

铁促进海水小球藻油脂积累的动态过程

刘志媛^{1,2}, 王广策¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要:许多微藻被认为是制备生物油燃料的理想原料, 培养液中高浓度的 Fe^{3+} 对海水小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 的油脂积累有明显的促进作用。采用荧光分光光度法对尼罗红染色后的海水小球藻的油脂积累过程进行了观测, 同时测定了铁对小球藻生长和叶绿素含量的影响。结果表明, 高铁处理的小球藻出现了两次油脂积累高峰, 且第 2 次脂积累的量显著高于第 1 次。

关键词: 脂; 微藻; FeCl_3 ; 叶绿素; 荧光分光光度法

中图分类号: Q949.21

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)11-0056-04

随着石油储量的日益减少和油价飞涨, 以动植物为原料的生物柴油的开发和应用再次受到广泛关注。大规模培养藻类是开发生物柴油, 建立可再生能源基地的重要途径^[1~3]。同陆生油料植物相比, 用微藻生产生物柴油具有一定的优势。首先, 藻类生长周期短, 生长速度快, 可以连续采收, 达到较高的生物产量和油脂产量。全球石油俱乐部 (Global Petroleum Club) 的统计数据表明, 微藻油脂的单位面积年产量是油棕的 15 倍, 大豆的 75 倍, 油菜籽的 200 倍^[3]。其次是微藻, 尤其是海水种的, 培养不与农业争耕地和淡水, 不影响食物安全保障, 如与养殖废水处理相结合, 可以充分利用氮、磷等资源, 兼收环境保护之利。此外, Scragg 等^[4]的试验结果表明, 含油量高的小球藻可以直接作为未经改装的内燃机的燃料, 而且产生的 SO_x 等废弃污染物较柴油少, 省略油脂提取步骤, 必将提高微藻作为生物柴油原料的市场竞争力。

虽然已有许多培养微藻、制取生物柴油的研究结果^[4, 6~11], 但微藻生物柴油至今尚未实现商业化生产。许多研究微藻制备生物柴油的公司都在致力于降低生产成本。美国可再生能源实验室 (NREL) 认为, 影响生产成本的关键不是相关的工程技术问题, 而主要是微藻的生物质产量和油脂含量^[10]。

只有当油脂含量达干物质的 50%~60% 以上时, 微藻生产生物柴油在价格上才具有竞争力^[12]。作者研究发现, 培养液中高浓度的 FeCl_3 对海水小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 的油脂积累有明显的促进作用, 可使其质量分数高达干质量的 56.6%^[13], 具有潜在的应用价值, 因此作者进一步研究了加铁促进这种藻的油脂积累的动态过程以及加铁对其生长的影响。

1 材料与方法

1.1 藻种与培养

海水小球藻 *C. vulgaris* C7 由中国海洋大学藻种库提供。用不加 Si 的 f/2 培养基^[14] (记为 f/2-Si), 单藻种静止培养。培养温度 21 ± 2 , 光强为 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光暗比为 14h : 10h。海水取自青岛汇泉湾, 经过滤后煮沸消毒。海水本身 Fe^{3+} 浓度为 $6.73 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, f/2-Si 培养基初始加 Fe^{3+} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /EDTA) 浓度为 $1.2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。

1.2 分析方法

1.2.1 生长测定

以小球藻活体吸收光谱 500 nm 处的光密度值代表细胞密度, 细胞数用血球计数板计数。光密度用紫外可见分光光度计 (UV757) 测定。

1.2.2 总脂含量测定

自 Greenspan 等^[15]提出用尼罗红 (9-diethylamino-5H-benzo [α] phenoxazine-5-one) 染色, 用荧光法测定细胞内油脂含量以来, 先后在多种生物中证明尼罗红染色后细胞荧光强度与细胞内油脂含量显著相关^[6, 15~21]。作者的研究结果表明, 经尼罗红染色后的小球藻在 480 nm 光激发下, 位于 580 nm 的荧光峰的强度与称质量法测定的总脂含量呈线性

收稿日期: 2008-03-10; 修回日期: 2008-04-25

基金项目: 国家 863 计划项目 (2006AA05Z112, 2007AA09Z110, 2007AA09Z406)

