

文章编号:1005-8737(2000)01-0020-05

三角褐指藻不同藻株脂肪酸组成的研究

陆开宏, 林霞, 钱云霞

(宁波大学 海洋与水产业系, 浙江 宁波 315211)

摘 要:1996~1998 年对上海、浙江和厦门的三角褐指藻进行分离克隆, 比较了其中 5 个藻株在相同培养条件下的脂肪酸组成及培养液淡化对其脂肪酸组成的影响。结果表明, 5 个藻株的脂肪酸组成特征基本一致, 均具有高比例的肉豆蔻酸(14:0)、棕榈酸(16:0)、棕榈油酸(16:1)、十六碳二烯酸(16:2)和 EPA(20:5), 只有低含量的 DHA(22:6)、花生烯酸(20:1)和 18 碳脂肪酸, 但不同藻株的脂肪酸含量存在一定的差异。其中, EPA 含量最高的为 XS03 株, 细胞干重中的含量为 39.02 mg/g, 占脂肪酸总量的 28.00%; 而 EPA 含量最低的为 XS04 株, 细胞干重含量及占脂肪酸总量的比例分别为 23.42 mg/g 和 19.13%。培养液淡化对三角褐指藻脂肪酸组成有明显影响, 但对不同藻株的作用结果不同。淡化后, DHA 和山萘酸(22:0)的含量在所有藻株中均有明显下降, 而 14:0、16:0、16:1、16:2、18:0、20:5 和脂肪酸总量在 SS02 和 ZS06 株中均有不同程度的提高, 在 ZS08、XS03 和 XS04 株中则有不同程度的下降。

关键词:三角褐指藻; 藻株; 淡化培养; 脂肪酸组成

中图分类号:Q949.2

文献标识码:A

藻类是自然界中能生化合成高度不饱和脂肪酸(HUFA)的极少数生物之一, 且其合成的 HUFA 与鱼油相比, 氧化稳定性好, 没有腥臭味。因此, 目前研究藻类中脂肪酸的组成及合成机制, 利用藻类生产 HUFA 已受到世界各国的广泛重视^[1-9]。作为人工育苗常规基础饵料的三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)具有较高的 EPA 含量^[10-12], 适宜人工高密度培养, 因此, 已有学者对其脂肪酸生物合成及脂肪酸组成进行过研究^[6, 11, 12]。但是, 由于藻类中 HUFA 的构成和含量随着藻的种类、品系、环境条件和培养方法的不同变化很大^[10], 要筛选富含 EPA(C20:5)或 DHA(C22:6)的藻种, 研究不同藻株的脂肪酸组成是很有必要的。本实验选用了适宜咸、淡水培养的三角褐指藻 5 个藻株, 以探讨培养液淡化对三角褐指藻脂肪酸

组成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用藻种分别由青岛海洋大学微藻研究所、上海水产大学渔业学院、福建水产研究所和宁波大学藻种室提供, 经浙江水产学院 3# 培养液(100 mg KNO₃, 10 mg K₂HPO₄, 2.5 mg FeSO₄·7H₂O, 0.25 mg MgSO₄, 20 mg Na₂-EDTA, 6 mg VB₁, 50 × 10⁻³ mg VB₁₂, 1 000 ml 天然海水)驯化、扩种培养后, 用水滴分离法进行分离, 分别经单个细胞克隆后, 选用生长繁殖快、耐低盐的上海梭型藻株 SS02、厦门三出放射型藻株 XS03、XS04 和浙江三出放射型藻株 ZS06、ZS08 进行试验。

1.2 藻株培养

1.2.1 海水组 5 个藻株均在相同条件下进行培养, 培养液为浙江水产学院 3# 培养液, 水温(13 ± 2)℃, 光照强度(2 000 ± 200)lx, 相对体积质量为 1.015。每个藻株均设平行试验样品 2 份, 摇瓶 3 次/

收稿日期:1999-7-26

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(96-01)

作者简介:陆开宏(1964-), 男, 浙江余姚人, 宁波大学副教授, 硕士, 从事水生生物形态、生态及生理生化研究。

d,并随机更换培养瓶位置。

1.2.2 淡水组 较前述培养时间提前 60 d 对 5 个藻株进行淡水驯化,试验同时增设 5 个藻株的淡水组,培养条件除培养液为淡水配制外,其余均与上述

相同。

各组均于藻类种群生长至稳定期前期收集分析。各藻株培养天数及细胞密度见表 1。

表 1 5 个藻株在海水组与淡水组的细胞密度

Table 1 Cell densities of the 5 strains cultivated in seawater and freshwater

组别 Group	项目 Item	藻株 Strain				
		SS02	ZS06	ZS08	XS03	XS04
海水组 Seawater	培养天数/d Culture days	13	13	13	13	13
	接种密度 Beginning density/($10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$)	65.5	63.5	66.8	65.5	64.8
	收获密度 Harvest density/($10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$)	1 218.5	1 407.5	1 258.8	1 088.2	1 201.6
淡水组 Freshwater	培养天数/d Culture days	15	15	15	15	15
	接种密度 Beginning density/($10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$)	67.2	65.4	63.8	67.5	67.2
	收获密度 Harvest density/($10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$)	788.5	827.5	680.0	856.8	689.5

1.3 分析测定

培养后的细胞,2 000 r/min 离心 20 min 后收集,用淡水培养液离心、清洗 3 次,再经 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^[13],经 NaOH-甲醇溶液皂化后,再用 30% 三氟化硼乙醚络合物-甲醇溶液酯化,然后加 2 ml 正己烷震荡 5 min,静置,待液体分层后,抽上层正己烷液上机分析。采用 GC-9A 型色谱仪(日本岛津公司)。测定条件:检测器,氢火焰离子化检测器(FID);玻璃柱 10% DEGS,长 2.6 m,内径 3.2 mm;载体,氮气,流量 30 ml/min;柱温,210℃,进样口温度,240℃。色谱峰定性采用部分脂肪酸甲酯标准样(Sigma 公司)与 Ackman^[14]的当量链长值结合法,脂肪酸的组成以面积归一化法计算,脂肪酸在藻类干重中的比例则按外标法计算。

2 结果

2.1 不同藻株的脂肪酸组成

海水组中,三角褐指藻 5 个藻株的脂肪酸组成如表 2、3 所示。在检测的 17 种脂肪酸中,肉豆蔻酸、棕榈酸、棕榈油酸、十六碳二烯酸和 EPA 等 5 种脂肪酸,在全部藻株中的含量都较高,5 种脂肪酸之和占脂肪总量的比例高达 71.17%~76.33%;月桂酸、十四碳烯酸、十四碳二烯酸和花生酸等 4 种脂肪酸仅少量发现,占脂肪酸总量的比例均在 1% 下;花生烯酸和 DHA 所占比例更小,部分藻株中未能检测到。各脂肪酸在 5 个藻株中的分布基本一致,但藻株之间也存在一定差异($P < 0.05$)(表 3)。

2.2 淡化对脂肪酸组成的影响

表 2 各藻株的主要脂肪酸占脂肪酸总量的比率

Table 2 Composition of main fatty acids in total fatty acids of each strain %

脂肪酸 Fatty acid	藻株 Strain				
	SS02	ZS06	ZS08	XS03	XS04
月桂酸(C12:0)	0.99	0.52	0.36	0.81	1.05
十二碳烯酸(C12:1)	2.80	2.63	2.45	2.42	3.25
十二碳二烯酸(C12:2)	1.08	1.00	1.01	0.94	1.32
肉豆蔻酸(C14:0)	10.12	10.00	9.50	7.48	8.92
十四碳烯酸(C14:1)	0.40	0.36	0.36	0.30	0.38
十四碳二烯酸(C14:2)	0.38	0.40	0.49	0.42	0.64
棕榈酸(C16:0)	13.71	11.76	11.04	10.54	12.97
棕榈油酸(C16:1)	23.34	22.81	22.55	23.61	24.44
十六碳二烯酸(C16:2)	6.45	7.03	6.46	6.89	6.70
硬脂酸(C18:0)	6.42	8.52	7.77	7.54	7.90
油酸(C18:1)	1.70	0.68	0.72	0.83	0.99
亚油酸(C18:2)	1.60	1.70	1.99	1.93	1.55
花生酸(C20:0)	0.12	0.09	0.10	0.12	0.10
花生烯酸(C20:1)	/	/	0.04	/	/
山嵛酸(C22:0)	2.79	2.71	2.79	3.78	3.03
EPA(C20:5)	20.64	22.73	24.06	28.00	19.13
DHA(C22:6)	0.66	/	/	0.84	0.88
合计 Total	93.20	92.94	87.87	92.6	87.63

5 个藻株淡水组的主要脂肪酸组成见表 4。与表 2、3 比较,多数脂肪酸的含量相差很大,说明淡化对 5 个藻株的脂肪酸组成影响明显。但是,淡化对不同藻株和不同脂肪酸的作用结果不同:淡化后,C22:6 和 C22:0 含量在所有藻株中均有明显下降。而 C14:0、C16:0、C16:1、C16:2、C18:0 和 C20:5 及总脂肪酸占藻细胞干重的比例,在 SS02 和 ZS06 中均有不同程度的提高,在 ZS08、XS03 和 XS04 株中则均有不同程度的下降,在 XS03 和 XS04 株中的下

降尤为明显。但在这 2 个藻株中 C18:1 和 C18:2 含量有明显提高。值得注意的是,作为重要营养指标

表 3 各藻株中的主要脂肪酸含量(干重)

脂肪酸 Fatty acid	mg/g 细胞 cell				
	SS02	ZS06	ZS08	XS03	XS04
月桂酸 (C12:0)	1.22	0.64	0.56	1.12	1.28
十二碳烯酸 (C12:1)	3.46	3.22	3.88	3.36	3.98
十二碳二烯酸 (C12:2)	1.34	1.22	1.60	1.32	1.62
肉豆蔻酸 (C14:0)	12.52	12.26	15.02	10.42	10.92
十四碳烯酸 (C14:1)	0.50	0.44	0.58	0.42	0.46
十四碳二烯酸 (C14:2)	0.46	0.50	0.78	0.58	0.78
棕榈酸 (C16:0)	16.96	14.42	17.46	14.68	15.88
棕榈油酸 (C16:1)	28.86	27.96	35.64	32.88	29.92
十六碳二烯酸 (C16:2)	7.98	8.62	10.20	9.60	8.20
硬脂酸 (C18:0)	7.94	10.44	12.28	10.50	9.66
油酸 (C18:1)	2.10	0.84	1.14	1.16	1.22
亚油酸 (C18:2)	1.98	2.08	3.14	2.68	1.90
花生酸 (C20:0)	0.14	0.12	0.16	0.16	0.12
花生烯酸 (C20:1)	/	/	0.06	/	/
山萘酸 (C22:0)	3.46	3.32	4.42	5.26	3.70
EPA (C20:5)	25.52	27.88	38.04	39.02	23.42
DHA (C22:6)	0.82	/	/	1.16	1.08
脂肪酸总量 Total FA	123.66	122.58	158.10	139.30	122.44

的 C20:5 水平,在 ZS06 藻株中淡化后比海水中有明显提高,而在 XS03 和 XS04 中,淡化后则有大幅度下降。

3 讨论

经测定,三角褐指藻 5 个藻株的脂肪酸组成中几乎都具有较高比例的 C14:0, C16:0, C16:1 和 C20:5,只有低含量的 C20:1 和 18 碳脂肪酸,与绿藻、甲藻和金藻的脂肪酸组成有较大的差别^[7,11,15],这与 Yongmanitchal^[7]和李荷芳^[11]等报道的结果相似。由此说明,不同种类的微藻具有其本身的特征脂肪酸,但不同作者对同一藻类分析的结果也有很大差异。Yongmanitchal^[7]曾报道三角褐指藻一个淡水品系(UTEX640)中 EPA 占脂肪酸总量的比例高达 30.5%,而另一海水品系(UTEX642)的 EPA 仅占脂肪酸总量的 20.7%;Moreno^[6]分析的一个三角褐指藻品系中 DHA 占脂肪酸总量的比例高达 10.8%,

表 4 淡水组各藻株中主要脂肪酸的组成

Table 4 Fatty acids composition of each strain in freshwater

脂肪酸 Fatty acid	SS02		ZS06		ZS08		XS03		XS04	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
月桂酸 (C12:0)	0.74	0.57	1.02	1.10	0.97	1.30	0.39	0.14	/	/
十二碳烯酸 (C12:1)	2.11	3.28	2.84	6.18	2.82	3.76	5.18	1.86	2.64	1.24
十二碳二烯酸 (C12:2)	0.82	1.28	1.09	1.19	1.11	1.48	2.54	0.92	1.60	0.76
肉豆蔻酸 (C14:0)	9.13	14.22	8.44	18.34	9.84	13.14	6.49	2.32	7.87	3.68
十四碳烯酸 (C14:1)	0.29	0.44	0.26	0.56	0.16	0.22	5.34	1.92	7.56	3.54
十四碳二烯酸 (C14:2)	0.28	0.44	0.39	0.86	0.13	0.18	0.23	0.08	0.49	0.24
棕榈酸 (C16:0)	11.12	17.32	11.06	24.04	11.97	15.98	13.62	4.88	12.53	5.88
棕榈油酸 (C16:1)	24.83	38.68	22.83	49.64	23.35	31.16	11.32	4.06	13.50	6.32
十六碳二烯酸 (C16:2)	8.46	13.18	7.98	17.36	7.62	10.16	2.59	0.92	3.09	1.44
硬脂酸 (C18:0)	11.98	18.66	10.24	22.26	10.40	13.88	4.79	1.72	5.70	2.66
油酸 (C18:1)	0.79	1.24	1.69	3.66	2.23	2.98	11.02	3.96	8.94	4.20
亚油酸 (C18:2)	0.51	0.78	0.75	1.64	0.57	0.76	12.04	4.32	6.61	3.10
花生酸 (C20:0)	0.06	0.10	0.06	0.12	0.14	0.18	2.33	0.84	1.28	0.60
花生烯酸 (C20:1)	0.36	0.56	0.41	0.90	0.37	0.50	/	/	/	/
山萘酸 (C22:0)	0.43	0.68	0.75	1.62	0.51	0.68	1.22	0.44	0.96	0.44
EPA (C20:5)	21.75	33.88	22.96	49.92	21.57	28.78	7.39	2.66	12.07	5.66
DHA (C22:6)	/	/	/	/	/	/	0.17	0.06	0.53	0.24
脂肪酸总量 Total FA	144.30		199.40		125.10		31.10		40.00	

注:A—占脂肪酸总量的比例(%). Percentage in total fatty acids. B—在藻细胞(干重)中的含量(mg/g). Content in algae cell (dry weight).

而其他学者^[6,7,11]的结果多在 2.0% 以下。一般认为这种差异是由藻类培养条件和分析手段不同所造

成。本实验发现,同种不同藻株之间脂肪酸组成也存在一定差异,这与 Lopez 等^[15]在等鞭金藻

(*Isochrysis galbana*) 不同藻株之间的实验结果一致, 鉴于 Lopez 等和本实验均各自在相同培养条件及分析技术下进行, 说明同种不同藻株(品系)之间存在遗传上的差异。

有关盐度对藻类脂肪酸组成的影响说法不一。Teshima^[16]发现不同盐度下(4~30)海水小球藻(*Chlorella* sp.)脂肪酸组成没有明显变化, 认为该藻在盐度很低条件下具有合成 EPA 的能力。Seto^[17]则在研究 SWC(Sea water concentration)和 NaCl 浓度对 *Chlorella minutissima* 脂肪酸组成的影响时发现, 随着培养液中 SWC 或 NaCl 浓度的增加, 细胞中 EPA 的比例增加, 而 C16:0, C18:1 ω 9 和 C18:2 ω 6 的比例减少; Al-Hasan 等^[18]也发现, 随着盐度的增加, 盐生舟形藻(*Navicula* sp.)中 C16:0 和 C16:1 占脂肪酸总量的比例会明显减少, C16:2 和 C16:3 则稍有增加, 而 EPA 的变化并不明显。Yongmanitchal^[7]分析了 153 株分离于泰国的淡水藻类, 发现它们主要由 C16:0, C18:1, C18:2 和 C18:3 4 种脂肪酸组成, 没有一株藻类合成 EPA 或 DHA。不过, 对于三角褐指藻的一个淡水品系(UTEX640), 情形则完全不同。这一品系不仅 EPA 含量高, 而且 EPA 含量随培养液中 NaCl 浓度的升高而明显减少。本研究发现, 三角褐指藻 5 个藻株在淡水中培养后, 除了 DHA 和 C22:0 水平均有明显下降外, 其余 6 种主要脂肪酸(C14:0, C16:0, C16:1, C16:2, C18:0 和 C20:5)不仅变化幅度大, 而且在不同藻株中的变化情况不尽相同, 即便 ZS06 和 ZS08 是同期分离于浙江藻种的两个藻株, 淡水培养后, 前者的 6 种脂肪酸均有不同程度的提高, 而后者恰恰相反。综上所述, 盐度不仅对不同种藻类和同种不同藻株(品系)藻种的脂肪酸组成影响不同, 而且对不同种脂肪酸的作用结果也不一样。

参考文献:

- [1] Dyerberg J, Bang H O, et al. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis[J]. *Lancet*, 1978, II:117-119.
- [2] Watanabe T. Nutritional quality of living feed from the viewpoint of EPA for fish[J]. *Bull Jpn Soc Sci Fish*, 1978, 44:1 223-1 227.
- [3] 姜悦, 陈峰, 梁世中. 利用海洋微藻生产 ω -3 多不饱和脂肪酸[J]. *海洋科学*, 1997, 6:18-20.
- [4] 徐天宇. 利用生物技术生产廿碳五烯酸和廿二碳六烯酸[J]. *食品与发酵工业*, 1995, 1:56-65.
- [5] 杨庆育. 温度对一些浮游植物中脂肪酸组成的影响[J]. *海洋与湖泊*, 1988, 19(5):439-446.
- [6] Moreno V J, Julia E A, Moreno D, et al. Biosynthesis of unsaturated fatty acids in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Lipids*, 1978, 14(1):15-19.
- [7] Yongmanitchal W, Ward O P. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid[J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(9):2 963-2 967.
- [8] Ben-Amotz A, Tornabene T G, Thomas W H. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids[J]. *J Phycol*, 1985, 21:72-81.
- [9] 齐藤洋昭. 水产动物中の DHA 分布[J]. *食品工业(日)*, 1993, 36(14):33-44.
- [10] 陆开宏, 孙世春. 藻类中 EPA、DHA 的含量及其在水产养殖等领域中的应用[J]. *宁波大学学报(理工版)*, 1998, 11(2):90-99.
- [11] 李荷芳, 周汉秋. 海洋微藻脂肪酸组成的比较研究[J]. *海洋与湖泊*, 1999, 30(1):34-40.
- [12] Yongmanitchal W, Ward O P. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under culture conditions[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(2):419-425.
- [13] Kochert G. Quantitation of the macromolecular components of microalgae: Physiological and Biochemical methods [M]. London: Press of Cambridge University, 1978. 189-190.
- [14] Ackman R G. Simplification of analysis of fatty acids in fish lipids and related lipid samples[J]. *Acta Med Scand*, 1987, 222:99-103.
- [15] 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.
- [16] Teshima S, Yamasaki S, Kanazawa A, et al. Effects of water temperature and salinity on eicosapentaenoic acid level of marine *Chlorella* [J]. *Bull Jpn Soc Sci Fish*, 1983, 49 (5):805.
- [17] 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.
- [18] 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.

Studies on fatty acids composition of different strains of *Phaeodactylum tricornutum*

LU Kai-hong, LIN Xia, QIAN Yun-xia

(Ocean & Fisheries Department of Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Fatty acids composition was compared among 5 different strains of *Phaeodactylum tricornutum*, which were isolated from the same species growing in Zhejiang, Shanghai and Xiamen respectively and cultured under similar conditions in this experiment during 1996 ~ 1998. Meanwhile, the effects of desalination of medium on their fatty acids composition were analyzed. The results show that the major fatty acids composition is identical approximately. The 5 strains are all rich in C14:0, C16:0, C16:1 and C20:5(EPA), and poor in C22:6, C20:1. But there exist some differences among those in fatty acids contents. The strain XS03 has the highest EPA content and EPA percentage in total fatty acids, which were 39.02 mg/g (dry cell) and 28.00%, respectively. The strain XS04 has the lowest EPA content and fatty acids percentage, which were 23.42 mg/g (dry cell) and 19.13%, respectively. Desalination of medium has notable effects on fatty acids composition of the 5 strains and, moreover, the differences are significant that after desalination, the contents of C14:0, C16:0, C16:2, C18:0 and C20:5 in SS02 and ZS06 all increase to certain degrees, and those in ZS08, XS03 and XS04 decrease in varying degrees, and in this treatment, the contents of C22:6 and C22:0 decrease in all the 5 strains.

Key words: *Phaeodactylum tricornutum*; strain; desalination; fatty acids composition