

两种微藻浓缩液保藏效果的比较

俞建中¹, 梁欣欣¹, 陈峰^{1,2}, 魏东¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

(2. 北京大学工学院, 食品与生物资源研究所, 北京 100871)

摘要: 本试验研究了不同冷冻保护剂和降温方式处理下, 眼点拟微球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 浓缩液 (2×10^9 cells/mL) 在 4 °C 和 -18 °C 下保藏 3 个月, 以及钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 浓缩液 (7% 干重) 在 -18 °C 下保藏 3 个月的效果。结果表明, 采用 -18 °C 速冻、不添加保护剂, 保藏 3 个月后眼点拟微球藻的相对细胞活性最高, 达到新鲜细胞对照的 48.17%, 显著高于其他处理组 ($P < 0.05$); 同样条件下, 眼点拟微球藻浓缩液的蛋白和 EPA 损失率分别为 3.42% 和 2.73%, 钝顶螺旋藻浓缩液的蛋白和总脂肪酸损失率分别为 4.17% 和 19.33%, 综合比较各处理, 该方法是这两种微藻浓缩液低温保藏的优选方法。

关键词: 眼点拟微球藻; 钝顶螺旋藻; 浓缩液; 保护剂; 保藏

文章编号: 1673-9078(2013)5-948-952

Evaluation of the Preservation Methods for Two Microalgal Concentrates

YU Jian-zhong¹, LIANG Xin-xin¹, CHEN Feng^{1,2}, WEI Dong¹

(1. School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Institute for Food and Bioresource Engineering, College of Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Various cryoprotectants and cooling methods were adopted for 3-month preservation of the concentrates of *Nannochloropsis oculata* (2×10^9 cells/mL, at 4 °C and -18 °C) and *Spirulina platensis* (7% dry weight at -18 °C). The results showed that, the highest relative cell activity of *N. oculata* concentrates preserved for 3 months reached 48.17% of that control (fresh cultured cells) by fast freezing at -18 °C without cryoprotectant, which higher than other treatments significantly ($P < 0.05$). Under the same conditions, the loss of protein and EPA in the concentrates of *N. oculata* had were 3.42% and 2.73%, respectively. The lose of the protein and total fat acids in the concentrates of *S. platensis* were 4.17% and 19.33%, respectively. Based on the systematic comparison, the method of fast freezing at -18 °C without cryoprotectant was determined as the favorable for preservation of the concentrates of *N. oculata* and *S. platensis* at low temperature.

Key words: *Nannochloropsis oculata*; *Spirulina platensis*; concentrate; cryoprotectant; preservation

微藻 (Microalgae) 作为水产动物苗种的开口饵料和次级饵料生物的营养强化食物, 在水产育苗中的地位不可替代, 具有满足幼体营养需要、提高成活率、促进生长发育、净化水质、增加溶解氧、调节微生态环境等综合作用^[1]。目前的育苗生产中, 往往因为鲜活饵料微藻供应不及时、供应量不足、品种单一而导致育苗成本上升甚至育苗失败。因此, 微藻浓缩液保藏技术的开发应用对于水产育苗行业的可持续健康发展至关重要。

微藻的低温保藏多针对微藻种质的长期低温/超低温冷冻保藏, 细胞密度低、处理量小、设备成本高,

收稿日期: 2013-01-09

基金项目: 广东省教育部产学研结合重点项目 (2011A090200073); 广东省科技攻关计划项目 (20052050166); 国家海洋局海洋可再生能源专项资金项目 (GHME2011SW04)''

作者简介: 俞建中 (1977-), 男, 博士后, 微藻生物工程

通讯作者: 魏东 (1966-), 男, 博士, 教授, 工业生物技术

难以放大^[2]。面向水产育苗的饵料微藻低温保藏技术应以高细胞密度、高细胞活力、低营养损失率为目标, 采用常温至 -20 °C 左右规模保藏, 还要考虑到育苗应用中尽可能减少或不使用保护剂。眼点拟微球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 和钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 是目前水产育苗中常用的饵料藻^[3-4]。本文针对这两种微藻的浓缩液, 系统研究 4 °C 和 -18 °C 下, 采用不同冷冻保护剂和不同降温方式处理后保藏 3 个月, 分析细胞活力、营养损失 [包括蛋白、EPA (Eicosapentemacnioc Acid, 二十碳五烯酸)、总脂肪酸等] 的变化情况, 以期建立简便、实用的微藻浓缩液低温保藏方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

