

碳源对粉核油球藻生长和脂肪酸组成特性的影响

李爱芬 刘 然 刘晓娟 徐 宁 张成武 段舜山

(暨南大学水生生物研究所, 广州 510632)

摘要:研究了不同碳源类型 (CO_2 、 NaHCO_3 和葡萄糖) 及其浓度对粉核油球藻 (*Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP 2078) 生长及脂肪酸组成的影响。结果表明: (1) 培养液中适量添加碳源促进了粉核油球藻的生长, 三种碳源的适宜添加浓度分别是 0.5% CO_2 、5mmol/L NaHCO_3 和 20g/L 葡萄糖, 对数生长末期的细胞密度分别是对照的 3.10 倍、1.47 倍和 2.78 倍; (2) 除了低浓度葡萄糖外, 其他碳源类型和浓度均降低了 TPUFA 和 EPA 占总脂肪酸的比例, 提高了 TSFA 的比例, 胞内 EPA 和 TSFA 含量均下降; (3) 低浓度碳源提高了 TSFA 和 EPA 产量。通入 0.5% CO_2 培养的 EPA 和 TSFA 产量分别是对照的 2.30 倍和 2.69 倍, 5mmol/L NaHCO_3 培养的 TSFA 产量是对照的 1.85 倍, 5g/L 和 10g/L 葡萄糖培养的 EPA 和 TSFA 产量最高分别可达对照的 2.11 倍和 1.58 倍。因此, 通入低浓度 CO_2 最有利于粉核油球藻的生长以及 EPA 和饱和脂肪酸的生产, EPA 和饱和脂肪酸含量的提高主要是通过生物量的增大来实现的。

关键词:粉核油球藻; 碳源; 生长; EPA; 饱和脂肪酸

中图分类号: Q494 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)03-0461-07

海洋微藻能够合成许多结构和生理功能独特的生物活性物质, 包括抗生素、毒素、多不饱和脂肪酸、色素和微藻燃料 (高含量脂类和碳氢化合物) 等。海洋微藻的脂肪酸组成一直以来是研究的重点, 其中, 长链多不饱和脂肪酸和短链饱和脂肪酸由于具有很高的应用价值, 因此成为微藻生物技术研发的热点之一。多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acids, PUFA s) 对人体有重要的生理作用, 特别是二十碳五烯酸 (Eicosapentaenoic acid, EPA) 和二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA) 对预防心脏病、动脉硬化、癌症、风湿关节炎、气喘和糖尿病等疾病具有明显的效果^[1,2]。许多海洋微藻是 PUFA s 的初级生产者, 富含 EPA, 提取工艺简单, 因此开发微藻生产 EPA 具有很大的发展前景。大多数微藻中碳链较短的饱和脂肪酸 (如 14:0, 16:0) 含量较高^[3], 短链饱和脂肪酸可以作为生物柴油原料。化石燃料缺乏和环境恶化迫使人类寻求新的生物能源, 生物柴油作为一种环保、可再生能源已经成为各国的研究热点。微藻的光合效率高, 具有适应能力强、生长周期短、生物产量高等特点, 因此, 利用微藻

生产生物柴油的研究越来越受到人们重视。

粉核油球藻 (*Pinguicoccus pyrenoidosus*) 是在太平洋发现的一种球形海洋单细胞微藻, 属于新定名的 Pinguiphyceae 纲, *Pinguicoccus* 属^[4]。该藻的总脂含量高达 27.45%, 脂肪酸的组成特征是二十碳五烯酸与 14:0, 16:0 含量较高^[5], 其他种类的脂肪酸含量较低, 因此粉核油球藻是生产多不饱和脂肪酸和短链饱和脂肪酸的优良藻株。目前, 国内关于粉核油球藻的研究相对较少, 本实验室对其在光照、温度、盐度、氮源和磷源等方面做过研究。为了提高粉核油球藻的生物量、EPA 含量和短链饱和脂肪酸含量, 本文探讨了不同碳源及其浓度对其生长与脂肪酸组成的影响, 寻找利用粉核油球藻生产 EPA 和饱和脂肪酸的最适培养条件, 为规模化培养该藻提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 藻种来源 粉核油球藻 (*Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP 2078) 由张成武教授购自美国, 本实验室保藏。试验藻种经抗生素法制备无菌藻株。

