

文章编号:1000-0615(2004)03-0477-04

·研究简报·

## 不同生长阶段微绿球藻的营养价值

黄旭雄, 周洪琪, 朱建忠, 倪勤

(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

关键词: 微绿球藻; 生长阶段; 粗蛋白; 总脂肪; 氨基酸; 脂肪酸

中图分类号: S963.16 文献标识码: A

### The nutritional value of *Nannochloropsis oculata* in different growth phases

HUANG Xu-xiong, ZHOU Hong-qi, ZHU Jian-zhong, NI Qin

(College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** The nutrition values of microalgae, *Nannochloropsis oculata*, in different growth phases were analyzed. The results indicated growth phase had effects on the main nutrition values of *N. oculata*. The algae in exponential phase have the highest crude protein content (33.99%) and the lowest (28.33%) in stationary phase. But the algae in stationary phase and phase of declining relative growth had higher amino acid content, 225.02mg·g<sup>-1</sup> and 214.82 mg·g<sup>-1</sup> respectively. The algae in exponential phase had the lowest amino acid content (98.87 mg·g<sup>-1</sup>). The total lipid content of algae in phase of declining relative growth was significantly higher than those in exponential phase and stationary phase. As the alga grew, the composition of fatty acid was changing and the compositions of EPA and PUFA declining. From the viewpoint of nutritional value and growth characteristics of microalgae, the phase of declining relative growth is the best harvest time of *N. oculata* under the batch culture model.

**Key words:** *Nannochloropsis oculata*; growth phase; crude protein; total lipid; amino acid; fatty acid

微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*)是一种重要的海产经济微藻,易培养,是海产苗种生产中广泛应用的一种饵料微藻。在澳大利亚及以色列等国家,微绿球藻被规模化培养来用于生产高纯度的EPA<sup>[1]</sup>。微藻的营养价值取决于藻种的遗传因素、生长阶段和培养条件。有关培养条件对微藻营养、脂肪酸组成的影响报道较多<sup>[1-5]</sup>,而关于生长阶段对微绿球藻营养价值影响的报道较少<sup>[6]</sup>。目前,生产上微藻的采收时间基本根据微藻的生长状况而定。本文研究了不同生长阶段微绿球藻的粗蛋白、总脂肪、氨基

酸及脂肪酸组成等营养指标,为其在生产中的科学采收提供营养学依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 藻种的来源与培养条件

试验用微绿球藻 *N. oculata* 取自上海水产大学生物饵料保种室。以 F/2 配方为培养液<sup>[7]</sup>在恒温光照培养箱内用 1000 mL 的烧瓶培养。温度 24℃,培养海水比重为 1.015,连续光照,光强 70μE·M<sup>-2</sup>·S<sup>-1</sup>。微藻起始接

收稿日期:2002-12-09

资助项目:上海市重点学科资助项目(科99-49)

作者简介:黄旭雄(1971-),男,浙江浦江人,在职博士生,副教授,主要从事水产动物营养与饵料学研究。E-mail: xxhuang@shfu.edu.cn

种浓度为  $(313 \sim 330) \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。培养期间每天早中晚摇动3次。

### 1.2 一次性培养条件下微绿球藻生长阶段的确定

按1.1方法培养,自接种后每天上午定时摇匀藻液,并用无菌移液管取样测定藻细胞浓度。藻细胞计数采用血球计数板法。藻细胞计数设6个重复。

### 1.3 不同生长阶段微藻营养价值的测定

将处于不同生长阶段的微绿球藻用连续离心机离心采收后,在55℃烘箱中烘干,磨碎后用于营养分析。粗蛋白用KDN-04定氮仪测定,总脂肪用氯仿-甲醇法测定。样品经盐酸水解后用岛津液相色谱仪测定氨基酸含量,脂肪酸经苯-石油醚甲酯化后在HP6890A型气相色谱仪上分析,并用归一化法计算脂肪酸的百分含量。除氨基酸外,其余指标测定设3个重复。

### 1.4 数据统计与分析

数据用平均值和标准差表示,并对其进行 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 试验条件下微绿球藻的生长特性

图1为试验条件下微绿球藻一次性培养的生长曲线。由图1可知,接种后的第1天,细胞数增长较缓,第2~4天,细胞数增长很快,第5天细胞数增长再次趋缓,第6~7天,细胞数无明显增加。根据藻类细胞增长的情况,确定接种后第3天、第5天和第7天分别为指数增长期、相对生长下降期和静止期。

