

Fe³⁺ 对三角褐指藻生长和脂肪酸组成的影响

蒋汉明¹, 张凤珍¹, 孙凌云¹, 翟 静¹, 顾洪雁¹, 张媛英¹, 高坤山²

(1.泰山医学院东校区基础部生化教研室, 山东 泰安 271000;

2.汕头大学海洋生物研究所, 广东 汕头 515063)

摘 要: 为了探讨培养基中 Fe³⁺ 浓度对微藻生长和脂肪酸的影响, 作者用含不同 Fe³⁺ 浓度的培养基对三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) 进行了培养, 并测定了其生长和脂肪酸组成。结果表明, Fe³⁺ 浓度为 0.5 μmol/L, 三角褐指藻生长缓慢, 比生长速率仅为 0.40/d, 但 C_{18:2(n-6)} 和 C_{18:3(n-6)} 占总脂肪酸的比例最高, 而 C_{20:5(n-3)} (eicosapentaenoic acid, EPA) 占总脂肪酸的比例最低。当 Fe³⁺ 浓度高于 24.5 μmol/L 时, 三角褐指藻的生长受到抑制, 但 EPA 和多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 占总脂肪酸的比例最高。随着 Fe³⁺ 浓度的增加, 三角褐指藻的 EPA 和 PUFAs 占干重的比例逐渐下降。

关键词: Fe³⁺; 三角褐指藻; 生长; 脂肪酸; EPA; PUFAs

Influences of Ferric Concentration on Growth and Fatty Acid Composition in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae)

JIANG Han-ming¹, ZHANG Feng-zhen¹, SUN Ling-yun¹, ZHAI Jing¹, GU Hong-yan¹,
ZHANG Yuan-ying¹, GAO Kun-shan²

(1.Staff of Biochemistry, Department of Basic Medicine, Taishan Medical College, Taian 271000, China;

2.Marine Biology Institute, Science Center, Shantou University, Shantou 515063, China)

Abstract: In order to study the effects of Fe³⁺ concentration on growth and fatty acid composition in microalgae, a marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*, was cultured in batch with varied Fe³⁺ concentrations. Its growth and fatty acid composition were examined. The results showed that *P. tricornutum* showed poor growth and the specific growth rate was 0.40/d in the medium with 0.5 μmol/L Fe³⁺. However, the fatty acids of C_{18:2(n-6)} and C_{18:3(n-6)} accounted for highest percentages of total fatty acids, and C_{20:5(n-3)} (eicosapentaenoic acid, EPA) occupied lowest proportion. Fe³⁺ overdose (> 24.5 μmol/L) inhibited the algal growth, but the proportions of EPA and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in total fatty acids achieved the highest maximum. Lower EPA and PUFAs contents based on dry mass of *P. tricornutum* were associated with higher Fe³⁺ levels.

Key words: Fe³⁺; *Phaeodactylum tricornutum*; growth; fatty acids; EPA; PUFAs

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)06-0043-04

收稿日期: 2004-06-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070582)

作者简介: 蒋汉明(1976-), 男, 助教, 硕士, 从事多不饱和脂肪酸调控的研究。

studies[J]. In Sakana no Hishitsu (Quality of Fish); Koseisha. ed. Japanese Society of Scientific Fisheries: Tokyo. 1974, 55-80.

[11] Arai K, Takashi R. Studies on muscular proteins of fish, XI. Effect of freezing on denaturation of actomyosin ATPase

from carp muscle[J]. Bull Jap Sci Fish, 1977, 43: 533-541.

[12] 陈德隆. 中国渔业概述[J]. 现代渔业信息, 2002, 17(1): 5-10.

[13] 韩雅珊. 食品化学试验指导[M]. 中国农业大学出版社, 1996. 52-54, 57-58.

由于人们破坏生态环境和生活习惯所造成的“生活习惯病”如高血脂、冠心病等疾病呈逐年上升的趋势。营养学和临床医学的研究表明,人类的这些疾病可能与 ω 3多不饱和脂肪酸(ω 3 polyunsaturated fatty acids, ω 3 PUFAs)缺乏有关。 ω 3 PUFAs是一类长链多不饱和脂肪酸,包括 α -亚麻酸($C_{18:3}$, LNA),二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)。 ω 3 PUFAs,尤其是EPA和DHA能有效地防治心脑血管疾病;此外DHA还对婴幼儿大脑的生长发育有促进作用^[1],素有“脑黄金”之称。目前,市场上销售的EPA和DHA制品绝大多数来自深海鱼油,但是由于受渔业资源的限制,其产量不稳定,且具有难闻的腥臭味和高胆固醇等缺陷,限制了这些多不饱和脂肪酸的应用。

海洋微藻是PUFAs的初级生成者,鱼类体内的PUFAs也是通过摄食浮游生物获得的。某些微藻不仅含有较高的PUFAs,而且其成分比较单一,利于分离纯化。此外,微藻具有生长快、易培养、单位面积产量高、可直接食用等优点,具有较大开发和利用的潜力。三角褐指藻是一种PUFAs含量较高的微藻^[2,3],培养条件与该藻脂肪酸的关系国内外已有不少报道^[4~6],但 Fe^{3+} 对该藻生长和脂肪酸组成的影响尚存在不少疑问。为此,本文研究了培养基中 Fe^{3+} 浓度对三角褐指藻生长和脂肪酸组成的影响,以期为更好地利用该藻生产PUFAs提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 培养基配制

天然海水(总铁浓度约为 $0.5 \mu\text{mol/L}$)经过滤后消毒,以备配制培养基使用。培养基按照F/2略加修改,其中氮源为 7.0mmol/L NH_2CONH_2 ,磷源为 $75 \mu\text{mol/L}$ NaH_2PO_4 。以EDTA-Fe的形式向培养基中添加 Fe^{3+} ,使得培养基中 Fe^{3+} 浓度分别为 0.5 、 12.5 、 24.5 、 60.5 、 $120.5 \mu\text{mol/L}$ 。

1.2 微藻的培养和收获

实验所用的三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin)由中国科学院海洋研究所提供。将培养至对数期的三角褐指藻接种到盛有600ml培养液的三角瓶中(1L),初始密度为 $5.0 \times 10^4/\text{ml}$ 。每个 Fe^{3+} 浓度三个重复。在 20°C , $120 \mu\text{mol/m}^2 \cdot \text{s}$ (L:D=16:8)条件下充气培养,每天取出少量藻液用血球计数板计数。比生长速率 μ 计算如下: $\mu = (\ln N_t - \ln N_0)/T$,其中 μ 为比生长速率, N_t 和 N_0 分别为经过T天后细胞密度和初始细胞密度。培养至对数末期,离心收集(4000r/min, 10min)。将收集的藻泥放入冰箱(-20°C)保存待用。

1.3 脂肪酸的提取与甲酯化

脂肪酸的提取参考Lepage^[7]的方法加以修改,将200mg冻存的藻泥放入带盖的螺口试管中,加入内标($C_{17:0}$) $200 \mu\text{l}$, 1mol/L KOH- CH_3OH 溶液4ml,充 N_2 后拧紧盖充分振荡, 75°C 水浴10min,冷却后移出上清液。重复上述步骤两次,合并提取液,然后加入 2mol/L HCl- CH_3OH 溶液12ml,充分混匀后 75°C 水浴10min,冷却后吸出上清液并向其中分两次加入4ml正己烷,静置分层,吸出上层正己烷相,用 N_2 吹干,加入1ml正己烷溶解,上机分析。

