

等鞭金藻生长和脂肪酸组成随 Fe^{3+} 浓度变化的研究

蒋汉明¹, 翟静¹, 张媛英¹, 顾洪雁¹, 高坤山²

(1. 泰山医学院天外村校区生物化学教研室, 271000 山东省泰安市; 2. 汕头大学海洋生物研究所, 515063 广东省汕头市)

摘要: 研究了一种重要的海洋微量元素铁对等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 生长和脂肪酸组成的影响。研究表明, 等鞭金藻在天然海水中(铁浓度为 $0.5 \mu\text{mol/L}$) 生长缓慢, 但当培养基中 Fe^{3+} 浓度超过 $12.5 \mu\text{mol/L}$ 时, 等鞭金藻生长差异不显著。 $\text{C}_{18:2(n-6)}$ 和 $\text{C}_{18:3(n-6)}$ 占总脂肪酸的比例随着 Fe^{3+} 浓度增加而下降, 但 $\text{C}_{22:6(n-6)}$ (DHA) 随着 Fe^{3+} 浓度增加而上升。 Fe^{3+} 浓度在 $12.5 \sim 120.5 \mu\text{mol/L}$, 多不饱和脂肪酸(PUFA) 占总脂肪酸的比例显著下降 ($P < 0.05$)。 DHA 和 PUFA 含量 (W/W) 随着 Fe^{3+} 浓度的增加先上升后下降, 二者达到最大值时 Fe^{3+} 浓度分别为 60.5 和 $24.5 \mu\text{mol/L}$ 。

关键词: Fe^{3+} ; 等鞭金藻; 生长; 脂肪酸; DHA; PUFA

近年来, 多不饱和脂肪酸, 尤其是 $n-3$ PUFA 对人体健康的积极作用越来越受到人们的重视^[1-7]。目前, 市售的 EPA 和 DHA 制品绝大多数来自深海鱼油, 由于鱼油受到渔业资源、种类等的影响, 其产量不稳定、价格昂贵, 且从鱼油中提取 $n-3$ PUFA 具有技术难度大, 气味难闻等缺点, 限制了 PUFA 的应用。

海洋微藻是 PUFA 的初级生产者。微藻资源丰富、生长快。某些微藻不仅含有较高的 PUFA, 而且其组成比较单一, 利于分离纯化^[8,9]。但是, 微藻的脂肪酸组成不仅受自身遗传因素的控制, 同时也受到培养条件的影响。铁是海水中重要的微量元素, 海水中铁的含量和存在形式不仅会影响到藻类的生长, 而且可能会影响藻类的生化组成。为此, 本文研究了不同 Fe^{3+} 浓度对等鞭金藻生长和脂肪酸组成的影响, 以期为大规模生产提供实验依据。

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 $\text{F}/2$ ^[10] 略加修改, 其中氮源为 $7.0 \text{ mmol/L NH}_2\text{CONH}_2$, 磷源为 $75 \mu\text{mol/L NaH}_2\text{PO}_4$ 。以 EDTA-Fe 的形式向培养基中添加 Fe^{3+} , 使培养基中 Fe^{3+} 浓度分别为 0.5 、 12.5 、 24.5 、 60.5 、 $120.5 \mu\text{mol/L}$ 。

收稿日期: 2004-10-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(NO. 30070582)

