

几种小球藻油脂含量检测方法的比较及优化

丛峰^{1,2}, 孙雪^{1,2}, 徐年军^{1,2*}

(1. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211;
2. 宁波大学 海洋学院海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 用 Bligh-Dyer 重量法、香草醛比色法和尼罗红染色法对蛋白核小球藻油脂含量进行了检测, 结果表明: 3种检测法中重量法结果准确, 但灵敏度较低, 最低检测量为 100 mg; 香草醛比色法和尼罗红染色法简便且灵敏度高, 实验中香草醛染色法最低检测量为 10 mg, 优化的香草醛比色法可直接检测藻粉, 最低检测限为 0.5~3.0 mg. 尼罗红染色法可直接检测藻液, 最低检测限为 200 μL 小球藻含量为 0.058 8~0.588 0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的藻液. 最后建立了以香草醛比色法为主的油脂含量检测方法, 和尼罗红染色法相结合可定量测定微量小球藻样品.

关键词: 小球藻; 油脂检测; 香草醛比色法; 尼罗红染色法

中图分类号: Q543

文献标识码: A

文章编号: 1001-5132 (2012) 01-0020-04

作为新一代生物柴油原料, 海洋微藻具有很多优势: 光合效率高, 含油量高, 生产周期短, 单位面积产率比高等植物高数十倍^[1]. 微藻能利用海水和盐碱水培养, 能耐受沙漠、干旱地等极端环境, 不与粮食作物争地^[2]. 微藻可利用废水中的氮、磷等营养, 既能降低水体富营养化又能降低培养成本^[3], 同时能吸收工农业生产中排放的 CO_2 . 微藻的化学成分可以通过环境条件的改变加以调节, 从而提高含油量^[4]. 目前微藻制备生物柴油的主要限制因素是原料供应和制备成本过高, 但未来 10~15 年通过技术革新有望实现微藻制备生物柴油的产业化生产^[5-6].

小球藻(*Chlorella*)是一种油脂含量较高的微藻, 作为生物柴油的原料已逐渐成为研究热点. 利用小球藻生产生物柴油的常见问题是小球藻中微量油脂含量的测定, 目前常见的方法有重量法^[7]、香草醛比色法^[8]、尼罗红染色法^[9]等, 但未见文献对这几种方法进行比较研究. 笔者以蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)为材料, 对其进行油脂提取和含量测定方法的优化, 以期微藻生物能源的研究提供快捷的检测方法.

1 材料和方法

1.1 实验材料

蛋白核小球藻由宁波大学海洋生物工程重点实验室提供. 实验取对数生长期采收的同一批藻粉. 香草醛试剂购于上海梯希爱化成工业发展有限公司. 尼罗红($0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)购于上海杰美基因医药科技有限公司, 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存.

1.2 实验方法

1.2.1 藻粉的制备

量取 5 000 mL OD_{460} 为 0.542 的小球藻藻液, 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 8 min 后收集藻泥, 冷冻干燥 24 h 得小球藻藻粉, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱低温保存备用.

1.2.2 总脂的重量法测定

采用 Bligh-Dyer 法测定^[7]: 精确称取 100 mg 小球藻藻粉, 加入 10 mL 玻璃离心管中, 加 7.6 mL 氯仿/甲醇/ H_2O 提取液(1:2:0.8), 均匀混合, 振荡 2 min, 超声提取 5 min, 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 8 min, 上层提取液倒入 125 mL 分液漏斗中, 下层藻粉残渣再抽提 1 次, 合并 2 次上层液于 125 mL 分液漏斗中. 向分液漏斗中加入 4 mL 氯仿使氯仿与甲醇和

收稿日期: 2011-07-11.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 浙江省科技厅公益性研究项目(2010C33066); 浙江省创新团队项目(2009R50012-6); 宁波市科技攻关项目(2010C10022); 宁波市科技局国际合作项目(2010C10022).

