

## 高效薄层色谱测定湛江等鞭金藻培养过程脂质变化

孟迎迎<sup>1,2</sup> 王海涛<sup>1,3</sup> 薛松<sup>1\*</sup> 杨海波<sup>2</sup> 尤慧艳<sup>2</sup>

(1. 中国科学院大连化学物理研究所 海洋生物产品工程组 辽宁 大连 116023)

(2. 大连大学 环境与化学工程学院 辽宁 大连 116622)

(3. 中国科学院大学 北京 100084)

**摘要:**【目的】研究湛江等鞭金藻(*Isochrysis zhangjiangensis*)由氮元素丰富至限制培养过程中脂质成分的变化。【方法】利用高效薄层色谱(HPTLC)分离分析微藻中脂质。【结果】随着培养基中营养物质的消耗,细胞逐渐处于胁迫状态,在这种状态下,细胞大量积累贮存脂质—甘油三脂(TAG),组成生物膜系统的单半乳糖甘油二脂(MGDG)、硫代异鼠李糖甘油二脂(SQDG)、磷脂酰甘油(PG)和磷脂酰胆碱(PC)含量降低,而游离脂肪酸(FFA)、甘油二脂(DAG)、双半乳糖甘油二脂(DGDG)、磷脂酰肌醇(PI)和磷脂酰乙醇胺(PE)则相对稳定。【结论】HPTLC可作为一种简便、可靠的微藻中脂质分离分析方法,为研究微藻油脂代谢途径以及甘油三脂(TAG)的调控积累提供有效手段。

**关键词:** 高效薄层色谱(HPTLC), 脂质代谢, 氮限制, 湛江等鞭金藻

## Lipids analysis of *Isochrysis zhangjiangensis* during cultivation process by HPTLC

MENG Ying-Ying<sup>1,2</sup> WANG Hai-Tao<sup>1,3</sup> XUE Song<sup>1\*</sup> YANG Hai-Bo<sup>2</sup> YOU Hui-Yan<sup>2</sup>

(1. Marine Bioproducts Engineering Group, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian, Liaoning 116023, China)

(2. College of Environment and Chemical Engineering, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

(3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100084, China)

**Abstract:** [Objective] To study the lipid compositions changes of *Isochrysis zhangjiangensis* from nitrogen-sufficient to nitrogen-limited cultivation process. [Methods] High performance thin layer chromatography (HPTLC) was used to analysis lipids of microalga *Isochrysis zhangjiangensis*. [Results] With the consumption of nutrition in the medium, the cells were gradually subjected to stress conditions, under which condition a large quantity of triacylglycerol (TAG) was accumulated. Opposed the storage of TAG, the lipids composed the biomembrane, monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG), phosphatidylglycerol (PG) and phosphatidylcho-

基金项目: 中国科学院百人计划项目(No. A1097); 国家 863 计划项目(No. 2012AA052101); 国家 973 计划项目(No. 2011CB200903); 辽宁省自然科学基金项目(No. 2012010263); 中国科学院大连化学物理研究所知识创新项目 CAS (No. K2010A3)

\*通讯作者: Tel: 86-411-84379069; ✉: xuesong@dicp.ac.cn

收稿日期: 2013-01-26; 接受日期: 2013-03-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

line (PC) gradually reduced. The content of free fatty acid (FFA), diacylglycerol (DAG), digalactosyldiacylglycerol (DGDG), phosphatidylcholine (PI) and phosphatidylethanolamine (PE) kept relatively stable. **[Conclusion]** As a robust and rapid tool for separation and analysis of lipids, HPTLC can be used in the study of lipid metabolism and regulatory accumulation of TAG in microalgae.

