

# 微藻脂类组成及脂肪酸分布的分析技术

孙培培<sup>1,2</sup>, 刘 宾<sup>1,2</sup>, 杨 博<sup>1,2</sup>, 陈 峰<sup>1\*</sup>

(1. 北京大学工学院食品与生物资源工程研究所, 北京 100871;

2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广州 510641)

**摘 要:** 微藻具有光合效率高、生长周期短、有可能异养生长等特性, 并含有多种生物活性物质, 尤其是 EPA、DHA 等多不饱和脂肪酸含量丰富, 可以作为功能食品的优质生物资源。多不饱和脂肪酸在微藻细胞中主要以脂质的形式存在, 脂类组成及脂肪酸分布信息可以为藻种筛选、不饱和脂肪酸的分离纯化等提供依据。本文综述了高产多不饱和脂肪酸的藻种, 脂质及脂肪酸的萃取方法与分离鉴定技术, 特别对全二维气相色谱法、高压液相色谱法在微藻中的应用进行了阐述。

**关键词:** 微藻; 脂质; EPA; DHA; 萃取; 分离鉴定

## Analysis technology of lipid class composition and fatty acid distribution in microalgae

SUN Pei-Pei<sup>1,2</sup>, LIU Bin<sup>1,2</sup>, YANG Bo<sup>1,2</sup>, CHEN Feng<sup>1\*</sup>

(1. Institute for Food & Bioresource Engineering, Peking University, Beijing 100871, China; 2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

**ABSTRACT:** Microalgae possess a number of important properties such as the features of high photosynthetic efficiency, rapid growth and possible heterotrophic cultivation and contain a variety of biologically active substances including EPA and DHA. They are considered a high-quality biological resource in functional foods. Polyunsaturated fatty acids in microalgal cells mainly exist in the form of lipids, thus lipid and fatty acid composition could provide the basis for the screening of microalgal strains and facilitate the separation and purification of those functional polyunsaturated fatty acids. This article summarized those microalgal strains with high-yield of polyunsaturated fatty acids, methods of extraction and separation of lipids and fatty acids. The applications of advanced technologies including comprehensive two-dimensional gas chromatography and high pressure liquid chromatography in microalgae were highlighted.

**KEY WORDS:** microalgae; lipids; EPA; DHA; extraction; separation and identification

脂肪酸是由一条长的烃链和一个末端羧基组成的羧酸, 分为饱和与不饱和脂肪酸, 烃链含有两个或两个以上双键的为多不饱和脂肪酸(PUFAs), 在生物体内多以结合态存在。天然多不饱和脂肪酸碳骨架长度多数为 18~22 个碳, 碳原子数目几乎都是偶数, 且

绝大多数为顺式脂肪酸。PUFAs 根据第一个双键距离甲基末端的位置分为  $\omega$ -3 与  $\omega$ -6 系列,  $\omega$ -3 PUFAs 以二十二碳六烯酸(DHA)、二十碳五烯酸(EPA)、 $\alpha$ -亚麻酸(ALA)为代表;  $\omega$ -6 PUFAs 以花生四烯酸(AA)、 $\gamma$ -亚麻酸(GLA)、亚油酸(LA)为代表, 它们能

\*通讯作者: 陈峰, 讲席教授, 主要研究方向为微藻生物工程与功能食品。E-mail: sfchencoe@pku.edu.cn

\*Corresponding author: CHEN Feng, Chair Professor, Institute for Food & Bioresource Engineering, Peking University, No.5, Yiheyuan Road, Haidian District, Beijing 100871, China. E-mail: sfchencoe@pku.edu.cn

调节人体的脂质代谢,是维持人体机能正常的重要生物活性物质,且人体内不能合成或合成不足,必须从食物中摄取,属于必需脂肪酸。临床及流行病学证明 PUFAs 中 DHA、EPA、AA 等在一些疾病(阿尔茨海默病、癌症、心血管疾病等)的预防及治疗中发挥着重要作用<sup>[1-5]</sup>,是功能食品与医学研究的热点,并已得到了一定的应用。因此,PUFAs 作为食品营养素补充剂在功能食品研究中受到越来越多的重视。

目前,商用 PUFAs 主要来源于海洋鱼类的油脂,但是从鱼油中提纯 PUFAs 技术成本昂贵,而且有不愉快的气味与味道<sup>[6]</sup>。鱼与鱼油由于生物富集还可能含有二噁英、多氯联苯、重金属等有害物质<sup>[7]</sup>。鱼类自身并不能合成 PUFAs,它是通过吞食富含 PUFAs 的微藻后在食物链中积累获得的,因此微藻才是 PUFAs 的原始生产者。微藻能快速生长繁殖,合成积累高浓度的 PUFAs,而且有些可以异养生长,避免污染问题,具有大规模生产的潜力,是 PUFAs 的优质生物资源。PUFAs 在微藻细胞内的存在形式有中性脂与极性脂,如甘油三酯、磷脂、糖脂等,其中以甘油三酯为主,它是细胞物质与能量的主要储存形式之一。微藻培养条件不同,脂质及脂肪酸组成会有很大差异, $\omega$ -6 与  $\omega$ -3 PUFAs 比例也有所不同,这些都会影响微藻作为功能食品的营养价值。因此,脂质及脂肪酸的安全、快速、准确的萃取分离检测技术对微藻资源的充分利用发挥着重要作用。