第一作者: 丛峰(1987-), 男, 山东威海人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 微藻生物能源. E-mail: fenger19871221@126.com

通讯作者: 徐年军(1973-), 男, 湖北赤壁人, 博士/研究员, 主要研究方向: 海藻生物资源利用等. E-mail: xunianjun@nbu.edu.cn

水的比例为2:2:0.8,振荡30 s,加4 mL水使得氯仿/甲醇/H₂O变成2:2:1.8,振荡30 s,静置2 h分层,放出下面氯仿层,旋转蒸发至恒重,称取蒸干前后蒸发瓶重量差,即为待测样品的总油脂量。

1.2.3 总脂的简化重量法测定

精确称取100 mg小球藻藻粉,加入50 mL玻璃离心管中,用30 mL氯仿:甲醇2:1(v/v)混合溶液充分抽提。加10 mL蒸馏水,剧烈振荡,离心分层。提取残渣重复提取1次,合并2次提取液,取氯仿层旋转蒸发仪蒸干。蒸干后蒸发瓶重量减去空蒸发瓶重量即为待测样品的总脂量。

1.2.4 总脂的香草醛比色法测定^[8]

提取小球藻总脂,分别配制油脂含量为0.1 mg·mL⁻¹、0.2 mg·mL⁻¹、0.5 mg·mL⁻¹、1.0 mg·mL⁻¹、2.0 mg·mL⁻¹、5.0 mg·mL⁻¹的氯仿溶液,取0.1 mL上述溶液,加0.5 mL浓硫酸,混匀,100 °C水浴10 min,冷却至室温,加1.978 mg·mL⁻¹香草醛磷酸试剂2.5 mL,混匀,反应2 h,在528 nm下进行比色。绘制不同油脂含量与OD₅₂₈相关的标准曲线,另取3份10 mg小球藻藻粉提取后用同法进行测定^[10]。

1.2.5 藻粉直接香草醛比色法测定

称取0.5 mg、1.0 mg、1.5 mg、2.0 mg、2.5 mg、3.0 mg小球藻藻粉,加1.0 mL浓硫酸,混匀,100 °C水浴10 min,冷却至室温,加1.978 mg·mL⁻¹香草醛磷酸试剂5 mL,混匀,反应2 h,在528 nm下进行比色。根据OD₅₂₈和小球藻藻粉重量制作标准曲线。另称取3份1.8 mg小球藻藻粉用同种方法进行测定,根据标准曲线计算出小球藻总脂含量。

1.2.6 总脂尼罗红染色法测定^[10]

干藻粉配制浓度为0.2 mg·mL⁻¹、0.5 mg·mL⁻¹、1.0 mg·mL⁻¹、2.0 mg·mL⁻¹、5.0 mg·mL⁻¹、10.0 mg·mL⁻¹的小球藻溶液,另配制3份1.5 mg·mL⁻¹的小球藻溶液作为待测液。取96孔荧光板,每孔加入200 μL藻液和2 μL尼罗红染料(0.1 mg·mL⁻¹),反应7 min,荧光酶标仪540 nm光激发下,检测580 nm处的荧光强度,扣除未染色藻液与尼罗红染料在该波长处的荧光强度。根据标准曲线计算出待测样品的油脂含量。

1.2.7 湿样油脂含量测定

配制浓度为0.058 8 mg·mL⁻¹、0.117 6 mg·mL⁻¹、0.235 2 mg·mL⁻¹、3.528 0 mg·mL⁻¹、0.470 4 mg·mL⁻¹、

0.588 0 mg·mL⁻¹的小球藻藻液作为标准样品,取3份浓度为0.294 mg·mL⁻¹的藻液作为待测样品。将藻液稀释3倍,取96孔荧光板,每孔加入200 μL藻液和2 μL尼罗红染料(0.1 mg·mL⁻¹),反应7 min,荧光酶标仪540 nm光激发下,检测580 nm处的荧光强度,扣除未染色藻液于尼罗红染料在该波长处的荧光强度。根据标准样品作标准曲线,然后计算出待测样品的油脂含量。

2 结果

2.1 总脂的Bligh-Dyer重量法测定

运用Bligh-Dyer法最终从3份100 mg的小球藻藻粉中分别得到0.0130 g、0.012 6 g、0.0134 g油脂,即小球藻的油脂含量分别为13.0%、12.6%、13.4%,平均值为(13.0±0.4)%。

2.2 总脂的简化重量法测定

根据简化重量法从3份100 mg的藻粉中提取的油脂量分别为0.012 5 g、0.012 4 g、0.013 0 g,所以油脂含量分别为12.5%、12.4%、13.0%,平均值为(12.630±0.321)%。

2.3 香草醛比色法测定

根据实验数据(表1)得到如下的标准曲线:

$$y = 0.248 4x + 0.048, R^2 = 0.986 6.$$

用同样的方法测定3份待测样品的OD₅₂₈分别为0.591、0.623、0.634,由标准曲线得样品中油脂含量为(2.287±0.090) mg·mL⁻¹,最终求得小球藻的油脂含量为(12.58±0.495)%。

