

三种海洋微藻生长期脂肪酸组成研究

李文权, 廖启斌, 李 芊, 陈清花, 王 宪

(厦门大学 海洋系, 亚热带海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要: 球等鞭金藻、盐藻和小球藻脂肪酸组成气相色谱分析的结果表明, 三种海洋微藻在指数生长期总多不饱和脂肪酸含量(TPUFA)明显比稳定生长期高, 而总饱和脂肪酸含量(TSFA)在指数生长期相对较低。球等鞭金藻的DHA, 小球藻的EPA和盐藻的C18:3均在培养后的第6d均达最大值。

关键词: 微藻; 生长期; 脂肪酸

中图分类号: Q178.53; Q547 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-6336(2002)02-0010-04

Fatty acid composition of three species of marine microalgae during growth phases

LI Wen-quan, LIAO Qi-bin, LI Qian, CHEN Qing-hua, WANG Xian

(Department of Oceanography, Institute of Subtropical Oceanography, Xiamen University, Xiamen, 361005, China)

Abstract: GC determination of fatty acid composition of *Isochrysis galbana*, *Chlorella* sp. and *Dunaliella salina* showed that TPUFA of the three species of microalgae in exponential phase were higher than those in stationary phase, otherwise TSFA were relatively lower in exponential phase. DHA of *Isochrysis galbana*, EPA of *Chlorella* sp. and C18:3 of *Dunaliella salina* were all the maximum at sixth day during cultural period.

Key words: microalgae; growth phase; fatty acid

海洋微藻具有较高的营养价值和药用价值, 特别是海洋微藻富含 ω_3 系列高度不饱和脂肪酸, 如C20:5(EPA)、C22:6(DHA)和C18:3等。这些 ω_3 系列高度不饱和脂肪酸具有降血压、抗血栓、降低胆固醇、预防老年痴呆、改善脑机能, 提高智力和记忆力等作用^[1]。因此, 海洋微藻多不饱和脂肪酸的研究具有十分重要的意义。本文对三种海洋微藻在生长过程中脂肪酸组成的变化进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 样品和试剂

实验所用的藻种为球等鞭金藻(*Isochrysis*

galbana)、小球藻(*Chlorella* sp.)和盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)。培养液采用F/2配方配制, 在SPX-250型生化培养箱中培养。光暗周期为12/12, 温度恒定在16℃, 每天振摇数次。微藻细胞数由血球计数板显微计数。脂肪酸标准样品购自美国SIGMA公司。

1.2 实验方法

扩大培养球等鞭金藻、小球藻、盐藻于2L的大三角瓶中, 加入营养盐后, 旋置在生化培养箱中培养。分别于培养2、6、8、10、12、14、18d时测定微藻的吸光值, 换算成细胞数, 同时采集藻液测定其脂肪酸含量。

1.3 样品的水解和脂肪酸甲酯的制备

收稿日期: 2001-07-18, 修改稿收到日期: 2001-11-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870565); 福建省自然科学基金资助项目(C97006)

作者简介: 李文权(1946-), 男, 福建厦门人, 教授, 主要从事海洋有机化学研究。

取 50 mL 实验藻液 (细胞数 1.2×10^5 /mL), 过滤完毕置干燥器干燥后连同滤膜放入带螺帽的水解管内, 加 0.3 mL 正十九酸内标液 (0.2 g/L) 和 2 mL $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ 混合液 (体积比为 2:1), 充 N_2 1 min 后密闭封口, 以 SCQ-250 型超声波清洗器 (33 kHz, 250W) 超声萃取 30 min, 移出上层清液, 重复 3~4 次 (超声作用时间可缩短为 10 min), 合并萃取液, N_2 浓缩吹干后, 加入 2 mol/L $\text{HCl-CH}_3\text{OH}$ 溶液, 充 N_2 后密闭 (为确保气密性良好, 可先用聚四氟乙烯材料封闭瓶口后, 再旋上螺帽拧紧)。在 100°C 水浴中反应 40 min, 冷却后用 2 mL 正己烷分两次提取, 合并提取液于具塞离心管中, 用 N_2 吹至 20~50 μL 供色谱分析用。