收稿日期: 2007-09-20; 修订日期: 2008-11-29

基金项目: 广东省科技攻关项目 (2005B33201001) 资助

作者简介: 刘然 (1982—), 女, 山东莱芜人; 硕士; 主要从事微藻生理生化研究

通讯作者: 李爱芬, E-mail: tiger@jnu.edu.cn

1.2 试验方法 采用 h/2 培养基^[6],培养温度为 (24 ±1) ℃,光照强度约 100μmol/m² · s,光暗周期为 12L 12D。通 CO₂试验:压缩空气与高纯 CO₂ 混合均匀。用气体流量计测定 CO₂ 流量 (I₁)和总气体的流量 (I₂),利用以下公式计算 CO₂ 体积分数: [CO₂ % = (I₁ / I₂) ×100%]。设置 CO₂ 体积分数为 0.5%、1.0%、1.5%。添加 NaHCO₃ 试验:在培养的第 1 天一次性加入 NaHCO₃,浓度设置为 5、10、20、25mmol/L。添加葡萄糖试验:在培养的第 1 天一次性加入葡萄糖,浓度设置为 5、10、20、40g/L。以不加碳源为对照。

将培养至对数生长期的藻种转接到装有 300mL 无菌培养液的 500mL 三角瓶中,初始 A₆₈₃ 为 0.07,接种密度为 6 ×10⁵ cells/mL 左右。静置培养,每天摇瓶。试验设 3 个平行。

1.3 生长的测定 隔天取适量藻液,用血球计数板在显微镜下计数,每个样计数 2 次,取平均值。

1.4 藻体的收获 收集培养至对数末期的藻液,离心收集藻细胞,双蒸水洗涤 3 次后,采用 ALPHR 2-4 (德国)冷冻干燥,藻粉于 - 20 ℃ 冰箱保存备用。

1.5 脂肪酸的分析测定 脂肪酸的提取参照 Bi-gogno^[7] 的方法。脂肪酸的测定采用 ThermoFinnigan TRACE GC-MS 型气相色谱—质谱联用仪。色谱条件: DB-5 柱 (30m ×0.25mm);进样口温度 260 ℃;程序升温,60 ℃ 保留 2min,以 30 ℃/min 升到 120 ℃,再以 1.5 ℃/min 升高到 250 ℃ 保留 2min;载气为高纯氮气,柱流量为 1.2mL /min。质谱条件:电离方式为 EI,电离电压为 70eV。使用面积归一法计算各组分的相对百分含量。

2 结 果

2.1 CO₂ 对粉核油球藻生长和脂肪酸组成的影响

低浓度 CO₂ 促进粉核油球藻细胞的生长 (图 1)。当 CO₂ 体积分数为 0.5% 时,细胞密度是对照的 3.10 倍。当 CO₂ 体积分数升高至 1% 时,细胞密度仍高于对照,但仅是 0.5% CO₂ 时的一半左右。通入 1.5% 的 CO₂,藻细胞在生长初期与对照组无差异,第 8 天进入稳定期,生长低于对照。CO₂ 含量较低 (0.5%) 时,脂肪酸组成基本不发生变化,胞内 EPA 和 TSFA 含量降低,由于生物量的大幅度提高, EPA 和 TSFA 产量均有明显提高,分别是对照的 2.30 倍和 2.69 倍。随着 CO₂ 体积分数的增大, EPA 和 TPUFA 比例降低, TSFA 比例提高,胞内 EPA 和 TSFA 含量均降低 (表 1)。

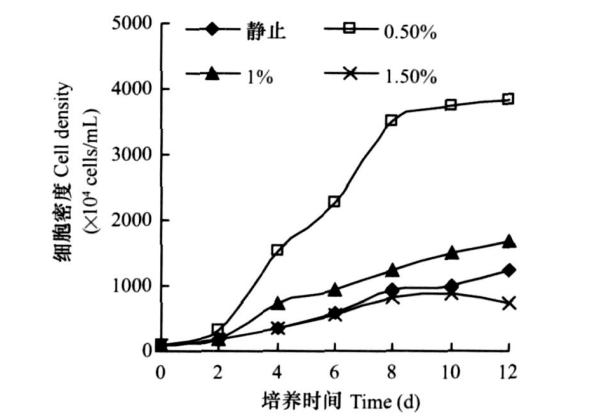


图 1 CO₂ 对粉核油球藻 CCMP2078 生长的影响
Fig. 1 Effects of CO₂ on the growth of *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP2078

表 1 CO₂ 对粉核油球藻 CCMP 2078 脂肪酸组成的影响
Tab. 1 Effects of CO₂ on the composition of fatty acids of *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP 2078

脂肪酸组成 Fatty acids of total fatty acids	CO ₂ 浓度 Concentrations of CO ₂ (%)			
	静止	0.5%	1.0%	1.5%
C14 0	34.30 ±0.28	11.26 ±0.09	15.47 ±0.14	33.17 ±0.20
C15 0	—	0.45 ±0.07	—	0.43 ±0.06
C16 0	22.62 ±0.25	40.47 ±0.23	63.78 ±0.56	26.73 ±0.22
C16 1	—	—	—	—
C18 0	0.72 ±0.04	2.41 ±0.08	0.07 ±0.02	1.06 ±0.08
C18 1	3.00 ±0.16	3.20 ±0.14	1.71 ±0.10	6.19 ±0.07
C18 2	2.00 ±0.10	2.06 ±0.07	0.46 ±0.08	2.07 ±0.05
C20 4	2.63 ±0.13	1.68 ±0.15	—	1.63 ±0.05
C20 5	24.32 ±0.23	19.69 ±0.24	—	10.92 ±0.24