2.4 藻粉直接香草醛比色法测定

以小球藻的油脂含量为13.0%计算,标准样品的油脂质量见表2。根据表2数据得到标准曲线为:

$$y = 5.824 6x + 0.095 7, R^2 = 0.997 0,$$

其中, x 为油脂质量(mg), y 为OD₅₂₈值。

用同样的方法测定3份待测藻粉的OD₅₂₈分别为1.402、1.429、1.384,由标准曲线得待测样品的油脂质量为(0.224 8±0.004) mg,计算出待测小球藻油脂含量为(12.49±0.215)%。

2.5 干藻粉样品的尼罗红染色法

以小球藻的油脂含量为13%计算,标准样品对应的油脂含量见表3。由表3得到的标准曲线为:

$$y = 0.310 2x + 0.119 8, R^2 = 0.793 9,$$

其中, x 为油脂含量(mg·mL⁻¹), y 为荧光强度。

表1 各标准样品油脂含量及 OD 值

	1	2	3	4	5	6
浓度/(mg·mL ⁻¹)	5.0	2.0	1.0	0.5	0.2	0.1
OD ₅₂₈	1.251±0.072	0.652±0.075	0.296±0.011	0.148±0.012	0.078±0.019	0.049±0.004

表2 各标准样品油脂重量及 OD 值

	1	2	3	4	5	6
藻粉重量/mg	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
油脂重量/mg	0.065	0.130	0.195	0.260	0.325	0.390
OD ₅₂₈	0.524±0.077	0.820±0.078	1.182±0.012	1.635±0.077	1.971±0.063	2.393±0.119

表3 各标准样品油脂含量及 OD 值

	1	2	3	4	5	6
藻粉含量/(mg·mL ⁻¹)	0.2	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0
油脂含量/(mg·mL ⁻¹)	0.026	0.065	0.130	0.260	0.650	1.30
OD ₅₈₀	0.027 1±0.012	0.109 4±0.034	0.170 7±0.023	0.297 9±0.009	0.401 7±0.020	0.465 9±0.053

表4 各标准样品中的油脂及 OD 值

	1	2	3	4	5	6
藻含量/(mg·mL ⁻¹)	0.058 8	0.117 6	0.235 2	0.352 8	0.470 4	0.588 0
油脂含量/(mg·mL ⁻¹)	0.007 644	0.015 288	0.030 576	0.045 864	0.061 152	0.076 440
OD ₅₈₀	0.085 7±0.004	0.108 5±0.024	0.131 9±0.009	0.153 9±0.010	0.164 0±0.019	0.185 9±0.025

3 份待测液中油脂与尼罗红反应的荧光强度分别为 0.198 5、0.226 6、0.259 8, 根据标准曲线得待测液油脂含量为(0.349 8±0.099) mg·mL⁻¹, 求出小球藻油脂含量为(23.32±6.595)%. 与重量法测定结果比较, 差异显著($P > 0.05$).

2.6 湿藻粉样品的尼罗红染色法

由表 4 数据得到标准曲线为:

$$y = 1.369 6x + 0.084 2, R^2 = 0.971 2,$$

其中, x 为样品的油脂含量(mg·mL⁻¹), y 为荧光强度.

测得 3 份待测液与尼罗红反应的荧光强度分别为 0.131 5、0.138 7、0.133 6, 根据标准曲线得待测液油脂含量为(0.036 8±0.003) mg·mL⁻¹, 待测液藻含量为 0.294 mg·mL⁻¹, 因此求得小球藻油脂含量为(12.52±0.921)%.

3 讨论

Bligh-Dyer 法是测定小球藻油脂含量最经典的方法, 其结果稳定, 但实验方法比较繁琐需多次提取. 简化重量法对提取步骤进行了优化, 2 种方法测定的结果分别为 13.0%和 12.6%, 差异不显著($P < 0.01$), 由此可见, 简化重量法是可行的. 这 2 种方法都是先提取油脂后直接称重, 目前重量法

是最科学的油脂检测方法, 虽然能够得到稳定的结果但测定需要的样品量较大(100 mg 左右), 在实际检测中很难用于微量样品的油脂含量检测.

