

L-肉碱对普通小球藻 *Chlorella vulgaris* 种群增长和生化组成的影响*

宋丹¹, 孙宇¹, 蔺丽丽¹, 陈玉珂¹, 董婧^{1,2}, 陈颖¹, 余涛¹, 张东鸣^{1**}

1. 吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118; 2. 沈阳农业大学畜牧兽医学院, 沈阳 110866

摘要: 分别以 0, 5, 50 mg/L 的 L-肉碱(L-carnitine) 处理淡水普通小球藻(*Chlorella vulgaris*), 以 SE 为培养液, 培养 7 d, 探究 L-肉碱对淡水普通小球藻种群增长、总脂和可溶性蛋白质含量的影响。结果表明: 不同质量浓度的 L-肉碱在不同培养时期对普通小球藻种群增长影响显著($P < 0.05$); 高浓度 L-肉碱显著降低总脂含量($P < 0.05$), 并使可溶性蛋白质含量显著升高($P < 0.05$)。结果提示, 在培养液中添加外源 L-肉碱可能通过直接作用于普通小球藻, 或促进培养液中微生物分泌活性物质间接影响普通小球藻的种群增长及总脂和可溶性蛋白质的含量。

关键词: L-肉碱; 普通小球藻; 种群增长; 总脂; 可溶性蛋白质

中图分类号: S968.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-5684(2011)01-0074-05

DOI: CNKI: 22-1100/S.20101227.1442.000

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/22.1100.S.20101227.1442.000.html>

Effects of L-Carnitine Supplements on Population Growth and Biochemical Composition in Micro-algae, *Chlorella vulgaris*

SONG Dan¹, SUN Yu¹, LIN Li-li¹, CHEN Yu-ke¹, DONG Jing^{1,2}, CHEN Ying¹, YU Tao¹, ZHANG Dong-ming¹

1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

Abstract: The study was conducted to investigate the effects of L-carnitine supplements on population growth, total lipids and soluble protein in freshwater micro-algae *Chlorella vulgaris*. Algae were cultured with SE formulations and enriched by 3 levels of L-carnitine: 0, 5 and 50 mg/L for 7 days. The results showed that L-carnitine supplements significantly ($P < 0.05$) affected the population growth of enriched algae and two levels of L-carnitine enrichment (5, 50 mg/L) produced different responses on population growth compared with the control during culture period. Total lipids content was significantly ($P < 0.05$) lower and soluble protein content was significantly ($P < 0.05$) higher in 50 mg/L L-carnitine enriched group than that in the other 2 groups. The results suggest that L-carnitine enrichment might affect population growth and biochemical composition in freshwater micro-algae *Chlorella vulgaris* in a direct or indirect way.

Key words: L-carnitine; *Chlorella vulgaris*; population growth; total lipids; soluble protein

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(30671621)

作者简介: 宋丹, 女, 硕士, 主要从事水产动物营养研究。

收稿日期: 2010-03-11 网络出版时间: 2010-12-27 14:42

** 通讯作者

L-肉碱(L-carnitine)是参与调控脂肪酸代谢的重要因子,也是生物体内重要的微量营养素。L-肉碱最重要的生理功能是参与线粒体内长链脂肪酸 β 氧化,在脂酰肉碱转移酶的作用下把活化后的脂肪酸(脂酰-CoA)以酰基肉碱的形式从胞液中转运入线粒体内完成 β 氧化,为生物体提供能量^[1]。在人类和动物营养领域,L-肉碱作为一种食品成分、饲料添加剂和营养强化剂已有大量研究,并被广泛应用^[1-4];在微小生物领域,国外已有关于细菌等对L-肉碱利用和新陈代谢方面的报道^[5],但在水产养殖领域广泛使用的微型生物饵料(微藻、轮虫等)研究方面与L-肉碱相关的报道很少,仅见L-肉碱强化对轮虫(*Brachionus rotundiformis*)种群增长和繁殖的影响以及生物饵料体内L-肉碱含量方面的研究报道^[6-7]。

