种来源

藻种眼点拟微绿球藻属于金藻门(Chrysophyta),真眼点纲(Eustigmatophyceae)。藻细胞直径2~3 μ m。

由中国水产科学研究院黄海水产研究所提供。

1.2 培养基

实验中所用培养基为Provasoli的加富培养基,氮源为NaNO₃,磷源为NaH₂PO₄·2H₂O,氮、磷的终浓度分别为0.924 mmol/L、0.085 mmol/L,N/P比为10.85(M/M)。培养基均用无菌海水配制。

1.3 培养装置

实验中所用密闭式BFG2光合生物反应器为烟台高新区海洋生物工程研究所生产。反应器罐体为柱状,径高比为1/3,实际体积为7L,工作体积为6L,培养过程中的各参数如温度、pH、转速、溶氧均能进行在线检测。实验前反应器空罐灭菌,121℃,20min。

1.4 藻种预培养

实验前离心收取藻液400~600ml,将藻泥接种至2L的玻璃三角瓶中,培养体积1L,培养基为无菌海水配制的Provasoli加富培养基,培养至对数期。所用玻璃器皿均为高压蒸汽灭菌。

* 国家“九五”攻关项目96C02-01-10-8、96C02-04-05号;国家“863”计划项目819-02-01号。

第一作者:王秀良,出生于1974年,硕士。主要从事海洋生物学研究。E-mail:Xiawang@163.com

收稿日期:2000-11-13;修回日期:2001-01-20

1.5 实验

将活化至对数期后期的藻种按 1:5 的接种量接种于光合生物反应器中,起始 OD₈₀ 值为 0.1 左右。培养体积为 6 L,温度为 25±0.5 °C,转速为 150 r/min,光照强度为 6 400±200 lx,光暗周期为 12 h: 12 h。分批培养中每天取样测定 680 nm 下的 OD 值及营养盐消耗情况,在不同的细胞时期收取藻液离心、洗涤,在离心收取藻泥后冷冻干燥,藻粉用于总脂和脂肪酸组成分析。实验重复两次,每次实验至少两个平行样,结果为平均值。

1.6 分析测试与计算

1.6.1 细胞浓度 根据回归方程 $y(10^6 \text{ cell/ml}) = 36.883 \times \text{OD}_{80} - 0.1076$, $R^2 = 0.85$; 由测得的 OD₈₀ 值,计算细胞浓度。

1.6.2 培养基中营养盐消耗 氮源浓度由镉-铜还原法测得;磷源浓度由磷钼蓝比色法测得^[3]。

1.6.3 总脂 藻体总脂占干重的百分比按 Ahlgren 1991 年的分光光度法测定,由(1)式可得分光光度法的总脂含量,由(2)式换算成重量法结果。

$$y(\mu\text{g}) = 46.51 \times \text{OD}_{528} + 2.06 \quad R^2 = 0.9881 \quad (1)$$

总脂 (%干重,重量法) = 6.7823 × 总脂 (%干重,光度法) + 0.1945

$$R^2 = 0.8565 \quad (2)$$

1.6.4 脂肪酸组成的气相色谱分析 按 Lepage 1984 年的方法并进行了改进。在螺口试管中称取 15 mg 藻粉,加入 1 ml 被 KOH 饱和的 CH₃OH 溶液,迅速混匀,于 75 °C 水浴中皂化、甲酯化 10 min,冷却至室温后加入约 2 ml 1 mol/L HCl-CH₃OH 溶液使 pH ≤ 2,振荡 1 min,在 75 °C 水浴酸化 10 min,冷却至室温,加入 0.3 ml 石油醚及少许蒸馏水促进分层,充分振荡,离心后取上层石油醚相进行色谱分析。

脂肪酸分析采用美国 HP 5890II 型气相色谱仪,氢火焰离子化检测器,SGEAC 20 毛细管柱 (30 m × 0.25 mm)。进样后程序升温:150 °C 保持 1 min,以 15 °C/min 升至 200 °C,再以 2 °C/min 升至 250 °C。高纯氮为载气,流速 1.5 ml/min,进样量为 1 μl。以面积归一化法得到各脂肪酸组分的相对百分含量。脂肪酸标样为 Sigma 公司产品。

