

# 尼罗红染色荧光定量海洋微拟球藻胞内油脂含量

李玉芹, 苏裴, 马怡然, 尹帅, 陈赛兰, 胡雅婷

(湘潭大学 化工学院, 湖南 湘潭 411105)

**摘要:**以海洋微拟球藻 *Nannochloropsis oceanica* 为受试对象, 采用尼罗红染色荧光定量胞内油脂含量。采用单因素实验考察了激发波长、发射波长、二甲基亚砜体积分数、染色时间、尼罗红质量浓度对微藻胞内油脂荧光强度的影响, 在此基础上, 采用响应面实验进行染色荧光定量条件优化。结果表明, 优化的微拟球藻胞内油脂尼罗红染色荧光定量最佳条件为二甲基亚砜体积分数 25.6%、染色时间 16 min、尼罗红质量浓度 0.11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、激发波长 430 nm、发射波长 685 nm。在最佳条件下, 尼罗红染色微拟球藻胞内油脂荧光强度与油脂含量显著正相关 ( $R^2 = 0.9999$ ), 说明通过尼罗红染色荧光法可快速表征微拟球藻胞内油脂含量。研究结果为后续微拟球藻资源高值化应用及高产油脂海洋微藻快速筛选和动态追踪微藻产油过程提供了依据。

**关键词:**海洋微拟球藻; 油脂含量; 尼罗红; 荧光强度

中图分类号: O657.3; TQ646

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2021)11-0121-07

## Fluorescent quantitation of oil content in marine

### *Nannochloropsis oceanica* by Nile Red staining

LI Yuqin, SU Pei, MA Yiran, YIN Shuai, CHEN Sailan, HU Yating

(School of Chemical Engineering, Xiangtan University, Xiangtan 411105, Hunan, China)

**Abstract:** The oil content of *Nannochloropsis oceanica* was quantified using Nile Red staining and fluorescence method. The effects of excitation wavelength, emission wavelength, dimethyl sulfoxide (DMSO) volume fraction, Nile Red staining time and Nile Red mass concentration on fluorescence intensity of *N. oceanica* oil were investigated by single factor experiment. Then, the response surface methodology was used to optimize the Nile Red staining conditions as follows: excitation wavelength 430 nm, emission wavelength 685 nm, DMSO volume fraction 25.6%, Nile Red staining time 16 min, Nile Red mass concentration 0.11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Under the optimal conditions, the oil content of *N. oceanica* was positively correlated with fluorescence intensity ( $R^2 = 0.9999$ ), which demonstrated that Nile Red staining and fluorescence quantitation could be used to rapidly and exactly detect the oil content in *N. oceanica*. The outcomes would be applied in high value application of *N. oceanica*, screening microalgal strains with higher oil content in large scale and dynamically tracking the oil-producing process of microalgae.

**Key words:** *Nannochloropsis oceanica*; oil content; Nile Red; fluorescence intensity

微藻因光合固碳效率高、生长周期短、胞内油脂含量丰富以及优良的脂肪酸组成等优势, 被认为是

低碳环保及可再生性生物柴油炼制的极佳原料<sup>[1-2]</sup>。然而, 微藻基生物柴油低成本产业的关键涉及高油脂含量藻株的筛选以及微藻产油条件的优化, 这些筛选优化过程均需频繁定量微藻胞内脂质, 因而简便快速、样品用量少、低能耗的高通量微藻脂质测定方法对于微藻生物柴油工业化尤为重要<sup>[3]</sup>。

近年来, 细胞染色荧光法因高效简便、样品需求

收稿日期: 2021-02-28; 修回日期: 2021-06-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(21676228); 湖南省教育厅重点项目(18A068)

作者简介: 李玉芹(1979), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为功能油脂(E-mail) yuqinli2004@xtu.edu.cn。

量小、污染少、可高通量操作等优势备受关注,其中尼罗红易溶于有机试剂,染色机制清晰,且在特定波长下荧光强度与油脂含量线性关系较好,具有可高通量操作及多藻适用性等优势,常被用于微藻产油全过程可视化动态监测及油脂含量测定<sup>[4-8]</sup>。邢欣等<sup>[9]</sup>对布朗葡萄藻油脂含量与荧光强度回归分析,发现两者相关性较好,利用尼罗红染色荧光定量布朗葡萄藻油脂含量结果更为稳定;蒋晓艳等<sup>[10]</sup>发现裂殖壶藻油脂含量与荧光强度有良好的线性关系,并确定了尼罗红快速检测油脂含量的最优染色条件。此外,尼罗红染色法也被广泛用于小球藻、隐甲藻、栅藻、杜氏盐藻、球等鞭金藻、三角褐指藻、莱茵衣藻等藻种生长条件维持、工程藻株构建和培养及油脂富集条件优化过程中的脂质定量<sup>[5]</sup>。