淡水普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)作为一种重要的活体微型生物饵料,可直接应用于贝类和虾类等水产品的饲养,也可应用于仔鱼开口期食用的轮虫等开口饵料的培养。因此,普通小球藻的培养技术、生长繁殖和营养价值(生化组成)等方面是研究的重点。本试验在水生动物和微型饵料生物研究的基础上,首次探究L-肉碱对普通小球藻种群生长和生化组成的影响,旨在为L-肉碱在微藻培养和应用领域作为营养强化剂来改善微藻生长和营养价值的可行性提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与药品

试验用淡水普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)购自中国科学院海洋研究所藻种库。L-肉碱购自Sigma公司(代号G-0158),配制SE培养液^[8]的药品均为分析纯,试验用水为蒸馏水。

1.2 试验方法

1.2.1 接种 试验前对试验用具高温、高压消毒,试验前1 d配制SE培养液,次日上午接种。

1.2.2 试验设计 L-肉碱在试验开始时一次性加入SE培养液中,设0(ck),5,50 mg/L 3个质量浓度处理组,每个处理3次重复。在恒温培养箱内用SE培养液培养,培养体积2 L,光照强度5 000 lx,光照24 h,温度控制在(23±1)℃,连续通气,培养7 d。

1.2.3 取样 小球藻初始密度为 $6.5 \times$

10^6 cells/mL。当淡水普通小球藻种群增长进入相对生长下降期时,将藻液用Avanti J-26XP型冷冻离心机6 000 g离心15 min后弃去上清,用蒸馏水洗涤后,再次离心,弃去上清液,获得普通小球藻样品。

1.3 测定方法

1.3.1 种群增长的测定 采用血球计数板计数法测定普通小球藻种群增长,每次取样前先将锥形瓶中藻液摇匀,取1 mL置于血球计数板上,在显微镜(10×40倍)下计数,藻生长的变化通过比生长速率的变化来反映,比生长速率 K 的计算公式:

$$K = (\ln N_t - \ln N_0) / t,$$

式中, N_t 为第 t 天的细胞密度, N_0 为初始的细胞密度, t 为培养时间。

1.3.2 样品的制备 将试验结束时收获的普通小球藻样品用小型台式冷冻干燥机冷冻干燥24 h,然后转移至干燥器中,备用。

1.3.3 总脂含量的测定 取研磨好的干燥藻粉置于10 mL离心管中,加入 V (氯仿): V (甲醇)=2:1液体,混匀后4℃放置过夜,离心10 min取上清;吸取上清液置于10 mL的螺口试管中,放入60℃的烘箱中蒸干溶剂,然后加入浓硫酸,100℃水浴10 min,冷却至室温后加入磷酸—香草醛(phosphoric acid Vanilin),充分振荡后放置2~3 h,用Uvic UV2100型紫外分光光度仪在528 nm下测其OD值,最后代入回归方程,计算总脂含量,再换算成质量比^[9]。

1.3.4 可溶性蛋白质含量的测定 取研磨好的干燥藻粉置于10 mL离心管中,加入蒸馏水,静置0.5~1.0 h,然后离心、弃去沉淀,将上清液稀释到合适的浓度,使其测定值在标准曲线的直线范围内。以结晶牛血清蛋白配制的标准蛋白质溶液为标准,用Uvic UV2100型紫外分光光度仪在595 nm下测定其OD值,根据回归方程计算出小球藻可溶性蛋白质含量,再换算成质量比^[10-11]。

1.4 统计分析

应用单因子方差分析(One way ANOVA)比较L-肉碱各水平间的差异显著性;并应用Duncan多重比较检验各处理间的均值,差异显著性水平(P)值设在0.05,均采用SPSS16.0统计软件进行统计分析。误差和置信区间用Mean ± SEM