2 结果

2.1 pH 对眼点拟微绿球藻生长的影响

pH 对眼点拟微绿球藻生长的影响见图 1。由图

1 可见,在 pH 为 6.8,8.5,9.8 的条件下,眼点拟微绿球藻具有大致相同的生长速率。在对数初期,该藻在 pH 6.8 的条件下具有较高的生长速率;在对数后期,在 pH 8.5,9.8 的条件下,眼点拟微绿球藻生长较快且细胞密度较高。在 pH 6.2 的条件下,眼点拟微绿球藻的生长受到抑制,而在 pH 5.5 的条件下,生长受到严重抑制。

由图 2,3 可见,在 pH 5.5,6.2 的条件下,眼点拟微绿球藻的营养盐消耗受到抑制,因而其生长缓慢,尤其是在 pH 5.5 的条件下,氮源浓度在整个细胞周期内几乎保持不变,磷源浓度在生长初期无变化,然后缓缓下降。在 pH 6.8,8.5,9.8 条件下,眼点拟微绿球藻的氮源消耗速率基本相同,而磷源消耗速率有差别,在 pH 9.8 的条件下,其消耗速率最快,其他条件下,消耗速率大致相同。

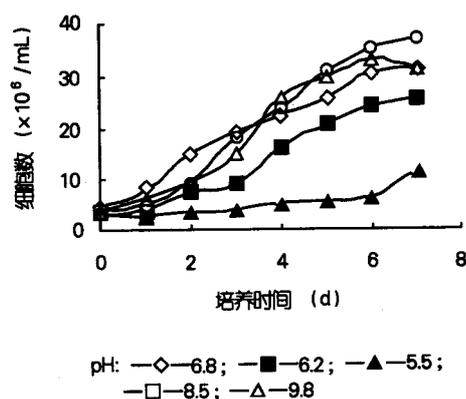


图 1 pH 对眼点拟微绿球藻生长的影响
Fig.1 Effect of pH on the growth of *N. oculata*

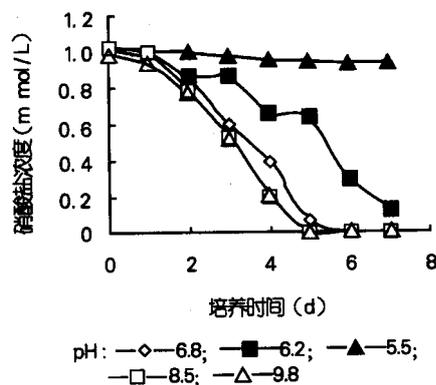


图 2 pH 对眼点拟微绿球藻氮源吸收的影响
Fig.2 Effect of pH on the nitrate absorption of *N. oculata*

