

营养盐对小球藻的生长、脂肪含量及 EPA 含量影响的研究*

李荷芳 周汉秋

(中国科学院海洋研究所)

二十碳五烯酸(EPA)是 n-3 系列高度不饱和脂肪酸,具有降血脂、抑制血小板聚集、降血压、抗动脉粥样硬化等作用(刘玉军,1987;Clemens, *et al.*, 1985)。人和动物体几乎不能合成 EPA,只能从食物中获取,而海藻是不饱和脂肪酸的(原始)初级生产者。

在以往研究的基础上,我们选择了 EPA 含量较高,且易于养殖的小球藻 *Chlorella* sp-2(李荷芳等,1999)为原料,用不同的营养液对其进行培养,分析藻体中的脂肪和 EPA 的含量变化,以便选择能使小球藻生长好、脂肪含量及 EPA 含量均高的营养条件,为开辟 EPA 的新来源提供依据。

一、材料与方 法

1. 藻种及其培养 由本所提供的小球藻在实验室内进行培养,温度为 $18.5 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$,室内自然光照;培养容器为 1000mL 透明试剂瓶,每瓶盛藻液 900mL。培养海水经煮沸消毒,不通气培养,每天定时摇动数次。小球藻的初始浓度为 24×10^4 个细胞/mL,养殖实验进行两周。

2. 正交试验的设计

(1)因子及水平的选定:氮(N,因子“A”)、磷(P,因子“B”)、铁(Fe,因子“C”)、硅(Si,因子“D”)、维生素 $B_1 + B_{12}$ (因子“E”)及 EDTA Na_2 (因子“G”),其中因子 A,B,C,D 取 4 水平,其余取 2 水平(表 1)。

(2)正交表的选用:本试验按 $L_{16}(4^4 \times 2^3)$ 正交表的要求(朱伟勇,1978)配制 16 种培养液(表 2)。

3. 生长的测量 用血球计数板计数。

4. 脂肪的提取和脂肪酸的分析 养殖实验结束后,用离心的方法收集藻泥。总脂的提取按 Bligh-Dyer 法进行(Bligh, *et al.*, 1959),脂肪的酯化按 Carreau-Dubacq 法进行(Carreau, *et al.*, 1978),用硅胶层析板以 C_6H_6 作展开剂对脂肪酸甲酯进行纯化,用

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3512 号。

国家自然科学基金资助项目,39570084 号;国家“九五”攻关项目,96-916-04-03 号。

收稿日期:1998 年 9 月 9 日。

表 1 试验因子及其水平(单位:mmol/L)

因 子	水平 1	水平 2	水平 3	水平 4
A(N)	0	0.5	1.0	2.0
B(P)	0	0.015	0.030	0.060
C(Fe)	0	0.001	0.002	0.004
D(Si)	0	0.009	0.018	0.036
E($VB_1 + VB_{12} < \frac{VB_1}{VB_{12}}$)	0	$0.1(\times 10^{-6})$		
	0	$0.0005(\times 10^{-6})$		
G(EDTA Na_2)	0	0.09		

表 2 营养液配方的正交设计(单位:mmol/L)

