

海洋赫氏颗石藻 (*Emiliana huxleyi*) 的脂质组成分析

张书苗, 高菁菁, 江寒瑞, 曾 珺, 李桂玲, 刘静雯

(集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 以海洋赫氏颗石藻 (*Emiliana huxleyi*) 为材料, 采用超高效液相色谱串联四极杆静电场轨道阱质谱 (ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole exactive mass spectrometry, UPLC-Q-Exactive-MS) 技术对其细胞总脂进行定性及相对定量分析。基于 UPLC-Q-Exactive-MS 一级质谱扫描及二级碎片信息扫描, 共鉴定出 4 大类 232 种脂质分子, 包括 54 种甘油磷脂 (26 PC, 13 PG, 5 PI, 4 PS, 2 PE, 2 PA, 2 CL)、142 种甘油酯 (21 DG, 94 TG, 27 MGDG)、20 种脂肪酰 (13 FA, 5 OAHFA, 2 WE) 和 16 种鞘脂 (11 Cer, 5 SPH), 它们分别占总脂的 55%、28%、15% 和 2%。分析表明, 赫氏颗石藻中含量最多的甘油磷脂为双磷脂酰甘油 (CL), 占总甘油磷脂的 36.69%; 甘油酯中三酰甘油 (TG) 的种类最丰富, 占总甘油酯的 32.20%; 脂肪酸多为 *n*-3 多不饱和脂肪酸, 其中 22:6*n*-3 (DHA) 的含量占总脂肪酸含量的 90.36%; 鞘脂中神经酰胺 (Cer) 含量高达 9.04 mg/g (干重), 其中 Cer 40:2 (isomer2) 为 6.28 mg/g (干重)。

[关键词] 海洋赫氏颗石藻; UPLC-Q-Exactive-MS; 脂质组学; 定性分析; 定量分析

[中图分类号] Q 932.7

Lipid Composition Analysis of Marine Microalgae *Emiliana huxleyi*

ZHANG Shumiao, GAO Jingjing, JIANG Hanrui, ZENG Jun, LI Guiling, LIU Jingwen

(College of Marine Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The total lipid of *Emiliana huxleyi* was analyzed by using ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole exactive mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive-MS) based on orbitrap, MS/MS fragmentation pattern, and lipid species were identified. A total of 232 lipid molecules classified into four major categories were identified, including 54 glycerophospholipids (26 PC, 13 PG, 5 PI, 4 PS, 2 PE, 2 PA, 2 CL), 142 glycerolipids (21 DG, 94 TG, 27 MGDG), 20 fatty aclys (13 FA, 5 OAHFA, 2 WE) and 16 sphingolipids (11 Cer, 5 SPH), which accounted for 55%, 28%, 15% and 2% of the total lipids, respectively. Cardiolipin (CL) is the most abundant lipid in *E. huxleyi*, accounting for 36.69% of the total glycerophospholipids. The most abundant glycerolipid was triglyceride (TG), accounting for 32.20% of the total glycerolipids. The fatty acids were mainly *n*-3 polyunsaturated fatty acids, and the content of 22:6*n*-3 (DHA) reached 90.36% of the total fatty acid. The sphingolipids ceramide content was 9.04 mg/g, of which Cer 40:2 (isomer2) reached 6.28 mg/g.

Keywords: *Emiliana huxleyi*; UPLC-Q-Exactive-MS; lipidomics; qualitative analysis; quantitative analysis

[收稿日期] 2024-01-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目“MicroRNA在海洋球石藻病毒重塑宿主脂代谢中的分子功能及网络调控机制”(42076086); 福建省自然科学基金项目“病毒诱导的microRNA在海洋球石藻(*Emiliana huxleyi*)细胞凋亡中的分子功能及网络调控机制”(2019J01696)

[作者简介] 通信作者: 刘静雯 (1965—), 教授, 博士, 从事海洋微生物资源开发利用研究, E-mail: ljwsbch@163.com。

0 引言

微藻富含蛋白质、多糖、脂质、色素等多种营养成分和生物活性物质, 具有极高的开发价值^[1]。目前, 微藻在医药^[2]、食品^[3]、化工^[4]和能源^[5]等各个领域的开发利用持续增长。微藻中的脂质主要分为中性脂和极性脂两大类, 中性脂主要由甘油三酯、固醇脂类及游离脂肪酸组成, 极性脂主要由磷脂和糖脂组成^[6]。由于大多数微藻富含动物需要的多不饱和脂肪酸, 其作为 EPA 和 DHA 生产的替代性原料已被广泛认可^[7-8]。随着全球经济的快速增长, 石油、煤炭和天然气等化石能源的消耗大幅度上升, 导致化石能源日益枯竭并引发严重的温室效应^[9]。微藻的生长速度快、周期短、经济效益高, 被认为是制备生物柴油燃料的理想原料^[10]。另外, 某些海洋微藻富含一些特殊结构的鞘脂, 如硅藻 (*Skeletonema costatum*) SKSPXS0711 和 SCXMBO2 中存在一些具有独特结构的二糖神经酰胺和三糖神经酰胺^[11]。与陆生动植物相比, 一些海洋生物如海星和海参中含有一个或多个单糖残基的脑苷脂, 这些特殊结构的鞘脂具有更高的生物学活性^[12]。鞘脂类物质在癌症治疗、医药保健品、功能性食品及高档护肤品等领域具有广阔的应用前景^[13]。

海洋颗石藻属于定鞭藻门, 是一类真核微型浮游植物, 其中, 赫氏颗石藻 (*Emiliania huxleyi*) 因具有形成“颗石粒”和高产二甲基硫化物的能力, 在调节海洋碳、硫生物地化循环及全球气候变化等领域备受关注^[14]。此外, 赫氏颗石藻还能够产生丰富的次级代谢产物^[15], 如 DHA、萜类^[16]、聚酮类^[17]及长链基中性脂^[18]等化合物。源自赫氏颗石藻细胞中的叶绿醇、棕榈酸和肉豆蔻酸等单体化合物在体外具有较强的抗菌和抗氧化活性^[19]。因此, 赫氏颗石藻作为一种新的海洋微藻脂质资源, 在医药、营养及能源领域都具有较好的应用前景。