**Keywords:** High performance thin layer chromatography (HPTLC), Lipid metabolism, Nitrogen limitation, *Isochrysis zhangjiangensis*

近年来, 由于石油危机的加剧以及由此带来的资源、环境及社会问题, 迫使人们开发可持续的替代能源。海洋微藻是单细胞植物, 具有光合效率高、生长速度快、不占用耕地和淡水资源的优点, 是生产生物能源最具潜力的生物质来源, 吸引人们对其进行深入研究<sup>[1-3]</sup>。产油微藻的油脂含量可达干重的30%–50%。微藻内油脂主要由甘油酯和少量衍生脂质(如色素、维生素等)组成, 甘油酯按照极性和结构可分为中性脂、糖脂和磷脂。中性脂包括甘油三脂(TAG)、游离脂肪酸(FFA)、甘油二脂(DAG)和甘油一脂(MAG); 糖脂包括单半乳糖甘油二脂(MGDG)、双半乳糖甘油二脂(DGDG)和硫代异鼠李糖甘油二脂(SQDG); 磷脂主要包括磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酸(PA)、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰甘油(PG)、溶血磷脂酰胆碱(LPC)和磷脂酰肌醇(PI)等。甘油三脂是微藻内主要的储能物质, 以脂质体的形式存在于胞质溶胶中; 甘油二脂可作为信号传导分子参与甘油三脂及类囊体上脂质的合成。类囊体膜是光合作用的场所, 构成类囊体的脂质主要包括单半乳糖甘油二脂、双半乳糖甘油二脂、硫代异鼠李糖甘油二脂以及磷脂酰甘油, 光合作用过程中能量的吸收、传递和转化以及水在温和条件下的高效分解、电子的传递都是在具有特定结构的光合膜上进行的<sup>[4-6]</sup>。磷脂作为细胞生物膜的主要成分, 构成细胞膜的双分子层, 参与生物膜信号传导<sup>[7-8]</sup>。鉴于上述微藻内脂质的功能, 微藻内脂质的分离对于油脂代谢途径的研究以及甘油三脂的调控积累具有良好的指导意义。

HPTLC 分析脂质具有方法简单、方便、灵活、同时分离多种组分<sup>[9-10]</sup>, 且分离后可结合质谱或气相色谱进行进一步鉴定物质结构等优点<sup>[11-12]</sup>。文献报

道对于中性脂的展开剂多采用正己烷-乙酸乙酯-冰乙酸<sup>[13]</sup>或正己烷-乙醚-冰乙酸, 糖脂的展开剂有丙酮-甲苯-水<sup>[14]</sup>、氯仿-丙酮-甲醇-水-冰乙酸体系以及多步分离的方法。磷脂展开剂较多使用氯仿-甲醇-水体系。中性脂的显色多采用 50%硫酸喷板, 120 °C 烘箱烘烤 15 min。糖脂的显色可以使用特定蒽酮-硫酸显色剂, 磷脂显色可用特定 Dittmer-lester 钼蓝显色剂<sup>[15]</sup>, 也可使用普适性显色剂如 50%硫酸、碘或者茴香醛进行显色。此外 HPTLC 分离糖脂使用硫酸铵浸板防止糖脂的分解, 增强糖脂分离<sup>[14]</sup>。总脂提取剂为氯仿:甲醇:甲酸(2:1:0.1, 体积比), 甲酸的加入可以防止磷脂、糖脂分解, 抑制谱带展宽。

本文利用 HPTLC 研究了湛江等鞭金藻由氮丰富至氮限制培养过程中微藻脂质成分的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

硅胶板(Silica gel 60 F254, Alumium sheets 0.20 mm, 20 cm×20 cm, Merck, 德国)使用时将其裁剪至相应尺寸。实验所用试剂正己烷、乙酸乙酯、甲苯、甲醇、冰乙酸、丙酮、氯仿、三乙胺均为分析纯。

### 1.2 脂质标准品

PC (L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine), LPC (L- $\alpha$ -Lyso-phosphatidylcholine), PI (L- $\alpha$ -Phos-phatidylcholine), PG (Phosphadidylglycerol), PE (L- $\alpha$ -Phosphatidylamine), PA (L- $\alpha$ -Phosphatidic acid), MGDG (Monogalactosyldiacylglyceride), SQDG (Sulfoquinovosyldiglyceride), MAG (Monolein), DAG (Dipalmitin), TAG (Triheptadecanoin), 以上标准品购于 Larodan Fine Chemicals AB (瑞典)。DGDG (Digalactosyldiglyceride)购于 Sigma 公司(美国)。

