

海洋微藻高度不饱和脂肪酸的研究

Ⅱ. 环境因子对球等鞭金藻 3011 中高度不饱和脂肪酸含量的影响

樊云真 刘发义 李荷芳
(中国科学院海洋研究所)

微藻在不同培养条件下,藻体中脂类和高度不饱和脂肪酸(PUFA)的含量及种类可发生很大变化。因此,研究不同培养条件对其含量的影响,以期寻找既能促进藻类较快生长,又能使其体内 PUFA 含量较高的培养条件,对于促进水产养殖的发展,乃至使其成为生产 EPA 和 DHA 的工业原料,无疑都具有重要的意义。

在系列研究 I 中我们报告了我国沿海水产养殖中常用的 7 种微藻的脂类和脂肪酸组成,在其基础上,我们选择了脂肪和 DHA 含量比较高的球等鞭金藻 3011(*Isochrysis galbana*),用不同的营养液、并在不同的生长期、温度、盐度等条件下,对其进行培养,分析藻体中 PUFA 含量的变化,以便更好地提高其营养价值和利用率,同时探讨用其作为生产 PUFA 的工业原料的可能性。

一、材料与方 法

球等鞭金藻 3011 由本所提供。采用正交设计的方法研究 N、P、Si、Fe、C 等 5 种元素对该藻的生长及藻体脂类和 PUFA 含量的影响。N、P、Si、Fe 取 4 个水平,C 取 2 个水平,按 $L_{16}(4^4 \times 2^3)$ 正交表的要求(朱伟勇,1978)配制 16 种营养液(表 1),微藻的初始浓度均为 8×10^4 个细胞/mL,在温度为 22—25℃、自然光照的条件下,进行 2 周左右的养殖试验。

为了解温度对金藻脂类和 PUFA 含量的影响,我们分别在适于微藻生长的不同季节(姜庆国等,1986):4 月、8 月和 12 月采用上述正交实验中选出的最佳的营养盐配方,对球等鞭金藻 3011 进行培养。

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3102 号。
国家自然科学基金资助项目,39570084 号。
收稿日期:1997 年 1 月 17 日。

表 1 营养液配方的正交设计(单位:mmol/L)

实验号	A (N)	B (P)	C (Si)	D (Fe)	E (空白列)	F (空白列)	G (C)
1	0	0.00	0.00	0.0000	0	0	0
2	0	0.05	0.05	0.0005	0	0	10
3	0	0.10	0.10	0.0010	0	0	10
4	0	0.20	0.20	0.0020	0	0	0
5	1	0.00	0.05	0.0010	0	0	0
6	1	0.05	0.00	0.0020	0	0	10
7	1	0.10	0.20	0.0000	0	0	10
8	1	0.20	0.10	0.0005	0	0	0
9	2	0.00	0.10	0.0020	0	0	10
10	2	0.05	0.20	0.0010	0	0	0
11	2	0.10	0.00	0.0005	0	0	0
12	2	0.20	0.05	0.0000	0	0	10
13	5	0.00	0.20	0.0005	0	0	10
14	5	0.05	0.10	0.0000	0	0	0
15	5	0.10	0.05	0.0020	0	0	0
16	5	0.20	0.00	0.0010	0	0	10

为研究盐度的影响,在温度为 20—25℃,自然光照周期(15h:9h 明、暗)、光强为 1000—8000 lx 条件下,从 10 到 120 共选择 10 个盐度梯度对球等鞭金藻 3011 培养 14 天。

上述研究中微藻的培养方法、样品的收集和分析方法与研究 I 报告相同。

二、结果与讨论

1. 营养盐的影响 不同配方的营养盐对球等鞭金藻 3011 生长速度影响的直观分析列于表 2。从表 2 中可看出,生长比较快的是 6 号、10 号、11 号、15 号和 16 号藻,其它各组则比较差。方差分析表明,N、P、Fe 浓度的改变对该藻的生长速度有显著影响($P < 0.05$),而 C 和 Si 对其生长速度影响不显著($P > 0.05$)。5 种元素对日平均生长速度的影响大小顺序为 $N > Fe > C > P > Si$,各元素的优水平分别为 A3、B2、C1、D4 和 G1,即培养液中 N、P、Si、Fe 和 C 的浓度分别为 2.00、0.05、0、0.020、0mmol/L 时,藻体的生长速度最快。