($n=6$)表示。

2 结果

2.1 L-肉碱对普通小球藻种群增长的影响

2.1.1 L-肉碱对普通小球藻种群密度的影响

由图1可见,不同质量浓度的L-肉碱对不同培养阶段普通小球藻的种群密度可产生不同程度的影响。培养1 d,与对照组相比,低浓度和高浓度处理组的藻种群增长出现了相反趋势,低浓度组种群密度显著高于其他2组($P < 0.05$);培养2 d,高浓度处理组种群密度显著低于对照组和低浓度处理组($P < 0.05$);培养3~4 d,高浓度组种群密度仍低于对照组和低浓度组,但各组间无显著差异($P > 0.05$);培养5 d,高浓度组种群密度显著低于对照组和低浓度组($P < 0.05$),低浓度组种群密度显著高于各处理组($P < 0.05$);培养6 d,高浓度组种群密度显著低于低浓度组($P < 0.05$);培养7 d,高浓度组种群密度显著高于对照组($P < 0.05$),低浓度组种群密度与其他2组无显著差异($P > 0.05$)。

2.1.2 L-肉碱对普通小球藻比生长速率的影响

L-肉碱对普通小球藻的比生长速率有显著的

表1 L-肉碱对普通小球藻比生长速率、总脂和可溶性蛋白质的影响

Table 1. Effects of L-carnitine on specific growth rate, total lipids and soluble protein in *Chlorella vulgaris*

| ρ (肉碱)/(mg·L ⁻¹) L-carnitine level | 比生长速率/(h ⁻¹) Specific growth rate | | | | | w (总脂)/ (mg·100mg ⁻¹) Total lipids | w (可溶性蛋白质)/ (mg·100mg ⁻¹) Soluble protein |
|--|--|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|--|---|
| | 0~1 d | 1~2 d | 2~5 d | 5~6 d | 6~7 d | | |
| 0 | 0.69±0.10 ^a | 0.10±0.03 ^a | 0.15±0.01 ^a | 0.15±0.03 ^a | -0.07±0.03 ^a | 5.08±0.13 ^a | 43.37±0.60 ^a |
| 5 | 1.06±0.05 ^b | -0.17±0.02 ^b | 0.16±0.01 ^a | 0.07±0.03 ^a | -0.06±0.02 ^a | 5.33±0.31 ^a | 46.31±1.16 ^a |
| 50 | 0.48±0.11 ^a | -0.18±0.03 ^b | 0.26±0.04 ^b | 0.27±0.02 ^b | 0.10±0.01 ^b | 4.32±0.10 ^b | 65.57±1.75 ^b |

注: 1. 表内数据为平均数±标准误($n=6$); 2. 含有不同字母上角标的每列平均数之间差异显著($P < 0.05$)

Note: 1. Data in the table are shown as Mean ± SEM ($n=6$); 2. Mean with unlike superscripts in columns were significantly different ($P < 0.05$)

2.2 L-肉碱对普通小球藻总脂含量的影响

由表1可见,高浓度L-肉碱处理组的总脂含量显著降低($P < 0.05$),低浓度L-肉碱处理组的总脂含量较对照组无显著差异($P > 0.05$)。

2.3 L-肉碱对普通小球藻可溶性蛋白质含量的影响

由表1可见,高浓度L-肉碱处理组的可溶性蛋白质含量显著升高($P < 0.05$),低浓度L-肉碱处理组的可溶性蛋白质含量较对照组无显著差异($P > 0.05$)。

影响。0~1 d,低浓度处理组的普通小球藻比生长速率显著高于对照组和高浓度组($P < 0.05$); 1~2 d,对照组比生长速率显著高于低浓度组和高浓度组($P < 0.05$); 2~6 d,高浓度处理组比生长速率显著高于对照组和低浓度处理组($P < 0.05$); 6~7 d,高浓度处理组比生长速率显著高于低浓度组和对照组($P < 0.05$)(表1)。