作者简介: 刘志媛 (1974-), 女, 山东淄博人, 在读博士, 主要从事藻类生理与发育调控研究, 电话: 13646486737, E-mail: liuzhiyuan111@163.com; 王广策, 通讯作者, 研究员, 电话: 0532-82898574, E-mail: gcwang@ms.qdio.ac.cn

正相关^[13]。因此,本实验采用同样荧光分光光度法直接测定细胞的中性脂含量,具体方法为:1 mL 藻液加 0.01 mL 尼罗红染料(质量浓度为 0.1 g/L 丙酮)染色 7 min 后,用日立 F-4500 型荧光分光光度计,用 480 nm 光激发,测定荧光发射光谱,以波长为 580 nm 的荧光强度减去藻细胞和尼罗红在该波长处的荧光值,所得相对荧光强度与细胞中总脂含量呈线性关系。

1.2.3 叶绿素含量测定

80%丙酮:二甲亚砜溶液(体积比 1/1,)提取叶绿素,用 UV757 分光光度计测定 663 nm 和 645 nm 光密度^[22],Arnon 公式计算抽提液中的叶绿素含量^[23]。

1.2.4 统计分析

对 3 次平行试验结果,用 DPS 数据处理系统进行统计分析^[24]。

2 结果

2.1 铁对小球藻脂积累的促进作用

经尼罗红染色的海水小球藻,用 480 nm 光激发时的室温荧光发射光谱如图 1 所示。位于 690 nm 的是叶绿素 a 的发射峰,位于 580 nm 的是被尼罗红染色的脂的发射峰,由于二者相距约 100 nm,叶绿素不会影响细胞中脂含量的直接测定。在普通培养条件下(f/2 培养基),已达生长静止期的小球藻没有油脂积累(曲线 a),向处于指数生长后期的培养液中补加 2.4×10^{-5} mol/L Fe^{3+} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /EDTA)后,580 nm 处出现平缓的荧光峰,说明油脂含量增加(曲线 b)。如将处于指数生长后期的小球藻离心收集并重新悬浮于补加 1.2×10^{-5} mol/L Fe^{3+} 的 f/2-Si 培养基中,580 nm 荧光发射峰升高并超过叶绿素荧光峰,说明小球藻重新接种于新的含较高 Fe^{3+} 浓度的培养基中后,能够大量积累油脂(曲线 c)。

用尼罗红染色法可以不经抽提,直接测定藻类细胞中的脂含量,而所需材料少,使分析测定方法明显简化。

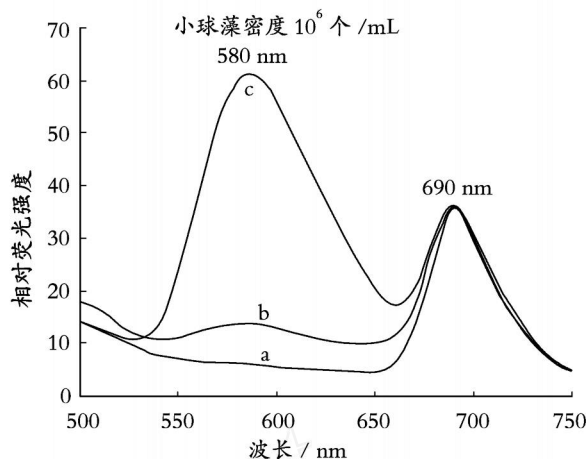


图 1 以 480 nm 波长激发,经尼罗红染色的海水小球藻的室温荧光发射光谱

Fig. 1 Fluorescence emission spectra of Nile red-stained *C. vulgaris* cells with 480 nm as the excitation wavelength

曲线 a: 普通培养条件下的小球藻的荧光发射光谱;曲线 b: 指数生长后期补铁的小球藻的荧光发射光谱;曲线 c: 重新接种于高铁培养基中的小球藻的荧光发射光谱

Curve a: emission spectrum of *C. vulgaris* under ordinary growth conditions; curve b: emission spectrum of *C. vulgaris* supplemented with Fe^{3+} in the later exponential growth phase; curve c: emission spectrum of *C. vulgaris* reinoculated into medium with high Fe^{3+} concentration

2.2 小球藻生长和脂积累的动态过程

处于指数生长后期的小球藻经 4 000 g 离心 5 min 后,细胞沉淀重悬于不加铁的 f/2-Si 培养基中,用分光光度法测定生长和油脂积累的动态过程,结果如图 2 所示。