1.4 气相色谱分析

实验所用的仪器为GC-17A(日本岛津), $15 \text{m} \times 0.53 \text{mm}$ Carbowax柱(Cole-Parmer)。程序升温: 165°C 恒温1min,然后以 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 的升温速率升至 235°C ,保持35min。进样器的温度为 235°C ,氢火焰离子化检测器(FID),载气为高纯 N_2 ,流速30ml/min, H_2 流速为50ml/min,空气流速为500ml/min,分流比为1:10,进样量 $2 \mu\text{l}$ 。通过与标准脂肪酸(Sigma)保留时间的对比鉴别各脂肪酸组分,面积归一法计算各组分的相对含量,内标法进行定量。

2 结果与分析

2.1 Fe^{3+} 浓度对三角褐指藻生长的影响

培养基中 Fe^{3+} 浓度为 $0.5 \mu\text{mol/L}$,三角褐指藻生长异常缓慢,比生长速率仅为 $0.4/\text{d}$ 。当 Fe^{3+} 浓度为 $24.5 \mu\text{mol/L}$ 时,三角褐指藻生长最快,对数末期细胞数目也最高,但和 $12.5 \mu\text{mol/L}$ 间差异不显著($p > 0.05$)。但当 Fe^{3+} 浓度高于 $24.5 \mu\text{mol/L}$ 时,三角褐指藻的生长开始受到抑制,且 Fe^{3+} 浓度越高抑制程度越大(图1和表1)。

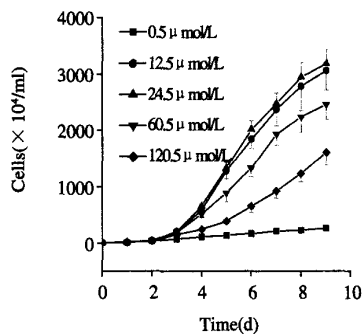


图1 Fe^{3+} 浓度对三角褐指藻生长的影响($n=24$)

Fig.1 Effects of Fe^{3+} concentrations on the growth of *P.tricornutum*. data are the means \pm SD ($n=24$)

2.2 Fe^{3+} 浓度对三角褐指藻脂肪酸组成的影响

$C_{16:0}$ 和 $C_{16:1(n-7)}$ 占总脂肪酸的比例随着 Fe^{3+} 浓度增加先下降后上升。 Fe^{3+} 浓度为 $24.5 \mu\text{mol/L}$ 时达到最低,分别为21.0%和30.9%,继续添加 Fe^{3+} ,二者占总脂肪酸的比例表现出上升的趋势(表2)。

表1 Fe³⁺ 浓度对三角褐指藻比生长速率(μ)的影响(n=24)

Table 1 Effects of Fe³⁺ concentrations on the specific growth rate (μ) of *P. tricornutum* data are the means ± SD(n=24)

| Fe ³⁺ 浓度(μmol/L) | 0.5 | 12.5 | 24.5 | 60.5 | 120.5 |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Specific rate(μ) | 0.40 ± 0.03 | 0.94 ± 0.02 | 0.97 ± 0.04 | 0.77 ± 0.05 | 0.65 ± 0.03 |

表2 Fe³⁺ 浓度对三角褐指藻脂肪酸组成的影响(占总脂肪酸的比例, n=3)

Table 2 Effects of Fe³⁺ concentrations on the fatty acid composition as % of total fatty acids in *P. tricornutum* data are the means ± SD (n=3)

