

温度、光照、氮含量对微绿球藻生长及脂肪酸组成的影响*

蒋霞敏

(宁波大学海洋与水产系 315211)

提要 报道了环境因子对微绿球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 的生长速率及脂肪酸组成的影响,结果表明:微绿球藻具有较快的生长速度,且富含 16:1(π 7)和 20:5(π 3)(EPA)。适温范围为 0~30℃,最适温度为 20℃。温度对脂肪酸组成的影响较明显,EPA 在 20℃ 时最高,30℃ 时急剧下降;生长较适宜光强为 5 000~7 000 lx,但在 1 000 lx 时 EPA 产率最大;氮含量为 10 mg/L 时生长速度最快,但此时 EPA 含量较低。

关键词 温度,光强,氮含量,微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*),生长率,脂肪酸组成

微绿球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 是一种海洋单细胞微藻,其细胞壁极薄,营养丰富,是近两年在泥蚶、斑节对虾、刀额新对虾等育苗以及轮虫培养中应用较佳的优良饵料。作者对该藻进行了培养和生产性应用后发现该藻适应性强、繁殖速度快、一次性培养指数生长持续时间长,且不易老化和污染。目前国内对外对微绿球藻的应用及营养报道有一些研究,Renaud 1991 年^[8],Dunstan 1993 年^[9]报道绿球藻含有很高的 EPA,而 Zhukova 1995 年^[7]认为绿藻纲的藻不含 EPA。本文研究了温度、光照、氮含量对微绿球藻生长及脂肪酸组成的影响,以期为该微藻的开发及利用提供理论依据。

1 材料方法

1.1 藻种

微绿球藻藻种取自宁波大学海洋与水产系藻种室。藻体椭圆形,细胞长 2.2~3.5 μm,宽 1.5~2.1 μm,色素体 1 个,几乎充满整个细胞,长 1.2~1.7 μm,宽 0.8~1.4 μm,由 7~9 层类囊体组成。淀粉粒 1~3 个,细胞壁极薄,正常培养条件下藻液呈黄绿色。

1.2 微藻的培养

静止培养,培养用海水均经脱脂棉过滤,煮沸消毒,培养容器为 100 ml 的三角烧瓶,培养水体 80 ml。培养液采用 MAV 配方(表 1)。营养盐试验培养液采用缺氮的 MAV 配方,加 KNO₃ 贮液;光强试验用 40 W 日光灯盏数和照射角度控制;温度试验用水浴加电热棒

或冰袋控制。培养时间 7 d,试验设 3 个平行组,各采双样,用血球计数板计数,取平均值。生长速率以下式计算: $K = (\ln N_t - \ln N_0) T^{-1}$, 其中 N_0 为起始时细胞密度, N_t 为培养第 t 天时细胞密度。

表 1 MAV 培养液配方

Tab.1 Composition of culture fluid

营养盐成分	含量(mg/L)
KNO ₃	100
KH ₂ PO ₄	10
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	2.5
MgSO ₄	0.25
EDTA-Na ₂	10
VB ₁₂	5×10^{-7}
VB ₁	6×10^{-3}

1.3 藻体收集和保存

取一定体积藻液,4 000~4 800 r/min 离心 5~10 min,再用消毒淡水清洗 2~3 次,经冷冻干燥,低温(-4℃)保存。

* 浙江省自然科学基金资助项目 301208 号。

作者:蒋霞敏,出生于 1957 年,副教授,硕士生导师,研究方向:饵料生物培养。E-mail: xzchxsc@nbu.edu.cn

收稿日期:2002-04-01;修回日期:2002-05-31

1.4 脂肪酸的测定

采用 Kocher 法萃取脂质, 用 NaOH 甲醇溶液皂化后, 用 30% 二氧化碳乙醚络合物甲醇溶液酯化, 然后加 2 ml 正己烷振荡 5 min, 静置, 待液体分层后, 抽上层正己烷液上机分析。用 GC9A 型气相色谱仪(日本岛津公司)测定脂肪酸种类及其含量。检测条件: 检测器, 氢火焰离子化检测器(FID); 色谱柱: PEG20 M 弹性石英毛细管柱; 柱温: 200 °C; 气化室温度: 230 °C; 进样量: 2 µl。定量分析采用对各组分峰面积积分, 用归一化法计算出脂肪酸组分的百分含量(以占脂肪酸总量的百分比表示)。