### 1.3 藻种

湛江等鞭金藻(*Isochrysis zhangjiangensis*), 由辽宁省水产研究所提供。

### 1.4 培养条件

采用批次培养方式, 培养使用 f/2 培养基培养于 600 mL 管式鼓泡反应器(培养体积为 500 mL)。培养所用天然海水经 0.45  $\mu\text{m}$  醋酸纤维滤膜过滤,  $0.4 \times 10^5$  Pa 灭菌 15 min。通气量为 0.2 vvm,  $\text{CO}_2$  含量为 4%。光照强度逐渐增强, 第 1 天为  $80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 第 2 天为  $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 第 3 天为  $200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 光照周期为 14:10 h (光/暗), 培养温度  $24 \pm 2$   $^\circ\text{C}$ , 接种密度为  $4.8 \times 10^6$  cells/mL, 培养基为 3 倍浓度的 f/2 培养基, 培养 7 d。

### 1.5 生长指标测定方法<sup>[16]</sup>

(1) 细胞密度: 光学显微镜计数(Olympus BH-2 显微镜)。(2) 细胞干重: 取 5 mL 藻液, 用预先干燥称重的 Whatman GF/C 滤纸过滤, 再用 0.5 mol/L 碳酸氢铵洗涤 2 遍, 烘干至恒重, 两者质量差即为细胞干重。(3) 叶绿素荧光参数  $F_v/F_m$  测定: 取新鲜培养基 3 mL 加入到 Water-PAM 荧光仪样品池中, 再加入适量藻液, 暗适应 10 min 后, 测定  $F_v/F_m$ 。(4) 培养基中硝酸钠浓度采用 SEAL 元素自动分析仪测定。

### 1.6 油脂提取

取一定体积藻液(干重约为 5–10 mg), 离心 (4 000 r/min, 5 min) 除去上清, 加入 1 mL 氯仿: 甲醇: 甲酸(2:1:0.1, 体积比), 超声提取 20 min, 至藻泥无色, 离心取上层溶剂<sup>[17]</sup>。

### 1.7 HPTLC 分离脂质

**1.7.1 HPTLC 分离中性脂:** 分离中性脂(TAG, FFA, DAG, MAG)展开剂为 A: 乙酸乙酯, B: 正己烷: 乙酸乙酯: 冰乙酸(70:30:1, 体积比)。将提取总脂样品于展开剂 A 中展开 2–3 cm, 将中性脂与极性脂(糖脂、磷脂)分开, 极性脂留于原点。待溶剂完全挥发后将板放于展开剂 B 中展开至终点, 进行中性脂分离。染色采用 50% 硫酸喷板,  $120$   $^\circ\text{C}$  烘箱烘烤 15 min 显色。

**1.7.2 HPTLC 分离糖脂:** 糖脂的分离展开剂为丙酮: 甲苯: 水(91:30:7.5, 体积比)<sup>[14]</sup>。实验前将硅胶板于 0.15 mol/L 硫酸铵溶液浸泡 30 s, 于密封容器放置至少 48 h, 使  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  充分与硅胶结合。使用前于  $120$   $^\circ\text{C}$  烘箱烘烤 2.5 h, 加热将  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分解成  $\text{NH}_3$  和  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NH}_3$  挥发,  $\text{SO}_4^{2-}$  与硅胶结合, 增加了硅胶的极性, 改善了糖脂分离度。显色采用茴香醛喷板,  $120$   $^\circ\text{C}$  烘箱加热 15 min。

**1.7.3 HPTLC 分离磷脂:** 磷脂展开剂采用氯仿: 甲醇: 水: 三乙胺(35:35:7:35, 体积比)<sup>[12]</sup>, 使用时硅胶板无需进行处理。显色采用茴香醛喷板,  $120$   $^\circ\text{C}$  烘箱加热 15 min。

**1.7.4 HPTLC 分离总脂:** 可将中性脂和糖脂分离方法进行整合, 将总脂中中性脂和磷脂同时进行分离, 即将 10 cm  $\times$  20 cm TLC 板于丙酮: 甲苯: 水(91:30:7.5, 体积比)展开剂中展开至 TLC 板的 2/3 处, 待溶剂完全挥发后, 再置于正己烷: 乙酸乙酯: 冰乙酸(90:10:0.1, 体积比)展开剂中展开至终点。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞培养参数

培养过程以培养基中 N 元素浓度、细胞密度和光系统 II 最大光量子效率  $F_v/F_m$  3 个指标表征培养环境及藻细胞光合作用状态的变化。N 元素是维持藻细胞生长分裂的主要营养元素, 在 N 元素缺乏后, 藻细胞会积累多糖或油脂。 $F_v/F_m$  为光合动力学参数, 表征细胞进行光合作用能力, 在营养元素充足, 细胞生长状态良好时  $F_v/F_m$  值较高, 相反在细胞刚接入新环境, 或营养缺乏时  $F_v/F_m$  值较低。由图 1 可见, 在细胞刚接入反应器时  $F_v/F_m$  值为 0.68, 随后在营养元素丰富时逐渐升高, 在接种后第 3 天细胞生长速率最高时, 细胞光合作用  $F_v/F_m$  达到最高值, 在营养元素消耗完毕后, 细胞进入 N 元素缺乏期,  $F_v/F_m$  值逐渐降低。N 元素浓度在培养第 3 天浓度接近于 0, 表明细胞进入氮限制时期。细胞生长速率在接种后第 1 天进入对数生长期, 培养至第 5 天使进入稳定期。

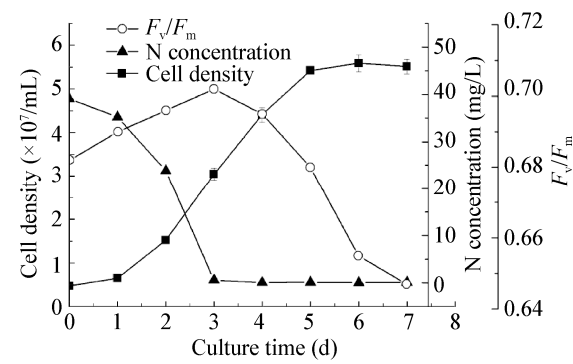


图 1 湛江等鞭金藻培养过程生长指标变化  
Figure 1 Changs of Chlorophyll fluorescence  $F_v/F_m$ , N concentration and cell density from *I. zhangjiangensis* with culture time

2.2 HPTLC 法分析湛江等鞭金藻培养过程中的脂质的变化

2.2.1 培养过程中性脂变化:图 1 中显示在培养第 3 天培养基中 N 元素消耗完毕,细胞进入 N 元素限制期,图 2 显示在培养第 3 天使 TAG 合成较少,生长第 5、7 天 TAG 逐渐积累。FA 和 DAG 变化不明显。可见细胞内油脂的积累主要为甘油三脂(TAG)积累。TAG 作为储存能量用于细胞内代谢能量支持或在条件适宜时重新进行细胞生长和分裂。FA 和 DAG 主要作为代谢中间体和信号传导分子,含量维持相对稳定。

2.2.2 培养过程中糖脂的变化:培养第 3 天湛江等鞭金藻  $F_v/F_m$  达到培养过程中的最高值 0.706,糖脂 MGDG、SQDG 和磷脂中 PG 同时达到最高值,在培养第 5 天细胞进入 N 元素限制,  $F_v/F_m$  值降低为 0.68,表明藻细胞光合作用下降,此时 MGDG、DGDG 及 PG 含量明显降低,而 SQDG 斑点几乎不见(图 3)。糖脂在光合作用中起重要作用,有研究表明光系统 II 补光色素蛋白复合体(LHC II)的活性形式是三聚体,与之结合的脂质分子有 MGDG、DGDG、PG,当将某一结合脂质分子去除后 LHC II 失去活性<sup>[4]</sup>。对于 SQDG 的研究现有文献对其代谢和生理作用并不明确,且 SQDG 在不同物种中含

量差别较大,湛江等鞭金藻中在培养第 1、3 天其含量较多,而在 N 元素限制后 SQDG 谱带消失,可能机理有待进一步验证。

2.2.3 培养过程中磷脂的变化:如图 4 所示,结果显示在培养 5-7 天磷脂整体减少,可能由于培养基中营养元素限制,磷脂合成减少。在培养第 3 天后随着藻细胞光合作用能力的下降,PG、PC 含量逐渐降低,PE、PI 在培养过程中含量变化不明显。磷脂在第 3 天达到最高随后在培养 5-7 d 含量降低。在糖脂(GL)位置可发现在第 3 天糖脂达到最大的量,随后逐渐减少,也证明了在营养元素限制时光合作用减弱,糖脂合成减少。

HPTLC 可将分离中性脂和糖脂的方法进行整合,在总脂的分离(图 5)中各个脂质的变化与中性脂、糖脂分离 TLC 图中变化相同。但总脂的分离能够对微藻内脂质代谢测定整体变化趋势。

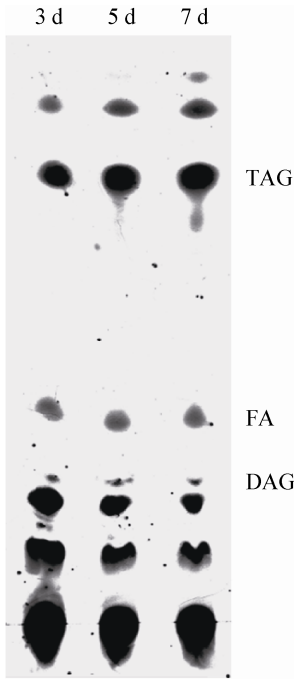


图 2 湛江等鞭金藻培养过程中性脂变化  
Figure 2 Variation of the neutral lipids from *I. zhangjiangensis* over the culture time

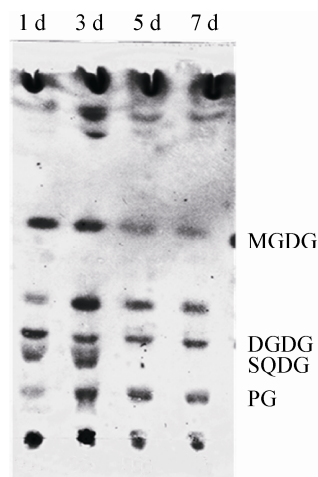


图3 湛江等鞭金藻培养过程糖脂变化

Figure 3 Variation of the glycolipids from *I. zhangjiangensis* over the culture time

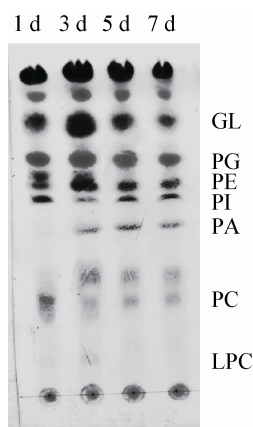


图4 湛江等鞭金藻培养过程磷脂变化

Figure 4 Variation of the phospholipids from *I. zhangjiangensis* over the culture time

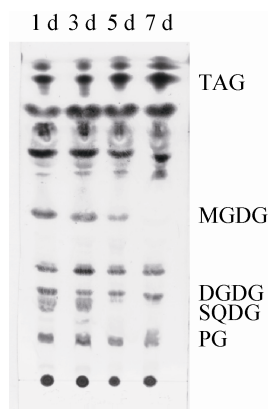


图5 薄层色谱分离总脂

Figure 5 Variation of the total lipid from *I. zhangjiangensis* over the culture time

国外已有文献利用HPTLC研究微藻代谢过程中脂质的变化, Fan等<sup>[13]</sup>利用HPTLC研究了莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)在N元素限制条件下中性脂TAG的合成主要是重新合成而不是由极性脂转换而来, 测定了培养过程中中性脂和光合脂含量变化, 结果显示在N元素限制条件下甘油三脂积累, 光合糖脂MGDG含量降低, DGDG含量升高, PG含量降低, 磷脂PE、PI含量变化不大。Yoon等<sup>[18]</sup>利用HPTLC研究莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)以磷脂作为酰基供体而DAG作为酰基受体, 通过磷脂:二酰甘油酰基转移酶(PDAT)催化形成TAG。同时其研究结果显示在N元素限制培养过程中TAG积累, MGDG含量明显降低, DGDG、SQDG和PI含量变化较小, PG含量降低, 与本文结果相比, 除SQDG变化不同外, 其余脂质变化趋势相同, 这说明在缺氮状态下SQDG降低可能是湛江等鞭金藻的一个特点。在高等植物中SQDG含量较低, 在磷缺乏时, 可以取代PG, 其作用是维持类囊体膜的稳定。在红藻(*Chondria dasyphylla*)中SQDG的含量远高于植物, 可占糖脂总量的39.9%<sup>[5]</sup>。在这类微藻中SQDG的作用与植物中不同, 是类囊体膜的结构脂质。湛江等鞭金藻中SQDG含量比较高, 由薄层色谱板斑点粗略判断约占极性脂的1/4左右。推测湛江等鞭金藻中SQDG的作用可能与红藻相似, 是光合膜的主要成分。在N元素限制条件下, 湛江等鞭金藻类囊体膜解体, 光合作用受损, 相应的组成光合膜的主要成分SQDG也会降低。

