

# 盐度及其调节方式对眼点拟微球藻的生长和 EPA 积累的影响

吴瑞珊, 魏东

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

**摘要:** 本文研究了盐度对海产眼点拟微球藻的生长和 EPA 积累的影响, 同时比较了天然海水、粗海盐和 NaCl 三种物质在调节培养基盐度、影响藻细胞生长和 EPA 积累方面的作用, 结果表明: 盐度处于 14.5‰~33.5‰之间对 EPA 的含量没有显著影响, 但对细胞比生长速率的影响更为显著。藻细胞生长和 EPA 积累的最适盐度范围在 27.0‰~29.0‰。用 NaCl 实现海水中的盐度不能有效促进细胞的生长和 EPA 积累, 而用粗海盐实现海水中的盐度能发挥与海水基本相同的作用。

**关键词:** 盐度; 眼点拟微球藻; 比生长速率; EPA

**中图分类号:** Q949.2; **文献标识码:** A; **文章篇号:** 1673-9078(2007)12-0005-05

## Effects of Salinity and Its Regulation Ways on Growth and EPA Accumulation of *Nannochloropsis oculata*

WU Rui-shan, WEI Dong

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The effects of salinity and its three regulation ways on cell growth and EPA accumulation of *Nannochloropsis oculata* are investigated in this paper. It is found that 14.5‰~33.5‰ of salinity has little influence on the EPA content of *N. oculata*, but greatly affects the cell growth. The best range of the salinity for the cell growth and EPA accumulation of *N. oculata* was determined to be 27.0‰~29.0‰. Besides, similar effects on the cell growth and EPA accumulation are found with the salinities regulated by sea water and sea salt. However, using NaCl to regulate the salinity can not efficiently improve the cell growth and EPA accumulation.

**Key words:** salinity; *Nannochloropsis oculata*; specific growth rate; EPA

二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, 简称 EPA) 是长链  $\omega$ -3 系列多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated acid, 简称 PUFA) 的一种。近年来, EPA 之所以受到科学界、健康食品业以及消费者的重视, 主要是由于以下几点原因<sup>[1]</sup>: (1) 在哺乳动物体内 EPA 主要用于合成前列腺素。(2) 具有降血压、降低血中甘油三酯含量、降低 L-胆固醇、增加 HDL 胆固醇的作用, 可用于预防和治疗心血管疾病。在日本已将 EPA 作为治疗闭塞性动脉硬化症、高血脂症临床用药<sup>[2]</sup>。(3) EPA 与癌症的预防和治疗有关。(4) 可以提高人体的免疫调节机能。(5) 富含 EPA 的藻类还是鱼类极好的饲料。

目前, EPA 的主要来源是海洋鱼油, 但海洋微藻

才是海洋多不饱和脂肪酸的初级生产者。利用高效生物反应器大规模生产富含 EPA 的海洋微藻, 正逐渐成为一条代替鱼油生产 EPA 的最有效的新途径<sup>[3,4]</sup>。

眼点拟微球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 是一种重要的海产经济微藻, 俗称“海洋小球藻” (*Marine Chlorella*)。它最突出的特点是生长快、耐受性好、富含多不饱和脂肪酸 (尤其是二十碳五烯酸 eicosapentaenoic acid, 简称 EPA, 20:5 $\omega$ -3)<sup>[5]</sup>。此外, 它还含有丰富的蛋白质、多种维生素和矿物质, 具有很高的营养价值和多种保健功能, 食用安全, 不仅是水产养殖业的重要饵料微藻, 还是生产高纯度 EPA 产品的极好原料, 国际上已用作健康食品和药品<sup>[6]</sup>。

眼点拟微球藻的 EPA 含量除了决定于自身的遗传因素外, 还受细胞生长、培养基的组成和外界环境因子 (温度、光照强度、光/暗周期等) 的极大影响<sup>[3,5]</sup>。尽管有关盐度对眼点拟微球藻的生长和 EPA 积累的影响已有多个报道<sup>[6-10]</sup>, 但它们的作用规律和机

收稿日期: 2007-9-17

基金项目: 广东省科技攻关项目资助 (5006524); 广东省自然科学基金项目 (20052050166)

作者简介: 吴瑞珊 (1982-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 微藻生物技术与天然产物研究

理仍不清楚,而且同一属的不同来源的藻种情况也有很大变化,因此很有必要做进一步的研究。

本文通过研究一系列盐度对细胞生长和脂肪酸组成的影响,阐明了它们的作用规律,同时进一步研究了粗海盐和 NaCl 在调节盐度、对细胞生长和 EPA 积累的作用方面与天然海水之间的差异,其结果对于海产眼点拟微球藻大规模养殖中生产培养基配方的改良有重要的参考意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 藻种来源及其预培养

