

户外环境条件下三角褐指藻生长和积累脂肪酸的条件优化

宋培钦, 刘鹭, 魏东

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 微藻的脂肪酸含量与其应用价值有直接关系, 而环境因素对微藻脂肪酸含量有着显著影响。本文以细胞密度、干重浓度、脂肪酸含量等为评价指标, 研究了户外跑道池系统中不同盐度 (20‰、25‰和 30‰)、pH 值 (7.5、8.0 和 8.5)、氮源种类 (尿素和碳酸氢铵) 等环境因素下三角褐指藻户外生长、脂肪酸积累的规律。结果表明, 随着培养基盐度的升高, 三角褐指藻的增长速率变缓, 在 20‰盐度条件下获得最大生物量 177.78 mg/L; 在 30‰盐度条件下获得最大脂肪酸含量 123.99 mg/g; pH 值 8.0 条件下, 三角褐指藻生物量浓度及脂肪酸含量均达到最大值 (166.39 mg/L 和 145.92 mg/g), 而在 pH 值 7.5 条件下, 三角褐指藻的生长受到抑制。尿素作为氮源较碳酸氢铵更有利于三角褐指藻的生长, 最终生物量为 150.83 mg/L, 但以碳酸氢铵为氮源条件下, 更利于脂肪酸的积累, 脂肪酸含量达到 169.72 mg/g。因此, 户外跑道池中的最适培养条件为盐度 20‰、pH 值 8.0、尿素为氮源。

关键词: 三角褐指藻; 环境因子; 氮源; 脂肪酸

文章编号: 1673-9078(2018)01-168-175

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.1.026

Culture Condition Optimization for the Growth of *Phaeodactylum tricornutum* and Accumulation of Fatty Acid of under Outdoor Environment

SONG Pei-qin, LIU Lu, WEI Dong

(School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The content of fatty acids in microalgae was directly related to its application value, and the the environmental factors had a significant effect on the content of fatty acids in microalgae. In this study, cell density, dry weight concentration and fatty acid content were used as the evaluation indexes to investigate the rules of outdoor growth and fatty acid accumulation of *Phaeodactylum tricornutum* under different environmental factors such as salinity (20‰, 25‰, 30‰), pH value (7.5, 8.0, 8.5) and nitrogen source (urea, ammonium bicarbonate). The results showed that the growth rate of *P. tricornutum* slowed down with the increase of salinity in culture medium. The maximum biomass (177.78 mg/g) was obtained under the condition of 20‰ salinity and the maximum fatty acid content was 123.99 mg/g under the condition of 30‰ salinity. In addition, the biomass and fatty acid content of *P. tricornutum* reached the maximum (166.39 mg/L and 145.92 mg/g, respectively) at pH 8.0, and the growth of *P. tricornutum* was inhibited at pH 7.5. The urea, used as nitrogen source, was more suitable than ammonium bicarbonate for the growth of *P. tricornutum* and the final biomass was 150.83 mg/L. Compared to urea, the ammonium bicarbonate was more advantageous for the accumulation of fatty acid, and the fatty acid content was 169.72 mg/g. Consequently, the optimum conditions for *P. tricornutum* were as follows: salinity, 20‰; pH, 8.0; , nitrogen source ,urea.

Key words: *Phaeodactylum tricornutum*; environmental factors; nitrogen sources; fatty acid

收稿日期: 2017-06-17

基金项目: 广东省公益研究与能力建设项目 (2015A020216003、2016A010105001); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项 (A201401C01) 资助; 国家自然科学基金项目 (31370383); 广州市科技计划项目产学研协同创新重大专项 (201704030084)

作者简介: 宋培钦 (1991-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 微藻生物技术

通讯作者: 魏东 (1966-), 男, 教授、博士生导师, 研究方向: 工业生物技术

海洋微藻作为食物链的初级生产者,具有种类丰富、产油量较高及繁殖较快等特点,在海洋生态系统的能量流动及物质循环中扮演着重要的角色。海洋微藻含有大量高价值的天然活性物质,如抗生素、类胡萝卜素、虾青素、藻红蛋白,及不饱和脂肪酸 EPA(二十碳五烯酸)、DHA(二十二碳六烯酸)等,在水产养殖业中,海洋微藻是鱼虾的重要饵料之一。近年来海洋微藻备受研究者的青睐,已被广泛应用于食品、医药、环境修复和生物能源等多个领域中。

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)是一种海洋真核单细胞藻,在分类上隶属于硅藻门、羽纹纲、褐指藻目、褐指藻科。通常情况下,三角褐指藻存在三种形态,梭形、卵形和三出放射形。在不同的条件下,三种形态间可以相互转换,在正常培养条件,多以三放出型和梭型为主^[1]。三角褐指藻对环境的适应性较强,并且生长速率较快,易于室内或户外规模化培养。三角褐指藻脂肪酸含量非常丰富,其中 EPA 可占到总脂肪酸含量的 30%以上^[2]。近年来,大量研究表明,二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)不仅具有抗单核细胞募集、抗炎、抗血栓、调节血脂水平和抗动脉粥样硬化等作用^[3],对于乳腺癌的治疗方面也可达到显著的效果^[4]。在水产养殖上,通常在动物的饵料中添加这些物质用来强化饵料,提高投喂动物的生长速度和存活率^[5]。微藻养殖方法和反应器很多,如:跑道池、光生物反应器和发酵罐等。和其他培养模式相比,跑道池易于排氧及规模化,迄今为止 90%的微藻商业化养殖,均采用跑道池^[6]。本文选取三角褐指藻为实验对象,探讨在户外跑道池条件下,盐度、pH 值和氮源种类对三角褐指藻生长情况及脂肪酸含量的影响,获得优化培养条件,以期今后三角褐指藻的户外大规模培养提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 藻种与培养方法

三角褐指藻(CCMP2561)由中国科学院水生生物研究所胡晗华研究员惠赠,藻种用 f/2 人工海水培养基进行斜面保种,保存温度 4℃。

1.2 实验试剂及仪器

标准品十九碳饱和酸(C19:0,纯度>99%)购于美国 Sigma 公司;正己烷、甲醇为色谱纯试剂;二氯甲烷、磷酸二氢钠、硅酸钠等为分析纯试剂;Instant Ocean 海盐购自 Marineland;盐度计(ATC)购自上海淋誉贸易有限公司;笔式 pH 计(MT-8062)购自

Exact Instrument;可见分光光度计(721)购自上海佑科仪器仪表有限公司;生物显微镜(PH100)购自中国江西凤凰光学集团公司;电子天平(BS224S)购自 Sartorius;冷冻干燥机(Modulyod)购自 Thermor Eletron Corporation;气相质谱联用仪(6890-5975i);高速离心机(TDL-4013)购自上海安享科学仪器厂;光照强度测定仪(1339R)购自 TaiWan。

1.3 实验方法

1.3.1 培养条件



图 1 开放池和超滤采收装置

Fig.1 open pool and ultrafiltration recovery unit

三角褐指藻的实验室阶段培养主要包括培养基配制、扩种以及在实验室人工光源条件下连续培养。三角褐指藻种子液的培养分三步进行,首先在 250 mL 的锥形瓶培养至指数期,然后转移到 3 L 的锥形瓶,最后扩种到 18 L 的蓝盖瓶中培养。三角褐指藻的培养采用 f/2 人工海水培养基^[7](表 1 和 2)。海水利用人工海盐(Reef Crystals®, Instant Ocean Corp., VA, USA)进行配置。培养温度 20±1℃,光照强度 4000±500 Lux。接种前要对培养基和培养器皿进行高温高压灭菌和消毒处理。当培养至大桶时,需每天保持连续光照并且不断通入空气进行并混合搅拌。

三角褐指藻户外培养阶段主要包括由一级池到三级池的户外培养以及采收工作,一级培养池及采收装置见图 1,(各级跑道池的底面积为:一级跑道 2.5 m²;二级跑道池 10 m²,三级跑道池 40 m²,各级跑道池的

培养水深均为 20 cm)。在户外培养过程中每级跑道池的起始接种密度要达到 OD₆₈₀ 在 0.2~0.3 之间, 接种时间一般选在早上光照不强的时间, 接种以及培养过程中添加的培养基均采用 f/2 人工海水培养基。户外培

养基用水为自来水, 配置培养基之前经过 0.5 μm 微孔滤膜过滤系统进行过滤, 并用 10⁻⁵ 的二氧化氯消毒。在每次使用培养池之前, 使用 5×10⁻⁵ 的二氧化氯对培养池进行消毒, 每次消毒时间 12 h。

表 1 f/2 培养基

Table 1 f/2 media

| Component | Stock Solution | Quantity | Molar Concentration in Final Medium |
|--|--------------------------|----------|-------------------------------------|
| NaNO ₃ | 75 g/L dH ₂ O | 1 mL | 8.82×10 ⁻⁴ M |
| NaH ₂ PO ₄ H ₂ O | 5 g/L dH ₂ O | 1 mL | 3.62×10 ⁻⁵ M |
| Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O | 30 g/L dH ₂ O | 1 mL | 1.06×10 ⁻⁴ M |
| trace metal solution | (see recipe below) | 1 mL | |

表 2 f/2 微量元素溶液

Table 2 f/2 Trace element Solution

| Component | Stock Solution | Quantity | Molar Concentration in Final Medium |
|--|-----------------------------|----------|-------------------------------------|
| FeCl ₃ 6H ₂ O | - | 3.15 g | 1.17×10 ⁻⁵ M |
| Na ₂ EDTA 2H ₂ O | - | 4.36 g | 1.17×10 ⁻⁵ M |
| CuSO ₄ 5H ₂ O | 9.8 g/L dH ₂ O | 1 mL | 3.93×10 ⁻⁸ M |
| Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O | 6.3 g/L dH ₂ O | 1 mL | 2.60×10 ⁻⁸ M |
| ZnSO ₄ 7H ₂ O | 22.0 g/L dH ₂ O | 1 mL | 7.65×10 ⁻⁸ M |
| CoCl ₂ 6H ₂ O | 10.0 g/L dH ₂ O | 1 mL | 4.20×10 ⁻⁸ M |
| MnCl ₂ 4H ₂ O | 180.0 g/L dH ₂ O | 1 mL | 9.10×10 ⁻⁷ M |

1.3.2 三角褐指藻生物量的测定与收获

三角褐指藻生物量的测定方法采用干重法和血球计数法。干重法: 吸取藻液 40 mL 置于已准确称量的 50 mL 康宁离心管中, 6000 r/min 离心 10 min, 所得藻泥用超纯水进行清洗后继续进行离心, 重复两次, 得到的藻泥进行冷冻干燥, 然后用分析天平称量干燥后藻粉的最终质量并计算差值。血球计数法: 在生物显微镜下, 通过血球计数板计数获得, 采用 25×16 的血球计数板, 计算公式如下:

细胞数/mL=(80 小格内的细胞数/80)×400×1000×稀释倍数

采收过程采用二级过滤采收模式, 首先藻液通过 20 μm 的预过滤装置除去藻液中较大的杂质, 再经过 0.5 μm 的微滤膜组件来浓缩藻液, 连续循环浓缩后达到预期浓度的藻液灌装后冷藏备用。

1.3.3 实验设计及处理

实验选用盐度、pH 值和氮源种类为主要影响因素, 浓度设计及氮源种类见表 3。

表 3 影响因素实验设计

Table 3 design of influence factor

| | 1 | 2 | 3 |
|------|-----|-----|-----|
| 盐度/‰ | 20 | 25 | 30 |
| pH | 7.5 | 8.0 | 8.5 |
| 氮源种类 | 尿素 | 碳铵 | - |

盐度优化实验在一级跑道池中进行。培养基采用 f/2 人工海水培养基 (氮、磷含量加倍); 碳铵为氮源; pH 值 8.0 (通过通入 CO₂ 控制 pH 恒定); 设置 A、B、C 三池, 盐度分别为 20‰、25‰和 30‰; 使用电机搅拌, 搅拌速率 80 rad/min。保持接种密度相同。

pH 优化实验在一级跑道池中进行。设置 A、B、C 三池, 在接种密度相同的条件下, 通过通入 CO₂ 分别控制培养基 pH 在 7.5、8.0 和 8.5; 培养基采用 f/2 人工海水培养基 (氮、磷含量加倍); 碳铵为氮源; 选取最优盐度 20‰; 使用电机搅拌, 搅拌速率 80 rad/min。

氮源优化实验在一级跑道池中进行。设置 A、B 两池, 采用 f/2 人工海水培养基 (氮、磷含量加倍), 分别以尿素和碳铵为氮源, 氮源浓度为 1.76 mmol/L; 选取最优盐度 20‰; 最优 pH 值 8.0; 使用电机搅拌, 搅拌速率 80 rad/min。

实验过程中, 通过跑道池、CO₂ 储气罐、pH 检测器和通气管道来维持 pH 值的恒定, 通气管道的一端与储气罐相连, 另一端伸入跑道池内的藻液中, 检测器具有一根浸没于藻液中的 pH 电极, 通过电极检测跑道池内的藻液 pH 值, 然后将测得的 pH 与检测器所设定的阈值相比较, 并形成阈值比较信号; 通气管道上具有电子通气控制器能够控制通气管道的气路通断, 电子通气控制器与检测器连接并可接收检测器的

阈值比较信号,并根据所接收的阈值比较信号控制电子通气控制器,从而实现 pH 值的稳定。优化周期均为 5 d,实验过程中,白天每隔两小时记录一次水温、pH 值和光照强度,时刻注意其生长状况。实验结束后,通过对细胞生长速度、细胞密度、细胞干重以及脂肪酸的积累情况进行分析对比,以确定户外高密度培养三角褐指藻的最适宜条件。

1.4 脂肪酸含量的测定

准确称取 10 mg 藻粉于 10 mL 螺口试管中,加入 100 μ L 内标液(1 g/L 十九烷酸二氯甲烷溶液),加入 2 mL 质量浓度为 40 g/L 的 KOH-CH₃OH 溶液,75 $^{\circ}$ C 水浴加热 15 min,冷却至室温后加入 2 mL BF₃-CH₃OH 溶液(体积比 1:4),再在 75 $^{\circ}$ C 水浴中加热 15 min,待冷却后加入 1 mL 饱和 NaCl 溶液和 2 mL 正己烷(色谱纯),涡旋 1 min 进行混匀,并在 4000 r/min 下离心 8 min,取上清液 1 mL 过 0.22 μ m 滤膜于进样瓶中。

在 Agilent 6890N GC-MS 上进行样品的脂肪酸含量测定,其中配备高效毛细管柱(DB-23, 30 mm \times 0.25 mm, 0.25 μ m)和 5975 内置型质量探测器。载气为高纯氦气,流速为 1 mL/min,样品分流比为 2:1,进样量为 0.2 μ L,质谱的质量扫描范围为 33~400 u。程序升温条件为:初始柱温 110 $^{\circ}$ C,保持 2 min,以 5 $^{\circ}$ C/min 升高至 220 $^{\circ}$ C 保持 5 min。各峰型的鉴定采用 NIST05a 谱库自动检索。根据各脂肪酸相对于 C19:0 内标的峰面积,计算出各脂肪酸组分的绝对含量。

1.5 数据统计

采用 Microcal Origin 8.5 Software 对数据进行处理和统计,实验数据均采用平均值 \pm 标准误差(mean \pm SD)给出(n=3)。采用 t 检验来确定各试验组之间差异, $p < 0.05$ 为显著差异。