香草醛比色法具有快速微量检测的特点, 实验中只用少量的样品(10 mg 左右)就可以检测小球藻的油脂含量. 由标准曲线和最终结果可以看出香草醛比色法检测小球藻油脂含量是可行的, 但此方法要先将油脂从小球藻中提取之后才可进行检测, 实验过程比较繁琐, 不方便大量样品的检测. 笔者对香草醛比色法进行了优化, 优化方法中省去了提取油脂的步骤, 直接称取藻粉进行检测, 从实验结果可知, 优化后的香草醛比色法也可以进行小球藻油脂含量的检测. 相比之下, 优化后的香草醛比色法更加简便、灵敏, 同时也能达到微量检测的目的(0.5~3.0 mg).

尼罗红染色剂是一种亲脂性的恶嗪类荧光染料, 能进入细胞与胞内中性脂结合并发出荧光检测信号, 其强度与细胞的中性脂含量呈线性关系. 因此, 检测藻液与尼罗红混合物的荧光强度再减去藻液和尼罗红各自的荧光强度所得的值与藻液油脂的含量成线性关系, 利用该原理能测定小球藻的油脂含量. Liu 等^[10]报道尼罗红染色后的小球

藻在 480 nm 光激发下, 580 nm 的荧光峰的强度与其总油脂含量呈线性相关. 实验中用尼罗红染色法对小球藻干样和湿样进行了油脂含量的检测. 与重量法与香草醛比色法相比, 尼罗红染色法更加快速灵敏, 但干样在尼罗红染色法中无法使藻粉均匀分散在水中从而导致实验结果误差很大, 湿藻尼罗红染色法($0.0588 \sim 0.5880 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)可以用于香草醛比色法的校正.

从实验可知, 小球藻油脂含量的重量法测定结果比较准确, 以香草醛比色法为主, 结合尼罗红染色法进行微藻样品的油脂检测得到的数据灵敏度好、可信度高, 能较准确地反应小球藻等能源微藻的油脂积累情况.

参考文献:

- [1] Chisti Y. Biodiesel from microalgae[J]. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(3):294-306.
- [2] 黄冠华, 陈峰. 环境因子对异养小球藻脂肪酸组分含量和脂肪总酸产量的影响[J]. *可再生能源*, 2009, 27(3): 65-69.
- [3] Wang B, Li Y, Wu N, et al. CO₂ bio-mitigation using microalgae[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79(5):707-718.
- [4] Courchesne N M D, Parisien A, Wang B, et al. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches [J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, 141:31-41.
- [5] Wijffels R H, Barbosa M J. An outlook on microalgal biofuels[J]. *Science*, 2010, 329(13):796-799.
- [6] Williams P. Biofuel: Microalgae cut the social and ecological costs[J]. *Nature*, 2007, 450:478.
- [7] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, 37:911-917.
- [8] Gunnel A, Leonardo M. Lipid analysis of freshwater microalgae: A method study[J]. *Arch Hydrobiol*, 1991, 121(3):295-306.
- [9] Cooksey K E, Guckert J B, Williams S A, et al. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using nile-red[J]. *J Microbiol Methods*, 1987, 6:333-345.
- [10] Liu Z Y, Wang G C, Zhou B C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*[J]. *Bio-resource Technology*, 2008, 99(11):4717-4722.

Comparison and Optimization of Total Lipid Detection Methods for Microalgae *Chlorella*

CONG Feng^{1,2}, SUN Xue^{1,2}, XU Nian-jun^{1,2*}

(1.Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.Key Laboratory of Marine Biotechnology, School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Three methods for detecting the total lipid content of the microalgae *Chlorella pyrenoidosa*, that is, bligh-dyer method, vanillin colorimetric method and nile-red method, are compared and analyzed for their efficiency and sensitivity, and the optimization method is also introduced. Test results indicate that the gravimetric method is of generic and the results from using it are accurate, but the gravimetric method is not adequately sensitive in the detection process of trace samples because of the minimum detectable amount being 100 mg. The vanillin colorimetric method and nile-red method both are simple and sensitive. The detection using the vanillin colorimetric method is limited to 10 mg, and the detection range of the optimized vanillin colorimetric method is 0.5 - 3.0 mg. The detection using nile-red method is limited to the amount ranging from $0.0588 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ to $0.588 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ algal solution. In conclusion, the lipid content of the microalgae *Chlorella pyrenoidosa* can be detected by the optimized vanillin and combined with the nile-red method, which turns out to be easier and more sensitive than the gravimetric method and can thus be used for the small amount of samples. The study provides a technical approach for the rapid detection of the lipid content of biofuel microalgae.

Key words: *Chlorella*; lipid detection; vanillin colorimetric method; nile-red method

(责任编辑 史小丽)