

研究报告

碳源种类及碳氮比对眼点拟微绿球藻生长密度、油脂含量和脂肪酸组成的影响

窦晓, 陆向红, 卢美贞, 薛蓉, 晏荣军, 计建炳

浙江工业大学化学工程与材料学院 浙江省生物质燃料利用技术研究重点实验室, 浙江 杭州 310014

窦晓, 陆向红, 卢美贞, 等. 碳源种类及碳氮比对眼点拟微绿球藻生长密度、油脂含量和脂肪酸组成的影响. 生物工程学报, 2013, 29(3): 358-369.

Dou X, Lu XH, Lu MZ, et al. Effects of carbon source and concentration on the growth density, lipid accumulation and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata*. Chin J Biotech, 2013, 29(3): 358-369.

摘 要: 研究了三种碳源 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 、葡萄糖对眼点拟微绿球藻生长密度和油脂含量的影响, 实验结果表明相对于葡萄糖, 无机碳源 NaHCO_3 更利于眼点拟微绿球藻的生长。以 NaHCO_3 为碳源, 研究了在不同的接种密度、 NaNO_3 浓度下, C/N 对眼点拟微绿球藻生长密度和油脂含量的影响。实验结果表明, C/N 对眼点拟微绿球藻生长密度的影响与接种密度和 NaNO_3 浓度有关, 在高的 NaNO_3 浓度时, C/N 对眼点拟微绿球藻生长密度的影响很小; 在低的 NaNO_3 浓度时, 随着 C/N 比的增加, 微绿球藻的生长密度先增加后下降, 存在最佳的 C/N 比。最佳的 C/N 比随接种密度而变化, 在接种密度为 $OD_{440}=0.10$ 时, 最佳 C/N 比为 3, 当接种密度提高到 $OD_{440}=0.70$ 时, 最佳 C/N 比增加到 5。 NaNO_3 浓度和 C/N 对微藻油脂含量均有较大影响, 在不同的接种密度和 NaNO_3 浓度下都表现为 C/N=1 时最利于微藻油脂的积累, 这与卡尔文循环过程中核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶的活性有关。本实验的最佳产油培养条件为以 NaHCO_3 为碳源, 初始接种密度为 $OD_{440}=0.70$, C/N=1:1, $C_{\text{NaNO}_3}=0.225\text{g/L}$, 此时油脂产率为 $56.7\text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$, EPA 产率为 $6.5\text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 。

关键词: 碳源, C/N, 眼点拟微绿球藻, 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶

Received: July 16 2012; **Accepted:** October 23, 2012

Supported by: Major Science and Technology Projects in Zhejiang Province (No. 2006C11015), Project of Education Department of Zhejiang Province (No. Y201224695), Project of Bud Talents of Zhejiang Province (No. Y201224695), Fund of Extracurricular Science and Technology in Zhejiang University of Technology, Science and Technology Projects in Zhejiang Province (Innovative Team) (No. 20130004).

Corresponding author: Xianghong Lu. Tel/Fax: +86-571-88320646; E-mail: luxh@zjut.edu.cn

浙江省重大科技项目 (No. 2006C11015), 浙江省教育厅项目 (No. Y201224695), 浙江省新苗人才计划 (No. Y201224695), 浙江工业大学大学生课外科技基金项目, 浙江省科技厅项目 (创新团队) (No. 20130004) 资助。

Effects of carbon source and concentration on the growth density, lipid accumulation and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata*