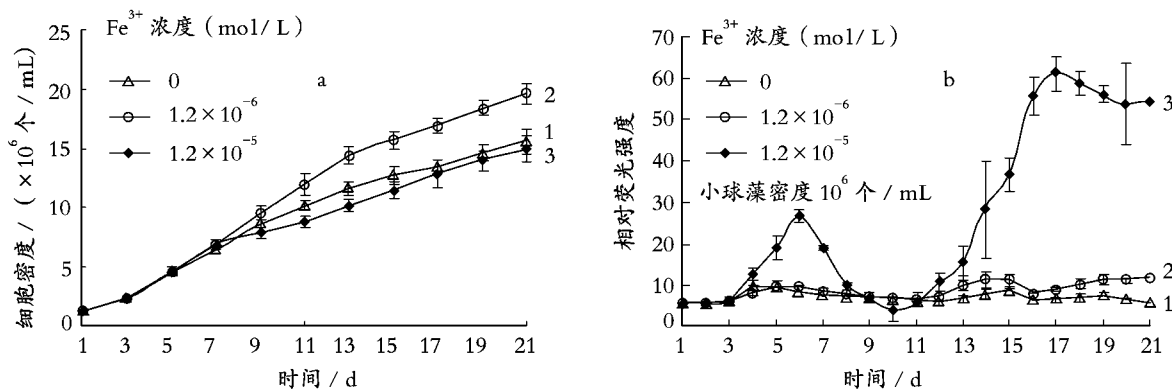


图 2 培养基中添加不同浓度的 Fe^{3+} 对小球藻(*C. vulgaris*)生长(a)和油脂积累(b)的影响

Fig. 2 Growth and lipid accumulation of *C. vulgaris* in media supplemented with different levels of Fe^{3+} concentration

由图 2 可知,重新悬浮于不加铁的新 f/2-Si 培养基中,小球藻仍可以利用海水中的铁(Fe^{3+} 浓度为 $6.73 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$) 恢复生长,但指数生长期较短。添加 $1.2 \times 10^{-6} \text{ mol/L Fe}^{3+}$,则指数生长期延长,达到较高的细胞密度,说明适当提高海水中铁的浓度,可以促进小球藻的生长,但是对油脂的积累无明显的促进作用。当添加的 Fe^{3+} 浓度提高 10 倍,达到 $1.2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时,在第 9 天至第 13 天时,小球藻细胞数增加很慢,以后又恢复,最后细胞密度与不加 Fe^{3+} 的处理相近,说明铁浓度过高对生长有抑制作用,但并不十分严重。另一方面,添加高浓度的 Fe^{3+} ($1.2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) 对脂的积累可产生显著的影响,在加铁后的第 6 天和第 17 天分别出现油脂积累的高峰,油脂含量分别为其他处理的 3 倍和 7 倍。而且,两个高峰之间油脂含量的最低点恰好是细胞分裂的延缓期(加铁后的第 9 天至第 11 天)。因此,油脂积累的第二个高峰相当于细胞对逆境的响应。油脂的再次积累不仅时间长,含量高,而且与藻生长的恢复同步,说明代谢途径和贮存物的类型已经进行了调整。

2.3 铁对小球藻叶绿素含量的影响

在加铁后重新培养 7, 11, 19 d 时测定小球藻叶绿素 a 和 b 的含量(图 3)。在不添加铁,只能利用培养液海水中的铁的情况下,叶绿素含量较低,除第 19 天叶绿素 b 的含量稍下降外,叶绿素 a 和 b 的含量在培养期间无明显变化。加铁培养基中小球藻的叶绿素含量均高于不加铁的。随培养时间延长,加铁量高的影响更明显(如第 11 天和第 19 天)。此外,在加 Fe^{3+} 浓度为 $1.2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时,叶绿素 a 和 b 的含量均以第 11 天为最高,恰好与细胞生长减缓和油脂含量下降至最低点同步(图 2, 图 3)。

