

10 种海洋微藻总脂、中性脂 和极性脂的脂肪酸组成*

俞建江 李荷芳 周汉秋

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 研究了 10 种海洋微藻的总脂、中性脂和极性脂的脂肪酸组成特征。海洋微藻的脂肪含量均在 15% 以上。极性脂一般为海洋微藻的主要脂类,是长链多元不饱和脂肪酸的主要提供者。中性脂含短链脂肪酸较多,为主要的储存脂类。绿藻纲可以将高含量的 $16:4(n-3)$ 和 $18:3(n-3)$ 作为化学分类的标记脂肪酸,小球藻和微绿球藻有丰富的 $20:5(n-3)$,与绿藻纲显著不同,可能属于大眼藻纲。绿枝藻纲的脂肪酸组成与绿藻纲类似,绿胞藻纲以 $16:0$ 、 $18:4(n-3)$ 和 $20:5(n-3)$ 为主要脂肪酸。脂肪酸组成可用于海洋微藻的分类学研究,并能指导利用海洋微藻生产高度不饱和脂肪酸。

关键词 海洋微藻,脂肪酸组成,中性脂,极性脂,化学分类学

近年来,海洋微藻的脂肪酸组成研究引起了各国科学家的兴趣。这不仅是由于海洋微藻是许多长链多元不饱和脂肪酸(PUFAs)的重要来源,研究发现这类脂肪酸对海洋动物和人类都具有营养学和医药学价值^[1],而且,脂肪酸组成和海藻系统分类之间存在着很大的相关性^[2]。因此,可将脂肪酸组成作为海洋微藻进行化学分类标记。本文所测定的 10 种海洋微藻是一群生物学研究进行得较多,而分类关系又较为复杂的单细胞海藻。其总脂的脂肪酸组成研究资料还不多,中性脂和极性脂脂肪酸组成的测定在国内外未见报道。本文旨在结合总脂、中性脂和极性脂的脂肪酸组成特点,探讨将脂肪酸组成应用于海洋微藻的系统分类,使这一化学分类的新方法成为传统分类方法的补充,同时为用海洋微藻生产 PUFAs 提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 海洋微藻的培养 10 种海洋微藻采用一致的培养液在实验室内培养。生长条件如下:室温 $15-25^{\circ}\text{C}$,自然光照,光强 $1000-100001\text{x}$,盐度约为 30,培养体积 $1500-2000\text{mL}$,静置培养,每天摇动数次。培养液使用的海水经过煮沸消毒。每种微藻的培养时间为 7d。

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3784 号
“九五”国家重点科技攻关项目,96-916-04-03 号;中国科学院生物分类区系学科发展特别支持费资助课题;曾呈奎海洋科学基金资助项目
1999-09-06 收到;1999-09-09 修回

1.2 样品分析方法 参照杉山昭博^[3]的方法,将培养 7d 的藻液以 4000r/min 离心 10min,收集沉淀的藻泥,用玻璃匀浆器匀浆后,按 Bligh-Dyer 法用氯仿-甲醇系统抽提,有机相减压蒸馏至干,称重、计算得到总脂的含量^[4].取四分之三量的总脂经硅胶柱(60-100 目)层析分成中性脂和极性脂两部分,分别称重,计算中性脂和极性脂的含量及比例.

1.3 脂肪酸组成和含量的测定 微藻总脂、中性脂和极性脂分别按 Carreau 等^[5]的方法甲酯化后得脂肪酸甲酯,经薄层层析(TLC)纯化后,用上分 1102 型气相色谱仪测定脂肪酸种类及其含量.参数为:色谱柱:Carbowax(25m×0.2mm);柱温:200℃;进样器及检测器温度为 240℃;载气为纯氮气.载气流速 68.5ml/min,空气压力为 0.147MP,氢气压力为 0.098MP.检测器:火焰离子化检测器(FID).脂肪酸的鉴定:用参照标准样品和碳链长度值(ECL)进行^[6,7].定量分别采用对各组份峰面积积分,用归一化法计算出脂肪酸组分的百分含量(以脂肪酸总量%表示).

2 结果与讨论

2.1 海洋微藻总脂、中性脂和极性脂含量

10 种海洋微藻总脂、中性脂和极性脂的含量如表 1 所示.海洋微藻的脂肪含量较高,一般在 15% 以上,个别达 30% 以上,远远大于大型藻中的含量(一般为 1% 左右).中性脂占总脂的 13-53% 之间.因此,极性脂是大多数海洋微藻的主要脂类.极性脂和中性脂的比例因藻种不同而异,盐藻、小球藻(除日本小球藻)和微藻比率为 1 左右,其他的在 3-7 之间.

表 1 10 种海洋微藻的总脂、中性脂和极性脂含量及比例

Tab. 1 The contents of total, neutral and polar lipids in ten marine microalgae

编号	种 名	总脂含量 (干重%)	中性脂 占总脂(%)	极性脂 占总脂(%)	极性脂:中性脂
1	盐藻 <i>Dunaliella</i> sp.	30.7	43.3	5.67	1.3
2	青岛大扁藻 <i>Platymonas helgolamdica</i>	18.8	21.6	78.4	3.6
3	亚心形扁藻 <i>Platymonas subcordiformis</i>	19.4	17.4	82.6	4.7
4	小球藻-1 <i>Chlorella</i> sp-1	24.3	44.9	55.1	1.2
5	小球藻-2 <i>Chlorella</i> sp-2	29.1	41.4	58.6	1.4
6	日本小球藻 <i>Chlorella hirataii</i>	24.2	16.7	83.3	5.0
7	微绿球藻 <i>Nannochloris</i> sp.	22.6	50.0	50.0	1.0
8	微型小球藻 <i>Chlorella nana</i>	18.9	42.0	58.0	1.4
9	四鞭藻 <i>Tetraselmis</i> sp.	17.3	12.9	87.1	6.8
10	盐生卡盾氏藻 <i>Chattonella subsalsa</i>	40.5	14.3	85.7	6.0

2.2 海洋微藻的总脂脂肪组成

10 种海洋微藻总脂脂肪酸组成见表 2.

表 2 10 种海洋微藻的总脂脂肪酸组成(%)

Tab.2 Fatty acid composition and ratios of total lipids in ten marine microalgae

编号*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
14:0	0.42	0.64	1.28	3.11	2.69	4.55	4.86	0.22	0.52	5.98
14:1		1.83						0.98	1.59	
i-15:0	1.97									
15:0										0.64
16:0	18.67	21.06	32.90	14.28	10.67	13.02	17.35	18.76	27.98	35.98
16:1(n-6)				23.62	22.52	29.33	27.73			
16:2(n-4)										
17:0	1.08	1.41	4.59						3.34	
16:3(n-6)										
16:3(n-4)						0.85				
16:3(n-3)	2.14	9.33					1.37	14.97	0.95	
16:4(n-3)	19.81	20.16	12.54	1.21	1.35				15.58	0.50
16:4(n-1)										
18:1				0.37						
18:1(n-9)	4.50	7.14	9.81	3.04	2.53	3.95	7.86	4.67	9.08	1.08
18:1(n-7)										
18:2(n-6)	6.08	4.30	8.17	2.17	2.19	2.72	3.60	11.35	9.21	2.33
18:3(n-6)	1.35		1.21							0.54
18:3(n-3)	38.38	22.53	15.28	1.04	0.61		2.72	29.47	17.32	4.15
18:4(n-3)		8.13	3.07						5.66	16.93
20:1										
20:1(n-7)								4.38	1.10	
18:5(n-3)		1.22	1.09							
20:2(n-6)		0.34	0.29			0.07	0.16	0.18	0.22	
20:3(n-6)				0.37	0.93	0.26	0.24			1.05
20:4(n-6)		0.90	1.79	6.31	7.42	7.28	4.78	0.97	0.93	
20:3(n-3)		0.52								2.36
20:4(n-3)										0.87
20:5(n-3)		4.82	5.89	43.89	48.13	37.24	28.59	4.14	5.32	23.01
22:2(n-6)										
22:5(n-6)										
22:5(n-3)										
22:6(n-3)								0.17		2.64
合计	98.90	99.35	99.29	98.42	99.03	99.27	99.25	99.70	98.82	98.06
C16PUFAs	21.95	20.47	12.54	1.21	1.35	0.85	1.37	14.97	16.54	0.50
C18PUFAs	39.73	31.88	20.65	1.04	0.61	0.00	2.72	33.85	22.98	21.61
C20PUFAs	0.00	6.24	7.68	49.58	56.47	44.78	33.61	5.11	6.25	27.29

* 编号同表 1

2.2.1 绿藻纲(Chlorophyceae)海洋微藻的脂肪酸组成 盐藻、扁藻、亚心型扁藻是三种属于绿藻纲的海洋微藻,由表 2 可知它们的脂肪酸组成非常类似.主要脂肪酸为 16:0、16:4(n-3)和 18:3(n-3),C₁₆PUFAs 和 C₁₈PUFAs 的含量很高,而 C₂₀PUFAs 较低,其中

20:5(n-3)在10%以内.这些结论与大多数已报道的绿藻纲海藻(包括大型藻)的研究资料相吻合.一般认为绿藻纲海洋微藻脂肪酸组成的最大特点是高水平的16:4(n-3)和18:3(n-3),这可以作为绿藻纲海洋微藻的标记脂肪酸.前者的含量在10%以上,这在其他类型微藻中较为少见^[8].后者被认为是生物合成20:5(n-3)等C₂₀PUFAs的前体,它的积累是绿藻纲海洋微藻细胞中脂肪酸合成的一个特点,即从C₁₈到C₂₀的延伸过程受抑制.

2.2.2 小球藻和微绿球藻脂肪酸组成 大多数研究者将小球藻列入绿藻纲的小球藻目或绿球藻目中^[9].但从脂肪酸组成看,“海洋”小球藻与典型的绿藻纲脂肪酸组成特点相差很大.其16:4(n-3)和18:3(n-3)的含量甚低,仅为1%左右.主要脂肪酸为16:0、16:1(n-7)和20:5(n-3).16:4(n-3)的含量很高,在25%以上,20:4(n-6)的含量比绿藻中的高得多.C₂₀PUFAs在这类海洋微藻占主要部分,C₁₆PUFAs和C₁₈PUFAs极少.Zhukova等认为绿藻纲的藻类无高含量的20:5(n-3),Maruyama等鉴定出一种富含20:5(n-3)的“海洋”小球藻为大眼藻纲(Eustimatophyceae)的一种微藻—微绿球藻.由表2可知,所测定的几种小球藻(除微型小球藻)与微绿球藻的脂肪酸组成极为相近,因此这类小球藻根据脂肪酸组成应归于大眼藻纲.其脂肪酸组成特征为16:1(n-7)与16:0的比率大于1,及具有高水平的20:5(n-3).

所测定的微型小球藻的脂肪酸组成与其他小球藻不同,且与典型的绿藻纲也有一定差别.其不含绿藻纲的标记脂肪酸16:4(n-3),而16:3(n-3)的含量却在15%以上,16:3(n-3)在绿藻纲中含量很低,在其他海洋微藻中也未发现有这么高的含量.这一结果与Zhukova等测定的一个小球藻种类基本一致,Zhukova等将这类小球藻归于绿藻纲中.

2.2.3 绿枝藻纲(Prasinophyceae)和绿胞藻纲(Chloromonadophyceae)海洋微藻的脂肪酸组成 绿枝藻纲是Christensen建立的一类与绿藻纲平行的特殊藻类纲.从四鞭藻的测定结果来看,其与绿藻纲十分相象.但文献报道其18:3(n-3)和20:5(n-3)的含量经绿藻相应高一点,也有的发现大量的16:1(n-9)及少量DHA的存在作为这一纲区别于绿藻纲的特点.绿胞藻纲微藻据称是一类在细胞学上发展得最高级的单细胞鞭毛类微藻,根据生物学研究也很难将其列入一些常见的纲中.从形态分类上属于绿胞藻纲的盐生卡盾氏藻来看,这类海洋微藻的主要脂肪酸为16:0、18:4(n-3)和20:5(n-3),并有少量DHA的存在.

2.3 海洋微藻的中性脂和极性脂脂肪酸组成

2.3.1 海洋微藻中性脂的脂肪酸组成 10种海洋微藻的中性脂脂肪酸组成见表3.比较表2和表3可以发现,所测定的10种海洋微藻中性脂脂肪酸组成与相应的总脂差别较大.绿藻纲和大眼藻纲的海洋微藻其中性脂14:0、16:0、16:1(n-7)的含量普遍比相应的总脂中的高,但总脂中含有的16:3(n-3)却没有在中性脂中发现.亚心型扁藻和四鞭藻的16:4(n-3)在中性脂中含量增加很多.在所测定的10种海洋微藻中性脂中18:1(n-9)的含量普遍比总脂中的高,而18:3(n-3)却降低很多.绿藻和绿枝藻的中性脂20:5(n-3)含量比总脂中的高,而在其他种类中则显著降低.总的来说,中性脂所含的短链脂肪酸较多,长链脂肪酸较少.与极性脂比较,中性脂更多的是以储存脂类的形式存在.因此微藻细胞中的短链脂肪酸主要存在于作为能量储存物质的中性脂中.