续表

脂肪酸组成 Fatty acids of total fatty acids	CO ₂ 浓度 Concentrations of CO ₂ (%)			
	静止	0.5%	1.0%	1.5%
C22 4	0.56 ±0.08	2.07 ±0.11	0.93 ±0.09	1.39 ±0.06
C22 5	5.61 ±0.24	7.56 ±0.13	2.78 ±0.11	8.14 ±0.10
C22 6	—	—	—	1.82 ±0.07
TSFA	57.64 ±0.28	54.59 ±0.56	79.32 ±0.49	61.39 ±0.53
TPUFA	35.12 ±0.26	33.06 ±0.21	4.17 ±0.25	25.97 ±0.18
EPA content (% dry weight)	6.18 ±0.17	4.19 ±0.07	—	1.52 ±0.05
TSFA content (% dry weight)	14.64 ±0.24	11.63 ±0.34	10.71 ±0.20	3.61 ±0.08
EPA yield (mg/L)	7.66 ±0.15	17.60 ±0.45	—	1.79 ±0.10
TSFA yield (mg/L)	18.15 ±0.27	48.85 ±0.53	24.20 ±0.16	4.26 ±0.08

注: TFA,总脂肪酸; TSFA,总饱和脂肪酸; TPUFA,总多不饱和脂肪酸; —,未检测到;下同
Note: TFA, Total fatty acids; TSFA, Total saturated fatty acids; TPUFA, Total polyunsaturated fatty acids; -, Not detected; The same as follows

2.2 NaHCO₃ 对粉核油球藻生长和脂肪酸组成的影响

试验结果表明,低浓度 NaHCO₃ 有利于粉核油球藻的生长(图 2)。当 NaHCO₃ 浓度为 5mmol/L 和 10mmol/L 时,最大细胞密度分别为对照的 1.47 倍和 1.30 倍。NaHCO₃ 浓度大于 20mmol/L 时,藻细胞生长受到抑制。培养液中添加 NaHCO₃ 降低了 TPUFA 和 EPA 占总脂肪酸的比例,提高了 TSFA 的比例,同时胞内 EPA 含量和产量也降低。低浓度 NaHCO₃ 提高了胞内 TSFA 含量和产量(表 2)。当 NaHCO₃ 浓度为 5mmol/L 时,TSFA 比例、胞内 TSFA 含量和产量均为最高值,分别为 65.02%、19.31% 和 33.60mg/L,分别是对照的 1.13 倍、1.32 倍和 1.85 倍。

2.3 葡萄糖对粉核油球藻生长和脂肪酸组成的影响

培养液中添加葡萄糖促进了粉核油球藻 CC-MP 2078 的生长。葡萄糖浓度为 5 - 20g/L 范围内,随着葡萄糖浓度的增大,藻细胞生长明显加快,当葡萄糖浓度为 20g/L 时,对数末期的细胞密度达最大值,是对照的 2.78 倍(图 3)。低浓度葡萄糖提高了 EPA 和 TPUFA 占总脂肪酸的比例,降低了 TSFA 比例,葡萄糖浓度超过 10g/L 时呈相反趋势。胞内 EPA 和 TSFA 含量均降低(表 3)。当葡萄糖浓度为 5g/L 和 10g/L 时,EPA 和 TSFA 产量均高于对照,最高分别可达对照的 2.11 倍和 1.58 倍。当葡萄糖浓度为 40g/L 时,TSFA 含量高达 57.97%。

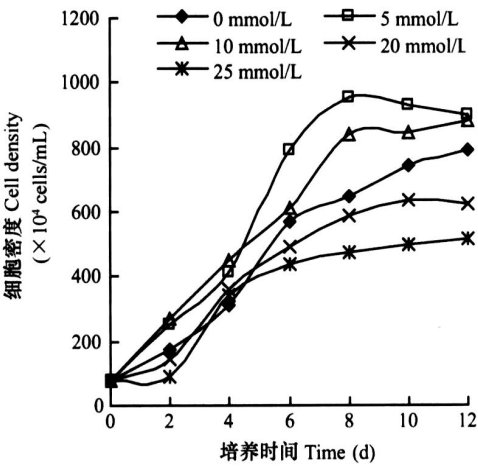


图 2 NaHCO₃ 对粉核油球藻 CCMP2078 生长的影响
Fig. 2 Effects of NaHCO₃ on the growth of *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP2078