Xiao Dou, Xianghong Lu, Meizhen Lu, Rong Xue, Rongjun Yan, and Jianbing Ji

Zhejiang Province Key Laboratory of Biofuel, College of Chemical Engineering and Materials Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: Effects of carbon sources (Na_2CO_3 , NaHCO_3 and glucose) and concentration of NaHCO_3 on the growth density and lipid contents of *Nannochloropsis oculata* were studied. *N. oculata* preferred inorganic carbon to glucose, the growth density and lipid content of algae cultured with NaHCO_3 were higher than that with glucose. The effects of concentration of NaHCO_3 on growth density and lipid content were related to inoculation density and nitrogen level. In high nitrogen level, the concentration of NaHCO_3 had little effect on the growth density, but in low nitrogen level, the growth density increased at first, and then decreased with the increase of concentration of NaHCO_3 . Based on the results we suggest that an optimum ratio of carbon to nitrogen was existed. Furthermore, we found the optimum ratio was changed with inoculation density. The optimum ratio of carbon to nitrogen was 3 when inoculation density was OD_{440} of 0.10, the optimum ratio increased to 5 with OD_{440} of 0.70. Concentration of NaHCO_3 and ratio of carbon to nitrogen had significant effects on the lipid content and productivity. Lipid content reached the highest value when the ratio of carbon to nitrogen was 1 with experimental range of nitrogen level and inoculation density. The lipid productivity was 56.7 mg/(L·d), and the EPA productivity was 6.5 mg/(L·d) at optimum cultivation condition with NaHCO_3 as carbon source, the ratio of carbon to nitrogen at 1, the concentration of NaNO_3 at 0.225 g/L, and the inoculation density with OD_{440} of 0.70.

Keywords: carbon source, C/N ratio, *Nannochloropsis oculata*, ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase rubisco

石化燃料的日益匮乏和燃烧带来的环境污染等问题都会影响人类的可持续发展,寻找绿色可再生能源是一项重要的战略任务^[1]。微藻因生长速率快、油脂含量高、无污染以及不占耕地等特点,在众多生物质能源原料中,受到格外关注^[2-4]。

目前微藻生物柴油产业发展的瓶颈问题就是成本过高,为了解决这个问题除了可以对微藻生物柴油生产的各个环节进行优化之外,还可以提取高价值的副产物。眼点拟微绿球藻脂肪酸组成简单,富含 EPA^[5],是微藻生物柴油理想原料之一。

氮是微藻生长必需的大量元素之一,对于微藻的生长、繁殖等生理活动有着重要的作用^[6]。

碳元素大约占藻细胞干重的 50%,是藻细胞的主要组成部分^[7],在微藻培养过程中适量加入碳源,有助于提高微藻生长的密度。氮元素对眼点拟微绿球藻生长影响的研究报道较多,碳元素对微藻生长的影响也有一定的研究:Roessler 等^[8]的研究显示丰富的碳源有利于积累更多的油脂;Regnanlt 等^[9]发现不同的 C/N 对微藻油脂合成具有显著影响;陈洁等^[10]的研究结果表明眼点拟微绿球藻偏爱重碳酸盐型碳源,在培养时加入 NaHCO_3 能够提高微藻的生长密度;有报道提出眼点拟微绿球藻一般脂含量为 28%,混养培养可达 39%,如果混养培养中辅以蔗糖可达到

54%^[11]。他们的研究找到了眼点拟微绿球藻生长的最佳氮源 NaNO_3 ，证实了眼点拟微绿球藻能够利用外在碳源，但是最适合眼点拟微绿球藻生长和油脂积累的碳源以及在不同的 NaNO_3 浓度下不同 C/N 对眼点拟微绿球藻生长密度、油脂含量和油脂组成的影响尚未见报道。本文采用连续充气培养的方法，固定 N/P=4:1 的条件下，考察了不同碳源、 NaNO_3 浓度和 C/N 耦合作用对眼点拟微绿球藻生长密度、油脂含量和脂肪酸组成的影响，以期筛选出眼点拟微绿球藻生长和油脂积累的最佳条件。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用眼点拟微绿球藻 *Nannochloropsis oculata* 来自海洋生物种质库，经过涂布平板的方法纯化之后，在本实验室保存待用。

