

doi: 10.16862/j.cnki.issn1674-3873.2018.02.023

乙醇对斜生栅藻叶绿素荧光特性 以及油脂积累的影响研究

成 杰^{1,2} 季 祥^{2*} 丁勇成³

- (1. 厦门大学 海洋与地球学院 近海海洋环境科学国家重点实验室 福建 厦门 361000;
2. 内蒙古自治区生物质能源化利用重点实验室 内蒙古 包头 014010;
3. 厦门大学 海洋与海岸带发展研究院 福建 厦门 361000)

摘 要: 为了研究乙醇对斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus* XJ002) 藻株光合效率以及胞内油脂积累的影响, 首先采用酶标仪作为检测仪器, 研究了尼罗红终浓度、二甲基亚砜(DMSO) 体积分数、尼罗红染色时间对藻株油脂测定的影响, 分析了藻株胞内油脂含量与尼罗红染色相对荧光信号强度之间的线性关系, 为 XJ002 藻株胞内油脂含量的测定提供了一个简便、快速的方法. 其次研究了不同体积分数的乙醇添加对 XJ002 藻株生物量、叶绿素荧光特性以及胞内总脂含量的影响. 结果表明: XJ002 藻细胞尼罗红染色最佳条件是: 二甲基亚砜体积分数为 2%, 尼罗红的终质量浓度为 $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 尼罗红的染色时间为 5 min. 添加高浓度乙醇导致藻细胞生物量与光合色素含量显著下降, 影响了藻细胞光系统 II 反应中心能量分配, 抑制光系统 II 反应中心受体侧电子传递活性. 当乙醇处理浓度为 3% 时, XJ002 藻株胞内总脂含量较对照组提高了 5.19%, 该研究表明乙醇可以作为 XJ002 藻株油脂积累的潜在诱导试剂.

关键词: 斜生栅藻; 乙醇; 尼罗红; 叶绿素荧光; 总脂

中图分类号: Q93 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3873-(2018)02-0113-10

0 引言

能源微藻具有光合效率高、成本低、含油量高、生产效率高等优点^[1-4], 被认为是未来生物柴油的主要原料^[5-6]. 传统的脂含量测定方法主要是有机溶剂提取法, 如用氯仿和甲醇^[7] 或乙醚抽提、称重测定脂含量. 有机溶剂提取法不但费时费力、污染环境, 而且测试藻样必须培养到足够的量(一般需要 100 mg 干物质). 近几年, 一些荧光染料被广泛应用于胞内油脂测定. 相对于传统有机溶剂, 荧光染料更加方便.

尼罗红(Nile Red) 在水中的溶解性与荧光量均较低, 能够与脂类物质(如蜡脂、三脂酰甘油及各种脂肪酸) 结合, 常被用于胞内油脂的测定^[8]. 采用 488 nm 激发波长激发, 中性脂通常在 530 nm 的散射波长出发出金黄色荧光信号, 极性脂通常在 575 nm 的散射波长出发出红色荧光信号, 其荧光强度与脂质含量成正比^[9]. 可以借助酶标仪定性和定量分析甘油三酯和磷脂等含量, 其性能稳定、着色清晰, 还可以进行荧光动力学分析, 适用于各种细胞包括藻类细胞.

通过调控藻细胞油脂代谢途径来提高藻细胞油脂积累是目前研究的热点, 乙醇在细胞内氧化为乙

收稿日期: 2018-02-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(41666007); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2015MS0335); 包头市应用研发资金科技计划项目(2015Z2010-3)

第一作者简介: 成 杰(1990—) 男, 山西省临汾市人, 博士研究生, 研究方向: 海洋能源微藻及活性物质提取.

* 通讯作者: 季 祥(1978—) 男, 内蒙古自治区包头市人, 教授, 博士, 研究方向: 生物质能、能源微藻.

酸,乙酸在乙酰辅酶 A 合成酶的作用下,利用 ATP 能量转化成乙酰辅酶 A,进而参与细胞内油脂的合成.除此之外,研究结果表明,藻细胞内油脂的积累与胞内活性氧的水平有关^[10],有许多环境因子都可以导致细胞内活性氧的产生,例如高光强、营养盐缺乏以及高盐环境^[11].在人类和其他哺乳动物的研究中,乙醇也可引起活性氧生成,通过乙醇脱氢酶代谢乙醇过程中可以在线粒体复合物 I 和 III 产生 ROS,导致细胞毒性、损伤和凋亡^[12].已经有研究报道,乙醇可以诱导雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)^[13]与红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)^[14]细胞内虾青素的积累,但是尚没有关于乙醇对斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)胞内油脂积累的研究.

本研究中首先采用酶标仪对藻细胞内的中性脂进行相对定量分析,优化了尼罗红染色中 DMSO 的使用浓度,尼罗红的终浓度和尼罗红染色的时间三个指标,为快速测定斜生栅藻胞内油脂含量提供了一定的理论和实验基础.其次通过添加不同体积分数的外源乙醇,调控与乙酰辅酶 A 相关的代谢反应,促使代谢流向油脂合成的方向移动.该研究将有助于进一步揭示油脂代谢中的关键调控因子,为促进微藻生物能源研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 实验材料

藻种斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus* XJ002)为内蒙古自治区生物质能源化利用重点实验室保存,取若干个 250 mL 锥形瓶,分别向其中加入一定数量的经高压蒸汽灭菌 BG11 培养基以及乙醇(分析纯),使每个锥形瓶中乙醇的终体积分数分别为 0%、1%、3%,每组重复 3 次.然后加入 XJ002 藻株,摇匀,藻液的最终体积为 150 mL,初始 OD₆₈₀ 值为 0.270,置于光照培养箱中培养.培养温度为(25±1)℃,光照强度 4 800 lx,光暗周期 14 h:10 h,静置培养,每天定时摇匀 3 次,并每隔 24 h 改变各锥形瓶的位置.尼罗红(Nile Red, NR)购自北京酷来博科技有限公司.48 孔酶标板(Costar 3548 48)购自美国 Costar 公司.

1.2 尼罗红染色条件优化

1.2.1 不同体积分数的二甲亚砜(DMSO)处理下荧光信号强度的测定

取培养至对数生长期后期的藻液适量与离心管中,7 800 r·min⁻¹离心 4.5 min,去除上清液,藻细胞沉淀用磷酸缓冲液洗涤,分别采用不同体积分数的二甲亚砜(0.0%、0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%)水溶液重悬藻细胞,使藻液吸光度 OD₆₈₀ 值为 0.8,38℃水浴 18 min,按 1 mL 藻液加 20 μL 尼罗红染料(质量浓度为 0.1 mg·mL⁻¹丙酮溶液),混匀染色 5 min,激发波长 480 nm,测定其在 570 nm 波长的荧光强度,研究不同体积分数的 DMSO 水溶液对尼罗红染色荧光信号强度的影响.

1.2.2 不同尼罗红终浓度处理下荧光信号强度的测定

按 1 mL 藻液加入不同体积的 NR 母液(质量浓度为 0.1 mg·mL⁻¹的尼罗红染料丙酮溶液),使得尼罗红终质量浓度(mg·mL⁻¹)为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5,其余操作见 1.2.1,研究不同尼罗红终浓度对尼罗红染色荧光信号强度的影响.

1.2.3 不同尼罗红染色时间处理下荧光信号强度的测定

分别采用不同的染色时间(1、5、10、15 min),其余操作见 1.2.1,研究不同的尼罗红染色时间对尼罗红染色荧光信号强度的影响.

1.3 藻细胞叶绿素荧光参数及总脂含量测定

藻细胞内光合色素的提取参照 Sartory 等^[15]方法.藻细胞叶绿素荧光特性通过植物效率分析仪(PEA, Hansatech)测定.测定前,取不同处理组的藻细胞,利用 BG11 基础培养基将各个处理组的吸光度 OD₆₈₀ 调成同一水平,并置于暗环境中 30 min,在暗环境中进行测定操作.各荧光参数的意义见表 1^[16].取培养至对数生长期后期的各处理组藻液适量,尼罗红染色测定藻细胞内总脂含量(%).

表 1 JIP-测定所用的快速叶绿素荧光诱导动力学曲线(O-J-I-P)的参数

Table 1 Formulae and glossary of terms used in the JIP-test in the analysis of the O-J-I-P fluorescence transient

| 参数 | 说明 |
|-------------|--|
| F_v/F_m | PSII 反应中心最大光能转化效率 |
| $Plabs$ | 光性能指数 |
| ABS/RC | PSII 单位反应中心吸收的光能 |
| Dl_0/RC | PSII 反应中心吸收的光能中用于热耗散的能量 |
| ET_0/RC | PSII 反应中心吸收的光能中用于电子传递的能量 |
| V_j | 在 J 点的相对可变荧光强度 |
| M_0 | O-J-I-P 荧光诱导曲线的初始斜率 |
| S_m | 标准化后的 O-J-I-P 荧光诱导曲线、荧光强度 $F = F_M$ 及 y 轴之间的面积 |
| ET_0/TR_0 | 反应中心捕获的激子中用来推动电子传递到电子传递链中超过 Q_A 的其他电子受体的激子占用来推动 Q_A 还原激子的比率(在 $t = 0$ 时) |
| ET_0/ABS | 用于电子传递的量子产额(在 $t = 0$ 时) |

2 结果与讨论

2.1 尼罗红染色快速测定藻株胞内油脂相对含量方法的优化

微藻细胞能不能用于企业化大规模生产生物柴油的原料主要看藻细胞内的油脂含量. 藻细胞的油脂含量不仅与种类有关,还与藻细胞的生长周期以及培养条件有关. 本研究采用酶标仪对 XJ002 藻株胞内的中性脂进行相对定量分析,通过二甲基亚砜(DMSO)浓度、尼罗红染色时间和尼罗红用量的选择优化了尼罗红染色测定中性脂的条件.

2.1.1 二甲基亚砜(DMSO)的体积分数对 XJ002 藻株荧光信号强度的影响

二甲基亚砜(DMSO)可以提高细胞的通透性,有助于尼罗红染料渗透到细胞内,从而提高了尼罗红染料与藻细胞内中性脂结合后的荧光信号强度. 由图 1 可知,当二甲基亚砜体积分数在 0.5% ~ 4.0% 之间时,荧光信号强度出现先增加后减少的趋势,这可能是由于过高的二甲基亚砜体积分数会对藻细胞产生一定的毒性,扰乱了荧光信号的监测.

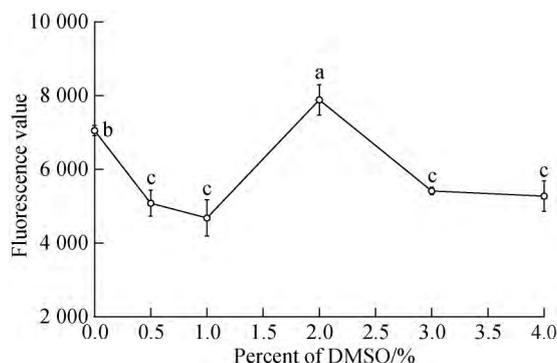


图 1 DMSO 浓度对尼罗红荧光值测定的影响

Fig. 1 Effect of various concentrations of DMSO on the fluorescence value of XJ002

由图 1 可知,当二甲基亚砜浓度体积分数为 0.0% 时,其荧光值也很高,表明不采用二甲基亚砜处理 XJ002 藻细胞的细胞膜也可以较好的测定荧光信号,这与 Chen 等的结果并不一致^[17]. 导致这种现象的原因可能与藻细胞所处的生长状态相关. 众所周知,藻细胞内中性脂的积累主要在稳定生长期,一般需要经过 15 d 左右的时间,在藻细胞生长过程中会释放许多代谢产物,他们可能会对藻细胞的细胞壁产生影响,导致藻细胞的细胞壁并不是那么的坚韧,因此尼罗红染料可以非常容易的进入细胞中. 但是,梁文艳等^[18]研究结果表明:完全的水环境会对尼罗红染料与中性脂结合后产生的荧光信号产生淬灭,通过添加二甲基亚砜可以有效缓解这种淬灭现象. 因此,虽然不采用二甲基亚砜处理 XJ002 藻细胞的细胞膜也可以较好的测定荧光信号,但是并不适合 XJ002 藻株荧光信号的检测.

2.1.2 尼罗红终浓度对 XJ002 藻株荧光信号强度的影响

尼罗红是一种脂溶性的荧光指针,其在水中的溶解性与荧光量均较低,能够与中性脂结合产生金黄色荧光信号,常被用于藻细胞内中性脂的测定^[19]。由图 2 可知,随着尼罗红处理浓度的增加,尼罗红染料与中性脂结合后产生的荧光信号呈现先增加后减少的总体趋势。当尼罗红浓度在 $1.5 \sim 2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内时,荧光信号强度较高,测定效果较好。当尼罗红终质量浓度为 $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,荧光信号强度最大。当尼罗红终质量浓度低于 $0.5 \sim 1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,荧光测定值比较小,这可能与太低浓度的尼罗红染料不能够充分的与藻细胞内中性脂结合,导致荧光信号较弱。当尼罗红质量浓度高于 $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,荧光测定值比较低,这可能是由于过高的尼罗红浓度会影响藻细胞活性,而且过高浓度的尼罗红溶液的背景测定值偏高,会影响荧光信号的测定。综上所述,尼罗红染液的最佳终质量浓度为 $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

由图 2 可知,只有二甲基亚砜体积分数为 2.0% 时,尼罗红染料与中性脂结合后产生的荧光信号强于对照组,说明过高或者过低体积分数的二甲基亚砜处理均不适合 XJ002 藻株荧光信号的测定。这可能是由于过低体积分数的二甲基亚砜渗透速度较慢,而过高体积分数的二甲基亚砜处理会遮盖尼罗红染料与中性脂结合后产生的荧光信号,导致荧光值不高。综上所述,二甲基亚砜处理 XJ002 藻细胞细胞壁的最佳体积分数为 2.0%。

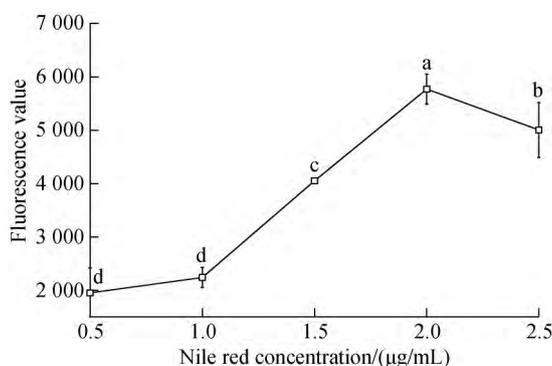


图 2 NR 终浓度对尼罗红荧光值测定的影响

Fig. 2 Effect of various concentrations of NR on the fluorescence value of XJ002

2.1.3 尼罗红染色时间对 XJ002 藻株荧光信号强度的影响

由图 3 可知,随着尼罗红染色时间的延长,尼罗红染料与中性脂结合后产生的荧光信号呈现先增加后减少的总体趋势。当尼罗红染色时间在 $1 \sim 10 \text{ min}$ 范围内时,荧光信号强度较高,测定效果较好。当染色时间大于 10 min 时,荧光信号强度急剧减少。当染色时间为 5 min 时,所测得的藻液荧光信号最强。由此可见,过短或者过长的染色时间均不利于荧光信号的检测。染色时间过短导致尼罗红染液不能充分的与藻细胞内中性脂结合,所以荧光值不高;而过长的染色时间,会使得荧光信号有所衰减,从而导致荧光值同样很低。综上所述,尼罗红最佳染色时间为 5 min 。

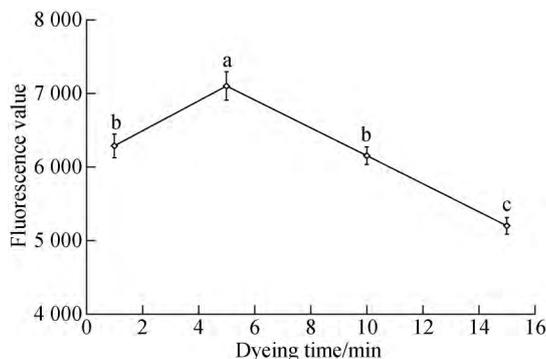


图 3 染色时间对尼罗红荧光值测定的影响

Fig. 3 Effect of various dyeing time on the fluorescence value of XJ002

2.2 XJ002 藻细胞内油脂含量与荧光信号强度间标准曲线的构建

为了快速而且方便的了解到藻细胞内油脂的含量,我们将采用有机溶剂测定的油脂含量与尼罗红染色荧光信号强度之间建立一定的线性关系,这样只要通过测定荧光信号强度就可以了解到藻细胞内油脂的含量.按照上述优化好的藻细胞尼罗红染色条件测定荧光信号强度与将对应的经氯仿甲醇提取后的藻细胞油脂含量建立的标准曲线如图4所示.从图中我们可以看出,藻细胞的荧光信号强度值在一定范围内与其胞内油脂含量存在一定的线性关系.其线性关系为: $Y = 145.79X + 1652.6$ ($R^2 = 0.9981$), 其中 Y 指荧光信号强度, X 指胞内油脂的含量 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), R^2 指两者的相关系数.

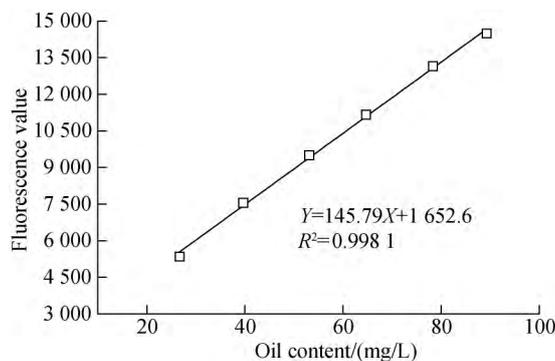


图4 斜生栅藻细胞油脂含量—荧光值标准曲线

Fig. 4 Standard curve of oil content and fluorescence value of XJ002

根据标准曲线,我们可以计算 XJ002 藻细胞的油脂含量 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).按照下面的公式计算 XJ002 藻株的油脂含量(单位为%): $M = A/B \times 100\%$; 其中 M 为 XJ002 藻株的油脂含量(%), A 为 XJ002 藻株的油脂含量 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), B 为斜生栅藻的干重 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

2.3 外源乙醇的添加对 XJ002 藻株生物量的影响

图5表示在一个完整的藻细胞培养周期内,外源乙醇的添加对 XJ002 藻细胞生物量的影响.由图可知,从第2天开始,不同体积分数的乙醇处理对藻细胞的生物量的影响表现出一定的差异.低浓度的乙醇处理对藻细胞生长影响不大,高浓度的乙醇处理使得藻细胞的生长状态受到明显的抑制.从第8天开始,低浓度的乙醇处理对藻细胞生长有了一定的促进作用,高浓度的乙醇处理显著抑制了藻细胞生物量的积累.当培养至15 d时,1%乙醇处理组的藻细胞生物量比对照组提高了16.19%,而3%乙醇处理组的藻细胞生物量比对照组降低了38.74%.藻细胞只有在适宜的环境条件下才可以保持良好的生长状况,低浓度的乙醇处理对藻细胞生物量的积累有促进作用,这与低浓度毒物的刺激效应一致,而高浓度的乙醇处理对藻细胞的生长代谢、光合作用以及藻细胞对营养盐的摄取都会产生显著地影响,导致藻细胞生长缓慢,甚至引起藻细胞的死亡(藻细胞在5%的乙醇处理条件下无法存活,藻细胞的颜色发黄,结果未给出).

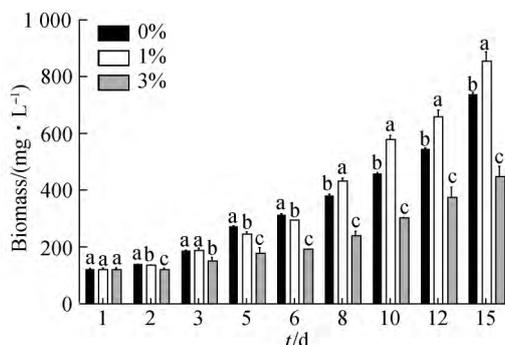


图5 不同浓度乙醇处理对 XJ002 藻细胞生长的影响

Fig. 5 Effect of various concentrations of ethanol on the biomass of XJ002

2.4 外源乙醇的添加对 XJ002 藻株光合色素的影响

表 2 表明,不同浓度乙醇处理条件下,XJ002 藻株胞内的光合色素具有显著的差异.低浓度的乙醇处理对藻细胞光合色素的含量影响不大,随着乙醇处理浓度的增加,叶绿素 a、叶绿素 b 以及类胡萝卜素均出现下降的总体趋势.与对照组相比,3%乙醇处理时,叶绿素 a 与类胡萝卜素分别下降了 82.00% 和 72.51% ($P < 0.01$).叶绿素 a 是大部分生物体内都存在的光合色素,是细胞内捕光色素蛋白复合体的重要组分,其含量可以作为藻细胞光合效率高低的参考指标.表 2 数据显示,高浓度的乙醇处理后,藻细胞的叶绿素 a 含量出现显著下降的趋势,表明高浓度的乙醇能够显著抑制藻细胞的光合作用.

表 2 不同浓度乙醇对斜生栅藻胞内光合色素含量的影响

Table 2 Effect of various concentrations of ethanol on the photosynthetic pigments of XJ002

| treatments/ (g · L ⁻¹) | chlorophyll-a/ (μg · mL ⁻¹) | chlorophyll-b/ (μg · mL ⁻¹) | Chl a + b/ (μg · mL ⁻¹) | carotenoids/ (μg · mL ⁻¹) | Chl a/b | Caro/Chl a + b |
|---------------------------------------|--|--|--|--|---------------|----------------|
| 0% | 5.067 ± 0.002 | 1.385 ± 0.030 | 6.452 ± 0.032 | 2.354 ± 0.029 | 3.661 ± 0.079 | 0.365 ± 0.003 |
| 1% | 4.415 ± 0.459 | 1.142 ± 0.091 | 5.557 ± 0.384 | 2.130 ± 0.125 | 3.866 ± 0.051 | 0.384 ± 0.004 |
| 3% | 0.912 ± 0.211 | 0.366 ± 0.042 | 1.278 ± 0.253 | 0.647 ± 0.076 | 2.477 ± 0.293 | 0.511 ± 0.042 |

2.5 外源乙醇的添加对 XJ002 藻株叶绿素荧光参数的影响

2.5.1 外源乙醇的添加对 XJ002 藻株叶绿素荧光诱导动力学曲线的影响

由图 6 可知,不同浓度乙醇处理 15 d 后各处理组的快速叶绿素荧光诱导动力学曲线有着显著的差异.随着乙醇处理浓度的增加,藻细胞快速叶绿素荧光诱导动力学曲线依次呈现出下降的总体趋势.乙醇对于藻细胞光合电子传递链的影响仍然需要通过特定的荧光参数来体现.

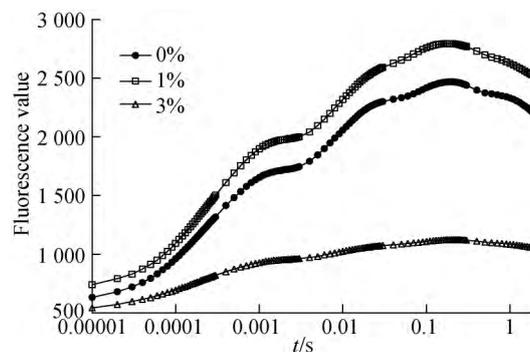


图 6 不同浓度乙醇处理对 XJ002 藻细胞叶绿素荧光诱导曲线的影响

Fig. 6 Effect of various concentrations of ethanol on the chlorophyll fluorescence induction curve of XJ002

2.5.2 外源乙醇的添加对 XJ002 藻株光合作用光系统 II 反应中心供体侧的影响

W_k 值是衡量藻细胞 PSII 反应中心供体侧放氧复合体是否受损的唯一指标, W_k 值的增加说明 PSII 反应中心供体侧的放氧复合体受损,进而影响了 PSII 反应中心供应电子的能力以及向下游传递电子的效率.由图 7 可知,不同体积分数的乙醇处理对 W_k 值的影响不大,表明外源乙醇的添加对 PSII 反应中心供体侧放氧复合体的结构无明显的损坏效应.

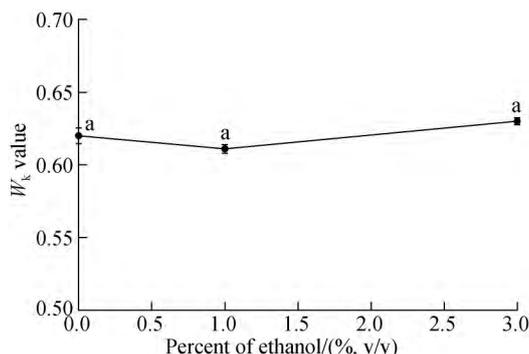
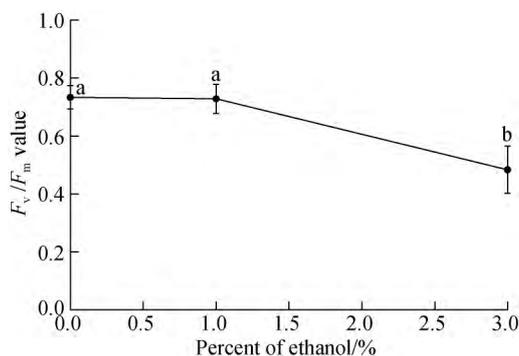
图7 不同浓度乙醇处理对 XJ002 藻株光系统 II 反应中心供体侧 W_k 值的影响

Fig. 7 Effect of various concentrations of ethanol on the donor side in photosystem II

2.5.3 外源乙醇的添加对 XJ002 藻株光合作用光系统 II 反应中心的影响

(1) 外源乙醇的添加对 XJ002 藻株光系统 II 最大光化学效率 (F_v/F_m) 的影响. F_v/F_m 值表示光系统 II 的最大光化学效率,通常可以反映藻细胞的光合效率以及胁迫环境对藻细胞的毒害程度.一般而言,藻细胞在有利的环境条件下 F_v/F_m 值可以保持基本不变,当藻细胞的生存环境出现变化时, F_v/F_m 值会出现显著地变化.由图 8 可知,低浓度的乙醇处理对 F_v/F_m 值的影响不大,高浓度的乙醇处理导致 F_v/F_m 值呈现出下降的趋势.当乙醇的体积分数为 3% 时, F_v/F_m 值较对照组降低了 34.06%,表明高浓度的乙醇处理显著抑制了光系统 II 的最大光化学效率,进而影响了藻细胞的光合效率.

图8 不同浓度乙醇处理对光系统 II 最大光化学效率 (F_v/F_m) 的影响Fig. 8 F_v/F_m value under various concentrations of ethanol

(2) 外源乙醇的添加对 XJ002 藻株光系统 II 反应中心能量分配的影响. ABS/RC 是指单位反应中心吸收的光能, DIo/RC 是指反应中心用于热耗散的能量, ETo/RC 是指反应中心用于电子传递的能量.由图 9 可知,低浓度的乙醇处理对光系统 II 反应中心的能量分配的影响不大,而高浓度的外源乙醇处理可以显著影响光系统 II 反应中心的能量分配.随着乙醇处理浓度的增加, ABS/RC 及 DIo/RC 值出现增加的趋势,而 ETo/RC 有所降低.当乙醇的处理浓度为 3% 时, ABS/RC 及 DIo/RC 值分别是对照组的 1.56 倍和 3.03 倍, ETo/RC 值较对照组降低了 22.37%.实验结果表明,随着乙醇处理浓度的增加,单位反应中心吸收的光能依次增加,但是反应中心用于电子传递的能量却出现下降的趋势,与此同时,反应中心用于热耗散的能量增加,说明反应中心吸收的过多的光能并没有用于藻细胞光合效率的提高,而是将多余的能量以热的形式散失,这可能是藻细胞在逆境胁迫下的自我保护机制.

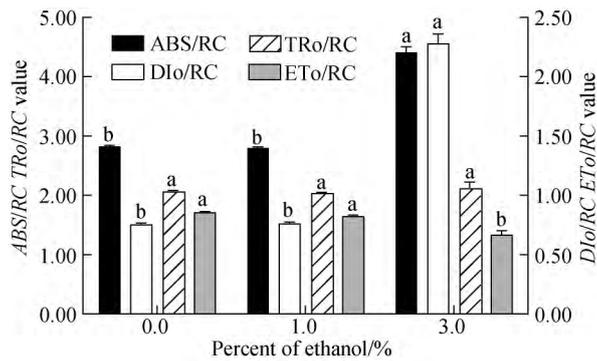


图 9 不同浓度乙醇处理对光系统 II 反应中心能量分配的影响

Fig. 9 Effects of various concentrations of ethanol on the energy distribution of reaction centers in photosystem II

2.5.4 代谢中间物的添加对 XJ002 藻株光系统 II 反应中心受体侧电子传递活性的影响

由图 10(A) 可知,随着乙醇处理浓度的增加, ETo/ABS 与 ETo/TRo 均出现降低的趋势,当 3% 乙醇处理藻细胞时, ETo/ABS 值与 ETo/TRo 值比对照组分别降低了 50.50% 和 24.70% ($P < 0.01$). 图 10(B) 可知, M_o 与 V_j 值随着乙醇处理浓度的增加表现出上升的总体趋势,各处理组间差异显著 ($P < 0.01$). 当乙醇处理浓度为 3% 时, M_o 与 V_j 值是分别是对照组的 1.21 和 1.17 倍 ($P < 0.01$). 研究结果表明,外源乙醇处理导致有活性的反应中心反应数量降低,中心吸收的光能更多的被用于 Q_A 的还原,使得 Q_A 被还原的速度加快了. 这将会导致藻细胞内大量积累 Q_A^- , 从而对藻细胞产生毒害作用.

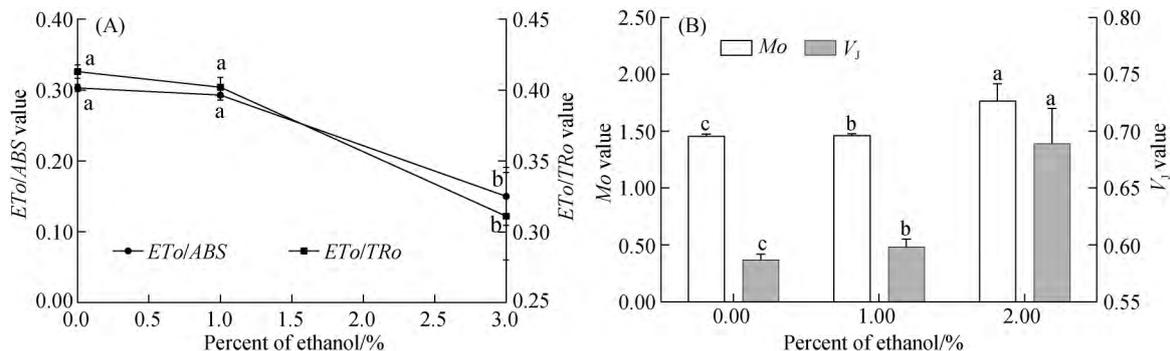


图 10 不同浓度乙醇处理对光系统 II 反应中心受体侧电子传递活性的影响

Fig. 10 Effects of various concentrations of ethanol on the electron transport activity of the acceptor side in photosystem II

2.6 添加外源代谢中间物对 XJ002 藻株胞内总脂含量的影响

由图 11 可知,不同体积分数乙醇的添加对藻细胞内总脂含量产生了显著影响. 低浓度的乙醇处理会降低细胞内总脂含量,高浓度的乙醇处理有助于细胞内总脂的积累. 当乙醇处理浓度为 1% 时, XJ002 藻株胞内总脂含量较对照组降低了 14.06%, 而乙醇处理浓度为 3% 时, XJ002 藻株胞内总脂含量较对照组提高了 5.19%. 乙酰辅酶 A 是细胞内脂肪酸合成的初始原料,给细胞提供足够量的乙酰辅酶 A 将有助于细胞内总脂的积累. 乙醇在细胞内可以氧化为乙酸,乙酸在乙酰辅酶 A 合成酶的作用下,利用 ATP 能量转化成乙酰辅酶 A,进而参与细胞内油脂的合成. 藻细胞可以在低浓度的乙醇环境中较好的生存,此时乙醇可以为藻细胞提供生长过程中的碳源,但是高浓度的乙醇处理,对藻细胞的形成了逆境条件,此时细胞内的碳原子流向会发生改变,使得细胞内积累更多的油脂含量,以此抵抗不利的生长环境. 除此之外,藻细胞内油脂的积累与胞内活性氧水平有关^[10],而乙醇可以引起活性氧生成^[12],进而可以引起细胞内油脂含量的提高. 此外,本研究结果表明,高浓度的乙醇处理显著地抑制了藻细胞的光合作用,使得胞内更多的碳原子用于中性脂的合成,从而使得总脂的含量有了一定程度的提高.

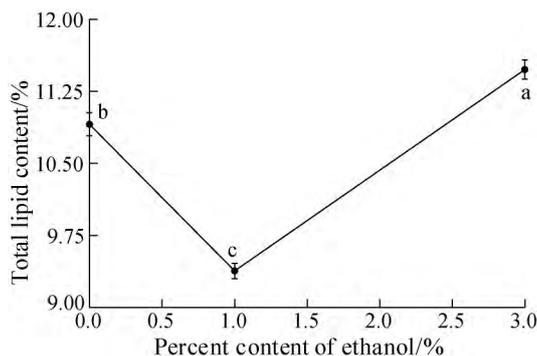


图 11 不同浓度乙醇处理对 XJ002 藻细胞总脂含量的影响

Fig. 11 Effects of various concentrations of ethanol on the total lipid content of XJ002

3 结论

建立了利用酶标仪对 XJ002 藻细胞的中性脂进行相对定量分析的方法,通过二甲基亚砜体积分数,尼罗红染色时间和尼罗红用量的选择优化了尼罗红荧光染色的条件. XJ002 藻细胞尼罗红染色最佳条件为:二甲基亚砜体积分数为 2%,尼罗红的终浓度为 $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,尼罗红的染色时间为 5 min. 高浓度乙醇的添加导致 XJ002 藻细胞生物量、叶绿素 a、叶绿素 b 以及类胡萝卜素含量显著下降. 与此同时,影响了光系统 II 反应中心的能量分配以及光系统 II 反应中心受体侧的电子传递活性,显著提高了 XJ002 藻株胞内总脂含量.

参 考 文 献

- [1] RAHEEM A, AZLINA W W, YAP Y H T, et al. Thermochemical conversion of microalgal biomass for biofuel production [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2015, 49: 990-999.
- [2] MAKAREVICIENE V, SKORUPSKAITE V, ANDRULEVICIUTE V. Biodiesel fuel from microalgae—promising alternative fuel for the future: a review [J]. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2013, 12(2): 119-125.
- [3] RAWAT I, KUMAR R R, MUTANDA T, et al. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production [J]. *Applied Energy* 2011, 88(10): 3411-3424.
- [4] ABDEL-RAOUF N, AL-HOMAIDAN A A, IBRAHEEM I B M. Microalgae and wastewater treatment [J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2012, 19(3): 257-275.
- [5] HU Q, SOMMERFELD M, JARVIS E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances [J]. *The plant journal* 2008, 54(4): 621-639.
- [6] WIJFFELS R H, BARBOSA M J. An outlook on microalgal biofuels [J]. *Science* 2010, 329(5993): 796-799.
- [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(8): 911-917.
- [8] FOWLER S D, BROWN W J, WARFEL J, et al. Use of Nile red for the rapid in situ quantitation of lipids on thin-layer chromatograms [J]. *Journal of lipid research*, 1987, 28(10): 1225-1232.
- [9] DE LAJARA A, MENDOZA H, MARTEL A, et al. Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, *Cryptocodinium cohnii* [J]. *Journal of Applied Phycology* 2003, 15(5): 433-438.
- [10] KIM D G, LEE C, PARK S M, et al. Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using *Chlorella vulgaris* [J]. *Bioresource technology* 2014, 159: 240-248.
- [11] BOUSSIBA S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response [J]. *Physiologia Plantarum*, 2000, 108(2): 111-117.
- [12] BAILEY S M, PIETSCH E C, CUNNINGHAM C C. Ethanol stimulates the production of reactive oxygen species at mitochondrial complexes I and III [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 27(7): 891-900.
- [13] WEN Z, LIU Z, HOU Y, et al. Ethanol induced astaxanthin accumulation and transcriptional expression of carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Enzyme and microbial technology* 2015, 78: 10-17.
- [14] GU W L, AN G H, JOHNSON E A. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma* [J]. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 1997, 19(2): 114-117.

- [15] SARTORY D P ,GROBBELAAR J U. Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis [J]. *Hydrobiologia* ,1984 ,114(3) :177-187.
- [16] 李鹏民 ,高辉远. 快速叶绿素荧光诱导动力学分析在光合作用研究中的应用 [J]. *植物生理与分子生物学报* ,2005 ,31(6) :559-566.
- [17] CHEN M ,TANG H ,MA H ,et al. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta* [J]. *Bioresource technology* ,2011 ,102(2) :1649-1655.
- [18] 梁文艳 ,张元春 ,曹敬灿 ,等. 采用尼罗红荧光探针对接藻中油脂的定量测定 [J]. *环境化学* ,2013 ,32(8) :1491-1495.
- [19] BANERJEE A ,SHARMA R ,CHISTI Y ,et al. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals [J]. *Critical reviews in biotechnology* ,2002 ,22(3) :245-279.

Effects of ethanol on chlorophyll fluorescence and total lipid content of *Scenedesmus obliquus* XJ002

CHENG Jie^{1,2} ,JI Xiang² ,DING Yong-cheng³

(1. College of Ocean and Earth Sciences ,State Key Laboratory of Marine Environmental Science ,Xiamen University ,Xiamen 361102 ,China;

2. Inner Mongolia Key Laboratory of Biomass-Energy Conversion ,Baotou 014010 ,China;

3. Coastal and Ocean Management Institute ,Xiamen University ,Xiamen 361000 ,China)

Abstract: In order to study the effects of exogenous ethanol on photosynthetic efficiency and total lipid content in *Scenedesmus obliquus* XJ002. We established a simple method to determine the intracellular lipid content of *Scenedesmus obliquus* XJ002 ,and explored the method of using Nile red fluorescent dyes for rapid determination of intracellular lipid content and added ethanol to study biomass ,photosynthetic pigments ,chlorophyll fluorescence characteristics and lipid content of XJ002. The results showed that it was feasible to determine the intracellular lipid content of XJ002 strain by staining of Nile red fluorescent dye. The optimum conditions for Nile red staining of the XJ002 strain were as follows: volume percentage of DMSO was 2% ,the concentration of Nile red was $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,and the staining time of Nile red was 5 min. At the same time ,the addition of high concentrations of ethanol resulted in a significant decrease in biomass ,chlorophyll a ,chlorophyll b and carotenoid content. The high concentration treatments could influence the energy distribution of reaction centers in photosystem II ,and inhibit electron transfer activity of receptor side of reaction center in photosystem II . The addition of ethanol resulted in a significant increase in the total lipid content of XJ002. When the concentration of ethanol was 3% ,the total lipid content was 5.19% higher than control group. Thus ethanol has the potential to be used as an effective reagent to induce lipid accumulation in XJ002 strain.

Key words: *Scenedesmus obliquus*; ethanol; Nile red; chlorophyll fluorescence; total lipid

(责任编辑: 林险峰)