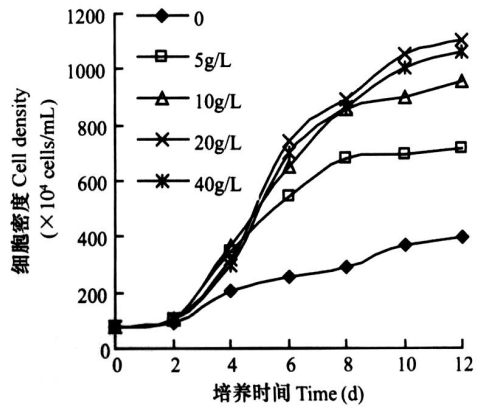


图 3 葡萄糖对粉核油球藻 CCMP2078 生长的影响
Fig. 3 Effects of glucose on the growth of *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP2078

表 2 NaHCO₃ 对粉核油球藻 CCMP 2078 脂肪酸组成的影响

Tab. 2 Effects of NaHCO₃ on the composition of fatty acids of *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP 2078

脂肪酸组成 Fatty acids of total fatty acids	NaHCO ₃ 浓度 Concentrations of NaHCO ₃ (mmol/L)				
	0	5	10	20	25
C14 0	34.30 ±0.33	34.73 ±0.21	27.28 ±0.32	34.63 ±0.41	32.30 ±0.34
C15 0	—	0.28 ±0.03	0.51 ±0.06	0.64 ±0.05	0.70 ±0.05
C16 0	22.62 ±0.25	28.61 ±0.24	30.22 ±0.24	33.98 ±0.43	33.99 ±0.35
C16 1	—	0.43 ±0.11	0.58 ±0.07	—	0.57 ±0.04
C18 0	0.72 ±0.13	1.40 ±0.22	2.47 ±0.10	1.42 ±0.14	1.64 ±0.09
C18 1	3.00 ±0.11	2.51 ±0.13	2.86 ±0.05	1.98 ±0.12	2.02 ±0.11
C18 2	2.00 ±0.08	2.16 ±0.12	2.36 ±0.14	1.47 ±0.22	1.25 ±0.10
C20 4	2.63 ±0.06	2.27 ±0.09	2.10 ±0.15	1.80 ±0.04	1.74 ±0.10
C20 5	24.32 ±0.27	13.94 ±0.21	12.96 ±0.20	8.89 ±0.20	7.62 ±0.14
C22 4	0.56 ±0.03	1.78 ±0.08	3.04 ±0.08	3.93 ±0.09	4.03 ±0.21
C22 5	5.61 ±0.07	8.72 ±0.11	9.72 ±0.23	7.77 ±0.10	8.37 ±0.26
C22 6	—	0.93 ±0.05	0.88 ±0.20	0.80 ±0.08	0.98 ±0.08
TSFA	57.64 ±0.53	65.02 ±0.54	60.48 ±0.56	70.67 ±0.52	68.63 ±0.49
TPUFA	35.12 ±0.24	29.80 ±0.21	31.06 ±0.51	24.66 ±0.21	23.99 ±0.23
EPA content (% dry weight)	6.18 ±0.05	4.14 ±0.10	2.98 ±0.07	1.75 ±0.08	1.64 ±0.05
TSFA content (% dry weight)	14.64 ±0.08	19.31 ±0.22	13.91 ±0.11	13.92 ±0.23	14.76 ±0.08
EPA yield (mg/L)	7.66 ±0.07	7.20 ±0.14	5.45 ±0.08	2.15 ±0.10	1.53 ±0.08
TSFA yield (mg/L)	18.15 ±0.12	33.60 ±0.26	25.46 ±0.20	17.12 ±0.08	13.73 ±0.21

表 3 葡萄糖对粉核油球藻 CCMP 2078 脂肪酸组成的影响 (%总脂肪酸)

Tab. 3 Effects of glucose on the composition of fatty acids of *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP 2078 (% TFA)