眼点拟微球藻 (*N. oculata*) 新鲜浓缩液由山东东营大振生物工程有限公司提供; 钝顶螺旋藻 (*S.*

platenis) 新鲜藻泥由广西北海生巴达生物科技公司提供。二甲基亚砜 (DMSO)、甘油、甲醇、异丙醇、丙酮均为国产分析纯; 二醋酸荧光素 (Fluorescein diacetate, FDA) 购自美国 Sigma 公司。

1.2 实验设计

1.2.1 眼点拟微球藻浓缩液低温保藏方法

眼点拟微球藻浓缩液低温保藏实验设置见表 1, 保藏温度为-18 °C 或 4 °C, 保藏时间为 3 个月。速冻法是将浓缩液直接放置在-18 °C 冰箱内速冻, 程序降温法是采用异丙醇为介质实现降温速率为 1 °C/min。4 °C 和-18 °C 保藏处理分别使用浓缩液 255 g/份和 240 g/份, 各处理加适量冷冻保护剂母液 (对照加无菌海水) 后最终质量为 300 g/份, 浓缩液终浓度为 2×10⁹ cells/mL, 设置 3 个平行样。

表 1 眼点拟微球藻浓缩液低温保藏方法

Table 1 Preservation methods adopted for *N. oculata*

concentrates			
序号	保藏温度	保护剂种类	降温方式
0	-	鲜活细胞对照	-
1		对照 I	速冻
2		10% 甲醇+10% DMSO	
3	-18 °C	对照 II	程序降温
4		10% 甲醇+10% DMSO	
5		15% 甲醇	
6	4 °C	对照 III	-
7		20% 甲醇	

1.2.2 钝顶螺旋藻浓缩液低温保藏方法

钝顶螺旋藻浓缩液低温保藏实验设置见表 2, -18 °C 下速冻和程序降温方法同上。各处理使用加水调配后的藻泥 250 g/份, 加保护剂母液 (对照加蒸馏水) 后最终质量为 300 g/份 (7% 干重), 设置 3 个平行样。保藏温度为-18 °C, 保藏时间为 3 个月。

1.2.3 细胞活性测定

采用 FDA 染色法^[5]方法对微拟球藻的相对细胞活性进行了检测, 将 4.16 mg 二醋酸荧光素 (FDA) 溶于 10 mL 丙酮中配制成浓度为 1 mmol 的母液, 置于在-18 °C 冰箱中保存。用无菌海水将眼点拟微球藻保藏浓缩液稀释到细胞浓度 1.5×10⁵ cells/mL; 以培养至对数末期的新鲜藻液为对照, 离心、清洗后用无菌海水稀释至 1.5×10⁵ cells/mL。5 mL 上述稀释藻液里加入 60 μmol FDA, 振荡混匀进行荧光染色, 每 5 min 振荡一次, 于室温下避光放置 30 min。染色结束后取样点在 96 孔荧光分析用黑板上, 每孔 100 μL, 置于 Tecan Sunrise 光吸收酶标仪检测 525 nm 下的荧光值 (FDA 激发波长为 480 nm), 至少 3 个平行样。根据

以下公式计算相对细胞活力:

$$\text{相对细胞活性}(\%) = (\text{处理组保藏后稀释液的荧光值} / \text{对照细胞悬液的荧光值}) \times 100\%$$

表 2 钝顶螺旋藻浓缩液低温保藏方法

Table 2 Preservation methods adopted by *S. platenis*

concentrates		
序号	保护剂种类	降温方式
0	鲜活细胞对照	-
1	对照 IV	速冻
2	2.5% 甲醇	
3	5% 甲醇	
4	10% 甲醇	
5	15% 甲醇	
6	10% 甲醇+10% DMSO	程序降温
7	15% 甘油	
8	对照 V	
9	2.5% 甲醇	
10	5% 甲醇	
11	10% 甲醇	程序降温
12	15% 甲醇	
13	10% 甲醇+10% DMSO	
14	10% 甘油	
15	15% 甘油	