海产眼点拟微球藻 (*Nannochloropsis oculata*, CCMP 525),购自美国 CCMP 藻种库。本实验采用两种培养基:(1) Provasoli 培养基 (Provasoli, 1968)<sup>[8]</sup>, (2) 自制培养基<sup>[12]</sup>。所有玻璃器皿均在高压灭菌后使用。在 500 mL 三角瓶内,接入少量活化的藻液于 300 mL 培养基中,培养至对数期备用。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 盐度对细胞的生长和 EPA 积累的影响

1.2.1.1 用消毒海水和无菌蒸馏水按 10:0、9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9 (v/v) 的比例配成一系列不同盐度的海水,并分别测定盐度值。

1.2.1.2 在 250 mL 无菌的三角瓶中分别加入上述不同盐度的海水各 70 mL、10 mL 自制培养基和 20 mL 预培养藻液,工作体积为 100 mL,起始 OD 值>0.1。每个盐度均设两个平行样,以 Provasoli 培养基为对照,培养 8 d。培养条件为:光照强度 2478.3+414.5 lux,温度为 21±1 °C,光暗周期为 12/12 h。培养瓶随机放置,每天至少摇动 4 次且培养瓶每天倒换 1 次位置。培养开始和结束时取样测定 680 nm 下培养液的 OD 值。藻液经离心、洗涤、再离心收集藻泥后冷冻干燥,藻粉用于脂肪酸的气质联用分析。实验重复两次,测试结果为两次实验的平均值。结果经统计分析以确定最佳盐度范围。

#### 1.2.2 天然海水、NaCl 和粗海盐的作用比较

1.2.2.1 用蒸馏水配制浓度分别为 25 g/L、26 g/L、29.2 g/L、31.5 g/L 的 NaCl 溶液和浓度分别为 25.2 g/L、26.5 g/L、29.4 g/L、31.6 g/L 的粗海盐溶液,使它们的盐度值与上步实验确定的最佳盐度相同。以上浓度的确定可通过预实验完成。配好的溶液都必须经煮沸消毒,粗海盐溶液在煮沸处理前还需经过滤除去杂质。

1.2.2.2 在 250 mL 无菌三角瓶中分别加入 70 mL NaCl 溶液或粗海盐溶液,10 mL 自制培养基,20 mL 预培养藻液进行培养,每个处理均设两个平行样,以

相应盐度的天然海水对照组,培养条件除光照强度为 4871.5±502.7 lux 外,其余同上。8 d 后取样测 OD 值并收集藻液制取藻粉以供脂肪酸分析用。实验重复两次,结果取平均值。

### 1.3 分析测试与计算

#### 1.3.1 比生长速率

眼点拟微球藻的比生长速率 $\mu$ 按下式计算: $\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / t$ 。式中, $\mu$ 为比生长速率( $d^{-1}$ ), $X_1$ 和 $X_2$ 分别为实验开始和结束时的 OD 值, $t$ 为培养时间(d)。

#### 1.3.2 脂肪酸组成的气质联用分析

在 Lepage 和 Toy 的方法<sup>[13]</sup>上进行了改进。在螺口试管中称取约 15 mg 左右的藻粉,加入 50  $\mu$ L C19:0 (浓度为 1  $\mu$ g/ $\mu$ L) 作为内标物,再加入 1 mL KOH-CH<sub>3</sub>OH 饱和溶液,迅速混匀,于 75 °C 水浴中皂化、甲酯化 10 min,冷却至室温后加入 2 mL 1N HCl-CH<sub>3</sub>OH 溶液使 pH $\leq$ 2,振荡 1 min,再于 75 °C 水浴酸化 10 min,冷却至室温,加入 2 mL 正己烷及少许蒸馏水促进分层,充分振荡,离心后取上层正己烷相进行气-质联用分析。

脂肪酸分析采用 Agilent 6890GC-5975MSD 型气质联用仪,进样后程序升温:150 °C 保持 2 min,再以 5 °C/min 升至 230 °C,保持 8 min。进样口、检测器的温度分别为 230 °C 和 250 °C。以高纯氦为载气,流速 1.0 mL/min,进样量为 1  $\mu$ L。峰的鉴定采用谱库自动检索,确定各脂肪酸组分所在位置,以面积归一化法得到各脂肪酸组分的相对百分含量,再根据每种脂肪酸相对于 C19:0 内标的峰面积来计算各脂肪酸组分的绝对含量。EPA 占藻粉干重的百分比可按下式计算。

$$EPA (\% \text{干重}) = \left[ \frac{EPA (\% \text{总脂肪酸})}{19.0 (\% \text{总脂肪酸})} \times 50 (\mu\text{g}) \times 10^{-3} \right] / [\text{藻粉干重 (mg)}] \times 100\%$$