微藻种类繁多,遗传特性迥异,加之不同培养条件下微藻脂质成分各异,因而尼罗红染色定量微藻脂质受藻种影响较大,导致染色参数(如染色时间、染色剂浓度、发射波长等)也大大不同<sup>[9-13]</sup>,需依据具体藻种探索特定的尼罗红检测脂质定量条件。

微拟球藻 *N. oceanica* 生长周期快、产油率高,属开发前景良好的海产经济微藻。尽管尼罗红染色已用于 *N. oculata*、*N. gaditana* 油脂定量<sup>[4,6]</sup>,但对 *N. oceanica* 油脂定量鲜有报道。因此,本文以 *N. oceanica* 为受试对象,考察了尼罗红质量浓度、二甲基亚砜(DMSO)体积分数、染色时间等对尼罗红染色定量油脂的影响,采用响应面法优化获得微拟球藻尼罗红染色最佳条件,解析油脂含量与尼罗红荧光强度线性关系,为后续微拟球藻资源高值化应用及产油海洋微藻快速筛选提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 藻种与试剂

海洋微拟球藻 *Nannochloropsis oceanica*, 为湘潭大学生物食品系藻菌资源开发与利用实验室保藏菌株;尼罗红,购自美国 Sigma Aldrich 公司;二甲基亚砜(DMSO),购自美国 Pharmco - Aaper 公司;其他化学药剂均为分析纯。

#### 1.1.2 仪器与设备

BS224S 精密电子天平,日本岛津公司;DK-98-IIA 型电热恒温水浴锅,天津泰斯特公司;H-1850 型医用离心机;Scientz-IIID 型超声细胞破碎仪;F97-Pro 型荧光分光光度计,上海棱光公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 微拟球藻培养

微拟球藻 *N. oceanica* 培养采用 ESAW 人工海

水培养基<sup>[4]</sup>。挑取单菌落微拟球藻细胞接入 ESAW 培养基中,在  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照强度 3 000 lx、光暗交替(12 h/12 h)条件下培养 168 h 获得种子液,以 15% 接种量将种子液接入图 1 所示跑道池中,在室温、自然光照条件下培养 168 h,喷雾干燥获得微拟球藻粉。

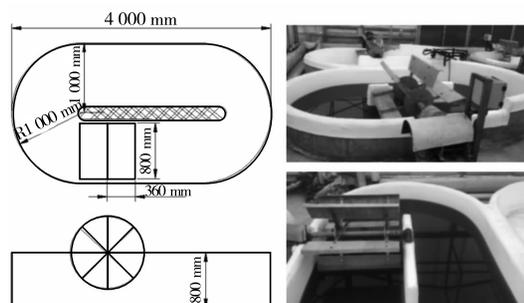


图 1 微拟球藻跑道池培养装置示意图

#### 1.2.2 微拟球藻胞内油脂的尼罗红染色荧光定量

取经图 1 跑道池培养 168 h 的微拟球藻液 50 mL,冰浴超声 4 min 后于 8 000 r/min 离心 10 min,去上清,PBS 缓冲液清洗 3 次,用不同体积分数的 DMSO 溶液悬浮细胞至  $OD_{680}$  值为 0.8。取 3 mL 悬浮藻液于  $40^\circ\text{C}$  水浴 10 min,加尼罗红溶液,避光染色不同时间,采用荧光分光光度计对染色微拟球藻进行三维波长扫描,测定不同条件下油脂荧光强度。

#### 1.2.3 微拟球藻生物量和油脂含量测定

生物量的测定:收集经图 1 跑道池培养一定时间的微拟球藻液,于 6 000 r/min 离心 20 min,弃上清,蒸馏水洗涤藻泥 3 次,  $-80^\circ\text{C}$  超低温预冻处理 12 h 后,真空冻干 48 h 至恒重,干重法计算藻细胞生物量。

油脂含量的测定:准确称取 20 mg 冻干藻粉,加入 0.75 mL 水-氯仿-甲醇(体积比 0.5:2:1)振荡 20 min 充分混匀,于 10 000 r/min 离心 10 min,重复萃取 3~5 次,收集合并所有氯仿层,真空干燥至恒重,计算藻细胞油脂含量。

#### 1.2.4 微拟球藻油脂含量与荧光强度线性关系曲线绘制

收集经图 1 所示跑道池培养 168 h 的微拟球藻,测定其生物量和油脂含量。将收集的微拟球藻藻液,稀释至生物量分别为 0.000 4、0.004、0.008、0.016、0.024、0.032、0.04、0.08、0.16、0.24、0.32、0.4 g/L,分别取 3 mL 上述稀释藻液于荧光比色皿中,以荧光强度为  $x$  值,油脂含量(mg)为  $y$  值,绘制

微拟球藻尼罗红油脂荧光强度与油脂含量的标准曲线。

### 1.2.5 数据处理

实验数据采用 Origin8 软件进行分析,每个实验 3 个重复,实验数据以“平均值  $\pm$  标准差”表示。实验数据  $t$  检验采用 IBM SPSS Statistics 19 软件进行显著性分析,显著水平为  $p < 0.05$ 。