1.2.4 蛋白含量测定

对保藏后两种微藻的蛋白含量进行了测定。浓缩液用蒸馏水洗涤, 离心, 将藻泥进行冷冻干燥。称取 0.5 g 冷冻藻粉, 用 Kjeltac™ 2300 半自动凯氏定氮仪分析其中含氮量, 进而计算出蛋白含量。眼点拟微球藻测定以培养至对数末期的藻液为对照, 离心、洗涤、冷冻干燥后称取测定; 螺旋藻测定以新鲜藻泥为对照, 经洗涤、冷冻干燥后称取测定。

1.2.5 脂肪酸组成、含量测定

测定了钝顶螺旋藻的总脂肪酸含量和眼点拟微球藻的 EPA 含量。脂肪酸样品制备采用氢氧化钾-甲醇法^[6], 将脂肪酸甲酯化后, 溶于正己烷备测。脂肪酸组成分析采用 Agilent 6890 GC-5975 MSD 型气质联用仪, 气相色谱分离采用高纯氮气作为载气, 流速为 1 mL/min。进样量 0.2 μL, 不分流, 进样口温度为 200 °C。升温程序: 130 °C 保持 1 min, 然后以 5 °C/min 升至 200 °C 保持 5 min。质谱分析采用扫描方式, 扫描范围为 33~400 amu。溶剂延迟 3 min。各出峰组分用质谱数据 NIST7.0 谱库检索, 对各组分进行定性。根据每种脂肪酸相对于 C19:0 内标的峰面积得到各脂肪酸的相对百分含量, 计算出各脂肪酸组分及总脂肪酸的含量。

2 结果与讨论

2.1 低温保藏对眼点拟微球藻相对细胞活性的影响

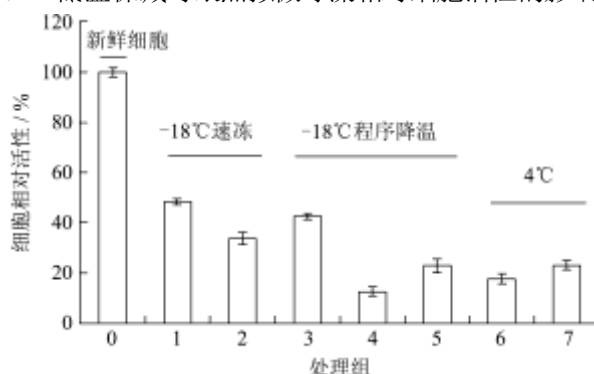


图 1 不同保藏方法处理的眼点拟微球藻细胞相对活性

Fig.1 The relative cell activity of *N. oculata* concentrates under various preservation conditions

本研究对各低温保藏条件下眼点拟微球藻的细胞活性进行了检测, 浓缩液保藏 3 个月后的细胞活性比较见图 1。由图 1 可见, 对照组(鲜活细胞)细胞活力设定为 100%, 不同保藏方法获得的细胞活性高低有较大差异。在-18℃下速冻法(1~2组)和程序降温法(3~5组)中细胞活性最高的都是不加保护剂组(1, 3组), 相对细胞活性分别为 48.17%、和 42.41%; 组 2(添加 10% 甲醇+10% DMSO)在所有添加保护剂的组中细胞活性最高, 也只有 33.71%。在 4℃下保藏浓缩液的相对细胞活性都低于 25%。各组间细胞活性比较差异显著 ($P < 0.05$)。结果表明, 低温保藏对相对细胞活性具有重大的影响, 各处理组的相对细胞活性指标均不及鲜活对照组的一半; 在不同温度的处理组中, -18℃保藏温度组的指标优于 4℃; 在-18℃条件下, 保护剂的添加具有反作用, 速冻法优于程序降温法。因此, -18℃速冻、不添加保护剂为各个处理组中最优选择。

2.2 低温保藏对两种微藻蛋白含量的影响

保藏 3 个月后眼点拟微球藻浓缩液的蛋白含量见图 2。

由图 2 可见, 对照组(鲜活细胞)蛋白含量为干重的 25.16%, 设定为 100%, 不同保藏方法获得的蛋白含量高低有较大差异, 其中-18℃速冻法中不加保护剂组(1组)蛋白含量最高, 达到干重的 24.30%, 与对照相比蛋白损失率最低, 为 3.42%, 但组 1、3、5 和 7 四组间对比差异均不显著。

