

营养盐对三角褐指藻脂肪酸含量与百分组成的影响

廖启斌, 李文权, 陈清花, 郑爱榕
(厦门大学海洋系、亚热带海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要: 通过对三角褐指藻分别在硅不足、维生素不足、氮不足、磷不足等不同营养盐条件下培养的对比试验, 发现随氮营养盐不足加剧, TPUFA 含量大幅度下降, 由对照组 42.13% 降至 29.86% (50%N) 和 20.17% (5%N), EPA 含量则由对照组 21.41% 降至 12.94% (50%N) 和 10.54% (5%N)。磷不足能导致 TFA 的增加和积累, 但 TPUFA (包括 EPA) 占总脂肪酸的百分比却呈现下降趋势。硅不足和维生素不足条件下, 三角褐指藻体内的 TPUFA 均有提高, 分别由 42.13% 升至 43.48% 和 45.86%。

关键词: 营养盐; 三角褐指藻; 脂肪酸; 影响

中图分类号: P734.4⁺; 0948.12 文献标识码: A 文章编号: 1007-6336(2000)02-0006-04

Effect of ultrasonic radiation on the fatty acid composition in *Phaeodactylum tricornutum*

LIAO Qi-bin, LI Wen-quan, CHEN Qing-hua, ZHENG Ai-rong

(Department of Oceanography, Institute of Subtropical Oceanography of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The variations in the fatty acids contents and composition in *P. tricornutum* were studied under nutrient (Si, Vitamine, N and P) starved culture conditions. In N-starved experiments, TPUFA contents decreased from 42.13% (controlled) to 29.86% (50%N) and 20.17% (5%N) and 10.54% (5%N), P-starvation will lead to the increase of total fatty acids (TFA), but the percentage of TPUFA tend to decrease. Si and Vitamine starvation will result in the increase of TPUFA (from 42.13% to 43.48% and 45.86%, respectively).

Key words: nutrients; *P. tricornutum*; fatty acids; effect

在海洋单胞藻营养成分中, 多不饱和脂肪酸(PUFA)是重要的生物活性物质, 除了可被利用生产高级营养保健品和抗心血管药物外, 生产鱼虾饵料添加剂也是极具开发潜力和高经济效益有应用前景的海洋蓝色产业之一^[1,2]。不同单胞藻多不饱和脂肪酸的成分与含量差距较大, 而且与环境条件密切相关。营养盐对微藻脂肪酸的百分组成起到了非常重要的作用, 本文旨在对硅、维生素、氮和磷几种营养盐对三角褐指藻脂肪酸含量和百分组成的影响进行探讨。

1 材料和方法

1.1 样品和试剂

实验所选用藻种为三角褐指藻 (*P. tricornutum*), 培养液采用 F/2 配方配制, 在 SPX-250 型生化培养箱中培养。光暗周期为 12 h/12 h, 温度恒定在 16°C, 每天振摇数次。脂肪酸标准样品购自美国 SIGMA 公司。

1.2 样品的水解和脂肪酸甲酯的制备

取 50 mL 实验藻液 (细胞密度 1.2×10^5 / mL), 加 0.3 mL 正十九酸内标液 (0.2 mg/

收稿日期: 1999-07-12, 修改稿收到日期: 1999-10-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870565) 和福建省自然科学基金资助项目 (C97006)

作者简介: 廖启斌 (1973-), 男, 福建宁化人, 助理研究员, 主要从事海洋有机化学研究。

mL), 过滤完毕置干燥器干燥后连同滤膜放入带螺帽的水解管内, 加入 2 mL CHCl₃-CH₃OH 混合液(体积比为 2:1), 充 N₂ 1 min 后密闭封口, 以 SCQ-250 型超声波清洗器(33 kHz, 250 W)超声萃取 30 min, 移出上清液, 重复 3~4 次(超声作用时间可缩短为 10 min), 合并萃取液, N₂ 浓缩吹干后, 加入 2 mol/L HCl-CH₃OH 溶液, 充 N₂ 后密闭(为确保气密性良好, 可先用聚四氟乙烯材料密封瓶口后再旋上螺帽拧紧)。于 100 °C 水浴中反应 40 min, 冷却后用 2 mL 正己烷分两次提取, 合并提取液于具塞离心管中, 用 N₂ 吹至 20~50 μL 供色谱分析用。

1.3 气相色谱分析

实验所用仪器为 SP-3420 型(北京分析仪器厂生产)气相色谱仪, 30 m×0.22 mm SE-54 弹性石英毛细管色谱柱(Australia International Sales), 程序升温分四个阶段进行, 第一段柱温为 50 °C 至 120 °C, 升温速率 20 °C/min, 于 120 °C 恒温 1 min; 第二段柱温为 120 °C 至 180 °C, 升温速率 6 °C/min, 于 180 °C 恒温 1 min; 第三段柱温为 180 °C 至 210 °C, 升温速率 6 °C/min, 于 210 °C 恒温 10 min; 第四段柱温为 210 °C 至 280 °C, 升温速率 3 °C/min, 于 280 °C 恒温 5 min。进样器

温度为 300 °C, 氢火焰离子化检测器(FID)温度为 300 °C, 载气为高纯 N₂, 柱头压为 0.42 MPa, 恒流控制, N₂ 流量 30 mL/min, H₂ 流量 30 mL/min, 空气流量 300 mL/min, 分流比 1:18 进样量 1 μL。海洋微藻脂肪酸的气相色谱定性和定量分析按文献[3]方法进行。

2 结果与讨论

取高温消毒过的 100 mL 小三角烧瓶 7 个, 编号为 D0~D6, 各加入 50 mL 刚扩大培养的三角褐指藻。D0 瓶作为对照组保持原 F/2 配方, 其余样品分别改变营养盐当中的某一项配方, 以使 D1 瓶硅酸盐为原配方的 5%(即 Na₂SiO₃·9H₂O 为 1 mg/L), D2 瓶维生素为原配方的 5%(即维生素 B₁ 为 0.005 mg/L, 维生素 B₁₂ 为 0.025 mg/L), D3 瓶氮营养盐为原配方的 50%(即 NaNO₃ 为 3.75 mg/L), D4 瓶氮营养盐为原配方的 5%(即 NaNO₃ 为 0.375 mg/L), D5 瓶磷营养盐为原配方的 5%(即 NaH₂PO₄ 为 0.25 mg/L), D6 瓶氮、磷营养盐均为原配方的 5%(即 NaNO₃ 为 0.375 mg/L、NaH₂PO₄ 为 0.25 mg/L)。以上藻液样品在生化培养箱中(16 °C)培养一周左右, 在对数生长期过滤采集样品, 按上述方法酯化测定, 结果见表 1。

表 1 营养盐对三角褐指藻脂肪酸百分组成影响

Tab. 1 Effect of nutrients on the fatty acid composition in *P. tricornutum* (% TFA^{*})

脂肪酸组分	样 品 编 号						
	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6
C14:0	8.19	7.81	8.07	10.06	5.86	6.24	5.50
C15:0	0.30	0.30	0.32	0.30	0.27	0.31	0.24
C16:4	2.47	2.70	3.18	2.28	2.36	1.38	1.75
C16:3	0.91	0.88	1.62	3.11	0.11	0.03	1.09
C16:2	10.00	9.83	10.20	6.02	1.36	4.44	2.26
C16:1	26.06	26.6	22.46	20.60	31.70	32.95	33.42
C16:0	15.50	15.5	15.59	26.14	28.88	20.24	23.90
C18:4	0.96	1.08	1.16	0.59	1.21	2.09	1.58
C18:3	1.47	1.33	1.44	1.08	1.59	1.68	1.56
C18:2	2.90	3.15	2.91	1.90	2.11	2.27	1.79
C18:1	6.07	4.72	5.98	4.14	8.53	10.37	10.36
C18:0	0.65	0.71	0.91	1.31	1.18	0.93	0.84
C20:4	0.84	0.85	1.06	1.20	0.32	0.48	0.32
C20:5	21.41	22.58	23.10	12.94	10.54	15.64	12.95
C20:1	1.10	0.88	0.81	7.59	3.42	0.43	1.74
C22:6	1.16	1.09	1.18	0.74	0.58	0.54	0.69
TSFA	24.64	24.32	24.89	37.81	36.19	27.72	30.48
TMUFA	33.23	32.2	29.25	32.34	43.64	43.75	45.52
TPUFA	42.13	43.48	45.86	29.86	20.17	28.54	24.00
TFA/%	5.612	5.869	5.484	4.626	5.28	10.16	8.131
K/d ⁻¹	0.089	0.092	0.09	0.088	0.054	0.064	0.053

* 注: TFA 为总脂肪酸; TSFA 为总饱和脂肪酸; TMUFA 为总单不饱和脂肪酸; TPUFA 为总多不饱和脂肪酸。K 为生长速率常数(d⁻¹), K=(lg N_t-lg N₀)/T, N₀ 为藻液初始细胞密度; N_t 为 T 时刻藻液细胞密度; T 为实验时间(d)。

由表1数据可知,硅营养不足会促进脂肪酸在三角褐指藻体内的积累,总脂肪酸含量由对照组的5.612%,上升至5.869%。维生素不足会导致总脂肪酸含量的下降,比对照组降低了0.128%。由生长速率常数 K 可知,硅营养不足和维生素不足条件下微藻的生长速率略有增大。硅和维生素不足能降低三角褐指藻体内的TSFA含量,但改变量较小,同对照组相比,分别降低了1.3%和1.0%。硅不足条件下,三角褐指藻体内的TMUFA略有降低,由对照组的33.23%,降至32.2%。在维生素不足条件下,TMUFA的含量下降至29.25%,改变量为11.97%。硅不足条件下,EPA含量略有上升,比对照组提高了5.46%,DHA含量却呈现下降趋势,比对照组降低了6.03%,C16:4、C18:4、C18:2三种不饱和脂肪酸均有不同程度的提高,比对照组分别提高了9.31%、12.5%、8.62%。TPUFA含量同对照组相比,提高了3.20%。在维生素不足条件下,EPA和DHA占总脂肪酸的百分比均呈现上升趋势,比对照组分别提高了7.91%和1.78%。C16:4、C16:3、C18:4三种不饱和脂肪酸得到较大幅度的提高,分别比对照组提高了28.86%、78.52%和21.01%。TPUFA百分含量由对照组的42.13%上升至45.86%。

一些研究结果表明,硅营养不足会促进脂肪酸在某些微藻体内积累,导致微藻体内脂肪酸增加^[4,5]。另有研究报道,在硅营养不足的情况下,藻体内乙酰辅酶A羧化酶(acetyl-CoA carboxybase)的活性增加了一倍,说明硅不足会激活该酶,从而促进脂肪在藻体内的合成^[6]。

由表1可知,氮不足会导致三角褐指藻总脂肪酸含量略有下降,而磷不足条件下,总脂肪酸含量却得到大幅度的提高,由对照组5.612%急剧上升至10.16%,提高近一倍。在营养盐中,氮的影响最为显著,比较各种营养盐不足对微藻生长的影响,氮不足是影响微藻生长速率最为重要的一个因素,氮营养盐的不足会导致微藻生长速率的急剧下降^[7]。由表1生长速率常数 K 数据可知,氮不足或磷

不足均会导致三角褐指藻生长速率下降,氮磷营养盐越不足,微藻生长速率降低越显著。

图1反映了不同氮营养盐条件下三角褐指藻脂肪酸百分含量的变化趋势。随培养液中氮浓度的增大,TSFA和TMUFA含量呈现下降趋势,TSFA由36.19%(5%N)降至

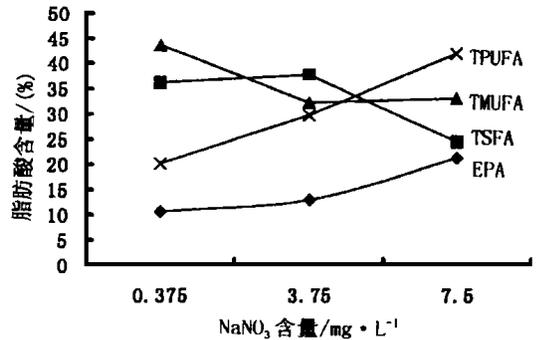


图1 不同氮营养盐条件下三角褐指藻脂肪酸百分含量的变化

Fig. 1 Variations of fatty acids in *P. tricornutum* with various contents of nitrate

24.64%(对照组),TMUFA则由43.64%(5%N)降至33.23%(对照组);TPUFA与前者呈现相反的变化趋势,随氮浓度的增大而呈现直线上升趋势,在5%N条件下,TPUFA含量仅为20.17%,50%条件下为29.86%,在原配方条件下其含量则高达42.13%。EPA含量也随氮浓度的增大而增大,对照组EPA含量是氮不足(5%N)条件下EPA含量的2.03倍,DHA的百分含量也随氮浓度的增大而增大,对照组DHA含量是氮不足(5%N)条件下DHA含量的2倍。

氮对微藻脂肪酸的百分组成起到了非常重要的作用^[8]。一些研究结果表明,氮不足会引起脂肪酸含量增加^[9]。但是有些微藻,包括绿藻和硅藻在氮营养不足的情况下脂肪酸含量并不增加,反映了这些藻类的代谢有所不同^[10]。Molina等^[11]也曾研究了不同氮营养盐条件下球等鞭金藻的脂肪酸含量变化,结果发现当氮营养盐(NaNO_3)从0.613 mg/L上升至9.8 mg/L时,PUFA和EPA的含量也随之升高。Reitan等^[12]曾对三角褐指藻等7种微藻在氮限制(5% μ_{max} ,50% μ_{max})条件下

脂肪酸含量变化, 结果发现, 随氮营养盐不足的加剧(由 50% μ_{\max} 降至 5% μ_{\max}), TPUFA 占总脂肪酸的百分比呈现下降趋势, TMUFA 百分比(主要是 C16:1 或 C18:1)却呈现上升趋势。三角褐指藻体内的 C16:3、C18:4、EPA、DHA 占总脂肪酸的百分比随氮营养盐不足的加剧而呈现下降的趋势。表明氮、磷营养盐是一些海洋微藻合成饱和脂肪酸必不可少的营养盐, 它们的不足会导致某些海洋微藻多不饱和脂肪酸含量的明显下降。

磷不足条件下(D5), 同对照组 D0 相比, 十八碳脂肪酸除 C18:2 以外, 其他均有不同程度的提高, 尤其是 C18:4 由 0.96% 上升至 2.09%, 十六碳多不饱和脂肪酸却均呈现明显的下降趋势, EPA 和 DHA 的百分含量也随营养盐中磷浓度的降低而降低, EPA 从 21.41% 降至 15.64%, DHA 则从 1.16% 降至 0.54%。磷营养盐不足条件下, TSFA 和 TMUFA 的含量均有不同程度的上升, TPUFA 却大幅度下降, 由 42.13% 降至 28.54%。氮营养盐和磷营养盐同时不足的条件(D6), EPA 百分含量进一步降低, 为 12.95%, DHA 含量则同 D4 (氮不足)、D5 (磷不足) 相近, 十八碳脂肪酸除 C18:2 外, 其含量均高于对照组, 但略低于 D5。同单一磷不足条件下三角褐指藻的脂肪酸含量相比, 氮磷营养盐同时不足, TSFA 和 TMUFA 进一步提高, 而 TPUFA 却进一步降低, 由 28.54% 降至 24.0%。

3 结 语

营养盐是影响海洋脂肪酸含量和百分组成最重要的环境因子之一。在各类营养盐中, 以氮的影响最为显著。在氮不足情况下, 三角褐指藻的生长速率和总脂肪酸含量有明显下降。随着氮不足的加剧, TPUFA 含量大幅度下降。磷不足会导致三角褐指藻总脂肪酸的增加和积累, 但 TPUFA (包括 EPA) 的含量却呈现下降趋势。硅不足和维生素不足都会使

三角褐指藻生长速率和 TPUFA 含量有所提高, 表明它们也是影响海洋微藻生长和生化组成的重要营养要素。

参考文献:

- [1] 于富才. 海洋动植物中生物活性物质的研究概况[J]. 海洋科学, 1994, 4:20-22.
- [2] 金 骏, 林美娇. 海藻利用与加工[M]. 北京: 科学出版社, 1993. 301-306.
- [3] 蔡阿根, 郑爱榕, 李文权, 等. 海洋微藻脂肪酸气相色谱分析[J]. 海洋技术, 1998, 17(4):64-68.
- [4] COOMBS J, DARLEY W M, HANSEN H O, et al. Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms: Chemical composition of *Navicula pelliculosa* during silicon-station synchrony[J]. Plant Physiol, 1967, 42: 1601-1606.
- [5] WERNER D. Die kieselure in stoffwechsel von *Cyclotella cryptica* Reimann, Lewin, und Guillard[J]. Arch Mikrobiol, 1996, 55: 278-308.
- [6] ROESSLER P G. Changes in the activities of various lipid and carbohydrate biosynthetic enzymes in the diatom *Cyclotella cryptica* in response to silicon deficiency[J]. Arch Biochem Biophys, 1988b, 226: 521-528.
- [7] SAKSHAUG E, ANDRESEN K, MYKLESTED S, et al. Nutrient status of phytoplankton communities in Norwegian waters (marine, brackish, and fresh) as revealed by their chemical composition[J]. J Plankton Res, 1983, 5: 175-196.
- [8] UTTING S D. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance[J]. Aquacult Engng, 1985, 4: 175-190.
- [9] SHIFRIN N S, CHISHOM S W. Phytoplankton lipids: interspecific difference and effects of nitrate-silicate light-dark cycles[J]. J Phycol, 1981, 17: 374-384.
- [10] 刘发义, 李荷芳, 吴贤汉, 等. 海洋微藻高度不饱和脂肪酸的研究和开发[A]. 中国药学会生化药物专业委员会, 等. 全国首届海洋生命活性物质与天然药物学术讨论会论文集[C]. 厦门: 中国药学会生化药物专业委员会等, 1996. 269-273.
- [11] MOLINA E M, PEREZ J A S, SANCHEZ J L G, et al. EPA from *Ischrysis galbana*, growth conditions and productivity[J]. Process Biochemistry, 1992, 27: 299-305.
- [12] REITAN K I, RAINUZZO J R, OLSEN Y. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae[J]. J Phycol, 1994, 30: 972-979.