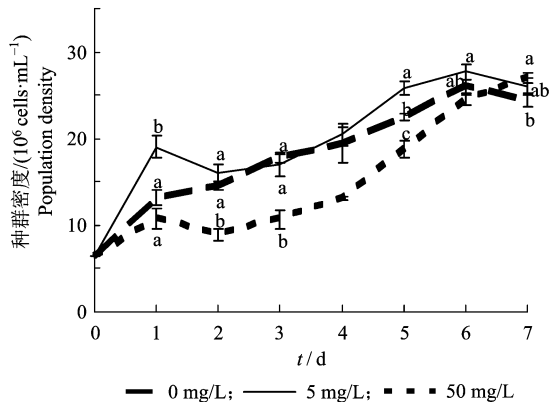


图1 L-肉碱对普通小球藻种群增长的影响

Fig. 1. Effects of L-carnitine on population growth in *Chlorella vulgaris*

3 讨论

3.1 L-肉碱对普通小球藻种群增长的影响

大量研究结果表明,L-肉碱对水生动物有促生长作用^[2],但关于L-肉碱对生物饵料的影响目前仅见Zhang等对轮虫的研究报道^[6]。L-肉碱作为重要的微量营养素普遍存在于动、植物体中^[12-13],Zhang等研究表明藻类细胞内存在L-肉碱^[7]。L-肉碱的主要生理功能是参与生物体内的脂肪酸 β -氧化,藻类的脂肪酸代谢机理与高等植物的脂肪酸代谢机理相似^[14-15]。Lawand等^[16-17]

认为植物体内脂肪酸分解代谢过程中存在着肉碱穿梭机制, 发生在过氧化物酶体中的脂肪酸 β -氧化所产生的乙酰单元必须通过肉碱被转运到过氧化物酶体外, 然后进入线粒体中进行三羧酸循环。从藻细胞吸收营养的机理分析, 溶解于培养液中的外源L-肉碱能够通过主动运输的方式进入藻细胞参与脂肪酸代谢, 进而直接影响普通小球藻的种群增长、脂类和蛋白质代谢。另外, 在普通小球藻培养液中存在许多微小生物(细菌等), L-肉碱能够以碳氮源的形式被这些微小生物利用, 促进其繁殖代谢和种群增长^[5]。已有研究证明, 这些微小生物种群增长过程中分泌的细胞外产物, 如维生素和生长刺激素等物质能够影响藻类的种群增长^[18]。因此, 在藻类培养液中添加L-肉碱还可能通过促进微小生物种群增长、增加其细胞外产物的分泌量而间接影响普通小球藻的种群增长。

本试验结果表明, 不同浓度的外源L-肉碱在不同的培养阶段对普通小球藻的种群增长可产生不同程度的影响。低浓度和高浓度处理组的藻种群增长在培养1 d时出现了相反趋势(图1), 且低浓度组种群密度显著高于其他2组。这可能是由于高浓度的L-肉碱短时间抑制了过氧化物酶体内肉碱乙酰转移酶的活性及脂肪酸的 β -氧化, 进而影响了脂肪酸 β -氧化过程中吡哆丁酸转变为吡哆乙酸(普通小球藻生长所必需的生长素)的速度^[19, 20]; 而低浓度处理组可能因为浓度较适宜, 提高了肉碱乙酰转移酶的活性, 刺激脂肪酸 β -氧化, 增加吡哆乙酸的生成速度, 进而短时间内快速促进藻的种群增长。

此外, L-肉碱也可能是通过培养液中微小生物的间接途径产生影响。高浓度L-肉碱会使微小生物短时间内过量繁殖, 使微小生物与普通小球藻种群增长的竞争加剧, 导致藻的种群增长受到抑制, 而低浓度L-肉碱会作为增加的碳氮源刺激微小生物种群的适度增长, 使得培养液中微小生物所分泌出的维生素和生长刺激素等细胞外产物增加, 促进了普通小球藻的种群增长。

培养2~5 d, 由于高浓度处理组中L-肉碱的含量随着普通小球藻脂肪酸 β -氧化或细菌分解代谢的消耗逐渐减少, 培养液中L-肉碱的浓度由过量逐渐转变为适宜, 因此出现了比生长速率高于对照组和低浓度处理组的趋势, 同时, 其种群密度