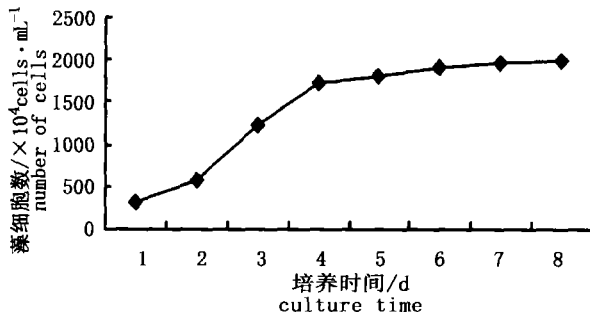


图1 试验条件下微绿球藻细胞增长曲线

Fig.1 The growth curve of *N. oculata* under experiment condition

### 2.2 不同生长阶段微绿球藻的粗蛋白含量

处于不同生长阶段的微绿球藻,其粗蛋白的含量不同(表1)。粗蛋白含量以指数增长期的最高(33.99%),略高于相对生长下降期(33.05%);静止期的粗蛋白含量最低(28.33%),显著低于前两个生长时期。

### 2.3 不同生长阶段微绿球藻的总脂肪含量

生长阶段对微绿球藻的脂肪含量也有影响(表2),相对生长下降期总脂肪含量极显著高于指数增长期和静止

期的脂肪含量,而指数增长期和静止期的脂肪含量差异不显著。

表1 不同生长阶段微绿球藻的粗蛋白及总脂肪含量  
Tab.1 The contents of crude protein and total lipid of *N. oculata* in different growth phases

生长阶段 growth phase	粗蛋白含量(%) crude protein content	总脂肪含量(%) total lipid content
指数增长期(EP) exponential phase	33.99 ± 0.78 <sup>Aa</sup>	21.61 ± 0.61 <sup>A</sup>
相对生长下降期(PDRG) phase of declining relative growth	33.05 ± 0.91 <sup>Aa</sup>	26.74 ± 0.34 <sup>B</sup>
静止期(SP) stationary phase	28.33 ± 0.88 <sup>B</sup>	20.77 ± 1.06 <sup>A</sup>

注:表中数字上标有不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。以下各表同表1

Notes: the figures in table marked with the different lower case means their differences are significant ( $P < 0.05$ ). While different capitals means their differences are very significant ( $P < 0.01$ ). The next tables are same as table 1

### 2.4 不同生长阶段微绿球藻氨基酸组成及含量

由表2可知,不同生长阶段的微绿球藻,其氨基酸含量有很大的差异,微绿球藻各氨基酸的含量在静止期和相对生长下降期明显高于指数增长期。静止期的总必需氨基酸和总氨基酸分别为  $121.31 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  样品和  $225.02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  样品;相对生长下降期的总必需氨基酸和总氨基酸分别为  $103.46 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  样品和  $214.82 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  样品;而指数增长期的总必需氨基酸和总氨基酸分别仅为  $49.96 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  样品和  $98.87 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  样品。但不同生长阶段的微绿球藻的氨基酸百分组成,除个别氨基酸差异略大,其余基本保持一致。微绿球藻所含的必需氨基酸中,His和Met的含量较少,Phe和Leu的含量相对较多。

### 2.5 不同生长阶段微绿球藻的脂肪酸组成

由表3可知,微绿球藻的脂肪酸组成中,含量多的脂肪酸为16:0、16:1n7和EPA(20:5n3),不同生长时期微绿球藻的脂肪酸组成有差异。随培养时间的延长,微绿球藻细胞内饱和脂肪酸的比例由指数增长期的28.98%增加到静止期的33.93%,而EPA、多不饱和脂肪酸的比例却分别从22.50%和42.18%降低到16.80%和35.79%。

## 3 讨论

有关微绿球藻的营养价值,现有的报道主要集中在脂肪和脂肪酸组成的研究。魏东等<sup>[1,6]</sup>报道微绿球藻的总脂含量占干重的20%~54.5%,具体与氮源、N/P和生长时期有关。易翠平等<sup>[3]</sup>认为不同硝酸钠水平下微绿球藻的总脂肪含量为26%~34%。本试验测得的微绿球藻总脂肪含量为20.77%~26.74%,与上述报道基本一致。但

与马志珍<sup>[5]</sup>报道微绿球藻脂肪含量为 6.9% 有较大的差异。而微绿球藻的蛋白质和氨基酸的研究鲜有报道。本试验测得的微绿球藻粗蛋白含量为 28.33% ~ 33.99%, 低于马志珍<sup>[5]</sup>报道的 46.7% 的蛋白质含量。