脂肪酸组成 Fatty acids of total fatty acids	葡萄糖浓度 Concentrations of glucose (g/L)				
	0	5	10	20	40
C14 0	34.30 ±0.53	2.86 ±0.03	2.93 ±0.07	24.38 ±0.37	32.32 ±0.23
C15 0	—	—	—	—	—
C16 0	22.62 ±0.37	4.20 ±0.07	3.97 ±0.22	21.04 ±0.31	24.58 ±0.27
C16 1	—	—	—	—	0.47 ±0.01
C18 0	0.72 ±0.14	1.10 ±0.10	0.93 ±0.03	1.13 ±0.04	1.07 ±0.10
C18 1	3.00 ±0.08	18.52 ±0.26	19.18 ±0.24	32.63 ±0.27	22.02 ±0.14
C18 2	2.00 ±0.12	1.10 ±0.07	0.97 ±0.08	1.77 ±0.09	0.96 ±0.04
C20 4	2.63 ±0.24	2.44 ±0.10	2.37 ±0.10	1.30 ±0.04	0.41 ±0.03
C20 5	24.32 ±0.37	39.65 ±0.45	39.07 ±0.35	12.75 ±0.12	4.54 ±0.01
C22 4	0.56 ±0.05	1.79 ±0.08	2.01 ±0.07	—	—
C22 5	5.61 ±0.11	21.70 ±0.15	22.33 ±0.14	—	—
C22 6	—	2.73 ±0.06	2.71 ±0.08	—	—
TSFA	57.64 ±0.67	8.16 ±0.11	7.83 ±0.11	46.55 ±0.51	57.97 ±0.52
TPUFA	35.12 ±0.52	69.41 ±0.64	69.46 ±0.56	15.82 ±0.22	5.91 ±0.11
EPA content(% dry weight)	6.18 ±0.08	8.09 ±0.13	6.49 ±0.14	1.61 ±0.08	0.59 ±0.07
TSFA content(% dry weight)	14.64 ±0.11	14.16 ±0.20	11.53 ±0.13	5.86 ±0.13	7.59 ±0.04
EPA yield(mg/L)	7.66 ±0.13	16.18 ±0.16	16.16 ±0.16	4.12 ±0.09	1.49 ±0.06
TSFA yield(mg/L)	18.15 ±0.21	28.32 ±0.24	28.71 ±0.21	15.00 ±0.10	19.20 ±0.10

3 讨 论

研究表明,适量添加碳源有利于粉核油球藻的生长。微藻可利用的碳源形式多样,包括无机碳源和有机碳源。由于 CO_2 是光合作用的底物,因此在微藻培养过程中经常通入 CO_2 来促进藻细胞的生长,如牟氏角毛藻 (*Chaetoceros muelleri*)、极大螺旋藻 (*Spirulina maxima*)、湛江叉鞭金藻 (*Dicrateria zhanjiangensis*)和盐藻 (*Dunaliella*)等^[8-10]。适量供应 CO_2 能显著促进微藻生长,但海洋微藻对 CO_2 的吸收和利用能力有一定的限度,过量的 CO_2 会降低培养液的 pH,所以 CO_2 浓度过高会抑制藻细胞的生长。粉核油球藻在 CO_2 体积分数为 0.5% 时,生长速率最快,细胞密度最高,随着浓度的升高,藻细胞生长呈下降趋势。在通气中含 1% CO_2 时,微绿球藻 (*Nannochloropsis* sp.) 细胞生长最快,其最大生长速率可达不添加 CO_2 时的 1.8 倍^[11]。绝大多数能吸收利用 HCO_3^- 的微藻具有较低的 CO_2 补偿点^[12]。如通入 1% CO_2 时,三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricomutum*)^[13]和紫球藻 (*Porphyridium purpureum*)^[14]等生物量均明显提高。许多微藻具有将 HCO_3^- 转化为 CO_2 的碳酸酐酶,因此具有利用 HCO_3^- 的能力^[15]。 NaHCO_3 不仅起到碳源的作用,而且起到缓冲剂的作用。h/2 培养液的初始 pH 为 7.7,添加适量的 NaHCO_3 可以有效地提高藻液的 pH,从而促进粉核油球藻细胞的快速生长。本试验中低浓度 NaHCO_3 有利于粉核油球藻的生长,可能原因为一次性添加 NaHCO_3 浓度过高时,藻液 pH 偏碱性,最终导致 $\text{HCO}_3^- + \text{OH}^- = \text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O}$,大部分 HCO_3^- 不能被藻细胞利用,从而限制了藻细胞的生长。大量研究表明,添加适量的 NaHCO_3 是提高微藻生物量的一种方法,如等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*)、绿色巴夫藻 (*Pavlova viridis*)、小球藻 (*Chlorella*)、亚心形扁藻 (*Platymonas subcordiformis*)、塔胞藻 (*Pyramimonas*)和小新月菱形藻 (*Nitzschia closterium*)等饵料藻均已达到较高的细胞密度^[16-18]。除了无机碳源外,许多微藻具有利用有机碳源进行兼养和异养生长的能力,葡萄糖是微藻最广泛利用的有机碳源形式。研究表明,粉核油球藻可以利用葡萄糖进行兼养生长,20 g/L 葡萄糖在对数生长末期的细胞密度是对照的 2.78 倍。由于兼养生长包括光合自养生长和有机物光异养生长^[19],因此能够显著提高生物量,兼养生物量的显著提高