表 2 球等鞭金藻培养正交实验结果直观分析

实验号	A (N)	B (P)	C (Si)	D (Fe)	E	F	G (C)	平均日 生长速度 ($\times 10^4$ 个/(mL·d))
1	1	1	1	1	1	1	1	2.21
2	1	2	2	2	1	2	2	3.19
3	1	3	3	3	2	1	2	4.87
4	1	4	4	4	2	2	1	5.66
5	2	1	2	3	2	2	1	7.83
6	2	2	1	4	2	1	2	20.12
7	2	3	4	1	1	2	2	8.25
8	2	4	3	2	1	1	1	7.81
9	3	1	3	4	1	2	2	9.06
10	3	2	4	3	1	1	1	18.34
11	3	3	1	2	2	2	1	16.19
12	3	4	2	1	2	1	2	4.23
13	4	1	4	2	2	1	2	4.18
14	4	2	3	1	2	2	1	6.44
15	4	3	2	4	1	1	1	17.37
16	4	4	1	3	1	2	2	14.25
各 1	15.93	23.28	52.77	21.13	78.48	79.13	81.85	
水 2	44.01	48.09	32.62	31.37	71.52	70.87	68.15	
平 3	47.82	46.68	28.18	45.29				
和 4	42.24	31.95	36.43	52.21				
极差	31.89	24.81	24.59	31.08	6.96	8.26	13.70	
平均极差*	28.70	22.33	22.13	27.97	13.98	16.59	27.51	
优水平	A3	B2	C1	D4			G1	
主次顺序	A3>D4>G1>B2>C1							

* 平均极差=极差 $\times$ 折算系数 $\times\sqrt{\text{每个水平所对应的试验次数}}$ 。

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。

为了更可靠地选择最佳营养液配方,我们将正交试验中所得的最佳营养液配方(17 号),与上述生长速度最快的 6,10 和 15 号配方以及参照陈椒芬(1987)等使用的营养液组成 0 号配方进一步进行对比试验,各组配方见表 3。养殖水温 25—30℃,养殖初始细胞浓度皆为 8×10^4 个/mL,分别于养殖 14 天和 28 天后测定其生长速率,以及藻体中总脂和脂肪酸含量(表 4)。结果表明,培养 14 天后,单位水体的总脂和 DHA 含量都以正交实验选出的最佳配方(17 号)最高,比常规使用的营养液(0 号)分别高 68.9%和 107.6%,比正交试验中生长最快的 6 号配方也分别高 41.12%和 56.51%。因此,无论是从生长速度考

虑还是从单位水体中脂类和 DHA 的产量考虑, 作者认为 17 号营养液配方都是最好的。

表 3 重复试验的营养液组成 (mmol/L)

试验号	N	P	Si	Fe	C
0*	0.7	0.03	0.041	0.0015	0
6	1.0	0.05	0	0.0020	10.00
10	2.0	0.05	0.200	0.0010	0
15	5.0	0.10	0.050	0.0020	0
17	2.0	0.05	0	0.0020	0

* 0 号为参照陈淑芬等人的配方; 17 号是根据上述正交试验结果选定的最佳营养液配方。

表 4 不同营养条件及不同生长期对球等鞭金藻 3011 总脂和 DHA 含量的影响

试验号	时间 (d)	生长速率 K^*	单位水体总脂含量 (10^{-3}g/L)	每个细胞总脂含量 (10^{-12}g)	单位水体 DHA 含量 (10^{-3}g/L)	每个细胞 DHA 含量 (10^{-12}g)
0	14	0.412	8.47	1.95	0.846	0.194
	28	-0.01	7.90	2.02	0.516	0.132
6	14	0.416	10.14	2.23	1.122	0.247
	28	-0.009	7.50	1.80	0.692	0.166
10	14	0.361	9.70	3.66	0.836	0.315
	28	-0.007	7.40	2.98	0.703	0.280
15	14	0.406	10.05	2.45	1.103	0.269
	28	-0.003	5.60	1.40	0.543	0.136
17	14	0.419	14.31	3.05	1.756	0.374
	28	-0.007	5.80	1.32	0.612	0.139

* K 的含意及公式同研究 I。

2. 生长期的影响 表 4 同时列出了培养 14 天和 28 天时的实验结果, 当培养到 28 天时, 各组的生长率都接近于零, 即达到静止生长期。此时单位体积中总脂和 DHA 含量比 14 天时分别下降了 23.7%—59.9% 和 16.0%—65%; 单个细胞中总脂和 DHA 含量也分别下降了 18.6%—56.7% 和 11.1%—70.8%。由此看出, 微藻在不同生长时期的总脂和脂肪酸含量也有变化。球等鞭金藻 3011 在对数生长期, 单位水体和单个细胞中总脂和 DHA 含量比静止生长期高得多。

