

不同培养液中卵形隐藻的生长和 主要生化组成的比较

曹吉祥 李德尚 王金秋

(青岛海洋大学, 266003)

摘 要 于1993年5~7月研究了5种培养液中卵形隐藻(*Cryptomonas ovata*)的生长及其主要生化成分的组成。结果表明,作者设计的FPW培养液培养的卵形隐藻的最大密度和特定生长率均明显高于目前室内研究中普遍使用的WC培养液培养的相应值($P < 0.05$);氨基酸组成及必需氨基酸的比例非常接近;但蛋白质水平及多不饱和脂肪酸比例稍低。FPW组成的简单性及由池塘水配制的特点表明,在隐藻规模化培养时,FPW较WC具有更大的实用性。

关键词 卵形隐藻,培养液,生长,生化组分

隐藻(*Cryptomonas*)是天然水域中最重要的鞭毛藻类之一[何志辉和李永函,1983],也是滤食性鱼类及许多草食性浮游动物的优良饵料[李永函,1983;张泰山和郑又雄,1988; Klaveness, 1988]。近年来,美国 Martek 公司利用隐藻生产具有荧光特性的藻红蛋白,作为荧光标记应用于生物医学研究及临床诊断[王业勤和李勤生,1993]。因此,研究隐藻的规模培养问题意义重大。

目前,培养隐藻多用WC培养液[Guillard和Lorenzen,1972]。WC要由蒸馏水配制,只适用于小规模培养或室内保种。因此,要实现隐藻的规模化培养,必须首先解决隐藻的培养液问题。此外,除个别关于隐藻脂肪酸组成的报导外[Beach等,1970; Ahlgren等,1992],尚未有对隐藻主要生化组成的分析结果。本研究比较了淡水水域中常见的卵形隐藻(*Cryptomonas ovata*)在不同培养液中的生长以及主要生化组分的含量。

1 材料和方法

1.1 培养液组成和生长测量

卵形隐藻(以下简称隐藻)藻种来自中国科学院水生生物研究所。实验用5种培养液(表1),其中FPW及FPW-1为作者自行设计,由经过滤的池塘水配制。其余3种均为常用于培养隐藻或具叶绿素的鞭毛藻类的培养液。

每种培养液为一实验组(每组3个重复)。用100mL三角烧瓶装入50mL培养液,加入等密度隐藻后,置于同样条件下培养。实验温度(23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$;24小时光照,光强为3 200~3 500 lx,培养7天。每天在无菌箱中取样后,在显微镜下计数各培养液中隐藻的密度;按下式计算隐藻的特定生长率(SGR): $\text{SGR} = \ln(n_t/n_0) / t$ 。式中: n_0 , n_t 分别为隐藻实验初及实验终的浓度,

t为实验周期(天)。同时测量 FPW 与 WC 中隐藻细胞的大小。

表 1 5种培养液的组成

Table 1 Compositions of five media used

(mg/L)

I		II		III		IV		V	
Ca(NO ₃) ₂	117.8	NaNO ₃	170	CaCl ₂	36.8	NaNO ₃	170	KH ₂ PO ₄	250
甘油磷酸钠	50	KH ₂ PO ₄	40	MgSO ₄	37	甘油磷酸钠	80	MgSO ₄	250
乙酸钠	100	乙酸钠	100	NaHCO ₃	12.6	NaHCO ₃	40	KCl	250
MgSO ₄ ·7H ₂ O	40	NaHCO ₃	40	K ₂ HPO ₄	11.4	BBT	2mL	FeCl ₃	痕量
NaHCO ₃	40	柠檬酸	40	NaNO ₃	85	土液	5mL	蛋白胨	2 000
K ₂ HPO ₄	4	BBT	5mL	NaSiO ₃	28.4	池水	1 000mL	乙酸钠	2 000
BBT	1mL	土液	20mL	微量元素	10mL			蒸馏水	1 000mL
PiV	1mL	池水	1 000mL	BBT	1mL				
双甘氨酸	200			双甘氨酸	100				
蒸馏水	1 000mL			蒸馏水	1 000mL				

注:1.培养液 I,来源于 Uematsu-Kaneda 和 Furuya[1982];III来源于 Guillard 和 Lorenzen[1972],称 WC 培养液;V 来源于 田昭彦[1974];II、IV 均为作者设计,分别称 FPW-1 及 FPW 培养液。2. BBT 为维生素母液[Guillard 和 Lorenzen, 1972]。3. P IV 为一种微量元素母液[华汝成, 1986]。4. III 中微量元素母液的配制参照 Guillard 和 Lorenzen[1972]。

