

海、淡水驯化对5种微藻脂肪酸组成的影响

陆开宏 林霞

(宁波大学海洋与水产业系, 315211)

摘要: 对5种微藻进行了脂肪酸分析及海淡水驯化影响其脂肪酸组成的研究, 结果表明: 淡水小球藻和海水小球藻的特征脂肪酸均为 16:0、16:2、18:0、18:2 和 18:3; 淡水斜生栅藻的特征脂肪酸为 16:0、18:1 和 18:3; 海水三角褐指藻的特征脂肪酸为 14:0、16:0、16:1 和 EPA。淡水藻海水驯化和海水藻淡水驯化后, 特征脂肪酸的种类不发生变化, 但各种脂肪酸的含量有明显变化, 驯化后, 几种特征脂肪酸及总脂肪酸占细胞干重的比例在蛋白核小球藻、小球藻-1 和三角褐指藻 SS02 品系中均有不同程度的提高, 而在斜生栅藻、小球藻-2 和三角褐指藻 ZS08、XS03 品系中均有不同程度的下降。

关键词: 微藻; 海淡水驯化; 脂肪酸

中图分类号: Q949 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2001)02-0179-06

微藻是水生态系中重要的初级生产者, 具有合成脂肪及多不饱和脂肪酸(PUFA)的能力。水产养殖中, 微藻的脂肪酸组成已作为评价该类饵料营养价值高低的重要指标^[1], 以海洋微藻取代鱼油生产 PUFA 的技术也正成为现代生物技术研究热点。藻类的脂肪含量及脂肪酸组成具有种的特异性, 同时, 在一定程度上受温度、光照、盐度和营养盐配方等多种环境条件的调节。为此, 已有一些学者研究过培养条件对几种海洋微藻脂肪酸组成的影响^[2-6], 但有关淡水微藻脂肪酸组成及盐度影响方面的工作较少^[5,7]。本研究分析比较了2种淡水微藻海水驯化和3种海洋微藻淡水驯化前后脂肪酸组成的变化, 以为优化饵料微藻的营养组成及深层次开发利用海洋微藻提供依据。

1 材料和方法

1.1 微藻的培养与驯化 2种淡水微藻是蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa* Chick)和斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus* Kütz); 3种海洋微藻为小球藻-1(*Chlorella* sp. -1)、小球藻-2(*Chlorella* sp. -2)和三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin)。其中小球藻-1由淡水种驯化而来, 已经在盐度 18—23 的海水中生长繁殖 10 余年; 三角褐指藻有 SS02、ZS08 和 XS03 三个品系, 分别从上海水产大学、福建水产研究所和本校藻种室提供的藻种中分离克隆; 其余均由本校生物饵料研究室提供。试验开始前 2 个月, 先对蛋白核小球藻和栅藻进行海水驯化, 对小球藻-1、小球藻-2 和三角褐指藻进行淡水驯化。

收稿日期: 1999-08-19; 修订日期: 2000-04-05

基金项目: 中国科学技术发展基金会曾呈奎海洋科学基金资助项目; 浙江省教委科研资助项目 97105 号

作者简介: 陆开宏(1964—), 男, 浙江省余姚市人; 副教授; 主要从事水生生物生理生态学研究

试验时同时设置驯化组和对照组,各组培养条件见表 1。

表 1 几种试验微藻的培养条件

Tab.1 Culture conditions of tested microalgae

组 别 Groups	水温(℃) Water temperature	光照($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) Light intensity	盐度(‰) Salinity	培养天数(d) Culture time
<i>C. pyrenoidosa</i> & <i>S. obliquus</i> (淡水组)	24—28	100—150	0	11
<i>C. pyrenoidosa</i> & <i>S. obliquus</i> (咸水组)	24—28	100—150	19—22	13
<i>Chlorella</i> sp.-1 & <i>Chlorella</i> sp.-2(海水组)	24—28	100—150	19—22	11
<i>Chlorella</i> sp.-1 & <i>Chlorella</i> sp.-2(淡化组)	24—28	100—150	2—3	12
<i>P. tricornutum</i> (海水组)	11—15	35—45	19—22	13
<i>P. tricornutum</i> (淡化组)	11—15	35—45	2	15

以上各组均设平行试验样品 2 份;培养液均为浙江水产学院 3 号;每天摇瓶 3 次,并随机更换培养瓶位置。各组均于细胞生长至稳定期前期收集分析。

1.2 分析测定 取一定体积的藻液,4000r/min 冰冻离心 10—15min,再用淡水培养液离心清洗 2 次,经 LGJ-III 型医用冷冻干燥机干燥,充氮气密封低温(4℃)保藏。