2 结果与讨论

2.1 温度对微绿球藻生长速率和脂肪酸组成的影响

采用 MAV 培养液, 在盐度为 34, pH 为 8.03, 光照强度为 5 000 lx, 光暗周期 12 h: 12 h 的条件下, 试验温度设置为 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 °C。测定温度对微绿球藻生长速率和脂肪酸组成的影响。结果表明(图 1 a), 该藻的适温范围较广, 在 0~30 °C 的条件下, 藻细胞都有不同程度的增加; 35 °C 时, 藻细胞发白死亡。对试验数据进行方差分析得 $F = 3\,690.48 > F_{0.01}(7, 8) = 6.19$, 说明温度对微绿球藻生长速率有显著影响。经多重比较得出, 该藻的适温范围为 0~30 °C, 最适温度为 20 °C。

同时表明(表 2), 微绿球藻的主要脂肪酸由 EPA,

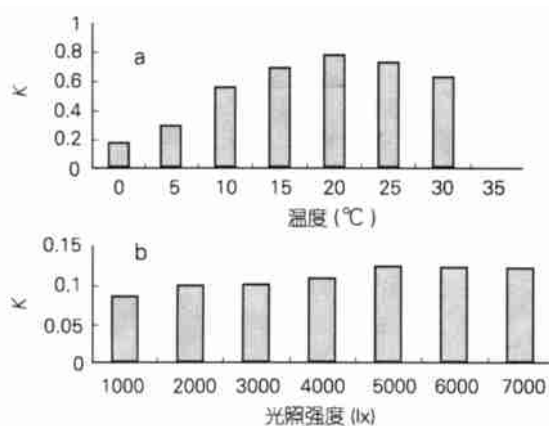


图 1 温度、光强对微绿球藻生长速率的影响

Fig. 1 The influence of different temperatures and light intensity on growth of *N. oculata*

16: 0 和 16: 1(n-7), 其次是 14: 0, 18: 1(n-9) 和 20: 4(n-6) 组成。当温度在 5~20 °C 范围内, EPA 随着温度的上升而增高, 20 °C 时 EPA 达到最高水平, 占总脂肪酸的 30.57%; 相反 16: 1(n-7) 随着温度的上升而下降, 20 °C 时降至最低水平, 为 20.85%。但超过 20 °C, EPA 随着温度的上升而降低, 在 30 °C 时 EPA 最低; 相反 16: 1(n-7) 随着温度的上升而增高。

Hodgson 曾报道温度不影响微绿球藻的脂肪酸组成; James 等 1989 年对微绿球藻的研究提出 EPA 的含量在 25 °C 时高于 30 °C 和 15 °C。本试验进一步证明温度对微绿球藻的脂肪酸组成有显著影响。低温能促进微藻合成较多的 PUFAs, 高温则抑制 PUFAs 的合成^[13], 这可能是温度影响不饱和脂肪酸合成过程中的各种链延伸酶、去饱和酶的活性和去饱和酶基因的转录活性^[11]。同时温度的变化可以有效地促进微绿球藻脂肪酸之间的转化。温度在 5~20 °C 范围内, 随着温度的上升 PUFAs(n-3) 和 EPA 不断增加, 20 °C 时 PUFAs(n-3) 和 EPA 达到最高水平, 相反 SUFA 特别是 16: 1(n-7) 随着温度的上升而不断下降, 20 °C 时降至最低水平。这充分表明温度调控是提高微绿球藻 EPA 有效的方法之一。