微藻脂质组成的分析主要是采用各种色谱技术, 如液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 技术, 克服了气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 只适用于分析挥发性化合物、样品衍生化处理费时、消耗大量样品的缺点, 成为脂质分析的重要手段^[20]。随着脂质组学的发展, 脂质分析技术也不断改进, 与高效液相色谱 (HPLC) 相比, 超高效液相色谱 (UPLC) 的柱效、灵敏度、分离能力和速度都得到很大提高, 节省了分析时间和有机试剂的消耗^[21]。软电离技术的出现推进了电喷雾质谱法 (ESI-MS) 技术在脂质分析中的应用, 可获得丰富的化合物结构碎片信息, 结合四极杆静电场轨道阱高分辨质谱仪 (Q-Exactive), 可大大提高复杂样品中脂质结构鉴定的准确性^[22]。因此, 超高效液相色谱串联四极杆静电场轨道阱质谱 (UPLC-Q-Exactive-MS) 技术被广泛应用于微藻脂质分析^[23]、农产品脂质谱分析^[24]和发酵类食品的脂质成分监测^[25]等方面。本文以海洋赫氏颗石藻 BOF92 为材料, 基于 UPLC-Q-Exactive-MS 技术对其总脂进行定性及相对定量分析, 以获得尽可能完整的赫氏颗石藻总脂分子库及其分布信息, 为微藻脂质生物学功能研究及脂质活性物质开发奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

赫氏颗石藻 BOF92^[26]于 1990 年分离自北海 (48°N, 12°E), 由挪威贝尔根大学生物系 Gunnar Bratbak 教授赠送。脂质标准样品 (色谱纯): FFA (C16:0-d₃)、FFA (C18:0-d₃) 购自美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司; SM (d18:1/12:0)、TAG (15:0/15:0/15:0) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; LPC (19:0)、PC (19:0/19:0)、PE (15:0/15:0)、Cer (d18:1/16:0)、Cer (d18:1/18:0) 购自美国 Avanti Polar Lipids 公司; Cer (t18:0/16:0) 购自美国 Matreya LLC 公司。反向色谱柱 C8 (1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm) 购自美国 Waters 公司。甲醇、乙腈、乙酸铵、异丙醇和甲酸均为色谱纯。

1.2 实验方法

1.2.1 赫氏颗石藻培养

采用 f/2-si 培养基, 生长温度为 (18 ± 1) °C, 光照强度为 100 μmol/(m² · s), 光暗周期比为 14:10。以质量比为 1:10 的比例将赫氏颗石藻接种于新鲜培养基中通气培养, 离心 (8 000 r/min, 4 °C,

5 min) 收集指数生长期的藻细胞 (细胞密度约为 1×10^6 个/mL), 细胞沉淀冷冻干燥后制成藻粉, 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 用于后续脂质提取分析。

1.2.2 脂质提取

采用改良的 Bligh 和 Dyer 法^[27]提取细胞总脂。称取 5 mg 上述 1.2.1 收集的藻粉, 加入 300 μL 含有同位素内标 Cer ($\text{d}18:1/16:0$ ($\text{d}31$)) 的甲醇溶液和小钢珠, 于快速研磨仪中破碎细胞 (频率为 65 Hz, 每次 2.5 min, 共 3 次)。加入 600 μL 氯仿, 涡旋混匀后加入 250 μL 超纯水再次混匀, 室温静置 5 min, 12 000 r/min 离心分层 10 min。将下层氯仿相转移至 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取 250 μL 作为总脂样品, 经真空冷冻干燥机离心浓缩干燥 24 h, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.2.3 色谱分析

流动相 A 为 $V(\text{乙腈}):V(\text{超纯水})=6:4$, 流动相 B 为 $V(\text{异丙醇}):V(\text{乙腈})=9:1$, 两者均含有 10 mmol/L 的乙酸铵。柱温为 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样室温为 $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, 流速为 0.26 mL/min, 洗脱梯度程序为: 初始比例为 32% 的流动相 B 持续 1.5 min; 在 14 min 内线性增加到 85%, 再在 0.1 min 内从 85% 增加到 97%, 并保持 2.4 min; 在 0.1 min 内重新回到初始流动相比例并保持 1.9 min, 总运行时间为 20 min。

1.2.4 质谱分析

利用 UPLC-Q-Exactive-MS 系统对脂质种类及分子进行分离和鉴定。离子源为电喷雾离子源 (ESI), 鞘气流速为 55 arb, 辅助气流速为 12 arb, 喷雾电压为 3 kV, 毛细管电压为 3 kV, 干燥气体温度为 $265\text{ }^{\circ}\text{C}$, 毛细管电离电压为 2.5 kV, 质荷比 (m/z) 为 100 ~ 1 500。采取针泵自动进样, 进样室温为 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.5 基于 UPLC-Q-Exactive-MS 的总脂定性分析

在上述液相色谱和质谱条件下, 利用 UPLC-Q-Exactive-MS 系统在正、负离子模式下对赫氏颗石藻总脂组成及分子进行鉴定。其中: 鞘脂类如鞘氨醇 (SPH)、神经酰胺 (Cer) 和糖鞘脂 (GSL) 以 $[M+H]^+$ 形式检测; 脂肪酸类如脂肪酸 (FA) 和 (O-酰基)-1-羟基脂肪酸 (OAHFA) 以 $[M-H]^-$ 形式检测; 甘油磷脂类如磷脂酰胆碱 (PC) 和磷脂酰乙醇胺 (PE) 以 $[M+H]^+$ 形式检测; 心磷脂 (CL)、磷脂酸 (PA)、磷脂酰甘油 (PG)、磷脂酰肌醇 (PI)、磷脂酰丝氨酸 (PS) 皆以 $[M-H]^-$ 形式检测; 甘油脂类 (单半乳糖甘油二酯 (MGDG) 以 $[M+Na]^+$ 形式检测; 甘油二酯 (DG)、甘油三酯 (TG) 以 $[M+NH_4]^+$ 形式检测; 脂肪酯类 (WE) 以 $[M+NH_4]^+$ 形式检测。

