

# 温度和光照对纤细角刺藻二十碳五烯酸含量的影响\*

## Effect of Temperature and Light on the Content of Eicosapentaenoic Acid in *Chaetoceros gracillis*

吴斌

Wu Bin

(广西海洋研究所 北海市长青东路 92号 536000)

(Guangxi Institute of Oceanography, 92 East Changqinglu, Beihai, Guangxi, 536000, China)

**摘要** 用气相色谱法分析纤细角刺藻的脂肪酸含量,探索不同温度和光照对该藻二十碳五烯酸(EPA)含量的影响。结果显示,从15℃~30℃,该藻的EPA含量随温度的升高而增加,其绝对含量在25℃时最高,而相对含量在30℃时最高。当温度超过30℃时,EPA含量急剧下降。在低光照下,EPA相对含量较高,占总脂肪酸的20.73%,在高光照下,EPA绝对含量较高,但相对含量只占总脂肪酸的6.44%。

**关键词** 纤细角刺藻 二十碳五烯酸(EPA) 温度 光照

中图分类号 S 968.4

**Abstract** The effect of temperature and light on the content of eicosapentaenoic acid (EPA) in *Chaetoceros gracillis* was studied by gas chromatography. From 15°C to 30°C, the content of EPA increased with increasing of temperature. The absolute content of EPA was highest at 25°C, whereas the relative content of EPA was highest at 30°C. When the temperature exceeded 30°C, the content of EPA decreased rapidly. In low light condition, the relative content of EPA was higher, and accounted for 20.73% of the total fatty acid. In high light condition, the absolute content of EPA was higher, but its relative content only accounted for 6.44% of the total fatty acid.

**Key words** *Chaetoceros gracillis*, eicosapentaenoic acid (EPA), temperature, light

海洋微藻中含有多种高度不饱和脂肪酸,其中二十碳五烯酸(EPA)对防治心脑血管疾病的功效已被国内外医学界所公认,除了在临床上应用外,EPA还广泛应用于各种保健药品中。目前市场上的EPA产品的原料来源主要是鱼油,但经研究发现,海洋微藻中的许多种类含有丰富的EPA,从海洋微藻中提取EPA具有不含胆固醇,没有鱼腥味等优点,以海洋微藻为原料提取EPA,已越来越受到各国学者的重视。对海洋微藻中EPA含量的分析研究工作,国内外学者都进行了不少研究<sup>[1-3]</sup>,发现EPA的含量因藻种的不同而异,而且环境因子、营养条件等的改变也会对其产生影响。本文以纤细角刺藻(*Chaetoceros gracillis*)为研究对象,研究温度和光照对EPA含量的影响,探讨其最适培养条件,为开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻的培养

实验所用藻种取自本研究室饵料实验室,藻种一

直在保种箱中纯种培养。实验所用培养液配方见表1。藻的培养在1000 ml锥形瓶里进行,培养液750 ml,藻的接种密度20万细胞/毫升,培养液盐度为2‰~3‰。

表1 培养液配方

Table 1 The component of culture medium

成分 Component	用量 Quantity
KNO <sub>3</sub>	0.2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.03g
VitaminB <sub>1</sub>	0.1mg
VitaminB <sub>2</sub>	0.3g
NaSiO <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.03g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3.15mg
Boiled sea water	1000ml

#### 1.1.1 温度试验

共设5个温度梯度,分别为15℃、20℃、25℃、30℃和35℃。培养在可控温的光照培养箱进行,光照度3000 lx,12 h光照,12 h黑暗。每个梯度设一个重复。

#### 1.1.2 光照试验

光照度设5个梯度,分别为500 lx、2000 lx、4000 lx、6000 lx、8000 lx。在光照培养箱进行,温

2000-08-13收稿,2001-01-21修回。

\* 广西青年科学基金资助项目(9718016)。

度 25°C, 12h光照, 12h黑暗, 每个梯度设一个重复。

## 1.2 EPA含量的分析

### 1.2.1 藻体的分离与干燥

试验培养约经 14 d, 达到对数生长末期时 (藻密度 400万细胞 毫升~ 500万细胞 毫升), 用离心的方法收集沉淀的藻泥, 转速 4 000 r/min, 离心时间 5 min, 藻泥用蒸馏水洗涤除盐。藻泥用真空干燥法干燥, 真空度 - 0.1 MPa, 温度 35°C, 干燥时间 2 h, 干燥后的样品装于青霉素小瓶中, 充氮气密封, 冷冻保存。

### 1.2.2 样品的处理

样品在进行气相色谱分析前须经过前处理, 处理方法参考彭兴跃<sup>[5]</sup>的方法, 具体步骤是: 称取 10 mg 左右干燥样品, 置于带磨口塞的 15 ml 试管中, 加入 2 ml 6% KOH 甲醇水溶液 (甲醇: 水 = 4: 1), 充氮气塞紧后在超声水浴中破碎抽提 20 min, 然后在 80°C 水浴中皂化 2 h, 冷却后加 2 ml 萃取液 (氯仿: 正己烷 = 1: 4) 萃取 3 次, 将萃取液合并后用氮气吹干, 加入 0.5 ml BF<sub>3</sub> 甲醇溶液, 70°C 水浴中甲酯化 20 min, 冷却后用 2 ml 石油醚萃取 3 次, 合并萃取液, 用氮气吹至约 0.5 ml, 备上机分析用。

### 1.2.3 气相色谱分析

仪器: 日本产 GC-14B 气相色谱仪; 进样量: 3 μl; 色谱条件: 玻璃柱 2 m × 3 mm, 酸洗 101 担体, 涂以 3% DEGS, 载气为超纯氮, 流速 50 ml/min, 检测器为 FID, 柱温 200°C, 气化室和检测器温度均为 260°C。

## 2 结果

### 2.1 温度对纤细角刺藻 EPA 含量的影响

温度对该藻 EPA 含量的影响见表 2

表 2 不同温度对纤细角刺藻 EPA 含量的影响

Table 2 The effect of temperature on the content of EPA of *Chaetoceros gracillis*

温度 Temperature (°C)	峰面积 Peak area	相对含量 Relative content (%)
15	97909	10.07 ± 0.84
20	106943	10.85 ± 1.12
25	131740	11.56 ± 0.63
30	107307	13.99 ± 0.39
35	51336	9.56 ± 1.08

表 1 中峰面积代表 EPA 绝对含量的多少; 相对含量指 EPA 占总脂肪酸的百分比。从表 1 中可以看出, 从 15°C ~ 30°C, EPA 的相对含量是随着温度的升高而增加, 而绝对含量则是在 25°C 时最高, 当温度超过 30°C 时, EPA 的绝对含量和相对含量都急剧下

降。对于用该藻生产 EPA 来说, 最适的培养温度为 25°C ~ 30°C。

### 2.2 光照对纤细角刺藻 EPA 含量的影响

光照对该藻 EPA 含量的影响见表 3

表 3 不同光照度对纤细角刺藻 EPA 含量的影响

Table 3 The effect of illumination on the content of EPA of *Chaetoceros gracillis*

光照度 Illumination (lx)	峰面积 Peak area	相对含量 Relative content (%)
500	129325	20.75 ± 0.32
2000	125252	9.03 ± 0.96
4000	153204	6.61 ± 1.03
6000	140365	6.12 ± 0.45
8000	147817	6.44 ± 0.67

从表 3 中可以看出, 不同光照度对该藻 EPA 绝对含量的影响不是很大, 相对来说高光照度状态下 EPA 的绝对含量稍高于低光照度状态。而不同的光照度对该藻 EPA 的相对含量影响非常明显, 低光照度状态下的 EPA 相对含量远远高于高光照度状态。

## 3 讨论

周洪淇<sup>[3]</sup>等报道新月菱形藻和铲状菱形藻的最适生长温度为 20°C 和 10°C, 温度升高时, 其脂肪含量显著降低。同时分析其 EPA 的含量也发现, 随着温度的升高, 其 EPA 含量也显著降低。也就是说, 无论是脂肪含量和 EPA 含量的最高值的培养温度是与其最适生长温度相适应的。对于纤细角刺藻来说, 其最适生长温度是 25°C ~ 30°C, 分析表明其 EPA 含量最高时的温度也是 25°C ~ 30°C, 这结果得出的结论与周洪淇等报道的相似。一般来说, 喜高温的微藻种类, 其 EPA 含量随培养温度的上升而增加, 但当温度超过一定值时, 其 EPA 含量会显著下降, 这与 Thompson 等<sup>[2]</sup>报道的在高温下微藻合成的脂肪较少结果一致。

有关光照对微藻脂肪酸含量的影响的报道很少, 这可能与光照度比较难以控制有关。事实上, 经研究发现, 光照对微藻的 EPA 含量的影响是非常显著的, 这个显著性主要表现在对 EPA 的相对含量方面。在低光照下, EPA 的含量远远高于高光照下的含量, 这在实现工业化生产时对提取和纯化 EPA 的工作相当有利。但有一个矛盾就是低光照下微藻生长速度较慢, 所得生物量较少, 这又对大规模生产产生不良影响。因此, 能否在高光照状态下使微藻大量繁殖后, 把其置于低光照下一段时间, 使 EPA 相对含量增加则有待进行探讨。

(下转第 53 页 Continue on page 53)

电镜下 M 和 Y 的超微结构, 显示了其与形态的相适应性。无论 M 还是 Y, 芽体或芽管长出时, 线粒体总是移到母细胞与芽体或芽管相连的部位, 为子细胞的发生提供能量; 液泡在子细胞发生时也会发生形态的变化, 在芽体或芽管发生时, 母细胞中有比较大的液泡, 大液泡逐渐分裂形成小液泡, 部分小液泡进入子细胞, 等到形成子细胞后, 这些小液泡又分别在母细胞和子细胞中聚成大液泡。由于液泡内含有许多酶类, 在诱导 M 和 Y 形成时, 氨基酸可能起作用产生不同的酶参与了生物代谢过程, 从而产生不同的形态。M 和 Y 又各自有和本身形态发生相关的结构。在 Y 中, 靠近母细胞和子细胞相连的部位及靠近子细胞和母细胞相连的部位, 有些颗粒状物质和囊泡, 这些物质与母细胞和子细胞的新壁形成有关, 囊泡中可能含有一种酶, 这种酶与芽体形成区的质膜相融合, 释放水解酶激活细胞质中的几丁质合成酶, 利于新壁的形成, 使细胞分开。在 M 细胞中, 母细胞顶端形成的大液泡 (相对细胞直径来说比较大), 所起的作用是产生压力使菌丝延伸。在 M 细胞的侧壁以及顶端部位有很多泡囊, 着色稍深, 含有多种水解酶类, 顶端泡囊与 M 细胞顶端生长时细胞壁的形成有关, 侧面的泡囊可能与 M 的侧枝发生有关。综上所述, *C. tropicalis* 二型性菌体细胞形态和结构有明显差异, 这些差异与所加氨基酸有何关系, 氨基酸是如何调控二型性发生的, 还需进一步从二型性菌体细胞生物化学差异上来分析。

致谢

本文的细胞形态观察得到广西师范大学分析中心张杏辉老师的大力帮助, 在此表示感谢。

- 1 Muthukumar Ganapathy, Nickerson W. Kenneth.  $Ca^{2+}$ -calmodulin regulation of fungal dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. Journal of Bacteriology. 1984, 390~ 392.
- 2 韦一能. 脯氨酸对 *Ceratocystis ulmi* 两种形态的影响. 微生物学通报, 1994, 21 (3).
- 3 Petal Romondini. Superoxide dismutase, catalase and cell dimorphism in *Candida albicans* cells exposed to methanol and different temperatures. Comparative Biochemistry and Physiology C Pharmacology Toxicology and Endocrinology, 1994, 108 (1): 47~ 54.
- 4 John C. Ahrens, Margaret R. Price et al.. Effect of culture density on the kinetics of germ tube formation on *Candida albicans*. J of General Microbiology, 1983, 129 3001~ 3006.
- 5 Rajiv K. Kolkarmi, Nickerson W. Kenneth. Nutritional control of dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. Experimental Mycology, 1981, 5: 148~ 154.
- 6 张晓云, 韦一能. 酵母二型性菌体内 SOD 和 MDH 同工酶的电泳分析. 广西师范大学学报 (自然科学版), 1998, 16 (4): 82~ 84.
- 7 林钧安, 高锦梁, 洪键等. 实用电子显微术. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1989.
- 8 Buchan D B Arleme, Gow A R Neil. Rates of germ tube formation from growing and non-growing yeast cells of *Candida albicans*. FEMS Microbiology Letters, 1991, 81 15~ 18.
- 9 Gow N A R, Gooday G W, New sam R J et al.. Ultrastructure of the septum in *Candida albicans*. Current Microbiology, 1980, 4 357~ 359.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 49 页 Continue from page 49)

### 参考文献

- 1 James C M et al. Growth and  $\omega$  fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. Aquaculture, 1989, 77: 337~ 351.
- 2 Thompson P A. Effect of variation of temperature on the biochemical composition of species of marine phytoplankton. J Phycol, 1992, 28 481~ 499.

- 3 洪淇等. 温度对新月菱形藻、铲状菱形藻和耙夫藻的生长、总脂肪含量以及脂肪酸组成的影响. 水产学报, 1996, 20 (3): 235~ 240.
- 4 姜悦, 陈峰, 梁世中. 利用海洋微藻培养生产  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸. 海洋科学, 1997, 6 18~ 20.
- 5 彭兴跃, 王大志等. 毫克级微藻样品中脂肪酸的分离及测定. 台湾海峡, 1998, 17 (3): 289~ 293.
- 6 李荷芳, 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.

(责任编辑: 蒋汉明)