2.2 光照强度对微绿球藻生长速率和脂肪酸组成的影响

采用 MAV 培养液, 在盐度为 34, pH 为 8.03, 温度为 20 °C, 对微绿球藻进行光照强度(1 000, 2 000, 3 000, 4 000, 5 000, 6 000, 7 000 lx) 单因子试验, 光暗周期 12h: 12h。结果表明(图 1 b), 该藻在 1 000~7 000 lx 范围内, 藻细胞都能繁殖生长, 低光照对生长不利。经方差分析得 $F = 53.50 > F_{0.01}(6, 7) = 7.19$, 说明光强度对微绿球藻有显著影响。经多重比较得出在 5 000~7 000 lx 的光强下, 均有较高的 K 值, 且相互间差异不显著, 说明该藻在 1 000~5 000 lx 范围内随着光照强度的增强生长速率加快, 至 5 000 lx 达到高峰, 以后至 7 000 lx 变化不明显。但随着光照强度的增强, PUFAs(n-3) 和 EPA 呈下降趋势, 1 000 lx 光强组 EPA 达最高值(36.57%)。与此相反, 饱和脂肪酸(14: 0, 16: 0, 18: 0) 含量随着光照强度的增强而上升, 尤其是 16: 0 更为显著; 光照强度对微绿球藻的 SUFA 影响不显著(表 2)。光强对微藻的不饱和脂肪酸的积累, 不同的藻有不同的规律。Thompson 发现大

表 2 不同温度和光强下微绿球藻脂肪酸的组成(%总脂肪酸)

Tab.2 The fatty acid composition of *N. Oculata* at different temperatures and light intensity(% total fatty acid)

脂肪酸	温度(℃)						光照强度(lx)		
	6	10	15	20	25	30	1 000	4 000	7 000
C12:1	0.25	0.11	-	0.63	-	-	0.55	-	0.53
C12:2	0.91	0.88	0.76	2.99	2.63	0.25	1.48	2.27	1.74
C14:0	4.37	4.41	4.52	4.72	5.09	3.95	4.52	5.35	5.26
C14:1	0.61	0.69	0.83	0.58	0.66	0.23	1.17	0.84	0.85
C14:2	0.55	0.49	0.35	0.60	0.60	0.48	0.31	0.44	0.38
C14:3	0.48	0.81	1.04	1.05	1.03	0.22	2.01	1.31	1.18
C16:0	21.87	21.98	19.50	17.28	19.06	37.24	17.74	18.23	20.46
C16:1(n-7)	28.59	27.82	24.60	20.85	21.50	25.34	18.43	17.46	17.17
C16:2(n-4)	0.23	0.27	0.29	0.62	0.57	0.37	0.33	0.26	0.24
C16:3(n-3)	0.86	0.88	0.89	1.22	1.10	0.33	1.28	1.22	0.95
C18:0	0.54	0.65	0.68	0.69	0.82	1.89	0.30	0.56	0.55
C18:1(n-9)	6.60	6.40	5.83	6.73	6.09	10.63	2.81	3.77	4.75
C18:2(n-6)	2.93	2.81	2.49	2.76	2.44	1.65	2.61	3.43	2.30
C20:3(n-3)	1.18	1.01	0.97	0.95	0.69	0.44	0.65	0.56	0.83
C20:4(n-6)	5.31	5.45	6.87	7.18	7.59	4.33	7.30	7.87	9.08
C20:5(n-3)	24.31	25.31	29.89	30.57	29.44	11.94	36.57	34.89	32.68
合计	99.59	99.97	99.42	99.15	99.31	99.21	98.06	98.43	98.59

多数微藻在低光照下有最大的 EPA 值,而 DHA 含量随光照强度的增强而增加^[12]。如后棘藻 (*Ellipsoidion* sp.)、拟微绿球藻 (*Nannochloropsis* sp.)、球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*)、螺旋藻 (*Spirulina* sp.) 均符合以上规律^[15-11], 本实验证明微绿球藻虽然在低光照下不利于光合作用和快速生长,但有利于 EPA 合成和积累,所以在培养时可以采取二步法控制光照强度以达到微绿球藻的快速生长和 EPA 累积。