## 1 多不饱和脂肪酸的生物学功能

上世纪八十年代开始,多不饱和脂肪酸的生物学功能在营养特别是初生婴儿的营养方面得到越来越多的重视<sup>[8]</sup>。PUFAs 的功能主要表现在两个方面:(1)调节细胞膜的流动性以及作为细胞膜的信号传递物质;(2)作为前列腺素、白三烯等代谢的前体物,预防及治疗一些慢性疾病<sup>[9]</sup>。

DHA 是对婴儿视力与神经发育重要的结构物质,由于婴儿自身合成 DHA 不能满足大脑发育的需要,所以必须从饮食中获取。FAO/WHO 专家委员会建议在婴儿配方食品中添加适量的 DHA。DHA 可以降低心血管疾病的风险,对高血压、关节炎、动脉粥样硬化与血栓等有积极的预防效果<sup>[10]</sup>。EPA 与 AA 是激素类物质类花生酸(前列腺素类、凝血恶烷类、白细胞三烯类)的重要前体物,但是它们形成的类花生酸在结构及功能上是不同的,在有些功能上甚至是相反

的,例如 EPA 可以抑制炎症的发生,而 AA 则会诱导产生炎症。因此 EPA 与 AA 的平衡摄取对于维持代谢平衡,预防代谢紊乱疾病具有重要意义<sup>[6]</sup>。另外在脂质营养的研究中, $\omega$ -3 与  $\omega$ -6 PUFAs 的摄入比例逐渐引起关注。有些研究认为人类在饮食进化中  $\omega$ -6 与  $\omega$ -3 PUFAs 适宜比例是 1/1,但是目前在人们饮食中这个比例远超过 1/1,尤其是西方饮食中甚至达到 10/1~(20~25)/1<sup>[5]</sup>,过高的比例对人体健康是不利的。FAO/WHO 推荐的合适的摄入比例为(5~10)/1。人们可以从日常饮食中获得足够的  $\omega$ -6 PUFAs,但可能缺乏适量的  $\omega$ -3 PUFAs。

## 2 多不饱和脂肪酸的微藻来源

### 2.1 微藻

微藻大多数为单细胞生物,据报道地球上约存在八十万种,已为人类认知的大约只有五万余种。它在工业应用方面具有很大的开发潜力,如作为食品营养素补充剂的 EPA、DHA 等多不饱和脂肪酸,作为抗氧化剂的类胡萝卜素,作为天然色素的藻胆蛋白,以及生物氢、甲烷等作为再生能源的生物燃料等<sup>[11-14]</sup>。关于微藻中多不饱和脂肪酸的研究主要包括高产多不饱和脂肪酸藻株的筛选、多不饱和脂肪酸的代谢机制、分离提纯技术等。

### 2.2 微藻中的多不饱和脂肪酸

高等植物与动物中缺乏合成长链多不饱和脂肪酸(大于  $C_{18}$ )的酶<sup>[15-16]</sup>。 $C_{18}$  PUFAs 可以从植物中获得,而微藻是长链多不饱和脂肪酸的重要来源。尽管已经发现很多微藻中富含 DHA、EPA、AA 等高营养价值的长链多不饱和脂肪酸(表 1),但是由于在传统光合自养条件下微藻较低的生长率及较小的细胞密度,因此用于商业生产的只有 *Arthrospira*, *Chlorella*, *Dunaliella salina* 以及 *Aphanizomenon flos-aquae* 等少数<sup>[17]</sup>。

## 3 微藻中脂质分类与脂肪酸组成

微藻中多不饱和脂肪酸主要以脂质的形式存在于细胞内。脂质可以分为中性脂与极性脂,其中中性脂以甘油三酯(TAG)为主,有少量的甘油二酯与甘油一酯;极性脂主要是糖脂(GL)与磷脂(PL),包括卵磷脂(PC)、溶血卵磷脂(LPC)、磷脂酰甘油(PG)、双磷脂酰甘油(DPG)、单半乳糖甘油二酯(MGDG)、双半

表 1 富含多不饱和脂肪酸的微藻  
Table 1 Microalgal strains rich in unsaturated fatty acids

微藻	PUFAs(%总脂肪酸)			参考文献
	DHA(22:6)	EPA(20:5)	AA(20:4)	
<i>Amphidinium carterae</i>	17.0	15.1	1.6	[18]
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	56.8	0.3	0	[19]
<i>Schizochytrium mangrovei</i>	39.1	0.5	0.6	[20]
<i>Thraustochytrium</i> sp.	25.9	0.5	0.9	[20]
<i>Schizochytrium</i> sp.	26.2	0.8	0.6	[20]
<i>Chlorella minutissima</i>	0	45.0	5.7	[21]
<i>Nannochloropsis</i> sp.	0	35.0	0	[22]
<i>Monodus subterraneus</i>	4.7	32.9	0	[23]
<i>Nitzschia laevis</i>	0	19.1	6.2	[24]
<i>Porphyridium cruentum</i>	0	19.7	17.2	[18]
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	6.5	10.8	9.2	[18]
<i>Schizochytrium aggregatum</i>	0	15.7	7.2	[18]
<i>Thraustochytrium aureum</i>	16.1	4.5	12.1	[18]