保藏 3 个月后钝顶螺旋藻浓缩液的蛋白含量见图 3。

由图 3 可见, 对照组(鲜藻泥)蛋白含量为 61.33% 干重, 设定为 100%, 不同保藏方法获得的蛋白含量

高低有较大差异, 其中-18℃速冻法中不加保护剂组(组 1)蛋白含量最高, 达到干重的 58.77%, 与对照相比蛋白损失率最低, 为 4.17%, 但组 1、5、8、10、11、12 六组间对比差异均不显著。

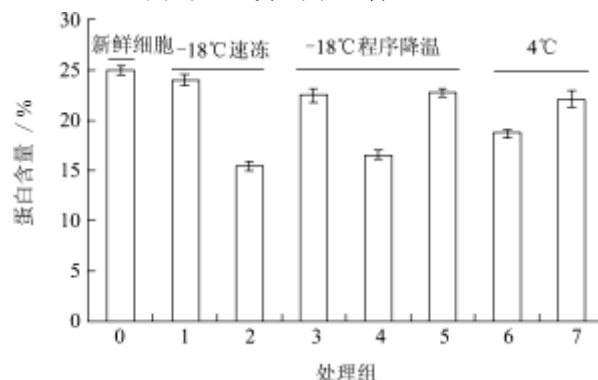


图 2 不同保藏方法处理的眼点拟微球藻蛋白含量

Fig.2 Protein content of *N. oculata* concentration under various preservation conditions

注: 蛋白质含量以干重计, 下同。

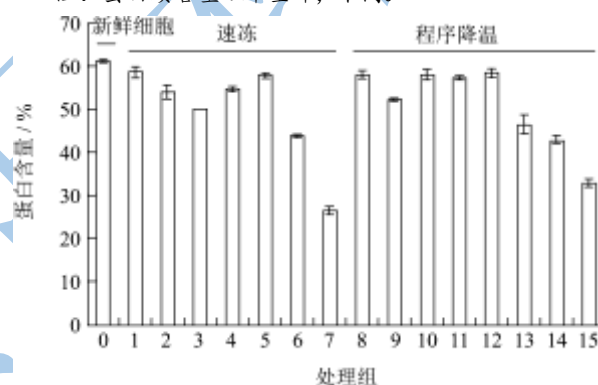


图 3 不同保藏方法处理的钝顶螺旋藻蛋白含量

Fig.3 Protein content of *S. platensis* concentration under various preservation conditions

实验结果证明, 两种微藻中, 蛋白损失率最低的处理方法有多个选择, 但考虑到方法的成本和操作简便性, -18℃速冻法、不加保护剂为最优选择。

2.3 低温保藏对两种微藻脂肪酸含量的影响

保藏 3 个月后眼点拟微球藻浓缩液的 EPA 含量见图 4。由图 4 可见, 对照组(鲜活细胞) EPA 含量占干重的 4.71%, 设定为 100%, 不同保藏方法获得的 EPA 含量高低有较大差异, 其中-18℃速冻法中不加保护剂组(组 1) EPA 含量最高, 达到干重的 4.58%, 与对照相比 EPA 损失率最低, 达到 2.76%, 但组 1、2、3 三组间对比差异均不显著。

保藏 3 个月后钝顶螺旋藻浓缩液总脂肪酸含量见图 5。由图 5 可见, 对照组(鲜藻泥)总脂肪酸含量为干重的 4.58%, 除了组 7 和 15 之外, 其他各组的总脂肪酸含量差异较小 (3.50~4.04%)。-18℃下程序降温法中加 2.5% 甲醇为保护剂的组 9 含量最高, 达到干