2.3 氮含量对微绿球藻生长速率和脂肪酸组成的影响

采用缺氮 MAV 培养液,在盐度为 34,pH 为 8.03,温度为 20℃,光照强度为 5 000 lx,光暗周期 12:12 的条件下,氮源为 KNO₃,进行不同氮含量(1,10,30,50 mg/L) 单因子试验,结果表明(图 2),培养 7 d 后,氮含量 10 mg/L 组藻细胞生长繁殖速度最快,生长速率达 0.67,藻液颜色黄绿鲜艳;高于和低于 10 mg/L 组生长繁殖相对较缓慢,尤其是氮含量 1 mg/L 组,第 5 天起藻液颜色发黄,说明氮含量不足,引起藻细胞

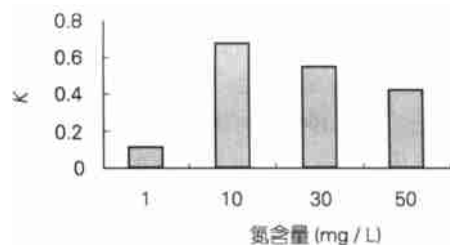


图 2 氮含量对微绿球藻生长速率的影响

Fig.2 The influence of different Nitrogen on growth of *N. oculata*

营养缺乏老化。但微绿球藻在氮含量较高($N \geq 30$ mg/L)或较低($N \leq 1$ mg/L)时,PUFAs(n-3)和 EPA 相对较高,SUFA 较低。与此相反,当氮含量为 10 mg/L 时,EPA 含量最低(表 3)。由此可见氮含量也是决定微绿球藻细胞内脂类含量的一个重要因素。梁英等认为不同的氮源和不同的氮浓度对微藻的脂肪酸组成有影响^[2];杨秀霞等认为微藻 PUFA 和 EPA 的比例随氮浓度的增加而增加^[1];Utting 等 1985 年报道当氮含量从

表3 不同氮含量下微绿球藻脂肪酸组成(%总脂肪酸)

Tab.3 The fatty acid composition of *N. oculata* at different Nitrogen contents(% total fatty acid)

脂肪酸	氮含量(mg/L)			
	1	10	30	50
C12:1	1.07	0.46	0.81	0.53
C12:2	3.08	1.65	2.76	2.09
C14:0	5.47	4.95	5.21	5.93
C14:1	0.46	0.67	0.63	0.54
C14:2	0.64	0.64	0.56	0.46
C14:3	0.95	0.66	1.03	0.81
C16:0	15.25	21.06	16.62	16.19
C16:1(n-7)	19.02	19.87	19.24	19.00
C16:2(n-4)	0.28	0.26	0.28	0.32
C16:3(n-3)	1.03	0.83	1.08	0.75
C18:0	0.43	0.68	0.67	0.44
C18:1(n-9)	3.07	4.13	3.82	3.50
C18:2(n-6)	2.66	2.39	2.67	2.63
C20:3(n-3)	0.73	0.68	0.62	0.62
C20:4(n-6)	7.03	6.72	6.91	7.62
C20:5(n-3)	37.53	33.07	36.08	38.57
合计	98.68	98.72	98.99	100.00
PUFAs(n-3)	39.29	34.58	37.78	39.94
SUFA	22.55	24.67	23.69	23.04

SUFA:表示单不饱和脂肪酸;PUFAs:表示多不饱和脂肪酸。

0.613 mg/L 上升至 9.8 mg/L 时球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*) 脂类含量从总有机质的 31% 下降到 25%;而 E. Molina Gri ma. 等人 1992 年的研究表明球等鞭金藻在 NaNO_3 较低的情况下($< 30.6 \text{ mg/L}$) 时, PUFAs 和 EPA 含量也相应减少^[6]。本实验表明氮含量左右微绿球藻细胞内的 PUFAs(n-3) 和 EPA 含量,至于氮的最适宜含量还有待于进一步研究。