乳糖甘油二酯(DGDG)等, 其他脂质成分还有硫酸甘油糖脂(SQDG)、甜菜碱(BL)以及不明确的磷脂成分等。多不饱和脂肪酸的组成可能有  $C_{18:2}$ 、 $C_{18:3}(\omega-3, ALA)$ 、 $C_{18:3}(\omega-6, GLA)$ 、 $C_{20:4}(\omega-6, AA)$ 、 $C_{20:5}(\omega-3, EPA)$ 、 $C_{22:5}(\omega-6, DPA)$ 、 $C_{22:6}(\omega-3, DHA)$ 等。微藻中脂质组成及脂肪酸分布与含量因不同藻种及培养条件不同会有较大差异<sup>[25-27]</sup>。在对水产动物的生长与营养品质影响方面, 多不饱和脂肪酸的极性脂形式要比中性脂形式更有效, 但是极性脂的含量通常要比中性脂低很多。对于 EPA、DHA 在脂质中分布的了解, 有助于进一步研究环境条件对脂质代谢的影响, 从而通过改变环境条件(低温、氮抑制)增加 EPA、DHA 的产量, 同时为 EPA、DHA 的分离纯化提供依据。因此, 脂质组成及脂肪酸的分布信息对微藻在功能食品及水产饲料方面的应用是非常重要的<sup>[28-30]</sup>。为获得完整的脂质信息, 合适的萃取方法及分析技术是关键。目前萃取多用氯仿、丙酮、正己烷等溶剂洗脱, 这些试剂具有挥发性及不同程度的毒性, 对人体健康与环境不利; 分离鉴定大多采用薄层色谱(TLC)与气相色谱(GC)技术, 操作繁琐, 消耗较高, 因此减少萃取分离中有机溶剂的使用, 开发高效、安全环保的提取方法, 选择合适的分离鉴定技术也是目前研究的热点。下面就一些萃取及分离鉴定手段进行综述。

## 4 脂质及脂肪酸的萃取分离

对微藻细胞中脂质的提取, 常规的萃取技术主要有溶剂萃取(solvent extraction, SE)、加压液相萃取(pressurized liquid extraction, PLE)、亚临界流体萃取(subcritical fluid extraction, SFE)、超临界流体萃取(supercritical fluid extraction, SFE)、微波辅助萃取(microwave-assisted extraction, MAE)、超声辅助萃取(ultrasonic-assisted extraction, UAE)等, 其中溶剂萃取应用比较广泛。除了上述较为普遍的萃取技术, 还有一些新的萃取过程应用于微藻中脂质的提取, 如同时蒸馏萃取(simultaneous distillation extraction, SDE)湿藻体中的脂质<sup>[31]</sup>。

### 4.1 溶剂萃取

溶剂萃取是通过有机溶剂与藻体的充分接触(浸泡、喷淋), 使脂质溶解在溶剂中而被萃取出来。目前最常用的溶剂萃取方法主要有两种: 索氏提取法与 Bligh and Dyer 法<sup>[32-33]</sup>。萃取过程中常用的有机试剂有正己烷、甲醇、氯仿、乙醚、乙腈等。由于这些溶剂都有一定毒性, 且萃取后需要经旋转蒸发浓缩以回收脂质, 用量较大, 时间较长, 特别是氯仿虽然对脂质有非常好的溶解性, 但是有一定的致癌作用, 对人体健康及环保都是不利的, 在食品级成分的提

取中也有一定限制。

#### 4.2 加压液相萃取

加压液相萃取是有机液相溶剂在较高温度(50~200 °C)、较大压力(1450~2175 psi)条件下实现对组分的快速萃取分离<sup>[34]</sup>。高温可以降低溶剂的介电常数,从而降低溶剂的极性使其与脂质极性相接近,促进萃取的进行。高压有助于增加传质速率迫使溶剂更容易渗入藻细胞,提高萃取效率。这种萃取方法与传统的溶剂萃取相比,减少了溶剂的消耗量,提高了萃取率,并且以水或者公认安全的试剂(乙醇)做溶剂,可以用作食品级成分的提取。但是这种方法不适于高温下热不稳定组分的萃取<sup>[35-36]</sup>。