测定时,先用 Kochert 法萃取脂质^[8],NaOH-甲醇溶液皂化后,用 30% 三氟化硼乙醚络合物-甲醇溶液酯化,然后加 2mL 正己烷震荡 5min,静置,待液体分层后,抽上层正己烷液上机分析。测定在配有一个氢火焰离子化检测器(FID)的 GC-9A 型色谱仪(日本岛津公司)上进行,采用 10%DEGS 玻璃柱,柱长 2.6m,内径 3.2mm,以氮气为载体,流量 30mL/min;柱温 210℃,进样器温度 240℃。色谱峰定性采用部分脂肪酸甲酯标准样(Sigma 公司)与 Ackman^[9]的当量链长值结合法,脂肪酸组分的百分含量以面积归一化法计算,脂肪酸在藻细胞干重中的比例则按外标法计算。

2 结果

2.1 5 种微藻的脂肪酸组成特点

5 种微藻的脂肪酸组成如表 2 所示。在 4 种绿藻中,淡水蛋白核小球藻、海水小球藻-1和小球藻-2 的脂肪酸组成十分接近,主要脂肪酸为 16:0、16:2、18:0、18:2 和 18:3,5 种脂肪酸之和在 3 种藻类中分别占总脂肪酸的 80.07%、78.87% 和 83.87%;斜生栅藻也基本由 C_{16} 和 C_{18} 脂肪酸所组成,与小球藻的不同在于斜生栅藻具有较高含量的 18:1,而只有低含量的 18:0 和 18:2。4 种绿藻均不含 DHA[22:6(n-3)],EPA[20:5(n-3)]也只在 2 种海水小球藻中少量存在,但 4 种绿藻的 PUFA 含量都相对较高,占总脂肪酸的比例达 44.73%—58.89%。

三角褐指藻 3 个品系的脂肪酸组成十分相似,主要脂肪酸为 14:0、16:0、16:1、16:2、18:0 和 EPA,尤其含有高水平的 16:1 和 EPA,两者之和占总脂肪酸的比例在 3 个品系中分别高达 43.98%、46.61% 和 51.61%,含量最高的 XS03 每克干藻含 EPA 达 39.02mg,最低的 SS02 也含 EPA25.52mg。3 个品系中没有或只含有很低水平的 DHA。

表 2 驯化前、后 5 种微藻的主要脂肪酸组成(%)

Tab.2 Fatty acid composition of 5 species of microalgae before and after domestication