3 结语

微绿球藻的适温范围为 $0 \sim 30^\circ\text{C}$, 最适温度为 20°C , 此时生长速率和 EPA 达到最高水平。在 $0 \sim 20^\circ\text{C}$ 范围内, EPA 随温度的上升而增高;在 $20 \sim 30^\circ\text{C}$ 范围内, EPA 随温度的上升而减少。在 $1\,000 \sim 7\,000 \text{ lx}$ 范围内随着光照强度的增强生长速率加快, 而 EPA 呈下降趋势, 低光照($1\,000 \text{ lx}$) 有利于微绿球藻 EPA 的积累。以 KNO_3 作为氮源, 氮含量在 10 mg/L 时藻细

胞生长速率达最大, 而 EPA 含量最低。在水产苗种培育和该藻大量培养时, 只有合理地控制温度、光照和营养, 才能大量获得富含 PUFA, 尤其是 EPA 等营养价值较高的微藻。

参考文献

- 杨秀霞, 于浩, 曾晓起. 影响微藻脂肪酸组成因素概述, 海洋湖沼通报, 2001, 1: 76 ~ 81
- 梁英, 麦康森, 孙世春等. 不同培养基对筒株藻 *Cylindrotheca fusiformis* 生长及脂肪酸组成的影响, 海洋湖沼通报, 2000, 1: 60 ~ 67
- 林学政, 李光友. 环境因子对微藻脂类的影响, 黄渤海海洋, 1999, 17(4): 54 ~ 59
- 李何芳, 周汉秋. 海洋微藻脂肪酸组成的比较研究, 海洋与湖沼, 1999, 30(1): 34 ~ 39
- 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, 青岛海洋大学学报, 2001, 31(4): 541 ~ 547
- 戴俊彪, 吴庆余. 培养海洋微藻 *Isochrysis galbana* 生产 EPA 和 DHA, 海洋科学, 1999, 3: 36 ~ 38
- Zhukova N. V., Aizdaicher N. A.. Fatty acid composition species of marine microalgae, *Phytochemistry*, 1995, 39(2): 351 ~ 356
- Renaud S. M., Parry D. L., Luong Van Thinh *et al.*. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in aquaculture, *J. Phycol.*, 1991, 26: 393 ~ 399
- Dunstan G. A., Volkman J. K., Barrett S. M. D. *et al.*. Changes in the lipid composition and maximization of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture, *J. Appl. Phycol.*, 1993, 5: 71 ~ 83
- Harrison P. J. *et al.*. Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review, *Fisheries Science*, 1998, 30: 785 ~ 807
- Seto A. *et al.*. Culture conditions affect eicosapentaenoic acid content of *Chlorella minutissima*, *Jacons*, 1984, 61(5): 892 ~ 894
- Thompson P. A. *et al.*. Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton, *Phycol.*, 1990, 26: 278 ~ 288
- James C. M. *et al.*. Growth and ω -3 fatty acid amino acid composition of microalgae under different temperature regimes, *Aquaculture*, 1989, 77: 337 ~ 351



EFFECTS OF TEMPERATURES, LIGHT INTENSITIES AND NITROGEN CONCENTRATIONS ON THE GROWTH AND FATTY ACID COMPOSITIONS OF *Nannochloropsis oculata*

JIANG Xia-min

(Ocean and Fisheries Department of Ningbo University, 315211)

Received: Apr., 1, 2002

Key Words: Temperatures, Light intensity, Nitrogen contents, *Nannochloropsis oculata*, Growth rate, Fatty acid

Abstract

The effects of temperatures, light intensities and nitrogen concentrations on the growth and fatty acid content of *N. oculata* were investigated. The results showed that the algae grew fast and were abundant in 16: 1 r7 and 20: 5 r3 (EPA). The suitable temperatures for the algae growth varied from 0 °C to 30 °C, and the optimum growth temperature was at 20 °C. The experiment indicated that variation in temperature has an obvious effect on fatty acid content, and furthermore, the maximum EPA content of *N. oculata* was reached at 20 °C, while the content rapidly decreased at 30 °C. The light intensities for suitable growth ranged from 5 000 to 7 000 lx, but the top EPA content achieved only at 1 000 lx. The results also showed that the optimum growth and relatively lower EPA content were obtained, when the same nitrogen concentration was supplied at 10 mg/ L.

(本文编辑:张培新)