1.2 试验过程

1.2.1 眼点拟微绿球藻的扩种

选取纯化之后镜检无原生动动物污染、生长状况良好的眼点拟微绿球藻，在恒温光照培养箱中用 250 mL 锥形瓶进行扩种培养，培养箱温度为 20 °C，连续光照，光照强度为 3 000 lx，培养期间每天定时摇动 3 次。

将培养至对数期的眼点拟微绿球藻放入 5 L 的培养瓶中进行进一步扩种培养，培养过程连续充气，自然光照，培养温度 20 °C~25 °C。培养采用 F/2 培养基^[12]，海水采用海水晶配制成的人工海水，pH 8.0。

1.2.2 实验设计

取 2 L 培养至对数期的眼点拟微绿球藻藻

液，3 000 r/min 离心去除营养盐，得到待用藻泥。在相同的 NaNO_3 浓度、N/P 下，设计 4 组实验，第 1 组为对照组，第 2、3、4 组培养初期分别加入 1 g NaCO_3 、1 g NaHCO_3 、1 g 葡萄糖，培养至稳定期后再加入等量的碳源，选择眼点拟微绿球藻生长的最佳碳源。以选取的最佳碳源为碳源，保持 N/P 不变，配制不同 NaNO_3 浓度和 C/N 的培养液，具体数据见表 1。

将去除培养盐的眼点拟微绿球藻藻泥接种至 1 L 的锥形瓶中，在连续通入无菌空气，自然光照，室内温度 20 °C~25 °C，pH 8.0 的条件下培养。每隔 24 h 取藻液在紫外分光光度计下测定 OD_{440} 的吸光度。培养至稳定期 3 d 后，收集微藻，测定微藻的生物量及油脂含量。

改变眼点拟微绿球藻的接种密度，其余培养盐配方和培养方法不变，考察不同接种密度下， NaNO_3 浓度、C/N 对眼点拟微绿球藻生长密度和油脂含量的影响。

1.3 分析方法

1.3.1 眼点拟微绿球藻细胞密度的测定

每隔 24 h，采用紫外可见分光光度仪测定微藻溶液在 440 nm 处的吸光值 (OD_{440})，每个样品重复测定 3 次，取平均值。

1.3.2 眼点拟微绿球藻油脂含量的测定

用 1 mol/L 的 NaOH 溶液将培养至稳定期后 3 d 的藻液的 pH 值调至 10.5，静置 24 h，去除上清液得到藻泥。藻泥中加入去离子水，3 000 r/min 离心 5 min，去除上清液，此过程重复 3 次以去除培养盐，将无培养盐的藻泥在 70 °C 的烘箱中烘干至恒重，采用改良酸法^[13]测定藻粉中油脂的含量。

表 1 不同培养盐中 NaNO_3 和 NaHCO_3 浓度

 Table 1 Concentration of NaNO_3 and NaHCO_3 in different medium

NaNO_3 (g/L)	C/N	NaHCO_3 (g/L)
0.025	1:1	0.029
	3:1	0.086
	5:1	0.140
	7:1	0.302
0.075	1:1	0.086
	3:1	0.259
	5:1	0.420
0.225	7:1	0.604
	1:1	0.259
	3:1	0.777
	5:1	1.295
	7:1	1.813

1.3.3 眼点拟微绿球藻藻油成分的分析

藻油的甲酯化：将所得到的藻油用 CHCl_3 溶解，转入 1.5 mL Agillient 玻璃瓶中，加入 1 mL 1 mol/L 的硫酸甲醇溶液，充 N_2 密封，于 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 1 h，自然冷却，加入 200 μL 去离子水，混匀，用 200 μL 正己烷萃取 3 次，合并有机相，用 200 μL 去离子水反萃取洗涤 3 次，取有机相，转入 1.5 mL Agillient 玻璃瓶中， N_2 吹干，称重。