实验号	A (N)	B (P)	C (Fe)	D (Si)	E ($VB_1 + VB_{12}$)	F	G (EDTA Na_2)
1	0	0	0	0	0		0
2	0	0.015	0.001	0.009	0		0.09
3	0	0.030	0.002	0.018	$VB_1 0.1 \times 10^{-6};$ $VB_{12} 0.0005 \times 10^{-6}$		0.09
4	0	0.060	0.004	0.036	$VB_1 0.1 \times 10^{-6};$ $VB_{12} 0.0005 \times 10^{-6}$		0
5	0.5	0	0.001	0.018	$VB_1 0.1 \times 10^{-6};$ $VB_{12} 0.0005 \times 10^{-6}$		0
6	0.5	0.015	0	0.036	$VB_1 0.1 \times 10^{-6};$ $VB_{12} 0.0005 \times 10^{-6}$		0.09
7	0.5	0.030	0.004	0	0		0.09
8	0.5	0.060	0.002	0.009	0		0
9	1.0	0	0.002	0.036	0		0.09
10	1.0	0.015	0.004	0.018	0		0
11	1.0	0.030	0	0.009	$VB_1 0.1 \times 10^{-6};$ $VB_{12} 0.0005 \times 10^{-6}$		0
12	1.0	0.060	0.001	0	$VB_1 0.1 \times 10^{-6};$ $VB_{12} 0.0005 \times 10^{-6}$		0.09
13	2.0	0	0.004	0.009	$VB_1 0.1 \times 10^{-6};$ $VB_{12} 0.0005 \times 10^{-6}$		0.09
14	2.0	0.015	0.002	0	$VB_1 0.1 \times 10^{-6};$ $VB_{12} 0.0005 \times 10^{-6}$		0
15	2.0	0.030	0.001	0.036	0		0
16	2.0	0.060	0	0.018	0		0.09

HP5880A 气相色谱仪测定脂肪酸。色谱柱为硅毛细管柱 ($25\text{m} \times 0.2\text{mm}$), 固定相为 Carbowax20M, 柱温为 190°C , 进样器和检测器的温度分别为 210°C 和 220°C ; 载气为纯氮气, 流速为 $2.9\text{mL}/\text{min}$, 分流比为 100:7.25; 检测器为火焰离子化检测器 (FID)。脂肪酸的鉴定参照标准样品和碳链长度 (ECL) 值 (Christie, 1988) 来进行, 定量分析采用对各组分峰面积积分, 用归一化法计算脂肪酸组分的百分含量 (以脂肪酸总量的 % 表示)。

二、结果与讨论

1. 营养盐对小球藻生长速度的影响 不同配方的营养盐对生长速度的影响见直观分析表 3。从表 3 中可以看出, 生长最快的为 10 号方, 生长较快的为 14 号、11 号、12 号、7 号方, 而 1 号、2 号、3 号、4 号、5 号、9 号、13 号方生长较差。从表 3 中还可以看出, N, P 的加入对小球藻的生长至关重要, 小球藻生长差的七种营养液或是不含 N 或是不含 P, 在缺 N 时, 小球藻生长速度慢, 以后随着 N 浓度的升高, 生长速度也随之增加, 但 N 含量增加至 $1.4\text{mmol}/\text{L}$ 时生长速度反而降低; 在缺 P 时, 生长速度也不快, P 含量在 $0.015\text{mmol}/\text{L}$ 时, 生长速度最快, 以后 P 含量增加, 生长速度反而降低。方差分析表明, N, P 浓度的改变对小球藻的生长速度有很显著的影响 ($P < 0.01$), 而 EDTANa_2 , Si, Fe 及维生素 B_1 , B_{12} 对其的生长速度影响不大。6 种因素对小球藻生长速度影响大小的顺序为 $\text{N} > \text{P} > \text{EDTANa}_2 > \text{Si} > \text{Fe} > \text{VB}_1 + \text{VB}_{12}$ 。各因素的优水平分别为 $\text{A}_3, \text{B}_2, \text{C}_4, \text{D}_1, \text{F}_2$ 和 G_1 , 即培养液中 N, P, Fe, Si, EDTANa_2 及 $\text{VB}_1, \text{VB}_{12}$ 的浓度分别为 1.0, 0.015, 0.004, 0, 0mmol/L 和 0.1, 0.0005 ($\times 10^{-6}$) 时藻体的生长速度最快。