为微藻高密度培养提供了一条有效途径,如钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*)^[20]、亚心形扁藻 (*Platymonas subcordiformis*)^[21]和微绿球藻 (*Nannochloropsis* sp.)^[22]利用葡萄糖生长的最大生物量分别是自养的 5.1 倍、6 倍和 1.4 倍。

碳源是微藻生长的必需元素之一,除了影响藻细胞生长外,对微藻的脂肪酸组成也有影响,并且不同碳源类型和浓度对脂肪酸组成的影响存在差异。适量通气可以提高培养液中溶解氧的浓度,由于在脂肪酸的代谢途径中,分子氧参与脂肪酸的去饱和过程,因此大多数情况下,适量通气可以提高脂肪酸的不饱和度。但是,如果通气速率过高,会导致细胞内脂肪含量的下降,可能是脂肪代谢在此条件下加快的结果。此外,二烯酸到三烯酸的转化受到抑制,而这是微藻合成 PUFA 的必经途径^[23]。微绿球藻 (*Nannochloropsis* sp.) 在通入 0.5% CO_2 浓度时, EPA 含量最高^[11]。本文研究表明,通入 0.5% CO_2 没有改变的脂肪酸不饱和度,通入 1.5% CO_2 降低了 TPUFA 和 EPA 占总脂肪酸的比例。关于 NaHCO_3 对微藻脂肪酸组成影响的报道较少,因此 NaHCO_3 及其浓度对微藻脂肪酸合成的机理尚不清楚。本文研究表明,随着 NaHCO_3 浓度的升高,TPUFA 和 EPA 占总脂肪酸的比例逐渐降低,TSFA 比例逐渐升高。郑爱榕等^[24]研究发现, NaHCO_3 的浓度为 2.5 g/dm³ 时,螺旋藻饱和脂肪酸含量升高 (尤其 16:0 含量达 53.93%),但多不饱和脂肪酸含量降低,且不含亚麻酸。当 NaHCO_3 浓度达 4.5 g/dm³,多不饱和脂肪酸亚麻酸含量达最高值 12.51%,但饱和脂肪酸含量却明显降低。有机碳兼养积累的大多是饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸,可能原因为自养条件下光合作用和脂合成酶将 CO_2 充分利用,生物合成 PUFA 途径中的去饱和过程需要分子氧,兼养条件下的 O_2 水平较自养下降,因此降低了脂肪酸的不饱和度^[25]。但是兼养脂肪酸的组成与有机碳种类和藻株也有很大关系。本文低浓度葡萄糖提高了 TPUFA 和 EPA 占总脂肪酸的比例,降低了 TSFA 比例,而高浓度葡萄糖呈相反趋势。三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricomutum* UTEX-640) 兼养培养的 EPA 比例与有机碳有关,乳酸盐显著提高了 EPA 比例,淀粉降低了 EPA 比例,甘油和甘氨酸对 EPA 比例基本没有影响^[26]。

尽管通入 0.5% CO_2 降低了 EPA 和 TSFA 占总脂肪酸的比例,但是 EPA 和 TSFA 产量显著高于对照,分别是对照的 2.30 倍和 2.69 倍。低浓度葡萄糖

糖既提高了 EPA 和 TSFA 占总脂肪酸的比例,又提高了 EPA 和 TSFA 产量,最高产量分别可达对照的 2.11 倍和 1.58 倍。利用微藻培养生产活性物质,一般通过两条途径来提高胞内活性物质的含量,一是提高培养系统内细胞的生物量,二是通过改变培养条件来提高胞内组分比例。因此,低浓度葡萄糖通过以上两种途径来提高 EPA 和饱和脂肪酸的产量,而通入低浓度 CO_2 主要是通过生物量的增大来提高 EPA 和饱和脂肪酸的产量。

参考文献:

- [1] Nordoy A. Is there a rational use for n-3 fatty acids (fish oils) in clinical medicine [J]? *Drugs*, 1991, **42**: 331—342
- [2] Gill I, Valivety R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence biological activities and applications [J]. *Trends in Biotechnology*, 1997, **15**: 401—409
- [3] Li H F, Zhou H Q. Comparative studies on fatty acid composition of marine microalgae [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1999, **30**(1): 34—40 [李荷芳, 周汉秋. 海洋微藻脂肪酸组成的比较研究. 海洋与湖沼, 1999, **30**(1): 34—40]
- [4] Andersen R A, Potter D, Bailey J C. *Pinguicoccus pyrenoidosus* gen. et sp. nov. (Pinguicophyceae), a new marine coccoid alga [J]. *Phycological Research*, 2002, **50**: 57—65
- [5] Kawachi M, Inouye I, Honda D, et al. The Pinguicophyceae class of photosynthetic stramenopiles whose members produce large amounts of omega-3 fatty acids [J]. *Phycological Research*, 2002, **50**: 31—47
- [6] Guillard R R L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates [M]. New York: Plenum Press 1975, 29—60
- [7] Biggno C, Khozin-Goldberg I, Cohen Z. Accumulation of arachidonic acid-rich triacylglycerols in the microalga *Parietochloris incisa* (Trebuxiophyceae, Chlorophyta) [J]. *Phytochemistry*, 2002, **60**: 135—143
- [8] Hu H H, Gao K S. Effects of double atmospheric CO_2 on the growth and photosynthesis of *Chaetoceros muelleri* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(6): 636—639 [胡晗华, 高坤山. CO_2 浓度倍增对牟氏角毛藻生长和光合作用的影响. 水生生物学报, 2001, **25**(6): 636—639]
- [9] Xia J R, Gao K S. Effects of high CO_2 concentration on growth and photosynthesis of *Spirulina maxima* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(5): 474—480 [夏建荣, 高坤山. 高浓度 CO_2 对极大螺旋藻生长和光合作用的影响. 水生生物学报, 2001, **25**(5): 474—480]
- [10] Wu Y, Sun J M, Sun P H, et al. Effects of CO_2 concentration on efficiently cultivating *Dicrateria zhanjiangensis* and *Dunaliella* sp. in photobioreactor [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(6): 741—744 [吴垠, 孙建明, 孙培海, 等. CO_2 浓度对光生物反应器高效培养的湛江叉鞭金藻和盐藻的影响. 水产学报, 2004, **28**(6): 741—744]
- [11] Xu F, Hu H H, Cong W, et al. Effects of air flow rate and CO_2 concentration on the growth of *Nannochloropsis* sp. and EPA accumulation in an airlift photobioreactor [J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2004, **4**(5): 457—461 [徐芳, 胡晗华, 丛威, 等. 通气量和 CO_2 对 *Nannochloropsis* sp. 在光生物反应器中的生长和 EPA 合成的影响. 过程工程学报, 2004, **4**(5): 457—461]
- [12] Yue G F, Wang J X, Zhu M Y, et al. Progress of inorganic carbon acquisition by algae (): mechanism and regulation [J]. *Marine Sciences*, 2003, **27**(6): 31—34 [岳国峰, 王金霞, 朱明远, 等. 藻类无机碳营养的研究进展. 藻类利用无机碳的机理及其调节. 海洋科学, 2003, **27**(6): 31—34]
- [13] Shifrin N S, Chisholm S W. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles [J]. *Journal of Phycology*, 1981, **17**: 374—384
- [14] Ohta S, Chang T, Aozasa O, et al. Alteration in fatty acid composition of marine red alga *Porphyridium purpureum* by environmental factor [J]. *Botanica Marina*, 1993, **36**: 103—107
- [15] Raven J A. Photosynthetic and non-photosynthetic roles of carbonic anhydrase in algae and cyanobacteria [J]. *Phycologia*, 1995, **34**(2): 93—101
- [16] Liang Y, Mai K S, Sun S C, et al. Effect of NaHCO_3 concentration on growth of *Isochrysis galbana* 3011 strain, Tahitian *Isochrysis galbana* strain and *Pavlova viridis* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, **8**(1): 37—40 [梁英, 麦康森, 孙世春, 等. NaHCO_3 浓度对等鞭藻 3011、等鞭藻塔溪堤品系和绿色巴夫藻生长的影响. 中国水产科学, 2001, **8**(1): 37—40]
- [17] Liang Y, Mai K S, Sun S C, et al. Effect of NaHCO_3 concentration on the growth of *Pyramidomonas* sp., *Chlorella* spp. and *Nitzschia closterium* [J]. *Journal of Oceanography of Huanghai & Bohai Seas*, 2001, **19**(2): 71—76 [梁英, 麦康森, 孙世春, 等. NaHCO_3 浓度对塔胞藻、小球藻和新月菱形藻生长的影响. 黄渤海海洋, 2001, **19**(2): 71—76]
- [18] Zhang H J, Pan S Y, Li Y G. Acceleration of NaHCO_3 on growth in the culture of *Platymonas subcordiformis* [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2001, **20**(3): 202—204 [张华军, 潘双叶, 李元广. NaHCO_3 在亚心形扁藻培养中的作用. 浙江海洋学院学报 (自然科学版), 2001, **20**(3): 202—204]
- [19] Facundo J M, Sasaki K, Kakizono T, et al. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions [J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1993, **76**: 408—410
- [20] Chen F, Zhang Y. High cell density mixotrophic culture of on *Spirulina platensis* glucose for phycocyanin production using a fed-batch system [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, **20**: 221—224
- [21] Xie J L, Zhang Y X, Li Y G, et al. Mixotrophic cultivation of *Platymonas subcordiformis* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2001, **13**: 343—347
- [22] Xu F, Hu H H, Cong W, et al. Effect of organic carbon sources on growth and photosynthesis of *Nannochloropsis* sp. [J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2003, **3**(6): 560—563