作者简介: 蒋汉明(1976-), 男, 讲师; 主要从事多不饱和脂肪酸方面的研究工作。

1.2 微藻的培养和收获

实验所用的等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 由中国科学院海洋研究所提供。将培养至对数期的等鞭金藻接种到盛有 600 mL 培养液的三角瓶中(1 L), 初始密度为 5.0×10^4 个/ mL 。每个 Fe^{3+} 浓度 3 个重复。在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ($\text{L:D} = 16:8$) 条件下充气培养。培养至对数期末, 离心收集 (4000 r/min , 10 min)。将收集的藻泥放入冰箱 ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$) 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^[11] 的方法并加以修改。将 200 mg 冻存的藻泥放入带盖的螺口试管中, 加入内标 ($\text{C}_{17:0}$) $200 \mu\text{L}$, $1 \text{ mol/L KOH-CH}_3\text{OH}$ 溶液 4 mL , 充 N_2 后拧紧盖充分振荡, $75 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 10 min , 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 $2 \text{ mol/L HCl-CH}_3\text{OH}$ 溶液 12 mL , 充分混匀后 $75 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 10 min , 冷却后吸出上清液并向其中分两次加入 4 mL 正己烷, 静置分层, 吸出上层正己烷相, 用 N_2 吹干, 加入 1 mL 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: $165 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温 1 min , 然后以 $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温速率升至 $235 \text{ }^\circ\text{C}$, 保持 35 min 。进样器的温度为 $235 \text{ }^\circ\text{C}$, 氢火焰离子化检测器(FID), 载气为高纯 N_2 , 流速 $30 \text{ mL}/\text{min}$, H_2 流速为 $50 \text{ mL}/\text{min}$, 空气流速为 $500 \text{ mL}/\text{min}$, 分流比为 $1:10$, 进样量 $2 \mu\text{L}$ 。通过与标准脂肪酸(Sigma 公司)保留时间的对比鉴别各脂肪酸组分, 面积归一化法计算各组分的相对含量, 内标法进行定量。

2 结果

2.1 Fe^{3+} 浓度对等鞭金藻生长的影响

等鞭金藻在不同 Fe^{3+} 浓度下生长情况见图 1。由图 1 可见,等鞭金藻在天然海水中(铁浓度 $0.5 \mu\text{mol/L}$),生长缓慢,比生长速度只有 0.42 个/d,对数期较短。但当培养基中 Fe^{3+} 浓度超过 $12.5 \mu\text{mol/L}$ 时,各浓度间比生长速度差异不显著 ($P > 0.05$)。

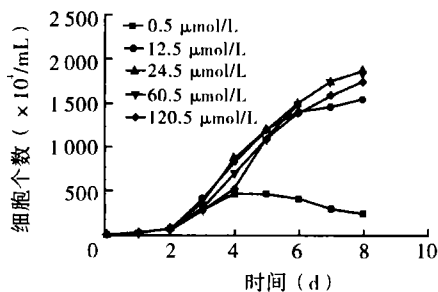


图 1 Fe^{3+} 浓度对等鞭金藻生长的影响 ($n = 24$)

等鞭金藻脂肪酸组成随 Fe^{3+} 浓度的变化见表 1。由表 1 可见, $C_{18:2(n-6)}$ 和 $C_{18:3(n-6)}$ 占总脂肪酸的比例随着 Fe^{3+} 浓度增加而降低,当 Fe^{3+} 浓度为 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 时,二者占总脂肪酸的比例分别为 27.6% 和 8.1% , $120.5 \mu\text{mol/L}$ 时,下降至 19.6% 和 3.9% 。 $C_{14:0}$ 和 DHA 占总脂肪酸的比例随 Fe^{3+} 浓度的增加而上升。 $C_{16:1(n-7)}$ 几乎不受 Fe^{3+} 浓度的影响,基本保持在 $4.5\% \sim 4.9\%$ 。 Fe^{3+} 浓度在 $0.5 \sim 12.5 \mu\text{mol/L}$ 时,PUFA 占总脂肪酸的比例基本保持不变;但在 $12.5 \sim 120.5 \mu\text{mol/L}$,随着 Fe^{3+} 浓度增加 PUFA 则降低。高浓度的 Fe^{3+} ($> 24.5 \mu\text{mol/L}$) 能够抑制 $C_{18:0}$ 的合成,使得 $C_{18:0}$ 比例下降,甚至于检测不到。

表 1 Fe^{3+} 浓度对等鞭金藻脂肪酸组成的影响 (占总脂肪酸的比例, $n = 3$)