#### 1.3.3 数理统计方法

在微机上采用 Microsoft Excel 2003 进行单因素方差分析和成对数据 t-检验;平均值的多重比较采用 Duncan 多重比较法<sup>[14]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 盐度对眼点拟微球藻的生长和 EPA 积累的影响

利用海水稀释来调节盐度对眼点拟微球藻的生长和 EPA 积累的影响见图 1。由图可见,随着盐度的下降,比生长速率值也随之下降,在盐度为 27.0‰ 时达到最大,为 0.244  $d^{-1}$ ,随着盐度的进一步下降,比生长速率也呈下降趋势。EPA 含量(%TFA)随盐度的下降大体上也呈下降趋势,但波动性较比生长速率要大,

其最高值 36.72% 出现在 32.0‰ 的盐度下。多重比较结果表明, 盐度在 14.5‰ 到 32.0‰ 之间 EPA 含量没有显著变化。总体来看, 比生长速率和 EPA 含量的较高值都在 27.0‰~32.0‰ 这个盐度范围内。

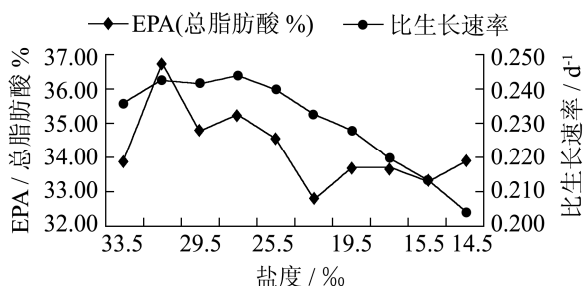


图1 海水稀释形成的不同盐度对眼点拟微球藻的生长和EPA含量的影响

Fig.1 Effect of salinity(regulated with differently diluted sea water) on growth and EPA content of *Nannochloropsis oculata*.

在实验盐度范围内, Provasoli 和自制培养基对比生长速率的影响很小, 但自制培养基生长的细胞中 EPA 含量远高于 Provasoli, 多重比较结果显示差异达

到极显著。这说明自制培养基较 Provasoli 培养基更能促进 EPA 的积累。综合以上结果, 选取了 22.0‰~32.0‰ 的盐度范围进行下面的实验。

本研究结果表明, 眼点拟微球藻生长和 EPA 积累的最适盐度在 25.0‰~32.0‰, 尤以 27.0‰~29.0‰ 的盐度为最佳, 这个盐度范围与陈洁的报道相符。陈洁等在研究该藻生长的生态因子分析中发现, 它在 13.7‰~33.4‰ 的盐度范围内都能生长, 而最适的盐度为 26.9‰<sup>[7]</sup>, 这进一步证实本实验的研究结果。

2.2 自制培养基盐度对细胞生长和 EPA 积累的影响

用 NaCl 和粗海盐调节自制培养基的盐度对眼点拟微球藻生长的变化情况见表 1。由表 1 可见, 三种处理中粗海盐最能促进眼点拟微球藻的生长, 海水次之, NaCl 最弱。对表中数据进行平均值的成对数据 t-检验, 结果也证实, 三种处理中用粗海盐处理、盐度调至 27.0‰~29.0‰ 的范围内, 这样的条件下比生长速率不仅能达到较高的水平、而且与其它条件下所获得的比生长速率相比差异达到显著或极显著。

表 1 用 NaCl 和粗海盐来调节盐度对眼点拟微球藻生长的影响

Table 1 Effect of salinity (regulated with NaCl and sea salt) on growth of *Nannochloropsis oculata*.

盐度/‰	海水对照				粗海盐				NaCl			
	22.0	25.0	27.0	28.5	27.0	28.5	29.0	31.5	26.0	27.0	29.0	30.0
$\mu/d^{-1}$	0.266	0.269	0.275	0.281	0.280	0.285	0.275	0.281	0.261	0.266	0.257	0.252
	$\pm 0.004$	$\pm 0.004$	$\pm 0.006$	$\pm 0.002$	$\pm 0.004$	$\pm 0.005$	$\pm 0.003$	$\pm 0.001$	$\pm 0.012$	$\pm 0.011$	$\pm 0.011$	$\pm 0.017$

表 2 用 NaCl 和粗海盐调节培养基盐度下眼点拟微球藻脂肪酸组成的变化

Table 2 Variation of fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* in media with different salinity regulate by adding NaCl and raw sea salt.

盐度/‰	脂肪酸/(总脂肪酸%)							EPA/(干重%)	
	16:0	16:1 $\omega$ 9	18:0	18:1 $\omega$ 9	18:1 $\omega$ 7	20:4 $\omega$ 6	20:5 $\omega$ 3		
海水对照	22.0	20.42 $\pm$ 2.98	22.33 $\pm$ 4.56	1.17 $\pm$ 0.66	2.50 $\pm$ 0.22	2.81 $\pm$ 0.30	4.25 $\pm$ 0.74	31.97 $\pm$ 5.16	6.01 $\pm$ 1.55
	25.0	19.19 $\pm$ 0.62	22.47 $\pm$ 1.05	0.31 $\pm$ 0.25	2.31 $\pm$ 0.16	2.50 $\pm$ 0.22	4.77 $\pm$ 0.27	37.63 $\pm$ 1.90	7.42 $\pm$ 2.44
	27.0	18.74 $\pm$ 0.58	22.02 $\pm$ 1.68	—	2.46 $\pm$ 0.16	2.31 $\pm$ 0.16	5.04 $\pm$ 0.12	36.83 $\pm$ 0.38	5.77 $\pm$ 1.52
	28.5	19.69 $\pm$ 1.18	22.73 $\pm$ 1.92	0.29	2.51 $\pm$ 0.38	2.46 $\pm$ 0.16	4.82 $\pm$ 0.64	35.19 $\pm$ 2.02	6.08 $\pm$ 0.96
粗海盐	27.0	19.39 $\pm$ 0.58	20.27 $\pm$ 1.09	0.59 $\pm$ 0.29	2.55 $\pm$ 0.49	2.51 $\pm$ 0.38	4.84 $\pm$ 0.59	36.11 $\pm$ 2.99	5.44 $\pm$ 0.92
	28.5	19.09 $\pm$ 1.60	21.10 $\pm$ 0.71	0.92 $\pm$ 0.60	2.25 $\pm$ 0.27	2.55 $\pm$ 0.49	5.19 $\pm$ 0.37	38.30 $\pm$ 3.02	6.27 $\pm$ 1.72
	29.0	19.29 $\pm$ 1.26	21.49 $\pm$ 0.98	—	2.08 $\pm$ 0.17	2.25 $\pm$ 0.27	5.17 $\pm$ 0.10	37.05 $\pm$ 2.43	5.93 $\pm$ 1.14
	31.5	19.36 $\pm$ 1.78	20.97 $\pm$ 1.73	0.11	2.32 $\pm$ 0.44	2.08 $\pm$ 0.17	5.12 $\pm$ 0.53	37.12 $\pm$ 1.97	5.50 $\pm$ 1.67
NaCl	26.0	19.29 $\pm$ 1.75	20.35 $\pm$ 1.84	0.28 $\pm$ 0.01	1.78 $\pm$ 0.11	2.32 $\pm$ 0.44	5.23 $\pm$ 0.23	36.85 $\pm$ 1.37	4.95 $\pm$ 1.02
	27.0	19.89 $\pm$ 0.77	21.55 $\pm$ 1.44	—	2.09 $\pm$ 0.36	1.78 $\pm$ 0.11	5.28 $\pm$ 0.17	39.19 $\pm$ 1.25	6.60 $\pm$ 0.60
	29.0	18.62 $\pm$ 0.94	21.59 $\pm$ 1.61	—	2.04 $\pm$ 0.30	2.09 $\pm$ 0.36	5.42 $\pm$ 0.27	39.36 $\pm$ 2.36	7.53 $\pm$ 4.01
	30.0	18.29 $\pm$ 1.32	19.35 $\pm$ 0.80	—	1.97 $\pm$ 0.39	2.04 $\pm$ 0.30	5.42 $\pm$ 0.32	39.41 $\pm$ 1.88	4.27 $\pm$ 0.83

注: “—”表示峰面积积分小于 0.1%。

用 NaCl 和粗海盐调节自制培养基的盐度对 EPA 积累的影响见表 2。由表 2 可见, 三种处理组中 EPA

的含量 (% 干重) 的较高值大多仍集中在 27.0‰~29.0‰ 的盐度范围内, 但成对数据 t-检验的结

果表明,它们之间不存在显著差异。在此基础上重点考察粗海盐组,由表2可见粗海盐处理组不同盐度下EPA含量普遍维持在5.5~6.3(%干重)这一较高水平,与海水组相比相差很小,EPA占干重的百分比在28.5%的盐度下取得6.27%的最大值,而NaCl组不同盐度下EPA含量变化较大。

