

# 温度逆境处理提高拟微球藻(*Nannochloropsis oculata*) EPA 含量的研究

杨官品<sup>1</sup>, 张继民<sup>1</sup>, 魏 东<sup>1</sup>, 张学成<sup>1</sup>

(1. 青岛海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

关键词: 微藻; 眼点拟微球藻; EPA; 温度逆境; 细胞态饵料

中图分类号: Q 945. 1

文献标识码: A

文章编号: 0253- 4193(2002) 04- 0132- 04

## 1 引言

二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)是一种长链多不饱和脂肪酸,是水产养殖动物幼体发育必需脂肪酸之一。富含 EPA 鲜活微藻、干燥微藻和冷冻微藻是水产养殖动物幼体重要的饵料<sup>[1]</sup>。同时, EPA 还能增强水产养殖动物免疫系统功能,提高成活率和抗病力<sup>[1~3]</sup>。由于 EPA 含量是饵料藻品质的决定因素之一,品种选育、生态调控等提高 EPA 含量的措施均能提高微藻饵料价值。

低温能提高微藻脂肪酸不饱和度,以维持生物膜流动性,抵抗低温伤害<sup>[4]</sup>。另外,我们推测长链脂肪酸有可能提高微藻适应高温环境的能力。微藻适应温度逆境的特性,对微藻抵抗高低温逆境具有重要生理意义,也可以在提高细胞态微藻饵料 EPA 含量、改善饵料品质中加以利用。微藻养殖一般以收获生物量为目的,利用温度逆境处理可克服生产中难以同步获得高 EPA 含量的困难,达到提高微藻饵料 EPA 含量,改善微藻饵料品质的目的。

眼点拟微球藻(*Nannochloropsis oculata*)是一种富含 EPA 的海洋微藻,是水产养殖动物优良饵料藻之一。本研究拟通过高低温逆境处理这一经济有效措施,提高眼点拟微球藻藻体 EPA 含量,改善其品质。

## 2 材料和方法

### 2.1 藻种

眼点拟微球藻由中国水产科学院黄海水产研究所提供,本实验室继代培养保存。

收稿日期: 2001- 01- 21; 修订日期: 2001- 04- 09.

基金项目: 国家海洋“863”计划资助项目(819- 02- 01).

作者简介: 杨官品(1963-),男,湖北省江陵县人,教授,博士,从事分子生物学、分子生态学研究。

## 2.2 培养基及培养条件

用煮沸灭菌海水配制的 Provasoli 培养基培养眼点拟微球藻<sup>[5]</sup>。培养时,光照强度为 60~100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,温度为 22  $^{\circ}\text{C}$ ,光暗周期为 12 h/12 h。取少量保存藻种于培养基中,活化培养到对数期,接种 20  $\text{cm}^3$ 活化藻液于 80  $\text{cm}^3$ 培养基中,使初始  $OD_{680\text{nm}}$ 值在 0.1~0.2 之间,摇动培养到稳定生长期。

## 2.3 实验处理

每次接种 10 瓶,培养到生长稳定期( $OD_{680\text{nm}}$ 值在 1.1~1.2 之间),各取两瓶藻液分别进行 4  $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 d(低温处理)、35  $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 d(高温处理)、4 和 35  $^{\circ}\text{C}$ 各放置 2 d(低/高温处理)以及 35 和 4  $^{\circ}\text{C}$ 各放置 2 d(高/低温处理)等处理,处理时,对光照培养箱和冷柜的玻璃门不进行遮光处理,也不提供光照。离心收集藻体,冷冻干燥备脂肪酸组成分析用。立即收获生长稳定期、不经过任何处理的藻体为对照。实验重复 3 次。

## 2.4 脂肪酸成分分析

基本按 Lepage 等<sup>[6]</sup>的方法制备样品。准确称取 15 mg 干燥藻粉,加入 1  $\text{cm}^3$  1 mol/dm<sup>3</sup> KOH-CH<sub>3</sub>OH 溶液,于 75  $^{\circ}\text{C}$ 皂化甲脂化 10 min,冷却至室温,加入 2  $\text{cm}^3$  1 mol/cm<sup>3</sup> HCl-CH<sub>3</sub>OH 溶液,75  $^{\circ}\text{C}$ 酸化 10 min,冷却至室温,加 0.3  $\text{cm}^3$ 石油醚和少量蒸馏水萃取脂肪酸,离心取石油醚相分析脂肪酸组成。

脂肪酸组成分析采用美国 HP5890II 型气相色谱仪、氢火焰离子化检测器和 SGE AC20 毛细管柱,按魏东等<sup>[7]</sup>的方法进行。根据待测峰与标样峰面积比和标样量计算各脂肪酸成分占干重的百分含量。按 150  $^{\circ}\text{C}$ 维持 1 min,以 15  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 200  $^{\circ}\text{C}$ ,再以 2  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 250  $^{\circ}\text{C}$ 程序升温。进样口和检测器温度设置为 250  $^{\circ}\text{C}$ 。以高纯氮为载气,流速为 1.5  $\text{cm}^3/\text{min}$ 。进样量为 1  $\text{mm}^3$ 。脂肪酸标准样购自 Sigma 公司。