脂肪酸	Fe^{3+} ($\mu\text{mol/L}$)				
	0.5	12.5	24.5	60.5	120.5
$C_{14:0}$	12.4 ± 0.2	13.5 ± 0.7	14.8 ± 0.8	15.7 ± 0.6	15.2 ± 0.2
$C_{15:0}$	NT	NT	NT	NT	0.5^*
$C_{16:0}$	17.4 ± 0.5	20.5 ± 0.8	16.7 ± 0.6	16.4 ± 1.2	17.2 ± 0.5
$C_{16:1(n-7)}$	4.7 ± 1.0	4.5 ± 0.0	4.5 ± 0.1	4.7 ± 0.5	4.9 ± 0.2
$C_{18:0}$	3.3 ± 0.3	1.8 ± 0.0	1.6^*	NT	NT
$C_{18:2(n-6)}$	27.6 ± 0.2	25.1 ± 2.9	22.5 ± 0.2	18.7 ± 0.5	19.3 ± 0.6
$C_{18:3(n-6)}$	8.1 ± 0.0	4.8 ± 0.0	4.7 ± 0.4	4.2 ± 0.1	3.9 ± 0.1
$C_{20:0}$	NT	NT	NT	NT	NT
$C_{20:4(n-6)}$	NT	NT	NT	NT	NT
$C_{20:5(n-3)}$	NT	1.5 ± 0.1	NT	NT	0.6^*
$C_{22:0}$	NT	NT	NT	NT	NT
$C_{22:6(n-3)}$	2.4 ± 0.4	6.8 ± 0.7	9.2 ± 0.6	10.9 ± 0.9	10.4 ± 0.0
其他	21.8 ± 0.2	27.8 ± 0.5	26.6 ± 0.3	29.5 ± 1.5	28.2 ± 1.4
PUFA	38.1 ± 0.7	38.2 ± 1.2	36.3 ± 0.2	33.7 ± 0.5	30.3 ± 2.5

注:NT未检测到; * 只有 1 个数据

Fe^{3+} 浓度对单位干重 DHA 和 PUFA 含量的影响见图 2。由图 2 可见,当 Fe^{3+} 浓度在 $0.5 \sim 60.5 \mu\text{mol/L}$ 时,DHA 含量随着 Fe^{3+} 浓度的增加而升高, $0.5 \mu\text{mol/L}$ 时为 0.3% , $60.5 \mu\text{mol/L}$ 时上升至 2.4% 。但当 Fe^{3+} 浓度升高至 $120.5 \mu\text{mol/L}$ 时,DHA 含量有所下降。PUFA 含量随着 Fe^{3+} 浓度增加先上升后下降,在 $24.5 \mu\text{mol/L}$ 时达到最高占干重的 9.9% 。

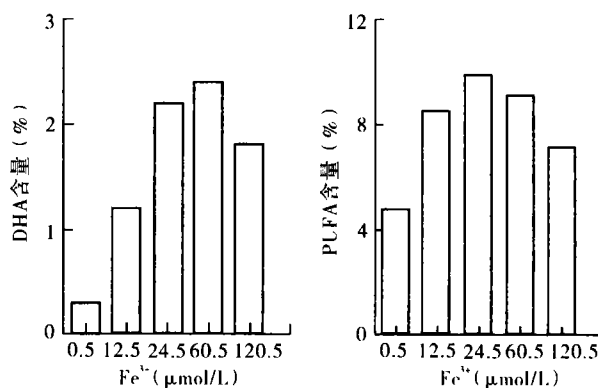


图 2 Fe^{3+} 浓度对等鞭金藻 DHA 和 PUFA 占干重含量 (W/W) 的影响 ($n = 3$)

3 讨论

铁是海水中的重要微量元素,也是海洋浮游植物生长所必需的微量元素^[12-17]。本文的研究表明,天然海水中 Fe^{3+} (浓度为 $0.5 \mu\text{mol/L}$) 难以满足等鞭金藻生长的需要,如若不额外添加,即使氮源和磷源很丰富(分别为 7.0 mmol/L 和 $75 \mu\text{mol/L}$),等鞭金藻仍然生长缓慢,对数期较短,对数期末细胞数目较低,表现出铁限制现象。而 Fe^{3+} 浓度在 $12.5 \sim 120.5 \mu\text{mol/L}$ 时,对其生长没有显著影响。

等鞭金藻属金藻门普林藻纲,该类型的微藻 PUFA 占总脂肪酸的比例高,但各组分比例变化较大,通常含有较多的 $C_{14:0}$ 、 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:1(n-9)}$ 和 DHA,有些含有较高的 EPA^[18,19]。本文所用的等鞭金藻除了含有上述主要脂肪酸外, $C_{18:2(n-6)}$ 占总脂肪酸的比例较高且几乎不含有 AA 和 EPA,易于 DHA 的分离纯化。