## 2 结果与讨论

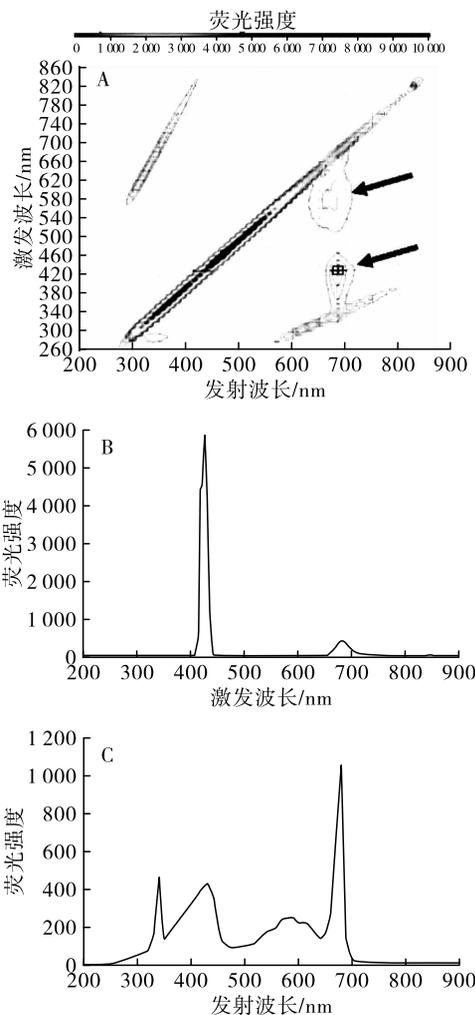
### 2.1 微拟球藻尼罗红染色荧光定量胞内油脂单因素实验

#### 2.1.1 荧光激发波长与发射波长的选择

报道证实不同藻属甚至同一藻属不同种亦或不同培养条件下的同种藻种,其积累胞内油脂组成和含量差异较大,有些微藻胞内以积累中性脂(如甘油三酯、甘油二酯、甘油一酯)为主,有些以积累极性脂为主,而中性脂和极性脂激发态能级分布不同,加之微藻株遗传特性迥异,导致油脂荧光定量激发波长和发射波长各不相同<sup>[14]</sup>。对于不同藻属,布朗葡萄藻油脂定量激发波长为 480 ~ 550 nm,发射波长为 580 nm<sup>[9]</sup>,亚心形扁藻胞内油脂定量激发波长为 520 nm<sup>[11]</sup>;对于同一藻属不同种,武迪<sup>[15]</sup>和王辉<sup>[16]</sup>等采用了相同的激发波长 480 nm 和发射波长 575 nm 定量微拟球藻 *N. oculata* 和 *Nannochloropsis* sp. HNN1 油脂,而刘林聪等<sup>[4]</sup>则以激发波长 515 nm 和发射波长 570 nm 定量微拟球藻 *N. gaditana* 油脂;对于不同培养条件下的小球藻株,梁文艳等<sup>[12]</sup>采用激发波长和发射波长分别为 485 nm 和 580 nm 定量油脂,而 Huang 等<sup>[13]</sup>选用激发波长 480 nm 和发射波长 580 nm。因此,本研究中微拟球藻油脂定量的最佳激发波长和发射波长需进行探索。

对微拟球藻油脂激发波长和发射波长进行 200 ~ 900 nm 波长扫描,结果见图 2。由图 2A 可看出,在发射波长 660 ~ 710 nm、激发波长 400 ~ 500 nm 以及 500 ~ 600 nm 处分别为微拟球藻油脂荧光及叶绿素荧光<sup>[7]</sup>。进一步地在图 2B 和图 2C 中,微拟球藻油脂荧光在激发波长 420 ~ 440 nm 和发射波长 670 ~ 690 nm 处出现了最高荧光强度,通过平移确定了微拟球藻油脂定量最适激发波长和发射波长分别为 430 nm 和 685 nm。另有研究报道证实,在激发波长 450 ~ 500 nm 范围内且发射波长大于 528 nm 时观测到的金黄色荧光通常为中性脂,而在激发波长 515 ~ 560 nm 范围内且发射波长大于 590 nm 时,观测到的红色荧光通常为极性脂<sup>[12-13]</sup>。本研究微拟球藻油脂激发波长为 430 nm,发射波长为 685

