

# 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

张文源, 高保燕, 李爱芬, 张成武

(暨南大学 水生生物研究中心生态学系, 广州 510632)

**摘要:** 以三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)为研究材料, 比较了  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  和  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  为氮源的两种培养基(mL1 和 ASW 培养基)对其生长和生物活性成分(岩藻黄素、金藻昆布糖和二十碳五烯酸(C20: 5, EPA))时相积累的影响, 同时分析了脂肪酸组成和总脂含量的变化。结果表明: 以 mL1 培养基培养时, 三角褐指藻的生物质量浓度明显高于 ASW 培养基培养时的生物质量浓度, 尿素优于其他两种氮源, 最大生物质量浓度为 3.7 g/L。不同培养条件下岩藻黄素含量的时相变化规律一致, 均随着培养时间的延长呈现先增加后减少的趋势, 其最高积累量分别为: 13.27 mg/g ( $\text{NaNO}_3$ )、13.23 mg/g( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ )和 13.89 mg/g ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )(mL1); 13.2 mg/g ( $\text{NaNO}_3$ )、14.92 mg/g ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ )和 13.6 mg/g ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )(ASW), 由此可知氮源对岩藻黄素积累量影响不大。金藻昆布糖含量随着培养时间延长逐渐增加, 其最大积累量分别为 9.82 mg/g( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )(mL1)和 8.59 mg/g( $\text{NaNO}_3$ )(ASW)。不同培养条件下其总脂含量变化不显著, 均在培养末期达到最大值, 分别为 24.18%( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )(mL1)和 23.79%( $\text{NaNO}_3$ )(ASW); 其主要脂肪酸组成为: 豆蔻酸(C14: 0)、棕榈酸(C16: 0)、棕榈油酸(C16: 1)、硬脂酸(C18: 0)、油酸(C18: 1)、亚油酸(C18: 2)、花生一烯酸(C20: 1)、木焦油酸(C24: 0)和 EPA, 其中, EPA 含量随着培养时间延长逐渐下降, 尿素最有利于 EPA 的积累。

**关键词:** 三角褐指藻; 生物质量浓度; 岩藻黄素; 金藻昆布糖; 二十碳五烯酸

中图分类号: Q4.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2016)05-0057-09

doi: 10.11759/hyxx20150706002

近年来微藻培养受到越来越多的关注, 一方面是因为微藻来源丰富, 生长迅速; 另一方面是由于微藻具有生产高价值代谢产物的潜能, 且能通过改变培养条件以提高细胞内生物活性物质的含量。其中海洋微藻的利用较为成熟, 在保健食品、药物、饲料、化妆品、生物农药、废水治理等方面具有较广泛的应用前景<sup>[1]</sup>。而海洋微藻中种群数量最大的是硅藻, 其作为海洋生态系统的初级生产者, 生物多样性高, 生物量巨大, 占海洋初级生产量的 40%左右<sup>[2]</sup>, 是天然活性产物的潜在来源<sup>[3]</sup>。在海洋硅藻中, 三角褐指藻的研究较为广泛, 被认为是岩藻黄素、金藻昆布糖和二十碳五烯酸(EPA)等生物活性物质的潜在生产者。另外, 三角褐指藻可利用天然海水进行培养, 不会竞争淡水资源, 与其他硅藻相比三角褐指藻对硅的需求量较低, 使其更易成为商业化生产的原料<sup>[2]</sup>。

岩藻黄素属于类胡萝卜素中的叶黄素类, 是一种偏极性类胡萝卜素, 它可通过甲醇、乙醇及丙酮等有机溶剂提取, 再经过硅胶柱层析的纯化方法获得, 亦可通过  $\text{CO}_2$  超临界萃取的方法获得。研究表明岩藻黄素具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗肥胖和抗糖

尿病等多种生理活性<sup>[4]</sup>。目前已有不同类型的岩藻黄素营养保健品在市场中销售, 而天然的岩藻黄素主要来源于褐藻和硅藻。由于三角褐指藻能适应弱光强生长, 其细胞色素组成中岩藻黄素所占的比例较高, 因此, 它被认为是天然岩藻黄素的最佳来源。

金藻昆布糖是一类水溶性多糖, 主要由葡萄糖通过  $\beta$ -1, 3 糖苷键主链和少量的  $\beta$ -1, 6 糖苷键支链连接而成的葡聚糖<sup>[5]</sup>。研究表明金藻昆布糖是硅藻细胞

收稿日期: 2015-11-26; 修回日期: 2016-02-06

基金项目: 国家“863”项目(2013AA065805); 国家自然科学基金项目(31170337); 广东省低碳专项(2011-051); 珠海市科技重大项目(PB20041018); 珠海市科技攻关项目(PC20081008)

[Foundation: National High Technology Research and Development Program of China (863Program), No.2013AA065805; Natural Science Foundation of China, No.31170337; the Special Program for Low-Carbon, Reform and Development Commission of Guangdong Province, NO.2011-051; Scientific and Technological Key Program of Zhuhai, No.PB20041018; Scientific and Technological Project Zhuhai, No. PC20081008]

作者简介: 张文源(1990-), 女, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 主要从事海洋微藻生物活性物质的研究, E-mail: 13397085106@163.com; 张成武, 通信作者, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事微藻生物资源技术方面的研究, E-mail: tzhangcw@jnu.edu.cn

中主要的储存性碳水化合物, 它能为细胞代谢循环提供能量, 也能转变成其他有机化合物<sup>[6]</sup>, 比如氨基酸、葡萄糖等。Kusaikin 等<sup>[7]</sup>发现尖针杆藻(*Synettra acus*)中的金藻昆布糖具有明显的抗肿瘤活性。Chan 等<sup>[8]</sup>发现  $\beta$ -葡聚糖具有抗辐射、降血脂血糖等功效, 常被称作生物活性调节剂。

EPA 属于  $\omega$ -3 系列多不饱和脂肪酸, 为人体必需脂肪酸。EPA 已被证实具有多种生理功效, 可预防冠状动脉心血管疾病; 可降低甘油三酯的含量, 从而预防高甘油三酯血症; 可防止血小板凝集, 降低血液中胆固醇含量, 从而降低动脉硬化炎症和各种癌症的风险<sup>[9]</sup>。EPA 主要来源于鱼油, 但从鱼油中获取高纯度高含量的 EPA 面临一些问题, 因为其 EPA 含量明显低于 10%, 并混有其他多种脂肪酸<sup>[9]</sup>。而许多微藻富含 EPA, 其中三角褐指藻是 EPA 的一种潜在来源, 并具有两种优势, 一是三角褐指藻生长迅速, 二是三角褐指藻细胞中二十二碳六烯酸(DHA)和花生四烯酸(AA)的含量相对较低, 从而能大大增加 EPA 的回收率<sup>[10]</sup>。

因此, 本文以海洋硅藻三角褐指藻为研究材料, 比较以  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  和  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  为氮源的两种培养基对三角褐指藻生长及其细胞中岩藻黄素、金藻昆布糖和多不饱和脂肪酸积累的影响, 以期为探究三角褐指藻的最适生长条件和生物活性成分积累的最佳条件提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验藻种与培养基

本实验所用的三角褐指藻藻株来源于中国科学院海洋研究所, 于暨南大学水生生物研究中心微藻生物资源技术实验室保存。

### 1.2 培养条件与方法

对处于生长对数期的三角褐指藻进行接种培养。采用  $\phi 6 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$  的柱状光生物反应器进行通气培养, 搅拌气体为含 1% 二氧化碳的压缩空气, 通气速率为 0.3 vvm, 单侧连续光照, 光照强度为 4000~4500 lx, 培养温度为  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。初始接种密度控制在 0.4~0.6。

以  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  和  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  为氮源的 mL1 和 ASW 的培养基进行培养, 其中氮浓度设定为 14.36 mmol/L, 每种条件下设定 3 个平行, 连续培养 15 天。每天从各管反应器中取 10 mL 藻液, 用于生

物量测定; 每隔 3 天再取一定量的藻液, 3500 r/min 离心收集藻细胞, 冷冻干燥后获得冻干藻粉, 储存于  $-20^\circ\text{C}$  的冰箱中, 用于各生化组分含量测定。

### 1.3 生物质质量浓度测定

采用重量法。混合纤维滤膜(上海市新亚净化器件厂, 孔径  $0.45 \mu\text{m}$ , 尺寸 50mm)于  $106^\circ\text{C}$  电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司)中干燥过夜至恒重  $M_1$ , 每天各管均匀取样 10mL 藻液进行抽滤, 并用 0.5 mol/L 的甲酸铵进行洗涤, 测定抽滤后藻粉与滤膜总恒重值  $M_2$ , 则计算藻每天生物质质量浓度为  $(\text{g/L}) = 1000 \times (M_2 - M_1) / 10$ 。

### 1.4 岩藻黄素含量测定

采用有机溶剂提取法。取各条件下第 0、3、6、9、12 和 15 天的冻干藻粉, 精确称取 10 mg, 分别加入 5 mL 甲醇, 于  $4^\circ\text{C}$  黑暗条件下磁力搅拌提取 12 h, 3500 r/min 离心 5 min, 取上清经  $0.45 \mu\text{m}$  微空有机滤膜过滤。过滤后所得色素提取物进行高效液相色谱分析, 并与岩藻黄素标准曲线进行对照, 计算出各时相岩藻黄素的含量。

### 1.5 金藻昆布糖含量测定

采用苯酚-硫酸法。称取 50 mg 冻干藻粉, 加入 50 mmol/L 的稀硫酸 5 mL 于  $60^\circ\text{C}$  水浴提取 1h。提取物离心后收集上清, 提取后的藻渣再用蒸馏水洗涤 2 次, 合并上清定容于 50 mL 容量瓶中。从容量瓶中吸取 1 mL 样品, 加入 1 mL 苯酚(6%)和 5 mL 浓硫酸充分摇匀, 室温静置 30 min 后, 于 490 nm 下测定吸光度值。结合葡萄糖的标准曲线, 计算出金藻昆布糖含量。

### 1.6 脂肪酸组成分析

采用气相色谱-质谱法(GC-MS)测定。精确称取 25 mg 冻干藻粉, 加入 2 mL 2% 的硫酸甲醇甲苯溶液(90 : 10, v/v), 同时加入十七烷酸作为内标, 充氩气后, 置于  $80^\circ\text{C}$  恒温水浴锅中搅拌 1.5 h。反应结束后再在上述原位转甲酯化样品溶液中加入 1 mL 蒸馏水和 1 mL 正己烷, 3500 r/min 离心 3 min, 吸取上清至小瓶中, 吹干后再加入 200  $\mu\text{L}$  正己烷密封, 留存上样, 以测定脂肪酸组成及 EPA 的相对含量。

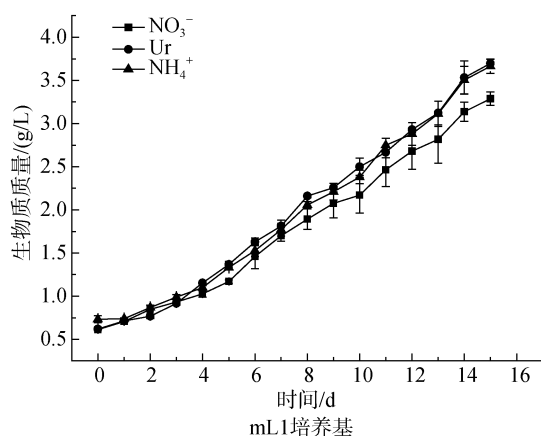
### 1.7 总脂含量的测定

总脂含量测定采用重量法。参考 Khozi-Goldberg I 等方法稍加修改。称取 80~100mg 冻干藻粉, 加入

2mL 二甲基亚砷-甲醇(1:9, v/v)混合溶液, 于 50°C 恒温水浴中磁力搅拌 1.5h, 再在冰浴中磁力搅拌 1.5 h, 3000 r/min 离心 5 min, 吸取上清至小玻璃瓶中。剩余藻渣再加入 4 mL 乙醚-正己烷溶液(1:1, v/v), 冰浴磁力搅拌 1.5 h, 3000 r/min 离心 5 min, 转移上清至上述对应小玻璃瓶中。以上操作重复一遍。在装有上清液的小玻璃瓶中加入 4 mL 蒸馏水以静置分层过夜。吸取上层相于离心管中, 3000 r/min 离心 5 min, 取上清于洁净干燥小瓶中, 吹干后用乙醚洗涤浓缩转移至预先称重的 EP 管中(管质量为  $m_1$ ), 用氮气吹至恒质量( $m_2$ )。得总脂含量(占藻粉干质量百分比, %)为:  $(m_2 - m_1) / \text{藻粉质量}$ 。

## 1.8 数据处理

运用 Excel 软件进行平均值及标准差值的计算。运用 origin 8.5 软件进行绘图。



## 2 结果与分析

### 2.1 不同氮源的 mL1 和 ASW 培养基对三角褐指藻生长的影响

为了测定不同氮源的 mL1 and ASW 培养基对三角褐指藻生长的影响, 在同一种氮浓度(14.36 mmol/L)下, 以生物质质量浓度为检测指标。得到的生长曲线如图 1 所示。由图 1 可知, 在 3 种形式氮源的 mL1 培养基和 ASW 培养基中, 三角褐指藻的生物质质量浓度均逐渐增加, 且尿素态氮和铵态氮的增长速率明显优于硝态氮, 最高生物质质量浓度均在第 15 天获得, 且均以尿素态氮条件下生物质质量浓度最高。mL1 培养基条件下最高生物质质量浓度为 3.7 g/L, ASW 培养基条件下最高生物质质量浓度为 3.3 g/L。

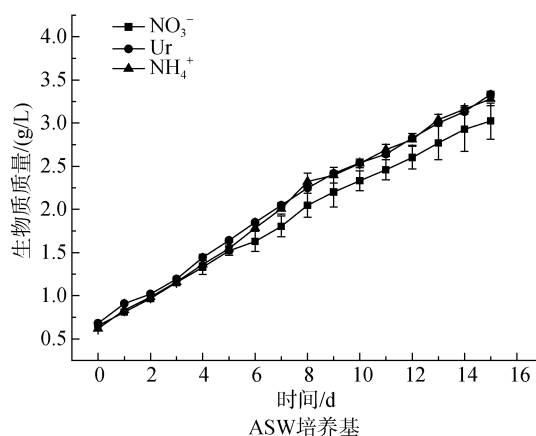


图 1 不同氮源的 mL1 和 ASW 培养基培养三角褐指藻时生物质质量浓度的时相变化

Fig. 1 Time-course changes in the biomass concentration of *Phaeodactylum trirorntutum* grown in mL1 or ASW media with different nitrogen sources

### 2.2 不同氮源的 mL1 和 ASW 培养基对三角褐指藻总脂积累的影响

图 2 所示为三角褐指藻在不同氮源的 mL1 和 ASW 培养基培养时油脂积累的时相变化。由图可知, 油脂积累量随着培养时间的延长呈现逐渐上升的趋势, 第 15 天达到最大值。在整个培养周期内, 油脂积累速率均比较平缓, mL1 培养基培养时油脂积累量略高于 ASW 培养基培养时油脂积累量, 其油脂最高积累量分别为 24.18%(mL1)和 23.79%(ASW)。同一种培养基不同氮源条件下油脂积累规律基本相同, 最大积累量相差不显著。

### 2.3 不同氮源的 mL1 和 ASW 培养基对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响

图 3 和图 4 分别显示了三角褐指藻在 mL1 和 ASW 培养基培养时主要色素组成及岩藻黄素的时相变化。由图可知, 三角褐指藻中的主要色素组成有岩藻黄素、硅甲藻黄素、叶绿素 a 及  $\beta$ -胡萝卜素等, 其中岩藻黄素含量最高。在 mL1 培养基中, 岩藻黄素含量随着培养时间的延长呈现先增加后减少的趋势, 在第 12 天达到最大积累量, 分别为: 13.27 mg/g ( $\text{NaNO}_3$ ), 13.23 mg/g ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ), 13.89 mg/g ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )。在 ASW 培养基中, 岩藻黄素呈现出相同的积累规律, 在第 9

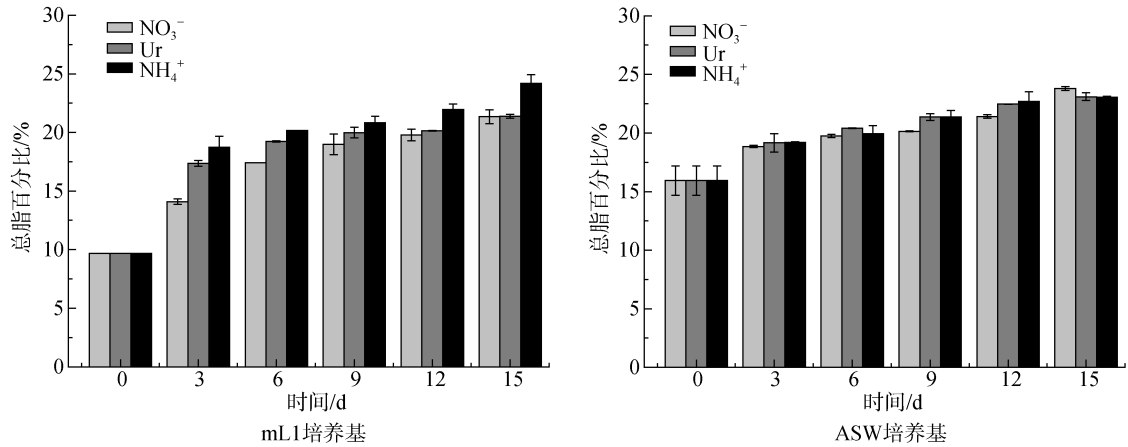


图2 不同氮源的 mL1 和 ASW 培养基培养三角褐指藻时总脂含量的时相变化

Fig. 2 Time-course changes in the total lipid content of *Phaeodactylum trirorutum* grown in mL1 or ASW media with different nitrogen sources

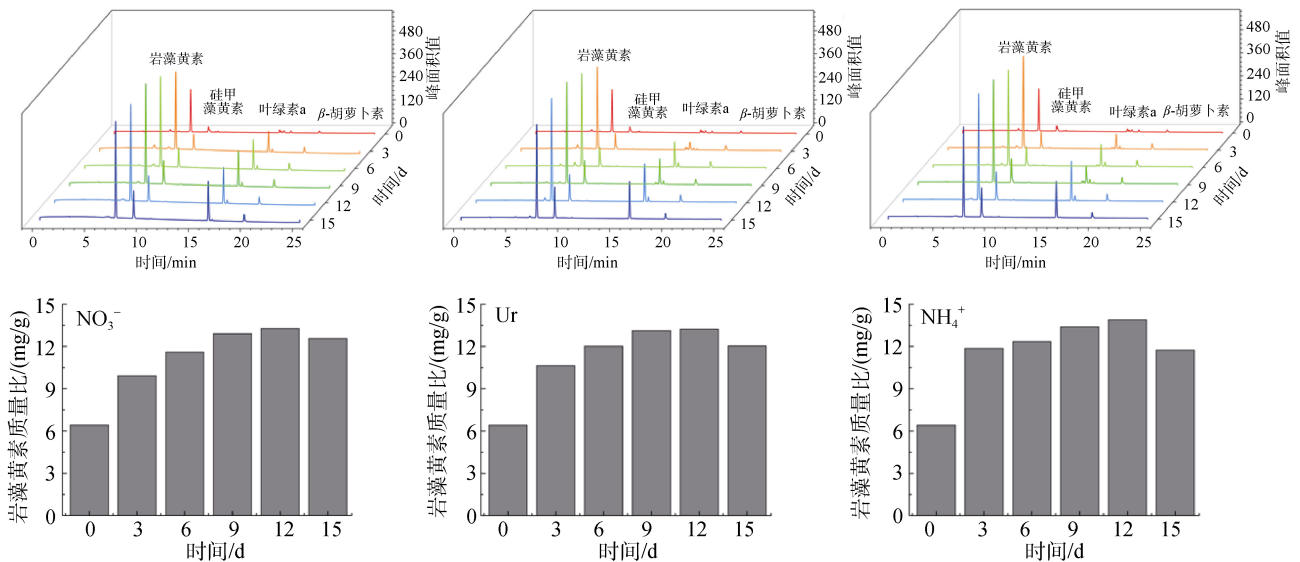


图3 不同氮源的 mL1 培养基培养三角褐指藻时岩藻黄素的时相变化

Fig. 3 Time-course changes in the pigment composition and fucoxanthin content of *Phaeodactylum trirorutum* grown in mL1 or ASA media with different nitrogen sources

天达到最大积累量, 分别为: 13.2 mg/g ( $\text{NaNO}_3$ )、14.92 mg/g( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ )、13.6 mg/g ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )。由此可知, 两种培养基对岩藻黄素的积累量影响不大, 3种氮源中尿素氮源更有利于岩藻黄素的积累。

#### 2.4 不同氮源的 mL1 和 ASW 培养基对三角褐指藻金藻昆布糖含量和单位体积产率的影响

金藻昆布糖是三角褐指藻中主要的储藏性碳水化合物。如图 5 所示, 培养基类型对金藻昆布糖的积累有一定的影响, 采用 mL1 培养基培养时金藻昆布糖的积累量更高, 最高达到 9.82%。3 种氮源对金藻

昆布糖的积累影响不显著, mL1 培养基中金藻昆布糖积累量分别为 8.25 mg/g ( $\text{NaNO}_3$ )、9.47 mg/g ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ )、9.82 mg/g ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), ASW 培养基中金藻昆布糖的积累量分别为: 8.59 mg/g ( $\text{NaNO}_3$ )、8.13 mg/g ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ )、7.73 mg/g( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )。

图 6 比较了不同培养条件下金藻昆布糖的单位体积产率。在 mL1 培养基中, 3 种氮源的最高单位体积产率分别为: 18.12 mg/(L·d), 23.37 mg/(L·d)和 23.97 mg/(L·d), 在 ASW 培养基中, 3 种氮源的最高单位体积产率分别为 17.3 mg/(L·d), 18.06 mg/(L·d)和 16.91 mg/(L·d)。

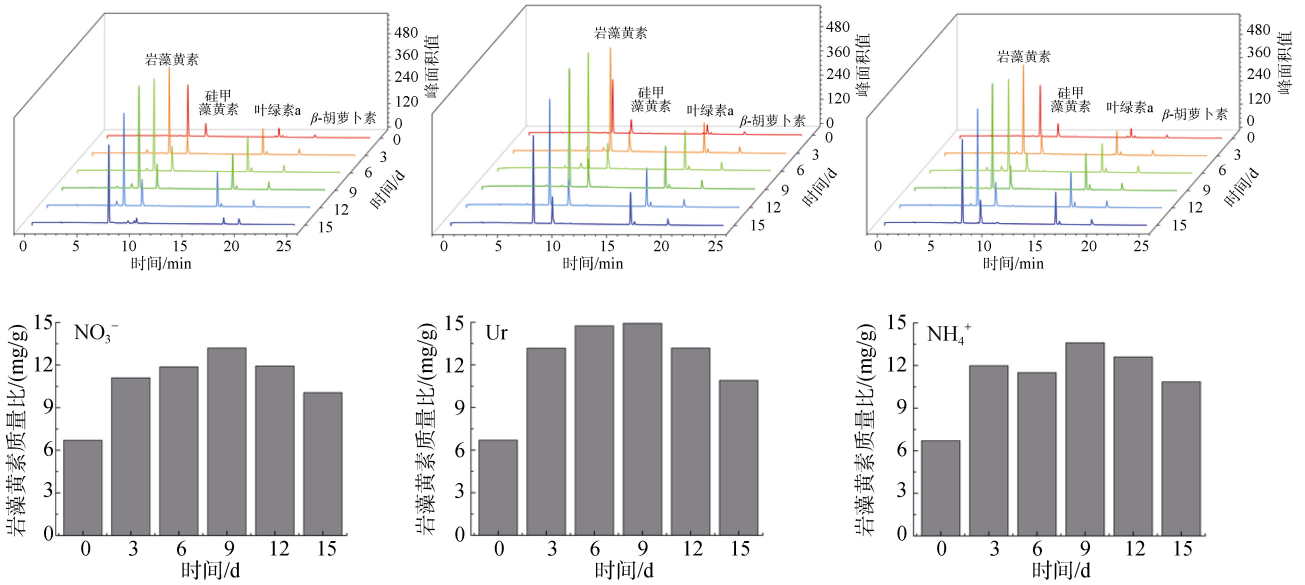


图4 不同氮源的 ASW 培养基培养三角褐指藻时岩藻黄素的时相变化

Fig. 4 Time-course changes in the pigment composition and fucocyanin content of *Phaeodactylum tricornutum* grown in 1 mL or ASW media with different nitrogen sources

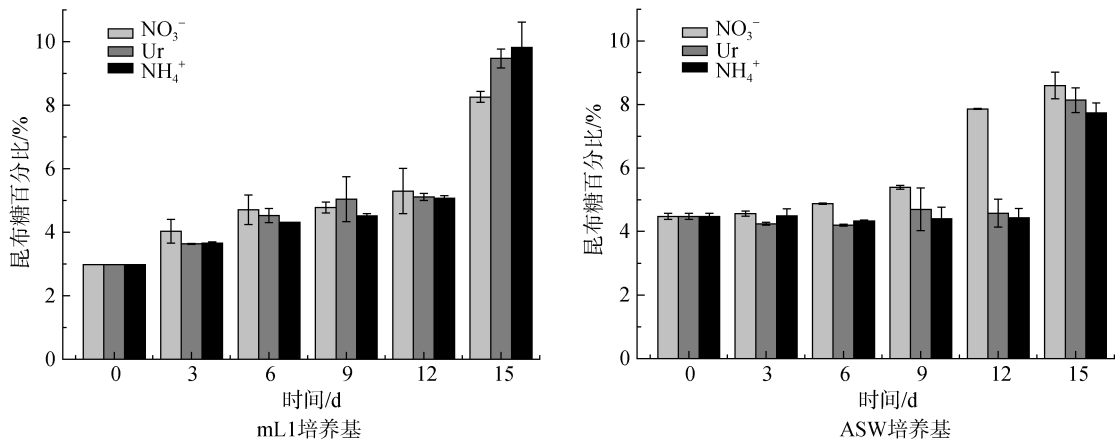


图5 不同氮源的 mL1 和 ASW 培养基培养三角褐指藻时金藻昆布糖含量的变化

Fig. 5 Time-course changes in the chrysolaminaran content of *Phaeodactylum tricornutum* grown in mL1 or ASW media with different nitrogen sources

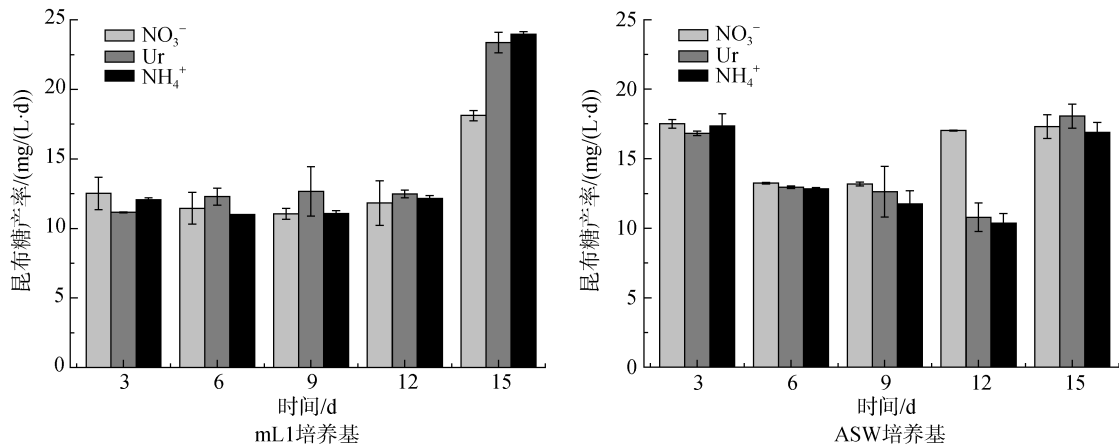


图6 不同氮源的 mL1 和 ASW 培养基培养三角褐指藻时金藻昆布糖的单位体积产率

Fig. 6 Volumetric production of chrysolaminaran by *Phaeodactylum tricornutum* grown in mL1 or ASW media with different nitrogen sources

### 2.5 不同氮源的 mL1 和 ASW 培养基对三角褐指藻脂肪酸组成的影响

图 7 所示为三角褐指藻在不同氮源的 mL1 和 ASW 培养基培养时脂肪酸的组成分析, 由图可知, 6 种培养条件下, 三角褐指藻的脂肪酸组成基本相同, 主要有豆蔻酸(C14: 0)、棕榈酸(C16: 0)、棕榈油酸

(C16: 1)、硬脂酸(C18: 0)、油酸(C18: 1)、亚油酸(C18: 2)、花生一烯酸(C20: 1)、木焦油酸(C24: 0)和二十碳五烯酸(C20: 5), 且从第 3 天到第 15 天, C16: 1、C18: 0、C24: 0 含量增加, C18: 1、C20: 5 含量减少, 其他脂肪酸含量变化不显著, 表明这两种培养基及 3 种不同氮源对脂肪酸组成的影响不大。

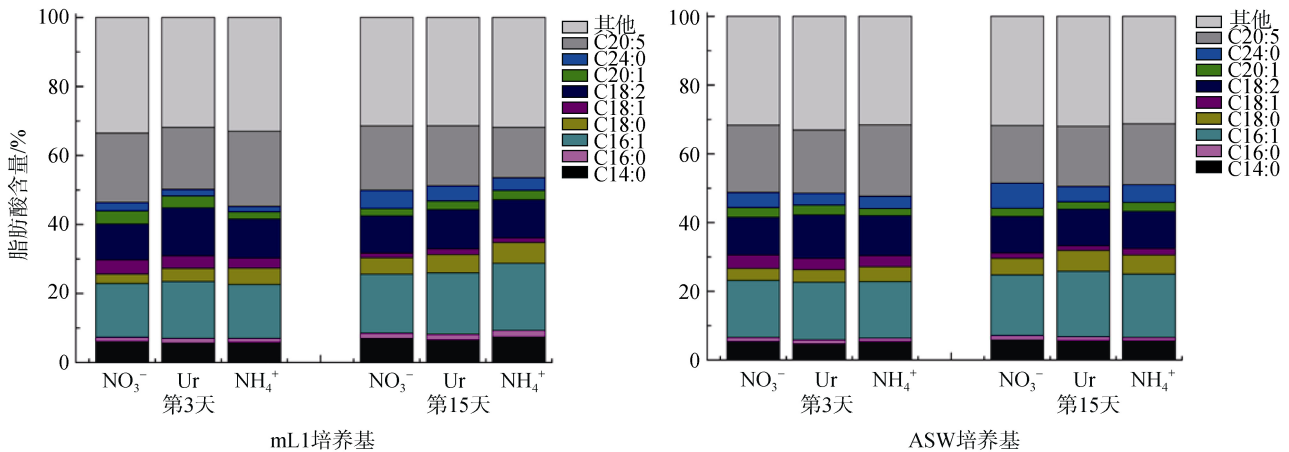


图 7 不同氮源的 mL1 和 ASW 培养基培养三角褐指藻的脂肪酸组成

Fig. 7 Fatty acid profiles of *Phaeodactylum tricornutum* on days 3 and 15 grown in mL1 or ASW media with different nitrogen sources

### 2.6 不同氮源的 mL1 和 ASW 培养基对三角褐指藻二十碳五烯酸含量和单位体积产率的影响

图 8 所示为三角褐指藻在两种培养基 3 种不同氮源条件下培养时二十碳五烯酸(EPA)含量的变化。由图 8 可知, 二十碳五烯酸含量随着培养时间延长而逐渐下降, 以铵氮为氮源 mL1 培养基培养时二十碳五烯酸(EPA)含量下降的最为显著, 由 22.14%下

降到 14.58%。而以尿素为氮源时, 二十碳五烯酸(EPA)含量由 19.97%下降至 17.45%, 因而最有利于 EPA 的积累。EPA 占总脂肪酸的最大比例为 22.14%。ASW 培养基条件下, 二十碳五烯酸(EPA)含量由 19.58% (NaNO<sub>3</sub>)、20.78%(CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)、20.77% (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 下降至 16.75% (NaNO<sub>3</sub>)、17.44% (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)、17.71% (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), EPA 占总脂肪酸的最大比例为 20.78%。

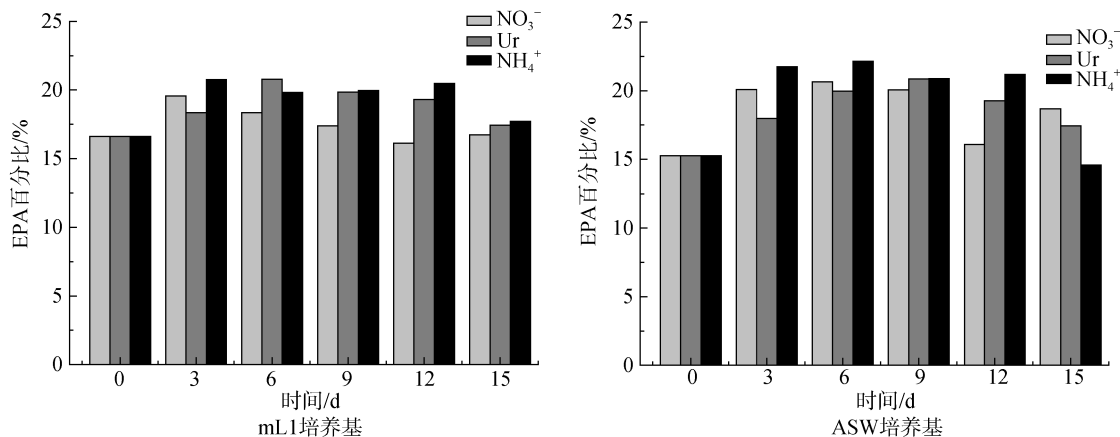


图 8 不同氮源的 mL1 和 ASW 培养基培养三角褐指藻时 EPA 含量的变化

Fig. 8 Time-course changes in the eicosapentaenoic acid (EPA) content of *Phaeodactylum tricornutum* grown in mL1 or ASW media with different nitrogen sources

3 种氮源的 mL1 培养基培养三角褐指藻时, EPA 的最大单位体积产率分别为: 2.56 mg/(L·d)(NaNO<sub>3</sub>), 2.31 mg/(L·d)(CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)和 2.77 mg/(L·d)(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)。另外, 3 种氮源的 ASW 培养基培养三角褐指藻时, EPA 的最大单位体积产率分别为: 2.98 mg/(L·d)(NaNO<sub>3</sub>),

3.09 mg/(L·d) (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)和 3.19 mg/(L·d)(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)。见图 9。

综上所述, 三角褐指藻分别在 mL1 和 ASW 培养基培养时, 二十碳五烯酸(EPA)的含量变化规律基本相同, 在以尿素为氮源时更有利于二十碳五烯酸(EPA)的积累。

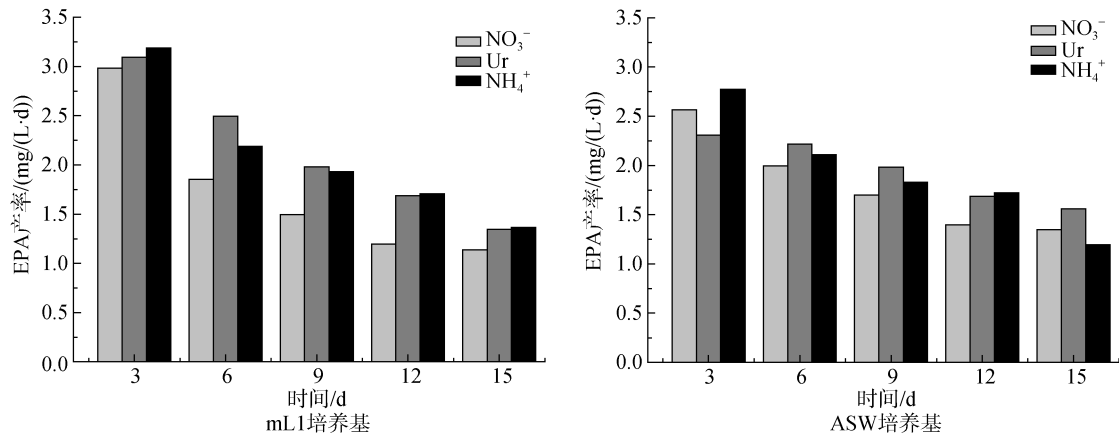


图 9 不同氮源的 mL1 和 ASW 培养基培养三角褐指藻时 EPA 的单位体积产率

Fig. 9 Volumetric production of eicosapentaenoic acid (EPA) by *Phaeodactylum tricornutum* grown in mL1 or ASW media with different nitrogen sources

### 3 讨论

藻类的生长、油脂和色素的积累、多糖含量的变化及脂肪酸组成与含量均受各种环境因子和营养因子的影响, 比如藻类的生长阶段<sup>[11]</sup>、培养基的组成<sup>[12]</sup>、光照和温度等, 氮源类型对微藻的生长、油脂和色素的积累及多糖含量与脂肪酸组成也有着较为显著的影响<sup>[13]</sup>。三角褐指藻在不同培养条件下的生长状况已广泛研究, 但均只比较其中的某一种活性物质(多为二十碳五烯酸)的差异变化。本实验比较了不同氮源、不同培养基对三角褐指藻的生长影响, 并同时研究了其对岩藻黄素、金藻昆布糖和二十碳五烯酸 3 种活性物质含量变化的影响。

培养基提供了藻类生长所需的各种营养元素<sup>[14]</sup>。mL1 培养基和 ASW 培养基均含有三角褐指藻生长所需的基本元素 N、P、S、Si 及 Zn、Cu、Co、Mn 等微量元素, 但部分元素浓度存在差异。mL1 培养基中, S 的浓度是 ASW 培养基的 10 倍, NaCl 的浓度相差不大, 有研究报道 NaCl 浓度增加不会抑制三角褐指藻的生长, 但会显著影响脂肪酸的组成, 当培养基中 NaCl 浓度增加时, EPA 含量也随之增加<sup>[15]</sup>。本实验的研究结果显示 mL1 培养基比 ASW 培养基更利于三角褐指藻的 EPA 积累。mL1 培养基和 ASW 培养基均添加了硅藻生长所需的维生素, 但 Droop

等<sup>[16]</sup>证实维生素对三角褐指藻中色素的积累没有特别的影响。色素的含量随着三角褐指藻的生长周期而发生变化<sup>[17]</sup>。mL1 培养基和 ASW 培养基对岩藻黄素的积累量影响不大, 且均随着培养时间的延长呈现先增加后减少的趋势, 进一步印证前人的研究。

与 mL1 培养基相比, ASW 培养基含有更少量的 Si 元素。但三角褐指藻在两种培养基中均能生长, 表明 Si 元素对三角褐指藻的生长不是必需的, 但添加适量的 Si 元素能更有利于其生长。Andreas 等<sup>[18]</sup>认为三角褐指藻虽是硅藻, 但对 Si 元素没有严格的需求, 而 Stigolsen 等<sup>[19]</sup>发现 Si 元素对硅藻假微型海链藻影响较大, 其能在淡水培养基生长, 只要添加了 Si 元素。与 mL1 培养基相比, ASW 培养基缺乏 Se、Ni、Cr 等微量元素, 表明这些微量元素对三角褐指藻的生长也有一定作用。

氮是微藻生长所必需的基本元素之一, 是构成藻体内蛋白质、核酸及色素的重要元素, 对藻类的生长发育有着重要的作用<sup>[20]</sup>。大量研究表明, 微藻能够利用多种不同形式的氮源供自身生长<sup>[21]</sup>。三角褐指藻能利用铵态氮、硝态氮、尿素态氮及其他无机氮源。Yongmanitchai 等<sup>[15]</sup>研究 NaNO<sub>3</sub>、CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 和 NH<sub>4</sub>Cl 对三角褐指藻生长和脂肪酸组成的影响, 得出以尿素为氮源进行培养时能得到最大生物量, 且

最利于二十碳五烯酸(EPA)的积累。Andreas 等<sup>[18]</sup>以  $\text{KNO}_3$ 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为氮源培养三角褐指藻, 得出尿素最佳氮源。本实验以  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  和  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  为 3 种不同氮源, 得出尿素为最适合三角褐指藻生长的氮源, 这与多数研究结果相符。通常, 微藻能够利用氨氮进行生长, 但随着  $\text{NH}_4^+$  被利用, 培养液的 pH 逐渐下降, 从而抑制了微藻的生长<sup>[22]</sup>。而硝氮被藻体吸收后, 转变成  $\text{NH}_4^+$ , 使培养液的 pH 增加, 从而不利于微藻的生长。以尿素为氮源时, 不会引起培养液 pH 的变动。另外从经济角度, 尿素氮源成本低, 且 1 摩尔尿素可提供 2 摩尔的 N 原子。

综上所述, (1)mL1 培养基与 ASW 培养基相比, 含有三角褐指藻培养所需的 Si 元素和 Se、Ni、Cr、V 等微量金属元素, 含有更高浓度的 S 元素, 因而更利于三角褐指藻的生长及金藻昆布糖、二十碳五烯酸(EPA)的积累, 但对总脂、岩藻黄素的积累影响不显著。(2)尿素态氮与硝态氮、铵态氮相比, 更利于三角褐指藻的生长、岩藻黄素和二十碳五烯酸的积累, 因此尿素为最佳氮源。但氮源类型对金藻昆布糖的积累影响较小。

#### 参考文献:

- [1] 高亚辉. 海洋微藻分类生态及生物活性物质研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2001, 40(2): 566-573.  
Gao Yahui. Studies on taxonomy, ecology and bioactive products of marine microalgae[J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 2001, 40(2): 566-573.
- [2] Benavides A M S, Torzillo G, Kopecký J, et al. Productivity and biochemical composition of Phaeodactylum tricornutum (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds[J]. Biomass and Bioenergy, 2013, 54: 115-122.
- [3] 周成旭, 田甜, 陈海敏, 等. 海洋微藻  $\beta$ -葡聚糖的生物活性分析[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(1): 66-72.  
Zhou Chengxu, Tian Tian, Chen Haimin, et al. Biatoactivities of  $\beta$ -glucan in six marine microalgae[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2014, 45(1): 66-72.
- [4] Peng J, Yuan J P, Wu C F, et al. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health[J]. Marine drugs, 2011, 9(10): 1806-1828.
- [5] Xia S, Wan L, Li A, et al. Effects of nutrients and light intensity on the growth and biochemical composition of a marine microalga *Odontella aurita*[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2013, 31: 1163-1173.
- [6] Myklestad S M. Production, Chemical Structure, Metabolism, and Biological Function of the (1 $\rightarrow$ 3)-Linked,  $\beta$ 3-D-Glucans in Diatoms[J]. Biological oceanography, 1989, 6(3-4): 313-326.
- [7] Kusaikin M I, Ermakova S P, Shevchenko N M, et al. Structural characteristics and antitumor activity of a new chrysolaminaran from the diatom alga *Synedra acus*[J]. Chemistry of natural compounds, 2010, 46(1): 1-4.
- [8] Chan G C, Chan W K, Sze D M. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells[J]. J Hematol Oncol, 2009, 2(25): 1-11.
- [9] Giménez A G, González M J I, Medina A R, et al. Downstream processing and purification of eicosapentaenoic (20: 5n-3) and arachidonic acids (20: 4n-6) from the microalga *Porphyridium cruentum*[J]. Bio-separation, 1998, 7(2): 89-99.
- [10] Yongmanitchai W, Ward O P. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid[J]. Phytochemistry, 1991, 30(9): 2963-2967.
- [11] Huerlimann R, De N R, Heimann K. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production[J]. Biotechnology and bioengineering, 2010, 107(2): 245-257.
- [12] Valenzuela-Espinoza E, Millán-Núñez R, Núñez-Cabrero F. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium[J]. Aquacultural Engineering, 2002, 25(4): 207-216.
- [13] Huang C C, Hung J J, Peng S H, et al. Cultivation of a thermo-tolerant microalga in an outdoor photobioreactor: influences of  $\text{CO}_2$  and nitrogen sources on the accelerated growth[J]. Bioresource technology, 2012, 112: 228-233.
- [14] Chisti Y. Biodiesel from microalgae[J]. Biotechnology advances, 2007, 25(3): 294-306.
- [15] Yongmanitchai W, Ward O P. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions[J]. Applied and environmental microbiology, 1991, 57(2): 419-425.
- [16] Droop M R. Optimum relative and actual ionic concentrations for growth of some euryhaline algae[J]. Verh Int Verein Theor, Angew Limnol, 1958, 13: 722-730.
- [17] Carreto J I, Catoggio J A. Variations in pigment contents of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* during growth[J]. Marine biology, 1976, 36(2): 105-112.
- [18] 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.
- [19] Olsen S, Paasche E. Variable kinetics of silicon-limited growth in *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) in response to changed chemical composition of the growth medium[J]. British phycological journal, 1986, 21(2): 183-190.



- [20] 胡章喜, 安时, 段舜山, 等. 不同氮原对布朗葡萄藻生长、总脂和总烃含量的影响[J]. 生态学报, 2009, 29(6): 3288-3294.  
Hu Zhangxi, An Min, Duan Shunshan, et al. Effects of nitrogen sources on the growth, contents of total lipids and total hydrocarbons of *Botryococcus braunii*[J]. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(6): 3288-3294.
- [21] Liang Y, Beardall J, Heraud P. Effects of nitrogen source and UV radiation on the growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae)[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2006, 82(3): 161-172.
- [22] 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): 545-551.  
Jiang Hanming, Gao Kunshan. Effects of nitrogen sources and concentrations on the growth and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2004, 28(5): 545-551.

## Effects of different culture conditions on growth and accumulation of bioactive compounds by *Phaeodactylum tricornutum*

ZHANG Wen-yuan, GAO Bao-yan, LI Ai-fen, ZHANG Cheng-wu

(Department of Ecology & Research Center for Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Received: Nov. 26, 2015

**Key words:** *Phaeodactylum tricornutum*; biomass concentration; fucoxanthin; chrysolaminaran; eicosapentaenoic acid

**Abstract:** In this study, the effects of mL1 and ASW media containing NaNO<sub>3</sub>, CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, or NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> on the growth and accumulation of bioactive compounds [fucoxanthin, chrysolaminaran, and eicosapentaenoic acid (EPA)] by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* were investigated; and the total lipid content and fatty acid composition were analyzed. The results showed that maximum biomass concentration in mL1 medium with urea as the nitrogen source was 3.7 g/L. Fucoxanthin content initially increased and then decreased during culture under different conditions, and the highest quantities that accumulated were 13.27 mg/g (NaNO<sub>3</sub>), 13.23 mg/g (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), and 13.89 mg/g (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) in mL1 medium and 13.2 mg/g (NaNO<sub>3</sub>), 14.92 mg/g (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), and 13.6 mg/g (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) in ASW medium, indicating that the nitrogen source had a weak effect on fucoxanthin accumulation. Chrysolaminaran content increased gradually during the culture period, and the highest contents were 9.82 mg/g (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) in mL1 and 8.59 mg/g (NaNO<sub>3</sub>) in ASW on day 15. The total lipid content changed slightly under the different conditions, and the maximum values were 24.18% (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) in mL1 and 23.79% (NaNO<sub>3</sub>) in ASW, which were observed during the stationary phase. The fatty acid profiles were myristic acid (C14: 0), palmitic acid (C16: 0), palmitoleic acid (C16: 1), stearic acid (C18: 0), oleic acid (C18: 1), linoleic acid (C18: 2), eicosaenoic acid (C20: 1), tetracosanoic acid (C24: 0), and EPA (C20: 5). The EPA content decreased gradually as culture time was extended. Urea was the optimal nitrogen source to accumulate EPA.

(本文编辑: 梁德海)