表 3 营养盐对小球藻生长速度影响的直观分析

实验号	A (N)	B (P)	C (Fe)	D (Si)	E ($\text{VB}_1, \text{VB}_{12}$)	F	G (EDTANa_2)	平均生长速度 [$\times 10^4$ 个/($\text{mL} \cdot \text{d}$)]
1	1	1	1	1	1	1	1	10.64
2	1	2	2	2	1	2	2	10.00
3	1	3	3	3	2	1	2	13.86
4	1	4	4	4	2	2	1	13.64
5	2	1	2	3	2	2	1	22.36
6	2	2	1	4	2	1	2	57.36
7	2	3	4	1	1	2	2	70.21
8	2	4	3	2	1	1	1	57.43

续表

实验号	A (N)	B (P)	C (Fe)	D (Si)	E (VB ₁ , VB ₁₂)	F	G (EDTANa ₂)	平均生长速度 [$\times 10^4$ 个/(mL·d)]
9	3	1	3	4	1	2	2	12.14
10	3	2	4	3	1	1	1	87.64
11	3	3	1	2	2	2	1	80.64
12	3	4	2	1	2	1	2	74.36
13	4	1	4	2	2	1	2	21.36
14	4	2	3	1	2	2	1	80.86
15	4	3	2	4	1	1	1	58.64
16	4	4	1	3	1	2	2	40.50
各水平平均值	1	12.04	16.63	47.29	59.02	43.40	51.48	
	2	51.84	58.97	41.34	42.36	45.56	37.47	
	3	63.70	55.84	41.07	41.09			
	4	50.34	46.48	48.21	35.45			
极差		51.66	42.34	7.14	23.57	2.16	14.01	
平均极差		46.49	38.11	6.43	21.21	4.34	28.13	
优水平	A ₁	B ₂	C ₄	D ₁	E ₂		G ₁	
主次顺序	A ₁ >B ₂ >G ₁ >D ₁ >C ₄ >E ₂							

* 平均极差 = 极差 $\times$ 折算系数 $\times$ (每个水平所对应的试验次数)^{1/2}, 水平数为 2 时, 折算系数为 0.71; 水平数为 4 时, 折算系数为 0.45。

2. 营养盐对小球藻体中脂肪含量的影响 不同配方的培养液对小球藻体中脂肪含量影响的直观分析见表 4。从表 4 中可以看出, 脂肪含量最高的配方为 14 号, 总脂含量达 33.6mg/L 藻液; 7 号、8 号、10 号、15 号方次之, 总脂含量为 19.7—23.3mg/L 藻液; 而 1 号、2 号、3 号、4 号、5 号、9 号、13 号及 16 号方含量较低, 脂肪含量在 10mg/L 藻液以下。

(1) N 对于小球藻中脂肪含量至关重要, 未加氮的藻体中总脂含量很低, 每升藻液中总脂含量仅为 1.6—3.2mg/L 藻液, 平均为 2.4mg/L 藻液; 而加入氮后其量显著提高, 在 2 水平时已提高到 14.7mg/L 藻液。

Anni 等(1985)和 Qian 等(1993)的研究及一些资料表明, 大多数藻类在缺 N 的条件下会引起脂肪含量的增加, 而在我们的正交实验中, 1 号、2 号、3 号、4 号方未添加 N, 也就是在缺 N 的条件下, 其单位体积中的脂肪含量较低, 这似乎与其他人的结果有矛盾, 但我们对单个细胞进行计算, 其脂肪含量在缺 N 情况下是增加的, 然而由于缺 N 小球藻生长不好, 在实验结束时单位水体内的海藻数要比含 N 量高的少得多, 因此, 提出来的脂肪量也就要少得多, 这与其他人的研究结果不矛盾。所以, 就其总脂肪量来看, 加 N 的要比不加 N 的脂肪总量要高得多。