重的4.04%，损失率最低，为11.79%；-18℃下速冻法中不加保护剂组（组1）的含量为3.70%，总脂肪酸损失率为19.21%，与其他各组的差异较小。

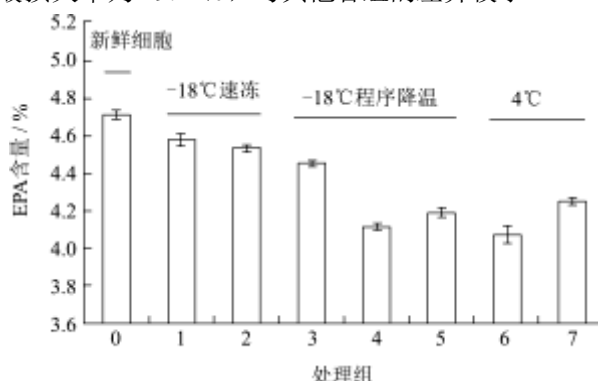


图4 不同保藏方法处理的眼点拟微球藻 EPA 含量

Fig.4 EPA content of *N. oculata* concentration under various preservation conditions

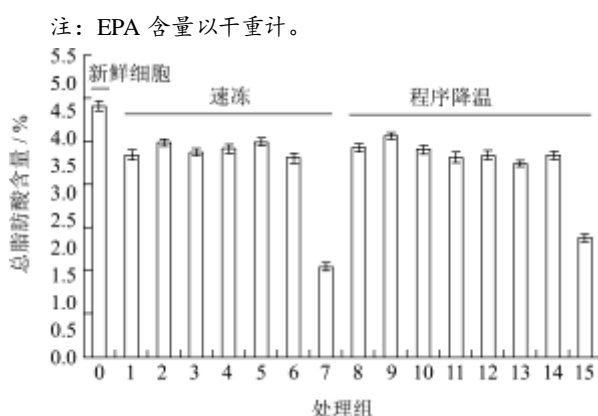


图5 不同保藏方法处理的钝顶螺旋藻总脂肪酸含量

Fig.5 Total fat acids content of *S. platensis* concentrates under various preservation conditions

注：总脂肪酸含量以干重计。

实验结果证明，两种微藻中，EPA/总脂肪酸损失率最低的处理方法有多个选择，-18℃速冻法、不加保护剂为眼点拟微球藻低温保藏的最优选择；虽然该处理方法下，钝顶螺旋藻总脂肪酸损失率并非最低，但考虑到方法的成本和操作简便性，亦建议优先选择该方法。

微藻低温保藏方法以降温方式和冷冻保护剂的选择最为关键。速冻法多运用于-30℃以上的低温保藏，而程序降温则更多用于超低温保藏（-80℃或液氮）。在微藻冷冻保藏中最常用的保护剂有二甲基亚砜（DMSO）、甘油和甲醇等，这些渗透性抗冻保护剂是许多化合物良好的溶剂，能与水很好地互溶，并能保持水分、增加溶液粘性，在冷冻过程中防止细胞脱水及冰晶形成，从而保持细胞活性^[2]，但是这些保护剂对保藏微藻的品质影响则研究较少。已有研究证明，保护剂对各类生物细胞具有一定程度的毒害作用，对

水产饵料生物或水产动物可能产生不利影响。例如，轮虫(*Brachionus plicatilis*)对低浓度（1%）的聚维酮（PVP）敏感；日本对虾(*Penaeus japonicus*)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)无节幼体对低浓度（1%）的甲醇、DMSO、丙二醇、PVP等各类保藏剂均敏感；而饵料生物如卤虫（*Artemia*）幼体能够耐受较高浓度的多种保护剂^[7]；印度对虾(*P. indicus*)无节幼体能够耐受高浓度的DMSO和丙二醇，半致死率为3~4 M^[8]；蓝对虾(*P. stylirostris*)无节幼体在1.4 M浓度的DMSO保护剂下存活率为100%^[9]。尽管如此，保护剂通过食物链进入水产动物体内，对于饲喂对象后期养殖及水产品安全造成的影响则无法估量。因此，从生产安全和食品安全角度考虑，应尽可能避免使用各类保护剂。