表 3 10 种海洋微藻的中性脂的脂肪酸组成(%)
Tab.3 Fatty acid composition of neutral lipids in ten marine microalgae

编号*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
14:0	1.78	1.78	1.71	3.05	3.57	4.53	5.52	2.26	0.56	6.14
14:1	1.31	1.30		5.85	3.92			3.12	0.83	
i-15:0										
15:0	1.24	1.01	0.66	1.77	1.07	0.50	0.21		0.31	1.66
16:0	26.30	29.10	21.35	30.07	24.97	18.45	21.37	43.96	16.28	38.61
16:1(n-7)				28.26	26.57	45.34	42.22			
i-17:0										
16:2(n-6)										
16:2(n-4)										
17:0		1.11	3.89							
16:3(n-6)										
16:3(n-4)						1.16	0.55		4.06	
16:3(n-3)								4.90	0.43	7.77
16:4(n-3)	16.71	12.30	21.83	1.78					26.51	
16:4(n-1)										
18:0	2.47	1.93	0.19	1.51	1.59	0.80	1.12			
18:1(n-9)	15.29	18.66	7.12	5.31	4.59	7.40	11.79	9.42	7.61	6.64
18:1(n-7)										
18:2(n-6)	7.67	7.30	4.85	1.20	1.25	1.92	2.75	8.49	5.97	3.00
18:3(n-6)	1.70		0.94							
18:3(n-3)	21.86	8.16	16.44	1.29			1.55	14.20	12.87	0.88
18:4(n-3)		3.76	4.96						8.00	7.57
20:0										
20:1(n-7)									0.59	
18:5(n-3)		1.38	0.50							
20:2(n-6)		0.94	0.32	1.15	1.17	0.26	0.23	0.34	0.23	0.33
20:3(n-6)						0.17	0.18			0.91
20:4(n-6)		1.88	3.05	1.41	3.96	2.45	1.40	0.87	2.18	
20:3(n-3)										1.79
20:4(n-3)										1.35
20:5(n-3)		7.39	10.77	14.19	25.13	12.86	9.16	5.30	12.28	13.25
22:2(n-6)										
22:5(n-6)										
22:5(n-3)										
22:6(n-3)								0.33		5.63
合计	96.33	98.00	98.59	96.84	97.80	95.83	98.04	93.20	98.71	95.55
C16PUFAs	16.71	12.30	21.83	1.78	0.00	1.16	0.55	4.90	30.99	7.77
C18PUFAs	23.56	13.30	22.85	1.29	0.00	0.00	1.55	14.20	20.87	8.46
C20PUFAs	0.00	9.27	13.82	15.59	29.08	15.48	10.73	6.18	14.46	17.30

* 编号同表 1

2.3.2 海洋微藻极性脂的脂肪酸组成 10 种海洋微藻的极性脂的脂肪酸组成如表 4 所示。极性脂是多数海洋微藻的主要脂类,所测定的 10 种海洋微藻极性脂的脂肪酸组成特点与相应的总脂基本一致,但其长链脂肪酸的含量一般比总脂中的更高,它们是海洋微藻 PUFAs 的主要提供者。这也与极性脂主要分布在生物膜上,调节膜的渗透性相适应。在生

产中,用分离出的极性脂作为纯化 PUFAs 的原料效率会更高.以小球藻-1 为例,其 20:5 (n-3)占极性脂的 50%以上,而在中性脂中仅占 14%,极性脂和中性脂的比率为 1.2,因此分离出极性脂很大程度上浓缩了 20:5(n-3).

表 4 10 种海洋微藻的极性脂的脂肪酸组成(%)

Tab.2 Fatty acid composition of polar lipids in ten marine microalgae

编号*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
14:0	0.51	0.66	0.75	3.56	3.32	5.70	5.15	0.14	0.53	6.31
14:1		2.40						0.10	2.25	
i-15:0										
15:0	0.45			0.15	0.35		0.10			0.85
16:0	20.40	23.05	30.29	10.43	11.25	14.16	13.13	14.95	30.98	36.93
16:1(n-7)				19.63	16.77	26.47	22.87			
i-17:0	2.77	4.44								
16:2(n-6)	1.92							11.88		
16:2(n-4)									3.56	
17:0	1.49	1.88	5.50							
16:3(n-6)										
16:3(n-4)						0.15				
16:3(n-3)	2.32	0.21						19.81	0.96	
16:4(n-3)	20.25	20.95	14.88	0.18	1.66				14.76	
16:4(n-1)										
18:0				0.31	0.66		0.20			
18:1(n-9)	4.32	6.69	9.46	1.98	1.93	2.49	3.05	3.88	9.02	1.65
18:1(n-7)										
18:2(n-6)	4.40	3.97	9.99	0.97	0.69	0.91	1.21	10.49	9.13	1.87
18:3(n-6)	1.04			0.21		0.20				0.68
18:3(n-3)	36.69	21.63	18.26	0.18	1.18		0.70	35.11	17.08	3.55
18:4(n-3)		8.79	2.57						4.37	17.53
20:0										
20:1(n-7)									1.09	2.26
18:5(n-3)		1.08	1.17							
20:2(n-6)		0.25		0.16	0.20				0.22	
20:3(n-6)						0.26	0.38			0.43
20:4(n-6)		0.37	0.89	7.29	7.36	7.15	6.98	0.06	0.50	
20:3(n-3)										2.07
20:4(n-3)		0.27		0.43						0.54
20:5(n-3)		2.54	2.88	54.27	53.95	41.02	45.05	0.61	3.44	22.86
22:2(n-6)										
22:5(n-6)										
22:5(n-3)										
22:6(n-3)								0.18		1.90
合计	96.56	99.18	96.62	99.75	99.31	98.52	98.80	97.21	97.88	99.43
C16PUFAs	22.75	21.16	14.88	0.18	1.66	0.15	0.00	19.81	15.72	0.00
C18PUFAs	37.73	31.50	21.99	0.39	1.18	0.20	0.70	35.11	21.45	21.76
C20PUFAs	0.00	3.18	3.77	61.99	61.31	48.43	52.41	0.67	3.93	25.91