3. 季节的影响 表 5 是用同样的培养液在不同季节养殖的金藻体内总脂及 DHA 的含量。

表 5 不同季节球等鞭金藻 3011 中总脂和 DHA 的含量

培养 季节	水温 (℃)	养殖天数 (d)	生长速率 <i>K</i>	总脂含量 (mg/L)	DHA 含量	
					(%FAs)	(mg/L)
4 月	16—18	17	0.318	17.31	19.39	3.356
8 月	28—32	16	0.322	12.04	11.35	1.370
12 月	15—18	15	0.360	14.31	22.00	3.148

从表 5 看出,不同季节培育出的金藻,其总脂和 DHA 含量有较大的变化,这种差别可能主要是由于温度不同而引起的。4 月和 12 月的水温较低,为 15—18℃,培养出的金藻总脂中 DHA 含量明显高于 8 月份,单位水体中总脂和 DHA 含量也明显高于后者,特别是 DHA 的量比 8 月份高出 1 倍以上。

温度对微藻影响的研究结果各不相同,大多数的研究表明,温度低,脂肪酸的不饱和度增高;但也有的微藻脂肪酸的不饱和度随温度的升高保持不变(Thompson *et al.*, 1992)。我们的实验结果与大多数的研究结果相同。温度降低时脂肪酸的不饱和度升高,膜脂流动性增加,这是生物本身的生理需求。人们认为,生物是通过增加脂肪酸的不饱和度来增加膜脂质的流动性,从而保持膜的生理功能的执行和提高对低温的耐受力。因此适当地降低温度是提高生物体内 PUFA 含量的一种有效手段。

4. 盐度的影响 表 6 是在不同盐度条件下养殖的球等鞭金藻 3011 体内总脂和高度不饱和脂肪酸的含量。

表 6 盐度对球等鞭金藻 3011 中脂肪及 PUFA 含量的影响

盐度	生长速率 <i>K</i>	单位水体 总脂含量 (mg/L)	每个细胞 总脂含量 (10 ⁻¹² g)	脂肪酸中 PUFA 含量 (%)	单位水体 DHA 含量 (mg/L)	每个细胞 DHA 含量 (10 ⁻¹² g)
10	0.154	—	—	—	—	—
15	0.316	6.1	2.65	52.03	0.71	0.308
20	0.352	8.3	2.68	49.67	0.87	0.283
25	0.360	10.7	3.24	51.83	1.05	0.317
30	0.354	9.9	3.19	50.79	1.26	0.405
45	0.297	7.9	3.51	48.32	0.58	0.257
60	0.221	—	—	—	—	—
75	0.120	—	—	—	—	—

从表 6 中看出,当盐度为 10—25 时,生长率随盐度的升高而增加,当盐度达到 25 时,生长速率最快;盐度大于 25,特别是大于 30 时其生长率则随其升高而下降;当盐度小于 10 或大于 45 时,球等鞭金藻 3011 基本不能生长,这与陈淑芬等(1987)的结果是一致的。从表 6 还可看出,在合适的盐度下(25—30),单位水体总脂和 DHA 的含量最高,单个细胞中总脂和 DHA 的含量也是最高的。

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, 169。
- 陈淑芬、潘永尧, 1987, 等鞭藻的生长及其主要营养成分的研究, 海洋与湖沼 18(1): 55—63。
- 姜庆国、王渊源, 1986, 我国饵料用海产单胞藻类的适宜培养季节, 海洋渔业, 8(6): 263—264。
- Thompson, P. A., Guo, Ming-xin *et al.*, 1992, Effects of variation in temperature I. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton, *J. Phycol.*, 28: 488—490.

**STUDIES ON POLYUNSATURATED FATTY ACIDS OF MARINE
MICROALGAE I. EFFECTS OF CULTURE CONDITIONS ON THE
CONTENTS OF FATTY ACIDS OF *ISOCHRYSIS GALBANA* 3011***

Fan Yunzhen, Liu Fayi, Li Hefang

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

ABSTRACT

This study of the effects of culture conditions (season, salinity, growth period, culture medium) on lipid and fatty acid composition of *Isochrysis galbana* 3011 showed: (1) Total lipid and DHA contents in the algae increased with decreasing temperature; (2) Too high and too low salinity slowed production of total lipid and DHA; suitable salinity was 2.5‰—3.0‰; (3) Total lipid and DHA contents in the exponential growth period were much higher than that in the static period; (4) Total lipid and DHA content of the algae growing in different culture medium varied very much, and the optimal medium for growth of the algae was: N, 2.0 mmol/L; P, 0.05 mmol/L; Fe, 0.002 mmol/L; Si, 0 mmol/L; and C, 0 mmol/L.

* Contribution No. 3102 from the Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences.