

Fe 对眼点拟微球藻的生长和脂肪酸组成的影响

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: 研究了铁对眼点拟微球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 的生长和脂肪酸组成的影响。结果表明: Fe^{2+} 浓度在 0~0.5 mmol/L 的范围内, 细胞比增长率随 Fe^{2+} 浓度的升高而降低。与对照组相比, 随着 Fe^{2+} 浓度的升高, 细胞中主要的饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸占总脂肪酸的比例有所降低, 而多不饱和脂肪酸占总脂肪酸的比例则有较大的提高。另外, 在一定范围内 (0~0.3 mmol/L), Fe^{2+} 浓度的升高则会促使细胞内积累二十碳五烯酸 (EPA)。细胞生长和 EPA 积累的最适 Fe^{2+} 浓度是 0.05 mmol/L, 在这一浓度下细胞比增长速率为 $0.236 \pm 0.020 \text{ d}^{-1}$, 细胞中 EPA 质量分数比对照组提高约 24%。

关键词: Fe^{2+} 离子; 眼点拟微球藻 (*Nannochloropsis oculata*); 比增长率; 脂肪酸; 二十碳五烯酸 (EPA)

中图分类号: Q975, Q946

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)07-0093-04

二十碳五烯酸 (EPA) 是长链 n-3 系列多不饱和脂肪酸 (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^[1]: (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^[2]。(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^[3,4]。

眼点拟微球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 是一种重要的海洋经济微藻, 俗称“海洋小球藻” (Marine Chlorella)。它最突出的特点是生长快、耐受性好、富含二十碳五烯酸^[5]。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保健功能, 目前主要用作人类健康食品、药品和水产养殖动物的饵料^[5]。

已有研究证实 Fe^{2+} 能够促进海洋微藻的生长^[6-9], 但 Fe^{2+} 对细胞中脂肪酸组成情况尤其是 EPA 含量的影响, 目前研究得还不多, 因此很有必要做进一步的研究。本工作通过研究一系列 Fe^{2+} 浓度对细胞生长和脂肪酸组成的影响, 阐明它的作用规

律, 以期为更好地利用眼点拟微球藻生产高纯度 EPA 提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 藻种来源及其预培养

眼点拟微球藻 (*N. oculata*, CCMP 525), 购自美国 CCMP 藻种库。本实验采用 Provasoli 培养基 (Provasoli, 1968)^[10]。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

用无菌蒸馏水配制浓度为 50 mmol/L 的 FeSO_4 溶液。在 250 mL 无菌三角烧瓶中, 依次加入上述 FeSO_4 母液, 再加入 110 mL Provasoli 培养基和 40 mL 藻液, 接种后工作体积为 150 mL, 使 Fe^{2+} 终浓度分别为 0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mmol/L, 以不加 FeSO_4 的为对照。培养条件为: 光照强度为 4 000~5 000 Lux, 温度为 $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 光暗周期为 12 h/12 h。培养瓶随机放置, 每天至少摇动 4 次且每天倒换 1 次位置。8 d 后取上层清液测 A_{680} , 收集藻液制备藻粉。实验重复 2 次, 结果取

收稿日期: 2007-09-27; 修回日期: 2008-03-12

基金项目: 广东省科技攻关计划项目 (5006524); 广州市科技计划项目 (2005Z3E0331); 广东省自然科学基金项目 (20052050166)

作者简介: 吴瑞珊 (1982-), 女, 广东惠州人, 硕士研究生, 主要从事微藻生物技术与天然产物研究, 电话: 020-85296116, E-mail: sansan5202001@yahoo.com.cn. 魏东, 通讯作者, 副教授, E-mail: fewd304@scut.edu.cn

平均值。经统计分析后确定适合的 Fe^{2+} 浓度范围。

1.3 分析测试与计算

1.3.1 比生长速率

细胞比生长速率 μ 按下式计算: $\mu = (\ln X_2 - \ln X_1)/t$ 。式中, μ 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 A 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^[11]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 μ L 碳 19 脂肪酸(浓度为 1 μ g/ μ L) 作为内标物, 再加入 1 mL KOH-CH₃OH 饱和溶液, 迅速混匀, 于 75 $^{\circ}$ C 水浴中皂化、甲酯化 10 min, 冷却至室温后加入 2 mL 1 mol/L HCl-CH₃OH 溶液使 pH \leq 2, 振荡 1 min, 再于 75 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 保持 2 min, 再以 5 $^{\circ}$ C/min 升至 230 $^{\circ}$ C, 保持 8 min。进样口、检测器的温度分别为 230 $^{\circ}$ C 和 250 $^{\circ}$ C。以高纯氦为载气, 流速 1.0 mL/min, 进样量为 1 μ 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含量, 再根据每种脂肪酸相对于碳 19 内标的峰面积来计算各脂肪酸组分的百分含量(以占脂肪酸总量的百分比表示)。藻粉中 EPA 的含量可按下式计算:

$$EPA\% = \left[\frac{\text{总脂肪酸中 EPA 含量}}{\text{总脂肪酸中 } C_{19:0} \text{ 含量}} \times 50(\mu\text{g}) \times 10^{-3} \right] / [\text{藻粉干质量}(\text{mg})] \times 100\%$$

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^[12] 多重比较法。

2 结果与讨论

2.1 Fe^{2+} 浓度对细胞生长的影响

Fe^{2+} 浓度对细胞生长的影响见图 1。由图 1 可见, Fe^{2+} 浓度在实验范围内, 细胞比增长速率随 Fe^{2+} 浓度的升高而降低, 对照的比增长速率最高, 为 $0.250 \pm 0.018 d^{-1}$ 。最高 Fe^{2+} 浓度下的比增长速率却最低, 只有 $0.148 \pm 0.014 d^{-1}$ 。对不同 Fe^{2+} 浓度下的比增长速率进行多重比较, 结果表明对照与不同浓度处理间有极显著差异, 这说明 Fe^{2+} 浓度对比增长速率有极显著的影响。在 0~0.05 mmol/L 浓度

范围内, Fe^{2+} 对细胞生长起抑制作用。但很多研究证实 Fe^{2+} 能促进微藻细胞的生长, 如 William J. Henley 等^[6]的研究表明海洋聚球藻细胞的比增长速率主要由 Fe^{2+} 的绝对浓度控制。他们设计了 3.6~900 nmol/L 的 Fe^{2+} 浓度, 结果发现细胞的比增长速率随铁离子浓度的提高而增加, 但 90 nmol/L 以上的浓度下细胞比生长速率的增加即趋于平缓。John H. Martin 等^[7], 朱明远等^[8]分别报道了浓度为 nmol/L 数量级的 Fe 能促进处于 Fe 限制的浮游藻类生长, 说明极微量的 Fe 即已使环境达到 Fe 饱和, 而本实验设定的 Fe 浓度远超过了 nmol/L 数量级。在很小的 Fe 浓度下细胞比生长速率就已经达到最大值, 既使再提高浓度也表现不出对细胞生长的促进作用, 反而可能产生抑制作用。

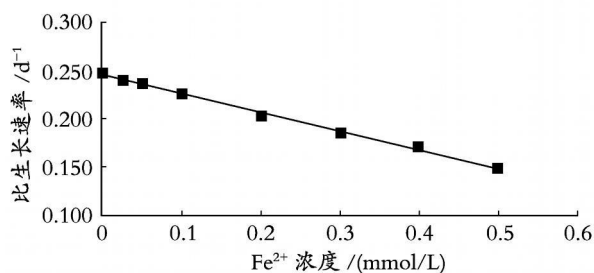


图 1 培养基中 Fe^{2+} 浓度对细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of ferrous ion concentration in media on cell growth

2.2 Fe^{2+} 浓度对脂肪酸组成的影响

培养基中 Fe^{2+} 浓度对脂肪酸组成的影响见表 1。由表 1 可见, 与对照相比, 随着 Fe^{2+} 浓度的升高, 16:0, 16:1n9, 18:1n9 和 18:1n7 在总脂肪酸中所占的比例都有所降低, 而 18:0, 20:4n6 和 20:5n3 的比例则有较大提高。在 0~0.3 mmol/L 的浓度范围内, EPA 干质量分数随 Fe^{2+} 浓度的增加而升高, Fe^{2+} 浓度从 0.025 mmol/L 上升到 0.05 mmol/L 时, EPA 含量增幅最多, 达 22.5%; 超过 0.3 mmol/L 则 EPA 含量呈下降趋势。

对不同 Fe^{2+} 浓度下的 EPA 含量进行多重比较, 结果显示与对照组之间、相互之间不存在显著差异。这说明 Fe^{2+} 浓度的升高虽不能显著提高眼点拟微球藻中 EPA 的含量, 但 Fe^{2+} 确有促进 EPA 形成的作用。综合考虑, Fe^{2+} 浓度在 0.05~0.1 mmol/L 之间为细胞生长和 EPA 积累的最适浓度, 过高的 Fe^{2+} 浓度容易使藻体大量沉淀而影响最终的生物量。

表 1 培养基中 Fe²⁺ 浓度对眼点拟微球藻脂肪酸组成的影响

Tab. 1 Effect of ferrous iron concentration in media on fatty acid composition of *Namochloropsis oculata*

c(Fe ²⁺) (mmol/L)	脂肪酸(%)							EPA 含量 (%)
	16: 0	16: 1n9	18: 0	18: 1n9	18: 1n7	20: 4n6	20: 5n3	
0	26.70±2.13	24.91±3.08	0.99±0.21	5.16±1.63	2.58±0.85	4.40±0.88	20.72±0.40	2.99±0.56
0.025	26.44±2.98	26.72±3.61	0.84±0.18	3.49±0.36	2.14±0.33	4.39±0.55	22.43±0.32	3.02±0.73
0.05	23.98±1.37	24.58±0.55	0.79±0.28	3.17±0.20	2.03±0.12	5.20±0.24	25.37±0.08	3.70±0.58
0.1	23.89±1.67	24.83±2.00	0.84±0.16	3.22±0.42	2.01±0.32	4.81±0.43	25.01±0.03	3.8±0.97
0.2	21.34±2.68	22.33±1.51	1.19	3.19±0.12	2.05±0.05	5.32±0.40	28.08±1.28	4.14±0.11
0.3	20.85±3.42	21.16±1.39	1.04±0.35	3.54±0.33	2.43±0.52	5.39±0.74	28.13±2.23	4.69±1.16
0.4	20.98±2.75	22.03±2.36	1.17	3.28±0.27	2.07±0.11	5.30±0.13	27.39±0.14	4.06±1.41
0.5	23.05±5.57	21.69±2.57	2.45±1.51	3.07±0.38	2.07±0.21	4.41±0.80	22.46±4.36	3.37±0.87

本实验结果显示 0~ 0.3 mmol/L 内 Fe²⁺ 浓度的升高会促使细胞内积累 EPA。Fe²⁺ 促进 EPA 积累的机理可能有以下几方面:

(1) 目前已知的脂肪酸去饱和酶都存在着 3 个保守的组氨酸簇, 它们与 Fe²⁺ 结合形成酶的活性中心^[4]。脂肪酸去饱和反应是个氧化反应, 二价铁离子是各种脂肪酸去饱和酶的辅基, 参与反应中的电子传递^[6]。Fe 能促进铁氧还蛋白的合成^[13]。Fe 能促进光合作用, 光照下光合电子传递链来的电子使铁氧还蛋白由氧化态转变为还原态, 在暗处光合作用产生的 NADPH 也能使铁氧还蛋白还原^[4]。充足的电子供体存在能保证去饱和反应的顺利进行。

(2) Fe²⁺ 能通过与其膜脂质的相互作用而使膜发生所谓的离子致密效应, 从而大幅升高膜从凝胶态到液态的相转变温度 (T_m)^[14], 膜的流动性因而降低, 这种情况可以刺激细胞中多不饱和脂肪酸的合成, 以恢复其原来的流动性。

(3) Fe²⁺ 是活性氧的发生器^[15], 而活性氧分子能参与某些不饱和键形成的反应。它可通过 Fenton 反应: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow OH^- + HO\cdot + Fe^{3+}$ 形成一种高活性的羟基自由基, 这种 HO· 以及其他各种活性氧分子(¹O₂、O₂⁻、H₂O₂、AO·²) 之间还可能因细胞内氧化还原电位的变化而发生互变^[16]。这些活性氧分子被证实可增进雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*) 细胞中类胡萝卜素的形成。多不饱和脂肪酸与类胡萝卜素都含有多个碳碳双键, 两者在结构上有相似之处。普遍认为过氧化物自由基(AO·²) 能把氢从膜脂上脱下来^[17], 故推测 Fe²⁺ 还可通过催化形成活性氧而增强脂肪酸的去饱和反应, 促进 EPA

的积累。但过量 Fe²⁺ 的加入却使细胞中 EPA 含量下降, 这种情况与雨生红球藻中过多亚甲基蓝(Methylene blue, ¹O₂ 的发生器) 的加入导致类胡萝卜素形成锐减的情况类似^[17], 可能活性氧分子浓度过高对细胞也会产生毒害作用, 从而降低细胞合成 EPA 的能力。

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>. 2006-09-11.

[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): 503-509.

[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(8): 42-46.

[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(7): 46-51.

[6] William J, Henley Y Y. Growth and photosynthesis of marine synechococcus (Cyanophyceae) under iron stress[J]. *Phycol*, 1998, 34: 94-103.

[7] John H, Martin R, Michael Gordon, et al. The case for iron[J]. *Limnol Oceanogr*, 1991, 36(8): 1793-1802.

[8] 朱明远, 牟学延, 李瑞香, 等. 铁对三角褐指藻生长、光合作用及生化组成的影响[J]. 海洋学报, 2000, 22(1): 110-116.

[9] 蒋汉明, 翟静, 张媛英, 等. 等鞭金藻生长和脂肪酸组成随 Fe³⁺ 浓度变化的研究[J]. 中国油脂, 2005, 30(8): 57-59.

[10] Provasoli L. Media and prospects of the cultivation of

- marine algae[M]. Jpn Soc Plant Physiol, 1968. 63-75.
- [11] Lepage G, Toy C. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction purification[J]. **J Lipid Res**, 1984, 25: 1 369-1 396.
- [12] 李春喜,姜丽娜,邵云,等,生物统计学[M](第三版). 北京:科学出版社.2005. 102-103.
- [13] McKay R M, Roche J L, Yakunin A F, *et al.* Accumulation of ferredoxin and flavodoxin in a marine diatom in response to Fe[J]. **J Phycol**, 1999, 35: 510-519.
- [14] Jeffrey R H, Williams E E. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment [J]. **Prog Lipid Res**, 1990, 29: 167-227.
- [15] Boyd P W, Watson A J, Law C S, *et al.* A mesoscale phytoplankton boom in the polar southern ocean stimulated by iron fertilization [J]. **Nature**, 2000, 407: 695-702.
- [16] Davey M, Geider R J. Impact of iron limitation on the photosynthetic apparatus of the diatom *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae) [J]. **JPhycol**, 2001, 37: 987-1 000.
- [17] Makio K, Toshihide K, Shiro N. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis* [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1993, 59(3): 867-873.

Effects of iron(II) concentration on growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata*

WU Rui-shan, WEI Dong

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

Received: Sep. , 27, 2007

Key words: Iron; *Nannochloropsis oculata*; specific growth rate; fatty acid; eicosapentaenoic acid (EPA)

Abstract: The effects of iron (II) concentration on cell growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* were investigated in this study. The cell specific growth rate(μ) decreases when ferrous ion concentration increases from 0 to 0.5 mM. With the increases of Fe^{2+} concentration, the contents of the main saturated fatty acid and monounsaturated fatty acid decreased when the content of polyunsaturated fatty acid increased. EPA accumulation was observed by means of ferrous ion at certain concentration ranged from 0 to 0.3 mM. 0.05 mM of ion concentration was optimal for cell growth and EPA accumulation. The cell specific growth rate was high up to $0.236 \pm 0.020 d^{-1}$, and the EPA content increased about 24% compared with the control.

(本文编辑: 康亦兼)