继续维持最低水平。而同时期内低浓度处理组的L-肉碱被消耗掉, 种群生长速率更接近对照组, 其种群密度与对照组间无显著差异(图1)。培养6~7 d, 对照组和低浓度处理组均为负增长, 而高浓度处理组仍保持稳定的正增长趋势, 这表明在培养后期, 低浓度处理组与正常生长的对照组相同, 种群增长减缓, 开始进入相对生长下降期, 而高浓度处理组的种群增长仍在加速, 培养至7 d种群密度已经显著高于对照组(图1), 原因应该是高浓度处理组中外源L-肉碱在持续产生影响。

3.2 L-肉碱对普通小球藻总脂含量的影响

脂类含量是衡量动植物产品营养价值的重要指标。关于外源L-肉碱可促进鱼类脂类分解代谢, 降低脂质含量的研究报道很多^[21, 23], 但外源L-肉碱是否对藻类脂类代谢产生影响的研究尚未见报道。本研究结果显示, 培养液中的高浓度外源L-肉碱对普通小球藻的总脂含量产生显著影响, 在降低脂类含量方面与前人关于L-肉碱作用于不同动物的研究结果相似^[22]。其原因可能是高浓度外源L-肉碱作为乙酰单元的载体持续影响藻的代谢, 直接参与并加速了过氧化物酶体中的脂肪酸 β -氧化; 也存在着通过刺激增加培养液中的微小生物的细胞外分泌物(维生素等)而间接对藻产生影响的可能。已有研究表明, 维生素对动物的脂类代谢有显著的影响^[24, 25], 维生素B₆在草鱼体内可作为辅酶或辅基的组成调节其体内的脂肪代谢, 降低脂肪含量^[25], 维生素C和E可作为辅酶或辅基的组成促进真鲷体内的类脂代谢^[24]。

3.3 L-肉碱对普通小球藻可溶性蛋白质含量的影响

前人的研究已经证实L-肉碱可以调节动物体内蛋白质的含量^[23, 26]。本研究结果表明, 培养液中添加高浓度外源L-肉碱能使普通小球藻的可溶性蛋白质含量显著增加。根据本研究得到的高浓度外源L-肉碱显著降低普通小球藻总脂含量的结果, 从L-肉碱影响脂类代谢、并具有节约蛋白质作用的机理分析, L-肉碱可能在直接参与并加速脂肪酸 β -氧化的同时消耗脂肪, 为机体代谢和生长提供充足的能量, 进而节约了作为能量供应的部分结构蛋白质, 经过培养期内的持续作用, 使藻的蛋白质含量显著增加。但本研究测定的是可溶性蛋白, 可溶性蛋白大多数是参与各种

代谢的酶类,其含量是植物体内总代谢水平的重要指标^[27]。所以,L-肉碱对藻类的节约蛋白质作用应该是通过促进脂肪酸 β -氧化而全面提高代谢水平,使参与代谢的各类酶的含量增加,同时也促进了种群持续快速增长。已有研究表明维生素能促进真鲷^[24]、螺旋藻^[28]和小麦^[29]体内蛋白质的累积。培养液中的微小生物将L-肉碱作为碳氮源直接利用后,增加分泌的细胞外产物中含有多种维生素,这些维生素的持续作用也有可能通过间接途径影响普通小球藻可溶性蛋白质的含量。

参考文献:

- [1] Feller A G, Rudman D. Role of carnitine in human nutrition [J]. *Physiology of human nutrition*, 1988, 118: 541-547.
- [2] Harpaz S. L-carnitine and its attributed functions in fish culture and nutrition—a review [J]. *Aquaculture*, 2005, 249: 3-21.
- [3] Borum P R. Possible carnitine requirement of the newborn and the effect of genetic disease on the carnitine requirement [J]. *Nutrition*, 1981, 39: 385-390.
- [4] Balzli J K, Bazer F W, Miguel S G, et al. The neonatal piglet as a model for human neonatal carnitine metabolism [J]. *Nutrition*, 1987, 117: 754-757.
- [5] Rebouche C J, Seim H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals [J]. *Annual Review of Nutrition*, 1998, 18: 39-61.
- [6] Zhang D M, Yoshimatsu T, Furuse M. Effects of L-carnitine enrichment on the population growth, egg ratio and body size of the marine rotifer, *Brachionus rotundiformis* [J]. *Aquaculture*, 2005, 248: 51-57.
- [7] Zhang D M, Yoshimatsu T, Furuse M. The presence of endogenous L-carnitine in live foods used for larviculture [J]. *Aquaculture*, 2006, 255: 272-278.
- [8] 邢丽贞,张彦浩,孔进,等.链丝藻的生长规律及其对污水中氮磷去除能力[J].*城市环境与城市生态*,2003,16(6):246-247.
- [9] Spolaore P, Cassan C J, Duran E, et al. Commercial applications of microalgae [J]. *Bioscience and Bioengineering*, 2006, 101(2): 87-96.
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [11] Kochert G. Protein determination by dye binding[M] // Hellebus J A, Craigie J S. *Handbook of Physiological Methods: Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge: Cambridge University Press, 1978: 91-93.
- [12] Miyasaki T, Sato M, Yoshinaka R, et al. Determination of free and esterified carnitine in tissues of rainbow trout by high performance liquid chromatography [J]. *Fisheries Science*, 1994, 60(2): 225-227.
- [13] Panter R A, Mudd J B. Carnitine levels in some higher plants [J]. *FEBS Letters*, 1969, 5(2): 169-170.
- [14] Somerville C, Browse J. Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes [J]. *Science*, 1991, 252: 80-87.
- [15] Thompson Jr G A. Lipids and membrane function in green algae [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, 1302: 17-45.
- [16] Lavand S, Dome A J, Long D, et al. Arabisopsis about de soufflé, which is homologous with mammalian carnitine acyl carrier, is required for postembryonic growth in the light [J]. *The Plant Cell*, 2002, 14: 2161-2173.
- [17] Bourdin B, Adenier H, Perrin Y. Carnitine is associated with fatty acid metabolism in plants [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, 45: 926-931.
- [18] Croft M T, Lawrence A D, Deery E R, et al. Algae acquire vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria [J]. *Letters*, 2005, 438(3): 90-93.
- [19] 徐靖,李辉亮,朱家红,等.植物脂肪酸 β -氧化的研究进展[J].*生物技术通讯*,2008,19(1):141-144.
- [20] Grotbeck L, Vance B D. Endogenous levels of indole-3-acetic acid in synchronous cultures of *Chlorella pyrenoidosa* [J]. *Phycology*, 1972, 8: 272-275.
- [21] Amelio V D, Santulli A. Effects of supplemental dietary carnitine on growth and lipid metabolism of hatchery reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. *Aquaculture*, 1986, 59(3-4): 177-186.
- [22] 田娟,冷向军,李小勤,等.肉碱对草鱼生长性能、体成分和脂肪代谢酶活性的影响[J].*水产学报*,2009,33(2):295-302.
- [23] Burtle G J, Liu Q H. Dietary carnitine and lysine affect channel catfish lipid and protein composition [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1994, 25(2):169-174.
- [24] Ji H, Om A D, Yoshimatsu T, et al. Effect of dietary vitamins C and E fortification on lipid metabolism in red sea bream *Pagrus major* and black sea bream *Acanthopagrus schlegelii* [J]. *Fisheries Science*, 2003, 69(5): 100F-100G.
- [25] 黄世蕉,沈.维生素B₆对草鱼脂肪代谢的影响[J].*水生生物学报*,1992,16(4):313-321.
- [26] Ji H, Bradley T M, Tremblay G C. Atlantic Salmon fed L-carnitine exhibit altered intermediary metabolism and reduced tissue lipid, but no change in growth rate [J]. *Nutrition*, 1996, 126: 1937-1950.
- [27] 李合生.植物生理生化试验原理及技术[M].北京:高等教育出版社,2002:165.
- [28] 金贵林,张少斌,王洪岩. V_C对螺旋藻生长的影响[J].*水产科学*,2008,27(4):203-204.
- [29] 唐瑞,吴瑜.维生素对小麦生长及生理功能的调节作用研究进展[J].*应用与环境生物学报*,2006,12(6):869-873.