1.2 生化组分的测定

在盛有 5L 培养液的小口瓶中,分别接种等密度的隐藻。培养条件同前,静止培养,每天摇动 3~5 次。6~7 天后离心收获(用蒸馏水漂洗藻泥后再离心)。在 Christ ALPHA-5 型真空冷冻干燥器中干燥得藻粉,充 N₂ 后保存(-18℃)各测。测定色素及脂肪酸时用隐藻鲜样品。

色素:准确吸取已知密度的藻液,离心后的藻泥用蒸馏水漂洗一次再离心。然后按西泽一俊和千原光雄[1979]的方法和公式测定并计算隐藻中叶绿素 a 及叶绿素 c,按 Strickland 和 Parsons[1968]测定类胡萝卜素,按 De Marsac 和 Houmard[1988]测定藻红蛋白(PE)、藻兰蛋白(PC)、别藻兰蛋白(APC)的含量。

元素组成:以 PE240C 元素分析仪测定样品中 C、N、H 组成,由 N 含量乘以 6.25,得粗蛋白含量[Osborne 和 Voogt, 1978]。氨基酸:Hitachi 835-50 型氨基酸自动分析仪分析法。粗脂肪:索氏抽提法[Osborne 和 Voogt, 1978]。脂肪酸:HP5800A 气相色谱仪分析法。灰分:马福炉灼烧法[Osborne 和 Voogt, 1978]。

2 结果

2.1 不同培养液中隐藻的生长

不同培养液中隐藻的生长明显不同(图 1)。在 I、II 培养液中隐藻只能存活 3~4 天;而在 V 培养液中接种后即死亡;在 III(WC)、IV(FPW)培养液中,隐藻生长良好,但也有差别。在 FPW 中隐藻的最大密度(25.5×10^4 个/mL)高于 WC 中的密度(19.0×10^4 个/mL),且差异显著($P < 0.01$);7 天内 FPW 中隐藻的特定生长率(SGR, 0.35 day^{-1})也高于 WC 中的值(0.3 day^{-1}),且差异显著($P < 0.05$),说明隐藻在 FPW 中优于在 WC 中的生长。随机选取 50~100 个隐藻测量其细胞大小。结果表明,在 FPW 与 WC 中培养的隐藻细胞大小没有明显差异($P > 0.01$)[FPW 中细胞大小为($1\,361.4 \pm 20.2$) μm^3 ;WC 中为($1\,387.2 \pm 18.7$) μm^3]。

2.2 隐藻的生化组成

基本成分: 在 FPW 中培养的隐藻与由 WC 培养的相比, C、N、H 元素含量稍低, 蛋白质、脂肪及灰分也低(表 2)。

色素: 在 FPW 中培养的隐藻的叶绿素总量及叶绿素 a、c 含量以及类胡萝卜素总量均高于 WC 中培养的相应值(表 3), 且差异显著($P < 0.05$); 而 WC 中隐藻的藻胆蛋白含量高于 FPW 中的值, 并差异显著($P < 0.05$)。叶绿素 a 含量与藻类增长正相关 [Hansmann, 1973]。因此, FPW 与 WC 中隐藻生长的差异与叶绿素 a 含量的差异是一致的。

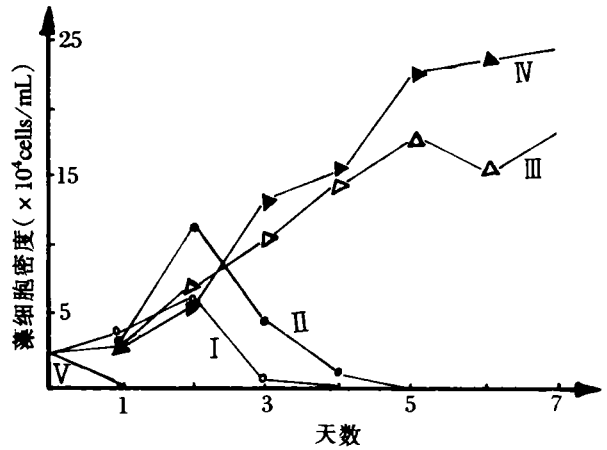


图 1 不同培养液中隐藻的生长

Fig.1 Growth of *C. ovata* cultured in various media

表 2 在 FPW 及 WC 中培养的卵形隐藻的元素组成 (%) 及基本营养成分 (%)

Table 2 Element compositions and basic nutrients (%) of *Cryptomonas ovata* cultured in FPW and WC media

	C	N	H	蛋白质	粗脂肪	灰分
FPW	33.28	9.40	5.0	58.75	3.23	1.2
WC	40.29	10.96	6.67	68.5	3.29	2.9

表 3 在 FPW 及 WC 中培养的卵形隐藻的色素组成 ($\bar{X} \pm SD$, 毫克/克·干重)

Table 3 Pigment compositions of *Cryptomonas ovata* cultured in FPW and WC media

	叶绿素			类胡萝卜素	藻胆蛋白			
	总量	叶绿素 a	叶绿素 c	总量	总量	PE	PC	APC
FPW	7.7±1.2	5.8±0.5	1.9±0.08	8.9±1.1	221.0±13.3	116.0±7.4	28.2±3.5	76.8±6.5
WC	5.9±0.9	4.7±0.8	1.2±0.07	7.2±0.9	245.5±18.2	128.6±10.3	30.3±4.8	87.7±7.3

脂肪酸: 如表 4 所示, 隐藻含 21 种 (FPW 中) 或 22 种 (WC 中) 脂肪酸, 碳链在 12~22 之间, 不饱和双键有 1~6 个。FPW 培养的隐藻脂肪酸组成中, 以 C18:3 ω 3 最丰富, 其次为 C16:0、C18:4 ω 3、C20:5 ω 3 及 C22:6 ω 3; 而 WC 培养的隐藻则以 C18:4 ω 3 最丰富, 其次为 C18:3 ω 3、C16:0、C20:5 ω 3 及 C22:6 ω 3。FPW 中隐藻脂肪酸中多不饱和脂肪酸比例 (\sum PUFA/ \sum FA) 低于 WC 中的值, 且 ω 3/ ω 6 比值也低。表明 WC 培养的隐藻脂肪酸组成优于 FPW 培养的组成。

氨基酸: 由 2 种培养液培养的隐藻的氨基酸组成及必需氨基酸比例 (\sum EAA/ \sum AA) 都非常接近(表 5)。Glu 和 Asp 是隐藻中最丰富的氨基酸; EAA 中, Leu 的含量最高。

表4 FPW及WC中培养的卵形隐藻脂肪酸的组成(相对含量,%)

Table 4 Fatty acid compositions of *Cryptomonas ovata* cultured in FPW and WC media

脂肪酸	FPW	WC	脂肪酸	FPW	WC
C12:0	0.09	0.07	C14:0	0.73	0.54
Cai-15:0	1.04	1.60	Cai-16:0	0.21	0.49
C16:0	23.13	17.64	C16:1 ω 9	2.80	3.14
C16:1 ω 7	0.40	0.28	C16:2 ω 6		0.55
C16:3 ω 3		1.17	C17:0	0.85	0.31
C18:0	3.39	1.44	C18:1 ω 9	1.96	0.99
C18:1 ω 7	1.39	2.43	C18:2 ω 6	2.45	2.83
C18:3 ω 3	24.05	19.31	C18:4 ω 3	13.33	22.59
C20:1 ω 9	1.51		C20:2 ω 6	0.61	0.53
C20:4 ω 6	0.61	0.55	C20:4 ω 3	0.66	0.69
C20:5 ω 3	11.48	15.53	C22:5 ω 6	2.35	1.40
C22:6 ω 3	3.33	3.57	Σ PUFA	58.87	68.72
$\Sigma \omega$ 3	52.8	63.41	$\Sigma \omega$ 6	6.02	5.86
$\Sigma \omega$ 3 / ω 6	8.77	10.22			

表5 FPW及WC中培养的卵形隐藻氨基酸的组成(相对含量,%)

Table 5 Amino acid compositions of *Cryptomonas ovata* cultured in FPW and WC media

必需氨基酸	FPW	WC	非必需氨基酸	FPW	WC
苏氨酸(Thr)	6.62	6.82	谷氨酸(Glu)	12.04	11.62
缬氨酸(Val)	5.88	5.74	天冬氨酸(Asp)	10.80	11.14
蛋氨酸(Met)	0.50	0.81	丝氨酸(Ser)	4.17	3.29
亮氨酸(Leu)	9.13	9.05	甘氨酸(Gly)	5.67	7.31
异亮氨酸(Ile)	3.99	4.03	丙氨酸(Ala)	8.82	8.83
苯丙氨酸(Phe)	5.25	5.53	胱氨酸(Cys)	4.10	5.15
赖氨酸(Lys)	6.45	6.42	酪氨酸(Tyr)	4.63	2.99
精氨酸(Arg)	7.03	5.93	脯氨酸(Pro)	3.44	3.48
组氨酸(His)	1.48	1.29			
Σ EAA	46.33	45.62			

注:色氨酸未测。

3 讨论

以往实验室内培养隐藻,广泛采用的是WC培养液[Guillard和Lorenzen,1972;徐振康和布恩斯,1992];中科院水生生物研究所藻种室也用WC保种。实验表明,由作者设计的FPW培养液培养的隐藻与WC培养的相比,蛋白含量及脂肪酸多不饱和程度均较低,说明营养价值有差异;但最高密度及SGR明显大($P < 0.05$)(图1)。更重要的是,WC培养液由10种成分组成,而且用蒸馏水配制,这就限制了其实际应用范围;而FPW培养液仅由5种成分组成,且用池塘水配制。因此,FPW培养液较WC更适用于规模化培养。

有关微藻营养组成的研究,已有许多报导[纪明候等,1985;华汝成,1986;Ahlgren等,1992;曹淑莉等,1993]。卵形隐藻与目前研究较多的几种微藻的营养成分列于表6。隐藻中蛋白含量及 Σ EAA/ Σ AA稍低于钝顶螺旋藻,高于小球藻和2种硅藻,尤其是高出硅藻1倍多。隐藻生化组成中最大的特点是PUFA含量丰富;不仅高于螺旋藻和小球藻,也高于被普遍认为 ω 3PUFA组成丰富的硅藻[代田昭彦,1974;Watanabe等,1983]。螺旋藻及小球藻中不含对鱼类

具有较高营养价值的 EPA(C20:5 ω 3)和 DHA(C22:6 ω 3),而隐藻中 EPA 及 DHA 丰富;硅藻中 EPA 及 DHA 含量与隐藻中接近。尽管表 6 中脂肪酸指标仅为相对含量,但也从一个侧面说明隐藻具有较高的营养价值。此外,隐藻无细胞壁,极易被水生动物破碎和消化。因而隐藻是水生滤食性动物食物的重要类群[Klaveness, 1988];隐藻水华为一级“好水”,隐藻塘具有很高的生产力[何志辉和李永函,1975;何志辉,1985]。

表 6 卵形隐藻与其它微藻主要营养指标的比较

Table 6 Comparisons of *Cryptomonas ovata* with other micro-algae in major nutritional indexes

种 类	蛋白质含量(%)	Σ EAA/ Σ AA	$\Sigma\omega$ 3PUFA/ Σ FA (EPA + DHA)	数据来源	
卵形隐藻	58.8	46.33	52.8	14.81	自测,FPW 培养
钝顶螺旋藻	61.2	53.04	21.7		曹淑莉等[1993],Becker[1986]
蛋白核小球藻	49.7	44.9	29.4		自测
三角褐指藻	27.9	49.9			曹淑莉等[1993]
纤细角刺藻	23.9		39.6	10.31 ~ 14.53	吴 斌(1991)

Beach 等[1970]报导了卵形隐藻脂肪酸的组成,认为隐藻不饱和脂肪酸中以 C18:4 ω 3 最丰富(34%);Ahlgren 等[1992]的研究证实了上述结论,但测量值低(8.0%)。我们的研究表明,由 WC 培养的隐藻脂肪酸中以 C18:4 ω 3 最丰富(22.59%),而 FPW 中培养的则以 C18:3 ω 3 最丰富(24.05%)。Reitan 等[1994]认为温度、盐度、光照、生长期、营养盐等都能影响藻类的脂肪酸组成,FPW 及 WC 中培养的隐藻最丰富的不饱和脂肪酸不同,很可能是由培养液中营养元素的差异造成,但究竟是哪种或哪些元素在起作用,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 王业勤、李勤生,1993.藻类天然产物的医药、保健应用潜力,生命科学进展——理论·技术·应用,余传隆(主编)。中国医药科技出版社(京)。
- [2] 纪明候等,1985.几种海洋浮游植物的氨基酸含量。海洋学报,7(5):598~604。
- [3] 华汝成,1986.单细胞藻类的培养与利用。农业出版社(京)。
- [4] 何志辉、李永函,1975.论白鲢的食物问题。水生生物学集刊,5(4):541~547。
- [5] 何志辉、李永函,1983.无锡市河埭口高产鱼池水质的研究 II.浮游生物。水产学报,7(4):287~299。
- [6] 何志辉,1985.从“看水”经验论养鱼水质的生物学指标。水生生物学报,9(1):89~99。
- [7] 李永函,1983.池塘轮虫和鞭毛藻类培养、利用技术操作规程(试行)。水库渔业,(3):59~61。
- [8] 张泰山、郑又雄,1988.鱼池中鞭毛藻类顶极群落的识别和培育。齐鲁渔业,(4):21~23。
- [9] 徐振康、布斯,1992.贝克水蚤对水华鱼腥藻的同化速率及其对藻丝数量的影响。水生生物学报,16(3):208~214。
- [10] 曹淑莉等,1993.8种海洋饵料微藻蛋白质含量及氨基酸组成比例的比较研究。海洋学报,15(4):98~103。
- [11] 代田昭彦,1974.水产饵料生物学。恒星社厚生阁版。
- [12] 西泽一俊和千原光雄,1979.藻类研究法。共立出版。
- [13] Ahlgren, G. et al., 1992. Fatty acid content and composition of freshwater microalgae, *J. Phycol.*, 28:37~50.
- [14] Beach, D. H. et al., 1970. The polyunsaturated fatty acids of marine and freshwater cryptomonads, *J. Protozool.*, 17:501~510.

(1)吴 斌,1991.纤细角刺藻 EPA 及 DHA 含量的分析及其在对虾育苗中的应用,青岛海洋大学硕士论文。

- [15] Becker, E. W., 1986. Nutritional properties of microalgae, potentials and constraints, 339 ~ 419. In Richmond A. (ed.): *CRC handbook of microalgae mass culture*, CRC Press.
- [16] De Marsac, N. T. & J. Houmard, 1988. Complementary chromatic adaptation: physiological conditions and action spectra. *Methods in Enzymology*, 167: 318 ~ 328.
- [17] Guillard, R. R. L. & C. J. Lorenzen, 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide c, *J. Phycol.*, 8: 10 ~ 14.
- [18] Hansmann, E., 1973. Pigment analysis. 359 ~ 368. In Stein I. R. (ed.): *Handbook of phyecological methods, culture methods and growth measurements*, Cambridge University Press.
- [19] Klaveness, D., 1988. Ecology of the Cryptomonada: a first review, 105 ~ 133. In Sandgren C. D. (ed.): *Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton*, Cambridge University Press.
- [20] Osborne, D. R. & P. Voogt, 1978. The analysis of nutrients in foods. Academic Press, USA.
- [21] Reitan, K. I., J. R. Rainuzzo and Y. Oisen, 1994. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J. Phycol.*, 30: 972 ~ 979.
- [22] Strickland, J. D. H. & T. R. Parsons, 1968. A practical handbook of seawater analysis. 167, 311.
- [23] Uematsu-Kaneda, H. & M. Furuya, 1982. Effects of calcium and potassium ions on phototaxis in *Cryptomonas*. *Plant & Cell Physiology*, 23(8): 1377 ~ 1382.
- [24] Watanabe, T., C. Kitajima, C. & S. Fujita, 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review, *Aquaculture*, 34: 115 ~ 143.

COMPARATIVE STUDIES ON GROWTH AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF *CRYPTOMONAS OVATA* CULTURED IN FIVE MEDIA

Cao Jixiang, Li Deshang and Wang Jinjui

(Ocean University of Qingdao, 266003)

ABSTRACT The studies were conducted on the growth and biochemical composition of *Cryptomonas ovata* cultured in five media, from May to July in 1993. Results showed that the maximum cell density and specific growth rate (SGR) of *C. ovata* cultured in FPW medium designed by the authors were remarkably ($p < 0.05$) greater than those of the alga cultured in WC medium widely-used for the culture of this alga in lab; amino acid composition and $\sum EAA/\sum AA$ of the alga cultured in FPW were very near to that in WC; however, the protein level and $\sum PUFA/\sum FA$ were lower. Authors are of the opinion that the FPW medium is more useful than WC, especially when used for large-scale culture of *C. ovata*, because it is more simple in composition and is prepared with pond water.

KEYWORDS *Cryptomonas ovata*, Culture medium, Growth, Biochemical composition