## 2.5 数据分析

各脂肪酸百分含量取每处理 6 个实测值的平均值。脂肪酸组成仅用 14 碳及 14 碳以上脂肪酸描述。以往的研究都对少数重要脂肪酸、总脂肪酸等进行比较,缺少综合参数。我们首次用  $\sum P_x$  计算长链脂肪酸总百分含量,  $P_x$  为第  $x$  种脂肪酸占干重的百分含量;用  $\sum P_x \cdot N_x$  计算长链脂肪酸链长指数,  $N_x$  是第  $x$  种脂肪酸碳原子数;用  $\sum P_x \cdot \omega_x$  计算长链脂肪酸不饱和度指数,  $\omega_x$  是第  $x$  种脂肪酸双键数;用  $\sum P_x \cdot \omega_x \cdot N_x$  表示链长和不饱和度综合改进指数。

# 3 结果和讨论

## 3.1 高温处理对脂肪酸组成的影响

合成长链脂肪酸可能是微藻在演化过程中适应高温环境形成的生理代谢途径的改变,这有利于微藻在高温环境下保持生物膜的流动性和稳定性。分析发现,高温处理和低/高温处理降低总长链脂肪酸含量、EPA 含量、链长指数、不饱和度指数和综合改进指数,使它们明显低于对照。这与预期结果不相符。我们认为造成这种现象有两种可能的原因:一是高温环境下微藻细胞脂肪酸可能流失,使之低于常态含量,尽管长链脂肪酸比例增加,但被总脂肪酸损失所掩盖;另一种可能性是高温环境下细胞结构改变,从而改变脂肪酸结合状态,使提取过程不能有效分离全部长链脂肪酸,造成实测值偏低。我们发现高/低温处理使 EPA 和总长链脂肪

酸含量明显高于低温处理和对照, 高温处理能加强低温逆境增加长链脂肪酸含量和 EPA 含量的效应, 说明细胞脂肪酸没有流失, 而是改变了结合状态.

### 3.2 低温处理对脂肪酸组成的影响

脂肪酸去饱和作用被认为是微藻细胞在低温下维持正常生长的适应机制. 低温可诱导脂肪酸去饱和酶的合成, 增加酶量, 使脂肪酸不饱和度提高以维持膜的流动性和正常生理功能. 另外, 低温还可能提高去饱和酶的活性, 使去饱和作用加强, 也可能因饱和脂肪酸合成减少而使不饱和脂肪酸合成增加<sup>[4]</sup>. 分析发现, 低温处理可明显提高总长链脂肪酸和 EPA 含量(表1), 而低温处理增加总长链脂肪酸和 EPA 含量的效应可以被高温前处理促进. 低温处理可使总长链脂肪酸和 EPA 含量从 7.53% 和 1.70% 细胞干重分别提高到 12.90% 和 2.74%, 分别比对照提高 71.3% 和 61.2%. 高温前处理进一步使总长链脂肪酸和 EPA 含量分别提高到 13.10% 和 3.42%, 分别比对照提高 87.2% 和 101.2%. 同时, 低温和/或低温处理几乎能成倍提高链长指数、不饱和度指数和综合改进指数. 这说明温度逆境处理是一种提高微藻 EPA 含量和细胞态微藻饵料品质的经济高效措施.

表1 不同处理对眼点拟微球藻长链脂肪酸组成的影响(%) (干重)

脂肪酸	低 温	高 温	低/高温	高/低温	对 照
14:0	0.48±0.04	0.22±0.03	0.21±0.03	0.65±0.02	0.44±0.04
16:0	3.68±0.04	0.88±0.02	0.12±0.02	3.44±0.20	1.95±0.06
16:1	3.94±0.06	0.92±0.06	1.30±0.03	4.49±0.23	2.44±0.04
18:0	0.40±0.03	0.17±0.04	0.27±0.03	0.40±0.03	0.55±0.04
18:1 $\omega$ 9	0.35±0.02	0.14±0.03	0.08±0.02	0.25±0.06	0.18±0.01
18:1 $\omega$ 7	1.23±0.04	0.21±0.03	0.23±0.04	0.42±0.05	0.23±0.02
20:4	0.09±0.02	0.01±0.02	—	0.04±0.01	0.04±0.01
20:5(EPA)	2.74±0.03	1.31±0.03	0.92±0.08	3.42±0.20	1.70±0.03
$\sum P_x$	12.90	3.87	3.13	13.10	7.53
$\sum P_x \cdot N_x$	220.74	67.81	54.55	224.34	128.50
$\sum P_x \cdot \omega_x$	19.57	7.88	6.21	22.43	11.52
$\sum P_x \cdot \omega_x \cdot N_x$	372.41	153.15	118.43	429.37	219.90

