

刘红全. 菱形藻 HE06 产二十碳五烯酸培养条件优化[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 317–320.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.090

# 菱形藻 HE06 产二十碳五烯酸培养条件优化

刘红全

(广西民族大学海洋与生物技术学院, 广西南宁 530000)

**摘要:**二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)对缓解心律不齐、高血压等疾病具有重要作用,对调节情绪、治疗风湿性关节炎及哮喘也具有积极意义。通过优化氮源和碳源、添加生长因子等途径提高菱形藻 HE06 的 EPA 产率。经优化得到硝酸钠、氯化铵、尿素、维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>12</sub>、生物素、葡萄糖、甘油、碳酸氢钠的最佳质量浓度分别为 75 mg/L、5 mg/L、30 mg/L、1.5 mg/L、6 μg/L、10 μg/L、1.2 g/L、2.4 g/L、1.2 g/L。在最佳优化条件下, EPA 产率由最初的 31.2 μg/L 提升至 504.8 μg/L, 提高了 15 倍; 生物量产率由 19.5 mg/L 提高至 32.4 mg/L, 提高了 66.2%。

**关键词:**菱形藻; 培养条件; 二十碳五烯酸(EPA)

**中图分类号:** S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0317-04

二十碳五烯酸(EPA)对高血压、动脉粥样硬化、血栓等心血管疾病的预防和治疗具有重大意义。在 20 世纪 80 年代前, EPA 主要从鱼油中提取, 由于其含量低、成分复杂等原因, 致使 EPA 价格昂贵, 难以满足人们日益增长的需求。随着微藻产 EPA 研究的深入, EPA 的价格越来越低。微藻 EPA 含量高、生产条件低、提取工艺简单, 已成为生产 EPA 极具潜力的原料来源。虽然野生型的微藻 EPA 含量高, 但也不足以工业化生产, 因此须对微藻进行生产条件优化。采用正交设计方法优化氮源、维生素、植物激素、碳源用量, 从培养基优化方面提高菱形藻 HE06 的 EPA 产率。

## 1 材料与与方法

### 1.1 仪器与藻种

LDZX-50 KB 型立式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂), 超净工作台(苏净集团安泰公司), CFM-5002 型荧光倒置显微镜(上海安捷伦公司), LRH-250-GSH 型人工气候箱(广东省医疗器械厂), Scientz-10N 型冷冻干燥机, GC20-14B 型气相色谱。

藻种 HE06 由笔者所在实验室分离自广西壮族自治区钦州市茅尾海自治区级红树林保护区, 经鉴定为菱形藻属。该藻培养于 f/2 培养基中, 人工气候箱的培养条件为光照度 4 000 lx、暗光比 12 h/12 h、温度(24 ± 1)℃、湿度 40%。

### 1.2 生长条件优化

于 500 mL 锥形瓶内装入 180 mL 液体培养基, 按照 10% 的接种量在超净台中接种对数期藻种。

**1.2.1 氮源优化** 分别以 f/2 原培养基中氮源物质的量为中间点, 向左右延伸 2 个质量浓度, 分别设置硝酸钠单因素优化质量浓度。分别设置硝酸钠的质量浓度为 55、65、75、85、

95 mg/L; 分别设置氯化铵的质量浓度为 35、41、47、53、60 mg/L; 分别将尿素的质量浓度调整为 10、20、30、40、50 mg/L。氮源的正交试验选用最佳硝酸钠、氯化铵、尿素单因素优化值及其左右邻值进行 4 因素 3 水平正交试验优化。

**1.2.2 维生素优化** 维生素的质量浓度参照 f/2 培养基的质量浓度进行设置。生物素的质量浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 μg/L; 维生素 B<sub>1</sub> 的质量浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.40、0.80 mg/L; 维生素 B<sub>12</sub> 的质量浓度分别为 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 μg/L。维生素的正交试验选用最佳生物素、维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>12</sub> 单因素优化值及其左右邻值进行 4 因素 3 水平正交试验优化。

**1.2.3 植物激素优化** IAA 的质量浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/L; 6-BA、赤霉素的质量浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/L。植物激素的正交试验选用最佳 IAA、6-BA、赤霉素单因素优化值及其左右邻值进行 4 因素 3 水平正交试验优化。

**1.2.4 碳源优化** 葡萄糖的质量浓度分别为 0.3、0.6、0.9、1.2、1.5 g/L; 甘油的质量浓度分别为 0.3、0.9、1.8、2.7、3.6 g/L; 碳酸氢钠的质量浓度分别为 0.3、0.9、1.8、2.7、3.6 g/L。碳源的正交试验选用最佳葡萄糖、甘油、碳酸氢钠单因素优化值及其左右邻值进行 4 因素 3 水平正交试验优化。

