

温度影响三角褐指藻生长和脂肪酸组成的初步探讨

潘 瑾 俞建中 马晓磊 潘克厚*

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室 应用微藻生物学研究室, 青岛 266003)

摘 要 实验对指数生长期、指数生长末期、静止期和衰亡期的三角褐指藻脂肪酸进行研究, 发现在指数生长末期二十碳五烯酸(Eicosapentaenoic acid, EPA)含量最高。实时定量 PCR 分析三角褐指藻 $\Delta 5$ 脂肪酸去饱和酶基因在不同生长时期的表达变化水平差异显著, 其中指数生长期表达量最高。为了探讨温度对微藻生长和脂肪酸组成的影响, 作者在不同温度下对三角褐指藻进行了培养, 并测定其生长和脂肪酸组成。结果表明, 三角褐指藻的生长随着温度的升高到达指数生长末期所需时间缩短; 不同温度下三角褐指藻的主要脂肪酸为 C14 : 0、C16 : 0、C16 : 1 Δ 9、C18 : 1 Δ 9、C18 : 2 Δ 9, 12、C20 : 5n3 (EPA), 总脂肪酸随着温度的升高依次呈现先升高后降低的趋势, 在 15 $^{\circ}$ C 时 EPA 占总脂肪酸的百分含量达到最高值 25.71%。

关键词 温度 三角褐指藻 生长 脂肪酸 EPA

中图分类号 S917.3 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2010)06-0090-05

Effect of temperature on the growth and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum*

PAN Jin YU Jian-zhong MA Xiao-lei PAN Ke-hou*

(Laboratory of Applied Microalgae Biology, Key Laboratory of Aquaculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT Analysis of fatty acids of *Phaeodactylum tricornutum* at different growth phases (the exponential, the end of exponential, the stationary, and the degradation phase) indicated that the percentage of eicosapentaenoic acid (EPA) in total fatty acids peaked at the end of the exponential growth phase. The gene expression pattern of $\Delta 5$ desaturase at different growth phases of *P. tricornutum* was analyzed by real-time quantitative PCR. The results showed that it was most highly expressed at the exponential growth phase. In order to study the effect of temperature on the growth and fatty acid composition in the microalgae, *P. tricornutum* was cultured in batch at varied temperatures. It was found that the algae grew faster at higher temperatures; the higher the temperature, the greater the growth rate. The main fatty acids were C14 : 0, C16 : 0, C16 : 1 Δ 9, C18 : 1 Δ 9, C18 : 2 Δ 9, 12, and C20 : 5n3 (EPA). As the temperature increased, the percentage of fatty acids increased first and then decreased. Microalgal cell

国家科技支撑计划项目(2006BAD09A12)资助

* 通讯作者。E-mail: khpan@ouc.edu.cn, Tel: (0532)82031939

收稿日期: 2009-09-11; 接受日期: 2010-02-08

作者简介: 潘瑾(1984-), 女, 硕士研究生, 主要从事硅藻脂肪酸方面的研究。E-mail: pan.jin66@163.com

which was cultured at 15°C had the highest content of EPA (25.71%).

KEY WORDS Temperature *Phaeodactylum tricornutum* Growth Fatty acid EPA

微藻是自然界为数不多的具有合成 EPA 和 DHA 能力的生物,某些微藻不仅含有较高的多不饱和脂肪酸(PUFAs),而且其组成比较单一,利于分离纯化(蒋敏霞等 2003;俞建江等 1999)。三角褐指藻 *Phaeodactylum tricornutum* 在分类学上隶属于硅藻门,其油脂含量能够达到干重的 15.16%~31.15%,而且可以利用多种有机物作为碳源进行混合营养生长(刘晓娟等 2008),是研究最多的产油微藻,也是海洋生态系统中非常重要的初级生产者(Field *et al.* 1998)。除了可作为研究海洋浮游植物生态生理学的代表性藻种(Falciatore *et al.* 2002),三角褐指藻在经济方面还有许多重要作用,比如在水产养殖中是多种养殖生物的优良饵料。微藻所产脂肪酸除了受其自身遗传控制之外,还受到很多培养条件的影响。本文从温度影响三角褐指藻生长和脂肪酸积累等方面进行试验,以期找出其生长和脂肪酸合成的最适条件,为大规模生产提供实验参考。

1 材料与方 法

1.1 藻种

三角褐指藻取自中国海洋大学水产学院微藻种质库(Microalgae Culture Collection of Ocean University of China),为单种培养,编号为 MACC/B114。