鲜活饵料的投放在水产育苗中非常重要，具有营养强化和净化水质的双重作用。已有研究发现，在10~30℃范围内，不添加保护剂的微藻浓缩液在中短保藏期（3个月以内），可确保较高的藻细胞活性。如，小球藻(*Chlorella sp.*)和球等鞭金藻3011(*Isochrysis galbana*) 在5~7℃的冰箱中保存1~3个月后恢复生长获得好于常温保藏的效果^[10]；球等鞭金藻3011在0℃和5℃下保存3个月后，仍然保持70%的存活率^[11]；三角褐指藻和中肋骨条藻（*Skeletonema costatum*）在0~10℃保存2个月，也可保持70%的存活率^[12-13]；小新月菱形藻(*Nitzschia closterium f. minutissima*) 在0℃下保存三个月，可保持65.5%的存活率，而在-30℃下保存3个月，可保持46%的存活率^[14]；小球藻(*C. minutissima*)在4℃直接保藏，活性明显高于加入各种保护剂的处理^[7]。因此，在特定的水产饵料藻类保藏中，不加保护剂直接冷藏或冷冻也能保证较高的微藻细胞活性。此外，饵料微藻保藏后的营养物（蛋白、脂肪酸，尤其是PUFA）含量对养殖动物育苗至关重要。为数不多的研究显示，低温保藏过程中微藻各类脂肪酸变化无特定规律，因藻种不同而不同，但脂肪酸总量均随保藏时间的增加而递减^[15]。

本研究结果表明，不使用保护剂、在-18℃下速冻保藏两种微藻浓缩液，具有营养损失小、相对细胞活性高的优势，应优先选择。

3 结论

本研究发现，综合比较各个处理方法，在不添加保护剂的情况下，采用-18℃速冻法对眼点拟微球藻和钝顶螺旋藻浓缩液冻藏处理3个月，眼点拟微球藻相对细胞活力最高、蛋白质和EPA损失率最低；在相同条件下螺旋藻蛋白质损失率最低，总脂肪酸损失率稍高。说明该方法简单有效、成本低、易于操作，利

用常规冷冻设备即可实现规模化应用,从生产安全性、经济性和便利性考虑,该方法为眼点拟微球藻和钝顶螺旋藻浓缩液保藏的优选方法。

参考文献

- [1] Hemaiswarya S, Raja R, Ravi-Kumar R, et al. Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27: 1737-1746
- [2] Taylor R, Fletcher L. Cryopreservation of eukaryotic algae: a review of methodologies [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1999, 10: 481-501
- [3] 何培民,王素娟,马家海.螺旋藻在我国水产养殖业应用与研究的现状、前景及对策[J].*上海水产大学学报*,1988,7(2): 149-154
- [4] 俞建中,梁欣欣,魏东,等.三种饵料微藻在凡纳滨对虾育苗中的饲喂效果评价.现代食品科技,2013,4:762-767
- [5] Regel R H, Ferris J M, Ganf G G, et al. Algal esterase activity as a biomeasure of environmental degradation in a freshwater creek[J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 59: 209-223
- [6] 吴瑞珊,魏东.盐度及其调节方式对眼点拟微球藻的生长和 EPA 积累的影响[J].现代食品科技,2007,23(12):5-8
- [7] Tzovenis I, Triantaphyllidis G, Naihong X, et al. Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain [J]. *Aquaculture*, 2004, 230: 457-473
- [8] Newton S S, Subramoniam T. Cryoprotectant toxicity in Penaeid prawn embryos [J]. *Cryobiology*, 1996, 33: 172-177
- [9] Alfaro J, Komen J, Huisman E A. Cooling, cryoprotectant and hypersaline sensitivity of Penaeid shrimp embryos and nauplii larvae [J]. *Aquaculture*, 2001, 195: 353-366
- [10] 蒋霞敏,朱艺峰.单胞藻浓缩,保藏及应用技术的初步研究[J].*浙江水产学院学报*,1993,12(2):81-91
- [11] 阎斌伦,朱明,张学成.球等鞭金藻 3011 浓缩细胞低温保存技术的研究[J].*海洋科学*,2005,29(12):43-46
- [12] 朱明,阎斌伦,滕亚娟,等.三角褐指藻浓缩液长期保存技术研究[J].*水产科技情报*,2003,30(6):246-249
- [13] 朱明,阎斌伦,滕亚娟,等.中肋骨条藻的浓缩与长期保存技术的研究[J].*水产科学*,2003,22(6):29-31
- [14] 孙建华,王如才,赵强.高浓度小新月菱形藻保存方法的研究[J].*海洋学报*,1998,20(2):108-112
- [15] 陈炜,王秀芬,白永安,等.浓缩方法及保存条件对小球藻藻膏脂肪酸的影响[J].*大连海洋大学学报*,2012,7(1):1-5