处理 Treatment	脂肪酸 Fatty acid	C.	S.	Chlorella	Chlorella	P. tricornutum		
		pyrenoidosa	obliquus	sp. -1	sp. -2	SS02	ZS08	XS03
驯化前 Before domestication	月桂酸 12:0	1.11	1.07	2.22	1.07	0.99	0.36	0.81
	十二碳烯酸 12:1	2.96	4.83	2.92	1.00	2.80	2.45	2.42
	十二碳二烯酸 12:2	1.09	2.27	1.46	0.39	1.08	1.01	0.94
	肉豆蔻酸 14:0	0.70	0.62	0.31	0.42	10.12	9.50	7.48
	十四碳烯酸 14:1	0.98	0.44	0.29	0.64	0.40	0.36	0.30
	十四碳二烯酸 14:2	/	0.58	/	0.08	0.38	0.49	0.42
	棕榈酸 16:0	9.15	10.03	11.48	13.26	13.71	11.04	10.54
	棕榈油酸 16:1	6.22	4.82	4.76	3.64	23.34	22.55	23.61
	十六碳二烯酸 16:2	8.66	1.12	7.01	11.43	6.45	6.46	6.89
	硬脂酸 18:0	14.22	0.95	15.57	12.35	6.42	7.77	7.54
	油酸 18:1	1.45	21.86	2.38	2.67	1.70	0.72	0.83
	亚油酸 18:2	15.03	5.36	13.77	22.64	1.60	1.99	1.93
	亚麻酸 18:3	33.01	32.32	31.04	24.19	1.32	3.13	0.95
	十八碳四烯酸 18:4	1.10	2.98	3.40	2.10	0.12	0.10	0.12
	花生烯酸 20:1	/	4.13	/	/	/	0.04	/
	二十碳二烯酸 20:2	/	/	/	/	/	/	/
	山嵛酸 22:0	0.76	0.92	0.77	0.78	2.79	2.79	3.78
	EPA 20:5	/	/	1.21	0.08	20.64	24.06	28.00
	DHA 22:6	/	/	/	/	0.66	/	0.84
	其他 Others	3.56	5.60	1.41	3.26	5.50	9.00	6.45
驯化后 After domestication	饱和酸 Saturates	25.94	13.59	30.35	27.88	34.03	31.46	30.15
	一烯酸 MUFA	11.61	36.08	10.35	7.95	28.24	26.12	27.16
	多烯酸 PUFA	58.89	44.73	57.89	60.91	32.23	33.42	36.24
	月桂酸 12:0	1.85	0.60	1.16	0.99	0.74	0.97	0.39
	十二碳烯酸 12:1	2.38	2.27	3.88	0.85	2.11	2.82	5.18
	十二碳二烯酸 12:2	1.14	0.88	1.85	0.36	0.82	1.11	2.54
	肉豆蔻酸 14:0	0.45	0.84	0.47	0.46	9.13	9.84	6.49
	十四碳烯酸 14:1	0.49	0.60	0.35	0.71	0.29	0.16	5.34
	十四碳二烯酸 14:2	/	0.11	0.12	0.10	0.28	0.13	0.23
	棕榈酸 16:0	10.98	15.19	9.04	10.63	11.12	11.97	13.62
	棕榈油酸 16:1	4.93	3.51	6.08	5.86	24.83	23.35	11.32
	十六碳二烯酸 16:2	6.60	1.36	9.23	12.21	8.46	7.62	2.59
	硬脂酸 18:0	15.67	2.41	14.43	13.58	11.98	10.40	4.79
	油酸 18:1	1.62	25.22	1.31	2.40	0.79	2.23	11.02
	亚油酸 18:2	13.24	9.10	16.32	20.23	0.51	0.57	12.04
	亚麻酸 18:3	35.75	27.23	29.89	25.04	2.21	1.89	2.31
	十八碳四烯酸 18:4	1.21	2.00	1.73	2.00	0.42	0.11	0.02
	花生烯酸 20:1	/	5.22	/	/	0.36	0.37	/
	二十碳二烯酸 20:2	/	/	/	/	/	/	/
	山嵛酸 22:0	1.34	0.55	0.77	0.91	0.43	0.51	1.22
	EPA 20:5	/	/	0.12	/	21.75	21.57	7.39
	DHA 22:6	/	/	/	/	/	/	0.17
	其他 Others	2.35	2.91	3.25	3.67	3.77	4.38	13.35
	饱和酸 Saturates	30.29	19.59	25.87	26.57	33.40	33.69	26.51
	一烯酸 MUFA	9.42	36.82	11.62	9.82	26.27	28.93	32.86
	多烯酸 PUFA	57.94	40.68	59.26	59.94	36.56	33.00	27.28

2.2 微藻脂肪酸对海、淡水驯化的响应

海、淡水驯化后 5 种微藻的脂肪酸组成(占总脂肪酸的百分比)及驯化前、后几种特征脂肪酸含量(每克干藻中的毫克数)的变化分别如表 2 和图 1 所示。可见,海、淡水驯化后每种微藻的特征脂肪酸种类没有明显变化,4 种绿藻仍然以 C_{16} 和 C_{18} 中的 5 种脂肪酸为主,三角褐指藻则仍以 16:2 和 EPA 占主导地位。不过,海、淡水驯化对多数种类的脂肪酸含量影响明显,且对不同种类(或品系)和不同脂肪酸的作用结果不同。海水驯化后,蛋白核小球藻中 16:0、18:0、18:3 及总脂肪酸占细胞干重的比例均有不同程度的升高,而斜生栅藻中除 18:2 外的其他特征脂肪酸及总脂肪酸占细胞干重的比例均有明显下降;两种海水小球藻经淡水驯化后,一种特征脂肪酸及总脂肪酸有明显升高,另一种则有不同程度的下降;即便是同种三角褐指藻的不同品系,其脂肪酸含量对淡水驯化的响应也截然不同,淡化后,SS02 的所有特征脂肪酸均有明显升高;而 ZS08 中除 18:0 稍有上升外,其他特征脂肪酸及总脂肪酸含量均有不同程度的下降;XS03 中所有特征脂肪酸及总脂肪酸含量的下降幅度更大,特别是作为重要营养指标的 EPA 水平,淡化前后其占细胞干重的比例相差达 36.36mg/g 之多。