2 结果与讨论

2.1 培养基盐度对三角褐指藻户外生长情况及脂肪酸含量的影响

盐度优化实验在一级跑道池中进行,培养期间白天平均最高光强为 12000 Lux,最低光强为 1500 Lux;跑道池藻液温度最高为 25 $^{\circ}$ C,最低为 22 $^{\circ}$ C。如图 2 所示,随着培养时间的变化,细胞密度和干重呈现出不断增长的趋势。随着培养液盐度的增加,细胞密度及干重的增长有显著性差异($p < 0.05$)。实验进行到第三天时,细胞进入对数生长期,细胞密度增长较快。

在第 5 d 时,20‰盐度下细胞密度及干重最大,分别达到 6.01×10^6 /mL, 177.78 mg/L; 25‰盐度次之,细胞密度为 3.85×10^6 /mL,干重为 165.93 mg/L; 30‰盐度下最低,细胞密度为 3.6×10^6 /mL,干重为 158.52 mg/L。

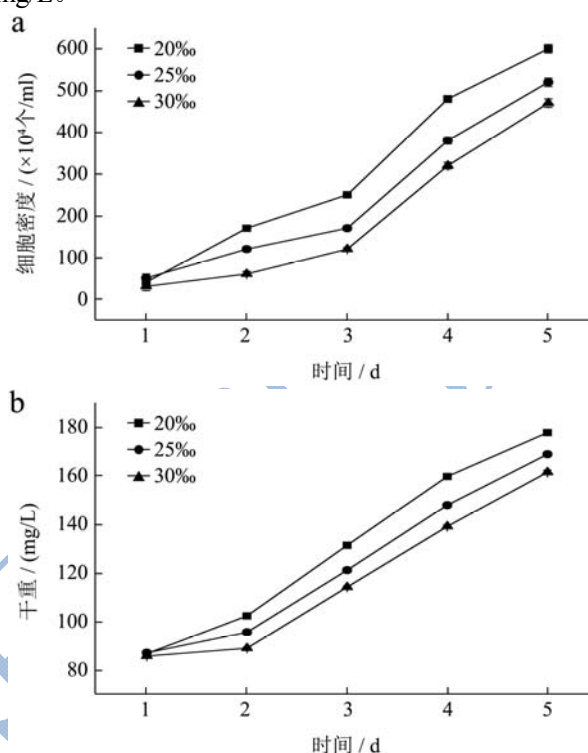


图 2 不同盐浓度下细胞密度 (a)、生物量浓度 (b) 的变化
Fig.2 Cell concentration(a) and dry biomass concentration (b) of *Phaeodactylum trirorutum* at different salinities

如图 3-a 所示,总脂肪酸含量随着培养时间的增加呈现出不断增长的趋势。在培养初期,随着盐度的升高,总脂含量呈现出下降的趋势。在培养至第 2 d 时,20‰盐度下的总脂含量最大,且不同盐度条件下,总脂肪酸含量有显著性差异($p < 0.05$)。培养至第 5 d 时,不同盐度条件下,总脂肪酸含量无显著性差异,在 30‰盐度条件下总脂肪酸含量达到最高,为 123.99 mg/g。如图 3-b 所示,在培养初期,随着盐度的升高,EPA 所占总脂肪酸比例呈现出先升高后下降的趋势。培养至第 5 d 时,不同盐度条件下,总脂肪酸组成中 EPA 含量无显著性差异,分别为 17.78%、17.33%和 17.09%。

三角褐指藻对盐度的适应范围较广,在 9‰~92‰的范围内都能生存,较高和较低浓度下,都不利于三角褐指藻的生长^[8]。盐度在一定程度上影响着藻类的渗透压、营养盐的吸收及其悬浮性。当藻细胞所处的海水盐度发生改变时,细胞的渗透压也随之改变,过高或过低的海水盐度都会对藻细胞造成伤害。陈峰等^[9]研究报道称脂类对微藻细胞膜的通透性起关键作

用,因此盐度的变化能影响许多微藻的脂质含量,种类和组成比例。叶丽等^[10]研究表明三角褐指藻紫外诱变株 MP-2 在盐度范围为 10~40‰下生长良好,最佳生长盐度为 25‰,高盐条件下(盐度高于 35),该藻的生长受到明显的抑制;但高盐有利于该藻总脂的积累。可能由于藻种及培养环境不同,本研究中三角褐指藻最适宜生长盐度 20‰。并且在 30‰盐度条件,总脂含量相对较高。Qiao H^[8]等研究称 EPA 含量随着盐度的变化,没有显著性差异这与本实验研究的结果相符合。

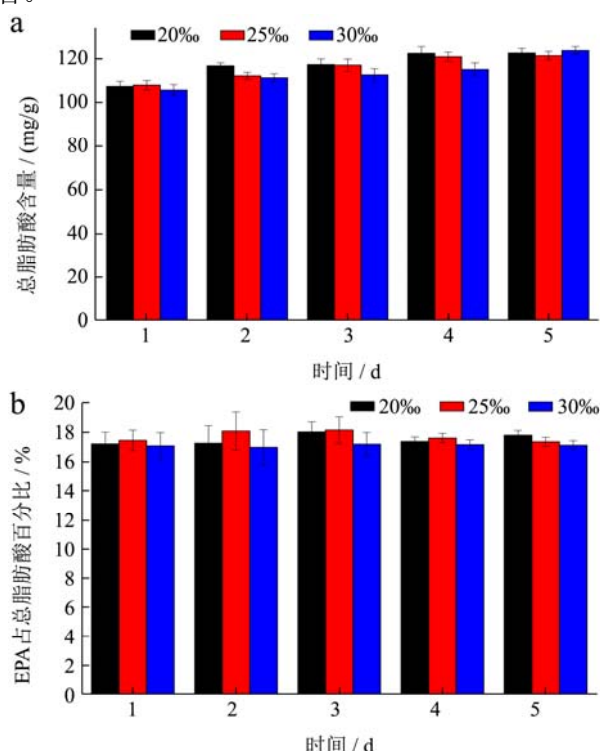


图3 不同盐度下脂肪酸总量(a)及EPA占总脂肪酸百分比(b)
Fig.3 Total fatty acid content (a) and EPA percentage of TFA (b) of *Phaeodactylum tricornutum* at different salinities

综上所述,盐度为 20‰不仅有利于三角褐指藻的生长,更适合于脂肪酸的积累,并且总脂肪酸组成中 EPA 所占的比例也相对较高。

2.2 培养基 pH 值对三角褐指藻户外生长情况及脂肪酸含量的影响

pH 值优化实验在一级跑道池中进行,培养期间白天平均最高光强为 35000 Lux,最低光强为 2000 Lux;培养基水温最高为 28 ℃,最低为 21 ℃。

从图 4 中可以看出,在起始两天内,不同 pH 条件下,细胞密度以及干重均呈现增长的趋势。从实验第 3 d 开始,三种 pH 值下的细胞密度及干重的增长速率发生了明显的变化,pH 值 8.0 下的细胞密度和干重

终细胞密度高达 5.8×10^6 /mL,干重为 166.39 mg/L,pH 值 8.5 条件下的细胞密度及干重量相对增长缓慢,最终达到 4.15×10^6 /mL,干重为 114.72 mg/L,此时而 pH 值为 7.5 条件下的细胞密度及干重则开始下降,最终降为 1.75×10^6 /mL,干重下降到 66.11 mg/L。通过图 5-a 可以看出,pH 值 8.0 以及 pH 值 8.5 条件下,随着培养时间的增加,总脂肪酸含量升高。三角褐指藻培养结束后,三种 pH 条件下,总脂肪酸含量差异较为显著 ($p < 0.05$),pH 值为 8.0 时三角褐指藻细胞的脂肪酸含量最高为 145.92 mg/g;pH 值为 8.5 的稍低,为 134.92 mg/g;pH 值 7.5 的脂肪酸含量最低,为 109.76 mg/g。如图 5-b 所示,不同 pH 条件下,EPA 占总脂肪酸的百分比也有显著性差异。培养至第五天时,pH 为 8.5 时,EPA 占总脂肪酸百分比最大,为 20.19%。

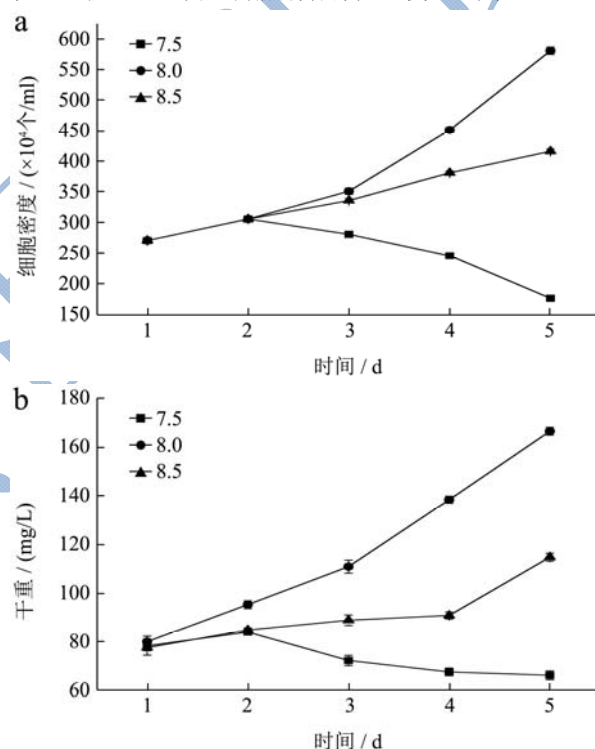
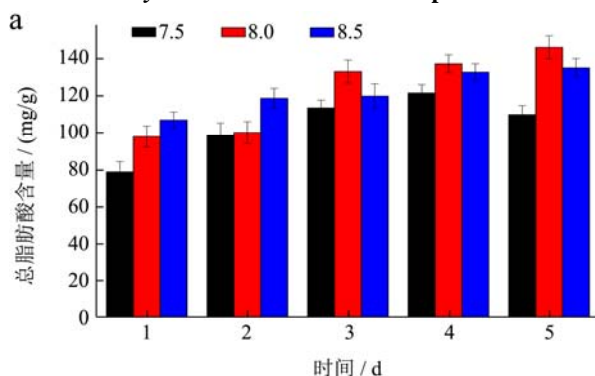


图4 不同 pH 条件下细胞密度(a)、生物量浓度(b)随时间的变化

Fig.4 Cell concentration(a) and dry biomass concentration (b) of *Phaeodactylum tricornutum* at different pH conditions



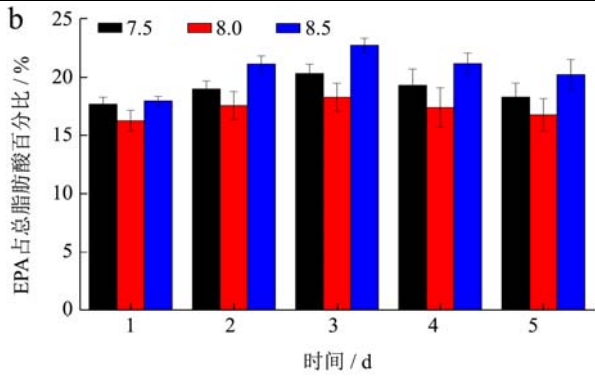


图5 不同 pH 条件下脂肪酸总量 (a) 及 EPA 占总脂肪酸百分比 (b)

Fig.5 Total fatty acid content (a) and EPA percentage of TFA (b) of *Phaeodactylum tricornutum* at different pH conditions

海洋微藻的最适 pH 值与海水相近约为 8.0, 但也具有藻种差异性。陈峰等^[11]研究指出 pH 值的变化会影响微藻细胞内外离子平衡、相关膜的结构组成、渗透压及藻细胞内相关酶的活性, 一旦偏离最适 pH 值, 微藻的生长及体内相关代谢活动会受抑制。吴伟伟等^[12]研究发现三角褐指藻的最适 pH 值是 8.5, 且与 pH 值 7.5 和 8.0 的差异性显著; 此外 pH 值在 6.0~10.0 条件下总脂含量呈现出先增加后下降的趋势, 在 8.0 条件下达到最大值; EPA 占总脂肪酸的比例在 7.5 和 8.5 条件下相对较高, 较 8.0 条件下差异性显著, 在 8.5 条件下达到最大值。Qiao H 等^[8]研究发现随着培养时间的增加单不饱和脂肪酸占总脂肪的比例逐渐下降, EPA 占总脂肪酸的百分比呈现出先升高后下降的趋势, 在指数期时增加, 在稳定期时开始下降。由于藻种的差异性及培养环境的不同, 本实验中三角褐指藻的最适生长 pH 值为 8.0, 并且在 7.5 条件下生长受到抑制; 总脂含量及 EPA 占总脂肪酸的比例均与之前的研究呈现出相同的变化规律。

由此可以看出, pH 值为 8.0 条件下更适合于三角褐指藻的生长; pH 值为 8.5 的条件下更有利于脂肪酸的积累, 并且总脂肪酸组成中 EPA 所占的比例也相对较高。

2.3 培养基中氮源种类对三角褐指藻户外生长情况及脂肪酸含量的影响

氮源种类优化实验在一级跑道池中进行, 培养期间白天平均最高光强为 30000 Lux, 最低光强为 2000 Lux; 培养基水温最高为 29 °C, 最低为 23 °C。不同氮源条件下, 起始接种细胞密度分别为尿素 1.9×10^6 /mL、碳酸氢铵 1.8×10^6 /mL。

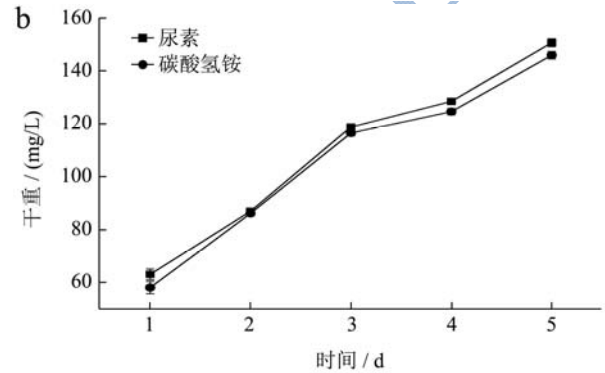
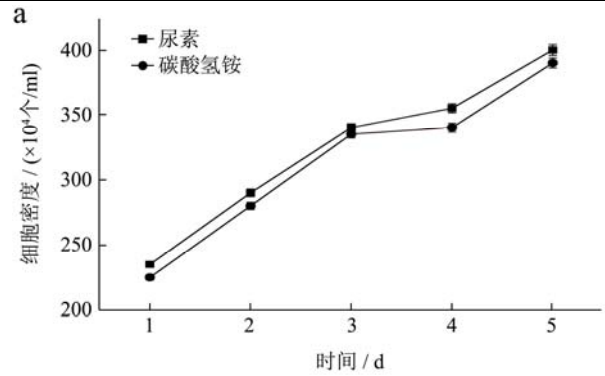


图6 不同氮源条件下细胞密度 (a)、生物量浓度 (b) 随时间的变化

Fig.6 Cell concentration(a) and dry biomass concentration (b) of *Phaeodactylum tricornutum* with different nitrogen sources

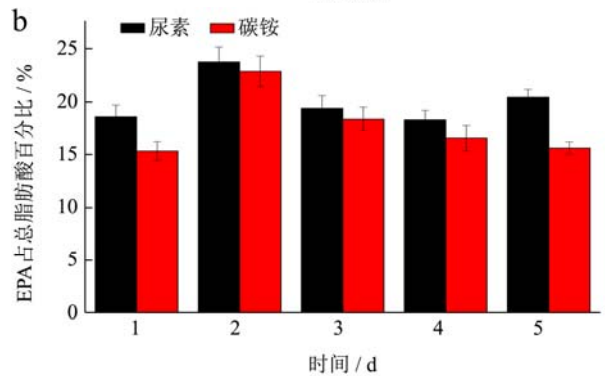
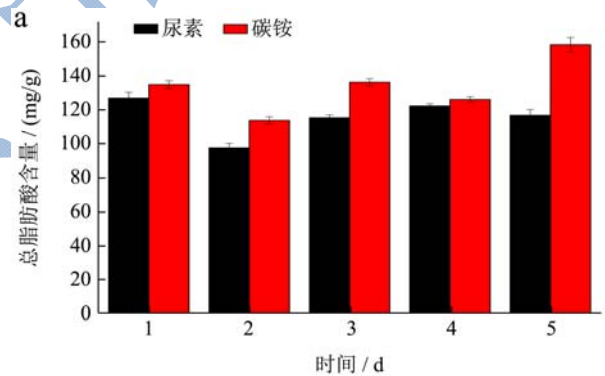