| 脂肪酸 | Fe ³⁺ (μmol/L) | | | | |
|------------------------|---------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | 0.5 | 12.5 | 24.5 | 60.5 | 120.5 |
| C _{14:0} | 4.4 ± 0.1 | 5.9 ± 0.6 | 6.7 ± 0.7 | 5.1 ± 0.3 | 5.4 ± 0.3 |
| C _{15:0} | NT | NT | NT | NT | NT |
| C _{16:0} | 28.1 ± 0.2 | 24.0 ± 0.9 | 21.0 ± 0.5 | 23.9 ± 0.6 | 29.7 ± 0.2 |
| C _{16:1(n-7)} | 37.0 ± 0.1 | 36.2 ± 2.1 | 30.9 ± 0.7 | 43.2 ± 1.2 | 43.7 ± 0.9 |
| C _{18:0} | 1.3 ± 0.2 | 1.0 ± 0.3 | 0.9 ± 0.2 | 0.8 ± 0.0 | 0.7 ± 0.1 |
| C _{18:2(n-6)} | 9.6 ± 0.2 | 3.2 ± 0.6 | 3.8 ± 0.8 | 3.5 ± 0.2 | 3.8 ± 0.2 |
| C _{18:3(n-6)} | 3.2 ± 0.1 | 1.9 ± 0.3 | 1.7 ± 0.4 | 1.2 ± 0.3 | 1.3 ± 0.3 |
| C _{20:0} | NT | NT | NT | NT | NT |
| C _{20:4(n-6)} | NT | NT | NT | NT | NT |
| C _{20:5(n-3)} | 13.1 ± 0.0 | 19.7 ± 0.9 | 22.5 ± 1.5 | 15.1 ± 1.6 | 10.9 ± 0.5 |
| C _{22:0} | NT | NT | NT | NT | NT |
| C _{22:6(n-3)} | NT | NT | NT | NT | NT |
| Others | 3.3 ± 0.8 | 8.0 ± 0.9 | 12.6 ± 1.6 | 7.1 ± 0.5 | 4.6 ± 0.6 |
| PUFAs | 25.9 ± 0.3 | 24.9 ± 1.6 | 28.0 ± 2.0 | 19.8 ± 0.8 | 16.2 ± 0.6 |

PUFAs: polyunsaturated fatty acids; NT: not detected.

当培养基中 Fe³⁺ 浓度为 0.5 μmol/L 时, C_{18:2(n-6)}和 C_{18:3(n-6)} 占总脂肪酸的比例最高, 分别为 9.6% 和 3.2%, 但随着 Fe³⁺ 浓度的继续增加, 二者占总脂肪酸的比例基本保持稳定。EPA 和 PUFAs 占总脂肪酸的比例在 Fe³⁺ 浓度为 24.5 μmol/L 时最高, 分别为 22.5% 和 28.0%。Fe³⁺ 浓度无论是高于或低于 24.5 μmol/L, EPA 和 PUFAs 占总脂肪酸的比例均表现出下降的趋势(表 2)。

EPA 和 PUFAs 占干重的比例随着 Fe³⁺ 浓度的增加而显著下降。当 Fe³⁺ 浓度为 0.5 μmol/L 时, EPA 和 PUFAs 占干重的比例分别为 2.3% 和 6.2%; 当 Fe³⁺ 浓度为 120.5 μmol/L 时, 下降至 0.7% 和 1.5%(图 2)。统计分析表明,

Fe³⁺ 浓度对 EPA 和 PUFAs 含量有极显著影响(p < 0.01, One-way ANOVA)。

3 讨 论

铁是海水中重要的微量元素(trace element), 也是海洋浮游植物生长所必须的微量元素, 它在某种程度上可以限制海洋初级生产力, 也可以诱发海域赤潮。海水中铁的存在形式与量不仅对浮游植物的生长、电子传递、氮的吸收、叶绿素的生物合成和光合作用等过程都有重要的影响^[8~11], 而且对浮游植物的生化组成也可能产生重要的影响。

野外实验表明, 铁可能是海洋微藻生长的主要限制因子^[12~14]。但是通过室内培养研究铁对微藻生长的影响的报道较少^[15]。本文的研究表明, 天然海水中 Fe³⁺(浓度为 0.5 μmol/L)难以满足三角褐指藻生长的需要, 如若不额外添加, 即使其它营养盐很丰富, 三角褐指藻仍然生长缓慢, 对数末期细胞数目很低, 表现出铁限制现象。这一结果与陈慈美等^[16]研究的结果明显不同。他们的结果表明, 在铁限制的条件下, 其它营养盐丰富时, 三角褐指藻仍能生长良好。当培养基中 Fe³⁺ 浓度超过 24.5 μmol/L 时, 三角褐指藻的生长受到明显的抑制, 可能高浓度的 Fe³⁺ 会对三角褐指藻产生毒性效应, 且这种效应随着 Fe³⁺ 浓度的增加而加剧。

C_{14:0}、C_{16:0}、C_{16:1(n-7)}和 EPA 是硅藻的主要脂肪酸, 大多数硅藻 C₁₈ 和 C₂₂ 多不饱和脂肪酸含量较低^[17,18]。本

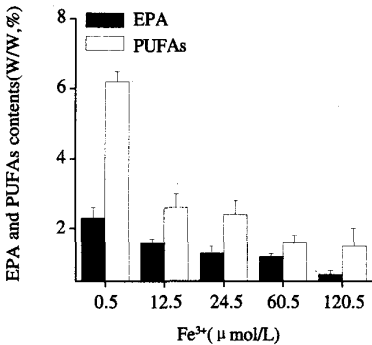


图2 Fe³⁺ 浓度对三角褐指藻 EPA 和 PUFAs 占干重含量(W/W)的影响(n=3)

Fig.2 Effects of Fe³⁺ concentrations on the EPA and PUFAs contents as % of dry weight (W/W, %) in *P. tricornutum*. data are the means ± SD (n=3)

实验所用的三角褐指藻属海产单细胞硅藻,其脂肪酸组成基本与已报道的种接近,但其 $C_{18:2(n-6)}$ 占总脂肪酸的比例较高,且 EPA 是最主要的多不饱和脂肪酸,几乎不含有 DHA 和 AA,易于分离纯化。

有关 Fe^{3+} 浓度对微藻脂肪酸组成的影响的报道较少^[19]。本文的研究表明,当 Fe^{3+} 浓度为 $24.5 \mu\text{mol/L}$ 时,三角褐指藻 EPA 和 PUFA 占总脂肪酸的比例最高。 Fe^{3+} 浓度高于或低于 $24.5 \mu\text{mol/L}$,二者占总脂肪酸的比例均下降。然而若以占干重的比例来表示,三角褐指藻 EPA 和 PUFA 含量随 Fe^{3+} 浓度的增加而显著下降。

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 Fe^{2+} 结合形成酶的活性中心^[20]。因此培养基中铁的存在量及形式不仅会影响到微藻的一系列生理生化过程,而且可能会影响微藻去饱和酶的活性。而 Fe^{2+} 在空气中极易被氧化成 Fe^{3+} 形成胶体态和颗粒态铁^[21]。一般认为这两种形态的铁不能被浮游植物直接利用^[22,23]。胶体态铁可在光还原的作用下转化成 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} ,从而被藻类利用。所以微藻能真正大量利用的是可溶性有机络合态铁^[24]。真核微藻还可利用铁还原酶将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} 加以吸收利用。但三角褐指藻在 Fe^{3+} 缺乏时,EPA 和 PUFA 含量最高,添加 Fe^{3+} 反而降低,可能是因为 Fe^{3+} 限制下,铁还原酶活性增加。Meddlemiss 等^[25]在研究单细胞绿藻 *Chlorella kessleri* Fott 时也有类似的报道,该藻在铁限制的条件下,细胞膜上的铁还原酶活性增加了 5 倍。

参考文献:

- [1] 吴克刚,柴向华,杨连生. n-3 系多不饱和脂肪酸防治心血管疾病的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2000, 21(6): 6-9.
- [2] Yongmanitchai W, Ward P O. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid[J]. Phytochemistry, 1991, 30(9): 2963-2967.
- [3] 李荷芳,周汉秋. 海洋微藻脂肪酸组成的比较研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(1): 34-39.
- [4] Fabregas J, Patino M, Morales E D, et al. Optimal renewal rate and nutrient concentration for the production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in semicontinuous cultures[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 26(1): 266-268.
- [5] 廖启斌,李文权,陈清花,等. 营养盐对三角褐指藻脂肪酸含量与百分组成的影响[J]. 海洋环境科学, 2000, 19(2): 6-9.
- [6] 李文权,李芊,廖启斌,等. 温度对四种海洋微藻脂肪酸组成的影响[J]. 台湾海峡, 2003, 22(1): 10-13.
- [7] Lepage G, Roy C. Improved recovery of fatty acids through direct transesterification without prior extraction or purification[J]. J Lipid Res, 1984, 25: 1391-1396.
- [8] Flynn K J, Hipkin C R. Interaction between iron, light, ammonium and nitrate: insights from the construction of a dynamic model of algal physiology[J]. J Phycol, 1999, 35: 1171-1190.
- [9] Gelder R J. Complex lessons of iron uptake[J]. Nature, 1999, 400: 815-816.
- [10] Rueter J G. The effect of iron nutrition on photosynthesis and nitrogen fixation in cultures of *Trichodesmium*[J]. J Phycol, 1990, 26: 30-35.
- [11] Davey M, Geider R J. Impact of iron limitation on the photosynthetic apparatus of the diatom *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae)[J]. J Phycol, 2001, 37: 987-1000.
- [12] Martin J H, Coale K H, Johnson K S, et al. Testing the iron hypothesis in ecosystem of the equatorial Pacific ocean[J]. Nature, 1994, 371: 123-129.
- [13] Coale K H, Johnson K S, Fitzwater S E, et al. A massive phytoplankton bloom induced by an ecosystem-scale iron fertilization experiment in the equatorial Pacific ocean[J]. Nature, 1996, 383: 495-501.
- [14] Boyd P W, Watson A J, Law C S, et al. A mesoscale phytoplankton bloom in the polar southern ocean stimulated by iron fertilization[J]. Nature, 2000, 407: 695-702.
- [15] 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.
- [16] 陈慈美,蔡阿根,陈雷. 铁对海洋硅藻的生物活性形式及其对藻类生长的影响[J]. 海洋通报, 1993, 12(1): 49-55.
- [17] Chor K T, Michael R T. Screening of diatoms for heterotrophic eicosapentaenoic acid production[J]. J Appl Phycol, 1996, (8): 59-64.
- [18] Graeme A D, Volkman J K, Stephane M B, et al. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae)[J]. Phytochemistry, 1994, 35(1): 155-161.
- [19] 郑爱榕,郑雪红,李文权. 螺旋藻脂肪酸随培养时间、温度、和营养盐变化的研究[J]. 海洋学报, 2003, 25(2)(增刊): 106-115.
- [20] 魏东,张学成. 微藻脂肪酸去饱和酶及其基因表达生态调控研究新进展[J]. 海洋科学, 2000, 24(8): 42-46.
- [21] Rich H W, Morel F M M. Availability of well defined iron colloids to the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*[J]. Limnol Oceanogr, 1990, 35: 652-662.
- [22] Suzuki Y, Kuma K, Matsunaga K. Effect of iron on ooconium formation growth rate and pigment synthesis of *Laminaria japonica* (Phaeophyta)[J]. Fish Science, 1994, 60: 373-378.
- [23] Kuma K, Matsunaga K. Availability of colloidal ferric oxides to coastal marine phytoplankton[J]. Marine Biology, 1995, 122: 1-11.
- [24] 曹勇,李道季,张经. 海洋浮游植物铁限制的研究进展[J]. 海洋通报, 2002, 21(6): 83-90.
- [25] Meddlemiss J, Anderson A M, Stratilo C W, et al. Oxygen consumption associated with ferric reductase activity and iron uptake by iron-limited cells of *Chlorella kessleri* (Chlorophyceae)[J]. J Phycol, 2001, 37(3): 393-398.