nm (> 528 nm),说明此株微藻积累油脂以中性脂为主,是炼制高品质生物柴油的理想原料。



注:A. 三维荧光扫描等高图;B. 微拟球藻油脂荧光激发波长图;C. 微拟球藻油脂荧光发射波长图。

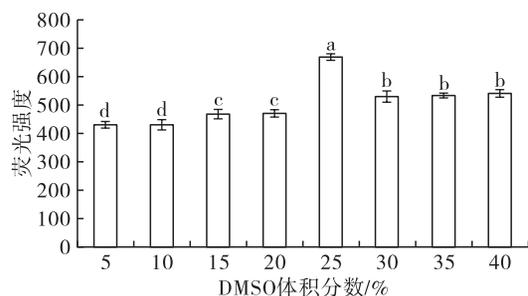
图 2 微拟球藻油脂定量荧光激发波长和发射波长确定

#### 2.1.2 DMSO 体积分数对荧光强度的影响

目前运用尼罗红染色法定量油脂的微藻主要有硅藻、黄藻、金藻、褐藻等<sup>[5]</sup>,然而如前所述,尼罗红染色法受藻种差异影响较大,某些藻种属如布朗葡萄藻<sup>[9]</sup>、裂殖壶藻<sup>[10]</sup>、小球藻<sup>[16]</sup>等又因细胞壁较厚、胞外分泌物多、聚集生长等原因,尼罗红染料不易渗入细胞内与油脂结合,染色效果不甚理想,因而传统尼罗红染色法定量油脂并不适用。DMSO、乙醇、丙酮、异丙醇及 EDTA 等有机试剂能较好地改善细胞壁和细胞膜通透性,利于尼罗红渗入胞内结合油脂,从而显著提高油脂染色效果<sup>[5]</sup>。DMSO 因能与胞膜发生交互作用且具有抗寒特性而在微藻中普适性较强,但为了避免高浓度 DMSO 对藻细胞的毒性效应,影响油脂定量准确性,DMSO 浓度选择和优化尤为重要。

不同藻种尼罗红染色定量脂质所需 DMSO 体

积分数差异较大。斜生栅藻<sup>[14]</sup>、布朗葡萄藻<sup>[9]</sup>、亚心形扁藻<sup>[11]</sup>等油脂定量最佳 DMSO 体积分数分别为 1%、8% 和 4%；不同培养条件下裂殖壶藻油脂定量采用的 DMSO 体积分数为 20%<sup>[17]</sup> 和 25%<sup>[10]</sup>。本研究微拟球藻细胞壁含纤维素和果胶质，尼罗红也不易穿透胞壁染色胞内油脂。尽管刘林聪<sup>[4]</sup>和武迪<sup>[15]</sup>等已报道了尼罗红定量微拟球藻 *N. oculata* 和 *N. oculata* XJ006 细胞内油脂 DMSO 体积分数分别为 5% 和 20%，但其微拟球藻种与本研究有所不同，因此在激发波长 430 nm 和发射波长 685 nm、尼罗红质量浓度 0.1 μg/mL、染色时间 15 min 条件下，考察不同 DMSO 体积分数对 *N. oceanica* 油脂的染色效果，结果见图 3。



注:不同小写字母表示具有显著性差异( $p < 0.05$ )。下同

图 3 不同 DMSO 体积分数对微拟球藻油脂荧光强度的影响

由图 3 可知，DMSO 体积分数在 5% ~ 25% 范围内，油脂荧光强度持续增强，并在 DMSO 体积分数为 25% 时达到最高值(670.37)，是 DMSO 体积分数 5% ~ 20% 荧光强度的 1.42 ~ 1.56 倍。当 DMSO 体积分数超过 25% 时，油脂荧光强度显著下降，且 DMSO 体积分数由 30% 继续增至 40% 时，油脂荧光强度无显著性变化。因此，微拟球藻 *N. oceanica* 尼罗红染色最佳 DMSO 体积分数为 25%。

### 2.1.3 染色时间对荧光强度的影响

尼罗红染色剂易发生荧光猝灭，染色时间过长会导致染色前后样品对比可信度降低，染色时间过短，尼罗红与胞内油脂结合不充分，导致荧光强度偏低，均不适宜荧光信号检测。蒋晓艳等<sup>[10]</sup>对裂殖壶藻染色荧光强度进行扫描发现，其在染色 5 ~ 15 min 时荧光强度较为稳定；Bertozzini 等<sup>[18]</sup>通过对几种微藻染色后油脂荧光强度进行时间扫描，确认最佳染色时间因藻种不同而不同，30 ~ 40 min 是较为理想的染色时间，并且染色后荧光发射强度达最高值的时间与染料在胞内扩散速率相关，因此不但不同藻种间染色时间差异大，即便同一藻种染色时间也缺乏精确的重复性；Liu 等<sup>[19]</sup>对小球藻、球等鞭金藻、三角褐指藻和莱茵衣藻尼罗红染色特性的研究发

现，其最佳尼罗红染色时间也不同。因此，选择适合的染色时间是正确定量脂质和减少实验误差的关键。

在激发波长 430 nm、发射波长 685 nm、DMSO 体积分数 25%、尼罗红质量浓度 0.1 μg/mL 条件下，考察不同染色时间对微拟球藻油脂的染色效果，结果见图 4。