1.2 培养基与培养条件

培养用海水取自青岛近海,经脱脂棉过滤、煮沸使用,用洗涤、晾干、高压灭菌后的 1 000 ml 三角烧瓶培养,将进入静止期约 7d 的藻细胞按 1 : 10 (*v/v*) 的比例为接入新鲜 f/2 海水培养基(Guillard *et al.* 1962),培养至静止期,再按上述比例转接 1 次,培养至指数生长末期;1 000 ml 三角瓶内加入 700 ml 新鲜 f/2 培养基,初始接种密度为 10×10^5 cells/ml,培养温度为 20 °C,在 GXZ-300A 型光照培养箱培养,光照强度为 60~100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$,光暗周期为 12 h/12 h,每天用血球计数板计数。培养时,每天摇瓶两次,并随机交换位置以减少误差。根据计数结果,在指数生长期、指数生长末期、静止期和衰亡期分别取样,每次约 150 ml 藻液,每个生长期取 3 个平行样本。一部分用于提取 RNA 并立即反转录,反转录产物 -20 °C 保存;其余藻液离心收集, -80 °C 保存备脂肪酸提取。

1.3 脂肪酸成分分析

脂肪酸的提取参考 Lepage 等(1984)的方法。准确称取 30 mg 经真空冷冻干燥的藻粉于 10 ml 玻璃试管中,加入 2 ml 1mol/L KOH-CH₃OH 于 75°C 孵育 10 min,冷却至室温,加入 4 ml 1 mol/L HCl-CH₃OH 75 °C 酸化 10 min,冷却至室温,再加入 1 ml 正己烷和少量蒸馏水进行萃取,离心取正己烷相分析脂肪酸组成。

脂肪酸组成分析采用美国 Agilent 6890 series GC system 气相色谱仪、氢火焰离子化检测器和 HP-5 毛细管柱(30 m×320 μm ×0.25 μm ,5% Phenyl Siloxane)。根据待测峰与标样峰面积比和标样量计算各脂肪酸成分占总脂肪酸含量的百分含量。程序升温:170 °C 恒温 1 min,然后以 3 °C/min 的升温速率升到 210 °C,保持 25 min。进样口温度为 210 °C。载气为高纯 N₂,流速为 45 ml/min, H₂ 流速为 40 ml/min,空气流速为 450 ml/min,分流比为 1 : 20,进样量为 1 μl 。

1.4 荧光实时定量 PCR

实验所用到的引物如下:Forward primer: 5'-TGG ATT CCT TTC CGG TTG C-3', Reverse primer: 5'-TAG TGG ACG CCG TGT TTG G-3',反转录产物为模板。在 10 ml 反应体系中依次加入灭菌双蒸水 6.1 μl ;RT 产物 1 μl ;Forward primer 0.2 μl (10pmol/ μl);Reverse primer 0.2 μl (10pmol/ μl);定量 PCR mixer 2.5 μl 。混合均匀后置入 7500 型实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增。扩增条件为 50 °C, 2 min;95 °C,

10 min; 95 °C, 15 s; 60 °C, 40 s, 共 40 个循环。反应结束后, 由机载电脑自动计算定量结果。

1.5 温度实验及统计方法

三角褐指藻培养条件同 1.2, 培养容器为 500 ml 三角瓶, 培养体积为 300ml, 接种密度为 3×10^5 个 cells/ml, 在 GXZ-300A 型生化培养箱中设定 5、10、15、20、25、30、35 °C 7 个温度, 每个温度设 3 个重复。在 5 °C 和 35 °C 时藻细胞几乎不生长, 其余 5 个温度下培养的藻细胞到达指数生长末期后收集细胞。每个实验温度取 3 份平行样品进行脂肪酸成分分析。实验数据应用 SPSS 13.0 软件分别进行单因子方差分析和多重比较。 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 藻细胞生长曲线