### 1.3 生长速率的测定

将所有培养体系置于人工气候箱中, 于 2 d 时开始测定培养体系的  $D_{680\text{ nm}}$ , 此后每天在规定时间内测定 1 次  $D_{680\text{ nm}}$ 。当培养体系的  $D_{680\text{ nm}}$  在 3 次测定内无变化时, 将 100 mL 藻液倒入 250 mL 离心瓶中, 于 6 000 r/min 离心 10 min 收集藻液, 将沉淀转移至 10 mL 带螺旋盖的离心管中, 用去离子水洗涤离心 2 次并冷冻干燥。干燥后的藻粉直接保存于 -20℃ 冰箱中。微藻的比生长速率  $\mu$  按照如下公式<sup>[1]</sup>进行计算:

$$\mu = \ln(N_t/N_0) / (T_t - T_0)$$

式中:  $N_t$  为稳定期悬浮藻液在 680 nm 处的吸光度;  $N_0$  为接种后 2 d 悬浮藻液的  $D_{680\text{ nm}}$ ;  $T_t$  为进入稳定期的时间(d);  $T_0$  为接种后 2 d 的时间(d)。

收稿日期: 2015-05-05

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30960215); 广西自然科学基金(编号: 桂科青 0728019)。

作者简介: 刘红全(1975—), 男, 黑龙江肇东人, 博士, 副教授, 主要从事生物技术研究。E-mail: lhongquan@163.com。

1.4 不饱和脂肪酸的提取及测定

脂肪酸的提取及甲酯化方法参考文献[2]。将 50 mg 干燥粉置于带螺旋盖的离心管中,加入混合溶液(三氯甲烷:甲醇:水=2:1:0.8)并充入 N<sub>2</sub> 1 min,以 80 W 超声 20 min 后于 75 ℃ 水浴 15 min,冷却后以 4 000 r/min 离心 10 min,取三氯甲烷层;重复以上步骤 2 次,合并三氯甲烷层,加入等体积混合溶液(甲醇:氢氧化钠=2:1)并充入 N<sub>2</sub> 1 min,以 80 W 超声 20 min 后于 75 ℃ 水浴 15 min,冷却后以 4 000 r/min 离心 10 min,取上清并加入 500 μL 正己烷萃取 30 min。

对 Liang 等的 EPA 气相色谱测定升温程序<sup>[3]</sup>稍作改进,初温 72 ℃ 保持 1 min,以 30 ℃/min 升温至 150 ℃ 并保持 1 min,再以 5 ℃/min 升温至 250 ℃ 并保持 5 min。进样口、检测器的温度均为 280 ℃。载气为高纯度氮气,流速为 30 mL/min,进样量为 1 μL。

2 结果与分析

2.1 生长速率

由图 1、表 1 可知,在正交优化的 4 组试验中,进入稳定期的时间均延后。其中,氮源、维生素、植物激素试验组进入稳定期的时间延后至 10 d;而碳源试验组进入稳定期的时间延后最长,达到 15 d。所有试验组的  $D_{680\text{ nm}}$  均有所提高,激素正交优化组的  $D_{680\text{ nm}}$  与前一优化组(维生素组)相比有所下降,表明植物激素正交试验对菱形藻 HE06 具有抑制作用,而氮源、维生素试验组基本无变化。维生素试验组进入对数期较快,氮源试验组适应期较长。比生长速率测定结果显示,氮源与维生素培养优化中的比生长速率最高,而碳源组与对照组相比基本无变化。