图7 不同氮源条件下脂肪酸总量 (a) 及 EPA 占总脂肪酸百分比 (b)

Fig.7 Total fatty acid content (a) and EPA percentage of TFA (b) in *Phaeodactylum tricornutum* with different nitrogen sources

培养结束后,最终细胞密度分别为 $4.0 \times 10^6/\text{mL}$ 和 $3.9 \times 10^6/\text{mL}$,生物量分别达到 150.83 mg/L 和 146.11 mg/L 。以尿素和碳酸氢铵这两种氮源培养三角褐指藻时,对其生物量的影响差异性显著 ($p < 0.05$)。

通过图 7-a 可以看出,培养结束后,当使用碳酸氢铵作为氮源时三角褐指藻细胞的脂肪酸含量最高为 169.72 mg/g ,尿素作为氮源时脂肪酸含量则相对较低,为 109.76 mg/g 。但通过图 7-b 可以看出,不同氮源条件下,总脂肪酸组成中 EPA 的含量均呈现出先升高后下降的趋势。在第二天时达到最大值,且不同氮源间无显著性差异;培养至第 5 d 时,尿素作为氮源其 EPA 的百分比要显著性高于碳铵,占总脂肪酸的 20.43%,碳铵为氮源时,其 EPA 含量相对较低,为 15.58%。

氮是微藻生长所必需的基本元素之一,同时也是构成藻体内蛋白质、核酸及色素的重要组成元素,对藻类的生长发育有着重要的作用。蒋汉明等^[13]以不同种类氮源(NH_4^+ 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、 NO_3^-)、不同氮源浓度(0、0.9、1.8、3.5、7.0 mmol/L)培养三角褐指藻,得出氮源浓度低于 1.8 mmol/L 时,以 NH_4^+ 为氮源时比生长速率最高, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 次之;氮浓度高于 3.5 mmol/L 时,以 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 为氮源比生长速率最高, NH_4^+ 次之;在氮浓度低于 3.5 mmol/L 时,以 NO_3^- 和 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 为氮源时 EPA 占总脂肪酸的比例相对较高,较 NH_4^+ 为氮源时差异性显著。张文源等^[14]以含氮量为 14.36 mmol/L 的硝酸钠、尿素、碳铵为氮源在不同培养基中培养三角褐指藻,得出尿素较适宜三角褐指藻的生长,且更有利于 EPA 的积累。Andreas^[15]等以 KNO_3 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 和 NH_4Cl 为氮源培养三角褐指藻,得出尿素为最佳氮源且更有利于 EPA 的积累。本实验以含氮量 1.76 mmol/L 的尿素、碳铵为氮源,得出尿素较适宜三角褐指藻的生长,且更有利于 EPA 的积累,但以碳铵为氮源时,更有利于脂肪酸的积累。这与大多数研究结果相符合。由此可以看出,以尿素为氮源时可以明显提高三角褐指藻的生物量及总脂肪酸组成中 EPA 的所占的比例,以碳铵作为氮源时则更有利于三角褐指藻脂肪酸的积累。

2.4 光暗周期对三角褐指藻脂肪酸组成和含量的影响

通过图 8 可以看出,一天中不同时刻总脂肪酸含量,及 EPA 占总脂肪酸的百分比均有较大差异。在上午 10 时,三角褐指藻中所积累的脂肪酸含量是最高的,为 136.15 mg/g 。而 EPA 占总脂肪酸含量的百分

比最高的时刻为 4 时~7 时,占总脂肪酸的 27.3%以上,10 时处 EPA 所占百分比也相对较高,占总脂肪酸的 26.91%。

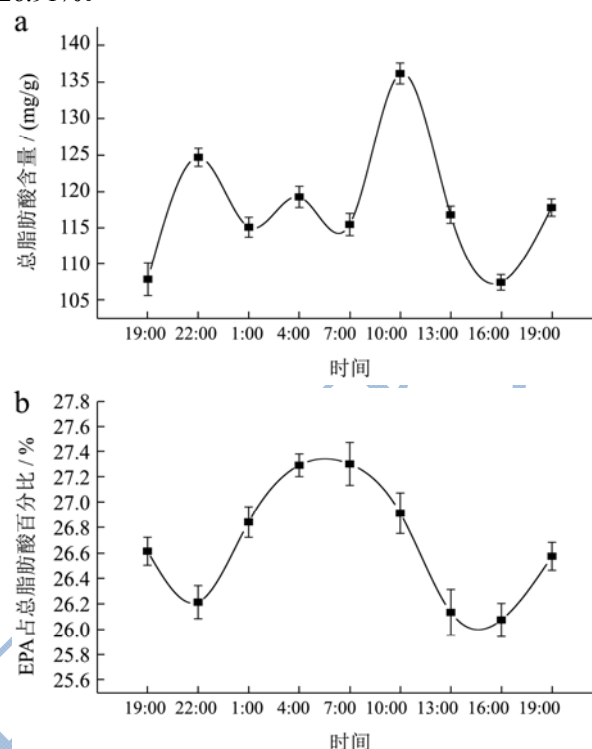


图 8 总脂肪酸含量 (a) 及 EPA 占总脂肪酸含量百分比 (b) 的昼夜变化规律

Fig.8 Diurnal variation of total fatty acid content (a) and EPA percentage of TFA (b) in *Phaeodactylum tricornutum*