为确保高分辨率, 在样品检测之前, 基于 LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org/>) 数据库计算每个脂质分子的精确质量分数 (精确至小数点后四位), 并确定每个脂质分子的保留时间, 以设置二级碎片扫描信息。一级质谱采用全扫描模式, 二级质谱在 dd. MS2 模式下进行质谱数据采集。在准确的质荷比 (m/z) 的基础上, 使用 LIPID MAPS 数据库及 LipidSearch、Xcalibur 软件 (Thermo, 美国), 根据串联质谱 (MS/MS) 的碎裂模式、保留时间及脂质种类对质谱结果进行数据采集。

1.2.6 基于 UPLC-Q-Exactive-MS 的总脂定量分析

使用 TraceFinder 软件 (Thermo, 美国) 对上述已鉴定的脂质分子进行定量分析, 其 m/z 耐受值为 $\pm 5 \times 10^{-9}$, 保留时间为 $\pm 15\text{ s}$ 。软件定量功能自动整合已采集的数据, 得到每种脂质分子的峰面积积分值, 并进行峰值检查和噪声消除以减少误差, 在进行统计分析之前, 将所有样品的峰面积归一化到总峰面积。利用外标法对神经酰胺含量进行绝对定量, 各种神经酰胺分子的绝对含量以每毫克藻细胞干重所含有该分子的干重表征 (mg/g), 每个峰的面积用内标和藻粉质量进行校正。

2 实验结果与分析

2.1 赫氏颗石藻脂质谱分析

在上述色谱与质谱条件下, 赫氏颗石藻细胞总脂提取物在反向色谱柱 C8 柱上得到了良好的分离 (见图 1)。由于采用的是反相色谱, 极性较强的物质先出峰, 碳原子数目少的、不饱和程度高的先流

出。由图 1 可见, 在正离子模式下 (图 1a), MGDG、DG、TG 的出峰时间主要集中在 4 ~ 14 min, PC、PE 的出峰时间主要集中在 5 ~ 10 min, SPH 的出峰时间集中在 1 ~ 2 min, Cer 的出峰时间则集中在 10 ~ 12 min; 在负离子模式下 (图 1b), FA 的出峰时间主要集中在 2 ~ 4 min, OAHFA 的出峰时间主要集中在 6 ~ 8 min, PG、PI、PS 和 PA 的出峰时间集中在 4 ~ 8 min, 2 种 CL 由于碳原子数目相差较大, 它们的出峰时间分别在 1 min 和 6 min。

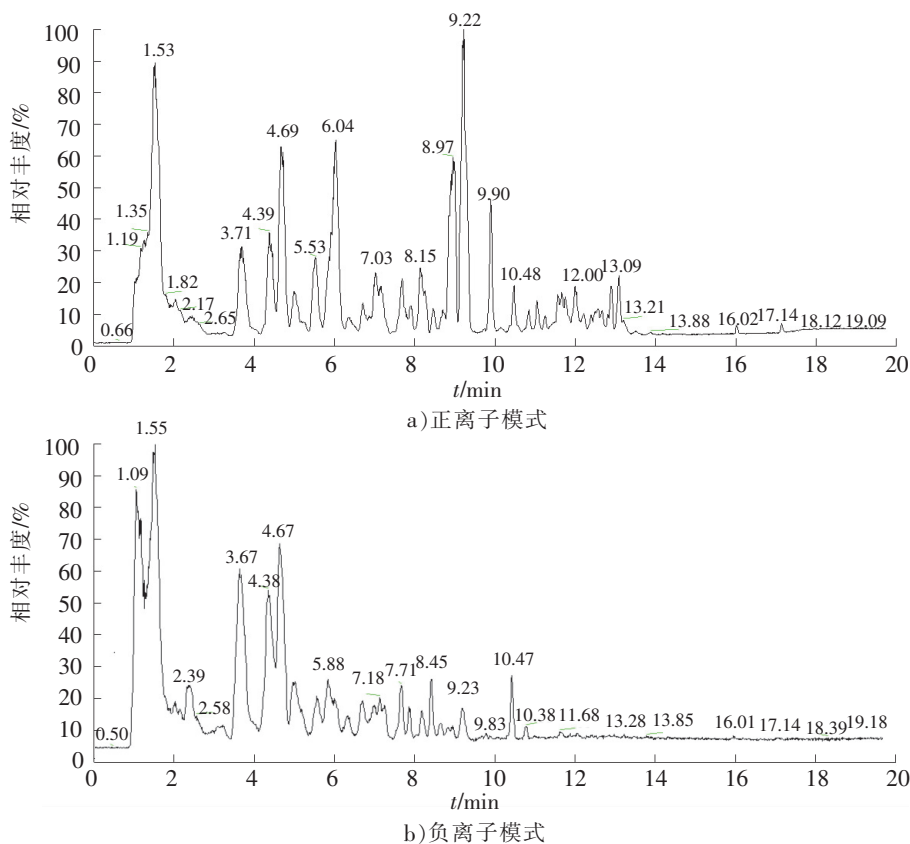


图 1 赫氏颗石藻细胞脂质粗提物的总离子流图

Fig.1 Total ion chromatogram of crude lipid extract from *E. huxleyi*

使用 UPLC-Q-Exactive-MS 技术在正、负离子模式下对赫氏颗石藻脂质分子进行一级质谱全扫描, 依据精确质量数、保留时间、二级质谱信息及 LIPID MAPS 数据库等信息, 确认每种分子的碳原子及不饱和键数目, 将它们表示为 C: N。基于 UPLC-Q-Exactive-MS 的检测灵敏度及检出限, 共获取了 474 个脂质离子, 正离子模式下鉴定出 8 种 188 个, 负离子模式下鉴定出 7 种 44 个共定量检测出 232 个脂类代谢物, 其中包括 54 种甘油磷脂 (26 PC, 13 PG, 5 PI, 4 PS, 2 PE, 2 PA, 2 CL)、16 种鞘脂 (11 Cer, 5 SPH)、142 种甘油酯 (21 DG, 94 TG, 27 MGDG) 和 20 种脂肪酸 (13 FA, 5 OAHFA, 2 WE) (见表 1)。可见, 赫氏颗石藻脂质主要由甘