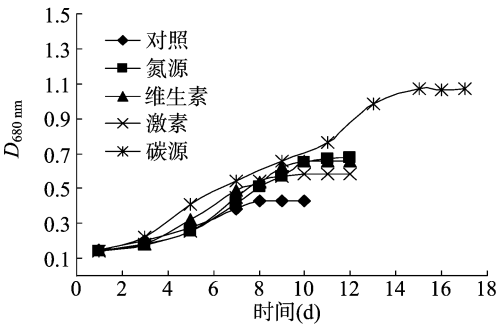


图1 生长曲线

表 1 比生长速率测定结果

试验组	比生长速率
对照组	0.135
氮源	0.151
维生素	0.150
植物激素	0.141
碳源	0.134

2.2 优化结果

单因素优化结果(表 2)显示,单独添加氯化铵、尿素均能提高菱形藻 HE06 的 EPA 含量,EPA 含量分别达到 0.234%、0.219%,与硝酸钠作为氮源相比分别增加了 45.3%、36.0%。但在单因素优化中,其生物量产率均有所下降,而在随后多种氮源正交优化中,与未优化对照组相比,生物量产率增加了 19.0%,EPA 产率增加了 161.5%(图 2-b)。可见,硝酸钠、尿素、氯化铵的正交优化更有利于菱形藻 EPA 的积累。在使用质量浓度方面,三者正交优化的使用质量浓度均有所回落,其中氯化铵的变动最大,变为 5 mg/L,尿素下降了 10 mg/L,硝酸钠回到 1/2 的使用质量浓度。

表 2 菱形藻优化结果

HE06 添加物	单因素优化			正交优化结果		
	最佳质量浓度	生物量产率(mg/L)	EPA 含量(%)	最佳质量浓度	生物量产率(mg/L)	EPA 产率(μg/L)
NaNO <sub>3</sub>	85 mg/L	19.8	0.161	75 mg/L	23.2	81.6
NH <sub>4</sub> Cl	40 mg/L	13.6	0.234	5 mg/L		
尿素	40 mg/L	16.1	0.219	30 mg/L		
维生素 B <sub>1</sub>	0.8 mg/L	6.5	0.257	1.5 mg/L	28.4	249.7
维生素 B <sub>12</sub>	2 μg/L	8.9	0.568	6 μg/L		
生物素	2 μg/L	15.9	0.081	10 μg/L		
IAA	1 mg/L	23.3	0.160	2 mg/L	20.4	36.9
6-BA	0.4 mg/L	18.8	0.045	0.2 mg/L		
赤霉素	0.15 mg/L	16.4	0.221	25 μg/L		
葡萄糖	0.9 g/L	25.4	0.191	1.2 g/L	32.6	503.9
甘油	1.2 g/L	23.6	0.183	2.4 g/L		
NaHNO <sub>3</sub>	1.2 g/L	19.0	0.130	1.2 g/L		

注:菱形藻 HE06 在 1/2 培养基中,硝酸钠的浓度为 75 mg/L,此时生物量产率为 19.5 mg/L,EPA 产率为 31.2 μg/L,进入稳定期时间为 8 d。

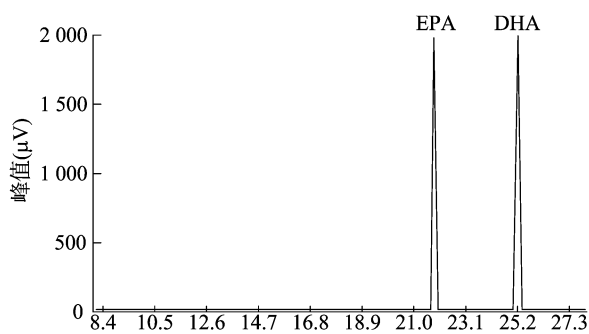
表 2、图 2-e 表明,菱形藻经过维生素正交优化后,生物量产率提升 22.4%,EPA 产率提升 206.0%,与氮源正交优化结果类似,均能有效提高 EPA 产率,且对生物量的影响不大。在使用质量浓度方面,维生素 B<sub>1</sub>、B<sub>12</sub>、生物素的使用质量浓度分别上升了 0.9、2.0、4.0 倍,与氮源优化结果相反。在仅有维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>12</sub>、生物素的培养基中生物量产率低下,分别为 6.5、8.9、15.9 mg/L。

在植物激素正交优化中,不仅生物量产率没有得到提升,EPA 产率也有所下降(图 2-c),表明对菱形藻 HE06 而言,IAA、6-BA、赤霉素的正交并不适于其生物量、EPA 产物的积累。在单因素优化中,仅加入 IAA 对生物量产率具有促进作用,而 6-BA、赤霉素均表现出抑制作用。

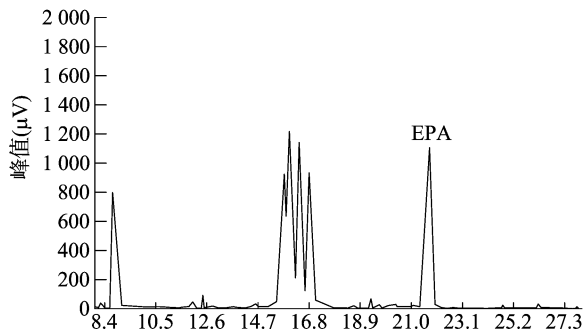
碳源正交试验中,在使用质量浓度方面,除碳酸氢钠不变以外,葡萄糖、甘油的使用质量浓度均有所上升。生物量产率由维生素试验组的 28.4 mg/L 上升至 32.6 mg/L,仅提高了 14.8%。气相色谱测定结果(图 2)显示,在 21.9 min 左右出

