

一种新的海洋经济微藻——粉核油球藻

李爱芬, 李 涛, 刘 然, 桑 敏, 徐 宁, 张成武

(暨南大学 水生生物研究中心, 广东 广州 510632)

摘要:以 *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP 2004 为实验藻种, 研究分析了藻粉的基本生化组成和培养周期中 PUFAs 组成与含量的动态变化。结果表明, 该藻的蛋白质量分数为 37.54%, 粗脂肪为 27.45%, 其中 PUFAs 包括 18:2, 18:3, 18:4, 20:4(AA, Arachidonic acid), 20:5(EPA, Eicosapentaenoic acid), 22:4(DTA, Docosatetraenoic acid) 和 22:6(DHA, Docosahexaenoic acid)。该藻 PUFAs 的组成特征是 EPA 含量高, 质量分数为 20.93%, 其他不饱和脂肪酸(16:3, 16:4, 18:3 和 18:4)的含量极微。分析结果显示粉核油球藻的营养价值较高, 是一种新的具有商业化开发潜力的海洋微藻。

关键词: 粉核油球藻(*Pinguicoccus pyrenoidosus*); 生化组成; PUFAs; EPA

中图分类号: Q949.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)05-0023-05

粉核油球藻(*Pinguicoccus pyrenoidosus*)是在太平洋发现的一种球形海洋单细胞微藻, 属于新定名的 Pinguiphyceae 纲, *Pinguicoccus* 属。Pinguiphyceae 纲包括 5 个属: *Glossomastix*, *Phaeomonas*, *Pinguiochrysis* (典型种类), *Pinguicoccus* 和 *Polypodochrysis*。超微结构(图 1)显示藻细胞没有细胞壁, 无鞭毛, 直径大约 4~6 μm , 有一个大的蛋白核, 帽状线粒体环绕蛋白核, 高尔基体的顺面呈球状凸起^[1]。该纲的藻含有的色素包括叶绿素 a、c 和墨角藻黄素、紫菁黄素、叶黄素、 β -胡萝卜素等。另外, Pinguiphyceae 纲的藻类脂肪酸组成具有明显的特征, 含有较高的 PUFAs 尤其是 EPA^[2]。

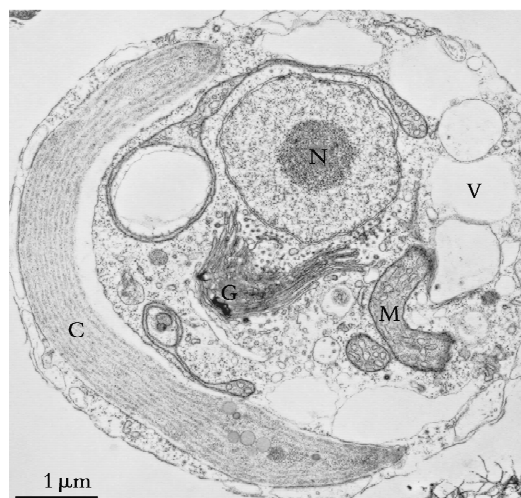


图 1 *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP2004 电子显微结构(引自 Robert A. Andersen 等, 2002)

Fig. 1 Electron micrographs of *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP2004

C. 叶绿体; N. 细胞核; G. 高尔基体; M. 线粒体; V. 液泡

C. chloroplast; N. nucleus; G. golgi body; M. mitochondrium;

V. vacuole

作者以粉核油球藻为实验藻种, 分析测定藻体的基本生化组成, 研究其培养过程中多不饱和脂肪酸的组成以及 EPA 的动态变化, 了解粉核油球藻的生长与 PUFAs 组成特征和 EPA 含量的变化规律, 旨在寻求生产 EPA 的优良藻种, 为利用微藻商业化生产 EPA 提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 藻种

Pinguicoccus pyrenoidosus CCMP 2004, 由张成武教授购自美国, 本实验室保藏。

1.2 微藻的培养

P. pyrenoidosus CCMP 2004 培养采用 h/2 培养基^[3], 将培养至对数生长期的藻种转接到装有 300 mL 无菌培养基的三角瓶中, 初始吸光值 A_{683} 为 0.07, 接种密度 6×10^5 个/mL 左右。光源为日光灯, 光照强度约 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光暗周期为 12 h : 12 h, 培养温度为 $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, 静置培养, 每天摇瓶, 培养至对数生长末期, 离心收集藻泥, 冷冻干燥得藻粉, 于 -20°C 冰箱保存备用。

1.3 细胞干质量

处于对数生长期的藻液, 用无菌海水稀释成不同浓度, 分别取 4 mL 测定其在 683 nm 下的吸光值; 另分别取一定体积的不同浓度的藻液, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤, 用蒸馏水洗涤, 滤膜置于 80°C 烘箱干燥

收稿日期: 2007-01-28; 修回日期: 2007-04-10

基金项目: 广东省科技攻关项目(2005B33201001)

作者简介: 李爱芬(1963-), 女, 山东昌邑人, 教授, 主要从事微藻生理生化研究, 电话: 020-85224366, E-mail: tiger@jnu.edu.cn

至恒质量,即得相应的藻体干质量。绘制 A 值与细胞干质量的标准曲线(图 2)。

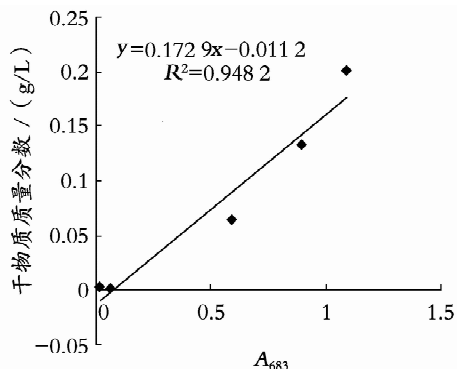


图 2 *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP 2004 干质量与 A_{683} 的对应关系

Fig. 2 Relationship between dry weight and A_{683} of *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP 2004

1.4 蛋白的测定

参照明斯亮兰法(Bradford 法)^[4]。用标准蛋白质量(μg)为横座标,吸光度值 A_{595} 为纵座标作图,即得到一条标准曲线 $y=0.0102x-0.0222$, $R^2=0.9838$ 。待测样品分别加入蒸馏水和考马斯亮蓝 G-250 试剂,测定 595 nm 的吸光值。由标准曲线,根据测出的未知样品的 A_{595} 值,查出未知样品的蛋白质含量。

1.5 总脂的测定

参照 Chen 1991 年^[5]的干质量法。将干藻粉用 1.6 mL 蒸馏水悬浮,加入 6 mL 甲醇/氯仿混合液(2:1,V/V)振荡 2 h,离心,将氯仿层转移至预先称质量的螺口试管中,在 60℃ 下用氮气将氯仿吹干,称质量。螺口试管前后质量之差即为粗脂质量,用以下公式计算总脂质量分数。

$$\text{总脂质量分数}(\%) = (\text{总脂质量} / \text{干藻质量}) \times 100\%$$

1.6 脂肪酸的分析测定

脂肪酸的提取参照 Chiara Bigogno^[6]的方法。在螺口试管中称取藻粉 25 mg,加入 2.0 mL 的 2% H_2SO_4 甲醇溶液,充入氮气。将螺口试管放入 80℃ 砂浴 1 h。冷却至室温,分别加入 1.0 mL 的蒸馏水和 1.0 mL 的正己烷,充分振荡,3 500 r/min 离心 5 min。取出上层放置到小玻璃瓶中,氮气吹干,再加入 100 μL 正己烷,封口待测。

脂肪酸的测定采用 ThermoFinnigan TRACE GC-MS 型气相色谱-质谱联用仪。色谱条件:DB-5 柱(30 m $\times$ 0.25 mm);进样口温度 260℃;程序升温,60℃ 保留 2 min,以 30℃/min 升到 120℃,再以 1.5℃/min 升高到 250℃ 保留 2 min;载气为高纯氮气,柱流量为 1.2 mL/min。质谱条件:电离方式为 EI,电离电压为 70 eV。使用面积归一法计算各组分的质量分数。

2 结果

2.1 *P. pyrenoidosus* CCMP 2004 的批次培养生长与生物量

P. pyrenoidosus CCMP2004 在一个生长周期内的生长曲线见图 3。由图 3 知,该藻在第 6 天处于对数生长前期,第 9 天处于对数生长期,第 12 天到达对数生长末期,第 15 天达到稳定期。在该藻的生长周期内,0~4 d 内藻的生长处于前滞期,细胞密度增加缓慢;第 4 天开始进入对数生长期,细胞密度呈指数增长,一直持续到第 12 天,细胞密度为 7×10^6 个/mL;12 d 后进入稳定期,细胞密度变化不稳定,这可能与生长后期细胞沉底及贴壁有关;第 20 天左右时,细胞密度为 6.8×10^6 个/mL,细胞处于衰亡期,细胞密度下降。在不同培养时间收获的藻体生物量变化见图 4。从图 4 中可以看出,在藻的生长周期内,藻体生物量随着收获时间的推迟而增加。第 12 天收获时,每升培养液的藻体干生物量为 0.215 g。第 20 天收获的生物量达最大值,每升培养液获得的藻体干质量为 0.342 g。

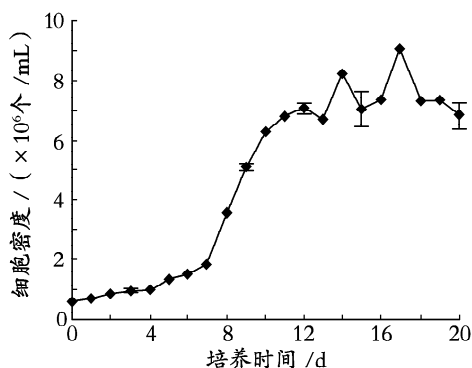


图 3 *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP2004 的生长曲线
Fig. 3 The growth curve of *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP2004

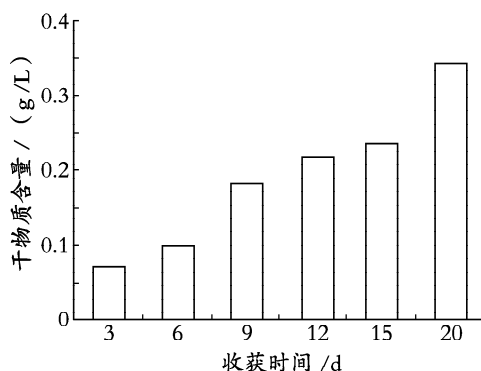


图 4 *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP2004 在不同收获时间的生物量

Fig. 4 The dry weight of *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP2004 in different harvest times

2.2 *P. pyrenoidosus* CCMP 2004 的基本生化组成

实验分析了 *P. pyrenoidosus* CCMP 2004 的主要生化组成,结果如表 1 所示。由表 1 可知,该藻的蛋白质质量分数较高为 37.54%,总脂质量分数也较高为 27.45%。该藻的脂肪酸组成特征:多不饱和脂肪酸种类较多,包括 18:2,18:3,18:4,20:4 (AA),20:5 (EPA),22:4 (DTA) 和 22:6 (DHA) 等 7 种。此外,还含有饱和脂肪酸 14:0,16:0,18:0 和单不饱和脂肪酸 16:1,18:1。PUFAs 的质量分数为总脂的 34.75%,EPA 质量分数较高,为总脂的 20.93%。由以上结果可以判断,*P. pyrenoidosus* CCMP 2004 具有较高的营养价值,且藻细胞没有细胞壁,易被人体消化吸收,可进一步开发为营养保健品。

表 1 *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP 2004 的基本生化组成
Tab. 1 The biochemical composition of *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP 2004

脂肪酸组成	质量分数(%)	总脂质量 分数(%)	蛋白质量 分数(%)
14:0	32.36	27.45	37.54
16:0	21.79		
16:1	0.59		
18:0	1.34		
18:1	3.28		
18:2	2.62		
18:3	0.21		
18:4	0.27		
20:4	4.61		
20:5	20.93		
22:4	0.85		
22:5	—		
22:6	5.26		

注:—表示未检出

表 2 *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP 2078 在不同收获时间的脂肪酸组成

Tab. 2 The fatty acids composition of *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP 2078 in different harvest times

收获时间 (d)	脂肪酸质量分数(%)												
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	18:4	20:4	20:5	22:4	22:5	22:6
3	31.97	17.95	1.3	1.29	4.27	4.18	0.34	0.32	2.60	15.31	0.65	4.57	0.33
6	29.50	16.45	1.53	1.70	5.40	4.34	0.35	0.33	2.61	14.44	0.55	5.73	0.68
9	28.05	13.06	1.07	0.93	3.10	3.41	0.45	0.36	3.6	20.99	0.63	6.40	0.95
12	32.36	21.79	0.59	1.34	3.28	2.62	0.21	0.27	4.61	20.93	0.85	—	5.26
15	37.82	22.81	1.02	1.85	3.20	3.26	0.37	0.12	1.88	8.91	0.87	3.04	0.30
20	32.62	26.92	0.94	2.50	4.22	2.55	0.31	—	2.82	13.87	1.86	4.91	0.53

注:—表示未检出

2.3 *P. pyrenoidosus* CCMP 2004 培养周期

P. pyrenoidosus CCMP 2004 在不同收获时间的脂肪酸组成见表 2。不同收获时间的脂肪酸组成相似。在整个培养周期内,14:0,16:0 和 EPA 始终是该藻的主要脂肪酸,三者之和占总脂肪酸的 60%~75%。在对数期(第 9 天),饱和脂肪酸 14:0,16:0 和 18:0 质量分数均达最低值,而在稳定期(第 15 天)达最高值,其中 18:0 质量分数在稳定期比在对数期增加约 1 倍。对数早期(第 6 天)时,单不饱和脂肪酸 16:1 和 18:1 质量分数均最高。在对数末期(第 12 天),单不饱和脂肪酸质量分数最低,为 3.87%。18:4、EPA 和 22:5 质量分数均在稳定期(第 15 天)最高,在稳定期(第 15 天)最低,但在第 20 天时,未发现 18:4 且 EPA 和 22:5 质量分数与第 15 天相比均有一定的提高。

2.4 *P. pyrenoidosus* CCMP 2004 培养周期内 EPA 及 PUFAs 含量的动态变化

P. pyrenoidosus CCMP 2004 在不同收获时间的 EPA 和 PUFAs 质量分数变化如图 5 所示,EPA 和 PUFAs 质量分数的变化具有相同的趋势。在第 3 天和第 6 天收获,EPA 和 PUFAs 质量分数变化都不大。PUFAs 质量分数在对数期(第 9 天)时达到最大值,为 36.79%,此后随收获时间的延长开始下降,在稳定期(第 15 天)时 PUFAs 质量分数最低为 18.75%。EPA 质量分数在对数期(第 9 天)和对数末期(第 12 天)时较高,分别为 20.99% 和 20.93%,相差甚微;在第 15 天时 EPA 质量分数最低,仅为 8.91%。然而,第 20 天与第 15 天相比,EPA 和 PUFAs 质量分数均有所上升。

根据本实验的结果,综合考虑该藻的生长情况和 EPA 含量情况,为最大限度地获得 EPA,应选择对数生长末期作为该藻的收获时间。

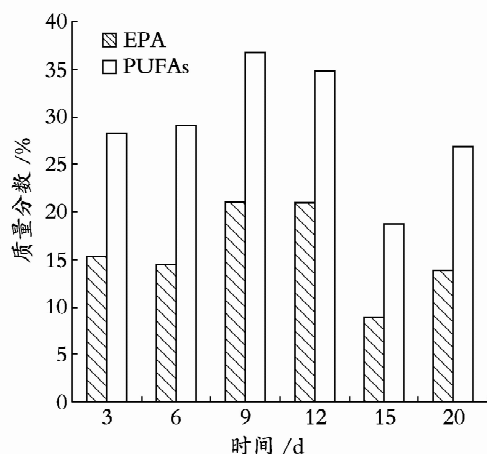


图5 *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP 2004 在不同收获时间的 EPA 和 PUFAs 质量分数

Fig. 5 The EPA and PUFAs as % of total fatty acids (TFAs) of *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP 2004 in different harvest times

3 讨论

本实验结果表明,在整个生长期内,14:0,16:0 和 EPA 始终是该藻的主要脂肪酸;EPA 和 PUFAs 的质量分数变化曲线呈 S 形且在对数生长期时达到最大值;在稳定期,饱和脂肪酸(14:0,16:0,18:0)质量分数增加。导致上述结果的原因,可能与脂肪酸生物合成相关的碳代谢的改变和培养基中的氮、磷浓度的改变有关。据报道,在高氮浓度下,小球藻(*Chlorella* sp.)、紫球藻(*Porphyridium cruentum*) 的 PUFAs 含量增加,EPA 是 PUFAs 的主要成分,碳链的延长和去饱和作用活跃^[7]。在生长后期,会出现营养限制。氮磷比为 11 通常认为是磷限制。磷限制程度的增加,导致三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*) 和盐藻(*Dunaliella tertiolecta*) 细胞内总脂肪酸含量显著增加,同时多不饱和脂肪酸水平大幅降低,而多不饱和脂肪酸降低的百分数,将由增加的饱和、单不饱和脂肪酸来弥补,特别是 16:0 和 16:1,这可能是由于稳定期的细胞处于生长限制条件下,光合作用同化的碳在脂类中积累,主要为中性脂,含有饱和脂肪酸的比例较高^[8]。本实验结果与上述文献报道相似,但是在稳定期没有发现单不饱和脂肪酸的显著增加。此外,PUFAs 含量在对数期时最高,这与微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*) 的情况一致^[9]。

在大多数藻中,某些不饱和脂肪酸如 16:3n-4, 16:3n-3,16:4n-3,18:3n-3,18:3n-6 和 18:4n-3 占总脂肪酸的比例相当高^[10]。本实验发现,与大多数藻的多不饱和脂肪酸组成明显不同的是,*P. pyrenoidosus* CCMP 2004 不含 16:3,16:4,而 18:3,18:4 的含量也极少,取而代之的是高含量的其他 PUFAs 尤其是 EPA。对于 Pinguiphytes 纲的藻而言,这是一个该纲藻普遍具有并且明显区别于其他藻类的特征,脂肪酸含量可作为鉴别该纲藻的特征之一。Kawachi^[2]关于 *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP 1144 脂肪酸测定的结果表明,其脂肪酸组成为 14:0,16:0,18:0,18:1,18:2,20:4(AA),20:5(EPA),22:4(DTA),22:6(DHA)等。本文实验结果与之相似,*P. pyrenoidosus* CCMP 2004 除含有上述脂肪酸外,还含有 16:1,18:3,18:4 和 22:5,这说明藻种之间存在差异。

此外,对该藻的生化组成分析得知,其蛋白质质量分数为 37.54%,粗脂肪的质量分数为 27.45%,其中 PUFAs 包括 18:2,18:3,18:4,20:4(AA),20:5(EPA),22:4(DTA)和 22:6(DHA)。PUFAs 质量分数为 34.75%,EPA 质量分数较高,为 20.93%。分析结果显示,该藻含有较高的 EPA,而且该藻含有较为丰富的蛋白质,营养价值较高,具有商业化生产的开发潜力。

参考文献:

- [1] Andersen R A, Potter D, Bailey J C. *Pinguicoccus pyrenoidosus* gen. et sp. nov. (Pinguiphyceae), a new marine coccoid alga [J]. **Phycological Research**, 2002, 50: 57-65.
- [2] Kawachi M. The Pinguiphyceae class of photosynthetic stramenopiles whose members produce large amounts of omega-3 fatty acids [J]. **Phycological Research**, 2002, 50: 31-47.
- [3] Guillard R R. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates [A]. Smith W L, Chanley M H. Culture of Marine Invertebrates [C]. New York: Plenum Press, 1975. 29-60.
- [4] 张志良. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990. 183-184.
- [5] Chen F, Johns M R. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid. Composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana* [J]. **Appl Phycol**, 1991, 3: 203-209.

- [6] Ohta S, Chang T, Aozasa O, *et al.* Sustained production of arachidonic and eicosapentaenoic acids by the red alga *Porphyridium purpureum* cultured in a light dark cycle [J]. *J Ferment Bioeng*, 1992, **74**(6): 394-402.
- [7] Yongmanitchai W, Ward O P. Omega-3 fatty acids; alternative sources of production [J]. *Process Biochemistry*, 1989, 117-125.
- [8] Zhu C J, Lee Y K, Chao T M. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1 [J]. *J Appl Phycol*, 1997, **9**: 451-457.
- [9] Suen Y, Hubbard J S, Holzer G, *et al.* Total lipid production of the green alga *Nannochloropsis* sp. under different nitrogen regimes [J]. *J Phycol*, 1987, **23**: 289-296.
- [10] 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.

A new marine microalgae of *Pinguicoccus pyrenoidosus*

LI Ai-fen, LI Tao, LIU Ran, SANG Min, XU Ning, ZHANG Cheng-wu

(Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Received: Jan. , 28, 2007

Key words: *Pinguicoccus pyrenoidosus*; biochemical composition; fatty acid composition; EPA; PUFAs

Abstract: *Pinguicoccus pyrenoidosus* is a lately named marine algae, which belong to Pinguiphyceae, *Pinguicoccus* genara. The characteristic of lipid composition of Pinguiphyceae is high amount of PUFAs especially EPA. This paper reported the biochemical composition, especially the characteristic of PUFAs composition of *P. pyrenoidosus* CCMP 2004. Analyzing the biochemical composition of this algae, the results show: the protein content was 37.54%, crude lipid content was 27.45%, PUFAs including 18:2, 18:3, 18:4, AA (Arachidonic acid, 20:4), EPA (Eicosapentaenoic acid, 20:5), DTA (Docosatetraenoic acid, 22:4), DHA (Docosahexaenoic Acid, 22:6). The characteristic of its lipid composition is the high amount of PUFAs especially EPA, but no (or trace amounts) other fatty acids (16:3, 16:4, 18:3 and 18:4) have been found, and the EPA content was 20.93%. The results indicated the commercial potential in EPA production from *P. pyrenoidosus* CCMP 2004 because of its higher value in nutrition aspect.

(本文编辑:张培新)