* 编号同表 1

由上述结果可知,各种海洋微藻因其分类位置的不同,均有其特定的脂肪酸.在此基础上可以总结出一些标记脂肪酸,来辅助分类学的研究.海洋微藻的脂肪酸组成及其在中性脂与极性脂中的分布特征,对于指导 PUFA 的生产和在微藻体内的代谢研究都有很大的意义.

参 考 文 献

- [1] Ami Ben-Amotz, Tornabene T G, Thomos W H. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. phycol.*, 1985, **21**: 72 - 81
- [2] Anne-Catherine Viso, Jean-Claude Marty. Fatty acids from 28 marine microalgae. *Phytochemistry*, 1993, **34**(6): 1521 - 1533
- [3] 杉山昭博. 海产微细藻类的冻结保存について. 水产增殖, 1993, **41**(3): 287 - 292
- [4] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of the total lipid extraction and purification. *Can J. Biochem Physiol*, 1959, **37**: 911 - 917
- [5] Carreau J P, Dubacq J P. Adaptation of macro-scale method to the micro-scale for the fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts. *J. Chromatogr.*, 1978, **151**: 384 - 390
- [6] Flanzy J, Boudon M, Leger C. Application of Carbowax 20M as an opentubular liquid phase in analyses of nutritionally important fats and oils. *J. Chromatogr Sci*, 1976, **14**: 17 - 24
- [7] Christie W W. Equivalent chain-lengths of methyl ester derivatives of fatty acids on gas chromatography, a reappraisal. *J. Chromatogr*, 1988, **447**: 305 - 314
- [8] 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
- [9] B. 福迪著, 罗迪安译. 藻类学. 上海科学技术出版社, 1980
- [10] Zhukova N V, Nina A, Aizdaicher. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*, 1995, **39**(2): 351 - 356

FATTY ACID COMPOSITION OF TOTAL, NEUTRAL AND POLAR LIPIDS OF TEN MARINE MICROALGAE

Yu Jianjing, Li Hefang and Zhou Hanqiu

(*Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071*)

Abstract Ten marine microalgae were examined for their fatty acid compositions of the total, neutral and polar lipids. Lipids of marine microalgae were extracted by the method of Bligh and Dyer. Total lipid content was determined by gravimetry after lipid extract exaporation under reduced pressure. Methyl esters of fatty acid (FAME) were obtained by the method of Carreau and Dubacq and purified with thin-layer chromatography. Then, FAME was performed on a GC 1102 instrument, made in Shanghai, supplied with an electronic integrator. The lipid contents of 10 marine microalgae were more than 15%. The polar lipids usually served as the main lipid and provided mostly polyunsaturated fatty acids. The neutral lipids, containing more short chain fatty acids, were the main deposited lipids. Large amounts of $16:4(n-3)$ and $18:3(n-3)$ might be used as the chemotaxonomic marker of Chlorophyceae. A significant amount of $20:5(n-3)$ in *Chlorella* and *Nannochloris*, distinguished Eustimatophyceae from Chlorophyceae. The Prasinophyceae and Chlorophyceae had closely related fatty acid compositions. The major fatty acids of Chloromonadophyceae were $16:0$, $18:4(n-3)$ and $20:5(n-3)$. The fatty acid compositions can afford the taxonomic classification of marine microalgae, and give the information of polyunsaturated fatty acids produced by marine microalgae.

Key words Marine microalgae, Fatty acid compositions, Neutral lipids, Polar lipids, Chemotaxonomy.