现 1 个较大的峰值,表明 EPA 产率得到极大提高,达到 503.9  $\mu\text{g/L}$ ,与维生素试验组相比提高了 101.8%。4 个试验

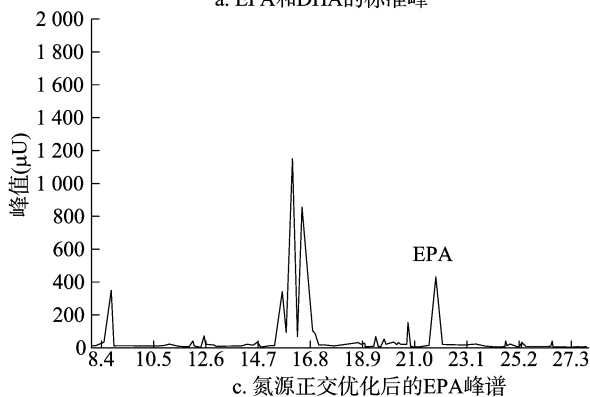
组中氮源、维生素、植物激素、碳源的添加对菱形藻 HE06 的总脂组分影响均不大,EPA 含量主要随总脂含量的升高而升高。



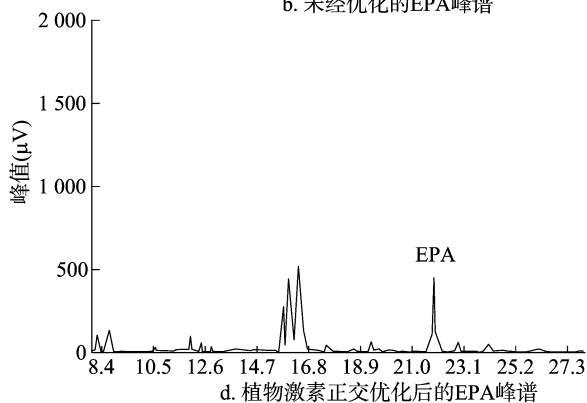
a. EPA和DHA的标准峰



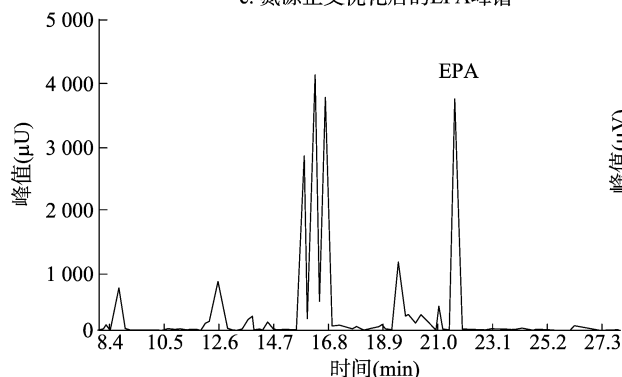
b. 未经优化的EPA峰谱



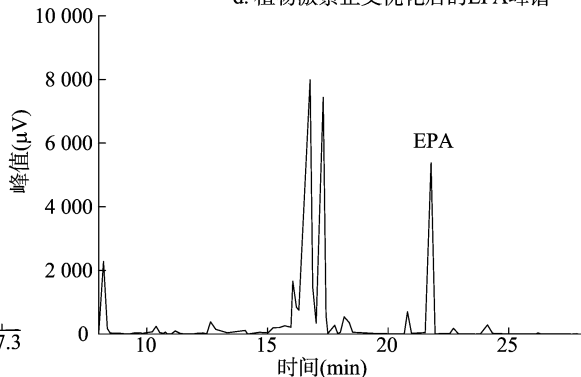
c. 氮源正交优化后的EPA峰谱



d. 植物激素正交优化后的EPA峰谱



e. 维生素正交优化后的EPA峰谱



f. 碳源正交优化后的EPA峰谱

图2 气相色谱测定结果

### 3 结论与讨论

经优化得到硝酸钠、氯化铵、尿素、维生素  $B_1$ 、维生素  $B_{12}$ 、生物素、葡萄糖、甘油、碳酸氢钠的最佳质量浓度分别为 75 mg/L、5 mg/L、30 mg/L、1.5 mg/L、6  $\mu\text{g/L}$ 、10  $\mu\text{g/L}$ 、1.2 g/L、2.4 g/L、1.2 g/L。在该条件下,EPA 产率为 504.8  $\mu\text{g/L}$ ,提高了 15 倍;生物量产率为 32.4 mg/L,提高了 66.2%。本研究同时添加 3 种氮源,不仅促进了菱形藻 HE06 生物量的增加,也促进了微藻 EPA 产量的积累。氨存在于所有细胞器中,微藻对氨态氮的吸收不仅受到环境中氨浓度的影响,还受到环境 pH 值、光照条件、自身对氮源的需求、环境中硝酸盐浓度的影响<sup>[4]</sup>。微藻对氨的持续吸收使环境中的 pH 值下降,pH 值持续下降导致微藻更倾向于吸收硝酸盐,从而使环境中的 pH 值上升。环境中质子浓度的升高对藻细胞具有毒性作用,这种作用可在一定程度上促进产物的积累,而

高浓度的质子能够破坏膜系统从而导致细胞死亡<sup>[5]</sup>;因此,在单因素优化中,最佳氨浓度下菱形藻 HE06 的生物量产率不高,而 EPA 含量却有所增加。铵离子的存在还会抑制微藻对环境中的硝酸盐的吸收,因此氮源正交优化中微藻对氮源的吸收下降<sup>[6]</sup>,使用氨态氮作为氮源时必须使培养基中的 pH 值条件保持稳定<sup>[7-8]</sup>。本研究中菱形藻 HE06 氨的单因素优化在三角锥形瓶中进行,没有持续控制培养基的 pH 值,因此生物量产率较低。微藻对硝酸盐的同化吸收过程须消耗大量的能量和质子,使 pH 值上升,与氨的同化作用相反<sup>[9]</sup>。微藻对尿素的同化作用主要依靠脲酶或尿素氨基水解酶催化完成,这 2 种酶在微藻细胞内的活性均不高;因此,在尿素单因素培养中,菱形藻 HE06 的生物量产率也较低<sup>[10]</sup>。在三者的正交试验中,微藻先后对氨、氮的吸收维持了培养基的 pH 值平衡,而培养基中不断变化的 pH 值刺激了微藻总脂的积累,从而促进 EPA 的积累。

目前,维生素在微藻内的合成代谢过程尚不明确,研究表明,其更多作为乙酰辅酶 A 羧化酶、丙酮酸脱氢酶、 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶等酶的辅因子参与微藻的新陈代谢。单因素及正交结果表明,当培养基中缺乏某种维生素时,会对微藻的生物量产率产生较大影响;当培养基中存在维生素时,其浓度对生物量的影响并不显著。维生素正交对菱形藻 HE06 的 EPA 产率影响较显著,表明向培养基中加入多种维生素能够促进某些微藻生物量及产物的积累<sup>[11]</sup>。

植物激素主要作为促生长因子促进微藻生长或产物的积累,而维生素作为生长因子维持微藻的基本生长需求。在菱形藻 HE06 的培养过程中,培养基中缺乏维生素时表现为微藻生长缓慢、生物量产率低下;而缺乏植物激素并不影响微藻的基本生长需求,反而当加入植物激素时影响微藻的生长,具有促进或抑制作用。

在亚心形扁藻(*P. Subcordiformis*)细胞内,当使用葡萄糖进行兼养时,细胞能够通过糖酵解同化葡萄糖,光合作用也在同步进行,只是光合作用的强度明显变弱<sup>[12]</sup>。对菱形藻 HE06 的单因素优化和正交试验均表明,这 2 种藻能够在有机碳源下兼养。在菱形藻 HE06 优化试验中,生物量产率过低归因于葡萄糖转化效率过低,这与藻种本身的特性<sup>[13]</sup>及光照度有关,过低的光照度[辐射强度低于  $22 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ]导致己糖转运蛋白活性过低,从而降低了葡萄糖通过细胞膜的效率<sup>[14-15]</sup>。在兼养过程中并不是碳源浓度越高、光照度越强越好;过量的碳酸氢钠会使碳酸根与碳酸氢根的离子平衡被破坏,从而形成沉淀;葡萄糖浓度及光照度的增加会抑制某些微藻的生长,同时影响总脂含量<sup>[16]</sup>。对菱形藻 HE06 而言,当葡萄糖浓度大于 0.9 时,其生物量并不随葡萄糖浓度的增加而增加<sup>[17]</sup>。对于某些种类微藻,高浓度葡萄糖可在相当长一段时期内阻碍微藻细胞生长,此时微藻进行分批或连续培养更有优势<sup>[15,18]</sup>。微藻能够以甘油作为仅有碳源,供给能量促进微藻的生长,但当甘油作为唯一氮源时微藻的光合作用会受到甘油的抑制,从而影响微藻生长<sup>[19]</sup>。在菱形藻 HE06 的培养中,碳源加入后其进入稳定期均延长至 15 d,这与葡萄糖浓度或甘油的加入有关<sup>[20]</sup>。在混合碳源的优化下,均能较好促进生物量生长及 EPA 的积累,比单独添加效果更明显。可见,通过异养获得 EPA 产物时,采用多种碳源正交更有利于 EPA 产物积累,促进碳源的利用并节省培养成本。