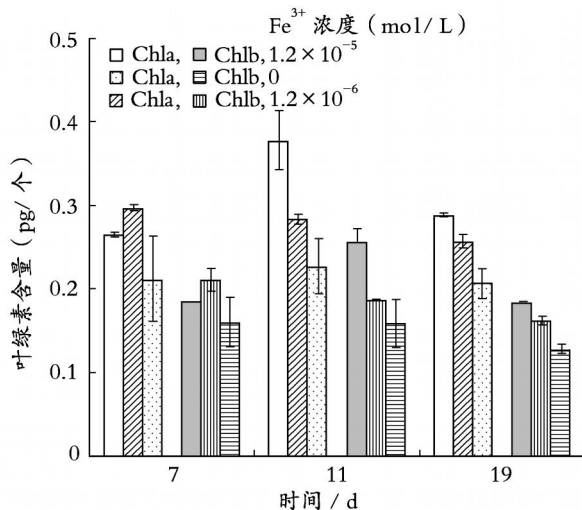


图 3 培养基中添加 Fe^{3+} 对小球藻(*C. vulgaris*)叶绿素 a 和叶绿素 b 含量的影响

Fig. 3 Chlorophyll a and b contents of *C. vulgaris* in media supplemented Fe^{3+}

3 讨论

加铁使含油量不高的小球藻的脂含量提高了 7 倍,高达干物质质量的 50 % 以上,这对于生物柴油开发具有一定的吸引力,特别是海水小球藻可以用海水培养,不与农业争水源和耕地,更具有明显的优势。

包括小球藻在内的多数绿藻的贮藏物质是淀粉,在叶绿体中以淀粉粒形式存在,当遇到逆境时有些绿藻会大量积累油脂^[5, 25]。

在小球藻中观察到的这种油脂大量积累现象,可能是由于已糖库的代谢途径由合成淀粉为主转变为合成油脂,分叉点在于磷酸已糖的调用方向。光合作用所固定的过量的碳进入磷酸已糖库,一方面可以淀粉形式储存在叶绿体内,另一方面,还可通过糖酵解途径生成丙酮酸,经丙酮酸脱氢酶催化直接得到乙酰辅酶 A。乙酰辅酶 A 是脂肪酸合成的前体,合成的脂肪酸运出叶绿体后,在内质网上同甘油-3-磷酸形成中性脂三酰甘油,贮存于油体中^[26],这就是被尼罗红染色后,经荧光检测观察到的油脂积累现象。磷酸已糖如被调用作脂肪酸合成,淀粉的合成将受到抑制。乙酰辅酶 A 还是线粒体中的三羧酸循环的碳源,其中间产物琥珀酰辅酶 A 是合成卟啉类化合物的基本原料,而卟啉是合成叶绿素、细胞色素及藻胆素的基本原料^[27]。因此,在实验中观察到的油脂积累和叶绿素含量的变化是叶绿体、内质网和线粒体等多种细胞器协同作用的结果。但是在这些代谢途径中并没有铁的直接作用位点。

叶绿体是微藻细胞的主要铁库,一条完整的光合电子传递链需要 24 个铁原子。此外,线粒体的呼吸电子传递链中的细胞色素也是铁卟啉化合物,叶绿体、线粒体的电子传递链和光合作用、呼吸作用等基础代谢过程是铁的直接作用位点。在大洋中,存在着高氮、低叶绿素含量的初级生产力极低的区域,其限制因子就是海水中可利用铁的含量低于临界浓度,通过补铁可以明显提高初级生产力^[28]。

在光能自养的小球藻中,光合作用和呼吸作用在具有超循环结构的代谢网络中处于核心地位,以正反馈的方式驱动整个网络运转,铁通过影响光合作用和呼吸作用,如何进一步影响糖库的调用方向,由贮存淀粉转向积累油脂是需要进一步研究的问题。显然,这些过程涉及到叶绿体、线粒体和内质网等多种细胞器的协同作用,由于乙酰辅酶 A 在脂肪酸合成和呼吸作用中处于代谢的关键位置,同时又是脂类 β -氧化的产物,在这种协同作用中乙酰辅酶 A 的代谢趋向和调控是值得关注的问题。

致谢:感谢中国科学院海洋研究所周百成研究员对本文提出诸多宝贵意见;感谢中国海洋大学朱保华博士的热心帮助。

参考文献:

- [1] Chisti Y. Biodiesel from microalgae [J]. **Biotechnol Adv**, 2007, 25:294-306.
- [2] Huntley M E, Redalje D G. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal [J]. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, 2007, 12:573-608.
- [3] Haag A L. Algae bloom again[J]. **Nature**, 2007, 447: 520-521.
- [4] Scragg A H, Morrison J, Shales S W. The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine [J]. **Enzyme Microb Tech**, 2003, 33:884-889
- [5] Illman A M, Scragg A H, Shales S W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium[J]. **Enzyme Microb Tech**, 2000, 27: 631-635
- [6] McGinnis K M, Dempster T A, Sommerfeld M R. Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri* [J]. **J Appl Phycol**, 1997, 9:19-24.
- [7] Takagi M, Karseno, Yoshida T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells[J]. **J Biosci Bioeng**, 2006, 101:223-226.
- [8] Xu H, Miao X L, Wu Q Y. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters[J]. **J Biotechnol**, 2006, 126:499-507.
- [9] Rao A R, Dayananda C, Sarada R S, et al. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents [J]. **Bioresour Technol**, 2007, 98: 560-564.
- [10] Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, et al. A look back at the U. S. Department of energy's aquatic species program-biodiesel from algae[R]. USA: National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, 1998. 27.
- [11] Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, et al. Commercial applications of microalgae[J]. **J Biosci Bioeng**, 2006, 101:87-96.
- [12] Neenan B, Feinberg D, Hill A, et al. Fuels from microalgae: Technology status, potential, and research requirements[R]. USA: Solar Energy Research Institute, Golden, CO, 1986. 149.
- [13] Liu Z Y, Wang G C, Zhou B C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* [J]. **Bioresour Technol**, 2008, 99:4 717-4 722.
- [14] Guillard R R, Ryther J H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran[J]. **Can J Microbiol**, 1962, 8:229-239.
- [15] Greenspan P, Mayer E P, Fowler S D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets [J]. **J Cell Biol**, 1985, 100:965-973.
- [16] de la Jara A, Mendoza H, Martel A, et al. Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* [J]. **J Appl Phycol**, 2003, 15: 433-438.
- [17] Kimura K, Yamaoka M, Kamisaka Y. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence[J]. **J Microbiol Meth**, 2004, 56:331-338.
- [18] Alonzo F, Mayzaud P. Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red[J]. **Mar Chem**, 1999, 67:289-301.
- [19] 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 Meth**, 1987, 6: 333-345.
- [20] Lee S J, Yoon B D, Oh H M. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*[J]. **Biotechnol Tech**, 1998, 12: 553-556.
- [21] Elsey D, Jameson D, Raleigh B, et al. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids[J]. **J Microbiol Meth**, 2007, 68:639-642.
- [22] 谭桂英,周百成. 底栖绿藻叶绿素的二甲基亚砷提取和测定方法[J]. 海洋与湖沼, 1987, 18:295-300.
- [23] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*[J]. **Plant Physiol**, 1949, 24:1-15.
- [24] Tang Q Y, Feng M G. DPS Data processing system: Experimental design, statistical analysis, and data mining[M]. Beijing: Science Press, 2007.
- [25] Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response[J]. **Physiol Plantarum**, 2000, 108:111-117.
- [26] Buchanan B B, Gruissem W, Jones R L. 植物生物化学与分子生物学[M]. 北京:科学出版社, 2002. 467.
- [27] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学[M]. 北京:高等教育出版社, 2002. 366.
- [28] Behrenfeld M J, Worthington K, Sherrell R M, et al. Controls on tropical Pacific Ocean productivity revealed through nutrient stress diagnostics[J]. **Nature**, 2006, 442:1 025-1 028.

Dynamics of lipid accumulation in marine microalga *Chlorella vulgaris* promoted by iron

LIU Zhi-yuan^{1,2}, WANG Guang-ce¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Mar. 10, 2008

Key words: lipid; microalga; FeCl₃; chlorophyll; spectrofluorimetry

Abstract: Some microalgae are proposed as good candidates for biodiesel production. Lipid accumulation in a marine microalga *Chlorella vulgaris* can be promoted by high level of Fe³⁺ concentration in the media. The dynamics of lipids accumulation promoted by iron in Nile red-stained *C. vulgaris* was traced with spectrofluorimetry method. The effect of iron on the growth and chlorophyll content of *C. vulgaris* was also measured. The results showed that notable lipid accumulation occurred twice in cells under high iron condition and much more lipid accumulated in the second period.

(本文编辑:张培新)