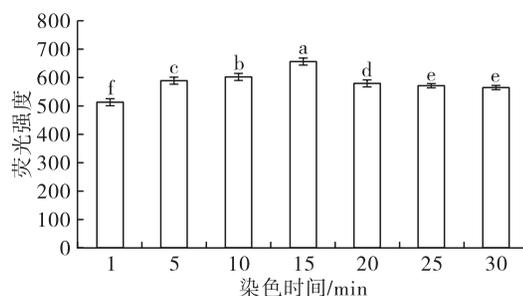


图 4 不同染色时间对微拟球藻油脂荧光强度的影响

由图 4 可以看出，随着尼罗红染色时间的延长，微拟球藻油脂荧光强度呈先增强后减弱趋势。当染色 15 min 时荧光强度达到最高值；当染色 15 ~ 30 min 时，荧光信号开始衰减，荧光强度逐渐降低。可能是在染色 15 min 内，尼罗红在细胞内扩散速度较慢，未与胞内油脂充分结合，因而荧光强度相对较弱，随着染色时间延长，在 15 min 时尼罗红透过率达到最大临界值，因而荧光强度最大。而尼罗红染色超过 15 min 后，因藻细胞膜通透性增大，胞内油脂失去保护发生氧化，荧光强度出现显著性降低。综上所述，尼罗红定量微拟球藻油脂的染色时间以 15 min 为宜。

### 2.1.4 尼罗红质量浓度对荧光强度的影响

在激发波长 430 nm 和发射波长 685 nm、DMSO 体积分数 25%、染色时间 15 min 条件下，考察不同尼罗红质量浓度对微拟球藻油脂的染色效果，结果见图 5。

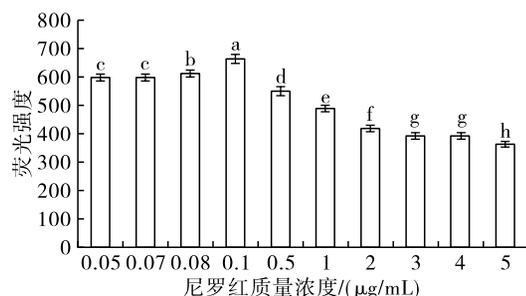


图 5 不同尼罗红质量浓度对微拟球藻油脂荧光强度的影响

尼罗红浓度是正确定量脂质以及减少实验误差的决定性因素。不仅如此，不同微藻材料因细胞大小和结构不同，所需最佳尼罗红浓度也各不相同。岳秀宏等<sup>[17]</sup>优化尼罗红染色快速筛选高油脂裂殖壶

藻时确定尼罗红质量浓度为  $1.0 \mu\text{g/mL}$ ; 张敬键等<sup>[14]</sup>在对斜生栅藻油脂含量快速检测采用的尼罗红质量浓度为  $1.5 \mu\text{g/mL}$ ; 宋琪等<sup>[11]</sup>采用尼罗红法测定亚心形扁藻油脂含量时得出最佳尼罗红质量浓度为  $0.8 \mu\text{g/mL}$ ; 而刘林聪<sup>[4]</sup>和武迪<sup>[15]</sup>等对与本研究同种藻种的微拟球藻油脂定量时所采用的尼罗红质量浓度分别为  $1 \mu\text{g/mL}$  和  $1.5 \mu\text{g/mL}$ 。由图 5 可知, 尼罗红质量浓度在  $0.05 \sim 5 \mu\text{g/mL}$  范围内, 微拟球藻油脂荧光强度总体呈先增高后降低的趋势, 在尼罗红质量浓度为  $0.1 \mu\text{g/mL}$  时荧光强度达到最高。在较低尼罗红质量浓度范围内, 尼罗红量少, 不能对胞内油脂染色完全, 导致荧光信号较弱; 而较高的尼罗红质量浓度 ( $>0.1 \mu\text{g/mL}$ ) 严重覆盖了荧光信号, 加之背景值过高, 从而导致荧光强度过低。基于此, 微拟球藻油脂定量最佳尼罗红质量浓度为  $0.1 \mu\text{g/mL}$ 。

## 2.2 响应面优化尼罗红染色条件

在单因素实验结果的基础上, 以 DMSO 体积分数 ( $A$ )、染色时间 ( $B$ ) 以及尼罗红质量浓度 ( $C$ ) 为自变量, 荧光强度 ( $Y$ ) 为响应值, 采用 Design Expert 10 进行三因素三水平响应面设计, 按中心组合设计寻找最佳尼罗红染色定量条件。响应面优化尼罗红染色条件优化结果见表 1。

表 1 响应面优化尼罗红染色条件优化结果

实验号	A DMSO 体积分数/%	B 染色 时间/min	C 尼罗红质量 浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	荧光 强度
1	20	5	0.10	674.6
2	30	5	0.10	722.9
3	20	25	0.10	710.1
4	30	25	0.10	702.9
5	20	15	0.05	697.3
6	30	15	0.05	701.2
7	20	15	0.15	711.5
8	30	15	0.15	726.8
9	25	5	0.05	686.4
10	25	25	0.05	713.2
11	25	5	0.15	724.1
12	25	25	0.15	733.1
13	25	15	0.10	758.3
14	25	15	0.10	753.0
15	25	15	0.10	766.2
16	25	15	0.10	765.5
17	25	15	0.10	775.7