气相色谱-质谱联用定性分析：采用 Aglient 公司生产的 7890-5973N 型气质联用仪 (GC-MS) 对甲酯化后微藻油脂中的脂肪酸甲酯进行定性分析。GC-MS 条件：DB-5MS 石英毛细管柱色谱柱 (30 m \times 250 μm \times 0.25 μm)。柱升温程序：初温 $60\text{ }^\circ\text{C}$ ，以 $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 $270\text{ }^\circ\text{C}$ ，保持 5 min，再以 $8\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 $300\text{ }^\circ\text{C}$ ，保持 8 min；操作条件：进样口温度 $270\text{ }^\circ\text{C}$ ，色谱-质谱接口温度 $260\text{ }^\circ\text{C}$ ；载气：氮气；载气流速：1.0 mL/min；电离方式：EI；电离能量：70 eV；测定方式：

全扫描方式 (SCAN)；扫描范围：200~550 amu；进样量：1 μL 。

气相色谱定量分析：采用 Aglient 公司生产的 7890 型气相色谱仪 (GC)，对甲酯化后微藻油脂中的脂肪酸甲酯进行定量分析。GC 分析条件：DB-WAX 毛细管色谱柱 (30 m \times 0.32 mm \times 0.50 μm)。柱升温程序：从 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 升至 $150\text{ }^\circ\text{C}$ ，保持 2 min；以 $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 $200\text{ }^\circ\text{C}$ ，保持 6 min；再以 $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 $230\text{ }^\circ\text{C}$ ，保持 5 min。载气：氮气；流量：3 mL/min。检测器：氢火焰检测器，氢气：30 mL/min；空气：300 mL/min。进样口温度： $280\text{ }^\circ\text{C}$ ；检测器温度 $300\text{ }^\circ\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 眼点拟微绿球藻藻油脂肪酸组成和含量的确定

取甲酯化之后的眼点拟微绿球藻藻油，采用气相色谱-质谱 (GC-MS) 联用定性分析脂肪酸

的组成,结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出,眼点拟微绿球藻藻油由 8 种脂肪酸组成,分别是饱和脂肪酸:豆蔻酸(C14:0),棕榈酸(C16:0),硬脂酸(C18:0);不饱和脂肪酸:棕榈油酸(C16:1),油酸(C18:1),亚油酸(C18:2),二十碳四烯酸(C20:4),二十碳五烯酸(EPA,C20:5)。采用气相色谱仪(GC)对藻油进行定量分析,眼点拟微绿球藻藻油中棕榈酸(C16:0),棕榈油酸(C16:1),EPA(C20:5)的含量比较大,分别为 32%~45%,32%~49%,1%~15%。

2.2 不同碳源对眼点拟微绿球藻生长密度和油脂含量的影响

表 2 显示了不同碳源对眼点拟微绿球藻生长密度和油脂含量的影响。可以看出外加碳源能够提高眼点拟微绿球藻的生长密度,但是却减低了微藻的油脂含量,这与 Roessler 等^[8]的研究结论“丰富的碳源有利于积累更多的油脂”矛盾,这可能是因为加入的碳源的量与他们有区别。在实验室条件下,加入 NaHCO_3 能够获得最大生物量,这与陈洁等^[10]的结论相一致。从表中可以

看出 3 种外加碳源中,无论是从生长密度还是油脂含量来看,无机碳源的促进作用都高于有机碳源葡萄糖,可能是因为眼点拟微绿球藻的生长更加偏重于利用无机碳源。两种无机碳源中,眼点拟微绿球藻的生长和油脂积累更偏重于利用 NaHCO_3 ,这是因为 NaHCO_3 和 Na_2CO_3 与培养液中添加的海盐中的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等形成了沉淀,添加 Na_2CO_3 所形成的沉淀比 NaHCO_3 多^[14],根据以上结论,此后的实验采用 NaHCO_3 为碳源。

2.3 C/N 对眼点拟微绿球藻生长密度的影响

沈和定等^[15]研究了初始接种密度对微绿球藻生长密度的影响,结果表明最佳的初始接种密度为 $(50 \times 10^4 \sim 200 \times 10^4)$ 个/mL,参考此研究结果,本论文选取初始接种密度 285×10^4 个/mL ($OD_{440}=0.70$) 和 35×10^4 个/mL ($OD_{440}=0.10$),研究 NaNO_3 浓度和 C/N 在不同初始接种密度下对眼点拟微绿球藻生长密度和油脂含量的影响。图 2 和图 3 分别为初始接种密度 $OD_{440}=0.70$ 和 $OD_{440}=0.10$ 时,在不同 NaNO_3 浓度下 C/N 对眼点拟微绿球藻生长密度的影响。可以看出

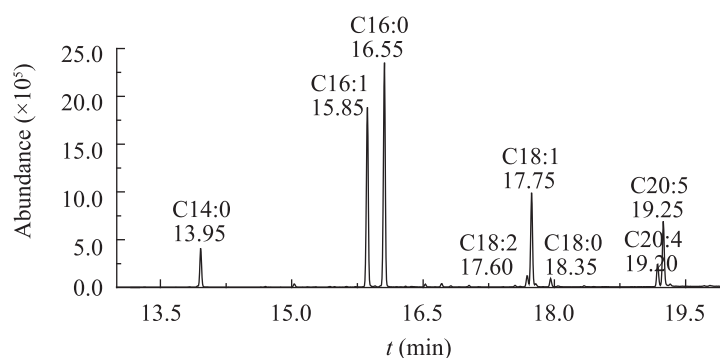


图 1 眼点拟微绿球藻藻油甲酯的气质联用总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram in GC-MS of fatty acid methyl ester of *N. oculata*.

表 2 不同碳源对眼点拟微绿球藻生长密度和油脂含量的影响

Table 2 Effects of different carbon sources on the the growth density and lipid content of *N. oculata*

	Without carbon	Na ₂ CO ₃	NaHCO ₃	Glucose
Dry weight (g/L)	3.06	3.44	4.72	3.25
Lipid content (%)	35.60	29.31	29.93	27.84

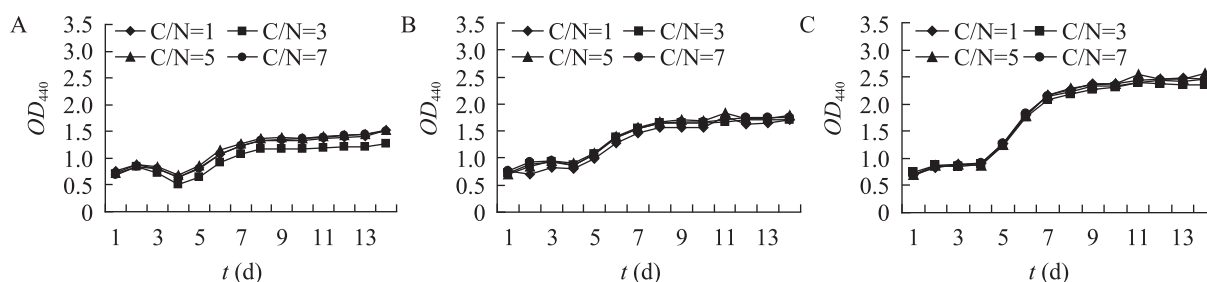


图 2 不同 C/N 对眼点拟微绿球藻生长密度的影响 (接种密度 $OD_{440}=0.70$, $NaNO_3$ 浓度分别为 0.025 g/L(A)、0.075 g/L (B)、0.225 g/L (C))

Fig. 2 Effects of different C/N ratio on the growth density of *N. oculata*. Inoculation density at OD_{440} of 0.70, the concentration of $NaNO_3$ at 0.025 g/L(A), 0.075 g/L (B), 0.225 g/L (C).

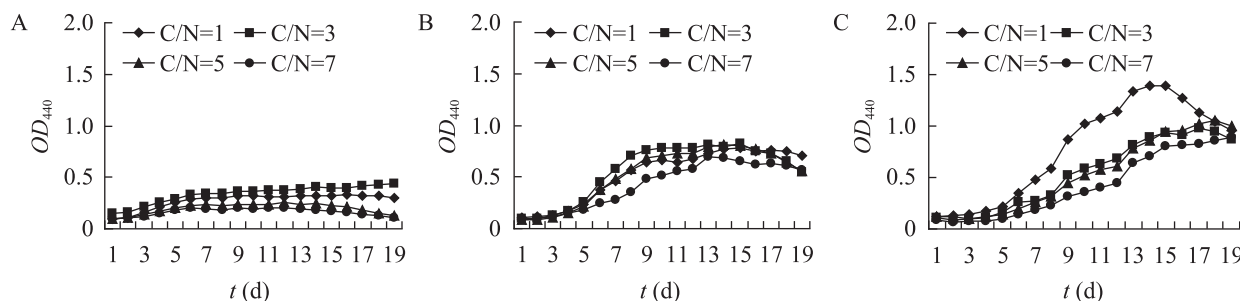


图 3 不同 C/N 对眼点拟微绿球藻生长密度的影响 (初始接种密度 $OD_{440}=0.10$, $NaNO_3$ 浓度分别为 0.025 g/L(A)、0.075 g/L(B)、0.225 g/L (C))

Fig. 3 Effects of different C/N ratio on the growth density of *N. oculata*. Inoculation density at OD_{440} of 0.10, the concentration of $NaNO_3$ at 0.025 g/L(A), 0.075 g/L (B), 0.225 g/L (C).

NaHCO₃ 浓度 (C/N) 对眼点拟微绿球藻生长密度的影响与初始接种密度和培养液中 NaNO₃ 浓度有关。在较低的 NaNO₃ 浓度时, NaHCO₃ 浓度对微藻生长有较大影响: NaHCO₃ 浓度存在饱和点, 在低于饱和点时, 随着 NaHCO₃ 浓度的增加, 眼点拟微绿球藻的生长速率增加; 超过饱和点

时, NaHCO₃ 浓度的增加反而会抑制微藻的生长。但随着 NaNO₃ 浓度的增加, NaHCO₃ 对眼点拟微绿球藻生长速率的影响逐渐变小, 这可能是因为 NaNO₃ 浓度较低的时候, 碳源是微藻生长的控制因子, 随着 NaNO₃ 浓度的提高, 氮源成为微藻生长的控制因子。在不同的初始接种密度

下, NaHCO_3 浓度的饱和点不同, 当初始接种密度 $OD_{440}=0.70$ 的时候, NaHCO_3 浓度的饱和点为 $C/N=5$, 此时眼点拟微绿球藻的生长速率高于其他组; 当初始接种密度 $OD_{440}=0.10$ 的时候, NaHCO_3 浓度的饱和点为 $C/N=3$, 此时眼点拟微绿球藻具有较高的生长速率, 这可能是因为在 NaNO_3 浓度较低时, 随着接种量的增加, 微藻生长所需的碳源的量有所增加。

在不同的初始接种量和 NaNO_3 浓度下, C/N 对眼点拟微绿球藻生物量的影响见表 3, 可以看出在不同的初始接种量和 NaNO_3 浓度下, C/N 对眼点拟微绿球藻生物量的影响与其对微藻生长速率的影响保持一致; 在相同的 NaNO_3 浓度和 C/N 下都表现为高的初始接种量能获得高的生长密度, 这与张海琪等^[16]的结论相一致。