藻细胞生长曲线如图 1 所示。

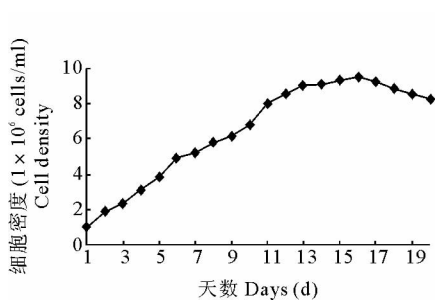


图 1 三角褐指藻的生长曲线

Fig.1 Growth curve of *P. tricornutum*

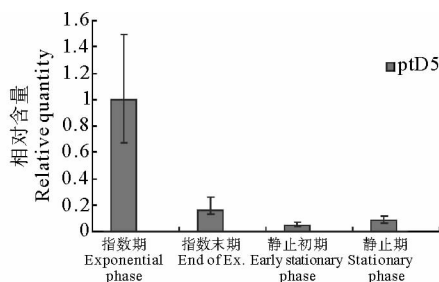


图 2 实时定量 PCR 结果

Fig.2 Results of real-time PCR

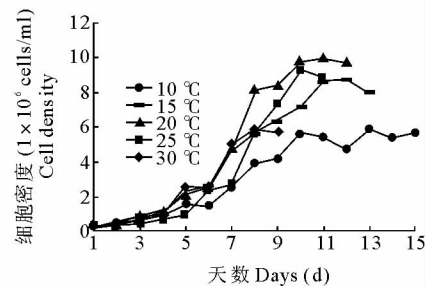


图 3 温度对三角褐指藻生长的影响

Fig.3 Effect of temperature on the growth of *P. tricornutum*

从接种后第 2 天开始计数, 发现细胞迅速生长, 至第 7 天达到一个较高的密度 (5.25×10^6 cells/ml); 随后细胞密度继续升高, 但与前几天比增长速度逐步下降, 至第 14 天密度为 9.12×10^6 cells/ml; 由于限制生长因子的作用不断增加, 藻细胞生长停止, 在第 15、16、17 天细胞数目变化不大; 从第 18 天开始细胞数目迅速减少。根据藻细胞计数, 分别在第 7、14、17、20 天取样, 对应三角褐指藻指数生长期、指数生长末期、静止期和衰亡期。

2.2 脂肪酸组成

三角褐指藻在不同生长期主要脂肪酸组成如表 1 所示。三角褐指藻在整个生长期 EPA 含量均很丰富, 在指数生长期 EPA 含量最低, 指数末期含量最高, 达总脂肪酸的 21.26%, 而后保持稳定直至衰亡期。其他几种脂肪酸含量的变化与 EPA 不同, C14 : 0, C16 : 0, C18 : 1 和 C18 : 2 在指数生长期最高, 然后逐渐降低, 直

表 1 三角褐指藻不同生长期主要脂肪酸百分组成 (%总脂肪酸)

Table 1 Fatty acid composition of *P. tricornutum* at different growth phase

主要脂肪酸 Fatty acid	指数期 Exponential phase	指数末期 End of exponential phase	静止期 Stationary phase	衰亡期 Degradation phase
14 : 0	10.80 ± 0.12	9.98 ± 0.34	9.86 ± 0.27	9.16 ± 0.19
16 : 0	25.90 ± 0.21	24.56 ± 0.23	23.26 ± 1.22	22.98 ± 1.13
16 : 1Δ9	27.18 ± 0.12	32.00 ± 0.13	32.72 ± 0.08	34.23 ± 0.26
18 : 0	3.34 ± 0.07	3.90 ± 0.21	3.82 ± 0.28	3.18 ± 0.34
18 : 1Δ9	2.97 ± 0.31	2.67 ± 0.36	2.62 ± 0.03	2.32 ± 0.02
18 : 2Δ9,12	3.60 ± 0.22	2.08 ± 0.02	2.90 ± 0.32	1.96 ± 0.27
20 : 5n-3 (EPA)	18.04 ± 0.21	21.26 ± 0.17	19.07 ± 0.05	19.71 ± 0.06

到衰亡期。C16 : 1 百分含量变化趋势与其他几种不饱和脂肪酸不同,在整个生长阶段呈上升趋势。C18 : 0 变化不明显。

2.3 $\Delta 5$ 脂肪酸去饱和酶基因 (*ptD5*) 表达分析

$\Delta 5$ 脂肪酸去饱和酶基因 (*ptD5*) 在藻细胞的不同生长时期的表达变化显著(图 2)。基本的变化趋势是指数生长期的表达水平最高,指数末期表达量显著下降,在静止初期达到最低,直至进入静止期后略有升高。即指数生长期显著高于其他 3 个时期,其中在指数期 *ptD5* 的表达量为其静止初期的 20 倍。