采用 Design Expert 10 对表 1 结果进行多元回归分析, 得到荧光强度 ( $Y$ ) 与 DMSO 体积分数 ( $A$ )、染色时间 ( $B$ ) 以及尼罗红质量浓度 ( $C$ ) 的二次多项

式回归方程:  $Y = -372.33 + 70.65A + 16.89B + 1810.6C - 0.28AB + 11.4AC - 8.9BC - 1.32A^2 - 0.28B^2 - 8.593C^2$ 。对回归模型进行方差分析, 结果见表 2。

表 2 响应面实验方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P
模型	13 822.42	9	1 535.82	23.99	0.000 2**
A	454.51	1	454.51	7.10	0.032 3*
B	328.96	1	328.96	5.14	0.047 8*
C	1 185.84	1	1 185.84	18.52	0.003 6**
AB	770.06	1	770.06	12.03	0.010 4*
AC	32.49	1	32.49	0.51	0.499 3
BC	79.21	1	79.21	1.24	0.302 8
A <sup>2</sup>	4 601.26	1	4 601.26	71.86	<0.000 1**
B <sup>2</sup>	3 314.62	1	3 314.62	51.77	0.000 2**
C <sup>2</sup>	1 943.15	1	1 943.15	30.35	0.000 9**
残差	448.20	7	64.03		
失拟项	151.07	3	50.36	0.68	0.609 7
净误差	297.13	4	74.28		
总和	14 270.62	16			

注: \*\* 表示极显著  $P < 0.01$ ; \* 表示显著  $P < 0.05$ ;  $P > 0.05$  表示不显著。

由表 2 可知, 模型  $P < 0.01$ , 失拟项  $P > 0.05$ , 决定系数 ( $R^2$ ) 为 0.968 6, 表明该模型荧光强度实际值与预测值之间有较好的拟合度, 可用于微拟球藻荧光定量油脂。一次项  $A$ 、 $B$ 、 $C$  对荧光强度影响显著或极显著, 其影响顺序为尼罗红质量浓度 ( $C$ )  $>$  DMSO 体积分数 ( $A$ )  $>$  染色时间 ( $B$ ); 交互项  $AB$  对荧光强度影响显著, 交互项  $AC$  和  $BC$  对荧光强度影响不显著; 二次项中  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  对荧光强度影响极显著。各因素的三维响应面分析及等高线分布见图 6。

由图 6 可以看出, 尼罗红质量浓度为  $0.1 \mu\text{g/mL}$  时, DMSO 体积分数和染色时间交互作用响应面等高线呈椭圆形, 说明 DMSO 体积分数和染色时间交互作用显著, 二者交互响应面三维图较为陡峭, 证实 DMSO 体积分数和染色时间协同影响荧光强度。DMSO 体积分数在 23% ~ 28% 范围内, 染色时间在 10 ~ 20 min 范围内, 荧光强度最高, DMSO 体积分数过高或过低以及染色时间过长或过短荧光强度均会下降。在尼罗红染色 15 min 时, DMSO 体积分数和尼罗红质量浓度交互作用响应面等高线接近圆形, 说明 DMSO 体积分数和尼罗红质量浓度交互作用不显著, 且响应面三维图陡峭程度欠佳, 证实荧光强度受 DMSO 体积分数和尼罗红质量浓度共同影响不明显。当 DMSO 体积分数在 23% ~ 28% 范

围内,尼罗红质量浓度在  $0.09 \sim 0.14 \mu\text{g/mL}$  范围内时,荧光强度最高,DMSO 体积分数和尼罗红质量浓度过高或过低都会造成荧光强度下降。DMSO 体积分数为 25% 时,染色时间和尼罗红质量浓度交互作用响应面等高线接近圆形,说明染色时间和尼罗红质量浓度交互作用不显著,而响应面三维图较陡,

证实荧光强度受染色时间和尼罗红质量浓度共同影响,尼罗红质量浓度较染色时间对荧光强度影响更大。随着染色时间延长以及尼罗红质量浓度的升高,荧光强度呈现先上升后下降趋势。当染色时间在  $10 \sim 20 \text{ min}$  之间,尼罗红质量浓度在  $0.09 \sim 0.14 \mu\text{g/mL}$  范围内时,荧光强度达到最高值。

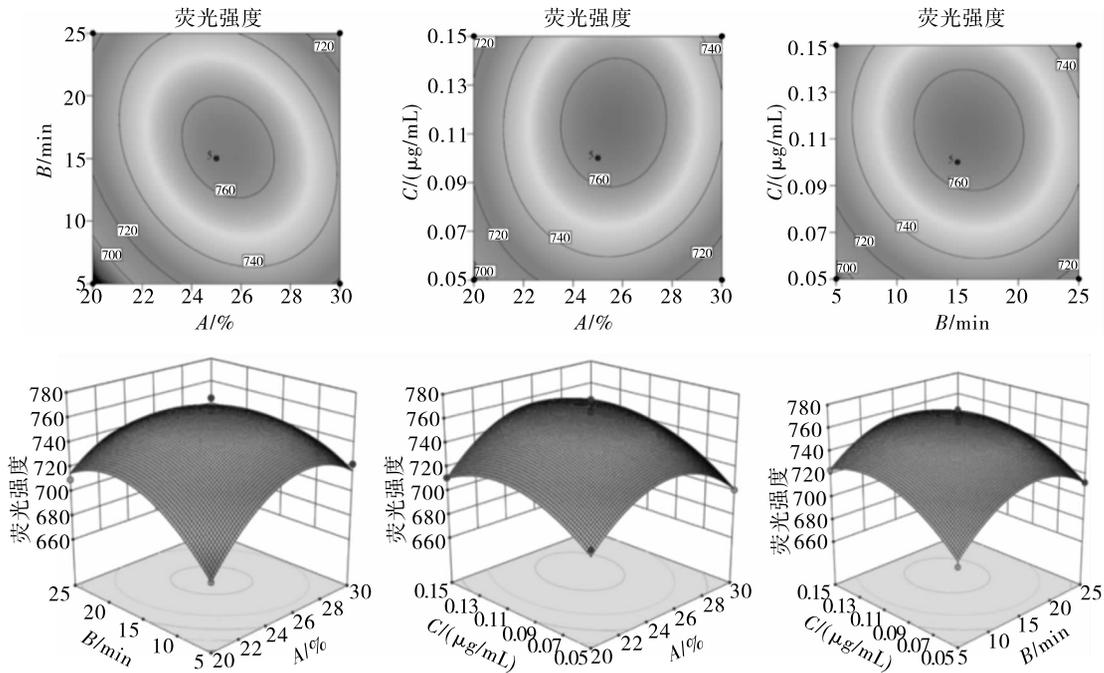


图6 DMSO 体积分数、染色时间和尼罗红质量浓度的三维响应面分析及等高线分布

由软件 Design Expert 10 优化后微拟球藻油脂染色最佳条件为 DMSO 体积分数 25.56%、染色时间 15.64 min、尼罗红质量浓度  $0.114 \mu\text{g/mL}$ , 此时预测荧光强度为 766.1。考虑到实际操作,取 DMSO 体积分数 25.6%、染色时间 16 min、尼罗红质量浓度  $0.11 \mu\text{g/mL}$ , 预测荧光强度为 766.7; 按照此条件进行 3 次验证实验得到实际荧光强度分别为 767.1、765.4、764.5, 平均值为 765.7, RSD 为 0.17%, 与预测值相对误差小于 1%, 表明响应面预测性良好, 可用于实际微拟球藻油脂的测定。

### 2.3 微拟球藻油脂含量与荧光强度等量关系

在上述优化的最佳染色条件下,按 1.2.4 方法绘制的标准曲线方程为  $y = 0.0033x - 0.0632$  ( $R^2 = 0.9999$ )。说明尼罗红荧光强度与藻细胞油脂含量呈良好的线性关系。因此,可以根据尼罗红荧光强度快速简便表征微拟球藻油脂含量。

按 1.2.1 微拟球藻培养方法,将图 1 跑道池培养 24、72、120、168、216 h 和 264 h 的微拟球藻在上述最佳条件下染色,在激发波长 430 nm、发射波长 685 nm 下测定荧光强度,代入标准曲线方程,求得不同培养时间下的油脂含量,结果见图 7。同时,对

不同培养时间下的微拟球藻尼罗红染色后进行激光共聚焦扫描,结果见图 8。

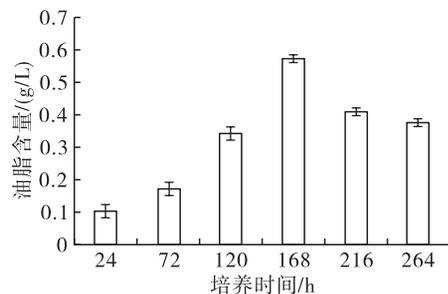


图7 微拟球藻不同培养时间下尼罗红染色荧光定量油脂含量变化

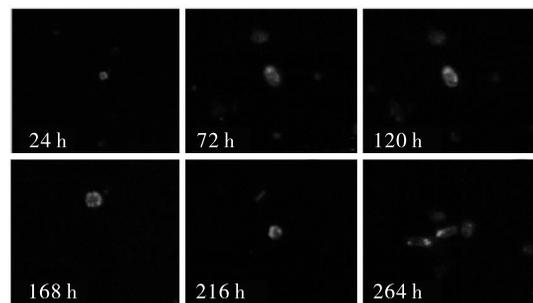


图8 微拟球藻不同培养时间下尼罗红染色激光共聚焦扫描图(80×)

