

# 锰离子对斜生栅藻 DHD-3 的生长和油脂积累的调控作用

袁程<sup>1,2</sup>, 刘君寒<sup>2</sup>, 任晓慧<sup>1</sup>, 李福利<sup>2</sup>

(1. 河北农业大学 海洋学院, 河北 秦皇岛 066003; 2. 中国科学院 青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266101)

**摘要:** 研究了培养液中不同锰离子浓度对斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)DHD-3 的生长、油脂积累以及脂肪酸组成的影响。结果表明, 培养液中不同初始浓度的锰离子对斜生栅藻早期叶绿素积累和生长会产生一定的调节作用, 过高或过低的锰离子都不利于斜生栅藻细胞内叶绿素的积累、微藻的生长和油脂的积累。经过 14 d 培养后, 当初始锰离子的添加量为 2.72 mg/L 时, 斜生栅藻的生物量和细胞内油脂含量分别达到 2.9 g/L 和细胞干重的 55.1%, 细胞内油脂含量比对照组提高了 11%; 同时, 单位水体中油脂的产量达到了 1.6 g/L, 比对照组提高了 14%, 但改变锰离子的初始浓度并不对斜生栅藻脂肪酸的组成产生明显影响。

**关键词:** 锰离子; 斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*); 油脂; 脂肪酸组成; 调控

中图分类号: Q176

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)02-0062-05

能源短缺成为 21 世纪人类面临的一个重大问题, 利用微藻生产生物柴油被认为是解决能源短缺的重要途径。斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)是一种常见的淡水微藻, 可以从不同的水体中分离获得, 尤其在污水中, 其油脂含量介于 11%~55%<sup>[1]</sup>, 可以用于污水处理<sup>[2]</sup>, 因此使用斜生栅藻生产生物柴油具有巨大的优势。

微藻在正常的生理条件下, 其细胞内油脂的积累是相对有限的。研究发现, 通过改变培养微藻的营养元素的组成和比例, 可以调控微藻生长的生理, 进而诱导微藻细胞油脂的积累, 如在氮、磷缺乏的情况下, 糖类物质等可转化为脂质<sup>[3-4]</sup>。氮和磷是微藻生长所必须的大量元素, 虽然可以通过调控氮、磷来诱导微藻油脂的积累, 但在增加微藻细胞含油量的同时, 却减少了微藻生物量的积累, 总体而言并未提高微藻单位体积水体中油脂的生产能力。锰是植物生长所需要的微量元素, 对于植物的生理调节有重要作用, 是植物细胞许多酶的辅因子, 如脂肪酸合成途径中的一些酶; 锰还直接参与光合作用, 是叶绿素形成的必需物质<sup>[10]</sup>。同时, 锰是工业废水中的常见排放物, 按照国家规定, 工业废水中  $Mn^{2+}$  的最高允许排放量为  $5 \times 10^{-3}$  g/L<sup>[5]</sup>。微藻培养的过程中, 水的需求量是巨大的。故探索利用含锰工业废水培养微藻来生产油脂, 除了可以生产生物柴油、解决燃

料问题的同时, 还能达到处理工业废水、保护环境的目的。

实验室前期筛选到一株油脂含量达到干重 46% 的斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*), 本文研究了培养基中不同水平的锰离子浓度对该栅藻细胞的生长、总脂含量和脂肪酸组成的影响, 为将来大规模利用含锰工业废水培养斜生栅藻生产生物柴油提供实验依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 藻种和培养方法

斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)DHD-3 为中国科学院青岛生物能源与过程研究所微生物资源藻种库保藏。

将对数生长期的藻种按照 1 : 10(V/V)的比例接种于含有不同锰离子浓度的 BG11 培养液中。初始接种  $OD_{750}$  为 0.2, 培养于柱式培养器( $\Phi$  4.2 cm $\times$ 38 cm),

收稿日期: 2010-12-16; 修回日期: 2011-03-29

基金项目: 中科院知识创新工程重要方向性项目(KGCX2-YW-374-3); 国家十一五重大科技专项: 水体污染控制与治理重大科技专项(2008ZX074220-003-005)

作者简介: 袁程(1985-), 男, 山东青岛人, 硕士研究生, 研究方向: 水生生物种质资源, 电话: 0532-80662656, E-mail: jkev001@126.com; 任晓慧, 通信作者, E-mail: renxiaohui710409@sina.com; 李福利, 通信作者, 电话: 0532-80662655, E-mail: lifl@qibebt.ac.cn

连续光照( $80 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ )、通气培养,  $\text{CO}_2$  浓度为 2%, 培养温度为  $25 \pm 1$ 。

BG11 培养基:  $\text{NaNO}_3$  1 500 mg/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  40 mg/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  75 mg/L;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  36 mg/L; 柠檬酸 6 mg/L; 柠檬酸铁铵 6 mg/L;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  1 mg/L;  $\text{NaCO}_3$  20 mg/L;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2.86 mg/L;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.81 mg/L;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.222 mg/L;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.39 mg/L;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.079 mg/L;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.049 mg/L; 去离子水 1 L, 调节 pH 至 7.4。

## 1.2 藻细胞干重的测定、叶绿素含量和蛋白质含量的测定

藻细胞干重的测定: 收集一定体积的藻液, 经  $0.8 \mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤, 并于  $105^\circ\text{C}$  烘至恒重, 称量藻细胞的干重。

叶绿素测定: 参照文献[6]方法进行。

蛋白质含量的测定: 收集一定体积的藻液,  $10\ 000 \text{ r/min}$  离心后, 弃上清, 加入  $0.5 \text{ mol/L}$  氢氧化钠溶液, 煮沸 10 min, 用 BCA 蛋白定量试剂盒(贝博生物, 上海)检测蛋白含量。

## 1.3 油脂的提取和脂肪酸成分的分析

收集藻细胞,  $3\ 500 \text{ r/min}$  离心 10 min, 用去离子水洗涤后, 在冷冻干燥机中冷冻干燥 24 h。称取约 30 mg 藻粉, 按照 Bligh-Dyer 法, 提取总油脂<sup>[7]</sup>。加入 2.5 mL 含 2% 浓硫酸的甲醇, 迅速混匀, 于  $85^\circ\text{C}$  水浴中反应 2 h。冷却至室温后, 加入 2 mL 正庚烷和 2 mL 饱和氯化钠, 充分振荡并静置分层, 加入一定量  $\text{C}_{19}$  脂肪酸甲酯, 离心后取上层进行气相色谱分析。

脂肪酸成分的分析采用气相色谱法(Varian 450-GC, 美国), 色谱检测条件如下: 使用 CP-WAX58 毛细管柱( $25 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$ ), 进样量为  $1 \mu\text{L}$ , 分流比为 1:30。升温程序:  $100^\circ\text{C}$  保持 2 min, 以  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  升至  $250^\circ\text{C}$ , 保持 3 min。进样器温度为  $250^\circ\text{C}$ , 检测器温度为  $280^\circ\text{C}$ 。以面积归一法得到各脂肪酸组分的相对含量, 脂肪酸标准品为 Sigma 公司产品。

## 2 结果与分析

### 2.1 锰离子对斜生栅藻生长的影响

图 1 给出了不同初始锰离子浓度的培养基中, 经 14d 培养后, 斜生栅藻细胞生物量的变化。总体而

言, 在本文实验研究的锰离子范围内, 锰离子浓度对微藻生物量的影响不大。仅当初始锰离子添加量为  $2.72 \text{ mg/L}$  时, 藻细胞的生物量最大, 达到了  $2.93 \text{ g/L}$ ; 当锰离子浓度较低和较高时, 生物量相对略低。马小妮等<sup>[8]</sup>研究了锰离子对于微囊藻生长的影响, 当锰离子含量在  $0.055 \sim 5.5 \text{ mg/L}$  时, 对微囊藻的生长会有促进作用, 当锰离子含量过高 ( $55 \text{ mg/L}$ ) 时, 反而对微囊藻的生长有抑制作用。本试验中未发现锰离子强烈的抑制斜生栅藻的生长的影响, 说明在锰离子添加量不超过  $4.53 \text{ mg/L}$  时, 不会显著影响到斜生栅藻的生长。

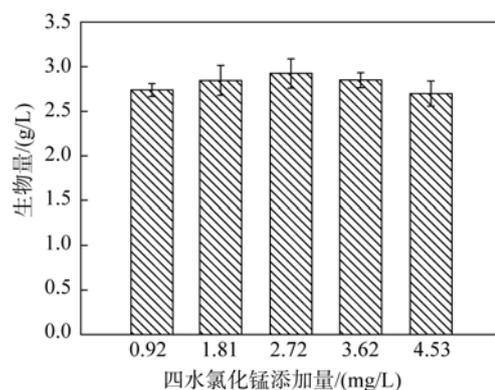


图 1 经过培养 14 d 后, 不同锰离子添加量对斜生栅藻生物量的影响

Fig. 1 Effect of different initial concentration Mn ion on biomass of *Scenedesmus obliquus* after a 14-day culture

### 2.2 锰离子对斜生栅藻叶绿素积累的影响

叶绿素 a 作为植物光合作用的基础, 能够直接或间接的反映植物生理状态的变化。由图 2 可知, 藻细胞体内叶绿素含量在微藻生长前期处在较高水平, 并在第 4 天达到最大, 随着培养时间的延长, 体内叶绿素 a 含量逐渐的减少。当藻细胞生长进入稳定期, 胞内油脂开始积累, 此时微藻的光合作用减弱, 叶绿素 a 的含量维持在一个较低的水平。

由图 2 可知, 锰离子对于微藻叶绿素 a 合成的影响主要在微藻细胞生长的初期。在微藻细胞培养至第 2 天时, 初始液中锰离子浓度较高, 影响了微藻细胞内叶绿素 a 的合成, 细胞内叶绿素 a 的含量较少。在初始锰离子添加量为  $2.72 \text{ mg/L}$  时, 叶绿素 a 含量最多, 但在第 4 天, 其叶绿素水平为不同锰离子添加量里含量最小的, 说明在培养的初期, 初始液中适当的锰离子能够促进叶绿素 a 的合成, 提高斜生栅藻对环境的适应能力。

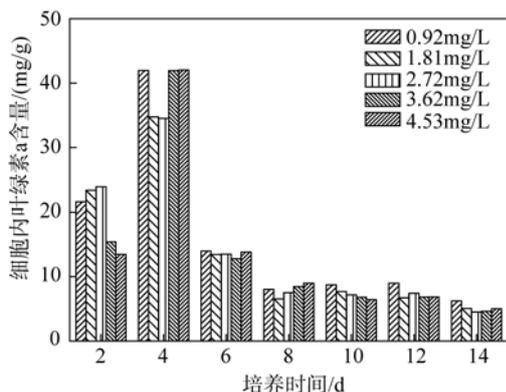


图2 锰离子对斜生栅藻细胞内叶绿素 a 含量的影响

Fig. 2 Effect of different initial concentration Mn ion on cellular chlorophyll a content of *Scenedesmus obliquus*

### 2.3 锰离子对斜生栅藻细胞内蛋白质含量的影响

当锰离子初始添加量为 0.92 mg/L 时, 经过 14d 的培养后, 微藻细胞内蛋白质的含量较少, 占细胞干重的 5.8%。锰离子初始添加量为 1.81 mg/L 时, 经过 14d 培养后, 细胞内蛋白质含量较高, 占细胞干重的 6.6%(图 3)。随着初始培养液中锰离子添加量的增加, 细胞内蛋白质的含量逐渐减少。说明高浓度的锰元素能够影响栅藻细胞内蛋白质的积累。但是低浓度的锰元素又会阻碍栅藻细胞的正常生长, 从而影响到栅藻细胞物质的积累。结合初始锰离子对斜生栅藻初期细胞体内叶绿素 a 含量的影响, 本试验中, 以培养液中初始锰离子浓度在 1.81 ~ 2.72 mg/L 为栅藻正常生长的最佳添加量。

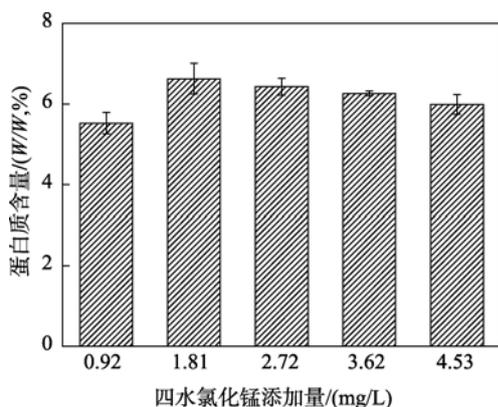


图3 经过 14 d 培养后, 锰离子对斜生栅藻细胞体内蛋白质含量的影响

Fig. 3 Effect of different initial concentration Mn ion on cellular protein content of *Scenedesmus obliquus* after a 14-day culture

### 2.4 锰离子对斜生栅藻细胞油脂含量和油脂产量的影响

图 4 给出了在不同初始锰离子浓度的培养液中, 经 14 d 培养后斜生栅藻细胞内油脂含量的变化, 当锰离子添加量为 0.92 mg/L 和 1.81 mg/L 时, 微藻细胞总脂含量比锰离子添加量为 2.72 mg/L 时稍低, 当初始锰离子添加量为 2.72 mg/L 时, 藻细胞内油脂含量最大, 达到了细胞干重的 55.1%, 相对于对照组 (MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1.81 mg/L) 提高 11%; 随着锰离子添加量的增大, 细胞内油脂含量降低较大, 当锰离子添加量为 3.62 mg/L 和 4.53 mg/L 时, 细胞内油脂含量分别为细胞干重的 43.1 %和 44.7%, 说明培养液中锰离子过少, 会影响到斜生栅藻细胞内油脂的积累, 但高浓度的锰同样也会抑制藻细胞中油脂的形成与积累; 同时, 对单位水体中油脂的生产能力分析发现(图 4), 2.72 mg/L 是该试验培养液中锰离子的最佳添加量, 此时水体中油脂的生产能力达到 1.6 g/L, 相对于对照组(MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1.81 mg/L)提高 14 %。综合分析, 在栅藻的培养过程中需要添加适量的锰离子诱导藻细胞中油脂的积累; 本试验中, 最佳的油脂生产能力的锰离子添加量为 2.72 mg/L。

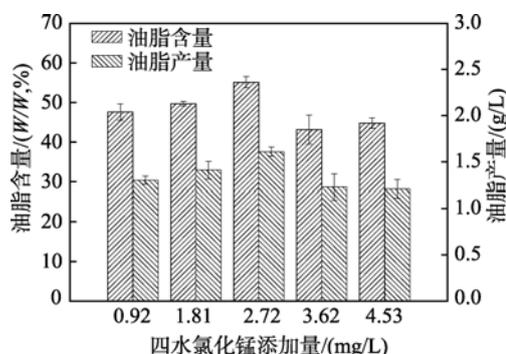


图4 初始液中不同浓度的锰离子添加量对斜生栅藻细胞内油脂含量和单位水体中油脂产量的影响

Fig. 4 Effect of different initial concentration Mn ion on cellular lipid content and yield of lipid in *Scenedesmus obliquus*

### 2.5 锰离子对斜生栅藻脂肪酸组成的影响

经过 14 d 的培养后, 不同浓度的锰对斜生栅藻脂肪酸组成的影响见表 1。根据标准样品中 14 种脂肪酸成分的保留时间, 发现斜生栅藻 DHD-3 的总脂中主要含有其中的 8 种, C14 : 0、C20 : 0 以及碳链更长的脂肪酸并未检测到。虽然培养液中添加高浓度的锰离子会造成了斜生栅藻油脂生产能力的下降,

表 1 不同初始浓度的  $Mn^{2+}$  对脂肪酸组成的影响Tab. 1 Effect of different initial concentration Mn ion on fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus*

脂肪酸	$MnCl_2 \cdot 4H_2O(mg/L)$				
	0.92	1.81	2.72	3.62	4.53
C16 : 0	30.53	28.87	29.48	31.31	28.43
C16 : 1	2.28	3.20	2.93	2.87	3.28
C16 : 2	4.72	4.33	3.81	3.28	4.04
C18 : 0	2.06	2.76	2.51	2.30	1.99
C18 : 1	36.68	39.41	40.35	41.2	39.85
C18 : 2	14.90	13.85	13.79	12.96	14.67
C18 : 3	5.97	5.47	5.06	4.15	5.34
C18 : 4	2.90	2.13	2.04	1.93	2.40

注: 所有结果均为 3 次测定的平均值; 所有结果均为各脂肪酸在总脂中的质量分数(%)

但锰离子对于斜生栅藻细胞内脂肪酸的组成没有明显的影响( $P=0.640$ ,  $P>0.05$  就表示在不同锰离子初始浓度下, 各组分差别不显著), C16 : 0 和 C18 : 1 仍是斜生栅藻脂肪酸中的主要成分, 其他脂肪酸在总油脂中的比例并未发生明显变化。

### 3 讨论

运用污水培养微藻生产可再生能源, 是当前生物能源领域的研究热点。作为污水排放中重要指标的锰离子, 被报道具有调节植物光合作用以及植物细胞脂肪酸积累的作用<sup>[9]</sup>。本试验研究了锰离子对一株高油脂含量的斜生栅藻生长、油脂积累以及脂肪酸组成的影响, 试验表明经过 14 d 培养后, 该藻的最佳油脂积累的初始锰离子添加量为 2.72 mg/L, 其生物量和细胞内油脂含量分别达到 2.9 g/L 和 55.1%, 细胞内油脂含量比对照组提高了 11%; 同时, 单位水体中油脂的产量达到了 1.6 g/L, 比对照组提高了 14%, 但改变锰离子的初始浓度并没有对斜生栅藻脂肪酸的组成产生明显影响, 说明可以利用锰离子调控斜生栅藻细胞的油脂积累, 增加单位水体中油脂的产量。

郭金耀等<sup>[9]</sup>研究了锰对盐藻生长和物质积累的影响, 发现培养液中的锰质量浓度为 2.0 mg/L 或 8.0 mg/L 时, 单个盐藻细胞中的蛋白质含量与  $\beta$ -胡萝卜素含量均最高, 但培养液中细胞密度、盐藻蛋白质含量、 $\beta$ -胡萝卜素含量都较低。说明了盐藻生长需要添加适宜的锰离子, 同时获得不同的代谢产物, 也可用锰离子进行调控。Constantopoulos<sup>[11]</sup>研究了锰离子对 *Euglena gracilis* 生长和油脂组成的影响, 发现培养基中缺乏锰离子时会影响藻细胞的生长, 但是缺锰培养未对最终细胞内叶绿素含量产生影响; 研

究还发现, 添加锰离子(9  $\mu m$ )与缺乏锰离子培养藻细胞时, 脂肪酸组成会发生变化; 添加锰离子时, 藻细胞中油脂含量由无锰离子时的 135  $\mu g$  增加到 157  $\mu g$ ; 同时油脂中不饱和脂肪酸的含量增加, 细胞内的不饱和脂肪酸质量分数由不添加锰离子时的 27.9% 增加至 52.3%, 说明锰离子能够影响到 *Euglena gracilis* 细胞内油脂含量和脂肪酸组成。

本试验通过研究锰离子对斜生栅藻生长、油脂积累及脂肪酸组成的影响, 为将来室外大规模利用含锰工业污水及中水等培养产能微藻提供了试验基础。

#### 参考文献:

- [1] Mata T M, Martins A A, Caetano N S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review[J]. Renewable Sustainable Energy Rev, 2010, 14(1): 217-232.
- [2] Voltolina D, Gomez-Villa H, Correa G. Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and a simulated light and temperature cycle[J]. Bioresour Technol, 2005, 96(3): 359-362.
- [3] Reitan K I, Rainuzzo J R, Olsen Y. Effect of nutrient limitation on fatty-acid and lipid-content of marine microalgae[J]. J Phycol, 1994, 30(6): 972-979.
- [4] Li X, Hu H Y, Ke G, et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp[J]. Bioresour Technol, 2010, 101(14): 5494-5500.

- [5] 梁明山, 李剑峰, 曾宇. 螺旋藻吸附锰离子的研究[J]. 水产科学, 1999, 18(4): 3-5.
- [6] Azov Y. Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 43(6): 1300-1306.
- [7] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Can J Biochem Physiol, 1959, 37(8): 911-917.
- [8] 马小妮, 薛文通, 魏军艳, 等. 铁、锰对微囊藻生长及产毒的影响[J]. 农业工程技术, 2007, 7: 60-63.
- [9] 郭金耀. 锰对盐藻生长与物质积累的调控作用[J]. 水产学报, 2008, 27(3): 148-150.
- [10] 王宝山. 植物生理学[M]. 北京: 科学出版社. 2003: 38-41.
- [11] Constantopoulos G. Lipid metabolism of manganese-deficient algae: Effect of manganese deficiency on the greening and the lipid composition of *Euglena gracilis*[J]. Plant Physiol, 1970, 45: 76-80.

## Regulation of Mn ion on the growth and lipid accumulation of microalga *Scenedesmus obliquus* DHD-3

YUAN Cheng<sup>1,2</sup>, LIU Jun-han<sup>2</sup>, REN Xiao-hui<sup>1</sup>, LI Fu-li<sup>2</sup>

(1. Ocean College of Hebei Agriculture University, Qinhuangdao 066003, China; 2. Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China)

Received: Dec., 16, 2010

**Key words:** Mn ion, *Scenedesmus obliquus*, Lipid, Fatty acid composition, regulation

**Abstract:** As an important component of chlorophyll, manganese (Mn) ion takes part in plant photosynthesis and adjusts the activity of enzymes. So the concentration of manganese in culture medium might affect the growth and metabolize of microalgae. The aim of this work is to investigate the effect of different concentration of Mn on the growth, lipid accumulation and fatty acid composition of *S. obliquus* DHD-3. The results show that the concentration of Mn will influence the growth and accumulation of chlorophyll. Too high or too low are both not good for *S. obliquus* growth, accumulation of chlorophyll and lipid. The maximum biomass and lipid content of *S. obliquus* DHD-3 were 2.9 g/L and 55.1% of dry cell weight, respectively after a 14-day incubation with an initial Mn ion concentration of 2.72 mg/L. The cellular lipid content was increased 11% compared with control group. At the meantime, the maximum lipid yield was 1.6 g/L, which was increased 14% compared with control group. In contrast, the concentration of Mn didn't affect the fatty acid composition of *S. obliquus*.

(本文编辑: 康亦兼)