1.4 气相色谱分析

实验室所用仪器为 SP-3420 型 (北京分析仪器厂生产) 气相色谱仪, 30 m \times 0.22 mm SE-54 弹性石英毛细管色谱柱 (Australia International Sales), 程序升温分四个阶段进行。第一段柱温为 $50 \sim 120^\circ\text{C}$, 升温速率为 $20^\circ\text{C}/\text{min}$, 于 120°C 恒温 1 min; 第二段柱温为 $120 \sim 180^\circ\text{C}$, 升温速率为 $6^\circ\text{C}/\text{min}$, 于 180°C 恒温 1 min; 第三段柱温为 $180 \sim 210^\circ\text{C}$, 升温速率为 $6^\circ\text{C}/\text{min}$, 于 210°C 恒温 10 min; 第四段柱温为 $210 \sim 280^\circ\text{C}$, 升温速率为 $3^\circ\text{C}/\text{min}$, 于 280°C 恒温 5 min。进样器温度为 300°C , 氢火焰离子化检测器 (FID) 温度为 300°C , 载气为高纯 N_2 , 柱头压为 0.42 MPa, 恒流控制, N_2 流量 30 mL/min, 空气流量 300 mL/min, 分流比为 1:18, 进样量 1 μL 。海洋微藻脂肪酸的气相色谱定性和定量分析按文献方法 [2] 进行。

2 结果和讨论

细胞数的结果如图 1~3, 脂肪酸分析结果如表 1。从图 1~3 可以看出, 三种微藻在培养的最初几天细胞数明显增加, 逐渐进入指数生长期。球等鞭金藻在培养 10 d 后进入稳定生长期, 盐藻和小球藻则在培养 12 d 后达到了稳定生长期。

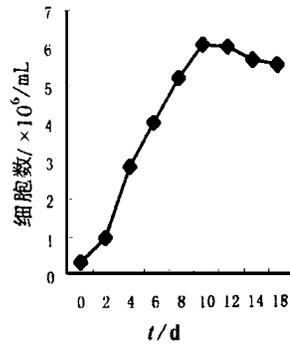


图 1 球等鞭金藻生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *I. galbana*

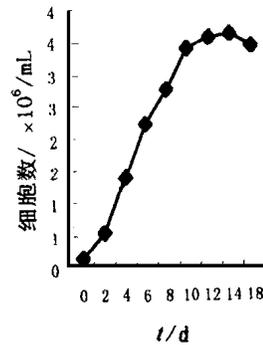


图 2 盐藻生长曲线

Fig. 2 Growth curve of *D. salina*

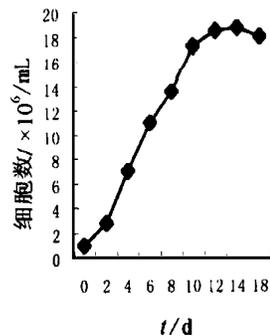


图 3 小球藻生长曲线

Fig. 3 Growth curve of *Chlorella* sp.

由表 1 可知, 球等鞭金藻在不同的生长时期, 总饱和脂肪酸 (TSFA)、总单不饱和脂肪酸 (TMUFA)、总多不饱和脂肪酸 (TPUFA) 占总脂肪酸 (TFA) 的百分组成有明显变化, 其中 TPUFA 含量的变化为 33.16%~43.21%, 变化幅度最大; 球等鞭金藻的 TPUFA 在指数生

表1 球等鞭金藻、小球藻和盐藻生长期脂肪酸组成变化(% TFA)
Tab.1 Variation of the fatty acid composition of *I. galbana*, *Chlorella* sp. and
D. salina during growth