由图7可见,随着培养时间延长,油脂含量呈先上升后下降趋势。在培养24~168 h内,油脂含量持续增加,在168 h达到最大值(0.57 g/L);之后随培养时间延长,油脂含量下降。对比其共聚焦扫描图(图8)可以看出,随着培养时间延长,微拟球藻胞内油脂体积逐渐变大,油脂荧光强度逐渐增强,在168 h时荧光强度达到最高值之后随着培养时间延长(168~264 h),油脂荧光强度逐渐减弱,证明油脂含量逐渐降低,这与图7尼罗红定量结果相一致,再次证实了尼罗红染色快速定量微拟球藻油脂的可行性。

### 3 结论

通过考察荧光激发波长、发射波长、助溶剂DMSO体积分数、尼罗红染色时间、尼罗红质量浓度对微拟球藻油脂荧光强度的影响,确定了尼罗红染色定量微拟球藻油脂最佳检测条件为激发波长430 nm、发射波长685 nm、DMSO体积分数25.6%、染色时间16 min、尼罗红质量浓度0.11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在最佳染色条件下微拟球藻油脂含量与荧光强度呈线性相关( $R^2=0.9999$ ),可用于快速简便表征微拟球藻油脂含量,大大提高了油脂检测效率。

### 参考文献:

- [1] CHEN Y M, XU C N. How to narrow the  $\text{CO}_2$  gap from growth - optimal to flue gas levels by using microalgae for carbon capture and sustainable biomass production[J/OL]. J Clean Prod, 2021, 280: 124448 [2021 - 02 - 20]. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124448>.
- [2] VASISTHA S, KHANRA A, CLIFFORD M, et al. Current advances in microalgae harvesting and lipid extraction processes for improved biodiesel production: a review [J/OL]. Renew Sust Energ Rev, 2021, 137: 110498 [2021 - 02 - 20]. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110498>.
- [3] SHARMA J, KUMAR S S, BISHNOI N R, et al. Screening and enrichment of high lipid producing microalgal consortia [J]. J Photochem Photobiol B, 2019, 192: 8 - 12.
- [4] 刘林聪, 杨菊平, 周健, 等. 尼罗红荧光优化法快速检测微拟球藻胞内油脂含量[J]. 微生物学通报, 2017, 44 (11): 2588 - 2595.
- [5] ALEMÁN - NAVA G S, CUELLAR - BERMUDEZ S P, CUAREMA M, et al. How to use Nile red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids [J]. J Microbiol Meth, 2016, 128: 74 - 49.
- [6] BALDUYCK L, VERYSER C, GOIRIS K, et al. Optimization of a Nile red method for rapid lipid determination in autotrophic, marine microalgae is species dependent [J]. J Microbiol Meth, 2015, 118: 152 - 158.
- [7] ORR V, REHMANN L. Improvement of the Nile red fluorescence assay for determination of total lipid content in microalgae independent of chlorophyll content [J]. J Appl Phycol, 2015, 27(6): 1 - 9.
- [8] 曹素娟, 柳科欢, 任玲萱, 等. 快速高通量测定三角褐指藻油脂含量[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2018, 55 (6): 1331 - 1336.
- [9] 邴欣, 宋琪, 刘双, 等. 尼罗红 - 荧光光谱法测定布朗葡萄藻油脂含量的方法研究[J]. 中国油脂, 2015, 40(2): 85 - 89.
- [10] 蒋晓艳, 王婉玉, 钟敏, 等. 裂殖壶菌胞内油脂尼罗红荧光染色快速检测方法的研究[J]. 中国油脂, 2016, 41(1): 51 - 55.
- [11] 宋琪, 李泉, 邴欣, 等. 尼罗红 - 荧光光谱法测定亚心形扁藻油脂含量 [J]. 中国油脂, 2016, 41 (10): 98 - 101.
- [12] 梁文艳, 张元春, 曹敬灿, 等. 采用尼罗红荧光探针对待微藻中油脂的定量测定 [J]. 环境化学, 2013, 32(8): 1491 - 1495.
- [13] HUANG G H, CHEN G, CHEN F. Rapid screening method for lipid production in alga based on Nile red fluorescence [J]. Biomass Bioenerg, 2009, 33 (10): 1386 - 1392.
- [14] 张敬键, 吕雪娟, 李爱芬, 等. 微藻细胞油脂含量的快速检测方法 [J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(1): 64 - 72.
- [15] 武迪, 成杰, 刘佳, 等. 尼罗红染色法检测拟微绿球藻油脂含量 [J]. 内蒙古科技大学学报, 2017, 36(3): 289 - 292.
- [16] 王辉, 陈来喜, 肖爱凤, 等. 氮和铁对小球藻和微拟球藻油脂积累的影响 [J]. 海南师范大学学报(自然科学版), 2012, 25(1): 86 - 89.
- [17] 岳秀宏, 李祥宇, 刘鹏阳, 等. 优化尼罗红荧光染色法简便快速筛选高油脂裂殖壶菌 [J]. 中国油料作物学报, 2019, 41(5): 796 - 803.
- [18] BERTOZZINI E, GALLUZZI L, PENNA A, et al. Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red [J]. J Microbiol Meth, 2011, 87(1): 17 - 23.
- [19] 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(11): 4717 - 4722.