### 3.3 温度逆境处理在微藻培养上的应用

以往的研究表明, 对数生长期藻体 EPA 含量最高, 而在稳定期 16:0, 16:1, 18:1 等是长链脂肪酸的主要成分<sup>[7~9]</sup>. 氮源类型、N/P、培养温度、光照等也影响眼点拟微球藻的生长速度、总脂肪酸含量和脂肪酸组成. 通过培养环境生态调控, 可在一定程度上提高总脂肪酸含量、长链脂肪酸含量及其组成<sup>[10~13]</sup>. 一些化学试剂也能影响微藻脂肪酸组成和 EPA 积累<sup>[14,15]</sup>. 眼点拟微球藻的培养可用封闭式光反应器<sup>[4]</sup>, 也能用跑道池(本实验室未发表资料)进行培养. 对一般光反应器而言, 实现温度、理化条件的有效控制是非常困难的, 也极大地受成本限制, 而跑道池培养根本不可能实现有效生态调控. 高生物量是培养追求的目标. 但是, 高生物量很难与长链多不饱和脂肪酸积累同步实现. 温度逆境处理为提高长链脂肪酸含量和 EPA 含量提供了一条切实可行的途径. 另外, 温度逆境处理还可能使不同培养批次收获物的含量趋于一致.

本研究仅对眼点拟微球藻进行了温度逆境处理, 处理条件也仅选择了 35 °C 最高耐受温度

和 4 °C 最方便温度, 生长时期也仅选择了稳定生长时期。很显然, 需要在其他富含 EPA 微藻中检验温度逆境处理效应, 需要优化温度、处理时间、处理时期、需要探讨温度逆境对其他生态调控措施效应的协同促进作用。

### 参考文献:

- [1] 麦康生, 何良. 增强鱼类免疫力的饲料生产技术基础[A]. 曾呈奎, 相建海. 海洋生物技术[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1998. 544—551.
- [2] OTERO A, GARCIA D, FABREGAS J. Factors controlling eicosapentaenoic acid production in semicontinuous cultures of marine microalgae [J]. J Appl Phycol, 1997, 9: 465—469.
- [3] VAZHAPPILLY R, CHEN F. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth [J]. J Am Oil Chem Soc, 1998, 75(3): 393—397.
- [4] 魏东, 张学成. 微藻脂肪酸去饱和酶及其基因表达的生态调控研究新进展[J]. 海洋科学, 2000, 21(8): 42—46.
- [5] PROVASOLI L. Media and prospects of the cultivation of marine algae [A]. Watanabe A, Hayyori A. Culture and Collection of Algae [M]. US-Japan Conf, Hokone, Jpn Soc Plant Physiol, 1968. 63—75.
- [6] LEPAGE G, TOY C. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction purification [J]. J Lipid Res, 1984, 25: 1369—1396.
- [7] 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[J]. 青岛海洋大学学报, 30(3): 503—509.
- [8] COHEN Z, VONSHAK A, RICHMOND A. Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red alga *Porphyridium cruentum*: correlation to growth rate [J]. J Phycol, 1988, 24: 328—332.
- [9] ZHU C J, LEE Y K, CHAO T M. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1 [J]. J Appl Phycol, 1997, 9: 451—457.
- [10] 魏东, 张学成, 隋正红, 等. 氮源和 N/P 对眼点拟微球藻的生长、总脂含量和脂肪酸组成的影响[J]. 海洋科学, 2000, 21(7): 46—51.
- [11] CHEN F, JOHNS M R. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana* [J]. J Appl Phycol, 1991, 3: 203—209.
- [12] REITAN K I, RAINUZZO J R, OLSEN Y. Effect of nutrient limitation of fatty acid lipid content of marine microalgae [J]. J Phycol, 1994, 310: 972—979.
- [13] ROESSLER P G. Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions [J]. J Phycol, 1990, 26: 393—399.
- [14] COHEN Z, HEIMER M Y.  $\Delta 6$  desaturase inhibition: a novel mode of action of norflurazon [J]. Plant Physiology, 1990, 93: 347—349.
- [15] COHEN Z, DIDIS, HEIMER M Y. Overproduction of  $\gamma$ -linoleic and eicosapentaenoic acids by algae [J]. Plant Physiology, 1992, 98: 569—572.

## Obvious increase of EPA content of *Nannochloropsis oculata* achieved in temperature stresses

YANG Guan-pin<sup>1</sup>, ZHANG Ji-min<sup>1</sup>, WEI Dong<sup>1</sup>, ZHANG Xue-cheng<sup>1</sup>

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

**Key words:** microalgae; *Nannochloropsis oculata*; eicosapentaenoic acid; temperature stress; cell shaped feed