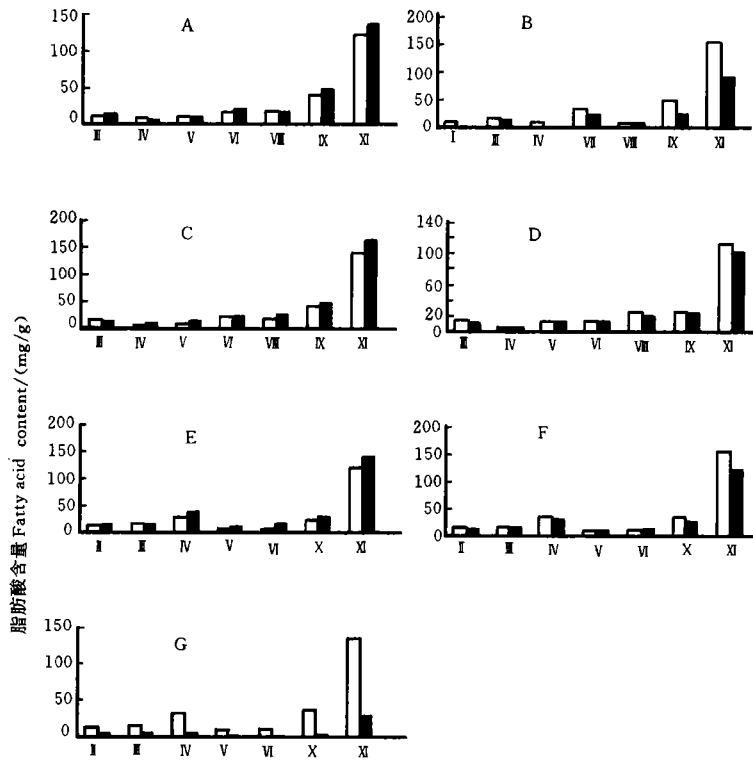


图 1 几种(品系)微藻脂肪酸对海、淡水驯化的响应

Fig. 1 The response of fatty acids of several microalgae to domestication of seawater and freshwater
(A) *C. pyrenoidosa* (B) *S. obliquus* (C) *C. sp.-1* (D) *C. sp.-2* (E) SS02 (F) ZS08 (G) XS03
I. $C_{12:1}$; II. $C_{14:0}$; III. $C_{16:0}$; IV. $C_{16:1}$; V. $C_{16:2}$; VI. $C_{18:0}$; VII. $C_{18:1}$;
VIII. $C_{18:2}$; IX. $C_{18:3}$; X. $C_{20:5}$; XI. Total FA

□ 驯化前 ■ 驯化后

3 讨论

Millner 和 Ackman 等人^[10,11]曾提出利用脂肪酸作为藻类的分类依据;近期, Volkman 和李荷芳等^[12-14]对多种海洋微藻的脂肪酸组成进行了比较研究,表明微藻中一些特征脂肪酸及某些脂肪酸的比例关系均可作为有用的分类标志。本研究进一步证明了这一规律:隶属于绿藻门的 4 种微藻都含有高含量的 C_{16} 和 C_{18} 多不饱和脂肪酸,缺乏 C_{20} 和 C_{22} 多不饱和脂肪酸;隶属于硅藻门的 3 株三角褐指藻则含有高含量的 C_{16} 和 C_{20} 多不饱和脂肪酸,缺乏甲藻门和金藻门普遍存在的高水平 22:6。这些均与 Volkman 和 Zhukova 等^[12,13]的研究结果一致。本试验选用的 3 种小球藻不论是淡水的、海水的还是海淡水反复驯化的,其脂肪酸组成十分相似;相对而言,栅藻因分类上与小球藻不在同属, C_{18} 脂肪酸的组成与小球藻有一定差异,但与不同门的三角褐指藻差异更大。Teshima 等研究的海水小球藻、Seto 等^[4]研究的微小球藻(*C. Minutissima*)和李荷芳等^[14]研究的小球藻-1、小球藻-2 均与本文研究的 3 种小球藻在脂肪酸组成上存在较大差异,而与 Renaud 等和 Zhukova 等研究的微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*)更为相似,因而上述学者研究的小球藻可能在分类上属于大眼藻纲(Eustimatophyceae),而不是绿藻纲。目前,各地利用海水小球藻强化培育富含 EPA 的轮虫及其它饵料动物时,应区别对待这两类“小球藻”。