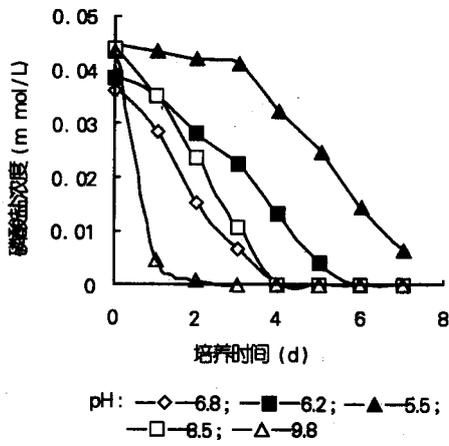


图3 pH对眼点拟微绿球藻磷源吸收的影响

Fig.3 Effect of pH on the phosphate absorption of *N. oculata*

2.2 pH对眼点拟微绿球藻总脂含量的影响

pH对眼点拟微绿球藻总脂含量的影响见图4。
除pH 9.8以外,在所有pH条件下,在一个细胞周期

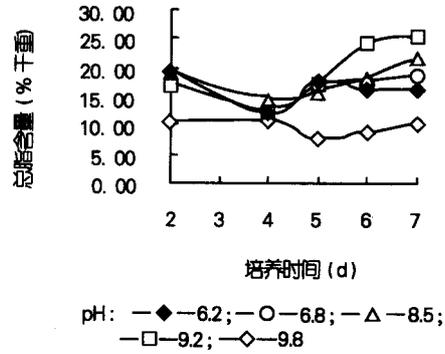


图4 pH对眼点拟微绿球藻总脂含量的影响

Fig.4 Effect of pH on the total lipid of *N. oculata*

表1 pH对眼点拟微绿球藻脂肪酸组成的影响

Tab.1 Effect of pH on the fatty acid composition of *N. oculata*

pH	培养时间(d)	脂肪酸(%总脂肪酸)							
		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1n9	18:1n7	20:4	20:5
6.2	2	3.24	32.53	22.67	2.83	3.24	1.85	3.34	14.78
	3	3.12	28.79	22.4	1.28	3.98	2.07	5.3	18.05
	4	3.00±0.16	27.49±0.43	20.72±1.01	2.43±1.30	3.99±0.07	2.55±0.24	5.17±0.16	16.90±0.99
6.8	2	3.49±0.32	27.30±0.56	22.43±1.20	1.71±0.12	2.91±0.10	1.89±0.09	3.83±0.06	19.63±0.44
	3	3.34	24.02	20.24	2.18	3.6	2.1	4.74	18.55
	4	3.79±0.04	24.76±1.14	19.06±0.31	1.66±0.53	2.38±0.09	2.73±0.17	5.17±0.55	23.23±2.24
8.5	2	3.66±0.15	28.48±0.88	21.67±0.83	2.54±1.02	3.55±0.12	2.04±0.27	5.37±0.25	15.95±0.99
	3	4.13±0.16	31.26±1.52	20.95±0.34	2.29±0.21	3.99±0.08	2.47±0.16	5.46±0.73	12.12±0.38
	4	4.29	29.74	21.29	2.08	3.91	2.62	4.73	11.74
9.2	2	3.46±0.04	27.66±0.16	21.68±0.01	2.16±0.30	3.36±0.06	1.76±0.03	4.45±0.24	15.78±0.88
	3	3.63±0.33	25.82±0.89	20.94±1.18	3.18±0.06	1.56±0.08	2.25±0.01	5.61±0.03	18.48±0.43
	4	4.38±0.24	30.08±0.95	21.14±1.12	2.22±0.15	5.41±0.07	2.55±0.07	4.96±0.27	14.80±1.04
9.8	2	3.85±0.09	30.76±0.34	21.06±0.18	3.00±0.27	3.62±0.34	2.01±0.08	3.26±0.00	14.62±0.16
	3	3.79±0.21	26.46±0.11	18.59±1.28	2.95±0.57	3.31±0.30	3.13±0.01	4.11±0.04	16.51±0.45
	4	4.28±0.31	31.54±0.09	19.37±0.93	1.82±0.64	3.36±0.1	2.52±0.17	5.18±0.25	14.95±0.83

内眼点拟微绿球藻总脂含量的变化规律基本相同,即藻细胞的总脂含量在对数初期有所下降,然后逐渐上升,在稳定期达到最大值。在 pH 9.2 的条件下,总脂含量最高可达细胞干重的 25.57%。在 pH 9.8 的条件下,眼点拟微绿球藻的总脂含量明显低于其他条件下的总脂含量,在稳定期时总脂含量仅占生物量干重的 10.55%。

2.3 pH 对眼点拟微绿球藻脂肪酸组成及 EPA 含量的影响

pH 对眼点拟微绿球藻脂肪酸组成的影响见表 1。由表 1 可见,16:0,16:1 和 20:5 是眼点拟微绿球藻脂肪酸组成的主要成分,三者占总脂肪酸的 60%~70%。在不同 pH 条件下,在一个生长周期内眼点拟微绿球藻脂肪酸组成的变化规律基本相同。在对数生长初期,16:0 与 20:5 的含量比较稳定,变化不大,而在对数后期 16:0 的含量明显增加,最高可达脂肪酸组成的 43%;20:5 的含量则明显降低,甚至仅为脂肪酸组成的 8%。18:1n9 的含量随培养时间的延长而增加,至稳定期时含量明显增加,最高可由对数初期的 3.6% 增长为 8.8%。14:0,16:1,18:0 及