t/d	藻类	脂肪酸组成/(%)									
		C14:0	C15:0	C16:4	C16:3	C16:2	C16:1	C16:0	C18:4	C18:3	C18:2
2	I	17.20	0.25	0.41	0.24	0.42	4.49	17.27	9.34	11.04	5.22
	C	4.87	0.47	0.41	0.28	0.32	20.13	35.45	0.09	0.37	3.29
	D	0.85	0.37	12.78	1.75	1.60	1.25	25.73	2.00	39.43	7.97
6	I	14.62	0.30	0.42	0.25	0.51	2.90	15.78	11.85	16.28	5.24
	C	3.98	0.40	0.43	0.37	0.41	19.93	33.10	0.11	0.46	3.39
	D	0.77	0.36	11.65	2.41	1.49	3.20	19.85	2.50	42.59	7.82
8	I	14.54	0.29	0.42	0.30	0.63	3.20	14.70	12.39	16.00	5.40
	C	5.72	0.43	0.41	0.32	0.38	20.76	31.35	0.10	0.43	3.45
	D	0.77	0.42	13.54	1.52	1.22	2.95	19.85	2.55	40.65	9.09
10	I	14.69	0.24	0.43	0.26	0.83	3.97	13.48	11.20	16.02	5.63
	C	5.74	0.33	0.39	0.35	0.35	21.54	23.29	0.10	0.51	3.18
	D	0.87	0.41	13.89	1.28	1.24	3.15	19.47	2.64	38.85	9.78
12	I	15.91	0.27	0.37	0.23	0.65	4.52	15.19	12.59	13.28	5.15
	C	5.64	0.42	0.38	0.31	0.32	21.82	35.40	0.09	0.41	2.92
	D	0.81	0.46	14.55	0.88	1.47	3.21	20.46	2.43	39.19	9.02
14	I	16.68	0.30	0.37	0.22	0.59	4.42	16.00	10.84	12.81	4.71
	C	5.72	0.43	0.38	0.29	0.29	22.13	36.62	0.08	0.35	3.25
	D	0.87	0.38	14.15	0.92	1.48	1.89	21.98	2.38	39.42	8.89
18	I	17.04	0.30	0.35	0.19	0.51	4.50	17.11	9.61	11.41	5.15
	C	5.94	0.44	0.37	0.27	0.29	21.78	38.16	0.08	0.34	3.00
	D	0.97	0.51	11.99	0.89	1.20	1.32	27.24	2.14	39.61	7.83

续表1

t/d	藻类	脂肪酸组成/(%)								
		C18:1	C18:0	C20:4	C20:5	C20:1	C22:6	TSFA	TMUFA	TPUFA
2	I	23.86	1.50	0.35	1.13	2.27	4.99	36.23	30.61	33.16
	C	5.77	1.14	2.05	24.34	0.52	0.51	41.92	26.42	31.65
	D	4.33	1.94	nd	nd	nd	nd	28.98	5.59	65.53
6	I	20.25	0.99	0.69	1.46	1.95	6.51	31.69	25.10	43.21
	C	5.90	1.01	2.45	27.15	0.38	0.54	38.49	26.20	35.31
	D	5.80	1.57	nd	nd	nd	nd	22.55	9.01	68.44
8	I	20.82	1.20	0.70	1.55	1.95	5.92	30.72	25.97	43.31
	C	5.68	1.16	2.43	26.29	0.49	0.57	38.67	26.94	34.40
	D	6.63	0.80	nd	nd	nd	nd	21.85	9.57	68.58
10	I	22.64	1.18	0.60	1.44	1.76	5.60	29.60	28.38	42.02
	C	6.03	0.96	2.13	24.02	0.50	0.58	40.32	28.08	31.60
	D	7.74	0.68	nd	nd	nd	nd	21.42	10.89	67.69
12	I	22.36	1.36	0.42	1.22	1.83	4.65	32.74	28.71	38.55
	C	6.39	1.16	1.88	21.77	0.50	0.59	42.62	28.72	28.67
	D	6.92	0.60	nd	nd	nd	nd	22.33	10.13	67.54
14	I	23.50	1.47	0.39	1.04	2.13	4.52	34.45	30.04	35.50
	C	6.55	1.13	1.85	19.86	0.51	0.55	43.90	29.20	26.90
	D	6.59	1.05	nd	nd	nd	nd	24.28	8.48	67.24
18	I	22.89	1.43	0.38	0.78	2.02	4.35	35.88	29.41	34.72
	C	6.63	1.09	1.77	48.86	0.53	0.46	45.63	28.93	25.44
	D	5.07	1.22	nd	nd	nd	nd	29.95	6.39	63.66

注: TFA, 总脂肪酸; TSFA, 总饱和脂肪酸; TMUFA, 总单不饱和脂肪酸; TPUFA, 总多不饱和脂肪酸。

I 为球等鞭金藻(*I. galbana*); C 为小球藻(*Chlorella* sp.); D 为盐藻(*D. salina*)。

长期明显高于稳定生长期, 在第 8 d 有最大值 (43.21%)。DHA 第 6 d 有最大值 (6.51%)。TSFA 和 TMUFA 的含量分别为 29.6% ~ 36.23% 和 25.1% ~ 30.61%。总饱和脂肪酸 (TSFA) 的含量在起始阶段存在一个较高数值, 进入指数生长期之后其含量开始明显下降, 在第 10 d 达到最低值, 到稳定生长期后又逐渐升高。总单不饱和脂肪酸 (TMUFA) 也有相似的变化趋势。

盐藻在培养过程中 TPUFA 含量变化不大, 在指数生长期的第 6 d 至 8 d 含量较高。TSFA 在指数生长期含量较低, 达到稳定生长期之后递增。TMUFA 先增大后减小。C18:3 在第 6 d 达到最大值 (占总脂肪酸的百分比为 42.59%)。C18:4 含量变化较小。C16:4 也是盐藻多不饱和脂肪酸中的主要成分, 到第 12 d 其含量达到最大值, 之后逐渐减小。

小球藻的 TPUFA 最大值则出现在第 6 d (35.31%)。EPA 是小球藻含量最高的高度不饱和脂肪酸, 与 TPUFA 有同样的变化趋势, 最大值出现在第 6 d (27.15%)。小球藻的 TSFA 在指数生长期相对较低, 稳定生长之后逐渐增大。TMUFA 的百分组成在整个生长期中变化较小。

微藻在不同时期的总脂肪酸和脂肪酸含量与组成有明显的变化, Dunstan 等人曾对 *Nannochloropsis oculata* 藻进行研究, 发现在指数生长期其体内的长链 PUFA 含量最高^[3]。

刘发义等对球等鞭金藻的研究发现, 在指数生长期其藻体内的总脂和 DHA 的含量都要大大高于稳定生长期^[4]。Michael 等人曾对

Heterosigma akashiwo 藻进行过为期 22 d 的观测, 结果发现在指数生长期 (第 6、10、14 d) 其藻体内的 PUFA 百分含量最高, 分别为 52.5%, 56.6%, 56.8%, 进入稳定生长期后 (第 18 和 22 d) 藻体内的 PUFA 开始明显下降, 分别降至 45.9% 和 43.5%^[5]。

3 结 语

本文通过对球等鞭金藻、盐藻和小球藻在生长过程中脂肪酸组成的研究表明, 三种海洋微藻在指数生长期总多不饱和脂肪酸含量 (TPUFA) 明显比稳定生长期高, 而总饱和脂肪酸 (TSFA) 在指数生长期相对较低。球等鞭金藻的 DHA, 小球藻的 EPA 和盐藻的 C18:3 均在扩大培养后的第 6 d 达最大值。

参考文献:

- [1] SIMOPOULOS A P, KIFER R R, WYKES A A. ω 3 fatty acids: Reseach advances and supput in field since June 1985 (worldwide)[J]. World Review of Nutrition and Dietetics. 1991, 66: 51-71.
- [2] 蔡阿根, 郑爱榕, 李文权, 等. 海洋微藻脂肪酸气相色谱分析[J]. 海洋技术, 1998, 17(4): 64-68.
- [3] DUNSTAN GA, VOLKMAN JK, BARRETT S M, *et al.* Essential polyunsaturated fatty acids form 14 species of diatom (bacillariophyceae) [J]. Phytochemistry, 1994, 35(1): 155-161.
- [4] 刘发义, 李荷芳. 海洋微藻高度不饱和脂肪酸的研究和开发[A]. 全国首届海洋生命活性物质与天然药物学术讨论论文集[C]. 厦门: 中国药学会生化药物专业委员会等, 1996. 269-273.
- [5] MICHAEL V B, JAMES R D, DAVID W P. Octadecapentaenoic acid in a raphidophyte alga *Heterosigma akashiwo*[J]. Phytochemistry, 1997, 45(2): 303-306.