#### 4.3 超临界流体萃取

超临界流体萃取指超出临界温度与压力时,流体介于气态与液态之间,密度近于液体,粘度近于气体,且扩散性处于两相之间,即同时具有气体的扩散传质性能和液体的溶解性能。与传统萃取方法相比,超临界流体这种低粘度和相对较高的扩散性使其运输性优于液体,更容易扩散通过固态基质,提高萃取效率。另外,可以通过改变萃取压力或温度,改变流体密度,而密度是与溶解性相关的,溶解性能的改变导致溶剂萃取能力的改变。这些物理化学特性使得对藻体脂质的萃取率远高于普通的有机溶剂,尤其对于多不饱和脂肪酸等受热容易氧化裂解的成分分离具有明显优势。超临界流体萃取技术还可以与气相色谱、超临界流体色谱技术耦合使物质萃取、分离更高效<sup>[37]</sup>。

#### 4.4 亚临界流体萃取

亚临界流体萃取是溶剂在低于超临界条件处于亚临界状态下的萃取操作,与超临界萃取相比,对压

力的要求相对较低。亚临界水萃取(subcritical water extraction, SWE)是使高温水(100~374 °C, 374 °C为水的临界温度)在较高压力下(通常是10~60 bar)维持在液体状态,此时水的极性降低,对弱极性 & 非极性物质的溶解性增强,性质类似有机溶剂,可用于脂质的萃取。SWE不使用有机溶剂,绿色环保,而且可以对藻液直接处理不需要冷冻干燥,萃取速度较快,但是高温高压能耗比较大<sup>[37]</sup>。

#### 4.5 微波辅助萃取

微波辅助萃取是微波穿透基质时被吸收转换成热能,使细胞内分子加热蒸发产生高压,从而改变细胞壁的多孔性,强化有机溶剂渗透及萃取过程。这种萃取方法是从基质内部和外部同时加热,除可用于脂质的提取,更常用于抗氧化成分如多酚类、类胡萝卜素类的萃取。

#### 4.6 超声辅助萃取

超声辅助萃取是利用超声波的空化效应与热效应,当超声波强度足够大时会在液体中形成腔或微泡,这些微泡从声波中吸收能量一定条件下破裂产生冲击波,撞击细胞表面导致细胞分解,从而释放出细胞内成分,达到萃取目的。目前超声辅助萃取已应用于油脂、蛋白质、糖的萃取,萃取过程中需要对萃取温度、时间、超声频率进行优化。

以上常规萃取技术在微藻脂质萃取中的应用在下表中较详细列出(表2)。

#### 4.7 同时蒸馏萃取

同时蒸馏萃取是1964年由Likens和Nickerson发明的,集水蒸汽蒸馏与溶剂萃取的特点,广泛用于挥发性、半挥发性组分的分离提取。Tanzi等<sup>[33]</sup>用同

表2 不同萃取技术在微藻脂质与脂肪酸提取中的应用

Table 2 Different extraction technologies in the application of lipid and fatty acid extraction from microalgae

微藻	萃取技术	萃取条件	参考文献
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	SE	乙醇(96%,v/v), 正己烷:水	[38]
<i>Synechocystis</i> sp.	PLE	正己烷, 乙醇, 水, 50~200 , 20 min	[39]
<i>Nannochloropsis</i> sp.	SFE	超临界流体 CO <sub>2</sub> , 40°C, 55°C, 40, 55, 70 MPa, 6 h	[40]
<i>Arthrospira maxima</i>	SFE	超临界流体 CO <sub>2</sub> , 50°C, 60°C 与 250 bar, 350 bar, 乙醇(10 mol%)	[41]
<i>Spirulina platensis</i>	SFE	超临界流体 CO <sub>2</sub> , 40°C, 55°C, 25, 40, 55, 70 MPa, 4 h	[42]
<i>C. cohnii</i>	SFE	超临界流体 CO <sub>2</sub> , 323 K, 30 MPa, 3 h	[43]
<i>Nannochloris</i> sp.	SFE	亚临界流体正己烷:乙醇 (3:1, v/v), 90 , 1.5 MPa, 30 min	[44]
<i>N. oculata</i>	UAE	5%生物量, 30 min, 1000 W	[45]
Seaweed	MAE	120 °C, 0.5 h	[46]

时蒸馏萃取的方法, 以萜烯(对伞花烃、柠檬烯、蒎烯)做萃取溶剂, 萃取微藻 *N. oculata* 与 *D. salina* 中的脂质, 并结合薄层色谱与气相色谱技术分析了脂质分类及脂肪酸组成。

## 5 脂质及脂肪酸的分析技术

脂肪酸的定性定量一般可以不经预处理直接进样分析或者通过衍生化处理(甲酯化)后再分析。现代色谱技术如气相色谱、高压液相色谱、薄层色谱与光谱技术如拉曼光谱、红外光谱、紫外光谱以及核磁共振波谱、质谱等可有效地分离鉴定脂质与脂肪酸成分。薄层色谱方法常用于总脂的分离, 由于甘油三酯是脂肪酸的主要存在形式, 本文主要阐述甘油三酯及脂肪酸的分析技术。