表 2 不同生长阶段微绿球藻的氨基酸含量与组成

Tab.2 The amino acid contents and compositions of *N. oculata* in different growth phases

氨基酸 amino acid	指数增长期 (EP)		相对生长下降期 (PDRG)		静止期 (SP)	
	含量(mg·g <sup>-1</sup> ) content	百分组成(%) composition	含量(mg·g <sup>-1</sup> ) content	百分组成(%) composition	含量(mg·g <sup>-1</sup> ) content	百分组成(%) composition
Asp <sup>*1</sup>	10.08	10.2	22.01	10.2	19.98	8.9
Glu <sup>*2</sup>	14.15	14.3	32.17	15.0	27.66	12.3
Ser	6.21	6.3	11.67	5.4	13.18	5.9
Gly	6.60	6.7	14.33	6.7	13.73	6.1
Thr	4.76	4.8	11.06	5.2	10.58	4.7
Cys	0.07	0.1	5.04	2.3	5.60	2.5
Arg	5.74	5.8	13.78	6.4	12.53	5.6
Ala	8.19	8.3	17.71	8.2	16.07	7.1
Tyr	3.60	3.6	8.42	3.9	7.48	3.3
His	1.00	1.0	2.86	1.3	2.38	1.1
Val	5.09	5.2	12.97	6.0	11.61	5.2
Met	1.65	1.7	3.60	1.7	3.29	1.5
Phe	14.28	14.4	14.57	6.8	41.23	18.3
Ile	3.66	3.7	8.77	4.1	8.36	3.7
Leu	8.58	8.7	20.64	9.6	18.38	8.2
Lys	5.20	5.3	15.20	7.1	12.95	5.8
ΣEAA <sup>*3</sup>	49.96	50.5	103.46	48.2	121.31	53.9
TAA	98.87	100.0	214.82	100.0	225.02	100.0

注: \* 1. Asp 实际为 Asp 和 Asn 之和; \* 2. Glu 实际为 Glu 和 Gln 之和; \* 3. ΣEAA 为 9 种 EAA (Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr 和 Val) 之和, Try 在水解过程中被破坏

Notes: \* 1. Asp consists of Asn and Asp; \* 2. Glu consists of Gln and Glu; \* 3. ΣEAA consists of 9 essential amino acid (Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr and Val), Try was destroyed during hydrolysis

表 3 不同生长阶段微绿球藻的脂肪酸组成

Tab.3 The fatty acid compositions of *N. oculata* in different growth phases

	指数增长期 (EP)	相对生长下降期 (PDRG)	静止期 (SP)
14:0	4.96 ± 0.16	5.76 ± 0.05	5.21 ± 0.01
16:1n7	22.68 ± 0.24	23.61 ± 0.10	24.83 ± 0.07
16:0	22.35 ± 0.16	23.17 ± 0.11	26.61 ± 0.22
18:3n3	5.17 ± 0.17 <sup>a</sup>	5.09 ± 0.05 <sup>a</sup>	5.17 ± 0.08 <sup>a</sup>
18:2n6	5.78 ± 0.62 <sup>ab</sup>	5.14 ± 0.10 <sup>aa</sup>	6.94 ± 0.13 <sup>bb</sup>
18:1n7	8.73 ± 0.11	8.22 ± 0.12	6.88 ± 0.09
18:0	1.67 ± 0.19	1.47 ± 0.06	2.11 ± 0.08
EPA	22.50 ± 0.46 <sup>Aa</sup>	21.71 ± 0.12 <sup>Aa</sup>	16.80 ± 0.13 <sup>B</sup>
ΣSFA	28.98 ± 0.16 <sup>A</sup>	30.40 ± 0.20 <sup>B</sup>	33.93 ± 0.25 <sup>C</sup>
ΣPUFA	42.18 ± 0.44 <sup>A</sup>	40.16 ± 0.29 <sup>B</sup>	35.79 ± 0.29 <sup>C</sup>

注: ΣSFA 包括 14:0、16:0 和 18:0; ΣPUFA 包括 EPA、18:3n3、18:2n6 和 18:1n7

Notes: ΣSFA consists of 14:0, 16:0 and 18:0. ΣPUFA consists of EPA, 18:3n3, 18:2n6 and 18:1n7

鱼虾等对饲料中蛋白质的需求,本质上是对饲料中氨基酸的需求。因此饲料中氨基酸的含量比粗蛋白含量更能准确反映饲料的蛋白质营养价值。在一次性培养过程中,随培养时间的延长,培养液中氮磷等营养素因藻类的

吸收利用,其浓度也随之降低。已知在氮缺乏的培养液中螺旋藻(*Spirulina* sp.)的蛋白质含量会降低<sup>[8]</sup>,球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)的粗蛋白含量随培养时间的延长而降低<sup>[9]</sup>。本试验中,微绿球藻的粗蛋白在指数增长期的测定值最高(33.99%),其次为相对生长下降期(33.05%),静止期粗蛋白测定值最低(28.33%);表现出类似的变化趋势。但是其氨基酸含量则为静止期最高(225.02 mg·g<sup>-1</sup>样品),其次为相对生长下降期(214.82 mg·g<sup>-1</sup>样品)次之,指数增长期最低(98.87 mg·g<sup>-1</sup>样品)。刘东燕等<sup>[10]</sup>认为球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)从延缓期进入指数生长期的开始阶段,藻细胞充分吸收培养液中的营养盐,迅速进行物质合成积累,为细胞在指数增长期的快速分裂奠定基础,会出现单位细胞内可溶性蛋白含量的高峰,在随后的指数增长期,单位细胞内的可溶性蛋白含量迅速降低。在细胞进入静止期阶段,细胞的生长策略发生改变,细胞分裂迅速下降,使物质合成在细胞水平得到积累,重新出现单位细胞内可溶性蛋白含量的高峰。若忽略不同生长阶段细胞的大小,本试验中微绿球藻的氨基酸含量的变化规律与球等鞭金藻细胞内可溶性蛋白的变化规律相似。处于不同生长时期的微绿球藻的各种氨基酸组成相对稳定(表 2)。因此,从氨基酸营养角度,处于静止期和相对生长下降期的微绿球藻优于处于指数增长期的微绿球藻。

结合表 1、2, 将表 2 中氨基酸含量折算成氨基酸占粗蛋白的百分含量, 则微绿球藻在指数增长期、相对生长下降期和静止期的氨基酸百分含量分别为 29.06%、55.00% 和 79.43%。由此可推论, 随培养时间的延长, 尽管微绿球藻的粗蛋白含量下降了, 但其质量逐步提高。产生这种现象可能与微藻对营养盐的吸收利用有关。已知将藻细胞从含氮磷的培养液转移到氮磷缺乏的培养液中后, 铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*)<sup>[11]</sup> 和雪藻 (*Parietochloris incisa*)<sup>[12]</sup> 能够利用早先藻体吸附的氮磷, 在一定时间内维持藻细胞的生长和代谢。

本试验中, 在培养前期, 细胞外培养液中的氮浓度较高, 微绿球藻能够快速吸收培养液中的氮元素, 并蓄积在细胞内。到了培养后期, 培养液中营养盐由于藻类的生长而被吸收、消耗, 此时藻细胞只能靠前期蓄积在细胞内的氮加以同化利用, 最终合成自身的氨基酸, 以维持细胞有限的生长, 结果使得细胞内的非蛋白氮含量降低。从而使藻体中氨基酸/粗蛋白的比值升高。本试验中, 微绿球藻的总脂肪含量在培养过程中先升后降(表 1), 其变化规律与魏东等<sup>[6]</sup>报道一致。在脂肪酸的组成上, 随培养时间的延长, 饱和脂肪酸的比例增加, 而 EPA、PUFA 的比例减少(表 3)。而饵料中含足量的 EPA、PUFA 对提高仔稚鱼及虾蟹幼体的变态成活率有重要作用<sup>[13,14]</sup>。另外, 魏东等<sup>[1,6]</sup>及易翠平等<sup>[3]</sup>都从微绿球藻中检测到 20:4n6, 而本试验中并未检测到该脂肪酸。这可能与微绿球藻的培养条件、样品处理及检测条件的不同有关。

综上所述, 从蛋白质质量、氨基酸含量、脂肪含量及脂肪酸组成等营养学角度综合考虑, 并结合微藻生长特性, 笔者认为相对生长下降期是微绿球藻采收的最佳时期。

在氨基酸测定过程中得到上海水产大学中日合作研究所横山雅仁先生、袁春红老师和陈舜胜老师的大力支持, 特此致谢!

## 参考文献:

- [1] Wei D, Zhang X C, Sui Z H, et al. Effect of nitrogen sources and N/P ration on cell growth, total lipid content and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* [J]. Marine Sciences, 2000, 24(7): 45 - 50. [魏东, 张学成, 隋正红, 等. 氮源和 N/P 对眼点拟微球藻的生长、总脂含量和脂肪酸组成的影响[J]. 海洋科学, 2000, 24(7): 45 - 50.]
- [2] Zhou H Q, Ding Z P, Zhang X R, et al. Study on *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* as live feed [J]. J Shanghai Fish Univ, 1998, 7 (suppl.): 323 - 331. [周洪琪, 丁卓平, 张旭日, 等. 微藻(三角褐指藻和牟氏角毛藻)饵料的研究[J]. 上海水产大学学报, 1998, 7(增刊): 323 - 331.]
- [3] Yi C P, Zhou H Q, Ding Z P, et al. Effect of different nitrogen's different concentration on growth, total lipid content of *Nannochloropsis oculata* [J]. J Shanghai Fish Univ, 1998, 7 (suppl.): 332 - 337. [易翠平, 周洪琪, 丁卓平, 等. 氮源及其浓度对微绿球藻生长、总脂肪含量及脂肪酸组成的影响[J]. 上海水产大学学报, 1998, 7(增刊): 332 - 337.]
- [4] Hua X M, Chen P, Zhou H Q, et al. Effect of salinity on the growth, total lipid and fatty acid composition of microalgae [J]. J Shanghai Fish Univ, 1998, 7 (suppl.): 338 - 344. [华雪铭, 陈鹏, 周洪琪, 等. 盐度对微藻的生长、总脂肪含量及脂肪酸组成的影响[J]. 上海水产大学学报, 1998, 7(增刊): 338 - 344.]
- [5] Ma Z Z. Nutritional values of microalgae commonly used in aquaculture: a review [J]. Modern Fisheries Information, 1992, 7(11): 12 - 19. [马志珍. 常用微藻饵料效果的综合评价[J]. 现代渔业信息, 1992, 7(11): 12 - 19.]
- [6] Wei D, Zhang X C, Zou L H, et al. Effect of cell growth phase on total lipid content and fatty acid composition of two marine microalgae [J]. J Ocean Univ Qingdao, 2000, 30(3): 503 - 509. [魏东, 张学成, 邹立红, 等. 细胞生长时期对两种海洋微藻总脂含量和脂肪酸组成的影响[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(3): 503 - 509.]
- [7] Chen M Y. Culture of live feed [M]. Beijing: Agriculture Press of China, 1995. 65. [陈明耀. 生物饵料培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995. 65.]
- [8] Feng W M, Wang T, Fang G R, et al. Quality control on production of Spirulina [J]. J Aquac, 1999, (1): 25 - 27. [冯伟民, 汪廷, 方光如, 等. 螺旋藻生产中的质量控制[J]. 水产养殖, 1999, (1): 25 - 27.]
- [9] Zhu C J, Lee Y K, Chao T M. Effect of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1 [J]. J Appl Phycol, 1997, 9: 451 - 457.
- [10] Liu D Y, Sun J, Gong J, et al. The effect of different N/P ratios on the growth of *Isochrysis galbana* [J]. Marine Fisheries Research, 2002, 23(1): 29 - 32. [刘东燕, 孙军, 巩晶, 等. 不同氮、磷比例对球等鞭金藻生长的影响[J]. 海洋水产研究, 2002, 23(1): 29 - 32.]
- [11] Gao X Q, Ren J C, Zong Z X, et al. Studies on the nutrient energetics on *Microcystis aeruginosa* [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis, 1994, 30(4): 461 - 469. [高学庆, 任久长, 宗志祥, 等. 铜绿微囊藻营养动力学研究[J]. 北京大学学报(自然科学版), 1994, 30(4): 461 - 469.]
- [12] Liu J G, Liu W, Zvi Cohen, et al. The high productivity of biomass and arachidonic acid in continuous high density culture of *Parietochloris incisa* [J]. Oceanol et Limnol Sin, 33(5): 499 - 508. [刘建国, 刘伟, Zvi Cohen, 等. 雪藻高密度连续培养中生物量和花生四烯酸的高产率[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(5): 499 - 508.]
- [13] Liu J K. Status quo and prospect of research on essential fatty acids and phospholipids of marine fish during early development [J]. Marine Fisheries Research, 2002, 23(2): 58 - 64. [刘镜恪. 海鱼早期阶段必需脂肪酸和磷脂的研究现状与展望[J]. 海洋水产研究, 2002, 23(2): 58 - 64.]
- [14] Shiau S Y. Nutrient requirements of penaeid shrimps [J]. Aquac, 1998, 164: 77 - 93.