表 1 正、负离子模式下赫氏颗石藻细胞的总脂组成

Tab. 1 Total lipid composition of *E. huxleyi* cells under positive and negative ion mode

脂质类别	离子模式	种类数量
三酰甘油 (TG)	+	94
单半乳糖甘油二酯 (MGDG)	+	27
磷脂酰胆碱 (PC)	+	26
二酰甘油 (DG)	+	21
神经酰胺 (Cer)	+	11
鞘氨醇 (SPH)	+	5
磷脂酰乙醇胺 (PE)	+	2
脂肪酯 (WE)	+	2
脂肪酸 (FA)	-	13
磷脂酰甘油 (PG)	-	13
磷脂酰肌醇 (PI)	-	5
(O-酰基)-1-羟基脂肪酸 (OAHFA)	-	5
磷脂酰丝氨酸 (PS)	-	4
磷脂酸 (PA)	-	2
心磷脂 (CL)	-	2

油磷脂、甘油脂、脂肪酸和鞘脂组成，其中，甘油磷脂含量最多，占总脂的 52%；鞘脂的含量最少，占总脂的 5%；甘油酯和脂肪酰各占总脂的 28% 和 15%。

2.2 脂肪酰成分分析

本研究共检测到 20 种具有不同质荷比的脂质分子（见表 2），其中 FA 13 种、OAHFA 5 种、WE 2 种，分别占总脂肪酰的 91.66%、4.55% 和 3.79%。检出的 13 种脂肪酸中包括：2 种饱和脂肪酸（SFA）FA（16:0）和 FA（18:0），占总脂肪酸的 0.92%；2 种单不饱和脂肪酸（MUFA）FA（16:1）和 FA（18:1），占总脂肪酸的 1.01%；9 种多不饱和脂肪酸（PUFA），占总脂肪酸的 98.1%，含量最多，其中 22:6n-3（DHA）的含量最为丰富，占总脂肪酸含量的 90.36%。共检出 5 种 OAHFA，占总脂肪酰的 4.55%，其中负离子模式下鉴定到的 OAHFA（18:2/22:2）含量最为丰富，质荷比（*m/z*）为 613.518 0。除此之外，WE 含量占总脂肪酰的 3.79%，在正离子模式下分别鉴定到 4:0/14:0 和 6:0/16:3 共 2 种 WE，质荷比（*m/z*）分别为 302.305 5 和 352.321 4。

表 2 赫氏颗石藻细胞中脂肪酰的组成
Tab. 2 Fatty acyls composition of *E. huxleyi* cells

脂质类型(C: N)	保留时间/min	分子式	组分	质荷比(<i>m/z</i>)
FA 16:0	3.02	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	FA(16:0) - H	255.233 0
FA 16:1	2.48	C ₁₆ H ₂₉ O ₂	FA(16:1) - H	253.217 3
FA 18:0	4.09	C ₁₈ H ₃₅ O ₂	FA(18:0) - H	283.264 3
FA 18:1	3.27	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	FA(18:1) - H	281.248 6
FA 18:2	2.64	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	FA(18:2) - H	279.233 0
FA 18:3	2.22	C ₁₈ H ₂₉ O ₂	FA(18:3) - H	277.217 3
FA 18:4	2.01	C ₁₈ H ₂₇ O ₂	FA(18:4) - H	275.201 7
FA 20:3	2.84	C ₂₀ H ₃₃ O ₂	FA(20:3) - H	305.248 6
FA 20:4	2.59	C ₂₀ H ₃₁ O ₂	FA(20:4) - H	303.233 0
FA 20:5	2.17	C ₂₀ H ₂₉ O ₂	FA(20:5) - H	301.217 3
FA 22:4	3.19	C ₂₂ H ₃₅ O ₂	FA(22:4) - H	331.264 3
FA 22:5	2.62	C ₂₂ H ₃₃ O ₂	FA(22:5) - H	329.248 6
FA 22:6	2.39	C ₂₂ H ₃₁ O ₂	FA(22:6) - H	327.233 0
OAHFA 36:3 (1)	6.29	C ₃₆ H ₆₆ O ₂	OAHFA(14:0/22:3) - H	559.471 8
OAHFA 36:3 (2)	6.74	C ₃₆ H ₆₆ O ₂	OAHFA(18:2/18:1) - H	559.471 2
OAHFA 40:4	8.68	C ₄₀ H ₇₂ O ₂	OAHFA(18:2/22:2) - H	613.518 0
OAHFA 40:5	7.72	C ₄₀ H ₇₀ O ₂	OAHFA(18:2/22:3) - H	611.502 7
OAHFA 40:6	7.35	C ₄₀ H ₆₈ O ₂	OAHFA(22:5/18:1) - H	609.486 6
WE 18:0	1.60	C ₁₈ H ₄₀ O ₂ N ₁	WE(4:0/14:0) + NH ₄	302.305 5
WE 22:3	1.95	C ₂₂ H ₄₂ O ₂ N ₁	WE(6:0/16:3) + NH ₄	352.321 4

2.3 甘油脂成分分析

本实验条件下检出的甘油脂共 142 种，包括 21 种 DG、94 种 TG、27 种 MGDG。MGDG 的含量最多，占总甘油脂的 57.58%。其中，MGDG（18:4/18:5）的丰度最高，质荷比（*m/z*）为 791.470 3；

其次为 MGDG (18:3/18:5) 和 MGDG (18:4/18:4), 质荷比 (m/z) 分别为 793.487 7 和 793.486 7。TG 的种类最丰富, 含量占总甘油酯的 32.20%, 其中 TG (16:0/18:1/22:6) 的含量最多, 质荷比 (m/z) 为 922.787 1。DG 的含量占总甘油酯的 10.21%, 主要有 DG (18:4/18:4) 和 DG (18:1/14:0) 等。