(2) EDTA 二钠盐的加入使小球藻体内脂肪含量降低。

(3) P 的加入对于小球藻脂肪含量的增加也很重要, 未加 P 的总脂含量均值为

6.3mg/L 藻液;而 P 的添加量为 0.015mmol 时,总脂含量可提高到 16.7mg/L 藻液,但 P 的添加量再增加时脂肪含量反而又降低。

(4)Fe 的加入对于小球藻脂肪含量的增加有影响,但加到一定浓度后,脂肪含量反而降低。从表 4 中可以看出,Fe 的添加以选择 3 水平为好。

(5)维生素 B₁,B₁₂的加入不能增加藻体中脂肪的含量。

综上所述,N 的加入对小球藻中脂肪含量的多少至关重要,P 的加入也很重要;加入 Fe 有一定的好处;而 EDTA 二钠盐的加入反而显著地降低了藻体中脂肪的含量;硅及维生素 B₁,B₁₂的加入对藻体中脂肪含量也有影响,使之有所下降。从表 4 中可以看出,6 种营养元素对小球藻中总脂含量影响的大小顺序为 N>EDTANa₂>P>Fe>Si>VB₁,VB₁₂,各元素的优水平分别为 A₄,G₁,B₂,C₃,D₁,E₁。即培养液中 N,P,Fe,Si,EDTANa₂及 VB₁,VB₁₂的浓度分别为 1.40,0.015,0.002,0,0mmol/L 和 0,0(ppm)时培养出来的藻体中总脂含量最高。

表 4 营养盐对小球藻中总脂含量影响的直观分析

实验号	A (N)	B (P)	C (Fe)	D (Si)	E (VB ₁ ,VB ₁₂)	F	G (EDTANa ₂)	总脂量 (mg/L 藻液)
1	1	1	1	1	1	1	1	3.2
2	1	2	2	2	1	2	2	2.3
3	1	3	3	3	2	1	2	1.6
4	1	4	4	4	2	2	1	2.6
5	2	1	2	3	2	2	1	6.0
6	2	2	1	4	2	1	2	7.4
7	2	3	4	1	1	2	2	22.4
8	2	4	3	2	1	1	1	22.9
9	3	1	3	4	1	2	2	9.7
10	3	2	4	3	1	1	1	23.6
11	3	3	1	2	2	2	1	10.8
12	3	4	2	1	2	1	2	15.7
13	4	1	4	2	2	1	2	6.4
14	4	2	3	1	2	2	1	33.6
15	4	3	2	4	1	1	1	19.7
16	4	4	1	3	1	2	2	6.8
各水平平均值	1	2.425	6.325	7.050	18.725	13.825	15.300	
	2	14.675	16.725	10.925	10.600	10.513	9.038	
	3	14.950	13.625	16.950	9.500			
	4	16.625	12.000	13.750	9.850			

续表

实验号	A (N)	B (P)	C (Fe)	D (Si)	E (VB ₁ , VB ₁₂)	F	G (EDTANa ₂)	总脂量 (mg/L 藻液)
极差	14.200	10.400	9.900	9.225	3.312		6.262	
平均极差	12.780	9.360	8.910	8.303	6.651		12.575	
优水平	A ₁	B ₂	C ₃	D ₁	E ₁		G ₁	
主次顺序	A ₁ > G ₁ > B ₂ > C ₃ > D ₁ > E ₁							

3. 营养盐对小球藻中 EPA 含量的影响 不同配方的营养盐培养液对小球藻体脂肪酸组成中的 EPA 含量影响见表 5。从表 5 中可以看出,培养液配方不同 EPA 的含量能相差很大,最高与最低的相差 4 倍,7 号、8 号、14 号、15 号培养液培养出的小球藻的脂肪中 EPA 含量在 45% 以上,尤其是 15 号方, EPA 含量高达 48%; EPA 含量在 35%—45% 的有 6 号、10 号、11 号、12 号、16 号;而 1 号、2 号、3 号、4 号、5 号、9 号、13 号方培养的小球藻体中脂肪中 EPA 含量很低,仅为 12% 左右。