影响微藻生长及产物积累的因素多种多样,对微藻生长发育的阻碍或促进也有所差异。氮源、维生素、碳源对微藻的生物量及产物积累具有明显作用,对已知藻种进行氮源、维生素、碳源的正交优化更有利于微藻的生长及产物积累。

#### 参考文献:

- [1] Devgoswami C R, Kalita M C, Talukdar J, et al. Studies on the growth behavior of *Chlorella*, *Haematococcus* and *Scenedesmus* sp. in culture media with different concentrations of sodium bicarbonate and carbon dioxide gas [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10 (61): 13128 - 13138.
- [2] Zhukova N V, Aizdaicher N A. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae [J]. Phytochemistry, 1995, 39 (2): 351 - 356.
- [3] 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.
- [4] Hildebrand M. Cloning and functional characterization of ammonium transporters from the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae) [J]. Journal of Phycology, 2005, 41 (1): 105 - 113.
- [5] Peuke A D, Tischner R. Nitrate uptake and reduction of aseptically cultivated spruce seedlings, *Picea abies* (L.) Karst [J]. Journal of Experimental Botany, 1991, 42 (239): 723 - 728.
- [6] Wen Z Y, Chen F. Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 29 (6/7): 341 - 347.
- [7] Lee K, Lee C G. Nitrogen removal from wastewaters by microalgae without consuming organic carbon sources [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002, 12 (6): 979 - 985.
- [8] Crawford N M K, Leustek T, et al. Nitrogen and sulfur [J]. Biochemistry and Molecular Biology of Plants, 2000: 786 - 849.
- [9] Kaplan D, Richmond A E, Dubinsky Z, et al. Algal nutrition [J]. Handbook of Microalgal Mass Culture, 1986: 147 - 198.
- [10] Sañudo W S A, Gobler C J, Okbamichael M, et al. Regulation of phytoplankton dynamics by vitamin B<sub>12</sub> [J]. Geophysical Research Letters, 2006, 33 (4).
- [11] Marquez F J, Sasaki K, Kakizono T, et al. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1993, 76 (5): 408 - 410.
- [12] Perez G O, Escalante F M, De - Bashan L E, et al. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products [J]. Water Research, 2011, 45 (1): 11 - 36.
- [13] Xie J L, Zhang Y X, Li Y, et al. Mixotrophic cultivation of *Platymonas subcordiformis* [J]. Journal of Applied Phycology, 2001, 13 (4): 343 - 347.
- [14] Sauer N. Hexose - transport - deficient mutants of *Chlorella vulgaris* [J]. Planta, 1986, 168 (1): 139 - 144.
- [15] Cheirsilp B, Torpee S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed - batch cultivation [J]. Bioresource Technology, 2012, 110 (2): 510 - 516.
- [16] Biomass L Y. Lipid productivities of *Chlorella Vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions [J]. Biotechnology Letters, 2009, 31 (7): 1043 - 1049.
- [17] Day J G, Tsavalos A J. An investigation of the heterotrophic culture of the green alga *Tetraselmis* [J]. Journal of Applied Phycology, 1996, 8 (1): 73 - 77.
- [18] Tan C K, Johns M R. Fatty acid production by heterotrophic *Chlorella saccharophila* [J]. Hydrobiologia, 1991, 215 (1): 13 - 19.
- [19] Ogawa T, Aiba S. Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1981, 23 (5): 1121 - 1132.
- [20] Aubert S, Gout E, Bligny R, et al. Multiple effects of glycerol on plant cell metabolism. Phosphorus - 31 nuclear magnetic resonance studies [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1994, 269 (34): 21420 - 21427.