2.4 温度对三角褐指藻生长的影响

温度对三角藻生长的影响见图 3,本实验的温度条件都在实验藻种的适宜的温度范围内。在 10~30 °C 之间随着温度的升高,三角褐指藻到达静止末期所需的时间缩短,在 10 °C 下培养,在第 15 天的时候收集,最高 5.68×10^6 cells/ml,而在 30 °C 培养时,第 10 天已达到指数生长末期。藻细胞在 20 °C 培养时能够达到最大密度 1×10^7 cells/ml。在 10~20 °C 之间,随着温度的上升三角褐指藻的生长速率增加,从 20~30 °C 逐渐下降。三角褐指藻的最适生长温度为 20 °C 左右。

2.5 温度对脂肪酸成分的影响

本研究主要进行了 5 个温度(10、15、20、25、30 °C)对三角褐指藻脂肪酸组成变化的实验。由于不同温度下测得的脂肪酸种类各不相同,本实验选取了在 5 个温度下都检测到的 7 种脂肪酸进行分析,结果如表 2 所示。

表 2 三角褐指藻不同温度下主要脂肪酸百分组成(%总脂肪酸)
Table 2 Fatty acid composition of *P. tricornutum* at different temperature

主要脂肪酸 Major fatty acid	温度 Temperature				
	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
14 : 0	7.90±0.38	8.42±0.11	8.95±0.19	7.47±0.21	6.68±0.57
16 : 0	20.05±0.84	21.58±0.10	24.49±0.43	22.77±0.05	20.07±1.16
16 : 1 $\Delta 9$	36.05±1.96	37.35±0.68	37.61±0.23	38.83±0.11	49.62±0.56
18 : 0	5.77±0.43	6.49±0.02	3.75±1.04	6.04±0.01	3.95±0.33
18 : 1 $\Delta 9$	4.21±0.07	4.40±0.22	4.88±0.32	4.56±0.34	3.21±0.03
18 : 2 $\Delta 9,12$	4.17±0.05	4.05±0.12	3.65±1.01	5.05±0.19	2.23±0.41
20 : 5n-3 (EPA)	21.8±0.12	25.71±0.19	20.47±0.46	15.28±0.05	14.37±0.28

7 种脂肪酸在不同温度处理下都有差异,其中 C16 : 0, C16 : 1, C20 : 5 较其他 4 种变化明显。EPA 的含量受藻细胞培养温度变化的影响显著。15 °C 培养条件下的藻细胞中 EPA 含量最高,达到 25.71%;从 15~30 °C 随着培养温度的升高,EPA 含量逐渐下降,到 30 °C 时达到最低为 14.37%。C16 : 0, C16 : 1 的百分含量从 10~20 °C 随温度上升而增加,随温度从 20 °C 上升到 30 °C, C16 : 0 的百分含量下降, C16 : 1 含量呈上升趋势。随着温度升高, C14 : 0, C18 : 0, C18 : 1, C18 : 2 百分含量变化不显著。

3 讨论

温度是影响藻类生长和生化组成的重要因子之一。微藻能够适应的温度范围很广,但是不同的微藻对温度的耐受能力差别很大。三角褐指藻在 10~25 °C 不仅具有较高的生长速率,而且指数生长末期细胞密度也较高。培养温度超过 25 °C,其生长受到明显的抑制。这一结果与 Yongmanitchai 等(1991)报道的结果基本一致。

本实验初步研究了三角褐指藻 $\Delta 5$ 脂肪酸去饱和酶基因 (*ptD5*) 在藻细胞的不同生长期的表达变化与各个时期藻细胞的 EPA 含量之间的关系。分析发现,各个时期藻细胞的 EPA 含量与基因表达量的变化呈现相反的趋势,即三角褐指藻在指数生长期 EPA 含量最低,而在指数生长末期迅速升高并在进入静止期后仍一直维持较高的水平。在指数生长末期 EPA 含量最高,原认为该时期与 EPA 合成有关的基因表达也应该是比较活

跃的,但是本实验的结果却出乎意料,虽然 $\Delta 5$ 脂肪酸去饱和酶基因在指数生长期的藻细胞中大量转录,但是并没有与之相对应的大量 EPA 生成;而到了指数生长末期,虽然基因的表达水平显著降低,但是 EPA 含量却有很大的提高。这一结果与先前关于三角褐指藻不同时期 EPA 含量的研究一致(Fernandez-Reiriz *et al.*, 1989)。现在的研究表明,转录水平稳固性的增加以及转录产物的加速积累这二者的协调作用引起去饱和酶基因表达量的上调(Dmitry *et al.*, 1997),因此在进行藻类脂肪酸去饱和酶相关研究时建议选取指数生长期的细胞。这也许还反映了从基因表达到产物合成的时滞,但是具体原因还需要进一步的试验探索。