已有一些学者研究了盐度变化对海洋微藻脂肪酸组成的影响。Teshima 等人发现海水小球藻在不同盐度条件下(4—30)脂肪酸组成没有明显变化,该藻在很低的盐度下仍能合成 EPA;Seto 则在研究 NaCl 浓度对微小球藻(*C. minutissima*)脂肪酸组成的影响时发现随着培养液 NaCl 浓度的增加,细胞中 EPA 的比例增加,而 16:0、18:1 和 18:2 的比例减少;Yongmanitchai 则报道三角褐指藻一个淡水品系(UTEX640)的 EPA 含量随培养液 NaCl 浓度的增加而显著下降。本研究发现,海、淡水驯化对 5 种微藻的脂肪酸含量均有一定影响,但两种淡水绿藻的脂肪酸组成对海水驯化的响应完全相反,两种海水小球藻对淡水驯化的响应也完全不同,即便是三角褐指藻的 3 个品系对淡水驯化的响应也是不一致的。这进一步说明盐度变化对不同藻种(或品系)和不同脂肪酸的作用结果不同。微藻脂肪酸对盐度变化的响应是否有一定的规律尚难定论,考虑到其它环境因子对微藻脂肪酸组成的影响十分明显,推测多数微藻中那些参与脂肪酸碳链延长和去饱和的酶对盐度变化是敏感的。

参考文献:

- [1] Watanabe T. Nutritional quality of living feed from the viewpoint of EFA for fish [J]. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 1978, **44**:1223—1227
- [2] Yongmanitchai W, Ward O P. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, **57**(2):419—425
- [3] Al-Hasan R H, Ali A M, Ka'wash H H, et al. Effect of salinity on the lipid and fatty acid composition of the halophyte *Navicula* sp.: potential in mariculture [J]. *J. Appl. Phycol.*, 1990, **2**:215—222
- [4] Seto A, Wang H L, Hesseltine C W. Culture conditions affect eicosapentaenoic acid content of *Chlorella minutissima* [J]. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1984, **61**:892—894
- [5] Teshima S, Yamasaki S, Kanazawa A, et al. Effects of water temperature and salinity on eicosapentaenoic acid level

- of marine *Chlorella* [J]. *Bull. Japn. Soc. Sci. Fish.*, 1983, **49**(5):805
- [6] Renaud S M, Parry D L, Van L, et al. Effects of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture [J]. *J. Appl. Phycol.*, 1991, **3**: 43—53
- [7] Yongmanitchal W, Ward O P. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid [J]. *Phytochemistry*, 1991, **30**(9):2963—2967
- [8] Kochert G. Quantitation of the macromolecular components of microalgae. Physiological and Biochemical methods [M]. London: Cambridge University Press, 1978, 189
- [9] Ackman R G. Simplification of analysis of fatty acids in fish lipids and related lipid samples [J]. *Acta. Med. Scand.*, 1987, **222**:99—103
- [10] Milner H W. The fatty acid of *Chlorella* [J]. *J. Biochem.*, 1948, **176**:813—817
- [11] Ackman R G, Tocher C S, Melachlan J. Marine phytoplankter fatty acids [J]. *J. Fish. Res. Board Can.*, 1968, **25**:1603—1620
- [12] Volkman J K, Jeffrey S W, Nichols P D, et al. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture [J]. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 1989, **128**:219—240
- [13] Zhukova N V, Aizdaicher N A. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae [J]. *Phytochemistry*, 1995, **39**(2):351—356
- [14] 李荷芳,周汉秋. 海洋微藻脂肪酸组成的比较研究 [J]. 海洋与湖沼, 1999, **30**(1):34—40

THE EFFECT OF DOMESTICATION WITH SEAWATER AND FRESHWATER ON FATTY ACID COMPOSITION OF FIVE SPECIES OF MICROALGAE

LU Kai-hong and LIN Xia

(Oceanographic & fisheries department, Ningbo University, 315211)

Abstract: The fatty acid composition of five species of microalgae and the effect of domestication with seawater and freshwater on them were studied. The results suggest that each class of microalgae is characterized by a specific fatty acid profile. The specific features of freshwater alga *Chlorella pyrenoidosa*, marine algae *Chlorella* sp.-1 and *Chlorella* sp.-2 are high content of 16:0, 16:2, 18:0, 18:2 and 18:3; The freshwater alga *Scenedesmus obliquus* is characterized by high content of 16:0, 18:1 and 18:3; The reliable marks of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* are rich in 14:0, 16:0, 16:1, 16:2, 18:0 and 20:5, especially in 16:0 and EPA. After domestication, the kind of “characteristic” fatty acids was not changed, but the content of the main fatty acids changed. The content (mg/g cell dry wt) of “characteristic” fatty acids and total fatty acid in *C. pyrenoidosa*, *Chlorella* sp.-1 and the clone SS02 of *P. tricornutum* increased to a certain degree, while the results were opposite in *S. obliquus*, *Chlorella* sp.-2 and the clones ZS08, XS03 of *P. tricornutum*.

Key words: Microalgae; Seawater and freshwater domestication; Fatty acid