本文的研究表明,等鞭金藻 DHA 占总脂肪酸的比例随 Fe^{3+} 浓度增加而升高, $120.5 \mu\text{mol/L}$ 时略有下降。PUFA 占总脂肪酸的比例在 $12.5 \sim 120.5 \mu\text{mol/L}$,随着 Fe^{3+} 浓度增加而下降。等鞭金藻 DHA 含量随 Fe^{3+} 浓度增加而上升, $120.5 \mu\text{mol/L}$ 略有下降,PUFA 含量先上升后下降, $24.5 \mu\text{mol/L}$ 时最大,为 9.9% 。

脂肪酸双键的形成是由去饱和酶催化完成的,脂肪酸去饱和酶存在 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+} 而形成胶体态和颗粒态铁^[21]。一般认为浮游植物不能直接利用含有 Fe^{3+} 的胶体态和颗粒态铁^[22,23]。真核微藻细胞膜上具有铁还原酶,可以将环境中的 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} 加以吸收利用。等鞭金藻在天然海水(铁浓度为 $0.5 \mu\text{mol/L}$)条件下,DHA和PUFA含量最低,可能是由于 Fe^{3+} 缺乏,使得等鞭金藻可利用的 Fe^{2+} 减少,从而影响了DHA和其他不饱和脂肪酸的合成。

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] Bucher HC, Hengstler P, Schindler C, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Am. J. Med., 2002, 112(4): 298-304.
- [3] 杨天奎,高春香,张超明,等. α -亚麻酸降血脂作用的研究[J]. 中国油脂, 1995, 20(3): 46-49.
- [4] 阮征,吴谋成,胡彼波,等. 多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 中国油脂, 2003, 28(2): 55-52.
- [5] 铃木平光. DHA对记忆和学习能力低下的预防作用[J]. 中国海洋药物, 1993, (4): 50-52.
- [6] 陈霞飞,冯颖,王新宜,等. 金海豹油胶囊对认知功能作用的临床观察[J]. 营养学报, 1999, 21(2): 240.
- [7] 赵忠栋,薛芳菁,徐虹,等. 母体二十二碳六烯酸对正常足月儿智能发育的影响[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2000, 16(7): 413-415.
- [8] 蒋敏霞,郑亦周. 14种海洋微藻总脂含量和脂肪酸组成研究[J]. 水生生物学报, 2003, 27(3): 243-247.
- [9] 俞建江,李荷芳,周汉秋. 10种海洋微藻总脂、中性脂和极性脂的脂肪酸组成[J]. 水生生物学报, 1999, 23(5): 481-488.
- [10] Guillard R R L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates[A]. Smith W L, Chanley M H. Culture of marine invertebrate animals [C]. Plenum: New York Press, 1975, 29-60.
- [11] 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.
- [12] Flynn KJ, Hipkin CR. 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.
- [13] Gelder R J. Complex lessons of iron uptake[J]. Nature, 1999, 400: 815-816.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Zhukova N V, Aizdaicher N A. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae[J]. Phytochemistry, 1995, 39(2): 351-356.
- [19] Viso A C, Marty J C. Fatty acids from 28 marine microalgae[J]. Phytochemistry, 1993, 34(6): 1521-1533.
- [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, Movel 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 oogonium 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.

Effect of ferric concentration on the growth and fatty acid composition of *Isochrysis galbana*

JIANG Han-ming¹, ZHAI Jing¹, ZHANG Yuan-ying¹, GU Hong-yan¹, GAO Kun-shan²

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

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

Abstract: The growth and variation of fatty acids composition in *Isochrysis galbana* with different Fe^{3+} concentrations was examined. It showed that the algae grown poorly in the culture without Fe^{3+} addition, however, its growth was insignificant difference when Fe^{3+} concentration exceeds $12.5 \mu\text{mol/L}$. The proportion of $C_{18:2(n-6)}$ and $C_{18:3(n-6)}$ in total fatty acid was decreased with the increase of Fe^{3+} concentration, but that of DHA was increased. The proportion of PUFA decreased markedly in the range of 12.5 to $120.5 \mu\text{mol/L } Fe^{3+}$. The content of DHA and PUFA (dry mass) was increased and then decreased with the increase of Fe^{3+} concentration, the content of DHA achieved the maximum value of 2.4% at $60.5 \mu\text{mol/L}$, and that of PUFA reached the highest value of 9.9% at $24.5 \mu\text{mol/L}$.

Key words: Fe^{3+} ; *Isochrysis galbana*; growth; fatty acid; DHA; PUFA