

盐度对隐杆藻类胡萝卜素及 脂肪酸含量的影响*

刘志礼 林辉 李鹏云

(南京大学生物科学与技术系, 南京 210093)

提要 于1992年6月, 采集分离江苏台南盐场盐生隐杆藻, 通过不同浓度的NaCl研究盐度对类胡萝卜素、脂肪酸含量的影响; 类胡萝卜素, 依Jones等(1974)方法提取, 脂肪酸依Schwarzenbach等(1978)方法提取。结果表明, 在0.5—1.5 mol/L NaCl培养基中, 类胡萝卜素的百分含量从2.76%下降到0.67%; 然而当培养基NaCl浓度增加到3.5 mol/L时, 类胡萝卜素的百分含量又开始上升, 到2.31%。在低盐度(NaCl, 0.5—1.0 mol/L)和高盐度(NaCl, 3.0—3.5 mol/L)下培养的盐生隐杆藻中, 总脂肪酸的含量高于中盐度(NaCl, 1.0—2.5 mol/L)的; 软脂肪酸含量变化同总脂肪酸相似; 此外, 在不同盐度下各种脂肪酸的相对百分含量也是变化的。

关键词 盐度 类胡萝卜素 脂肪酸 隐杆藻

盐生隐杆藻是典型的嗜盐性蓝藻(halophilic blue-green algae), 可在0.5到饱和NaCl水体中生活, 是盐湖或盐田的常见藻类, 国内外已有不少记载。国内外学者对于盐生隐杆藻的报道多数只限于盐湖或盐田生物的一般生物资源调查或出于对盐田生态的研究, 其生理生化和有机化学工作只有少数报道(Jones et al., 1974; Colclassur et al., 1974)。

鉴于类胡萝卜素和脂肪酸有应用价值(舒德新等, 1989; 赖百塘, 1991; 蔺定运, 1987), 本文报告盐度对盐生隐杆藻细胞中类胡萝卜素百分含量及脂肪酸各组分含量影响, 目的在于为开发利用这一资源提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 藻种的来源及培养

盐生隐杆藻(*Aphanothece halophytica*)于1992年5月由江苏连云港市台南盐场分离, 于1992年6月—1993年10月进行实验。所用培养基参照Tindal等(1977)方法, 每升培养基成分为: NaCl, 116.88g; KCl, 2.0g; MgCl₂·6H₂O, 10.5g; MgSO₄·7H₂O, 10.0g; Ca(NO₃)₂·4H₂O, 1.0g; NaNO₃, 0.5g; KH₂PO₄, 0.05g; FeCl₂, 0.03g; EDTA, 0.002g; 微量元素A₅, 1ml, 微量元素B₆, 1ml(田宫博等, 1965)¹⁾[A₅: H₂BO₃, 2.86g;

* 国家自然科学基金资助项目, 39470015号; 江苏省自然科学基金资助项目, BK95021301号。刘志礼, 男, 出生于1934年7月, 教授。

1) 田宫博等, 1965, 藻类实验法, 99。

收稿日期: 1993年12月11日, 接受日期: 1996年8月5日。

MnCl₂ · 4H₂O, 1.81g; ZnSO₄ · 7H₂O, 0.22g; CuSO₄ · 5H₂O, 0.08g; Na₂MoO₄, 0.021g; 纯水, 1000ml; 浓 H₂SO₄, 1 滴。B6: NH₄VO₃, 229.6mg; Cr₂K₂(SO₄)₄ · 24H₂O, 960.2mg; NiSO₄ · 6H₂O, 447.8mg; Co(NO₃)₂ · 6H₂O, 493.8mg; NaWO₄ · 2H₂O, 179.4mg; Ti 溶液, 20ml; N / 10H₂SO₄, 1000ml]。培养液盐度(NaCl)浓度依次为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0mol / L。0.5, 1.0mol / L 为低盐度; 1.5, 2.0, 2.5mol / L 为中盐度; 3.0, 3.5, 4.0mol / L 为高盐度。

在 15L 玻璃容器中, 光强, 120μE / (m² · s); 光周期, L:D=16:8; 培养温度在 26—33℃。停滞期细胞以 4000r / min 离心。所得藻细胞用蒸馏水洗去培养液及细胞表面的盐, 反复数次。110W 红外灯下干燥 12h, 称重。

1.2 类胡萝卜素及脂肪酸的抽提 (Jones et al., 1974; Schwarzenbach et al., 1978)

1.2.1 藻细胞内酶的去活性、脂肪酸的皂化 在研磨好的干藻粉中加入 100ml 5% (W / V) KOH 的甲醇水溶液(甲醇:水=7:3, V / V), 于 N₂ 中 60℃ 水浴 2h。

1.2.2 胡萝卜素的抽提 在皂化好的混合物中加入 1 倍体积的苯萃取胡萝卜素, 不能被皂化的胡萝卜素被萃取到上层苯中, 反复一次, 汇集两次苯的萃取液。下层墨绿色混合液留待抽提脂肪酸。胡萝卜素的苯溶液用蒸馏水洗涤后浓缩、定容, 以 UVIKON 860 型紫外-可见分光光度计(瑞士产)测定光谱吸收曲线。

1.2.3 脂肪酸的抽提及甲酯化 用棉花团(已经过甲醇:苯=1:1抽提)滤去混合液中的固体物质。在冰浴中调皂化液的 pH 至 2 左右(用 2mol / L HCl)后, 用石油醚(1 倍体积, 30—60℃)抽提脂肪酸, 重复一次, 汇集两次的抽提液在 40℃ 下用旋转蒸发器去除石油醚, 得到脂肪酸。于脂肪酸中加入 50ml 的 12.5% BF₃ 甲醇试剂, 沸水浴加热 2min 后冷却; 生成的脂肪酸甲酯用 2 倍体积石油醚抽提, 并加入适量饱和氯化钠, 脂肪酸甲酯转入醚层。用旋转薄膜蒸发器在 40℃ 下浓缩抽提液至 2 或 3ml。

1.2.4 脂肪酸甲酯的分析 3m × 3mm 不锈钢柱; 固定液为 20% PEGS(丁二酸乙二醇聚酯); 担体为 Chromosorb W. AWCMDs(60—80 目); 氮气流速为 40ml / min, 氢气流速为 50ml / min, 空气流速为 600ml / min; 柱温为 180℃, 汽化室温度 250℃。C-RIA 型数据处理计算数据。用日本岛津公司产 GC-5A 气相色谱仪、火焰电离检测器进行分析与检测。

2 结果

2.1 盐度对盐生隐杆藻类胡萝卜素含量的影响结果

类胡萝卜素浓度与 OD_{440nm} 对照, 以及在不同盐度下培养所得盐生隐杆藻干物质中胡萝卜素的百分含量, 见表 1。显而易见, 盐生隐杆藻物质中类胡萝卜素的百分含量与培养液盐度之间有规律性关系。低盐度(0.5—1.0mol / L)与高盐度(3.0—3.5mol / L)下类胡萝卜素含量高(1.34%—2.76%), 而中盐度(1.5—2.5mol / L)的培养基中类胡萝卜素含量少(0.67%—0.84%)。

2.2 盐度对盐生隐杆藻脂肪酸含量的影响结果

2.2.1 脂肪酸的组成 经对气相色谱图(此略)鉴定, 盐生隐杆藻脂肪酸的组成依次为: 月桂酸(12:0)、十二碳烯酸(12:1)或十三碳酸(13:0)、肉豆蔻酸(14:0)、软脂酸(16:0)、十六碳烯酸(16:1)、硬脂酸(18:0)、油酸(18:1)、亚油酸(18:2), 另外还

表 1 盐生隐杆藻类胡萝卜素浓度与 OD_{440nm} 值对照, 以及不同盐度下类胡萝卜素的百分含量

Tab. 1 Comparison to concentration and OD_{440nm} values of the carotenoids in *A. halophytica* and percentages of carotenoids in dry substance of *A. halophytica* different salinity of media

类胡萝卜素浓度 (mg/ml)			0.258	0.193	0.128	0.064	
OD _{440nm}			1.120	0.280	0.536	0.262	
NaCl (mol/L)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
百分含量(%)	2.76	1.34	0.67	0.75	0.84	1.49	2.31

可能存在十碳酸(10:0)。见表 2。

表 2 不同盐度下盐生隐杆藻脂肪酸各组分相对百分含量(%)

Tab. 2 Relative percentages of each component of fatty acids of *A. halophytica* under different salinity of media

样品	培养液								
	NaCl 浓度 (mol/L)	12:0	12:0 or 13:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2
a	0.5	0.28	1.09	7.05	38.82	16.73	20.26	5.41	10.32
b	1.0	0.16	0.86	3.23	41.04	20.42	17.17	6.99	10.08
c	1.5	微量	1.08	7.36	35.64	22.91	20.69	3.68	7.87
d	2.0	0.26	1.64	8.66	39.45	16.32	15.77	6.29	11.56
e	2.5	微量	1.30	5.02	37.45	21.49	18.81	5.32	10.57
f	3.0	微量	1.19	4.78	40.15	20.78	18.34	5.41	9.32
g	3.5	微量	2.89	12.81	38.34	14.11	12.93	7.58	11.29
h	4.0	微量	1.53	6.23	36.57	21.43	18.72	5.19	10.30

2.2.2 盐度对盐生隐杆藻总脂肪酸含量的影响结果 从各样号总脂肪酸含量分析结果(表 3)可以看出, 培养液 NaCl 浓度在 1.0—4.0 mol/L 范围内, 以浓度为 1.0 和 4.0 mol/L 的总脂肪酸含量较高, 分别为 20.3 和 20.2 μg/mg, 高于浓度为 1.5—3.5 mol/L 培养液的(10.6—17.6 μg/mg)。将 NaCl 浓度在 1.0 mol/L 培养的盐生隐杆藻移入浓度为 0.5 mol/L 培养液中, 总脂肪酸含量则下降到最低(10.4 μg/mg); 反之, 从浓度为 3.0 mol/L 的培养液移至浓度为 3.5—4.0 mol/L 的培养液中, 总脂肪酸含量则明显增加(17.6—20.2 μg/mg)。

2.2.3 盐度对脂肪酸中各组分含量的影响结果 从脂肪酸归一化分析结果, 可得出盐生隐杆藻干物质中脂肪酸各组分的含量。随盐度的增加各组分含量有明显变化。月桂酸(12:0), NaCl 浓度在 0.5 mol/L 时其含量较高(0.28 μg/ml), 其次在浓度为 2.0 mol/L 时, 含量为 0.26 μg/mg。十二碳烯酸(12:1)或十三碳酸(13:0)和肉桂酸

表3 在不同盐度培养中培养的停滞期盐生隐杆藻总脂肪酸的含量

Tab. 3 Content of total fatty acids of dry substance of *A. halophytica*
under the different salinity of media

NaCl (mol /L)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
总脂肪酸含量 ($\mu\text{g} / \text{mg}$)	10.4	20.3	10.8	12.1	17.4	15.9	17.6	20.2
含量(%)	1.04	2.03	1.06	1.21	1.74	1.59	1.76	2.02

(14:0) 在 NaCl 浓度为 3.5 mol /L 时其含量最高(2.89 $\mu\text{g} / \text{mg}$, 12.81 $\mu\text{g} / \text{mg}$)。软脂酸(16:0)在各 NaCl 浓度都比较高, 但最高浓度为 1.0 和 3.0mol /L 时, 其组分含量分别为 40.04 和 40.15 $\mu\text{g} / \text{mg}$ 。十六碳烯酸(16:1)的含量, 最高在 NaCl 浓度为 15mol /L 时, 达 22.91 $\mu\text{g} / \text{mg}$; 其次浓度在 2.5, 4.0, 1.0, 3.0mol /L 时, 分别为 21.49, 21.43, 20.42 和 20.78 $\mu\text{g} / \text{mg}$ 。硬脂酸(18:0)的高含量在 NaCl 浓度为 0.5 和 1.5mol /L 时, 分别为 20.26 和 20.69 $\mu\text{g} / \text{mg}$ 。油酸(18:1)的含量在 NaCl 浓度下大体接近。亚油酸(18:2), 其最高含量在 NaCl 浓度为 2.0, 3.5 时, 其次在 0.5—1.0, 2.5 和 4.0mol /L。总之, 脂肪酸各组分的含量同盐生隐杆藻生长的 NaCl 浓度之间存在相关性和差异性。

3 讨论和结语

3.1 类胡萝卜素同盐度的关系

本研究表明, 盐生隐杆藻干物质中类胡萝卜素的含量在 0.67%—2.76% 之间, 同时发现盐生隐杆藻生长的最适 NaCl 浓度在 2.0mol /L 附近, 每升日产量高达 3g(另文详述); 其干物质的类胡萝卜素相对含量较低, 一般小于 1.0%。而在低盐度(0.5—1.0mol /L)或高盐度(3.5—4.0mol /L), 则生长显著减慢(一般每升小于 1.0g /d), 而干物质中的类胡萝卜素的含量可高达 2.76%—2.31%。因此, 依此规律, 在生产中, 如果把中盐度中培养的盐生隐杆藻在每次培养后期转接到低盐度(0.5—1.0mol /L)或较高盐度(3.5—4.0mol /L)中去, 获得较多的类胡萝卜素应是有可能性的, 特别是在已知 β -胡萝卜素是安全的维生素 A 元, 有抗氧化、预防肿瘤和癌症的作用(舒德新等, 1989; 赖百塘, 1991), 而且不少研究已证实蓝藻的类胡萝卜素主要存在形式为 β -胡萝卜素, 为此, 重视对盐生隐杆藻生产类胡萝卜素的高产研究是有重要现实意义的。

3.2 脂肪酸同盐度的关系

关于盐生隐杆藻脂肪酸组成的研究, 国内尚未见报道。Colclasure 等(1974)报道过盐生隐杆藻脂肪酸的组成, 为软脂酸、十六碳烯酸、十六碳二烯酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸等 8 种。而本文测定其脂肪酸也为 8 种, 有 4 种与其相同, 4 种不相同。造成这种差异的原因, 可能是因为国产盐生隐杆藻和美国盐生隐杆藻品系不同或生态差异所致。作为能量物质的脂肪酸, 在盐生隐杆藻细胞中是可以被利用的。从中盐度中培养的盐生隐杆藻转入低盐度(NaCl, 0.5mol /L)中, 总脂肪酸的含量降低, 这可能是因为盐生隐杆藻在低盐度这种逆境下光合同化作用相对减弱, 利用了细胞内贮存的脂肪酸的缘故。各种脂肪酸减少的量是互不相同的, 其中软脂酸、十六碳烯酸和油酸的含量减少

最快,这三种脂肪酸在盐生隐杆藻细胞中是首先被利用的;反之,肉豆蔻酸在干物质中的含量却增加了,增加的这部分脂肪酸可能是由前三者转化而来,这一点有待进一步证实,在 1.0—4.0 mol /L NaCl 范围内,总脂肪酸含量基本上是两头高、中间低,这一结果与紫球藻(*Porphridium cruentum*) 脂肪酸含量随盐度变化是十分相似的。说明盐度对脂肪酸的形成有直接影响。

参 考 文 献

- 舒德新等, 1989, 海湖盐与化工, **19**:24—74。
赖百塘, 1991, 中华肿瘤杂志, **3**:147—151。
蔺定运, 1987, 食用色素的识别与应用, 中国食品出版社(北京), 42—49。
Colclasure, G. C. et al., 1974, *Am. J. Bot. (suppl)*, **61**:21—22。
Jones, J. H. et al., 1974, *Am J. Bot. (suppl)*, **61**:24。
Schwarzenbach, R. P. et al., 1978, *J. Lipid Res.*, **19**:12。
Tindall, D. R. et al., 1977, *J. Phycol.*, **13**:127—133。

EFFECTS OF SALINITY ON CAROTENOID CONTENT AND FATTY ACID COMPONENT OF *APHANOTHECE HALOPHYTICA*

Liu Zhili, Lin Hui, Li Pengyun

(The Department of Biological Science and Technology, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract The influence of various NaCl concentration on carotenoid content and fatty acid composition of algal cell dry weight were studied from June, 1992 to October, 1995 by using the methods of Jones et al. (1974) and Colclasure et al. (1974). Algal species *Aphanothece halophytica* were obtained from the Tainan Saltwork of Jiangsu Province in May 1992. The 1 Liter medium was composed of 116.88g NaCl, 2.0g KCl, 10.5g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10.0 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0g $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0.5g $NaNO_3$, 0.05g KH_2PO_4 , 0.03g $FeCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.002g EDTA; 1ml A_5 and 1ml B_6 (microelement).

The cultural experiments were carried out under 26 — 30 °C, 16: 8 L /D, illumination of $120\mu\epsilon / (m^2 \cdot s)$. The results showed that at concentration of 0.5 — 1.0 mol /L, NaCl could decrease the carotenoids content from 2.76% to 0.67%, and that when the concentration of NaCl in the medium increased from 1.5 to 3.5 mol /L, the carotenoids content increased from 0.67% to 2.31%; the total fatty acid content (2.02% — 2.03%) in low concentration (1.0 mol /L) and high concentration (3.5 — 4.0 mol /L) of NaCl were higher than that (1.06% — 1.74%) for medium concentration (1.5 — 3.5 mol /L) of NaCl. Fatty acid components separated and determined were: dodecenoic acid or tridecanoic acid 0.86 — 2.89, myristic acid 3.23 — 12.81, soft fatty acid 35.64 — 20.69, oleic acid 3.68 — 7.58, linolic acid 7.87 — 11.56. The relative percentage content of each fatty acid component also varied with the change of salinity.

Key words Salinity Carotenoids Fatty acid *Aphanothece halophytica*