2.4 甘油磷脂成分分析

本研究共检出 54 种甘油磷脂, 正离子模式下检出 26 种 PC 和 2 种 PE, 分别占总甘油磷脂的 27.44% 和 1.18%, 含量较丰富的 PC 为 PC (16:1/20:5)、PC (22:6/22:6) 和 PC (16:0/22:6), 质荷比 (m/z) 分别为 778.539 7, 878.569 9, 806.569 4, PE (20:0/22:5) 和 PE (20:1/22:6) 的质荷比 (m/z) 分别为 822.602 9, 818.568 0。负离子模式下检出 13 种 PG、6 种 PI、4 种 PS、2 种 PA 和 2 种 CL, 其含量分别占总甘油磷脂的 27.38%, 2.23%, 4.22%, 0.86%, 36.69%。PG (22:5/22:6)、PI (16:1/14:0)、PS (22:6/21:0) 的质荷比 (m/z) 分别为 867.52 0, 779.468 0, 844.606 9。鉴定到的 2 种 PA (17:1/22:6) 和 PA (19:1/22:6) 质荷比 (m/z) 分别为 731.464 4, 759.4959, 2 种 CL (22:6/14:0/22:1/22:6) 和 CL (6:0/12:0/15:0/22:6) 的质荷比 (m/z) 分别为 774.504 4, 606.364 1。

2.5 鞘脂成分分析

赫氏颗石藻细胞中的鞘脂主要包括 Cer 和 SPH 2 种 (见表 3)。在正离子模式下共检出 11 种 Cer 和 5 种 SPH, 其结构多为带 2 个羟基 C18 碱基链和不带羟基的 C20 ~ C23 脂肪酸链, 含量最丰富的 Cer 为 Cer (d18:2/22:0), 质荷比 (m/z) 为 620.598 2。丰度最高的 SPH 为 SPH (d20:0) 和 SPH (t20:0), 质荷比 (m/z) 分别为 330.337 1, 346.332 4。

表 3 赫氏颗石藻细胞中鞘脂的组成
Tab. 3 Sphingolipid composition of *E. huxleyi* cells

脂质类型 (C: N)	保留时间/min	分子式	组分	质荷比 (m/z)
Cer 38: 0	11. 19	C ₃₈ H ₇₈ O ₃ N	Cer(d18: 0/20: 0) + H	596. 598 2
Cer 38: 1	11. 02	C ₃₈ H ₇₆ O ₃ N	Cer(d17: 1/21: 0) + H; Cer(d18: 1/20: 0) + H	594. 582 5
Cer 38: 2	10. 57	C ₃₈ H ₇₄ O ₃ N	Cer(d18: 2/20: 0) + H	592. 566 9
Cer 40: 0	11. 88	C ₄₀ H ₈₂ O ₃ N	Cer(d18: 0/22: 0) + H	624. 629 5
Cer 40: 1	11. 67	C ₄₀ H ₈₀ O ₃ N	Cer(d18: 1/22: 0) + H	622. 613 8
Cer 40: 2(isomer1)	11. 09	C ₄₀ H ₇₈ O ₃ N	Cer(d18: 1/22: 1) + H	620. 598 2
Cer 40: 2(isomer2)	11. 36	C ₄₀ H ₇₈ O ₃ N	Cer(d18: 2/22: 0) + H	620. 598 2
Cer 40: 3	10. 71	C ₄₀ H ₇₆ O ₃ N	Cer(d18: 2/22: 1) + H	618. 582 5
Cer 41: 1	12. 02	C ₄₁ H ₈₂ O ₃ N	Cer(d18: 1/23: 0) + H	636. 628 9
Cer 42: 1	12. 36	C ₄₂ H ₈₃ O ₃ N	Cer(d20: 0/16: 0) + H	650. 644 6
Cer 42: 2	12. 05	C ₄₂ H ₈₁ O ₃ N	Cer(d20: 1/18: 0) + H	648. 628 9
SPH 16: 0	1. 32	C ₁₆ H ₃₆ O ₃ N	SPH(t16: 0) + H	290. 269 3
SPH 18: 1	0. 20	C ₁₈ H ₃₈ ON	SPH(m18: 1) + H	284. 295 3
SPH 20: 0 (1)	1. 83	C ₂₀ H ₄₄ O ₂ N	SPH(d20: 0) + H	330. 337 1
SPH 20: 0 (2)	1. 88	C ₂₀ H ₄₄ O ₃ N	SPH(t20: 0) + H	346. 332 4
SPH 22: 0	2. 27	C ₂₂ H ₄₈ O ₂ N	SPH(d22: 0) + H	358. 368 4

赫氏颗石藻细胞中含有丰富的神经酰胺, 占鞘脂总量的 85% 以上, 因此, 进一步基于同位素内标 Cer (d18:1/16:0)、Cer (d18:1/18:0) 和 Cer (t18:0/16:0) 对各种神经酰胺进行了绝对定量分析。结果显示, 赫氏颗石藻细胞中神经酰胺的绝对含量高达 9.04 mg/g (干重), 其中 Cer 40:2 (isomer2) 的含量高达 6.28 mg/g (干重), Cer 42:1 的含量最少, 为 0.001 3 mg/g (干重) (见图 2)。

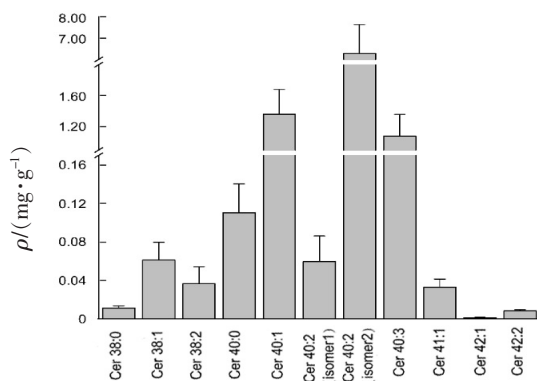


图 2 赫氏颗石藻细胞中神经酰胺的组成和含量
Fig.2 Ceramide composition and content of *E. huxleyi* determined