### 5.1 全二维气相色谱法

气相色谱应用于脂肪酸分析基本取代了传统的分析方法, 由于甘油三酯沸点高、难挥发, 可以采用高温气相色谱柱测定<sup>[47]</sup>, 但是长链多不饱和脂肪酸高温下不稳定易裂解造成损失, 所以一般先甲酯化后再对脂肪酸甲酯(FAMES)进行分析。一维气相色谱(1D GC)灵敏度高, 定量准确, 但是大量结构相似化合物的存在使得一维分析十分复杂, 完全分离有一定难度, 多维色谱分离技术如全二维气相色谱(comprehensive two-dimensional gas chromatography, GC×GC)可以解决这一问题。它是把分离机制不同的两根色谱柱以串联方式结合, 中间是由起捕集、聚

焦、再传送作用的环形调制器连接成的二维色谱柱系统, 经第一根色谱柱分离出来的组分, 都需进入调制器先冷喷降温再以脉冲方式送到第二根色谱柱进一步地分离。第一根色谱柱一般采用液膜较厚的柱子, 第二根则使用内径较小的短柱子, 以使组分在第二维快速分离, 通常第二维的色谱峰峰宽为  $0.1\sim 0.5$  s<sup>[48-50]</sup>。全二维气相色谱分离原理及简易分离过程可在下图(图 1), 在一维上的一个谱峰经过第二根色谱柱后分离出三个组分。与一维色谱相比, 全二维气相色谱可以较好地避免组分重叠现象, 具有分辨率高、灵敏度好、峰容量大、分析更快速以及定性更有规律等优势。它的峰容量为两根色谱柱各自峰容量的乘积, 分辨率为两根柱各自分辨率平方和的平方根, 检测灵敏度比 1D GC 高约十几到几十倍。

飞行时间质谱(TOF-MS)采用高采集频率(最大可达 500 全谱图/s), 它可以很好地检测全二维气相色谱流出的信号, 是可以较好地与 GC×GC 匹配的质谱技术。全二维气相色谱-飞行时间质谱联用技术(GC×GC-TOF-MS)可以分离双键数目、位置以及双键的几何构型(顺式与反式)不同的脂肪酸, 有可能解决复杂样品的分离和结构鉴定。Gues 等<sup>[51]</sup>用 GC×GC 分析了青鱼油中的 FAMES, 得到依据双键的多少形成的二维结构谱图。在该图上随着双键数的增加, 第二维的保留明显增加。相同数目碳原子的脂肪酸形成了一个簇, 未知脂肪酸的碳原子和双键数可以从预测。Mondello 等<sup>[52]</sup>也用 GC×GC 分析了不同来源的天然动物脂肪和植物油, 比较了不同柱系统上脂肪

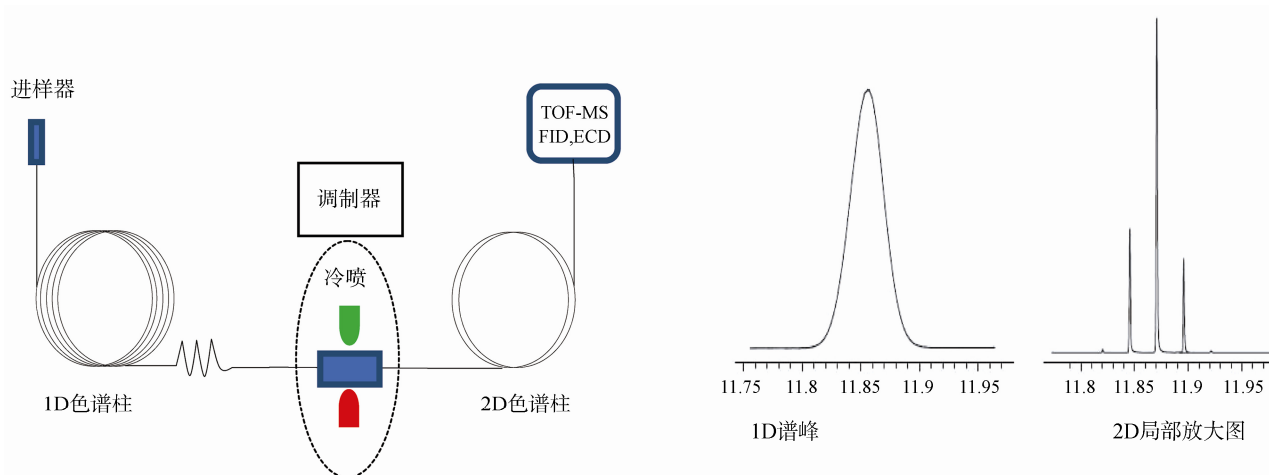


图 1 全二维气相色谱设计原理图与简易分离过程

Fig. 1 Scheme and simple separation process of GC × GC apparatus

酸甲酯的分离。Delmonte 等<sup>[53]</sup>通过 GC×GC 分离了在一维色谱中无法分离的脂肪酸。Gu 等<sup>[54]</sup>用 1D GC 与 GC×GC 比较分析了两种硅藻 *Cylindrotheca closterium* 和 *Seminavis robusta* 中脂肪酸的组成, 对于 *C. closterium*, C<sub>16:3</sub>、C<sub>16:4</sub>、C<sub>18:4</sub> 与 C<sub>22:5</sub> 只有在二维中被检出, 同样对于 *S. robusta*, C<sub>16:2</sub>、C<sub>16:3</sub> 与 C<sub>18:4</sub> 在一维也未检出而在二维中检测到。