从表 5 中可以看出,培养液中 N、P 的加入对小球藻体中 EPA 的含量极为重要,其中尤其是 P,未加 P 的营养液培养出来的藻体中 EPA 的含量仅为 10% 左右,而加入 P 后, EPA 含量显著增加;在 2 水平时, EPA 含量的均值已在 30% 以上。在缺 N 时, EPA 含量也很低,为 13% 左右,而加入 N 后, EPA 含量也显著增加;在 2 水平时, EPA 含量的均值也在 30% 以上。方差分析表明, P、N 的加入对藻体内 EPA 的含量有显著的影响 ($P < 0.05$),而维生素 B₁、B₁₂、EDTANa₂、Si、Fe 的加入对藻体中的 EPA 含量的增加没有大的影响。6 种营养元素对小球藻脂肪中 EPA 含量影响大小的顺序为 $P > N > VB_1, VB_{12} > EDTANa_2 > Si > Fe$,各元素的优水平分别为 A₂、B₄、C₁、D₁、G₁、E₁,即培养液中 N、P、Fe、Si、EDTANa₂ 以及 VB₁、VB₁₂ 的浓度分别为 1.0、0.060、0、0、0 mmol/L 和 0、0 (ppm) 时培养出来的小球藻体的脂肪中 EPA 含量最高。

表 5 营养盐对小球藻中 EPA 含量影响的直观分析

实验号	A (N)	B (P)	C (Fe)	D (Si)	E (VB ₁ , VB ₁₂)	F	G (EDTANa ₂)	EPA 含量 (FAs%)
1	1	1	1	1	1	1	1	12.24
2	1	2	2	2	1	2	2	12.51
3	1	3	3	3	2	1	2	13.21
4	1	4	4	4	2	2	1	13.01
5	2	1	2	3	2	2	1	10.89
6	2	2	1	4	2	1	2	38.22
7	2	3	4	1	1	2	2	46.51
8	2	4	3	2	1	1	1	47.63
9	3	1	3	4	1	2	2	9.73

续表

实验号	A (N)	B (P)	C (Fe)	D (Si)	E (VB ₁ , VB ₁₂)	F	G (EDTANa ₂)	EPA 含量 (FAs%)
10	3	2	4	3	1	1	1	41.99
11	3	3	1	2	2	2	1	35.09
12	3	4	2	1	2	1	2	44.86
13	4	1	4	2	2	1	2	10.07
14	4	2	3	1	2	2	1	45.72
15	4	3	2	4	1	1	1	48.00
16	4	4	1	3	1	2	2	39.23
各水平 平均值	1	12.74	10.73	31.20	37.33	32.23	31.82	
	2	35.81	34.61	29.07	26.33	26.38	26.79	
	3	32.92	35.70	29.07	26.33			
	4	35.76	36.18	27.90	27.24			
极差	23.07	25.45	3.30	11.00	5.85		5.03	
平均极差	20.76	22.91	2.97	9.9	11.75		10.10	
优水平	A ₂	B ₄	C ₁	D ₁	E ₁		G ₁	
主次顺序	B ₄ >A ₂ >E ₁ >G ₁ >D ₄ >C ₁							

4. 营养盐对小球藻的生长速度、脂肪含量及 EPA 含量的影响 藻体中 EPA 含量高的先决条件是藻类生长得好,但藻生长得好不一定脂肪含量、EPA 含量高,就小球藻而言,一般缺 N,虽然单个细胞藻体中脂肪含量增加,但却生长得很不好,这样单位体积内脂肪总含量仍不高。所以,必需具备生长速度、脂肪含量、EPA 含量三方面的因素才能得到 EPA 总量高的产品。表 6 为不同营养盐配方的培养液对小球藻的生长速度、脂肪含量和 EPA 含量影响综合评分直观分析表,从表中可以看出,P,N 对于小球藻的生长、脂肪含量、EPA 含量至关重要。Fe 的加入对其虽有好处,但作用不是太大,而 EDTANa₂、维生素 B₁,B₁₂及 Si 的加入反而不利于 EPA 总量的增加。6 种营养要素对小球藻中 EPA 总量影响的主次顺序为 P>N>EDTANa₂>Si>VB₁,VB₁₂>Fe,各元素的优水平分别为 B₂,A₃,G₁,D₁,E₁,C₃,即培养液中 N,P,Fe,Si,EDTANa₂ 及 VB₁,VB₁₂的浓度分别为 1.0,0.015,0.002,0,0mmol/L 及 0,0(ppm)时培养出来的小球藻体中所得到的 EPA 总量最高。