3 讨论

微藻脂质组成复杂多样, 对其定性分析有利于了解脂质分子、脂质亚类及整个脂质组成的含量变化, 相对定量分析有助于筛选应激条件下的脂质相应变化标志物, 绝对定量分析则有助于脂质代谢途径的构建和生物化学机制的剖析^[28]。通过对微藻进行脂质定性定量分析, 筛选富含脂质潜力的微藻种类, 可为微藻脂类可再生资源的开发提供理论参考。

3.1 赫氏颗石藻 BOF92 脂质与功能性食品

DHA 作为脂质营养成分被广泛添加在婴幼儿奶粉、健康食品和保健品中, 使其市场需求不断增加。海洋微藻是 DHA 的良好来源, 如隐甲藻、裂壶藻、破囊壶菌是目前生产 DHA 的主要藻株, 其中隐甲藻的 DHA 占多不饱和脂肪酸的 99% 以上, 成为可用于规模化生产 DHA 的优选材料^[7]。本研究采用超高效液相色谱串联技术从海洋赫氏颗石藻 BOF92 细胞中检测到丰富的二十二碳六烯酸 (DHA, 22:6n-3), 其含量占总脂肪酸含量的 90.36%, 占多不饱和脂肪酸的 99% 以上。基于亲水作用色谱-质谱联用技术 (HILIC: MS) 分析结果显示, 赫氏颗石藻 RCC 1250 细胞中多不饱和脂肪酸主要为 22:6n-3 (DHA, 17.2%) 和 18:4n-3 (SDA, 11.0%)^[29]; 采用高效薄层色谱法 (HPTLC) 及气相色谱-质谱法 (GC-MS) 联用技术, 检测赫氏颗石藻 BL21、DWN、VAN、92D、G1779、25J、SA 和 M181 等株系细胞中 DHA 含量, 发现其占总脂肪酸含量的 67.33% ~ 81.74%^[30]。可见, 赫氏颗石藻有望成为一种新型微藻资源用于不饱和脂肪酸的开发。

3.2 赫氏颗石藻 BOF92 作为能源微藻的潜力

微藻生物柴油可作为化石燃料的替代品, 成为第三代生物燃料的替代品^[31]。本研究结果显示, 野生型颗石藻 BOF92 细胞中含有 100 多种甘油酯类, 占总脂含量的 28%, 具有开发为产油微藻的潜力。另外, 研究发现, 病毒感染能够诱导赫氏颗石藻细胞甘油酯合成途径中相关酶基因的表达, 进一步促进三酰甘油 (脂滴, LDs) 的积累^[32-33]。可见, 某些生物胁迫能够通过改变脂质代谢途径而利于甘油酯的积累。除此之外, 营养胁迫如氮饥饿条件下, 筒柱藻 (*Cylindrotheca* sp.) MACC/B200 和三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin) 细胞中总脂含量能够分别达到干重的 28.9%^[34]或是野生型的 1.88 ~ 5.90 倍^[35]。随着微藻生物技术的快速发展, 通过基因改造重构细胞脂质代谢过程能够有效提高微藻细胞的油脂合成和积累。例如, 过表达苹果酸酶基因 *PtME* 通过促进三角褐指藻 (*P. tricornutum*) CCMP2561 丙酮酸代谢和碳固定, 相较于野生型藻株, 其细胞总脂含量增加了 2.5 倍, 占细胞干重的 57.8%^[36]。本课题组已初步建立了颗石藻 BOF92 遗传表达体系, 并通过过表达丝氨酸棕榈酰转移酶基因 *SPT*, 有效促进了鞘脂类物质的积累^[37]。针对富含甘油酯的颗石藻, 未来通过基因工程和代谢工程技术靶向改进细胞甘油酯代谢途径, 有望进一步提高该藻甘油酯的产量。

3.3 赫氏颗石藻 BOF92 中鞘脂类物质在医药领域的应用潜力

鞘脂是一类生物活性脂质, 在细胞生存和信号转导中起关键作用^[38]。近年来, 在海洋生物如海

参^[39]、骨条藻^[11]及假微型海链藻^[40]等细胞中陆续检测到一些新型结构的鞘脂类物质。与陆生生物相比,这些海洋生物来源的鞘脂结构明显不同,并且具有物种特异性,表现出较好生物学活性。如从海星和海参中分离的特异性神经节苷脂具有抗肿瘤和抗炎特性^[12]。赫氏颗石藻 BOF92 细胞中含有丰富的鞘脂类物质,特别是神经酰胺的绝对含量高达 9.04 mg/g (干重),占总鞘脂的 85.28%。而且,这些神经酰胺的长链鞘氨醇碱基主要为 d17:1、d18:0、d18:1、d18:2、d20:0 和 d20:1, *N*-酰基链 C 在 C₁₈ ~ C₂₂ 之间,主要以 C₂₂ 为主。类似地, Li 等^[11]采用 UPLC-Q-TOF-ESI MSE 技术从 11 株硅藻、3 株甲藻及 3 株定鞭藻中共检测到 27 种神经酰胺,其中在冠盘藻 (*Stephanodiscus* sp) 中检测到 5 种神经酰胺类物质,其含量为 9.38 mg/g (干重)。而且神经酰胺 *N*-酰基链的长度和羟基化程度在不同藻类中差别较大,硅藻 *N*-酰基链中碳原子数均为偶数,且不存在羟基化衍生物;甲藻 (*Alexandrium minutum*、*Prorocentrum donghaiense* 和 *Karlodinium veneficum*) 中含有一些碳原子数为奇数的羟基化脂肪酸链,而 C₂₂ 和 C₂₄ 的长链含羟基脂肪酸多存在于定鞭藻 (*Isochrysis galbana*、*I. zhanjiangensis* 和 *Pleurochrysis carterae*) 中。可见,冠盘藻和赫氏颗石藻 BOF92 细胞内含有较丰富的神经酰胺,且 *N*-酰基链为 C₂₂ 的神经酰胺多存在于定鞭藻门中。