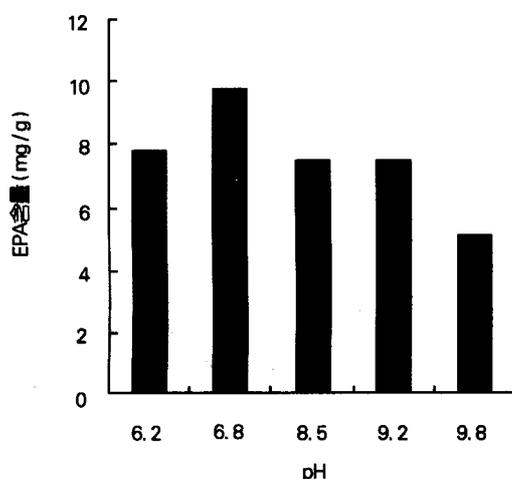


图 5 pH 对眼点拟微绿球藻对数早期 EPA 含量的影响
Fig. 5 Effect of pH on the EPA content of *N. oculata* in the early exponential phase

20:4 等的含量变化不大。在 pH 6.2 条件下,稳定期时 16:0 的含量相对较低,占总脂肪酸组成的 31%,而在碱性条件下,其含量相对较高,占总脂肪酸组成的 40% 左右。在对数期 pH 对 EPA (20:5) 含量的影响

见图 5。由图 5 可知,在 pH 6.8 的条件下,眼点拟微绿球藻含有较高的 EPA 约为 9.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (干重);而在 pH 9.8 的条件下, EPA 含量明显降低,仅为 5.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (干重),在其他条件下, EPA 含量差别不大。

3 讨论

(1) 在 pH 6.8~9.8 的范围内,眼点拟微绿球藻有较高的生长速率。在 pH 5.5,6.2 的酸性条件下,营养素的吸收受到阻碍,因而藻细胞的生长受到抑制。一般海洋藻类生存的适宜 pH 值与海水的 pH 值相近,为 pH 8.3 左右。不同的藻类生活的适宜 pH 值不同,偏离此 pH 值,微藻生长和体内有关代谢活动即受影响。Cohen 1988 年发现紫球藻 (*Porphyridium cruentum*) 的理想 pH 为 7.6 左右,偏离此值时,藻细胞生长变慢。本研究表明眼点拟微绿球藻对 pH 有较强的适应性,在 pH 9.8 的强碱性条件下,仍然保持很高的生长速率,只有在偏酸性条件下,由于氮、磷的吸收受到阻碍,生长才受到抑制。

(2) 本实验表明在 pH 9.8 的条件下,眼点拟微绿球藻的总脂含量明显低于其他 pH 条件下的总脂含量。在 pH 6.8 的条件下, EPA 的含量较高,而在 pH 9.8 的条件下, EPA 的含量明显低于其他 pH 条件下 EPA 的含量。有些研究者认为培养酸碱度的改变影响了细胞内外的离子平衡、细胞膜的渗透性及有关膜的结构组成。当 pH 的范围在 5.5~8.0 之间时,微藻的多不饱和脂肪酸的生产受 pH 的影响较小^[4]。但 Mdina 等 1992 年发现等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 在 pH 6.0~8.0 范围内,总脂含量变化不大,但 EPA 含量,随 pH 上升而下降,在 pH 6.0 时含量最高。本研究也发现在 pH 6.8 时,眼点拟微绿球藻的 EPA 含量最高。这表明 pH 值对微藻的总脂及 EPA 含量的影响因藻种的不同而异。在 pH 9.8 时,眼点拟微绿球藻的总脂及 EPA 含量均明显低于其他条件下的总脂及 EPA 含量。这表明在强碱性条件下,眼点拟微绿球藻的脂类合成受到了抑制;生物体内长链脂肪酸的合成都是从 16:0 开始,通过一系列脱氢酶、加氧酶和链延长酶类,向长链多不饱和脂肪酸转化,pH 可能使此过程有关的酶的活性受到影响,因而 EPA 含量相对较低。