三、结 论

(1)N,P 对小球藻的生长速度、藻体中的脂肪含量及其 EPA 含量的多少极为重要;Fe 的加入对其虽有好处,但作用不是太大;而 EDTANa₂,Si 及 VB₁,VB₁₂的加入反而不利于 EPA 总量的增加。

(2)培养液中 N 的添加量为 1.0mmol/L,P 的添加量为 0.015mmol/L,Fe 的添加量

为 0.002mmol/L 时所培养出来的小球藻,无论是生长速度,还是藻体中的脂肪含量及其 EPA 含量都较高。

参 考 文 献

- 朱伟勇,1978,正交与回归正交试验法的应用,辽宁人民出版社,25—33。
- 刘玉军,1987,鱼油,二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸的生物效应与作用机理,生理科学进展,18(3):230。
- 李荷芳、周汉秋,1999,海洋微藻脂肪酸组成的比较研究,海洋与湖沼,30(1):34—40。
- Ami Ben-Amotz, *et al.*, 1985, Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipid, *J. Phycol.*, 21: 72—81.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer, 1959, A rapid method of the total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911—917.
- Carreau, J. P. and J. P. Dubacq, 1978, Adaptation of macro-scale method to the micro-scale for the fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts, *J. Chromatogr.*, 151: 384—390.
- Christie, W. W., 1988, Equivalent chain-lengths of methyl ester derivatives of fatty acids on gas chromatography, A reappraisal, *J. Chromatogr.*, 447: 305—314.
- Clemens, V. S., F. Sven and C. W. Peter, 1985, Long-term effects of dietary marine ω -3 fatty acid upon plasma and cellular lipid, platelet function and eicosanoid formation in humans, *J. Clin. Invest.*, 76: 1626.
- Qian Kai Xian and A. Michael Borowitzka, 1993, Light and nitrogen deficiency effects on the growth and composition of *Phaeodactylum tricornutum*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 38: 93—103.

EFFECTS OF NUTRIENTS ON GROWTH, AND CONTENT OF TOTAL LIPID AND EPA, OF *CHLORELLA* SP-2 *

Li Hefang, Zhou Hanqiu

(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences*)

ABSTRACT

In this study on the effects of nitrogen, phosphorus, iron, silicon, Vitamin B₁, Vitamin B₁₂ and ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt (EDTANa₂) on the growth and contents of total lipid and EPA of *Chlorella* sp-2, inorganic nitrogen, phosphorus, silicon, chelated iron, EDTANa₂, and Vitamin B₁, B₁₂ mixture were supplemented in various combinations and concentrations according to an L₁₆ (4⁴ × 2³) orthogonal table. The results indicated that nitrogen and phosphorus supplementations have very significant effects on the growth and contents of total lipid and EPA of *Chlorella* sp-2. Growth, total lipid and EPA content of the algae in different culture media varied very much. Based on the observation of growth, total lipid and EPA content, we conclude that the optimal medium contents are as follows: N, 1.0 mmol/L; P, 0.015 mmol/L; Fe, 0.002 mmol/L; Si, 0 mmol/L; Vitamin B₁, 0 (ppm); Vitamin B₁₂, 0 (ppm) and EDTANa₂, 0 mmol/L.

* Contribution No. 3512 from the Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences.