

微藻总脂含量快速测定的方法比较

魏东¹, 袁显渊¹, 向文洲²

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 中国科学院南海海洋研究所, 广东广州 510301)

摘要: 快速、可靠、简便的总脂含量测定方法在富油藻种筛选、功能性藻油评估及微藻生物学研究中至关重要。本研究以三种微藻(微绿球藻 *Nannochloris* sp.、普通小球藻 *Chlorella vulgaris*、绿色巴夫藻 *Pavlova viridis*)藻粉为原料,系统比较了四种方法(Bligh-Dyer法、改良Bligh-Dyer法、ASTM标准法和皂化法)用于测定微藻中总脂含量的差异,并以原位转酯法为对照,进一步分析了各方法总脂提取物中的脂肪酸含量及组成。改良Bligh-Dyer法和ASTM标准法总脂测定结果稳定,脂肪酸回收率最高,三种藻粉中分别为93.65%和93.74%、85.02%和85.77%、88.62%和88.84%;两者总脂含量及提取物中脂肪酸的组成和含量均无显著差异($p>0.05$)。显然,改良Bligh-Dyer法操作简便、分析时间短(1 h)、所需样品量少(0.25 g),可替代ASTM标准法,作为实验室快速准确测定微藻总脂含量的首选方法。

关键词: 微藻; 总脂; 脂肪酸; 改良Bligh-Dyer法; 皂化法

文章编号: 1673-9078(2014)7-242-246

Comparison of Methods for Rapid Determination of Total Lipid Content in Microalgae

WEI Dong¹, YUAN Xian-yuan¹, XIANG Wen-zhou²

(1. School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510301, China)

Abstract: The rapid, reliable and easy manipulated method for determination of total lipid content in microalgae is crucial important for screening oleaginous strains, evaluation of functional oil from microalgae and microalgal biological research. Using dry powder of three microalgae (*Nannochloris* sp., *Chlorella vulgaris* and *Pavlova viridis*) as feedstock, the difference of four methods (Bligh-Dyer, modified Bligh-Dyer, ASTM standard and direct saponification methods) was systematically compared in terms of determining total lipid content in microalgae. The fatty acid contents and compositions in crude extracts from different methods were further profiled by GCMS with *in situ* transesterification method as control. The results showed that the modified Bligh-Dyer and ASTM standard methods had steady extraction outcomes with the highest fatty acid recoveries at 93.65% vs 93.74%, 85.02% vs 85.77%, and 88.62% vs 88.84% in three powders, respectively. Moreover, no significant difference ($p>0.05$) appeared in total lipid and fatty acid contents and compositions in extracts by the two methods. Obviously, the modified Bligh-Dyer method is a simple and preferred method with less amount demand of sample (0.25 g) and short time-consuming (1.0 h) for the rapid determination of total lipid content in microalgae, which is an alternative of ASTM standard method in laboratories.

Key words: microalgae; total lipid; fatty acid; modified Bligh-Dyer method; direct saponification method

微藻 (*microalgae*) 具有生长速度快、营养物质丰富、不与农林业争地,能利用多种非可饮用水源人工规模培养等优点^[1],尤其是某些富含功能性油脂(超长链不饱和脂肪酸,如ARA、EPA、DHA等)的微

收稿日期: 2014-2-10

基金项目: 国家 863 计划项目 (2013AA065802); 国家海洋局海洋可再生资源专项资金资助项目 (GHME2011SW04); 广东省教育部产学研结合重点项目 (2011A090200073)

作者简介: 魏东 (1966-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事工业生物技术研究开发

藻,在食品^[2]、保健品^[3],甚至水产饵料^[4]和饲料添加剂中的应用越来越广泛。此外,随着化石能源的枯竭和环境污染的加剧,微藻生物燃料的开发和应用受到了广泛关注^[5]。微藻种类多,结构及营养组成各异,无论是发酵法还是户外光自养大规模培养法培养微藻,富油藻种的筛选评价和积累油脂的过程控制始终是藻油生产的技术关键。因此,快速、准确、简便分析藻细胞中的油脂含量至关重要。

目前,微藻总脂含量的检测方法主要包括染色法、傅立叶红外光谱法、核磁共振法、重量法、超临界 CO₂

提取法和离子液提取法等^[6]。前三种方法虽然所需样品量少、测定时间短,但操作复杂、总脂含量测定均为相对值;染色法存在荧光染料较难穿透细胞壁导致测定结果重现性不好的问题^[6];超临界 CO₂ 提取法和离子液提取法提取效率高,但设备要求高、测定费用贵。传统的重量法(有机溶剂提取后称重的方法)虽然所需样品量相对较多,但操作简便、测试成本低、测定结果稳定且为绝对值,被广泛应用于实验研究及生产控制。本研究以产油能力高的微绿球藻、普通小球藻和绿色巴夫藻^[7]的藻粉为原料,采用5种不同的重量法对它们的总脂进行了测定,并以原位转酯法测定的脂肪酸含量为对照,通过进一步分析各方法粗脂提取物中的脂肪酸组分及含量,寻求一种快速、准确的微藻总脂含量测定方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

海洋微绿球藻(*Nannochloris* sp.)藻泥(含水率约为79.4%)由中科院南海海洋研究所提供;普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)和绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*)藻粉由福建新大泽生物科技有限公司提供。内标十九碳饱和脂肪酸(C19:0)购自美国Sigma公司;甲醇、氯仿、无水乙醇、正己烷、氢氧化钾、磷酸氢二钾等均为分析纯。

6890-5975 气相色谱-质谱联用仪、高效毛细管柱DB-23(0.25 μm, 30 m×0.25 mm)购自美国Agilent公司;DW3型冷冻干燥机购自美国热电公司;Allegra 25R台式高速冷冻离心机购自美国贝克曼库尔特公司。

1.2 研究方法

1.2.1 样品预处理

微绿球藻藻泥用去离子水离心清洗三次以除去盐分,冷冻干燥备用。

1.2.2 油脂提取

1.2.2.1 Bligh-Dyer 法

按文献^[8]的方法进行了适当修改:称取4.00 g藻粉,加10 mL水、120 mL甲醇-氯仿(2:1, V/V),混匀0.1 h,再加入40 mL氯仿,抽滤,收集滤液,加62 mL水,静置过夜。分离下层溶液,用氯仿定容至10 mL,待测。

1.2.2.2 改良 Bligh-Dyer 法

称量0.25 g藻粉,加12.5 mL氯仿、25 mL甲醇、10 mL 50 mM K₂HPO₄ (pH 7.4)缓冲液,震荡1 h,再加入12.5 mL氯仿、12.5 mL 50 mM K₂HPO₄ (pH 7.4)缓冲

液,混匀,静置。分离下层溶液,用氯仿定容至10 mL,待测。

1.2.2.3 皂化提取法^[9]

分别以96%乙醇和正己烷-乙醇(1:2.5, V/V)为溶剂进行两种皂化提取实验。称量0.50 g藻粉,加38 mL 3 mM KOH 乙醇或正己烷-乙醇溶液,60 °C下100 r/min水浴震荡1 h,收集提取液,加10 mL水,用20 mL正己烷分两次萃取,收集上层溶液;剩余溶液用HCl:H₂O(1:1, V/V)调pH至1,再用20 mL正己烷分两次萃取。合并所有萃取液后旋转蒸发浓缩,用氯仿定容至10 mL,待测。

1.2.2.4 ASTM 标准法^[10]

参照ASTM D5369-93(2008)标准,称量10.00 g藻粉,用纤维膜包好,以正己烷和乙醇各100 mL为溶剂,75~80 °C下索氏提取10 h,提取液旋转蒸发浓缩,用氯仿定容至10 mL,待测。

1.2.3 总脂含量测定

取5.00 mL定容液于已称重的铝碟,60 °C烘干至恒重,计差重。

1.2.4 原位转酯法^[11]测定微藻中脂肪酸含量

称量0.10 g藻粉,加0.20 mL 1.00 mg/mL C19:0 二氯化碳溶液,再加入1 mL 5% (V/V) H₂SO₄-甲醇溶液,90 °C水浴震荡0.5 h。冷却后,加入5 mL正己烷,90 °C水浴震荡15 min,静置,取1 mL上层溶液于进样瓶中进行气质分析,面积归一化法计算脂肪酸含量,再换算出藻粉干重的脂肪酸含量。

1.2.5 总脂提取物中脂肪酸组分分析

取1.00 mL定容液于10 mL玻璃螺口管,甲酯化采用硫酸-甲醇法^[12],取1 mL上层溶液于进样瓶中进行气质分析。

GC/MS 分析条件:高纯氦气作为载气,流速为1 mL/min。进样量1 μL,分流比1:2,进样口和检测器温度分别为235 °C和240 °C。升温程序:100 °C保持1 min,然后以10 °C/min升至235 °C保持10 min。质谱分析采用扫描方式,扫描范围33~450 u。各峰型的鉴定采用NIST05a 谱库自动检索。根据各脂肪酸相对于C19:0 内标的峰面积,计算各脂肪酸组分的绝对含量^[13],再换算出在总脂干重中的脂肪酸含量。

1.3 分析方法

1.3.1 脂肪酸回收率的计算方法

脂肪酸回收率=不同方法得到的总脂提取物中的总脂肪酸含量/原位转酯法测得的总脂肪酸含量×100%

1.3.2 数据处理方法

采用Excel 2003 进行数据处理,结果以平均值±标

准差形式表示, 并采用 t 检验进行差异性分析。

2 结果与讨论

2.1 不同微藻中的脂肪酸组成

原位转酯法 (*in suit transesterification*), 也称直接转酯法 (*direct transesterification*), 由于不需要经过油脂提取过程, 直接将细胞中的油脂转化成脂肪酸甲酯, 比传统的提取油脂后再进行转酯化的方法获得的脂肪

酸甲酯更多, 被广泛应用于微藻脂肪酸组分分析^[12], 但由于单位质量所需的有机试剂及催化剂太多, 成本太高而不适合用于规模化生产。由表 1 可知, 普通小球藻、绿色巴夫藻和微绿球藻中不饱和脂肪酸总量占总脂肪酸的比例分别达到 64.97%、49.87% 和 70.32%, 多不饱和脂肪酸总量占总脂肪酸的比例分别达到 58.08%、11.65% 和 59.66%, 其中绿色巴夫藻还含有 EPA, 是非常理想的功能性油脂原料。

表 1 原位转酯法分析三种微藻的脂肪酸组分 (n≥3)

Table 1 Fatty acid compositions of three microalgae by in suit transesterification

脂肪酸	普通小球藻		绿色巴夫藻		微绿球藻	
	含量/%DW	占总脂肪酸比例/%	含量/%DW	占总脂肪酸比例/%	含量/%DW	占总脂肪酸比例/%
C14:0	0.06±0.00	0.67±0.11	0.67±0.01	9.65±0.23	0.11±0.00	1.68±0.08
C16:0	2.68±0.04	29.09±0.46	2.70±0.02	39.12±0.31	1.66±0.02	25.26±0.37
C16:1	0.27±0.00	2.89±0.15	2.57±0.03	37.23±1.37	0.47±0.01	7.20±0.16
C16:2	0.45±0.02	4.92±0.23	0.05±0.00	0.68±0.07	0.63±0.01	9.58±0.13
C16:3	0.85±0.05	9.25±0.50	0.05±0.00	0.70±0.07	0.42±0.01	6.40±0.16
C18:0	0.48±0.03	5.26±0.32	0.09±0.00	1.36±0.10	0.08±0.00	1.16±0.09
C18:1	0.37±0.02	4.00±0.17	0.07±0.00	0.99±0.05	0.23±0.02	3.46±0.28
C18:2	1.54±0.05	16.71±0.50	0.17±0.00	2.50±0.11	1.71±0.03	25.95±0.41
C18:3	2.50±0.04	27.20±0.45	0.25±0.02	3.68±0.07	1.17±0.02	17.73±0.27
C20:5	ND	0.00	0.28±0.00	4.08±0.06	ND	0.00
C24:0	ND	0.00	ND	0.00	0.10±0.00	1.57±0.01
TFA	9.20±0.18	100.00±1.99	6.90±0.06	100.0±0.88	6.58±0.07	100.00±1.04
USFA	5.98±0.18	64.97±1.96	3.44±0.07	49.87±1.17	4.62±0.05	70.32±0.77
PUFA	5.34±0.15	58.08±1.64	0.80±0.02	11.65±0.24	3.92±0.05	59.66±0.73

注: TFA, 总脂肪酸; USFA, 不饱和脂肪酸; PUFA, 多不饱和脂肪酸; ND, Not Detected。

2.2 不同测定方法的结果比较

表 2 不同方法测得的三种微藻总脂含量

Table 2 Total lipid contents in three microalgae by different methods

原料	测定方法	总脂含量 /%DW	脂肪酸占总 脂百分比/%	脂肪酸 回收率/%
普通小球藻	Bligh-Dyer 法	13.93±0.10	38.53±0.81	58.95±1.05
	改良 Bligh-Dyer 法	18.40±0.20	46.83±0.74	93.65±0.47
	皂化提取(乙醇)法	5.47±0.45	23.06±2.52	13.62±0.35
	皂化提取(正己烷:乙醇)法	5.20±0.40	30.14±3.28	16.94±0.58
	ASTM 标准法	18.43±0.23	45.79±0.32	93.74±1.30
绿色巴夫藻	Bligh-Dyer 法	8.33±0.52	46.71±1.61	56.38±0.88
	改良 Bligh-Dyer 法	11.97±0.31	49.05±1.86	85.02±1.09
	皂化提取(乙醇)法	4.47±0.06	63.76±2.17	41.29±1.88
	皂化提取(正己烷:乙醇)法	5.33±0.21	72.66±3.36	56.10±0.51
	ASTM 标准法	12.61±0.04	45.84±0.07	85.77±0.37

转下页

接上页

	Bligh-Dyer 法	6.38±0.20	72.69±1.94	70.47±2.66
	改良 Bligh-Dyer 法	21.46±0.17	24.10±0.62	88.62±1.45
微绿球藻	皂化提取(乙醇)法	6.83±0.14	29.18±1.14	30.31±1.16
	皂化提取(正己烷:乙醇)法	10.07±0.18	32.50±0.64	49.78±1.28
	ASTM 标准法	20.22±0.75	24.68±0.66	88.84±0.63

由表 2 可知,用不同方法测得的三种微藻总脂及脂肪酸含量差异很大,以原位转酯法测定的脂肪酸含量为对照,改良 Bligh-Dyer 法和 ASTM 标准法脂肪酸回收率最高、提取效果稳定,两者测得的总脂及其提取物中脂肪酸均无显著性差异 ($p>0.05$),普通小球藻、绿色巴夫藻和微绿球藻中脂肪酸回收率分别为 93.65% 和 93.74%、85.02% 和 85.77%、88.62% 和 88.84%,较

其它方法能更好地测定微藻中功能性油脂的含量。而 ASTM 标准法容易受实验装置、冷凝水水温等多方面影响,与之相比,改良 Bligh-Dyer 法操作简单,所需的试剂量、操作时间和藻粉干重分别是 ASTM 标准法的 1/4、1/10 和 1/40 (见表 3)。因此,改良 Bligh-Dyer 法可替代 ASTM 标准法用于实验室快速准确测定藻细胞中的总脂含量。

表 3 不同测定方法操作参数的比较

Table 3 Comparison of operation parameters from different assay methods

测定方法	Bligh-Dyer 法	改良 Bligh-Dyer 法	皂化提取 (乙醇)法	皂化提取 (正己烷-乙醇)法	ASTM 标准法
提取时间/h	0.1	1	1	1	10
藻粉干重/g	4	0.25	0.5	0.5	10
有机溶剂 /mL	甲醇 80 氯仿 80	甲醇 25 氯仿 25	乙醇 48 正己烷 20	乙醇 37 正己烷 31	乙醇 100 正己烷 100

Bligh-Dyer 法测得的普通小球藻、绿色巴夫藻和微绿球藻中总脂含量分别是改良 Bligh-Dyer 法所测值的 75.71%、69.59% 和 29.73%。一方面,由于在相同的甲醇-氯仿 (1:1, V/V) 体系中,改良 Bligh-Dyer 法提取时间是 Bligh-Dyer 法的 10 倍,随着提取时间的延长,细胞内甘油三酯不断被萃取出来,导致总脂提取物中脂肪酸所占的比例不断提高 (普通小球藻从 38.53% 提高到 46.83%,绿色巴夫藻从 46.71% 提高到 49.05%)。另一方面,由于改良 Bligh-Dyer 法中每克生物质干重所对应的甲醇和氯仿均为 100 mL,是 Bligh-Dyer 法 (20 mL/g 生物质) 的 5 倍,藻细胞被严重破坏,膜脂、糖脂等被溶解。研究表明,虽然 Bligh-Dyer 法测定时间短,但分析时容易因藻细胞结构不同而产生总脂提取是否充分的问题,不能准确测定藻细胞中的总脂含量。

皂化提取法中将脂肪酸转化成脂肪酸钾盐,先用正己烷萃取不可皂化的油脂,然后用盐酸将脂肪酸钾盐还原成脂肪酸,再用正己烷萃取。Sheng 等人用皂化法提取 *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 中的油脂,其测得的总脂含量是 Bligh-Dyer 萃取法的 1.17 倍^[14],与本实验中微绿球藻的结果基本一致。但该方法在三种藻中的脂肪酸回收率均最低,并不能真实反映微藻用于功能油脂开发的潜力。

2.3 不同方法来源的总脂提取物中脂肪酸组成分析

三种微藻不同方法获得的总脂提取物中,每种脂肪酸占总脂肪酸的比例没有显著性差异 (见图 1),但提取的脂肪酸组成和含量差异性显著 ($p<0.05$)。以 96% 乙醇为溶剂的皂化提取法提取的各脂肪酸含量最低。改良 Bligh-Dyer 法和 ASTM 标准法提取的各脂肪酸的组成最齐全、含量均为最高,与原位转酯法直接测得的各脂肪酸含量最为接近。这进一步说明改良 Bligh-Dyer 法和 ASTM 标准法能够准确衡量微藻用于功能性油脂开发的能力。

3 结论

本文从总脂含量、脂肪酸组分及含量和测定操作参数等方面,综合比较了三种微藻的总脂含量在五种方法下的测定结果,证实了改良 Bligh-Dyer 法和 ASTM 标准法获得的总脂及脂肪酸回收率高且无显著性差异。其中,改良 Bligh-Dyer 法耗时短、操作简单、所需藻粉量少,可代替 ASTM 标准法作为实验室快速准确筛选优良藻株及监控油脂积累过程的首选方法。同时,脂肪酸组成分析表明,三种藻富含多不饱和脂肪

酸, 适合用于功能性油脂的开发。

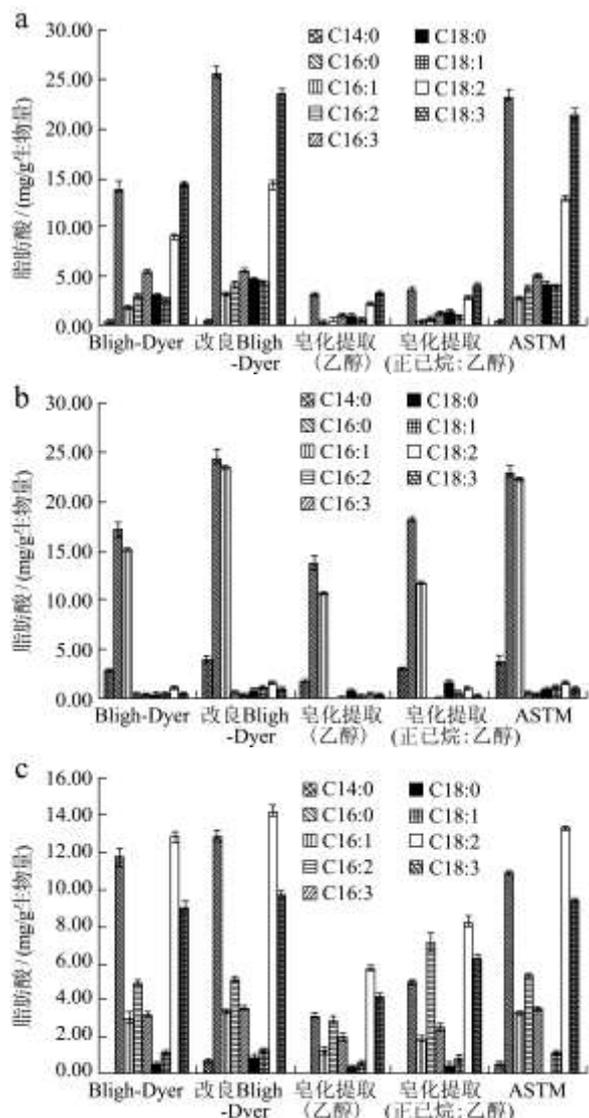


图1 不同方法来源的总脂提取物中脂肪酸含量

Fig.1 Fatty acid composition in total lipid extraction from different methods

注: a: 普通小球藻, b: 绿色巴夫藻, c: 微绿球藻。

参考文献

[1] 陈峰,姜悦.微藻生物技术[M].北京:中国轻工业出版社,1999
CHEN Feng, JIANG Yue. The biotechnology of microalgae [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999

[2] 彭云,李汴生,林应胜,等.微藻 DHA 在蛋糕中的应用[J].现代食品科技,2012,28(2):200-203,199
PENG Yun, LI Bian-sheng, LIN Ying-sheng, et al. Application of microalgal DHA in cake [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(2): 200-203, 199

[3] 王冬琴,谭瑜,卢虹玉,等.微藻生物活性物质在食品工业中的应用进展[J].现代食品科技,2013,29(5):1185-1191
WANG Dong-qin, TAN Yu, LU Hong-yu, et al. Application of

microalgal bioactives in food industry [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(5): 1185-1191

[4] 俞建中,梁欣欣,魏东,等.三种饵料微藻在凡纳滨对虾育苗中的饲喂效果评价[J].现代食品科技,2013,29(4):762-767
YU Jian-zhong, LIANG Xin-xin, WEI Dong. Feeding effect evaluation of three microalgae in the larval rearing of *Litopenaeus vannamei* [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(4): 762-767

[5] Scott S A, Davey M P, Dennis J S, Et al. Biodiesel from algae: challenges and prospects [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2010, 21(3): 277-286

[6] 梁英,石伟杰,田传远.微藻总脂含量测定方法概述[J].中国海洋大学学报,2012,42(5):35-40
LIANG Ying, SHI Wei-jie, TIAN Chuan-yuan. A review of the methods for determining total lipid content in microalgae [J]. Periodical of Ocean University of China, 2012, 42(5): 35-40

[7] Rodolfi L, Chini Zittelli G, Bassi N, et al. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2008, 102(1): 100-112

[8] 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

[9] Cartens M, Grima E M, Medina A R, et al. Eicosapentaenoic acid (20:5n-3) from the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1996, 73(8): 1025-1031

[10] ASTM. D5369-93 (2008), Standard practice for extraction of solid waste samples for chemical analysis using soxhlet extraction [S]

[11] Griffiths M, Van Hille R, Harrison S T L. Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae [J]. Lipids, 2010, 45(11): 1053-1060

[12] Sathish A, Sims R C. Biodiesel from mixed culture algae via a wet lipid extraction procedure [J]. Bioresource Technology, 2012, 118: 643-647

[13] Wahlen B D, Willis R M, Seefeldt L C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 2724-2730

[14] Sheng J, Vannela R, Rittmann B E. Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC 6803 [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 1697-1703

现代食品科技