- [徐芳, 胡晗华, 丛威, 等. 有机碳源对产 EPA 微藻 *Nannochloropsis* sp. 生长及光合作用的影响. 过程工程学报, 2003, 3(6): 560—563]
- [23] Wichien Y, Ward O P. ω -3 fatty acids: Alternative sources of production [J]. *Process Biochemistry*, 1989, 8(24): 117—125
- [24] Zheng A R, Li W Q, Qu L, et al. Effects of nutrient on fatty acid composition in *Spirulina platensis* [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2001, 20: 52—56 [郑爱榕, 李文权, 曲琳, 等. 营养盐对螺旋藻脂肪酸组成和含量的影响. 台湾海峡, 2001, 20: 52—56]
- [25] Radwan S S, Mangold H K. Biochemistry of lipids in plant cell cultures [J]. *Advances in Biochemical Engineering*, 1980, 16: 109—133
- [26] Cerón Garcá M C, Sánchez Miró A, Fernández Sevilla JM, et al. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40: 297—305

EFFECTS OF CARBON SOURCES ON GROWTH AND FATTY ACID COMPOSITION OF PINGUIOCOCCUS PYRENOIDOSUS CCMP 2078

LIAI-Fen, LIU Ran, LIU Xiao-Juan, XU Ning, ZHANG Cheng-Wu and DUAN Shun-Shan

(Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632)

Abstract: Microalgae are potential sources of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), mainly EPA (Eicosapentaenoic acid) and DHA (Docosahexaenoic acid). However, the EPA productivity of microalgae is lower compared with bacteria and fungi, and the reason is mainly the low growth rate and biomass under photoautotrophic conditions. To promote the EPA productivity, culture conditions such as culture temperature, irradiance, pH, nutrition sources and concentrations have been investigated. Nevertheless, some microalgae grow rapidly and have a higher biomass under mixotrophic conditions than which under photoautotrophic conditions. *Pinguicoccus pyrenoidosus* belongs to Pinguiphyceae, *Pinguicoccus* genera. The percentage of crude lipid content of the microalgae is 27.45%, among which EPA and saturated fatty acids (14.0, 16.0) are high, but the contents of other kinds of fatty acids are very low. So *Pinguicoccus pyrenoidosus* is a good material for producing PUFAs and saturated fatty acids. So far, there is little information about the mixotrophic growth on the growth rate and fatty acid composition of the microalgae. In order to determine the optimal culture conditions, EPA productivity and saturated fatty acids productivity, effects of different carbon resources (inorganic carbon compounds and organic carbon compounds) on the growth and fatty acid composition in *P. pyrenoidosus* CCMP 2078 were investigated. The experimental method included the following three parts: First, three different concentration levels of CO_2 were set, namely 0.5%, 1.0% and 1.5%; Second, four different concentration levels of NaHCO_3 were set, namely 5, 10, 20 and 25 mmol/L; Third, four different concentration levels of glucose were set, namely 5, 10, 20 and 40 g/L, respectively. Parameters of cell density and fatty acid composition were measured. The results showed that (1) Growth of *P. pyrenoidosus* CCMP 2078 was promoted by adding proper concentrations of carbon sources. The optimal concentrations of carbon sources for growth were 0.5% CO_2 , 5 mmol/L NaHCO_3 and 20 g/L glucose, and the cell density of late logarithmic phase were 3.10-fold, 1.47-fold and 2.78-fold of that obtained under control; (2) When added the carbon sources except the low concentration of glucose, the percentages of TPUFA (Total polyunsaturated fatty acids) and EPA, and cell EPA and TSFA (Total saturated fatty acids) content were all lowered, but the percentage of TSFA was increased; (3) The yield of SFAs (Saturated fatty acids) and EPA were enhanced when added low concentrations of carbon sources. The yield of EPA and TSFA were 2.30-fold and 2.69-fold when added 0.5% CO_2 of those obtained under control, respectively. The yield of TSFA was 1.85-fold when added 5 mmol/L NaHCO_3 of that obtained under control. The maximum yield of EPA and TSFA were 2.11-fold and 1.58-fold when added 5 g/L and 10 g/L glucose of those obtained under control, respectively. Therefore, low concentration of CO_2 was the optimal culture condition for the growth of *P. pyrenoidosus* CCMP 2078, and also for the yield of EPA and SFAs. The increases of EPA and TSFA were resulted by the enhancement of the biomass concentration.

Key words: *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP 2078; Carbon sources; Growth; EPA; Saturated fatty acids