(3) 本实验表明在不同 pH 条件下,眼点拟微绿球藻的总脂含量在一个培养周期内均表现出相同的变化规律,在对数初期总脂含量略有下降,然后逐渐上升,在稳定期含量达到最大值;其脂肪酸组成在一个

培养周期内也表现出相同的变化规律。在对数期 EPA 含量较高, 稳定期时含量明显降低, 而 16:0 和 18:1n9 的含量与 EPA 相反, 在稳定期其含量明显升高。Yongmanitchai 等 1989 年表明当培养进入后期时, 许多微藻倾向于以脂类的形式储存它们的能源。这种脂类通常富含饱和和单不饱和脂肪酸。海洋微藻等鞭金藻在培养后期, 脂类是有机物中的主要成分, 且中性脂含量显著升高, 而富含长链多不饱和脂肪酸的糖脂却显著降低^[8]。本实验表明眼点拟微绿球藻也具有此规律。在许多微藻中, 已经观察到不饱和脂肪酸的降低是时间的函数。然而, Arao, T. 等 1987 年发现在一种海洋硅藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) 中, EPA 含量当培养进入后期时显著增加。由此可见, 培养周期对海洋微藻的影响也因藻种而异。🌊

参考文献

1 魏东, 张学成, 隋正红等. 氮源和 N P 对眼点拟微绿球藻的生长、总脂含量和脂肪酸组成的影响, 海洋科学, 2000, 24(7): 46 ~ 51
 2 魏东, 张学成, 邹立红等. 细胞生长时期对两种海洋微藻总脂含量和脂肪酸组成的影响, 青岛海洋大学学报,

2000, 30(3): 503 ~ 509
 3 T. R. 帕森斯, 前天吉明, C. M. 兰莉. 海水分析的化学和生物学方法. 厦门: 厦门大学出版社, 1991. 24 ~ 27, 3 ~ 7
 4 陈峰, 姜悦. 微藻生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 214 ~ 239
 5 Brown M. R., Jeffrey S. W. et al.. Nutritional properties of microalgae for mariculture, *Aquaculture*, 1997, 151: 315 ~ 331
 6 Zittelli G., Lavista F. et al.. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. Cultures in outdoor tubular photobioreactors, *Journal of biotechnology*, 1999, 70(1 ~ 3): 299 ~ 312
 7 Zou N., Richmond A.. Effect of light - path length in outdoor flat plate reactors on output rate of cell mass and of EPA in *Nannochloropsis* sp., *Journal of Biotechnology*, 1999, 70(1 ~ 3): 351 ~ 356
 8 Fidalgo J. P., Torres E., Cid A. et al.. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*, *Aquaculture*, 1998, 166: 105 ~ 116

EFFECTS OF pH ON THE GROWTH, TOTAL LIPID CONTENT AND FATTY ACID COMPOSITION OF THE MARINE MICROALGA *Nannochloropsis oculata*

WANG Xiurliang¹ LIU Chen - lin² ZHANG Xue - cheng¹
¹ College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, 266003
² First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, 266061

Received: Nov., 13, 2000

Key Words: *Nannochloropsis oculata*, EPA, Total lipid, Fatty acid, pH, Photobioreactor

Abstract

pH has an obvious effect on the growth, total lipid content and fatty acid composition of marine microalga *Nannochloropsis oculata*. Results showed that a high growth rate of the alga was obtained under the range of pH 6.2 ~ 9.8, but the growth was very weak at pH 5.5 because the absorption of nitrate and phosphate was disturbed. At pH 9.8, the total lipid and EPA content of the alga dropped obviously but higher EPA content at pH 6.8. The total lipid of the species increased gradually as the culture aged except for a slight reduction in the early exponential phase, the content of 16:0 and 18:1n9 increased obviously in the stationary phase, but the EPA content dropped.

(本文编辑: 张培新)