目前关于真核微藻脂肪酸去饱和酶表达调控的研究很少,在对 *Pavlova salina* 不同温度下 $\Delta 5$ 去饱和酶表达情况的研究中发现,25℃时表达量高于 20℃,而 20℃时表达量又高于 15℃,其 EPA 含量是与之对应的,即 25℃时 EPA 含量最高,15℃时最低(Zhou *et al.*, 2007)。可见不同藻种、不同培养条件与基因表达与产物合成的关系是不确定的。

本研究表明,低温下三角褐指藻能够积累更多的多不饱和脂肪酸,这一结果与在高等植物和其他微藻中所获得的结果是一致的(杨官品等 2002;李文权等 2003)。植物体内饱和脂肪酸在脂肪酸去饱和酶的作用下引入双键即形成不饱和脂肪酸,低温有利于微藻积累 EPA 和 PUFAs 可能与低温激活微藻去饱和酶基因表达有关(Sakamoto *et al.*, 1994)。低温可诱导脂肪酸去饱和酶的合成,增加酶量(杨官品等 2002),使脂肪酸不饱和度提高以维持膜的流动性和正常生理功能。另外,低温还可能提高去饱和酶的活性,使去饱和作用加强,使不饱和脂肪酸合成增加(魏东等 2000)。低温处理可明显提高长链多不饱和脂肪酸含量,所以微藻最适生长温度不一定就是其积累 PUFAs 的最佳温度,虽然低温可以获得较高的 PUFAs 含量,但是会降低生物量,从而影响 PUFAs 产量。因此在生产过程中可以通过在最适温度下培养一段时间获得较高的生物量后再转入低温下处理的方法获得较高含量的 PUFAs。

参 考 文 献

- 李文权,李 芊,廖启斌,陈清花. 2003. 温度对 4 种海洋微藻脂肪酸组成的影响. 台湾海峡, 22(1): 9~13
- 刘晓娟,段舜山,李爱芬. 2008. 有机碳源对三角褐指藻生长、胞内物质和脂肪酸组分的影响. 生物工程学报, 24(1): 147~152
- 杨官品,张继民,魏 东,张学成. 2002. 温度逆境处理提高拟微球藻 *Nannochloropsis oculata* EPA 含量的研究. 海洋学报, 24(4): 132~136
- 俞建江,李荷芳,周汉秋. 1999. 10 种海洋微藻总脂、中性脂和极性脂的脂肪酸组成. 水生生物学报, 23(5): 481~488
- 蒋敏霞,郑亦周. 2003. 14 种海洋微藻总脂含量和脂肪酸组成研究. 水生生物学报, 27(3): 243~247
- 魏 东,张学成. 2000. 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. 海洋科学, 21(8): 42~46
- Los, D. A., Ray, M. K., and Murata, N. 1997. Differences in the control of the temperature-dependent expression of four genes for desaturases in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Mol. Microbiol.* 25: 1 167~1 175
- Falciatore, A., and Bowler, C. 2002. Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 109~130
- Fernandez-Reiriz, M. J., Perez-Camacho, M. J. F. A., Blanco, M. P. J., Campos, M. J., and Labarta, U. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*, 83: 17~37
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., and Falkowski, P. 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281: 237~240
- Guillard, R. R. L., and Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatom: *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8: 229~239
- Lepage, G., and Toy, C. 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction purification. *J. Lipid Res.* 25: 1 369~1 396
- Sakamoto, T., Higshi, S., and Wada, H. 1994. Low-temperature-induced desaturation of fatty acids and expression of desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7002. *Plant Mol. Biol.* 26: 249~263
- Yongmanitchai, W., and Ward, P. 1991. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricoratum* under different culture conditions. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 57(2): 419~425
- Zhou, X. R., Robert, S. S., Petrie, J. R., Frampton, D. M. F., Mansour, M. P., Blackburn, S. I., and Nichols, P. D. 2007. Isolation and characterization of the marine microalga *Pavlova salina* encoding three front-end desaturases involved in decosahexaenoic acid biosynthesis. *Phytochem.* 68: 785~796