## 5.2 高压液相色谱法

气相色谱与质谱联用通过测定 FAMES, 可以获得脂肪酸的结构组成及含量信息, 但是无法获得完整的脂质信息。高压液相色谱与质谱联用技术可实现常温 and 低温下脂质的有效分离鉴定, 不仅可以获得脂肪酸的组成信息, 还可以获得脂肪酸在 TAG 中位置分布的结构信息。在脂质营养的研究中认为, 脂肪酸在 TAG 中的位置分布, 决定其在体内的吸收代谢情况, Sn-2 位脂肪酸在人体内吸收利用率比 Sn-1(3) 位的脂肪酸高<sup>[55]</sup>。因此, 多不饱和脂肪酸在 TAG 中的位置分布影响其在人体内的吸收利用情况, 其与微藻油的营养价值相关。MacDougall 等<sup>[56]</sup>利用 UPLC-MS 分析了六种可以用作生产生物柴油的微藻 *Botryococcus braunii*, *N. gaditana*, *Neochloris oleabundans*, *Phaeodactylum tricornutum*, *P. aeruginosum* 与 *Scenedesmus obliquus* 的脂肪酸组成及在 TAG 中的分布, 同时对磷脂与糖脂也进行了测定。液相色谱不仅可以获得完整的脂质信息, 而且可以用来制备多不饱和脂肪酸。Mansour 等<sup>[57]</sup>利用制备型反相高压液相色谱对 *Scrippsiella* sp. 中的 EPA、DHA 等进行了制备性分离。

## 5.3 其他分析方法

气相色谱虽然应用普遍, 但是不适合热不稳定化合物的分离, 对多不饱和脂肪酸需进行甲酯化处理, 操作比较繁琐且不能获得完整的脂质信息; 液相色谱可以分离热敏性成分, 但是需用色谱级有机溶剂, 且溶剂使用量也较大, 成本较高。红外光谱也可用于脂质的分析, 但是只适于反式脂肪酸含量的测定。相对这些常规分析, 傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 与超临界流体色谱 (SFC) 的应用可以弥补红外光谱与气相、液相色谱的不足。FTIR 不仅可同时测定顺式与反式脂肪酸而且灵敏度较红外光谱大大提高, 扫描时间也大幅度减少。SFC (CO<sub>2</sub> 流体) 具有气相色谱的分离度, 且不使用溶剂, 其比高压液相色谱成本要低,

同时它是在略高于超临界温度的低温下使用, 适合多不饱和脂肪酸的分离。此外, 作为红外光谱的补充, 也有拉曼光谱应用于中性脂质的研究<sup>[58-59]</sup>。但是对于复杂脂质的分析, 仍需借助质谱、核磁共振波谱等准确确认结构。

## 6 结论

EPA、DHA、AA 等多不饱和脂肪酸是人体重要的脂肪酸, 作为重要的食品营养素补充剂与人类健康密切相关。微藻可以作为多不饱和脂肪酸的优质来源, 但是由于存在生物量及油脂产率低、提取纯化成本较高等问题使其工业化生产有一定困难。因此, 脂质及脂肪酸的高效萃取及快速检测手段对于微藻资源的开发利用是至关重要的。筛选及改造藻株、优化培养条件以获得高产多不饱和脂肪酸的藻株依然是研究重点。

## 参考文献

- [1] Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases [J]. *Exp Biol Med*, 2008, 233(6): 674-688.
- [2] Simopoulos AP. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease [J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2008, 17(S1): 131-134.
- [3] Innis SM. Dietary triacylglycerol structure and its role in infant nutrition [J]. *Adv Nutr: An Int Rev J*, 2011, 2(3): 275-283.
- [4] Serini S, Fasano E, Piccioni E, *et al.* Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and the paradox of their health benefits and potential harmful effects [J]. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24(12): 2093-2105.
- [5] Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain [J]. *Mol Neurobiol*, 2011, 44(2): 203-215.
- [6] Wen ZY, Chen F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae [J]. *Biotechnol Adv*, 2003, 21(4): 273-294.
- [7] Qi BX, Fraser T, Sam M, *et al.* Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(6): 739-745.
- [8] Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production [J]. *Biochimie*, 2004, 86(11): 807.
- [9] Ho SY, Jiang Y, Chen F. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) content of the fungus *Mortierella alpina* isolated from soil [J]. *J Agr Food Chem*, 2007, 55(10): 3960-3966.
- [10] Sijtsma L, De Swaaf M. Biotechnological production and applications of the  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic

- acid [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(2): 146–153.
- [11] Chen F, Zhang YM. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycoeyanin production using a fed-batch system [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1997, 20(3): 221–224.
- [12] Li HB, Fan KW, Chen F. Isolation and purification of canthaxanthin from the microalga *Chlorella zofingiensis* by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Separ Sci*, 2006, 29(5): 699–703.
- [13] Huang GH, Chen F, Wei D, *et al.* Biodiesel production by microalgal biotechnology [J]. *Appl Energ*, 2010, 87(1): 38–46.
- [14] Sun Z, Peng X F, Liu J, *et al.* Inhibitory effects of microalgal extracts on the formation of advanced glycation endproducts (AGEs) [J]. *Food Chem*, 2010, 120(1): 261–267.
- [15] Gill I, Valivety R. Polyunsaturated fatty acids, Part 1: Occurrence, biological activities and applications [J]. *Trend Biotechnol*, 1997, 15(10): 401.
- [16] Certik M, Shimizu S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production [J]. *J Biosci Bioeng*, 1999, 87(1): 1–14.
- [17] Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, *et al.* Commercial applications of microalgae [J]. *J Biosci Bioeng*, 2006, 101(2): 87–96.
- [18] Vazhappilly R, Chen F. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1998, 75(3): 393–397.
- [19] Jiang Y, Chen F. Effects of medium glucose concentration and pH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic *Cryptothecodinium cohnii* [J]. *Proc Biochem*, 2000, 35(10): 1205–1209.
- [20] Jiang Y, Fan KW, Tsz-Yeung Wong R, *et al.* Fatty acid composition and squalene content of the marine microalga *Schizochytrium mangrovei* [J]. *J Agr Food Chem*, 2004, 52(5): 1196–1200.
- [21] Seto A, Wang HL, Hesseltine CW. Culture conditions affect eicosapentaenoic acid content of *Chlorella minutissima* [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1984, 61(5): 892–894.
- [22] Sukenik A. Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp.(Eustigmatophyceae) [J]. *Bioresource Technol*, 1991, 35(3): 263–269.
- [23] Hu Q, Hu Z, Zvi C, *et al.* Enhancement of eicosapentaenoic acid (EPA) and  $\gamma$ -linolenic acid (GLA) production by manipulating algal density of outdoor cultures of *Monodus subterraneus* (Eustigmatophyta) and *Spirulina platensis* (Cyanobacteria) [J]. *Eur J Phycol*, 1997, 32(1): 81–86.
- [24] Wen ZY, Chen F. Production potential of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis* [J]. *Biotechnol Lett*, 2000, 22(9): 727–733.
- [25] Fan KW, Jiang Y, Faan YW, *et al.* Lipid characterization of mangrove *thraustochytrid-Schizochytrium mangrovei* [J]. *J Agr Food Chem*, 2007, 55(8): 2906–2910.
- [26] Chen GQ, Jiang Y, Chen F, *et al.* Salt-induced alterations in lipid composition of diatom *Nitzschia laevis* (bacillariophyceae) under heterotrophic culture condition [J]. *J Phycol*, 2008, 44(5): 1309–1314.
- [27] Ho SY, Chen F. Lipid Characterization of *Mortierella alpina* Grown at Different NaCl Concentrations [J]. *J Agr Food Chem*, 2008, 56(17): 7903–7909.
- [28] Meireles LA, Guedes AC, Malcata FX. Lipid class composition of the microalga *Pavlova lutheri*: eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids [J]. *J Agr Food Chem*, 2003, 51(8): 2237–2241.
- [29] Chen GQ, Jiang Y, Chen F. Fatty acid and lipid class composition of the eicosapentaenoic acid-producing microalga, *Nitzschia laevis* [J]. *Food Chem*, 2007, 104(4): 1580–1585.
- [30] Chen GQ, Jiang Y, Chen F. Variation of lipid class composition in *Nitzschia laevis* as a response to growth temperature change [J]. *Food Chem*, 2008, 109(1): 88–94.
- [31] Joana Gil-Chávez G, Villa JA, Fernando Ayala - Zavala J, *et al.* Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview [J]. *Compr Rev Food Sci Food Safe*, 2013, 12(1): 5–23.
- [32] Bligh E, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. *Can J Biochem Physiol*, 1959, 37(8): 911–917.
- [33] Tanzi CD, Vian MA, Chemat F. New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process [J]. *Bioresource Technol*, 2013, 134: 271–275.
- [34] Dobiáš P, Pavlíková P, Adam M, *et al.* Comparison of pressurised fluid and ultrasonic extraction methods for analysis of plant antioxidants and their antioxidant capacity [J]. *Cent Eur J Chem*, 2010, 8(1): 87–95.
- [35] Mulbry W, Kondrad S, Buyer J, *et al.* Optimization of an oil extraction process for algae from the treatment of manure effluent [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2009, 86(9): 909–915.
- [36] Ajila CM, Brar SK, Verma M, *et al.* Extraction and analysis of polyphenols: recent trends [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2011, 31(3): 227–249.
- [37] Herrero M, Cifuentes A, Ibanez E. Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review [J]. *Food Chem*, 2006, 98(1): 136–148.
- [38] Fajardo AR, Cerdan LE, Medina AR, *et al.* Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricorutum* [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2007, 109(2): 120–126.
- [39] Plaza M, Santoyo S, Jaime L, *et al.* Screening for bioactive compounds from algae [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(2): 450–455.
- [40] Andrich G, Nesti U, Venturi F, *et al.* Supercritical fluid extraction