鞘脂类物质具有复杂的结构,它们的核心是长链鞘氨醇碱基和长链脂肪酸,其精确结构决定了其特定功能,分子结构和组成的微小改变可能对鞘脂的关键生物学功能产生深远的影响^[41],因此,定鞭藻门鞘脂的这种较长 *N*-酰基链可能赋予其特定的功能。神经酰胺作为细胞中的第二信使分子,其含量甚微,但广泛参与细胞分化、信号转导、细胞自噬、凋亡及增殖等重要活动^[42]。最近,本实验室从海洋赫氏颗石藻 BOF92 中分离获得一种神经酰胺类单体化合物 Ehux-C22,初步研究发现,2 μmol/L Ehux-C22 处理小鼠 B16 黑色素瘤细胞后,能够通过诱导黑素体自噬显著抑制 B16 细胞黑色素水平,而且, Ehux-C22 诱导的 B16 细胞外泌体 miRNA 可以通过靶向人角质细胞 Hacat 中的腺苷酸环化酶 2 (ADCY2) 抑制角质细胞对黑素体的吞噬。基于神经酰胺的生理功能,食品及医药领域对天然神经酰胺产品的需求也在不断扩大。目前,天然神经酰胺产品的主要来源为植物源神经酰胺,其中大面积种植魔芋是神经酰胺产业化的主要来源,日本种植的魔芋中神经酰胺含量可达 0.15% ~ 0.20%^[43];周浩等^[44]从我国种植的 4 种不同魔芋中检测到神经酰胺粗品含量最高为 3.29 mg/g (干重),其中神经酰胺 Cer II 含量最高可达 43.8 μg/g (干重)。但魔芋对生长环境要求苛刻,栽培技术难度大,培育周期长,总体生产效率低下,经济成本高。因此,天然来源神经酰胺的产量低仍是制约神经酰胺活性物质开发的瓶颈。近年来,越来越多的研究聚焦在海洋资源开发利用上,但迄今为止,有关海洋生物鞘脂的相关报道相对较少,天然资源的局限性使其很难实现产业化。赫氏颗石藻 BOF92 细胞中的神经酰胺含量是魔芋的 2.75 倍,在生产神经酰胺类物质中具有很大潜力。

4 结论

本文基于 UPLC-Q-Exactive-MS 技术鉴定了赫氏颗石藻 BOF92 的总脂组成,并对其进行定性和定量分析,共鉴定出 232 种脂质分子,分为甘油磷脂、鞘脂、甘油酯和脂肪酸 4 大类。赫氏颗石藻 DHA 的含量占多不饱和脂肪酸的 99% 以上,未来可作为生产 DHA 的优良藻种。该藻株含有上百种甘油酯类,占总脂含量的 28%。另外,赫氏颗石藻细胞中神经酰胺的绝对含量高达 9.04 mg/g (干重)。因此,赫氏颗石藻细胞中丰富的脂质类物质在营养品、生物柴油、医药领域具有一定的应用潜力。

[参考文献]

- [1] 缪晓玲,吴庆余.微藻生物质可再生能源的开发利用[J].可再生能源,2003(3):13-16.
- [2] LAURITANO C, ANDERSEN J H, HANSEN E, et al. Bioactivity screening of microalgae for antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, anti-diabetes, and antibacterial activities[J]. Frontiers in Marine Science, 2016, 3:1-12.
- [3] SAINI R K, RAVISHANKAR G A, KEUM Y S. Microalgae and thraustochytrids are sustainable sources of vegan EPA and

- DHA with commercial feasibility[J]. Indian Journal of Microbiology, 2023, 63(1):1-4.
- [4] MOROCHO-JÁCOME A L, RUSCINC N, MARTINEZ R M, et al. Technological aspects of microalgae pigments for cosmetics[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104:9513-9522.
- [5] MATHUMATHY M, SUREKA S T, RASHMI V S S, et al. Screening of lipid production in marine cyanobacteria and microalgae grown in ossein effluent for biodiesel production[J]. Applied Ecology and Environmental Sciences, 2022, 10(2):38-43.
- [6] FAHY E, SUBRAMANIAM S, BROWN H A, et al. A comprehensive classification system for lipids[J]. Journal of lipid research, 2005, 46(5):839-861.
- [7] 贾文斌, 辛富刚, 孙玉霞, 等. 隐甲藻生产二十二碳六烯酸(DHA)的研究进展[J]. 中国农学通报, 2019, 35(30):84-90.
- [8] 唐传球, 甘莉, 刘心雨, 等. 原位甲酯法耦合 GC-MS 快速分析裂殖壶藻中 EPA 和 DHA 含量[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(5):166-169.
- [9] DONOHUE T J, COGDELL R J. Microorganisms and clean energy[J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4(11):800.
- [10] 李华, 王伟波, 刘永定, 等. 微藻生物柴油发展与产油微藻资源利用[J]. 可再生能源, 2011, 29(4):84-89.
- [11] LI Y R, LOU Y M, MU T, et al. Sphingolipids in marine microalgae: development and application of a mass spectrometric method for global structural characterization of ceramides and glycosphingolipids in three major phyla[J]. Analytica Chimica Acta, 2017, 986:82-94.
- [12] MALYARENKO T V, KICHA A A, STONIK V A, et al. Sphingolipids of asteroidea and holothuroidea: structures and biological activities[J]. Marine Drugs, 2021, 19(6):330.
- [13] 孙天玮, 徐婷, 董蕾, 等. 神经酰胺生物学功能和药理功能研究进展[J]. 湖北民族学院学报(医学版), 2008, 25(1):59-62.
- [14] TSUJI Y, YAMAZAKI M, SUZUKI I, et al. Quantitative analysis of carbon flow into photosynthetic products functioning as carbon storage in the marine coccolithophore, *Emiliania huxleyi*[J]. Marine Biotechnology, 2015, 17(4):428-440.
- [15] THØGERSEN M S, MELCHIORSEN J, INGHAM C, et al. A novel microbial culture chamber co-cultivation system to study algal-bacteria interactions using *Emiliania huxleyi* and *Phaeobacter inhibens* as model organisms[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9:1705.
- [16] KOTAJIMA T, SHIRAIWA Y, SUZUKI I. Functional screening of a novel $\Delta 15$ fatty acid desaturase from the coccolithophorid *Emiliania huxleyi*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2014, 1841(10):1451-1458.
- [17] ZHENG Y S, DILLON J T, ZHANG Y F, et al. Discovery of alkenones with variable methylene-interrupted double bonds: implications for the biosynthetic pathway[J]. Journal of Phycology, 2016, 52(6):1037-1050.
- [18] NAKAMURA H, SAWADA K, ARAIE H, et al. *n*-nonacosadienes from the marine haptophytes *Emiliania huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica*[J]. Phytochemistry, 2015, 111:107-113.
- [19] 刘静雯, 吴书燕, 马亚瑞, 等. 海洋球石藻(*Emiliania huxleyi*) 活性物质分离鉴定及其抗菌抗氧化性能研究[J]. 海洋与湖沼, 2021, 52(5):1180-1190.
- [20] PETERSON B L, CUMMINGS B S. A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples[J]. Biomedical Chromatography BMC, 2010, 20(3):227-243.
- [21] RAINVILLE P D, STUMPF C L, SHOCKCOR J P, et al. Novel application of reversed-phase UPLC-*oa*TOF-MS for lipid analysis in complex biological mixtures: a new tool for lipidomics[J]. Journal of Proteome Research, 2007, 6(2):552-558.
- [22] 王勇, 张宪臣, 华洪波, 等. 超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱联用快速测定水产品及其干制水产品制品中的 116 种农药和 24 种生物毒素残留[J]. 现代食品科技, 2022, 38(1):371-389, 335.
- [23] ORELLANA G, VAN MEULEBROEK L, DE RIJCKE M, et al. High resolution mass spectrometry-based screening reveals lipophilic toxins in multiple trophic levels from the North Sea[J]. Harmful Algae, 2017, 64:30-41.
- [24] WANG P, ZHONG L L, YANG H B, et al. Comprehensive comparative analysis of lipid profile in dried and fresh walnut kernels by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS[J]. Food Chemistry, 2022, 386:132706.
- [25] LIU Q Y, LIN J J, ZHAO W H, et al. The dynamic changes of flavors and UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS based lipidomics in mackerel (*Scomberomorus niphonius*) during dry-cured processing[J]. Food Research International, 2023, 163:112273.

- [26] CASTBERG T, THYRHAUG R, LARSEN A, et al. Isolation and characterization of a virus that infects *Emiliania huxleyi* (Haptophyta) [J]. *Journal of Phycology*, 2002, 38(4): 767-774.
- [27] 魏东, 袁显渊, 向文洲. 微藻总脂含量快速测定的方法比较[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(7): 242-246.
- [28] 杨森, 孟迎迎, 褚亚东, 等. 基于液质联用的莱茵衣藻极性甘油酯组定性定量分析[J]. *植物学报*, 2018, 53(6): 812-828.
- [29] AVEIRO S S, MELO T, FIGUEIREDO A, et al. The polar lipidome of cultured *Emiliania huxleyi*: a source of bioactive lipids with relevance for biotechnological applications[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(10): 1434.
- [30] POND D W, HARRIS R P. The lipid composition of the coccolithophore *Emiliania huxleyi* and its possible ecophysiological significance[J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1996, 76(3): 579-594.
- [31] POOYA M N, MEISAM T, MORTAZA A, et al. Metabolic engineering of microalgae for biofuel production[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2020, 1980: 153-172.
- [32] ZHANG E Q, GAO J J, WEI Z H, et al. MicroRNA-mediated regulation of lipid metabolism in virus-infected *Emiliania huxleyi* [J]. *The ISME Journal*, 2022, 16(11): 2457-2466.
- [33] SERGEY M, CARMIT Z, SHILO R, et al. Viral infection of the marine alga *Emiliania huxleyi* triggers lipidome remodeling and induces the production of highly saturated triacylglycerol[J]. *The New Phytologist*, 2016, 210(1): 88-96.
- [34] 梁英, 孟祥荣, 孙明辉, 等. 氮磷饥饿时间对筒柱藻生长及总脂含量的影响[J]. *水产科学*, 2017, 36(3): 249-358.
- [35] 赵佩佩, 顾文辉, 伍松翠, 等. 氮限制有利于三角褐指藻脂积累[J]. *科学通报*, 2015, 60(23): 2196-2211.
- [36] XUE J, NIU Y F, HUANG T, et al. Genetic improvement of the microalga *Phaeodactylum ricornutum* for boosting neutral lipid accumulation[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 27: 1-9.
- [37] CAI W C, WANG X, SU J J, et al. Transformation of coccolithophorid *Emiliania huxleyi* harboring a marine virus (Coccolithoviruses) serine palmitoyltransferase (SPT) gene by electroporation[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2021, 39: 693-704.
- [38] IESSI E, MARCONI M, MANGANELLI V, et al. On the role of sphingolipids in cell survival and death[J]. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2020, 351: 149-195.
- [39] 董喆, 丁宁, 崔洁, 等. 海参脑苷脂及神经酰胺对小鼠高尿酸血症的改善作用[J]. *中国海洋药物*, 2013, 32(6): 65-71.
- [40] 黄莉莉, 陈文笔, 李艳荣, 等. 营养盐对假微型海链藻中鞘脂合成的影响[J]. *宁波大学学报(理工版)*, 2016, 29(3): 23-28.
- [41] MU J M, LAM M S, SHUI G H. Emerging roles and therapeutic potentials of sphingolipids in pathophysiology: emphasis on fatty acyl heterogeneity[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2023, 51(3): 268-278.
- [42] ALIZADEH J, DA SILVA ROSA S C, WENG X H, et al. Ceramides and ceramide synthases in cancer: focus on apoptosis and autophagy[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2023, 102(3): 151337.
- [43] 蒲云峰, 张伟敏, 钟耕. 神经酰胺功能和应用[J]. *粮食与油脂*, 2005(7): 14-16.
- [44] 周浩, 王健, 聂旭, 等. 四种魔芋中神经酰胺含量比较研究[J]. *化学与生物工程*, 2013, 30(4): 83-85.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)