综合考虑粗海盐和NaCl调节盐度对细胞生长和EPA积累的影响,可得到如下结论:在蒸馏水配制的自制培养基配方中添加约26.5~29.5 g/L粗海盐能有效促进细胞的生长,同时得到占藻粉干重6%左右的EPA含量。本研究结果表明,虽然盐度在14.5‰~33.5‰范围内EPA的含量没有显著的变化,这与Teshima、Renaud和周洪琪的研究报道一致<sup>[9,10,15]</sup>,但盐度的降低却对细胞的生长和EPA的积累具有一定的影响,这与Zittelli和Hanhua Ha的研究结果相似<sup>[6,8]</sup>。本实验中发现不论哪个盐度下,自制培养基较Provasoli培养基更能促进细胞内EPA的积累。这可能是自制培养基N:P浓度较Pro培养基高得多,对细胞生长的促进作用更明显<sup>[5]</sup>。盐度作用不大,这更进一步说明了盐度对细胞EPA积累的影响有限。

盐度影响细胞生长和EPA的积累的机制,目前报道不多。推测盐度的变化引起渗透压的变化,进而通过影响细胞生物膜的流动性、结构和功能来调节细胞的代谢,从而对细胞的生长和脂肪酸的合成施加影响<sup>[16-19]</sup>。具体来说,可能有以下几个方面:

(1)从生理影响方面来看,细胞的生长和实现其正常的生理功能需要有一定的渗透压来维持,从而保持各种膜结构的完整性和流动性。高盐浓度下,微藻细胞为了避免胞内失水过多与有害离子的进入,细胞膜流动性和渗透性下降<sup>[20]</sup>;低盐浓度下,细胞吸水膨胀,需要更多的膜物质,若膜物质来不及补充,膜有可能发生破裂。膜结构的这种变化势必会影响到细胞的生长和脂肪酸的合成。

(2)从代谢影响方面来看,盐度会影响细胞的光合作用<sup>[21,22]</sup>。微藻细胞脂肪酸去饱和作用主要通过光合电子传递系统与光合作用相关联<sup>[4]</sup>。盐度的变化影响到光合电子传递系统,从而不仅对细胞的生长产生影响,同时也影响多不饱和脂肪酸的合成。

有关NaCl、粗海盐和海水在调节盐度、影响细胞生长和EPA积累方面的作用比较表明:用NaCl代替实现海水中的盐度不能有效促进细胞的生长和EPA

积累,而用粗海盐代替实现海水中的盐度能发挥与海水基本相同的作用。究其原因,可能是因为海水中成分多样,含有多种微量元素,单一的NaCl不可能代替它们对细胞的作用。而粗海盐由海水晒制而成,其水溶液基本上等同于海水,故可在淡水中添加粗海盐来实现海水的作用。

### 3 结论

眼点拟微球藻是一种适盐范围很广的种类,细胞生长和EPA积累的最适盐度范围在25.0‰~32.0‰,尤以27.0‰~29.0‰的盐度为最佳。在培养时用粗海盐代替海水,能有效促进细胞的生长和EPA的积累。此结果为该藻更好地进行工业化大规模生产EPA提供实验依据。

### 参考文献

- [1] 黄鸿洲,董旭.海洋微藻高度不饱和脂肪酸的研究. <http://www.paper.edu.cn>
- [2] 萧家捷.DHA和EPA功能综述[J].中国食物与营养,1996,(2):8-13
- [3] 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,2000,30(3):503
- [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,2000,24(08):42
- [5] 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,2000,24(07):46
- [6] G. Chini Zittelli, F. Lavista, A. Bastianini, et al. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *J. Biotechnol.* 1999,70:299-312
- [7] 陈洁,蒋霞敏,段舜山.眼点拟微球藻生长的生态因子分析[J].生态科学,2002,21(1):50-53
- [8] Hanhua Hu, Kunshan Gao. Response of growth and fatty acid compositions of *nannochloropsis* sp. To environmental factors under elevated CO<sub>2</sub> concentration. *Biotechnol Lett*, 2006,28:987-992
- [9] Teshima. S., Yamasaki, S., Kanazawa. A., et al. Effect of water temperature and salinity on eicosapentaenoic acid level of marine *Chlorella*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fisheries*, 1983,49

(下转第22页)