由此可以看出,三角褐指藻积累脂肪酸的最佳时间为上午 10 时左右,并且此时 EPA 占总脂肪酸的百分比也相对较高,所以上午 10 时是三角褐指藻户外培养的最佳采收时间。

3 结论

本研究通过优化影响户外跑道池中三角褐指藻生长及脂肪酸含量的环境因素,得到户外培养三角褐指藻的最适条件,并建立了一整套完整的户外培养、采收设备及原位补碳-pH 在线控制专利技术。在户外跑道池规模化培养三角褐指藻时,选择 20‰盐度、pH 值 8.0 条件下,以尿素为氮源进行培养,不仅可以获得较大的生物量,同时可以得到含量较高的脂肪酸,且更有利于 EPA 的积累。此外,藻种采集的时间可以选择在上午 10 时左右进行,以获得最大生物量和脂肪酸含量。在今后的研究中,多个因素之间的交互作用,及交互作用下的最优水平,仍需要更深入的探究。

参考文献

- [1] Kim S M, Jung Y-J, Kwon O-N, et al. A potential commercial

- source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166(7): 1843-55
- [2] Santos-S Nchez N, Valadez-Blanco R, Hern Ndez-Carlos B, et al. Lipids rich in ω -3 polyunsaturated fatty acids from microalgae [J]. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 2016, 100(20): 8667-84
- [3] Mcmanus S, Aacuten, Tejera N, et al. Differential effects of EPA vs. DHA on postprandial vascular function and the plasma oxylin profile in men [J]. *Journal of Lipid Research*, 2016, 57(9): 1720-1727
- [4] Rendeiro C, Sheriff A, Bhattacharya T K, et al. Long-lasting impairments in adult neurogenesis, spatial learning and memory from a standard chemotherapy regimen used to treat breast cancer [J]. *Behavioural Brain Research*, 2016, 315: 10-22
- [5] Wu H, Li T, Wang G, et al. A comparative analysis of fatty acid composition and fucoxanthin content in six *Phaeodactylum tricornutum* strains from different origins [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2016, 34(2): 1-8
- [6] Norsker N-H, Barbosa M J, Vermu M H, et al. Microalgal production-a close look at the economics [J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(1): 24-7
- [7] Gullardr R. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates [M]. *Culture of marine invertebrate animals*. Springer, 1975
- [8] Qiao H, Cong C, Sun C, et al. Effect of culture conditions on growth, fatty acid composition and DHA/EPA ratio of *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Aquaculture*, 2016, 452: 311-7
- [9] Chen G Q, Jiang Y, Chen F. Salt-Induced alterations in lipid composition of diatom *Nitzschia Laevis* (Bacillariophyceae) under heterotrophic culture condition(1) [J]. *Journal of Phycology*, 2008, 44(5): 1309-14
- [10] 叶丽,蒋霞敏,毛欣欣,等.温,光,盐对三角褐指藻紫外诱变株生长,总脂及脂肪酸的影响[J].*生态学杂志*,2015, 34(2):454-62
YE Li, JIANG Xia-min, MAO Xin-xin, et al. Effects of temperature, light intensity and salinity on the growth, total lipid and fatty acid of *Phaeodactylum tricornutum* mutant [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2015, 34(2): 454-62
- [11] 陈峰,姜悦.微藻生物技术[M].北京:中国轻工业出版社,1999
CHEN Feng, JIANG Yue. Thematic technology of microalgae [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999
- [12] 吴伟伟.环境因子和抑制剂对三角褐指藻脂肪酸合成的影响[D].南京:南京农业大学,2012
WU Wei-wei. Effects of environmental factors and inhibitors on fatty acid synthesis of *Phaeodactylum tricornutum* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012
- [13] 蒋汉明,高坤山.氮源及其浓度对三角褐指藻生长和脂肪酸组成的影响[J].*水生生物学报*,2004,28(5):545-51
JIANG Han-ming, GAO Kun-shan. Effects of nitrogen source and its concentration on growth and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(5): 545-51
- [14] 张文源,高保燕,李爱芬,等.不同培养条件对三角褐指藻生长及其生物活性成分积累的影响[J].*海洋科学*,2016, 40(5):57-65
ZHANG Wen-yuan, GAO Bao-yan, LI Ai-fen, et al. Effects of different culture conditions on the growth and bioactivity constituents of *phaeodactylum tricornutum* [J]. *Marine Sciences*, 2016, 40(5): 57-65
- [15] Meiser A, Schmid-Staiger U, Trösch W. Optimization of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornutum* in the flat panel airlift (FPA) reactor [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2004, 16(3): 215-225