### 3 结论

采用HPTLC法分析了湛江等鞭金藻在N元素充足至N元素限制过程中细胞内各种脂质成分的变化, 在N元素限制培养条件下, 中性脂TAG积累, FFA和DAG相对稳定。当 $F_v/F_m$ 值最高时光合糖脂(MGDG、DGDG、SQDG)及磷脂中PG达到最高值; N元素限制时,  $F_v/F_m$ 下降, 光合糖脂MGDG、SQDG以及磷脂酰甘油PG含量降低, 而

DGDG 含量变化不明显。湛江等鞭金藻由 N 元素充足环境到 N 元素限制环境过程中, 磷脂中 PE、PI 变化不明显, PC 含量减少。HPTLC 提供了一种简便、可靠的微藻脂类分析方法, 为气相色谱检测微藻中各脂类脂肪酸成分及质谱分析各种脂质结构奠定了良好的分离基础, 同时对微藻内油脂代谢研究以及油脂调控积累有一定的指导意义。

## 参 考 文 献

- [1] Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products[J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2010, 14(2): 557-577.
- [2] 姜进举, 苗凤萍, 冯大伟, 等. 微藻生物柴油技术的研究现状及展望[J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(2): 134-140.
- [3] 夏金兰, 万民熙, 王润民, 等. 微藻生物柴油的现状与进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(7): 118-126.
- [4] 童建松, 阳振乐, 李良璧, 等. 光合膜脂双半乳糖二酰基甘油的研究进展[J]. *植物学通报*, 2003, 20(5): 531-538.
- [5] 杨文, 候海彤, 冯福应, 等. 硫代异鼠李糖甘油二酯(SQDG)的生物合成与功能[J]. *植物学通报*, 2003, 20(1): 103-114.
- [6] Dörmann P, Benning C. Galactolipids rule in seed plants[J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(3): 112-118.
- [7] Moellering ER, Miller R, Benning C. Molecular Genetics of Lipid Metabolism in the Model Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions*[M]. Berlin: Springer, 2010, 30: 139-155.
- [8] 章文华, 王学敏. 植物体内磷脂代谢和信号转导[J]. *生命科学*, 2000, 12(3): 100-105.
- [9] Fuchs B. Analysis of phospholipids and glycolipids by thin-layer chromatography-matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 12(59): 62-73.
- [10] Fuchs B, Süß R, Teuber K, et al. Lipid analysis by thin-layer chromatography-A review of the current state[J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 12(18): 2754-2774.
- [11] Vieler A, Wilhelm C, Goss R, et al. The lipid composition of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the diatom *Cyclotella meneghiniana* investigated by MALDI-TOF MS and TLC[J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2007, 150(2): 143-155.
- [12] Fuchs B, Schiller J, Suess R, et al. Analysis of stem cell lipids by offline HPTLC-MALDI-TOF MS[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 392(5): 849-860.
- [13] Fan J, Andre C, Xu C. A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *FEBS Letters*, 2011, 58(5): 1985-1991.
- [14] Wang Z, Benning C. Arabidopsis thaliana polar glycerolipid profiling by thin layer chromatography (TLC)coupled with gas-liquid chromatography (GLC)[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2011, 49: e2518.
- [15] Ryu EK, Maccoss M. Modification of the Dittmer-Lester reagent for the detection of phospholipid derivatives on thin-layer chromatograms[J]. *Journal of Lipid Research*, 1979, 20(4): 561-563.
- [16] Feng DN, Chen ZA, Xue S, et al. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(12): 6710-6716.
- [17] Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 226(1): 497-509.
- [18] Yoon K, Han D, Li Y, et al. Phospholipid: Diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Plant Cell*, 2012, 24(9): 3708-3724.