- of bioactive lipids from the microalga *Nannochloropsis* sp. [J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2005, 107(6): 381–386.
- [41] Mendes RL, Reis AD, Palavra AF. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of  $\gamma$ -linolenic acid and other lipids from *Arthrospira (Spirulina) maxima*: Comparison with organic solvent extraction [J]. Food Chem, 2006, 99(1): 57–63.
- [42] Andrich G, Zinnai A, Nesti U, et al. Supercritical fluid extraction of oil from microalga *Spirulina (Arthrospira) platensis* [J]. Acta Aliment, 2006, 35(2): 195–203.
- [43] Couto RM, Simões PC, Reis A, et al. Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* [J]. Eng Life Sci, 2010, 10(2): 158–164.
- [44] 陈闽, 陈晓琳, 刘天中, 等. 不同亚临界溶剂从微拟球藻湿藻泥中提取油脂[J]. 过程工程学报, 2001, 11(3): 380–385.  
Chen M, Chen XL, Liu TZ, et al. Subcritical extraction of lipids from wet microalgae paste of *Nannochloropsis* sp. [J]. Chin J Process Eng, 2001, 11(3):380–385.
- [45] Adam F, Abert-Vian M, Peltier G, et al. “Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: a green, clean and scalable process [J]. Bioresource Technol, 2012, 114: 457–465.
- [46] Cravotto G, Boffa L, Mantegna S, et al. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves [J]. Ultrasonics Sonochem, 2008, 15(5): 898–902.
- [47] Paik MJ, Kim H, Lee J, et al. Separation of triacylglycerols and free fatty acids in microalgal lipids by solid-phase extraction for separate fatty acid profiling analysis by gas chromatography [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(31): 5917–5923.
- [48] Adahchour M, Beens J, Vreuls RJJ, et al. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC  $\times$  GC): I. Introduction and instrumental set-up [J]. Trend Anal Chem, 2006, 25(5): 438–454.
- [49] Adahchour M, Beens J, Vreuls RJJ, et al. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC  $\times$  GC): II. Modulation and detection [J]. Trend Anal Chem, 2006, 25(6): 540–553.
- [50] Adahchour M, Beens J, Vreuls RJJ, et al. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC  $\times$  GC): III. Applications for petrochemicals and organohalogenes [J]. Trend Anal Chem, 2006, 25(7): 726–741.
- [51] de Geus HJ, Aidos I, de Boer J, et al. Characterisation of fatty acids in biological oil samples using comprehensive multidimensional gas chromatography [J]. J Chromatogr A, 2001, 910(1): 95–103.
- [52] Mondello L, Casilli A, Tranchida PQ, et al. Detailed analysis and group-type separation of natural fats and oils using comprehensive two-dimensional gas chromatography [J]. J Chromatogr A, 2003, 1019(1): 187–196.
- [53] Delmonte P, Fardin-Kia AR, Rader JJ. Separation of fatty acid methyl esters by GC-online hydrogenation  $\times$  GC [J]. Anal Chem, 2013, 85(3): 1517–1524.
- [54] Gu Q, David F, Lynen F, et al. Evaluation of ionic liquid stationary phases for one dimensional gas chromatography-mass spectrometry and comprehensive two dimensional gas chromatographic analyses of fatty acids in marine biota [J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(20): 3056–3063.
- [55] Bracco U. Effect of triglyceride structure on fat absorption [J]. Am J Clin Nutr, 1994, 60(6): 1002s–1009s.
- [56] MacDougall KM, McNichol J, McGinn PJ, et al. Triacylglycerol profiling of microalgae strains for biofuel feedstock by liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 401(8): 2609–2616.
- [57] Mansour MP. Reversed-phase high-performance liquid chromatography purification of methyl esters of C<sub>16</sub>-C<sub>28</sub> polyunsaturated fatty acids in microalgae, including octacosaoctanoic acid [28:8(n-3)] [J]. J Chromatogr A, 2005, 1097(1): 54–58.
- [58] Huang YY, Beal C, Cai WW, et al. Micro-Raman spectroscopy of algae: Composition analysis and fluorescence background behavior [J]. Biotechnol bioeng, 2010, 105(5): 889–898.
- [59] Münchberg U, Wagner L, Spielberg ET, et al. Spatially resolved investigation of the oil composition in single intact hyphae of *Mortierella* spp. with micro-Raman spectroscopy [J]. BBA-Mol Cell Biol Lipids, 2013, 1831: 341–349.

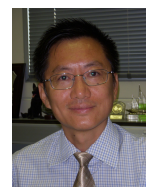
(责任编辑: 赵静)

## 作者简介



孙培培, 博士研究生, 主要研究方向为微藻生物工程。

E-mail: zixinsp@163.com



陈峰, 讲席教授, 主要研究方向为微藻生物工程与功能食品。

E-mail: sfchencoe@pku.edu.cn