2.4 C/N 对眼点拟微绿球藻油脂含量的影响

在不同的初始接种密度和 NaNO_3 浓度下, C/N 对眼点拟微绿球藻油脂含量的影响见图 4。两种接种密度下都表现为: C/N 为 1 时, 眼点拟微绿球藻的油脂含量最高; 在相同的 C/N 下, 随着 NaNO_3 浓度的增加, 微藻的油脂含量逐渐降低, 这与 Attilio Converti^[17]的“氮缺陷有利于微藻油脂积累”的结论相符合; 在相同的 NaNO_3 浓度下, 随着 C/N 的增加, 眼点拟微绿球藻的油

脂含量波动比较大, 但都是在 $C/N=1$ 时达到最大, 这可能与微藻固定 CO_2 及油脂代谢过程中的关键酶核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (简称 Rubisco) 有关, 这个酶是光合作用碳固定以及油脂合成过程中的重要调节酶^[18], 从微藻脂肪酸和油脂生物合成的途径图中可以看出^[19]: 在微藻油脂合成的过程中, C_3 循环是最基本的、最重要的一个步骤, 此循环又包括 3 个阶段:

- 1) 羧化阶段 (CO_2 的固定阶段): RuBP (二磷酸核酮糖)+ $\text{CO}_2 \rightarrow 2 \text{PGA}$ (3-磷酸甘油酸); 催化酶: Rubisco (核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶)。
- 2) 还原阶段: $\text{PGA} \rightarrow \text{GAP}$ (甘油醛-3-磷酸)。
- 3) 再生阶段: RuBP 的再生。

这个反应中 CO_2 的固定是限速步骤^[20], PGA 的生成速率可以用方程 $r_{\text{PGA}} = kC_{\text{CO}_2}C_{\text{RuBP}}$ 表示, 其中 k 表示反应速率常数, 与 Rubisco 的活性有关, C_{CO_2} 、 C_{RuBP} 分别表示 CO_2 和 RuBP 的浓度, 从速率方程中可以看出 CO_2 的固定不仅与 CO_2 和 RuBP 的浓度有关, 还与 Rubisco 的酶活性有关。

Rubisco 的羧化活性和加氧活性需要在含有 CO_2 及 Mg^{2+} 的偏碱性 pH 环境中活化^[21-22], 根据活化动力学的分析, Lorimer 等^[23]提出以下动力学模型:

表 3 接种密度和 C/N 对眼点拟微绿球藻生物量的影响

Table 3 Effects of different inoculation density and C/N ratio to the growth density of *N. oculata*

Concentration of NaNO_3 (g/L)	A				B				C			
	0.025				0.075				0.225			
C/N	1	3	5	7	1	3	5	7	1	3	5	7
$OD_{440}=0.1$	0.27	0.40	0.11	0.10	0.70	0.75	0.73	0.59	0.70	0.81	0.78	0.64
$OD_{440}=0.7$	1.38	1.14	1.37	1.36	1.52	1.73	1.59	1.67	2.22	2.13	2.32	2.24

$E(\text{钝化}) + ACO_2 \rightleftharpoons E-A^CO_2(\text{钝化});$

$E-A^CO_2(\text{钝化}) + Mg^{2+} \rightleftharpoons E-A^CO_2-Mg^{2+}(\text{活化});$

E 代表 Rubisco 酶; A^CO_2 代表起催化作用的 CO_2 。

动力模型显示 Mg^{2+} 对 Rubisco 的羧化活性和加氧活性的活化起着很大的作用, 当 C/N 从 1 增加到 3 的时候, 培养液中 HCO_3^- 量增加, 溶液碱性增强, Mg^{2+} 的沉淀量增加, 游离的 Mg^{2+} 降低, 不利 Rubisco 酶的活化, 从而导致微藻的油脂含量下降; 当 C/N 从 3 增加到 7 的时候, 此时培养基中 CO_2 的浓度变大, 酶的活性对 PGA 的生成速率的影响变小, 底物 CO_2 浓度的增加起主要作用, 所以微藻的油脂含量又有所增加。

在两种初始接种密度下, $NaNO_3$ 浓度和 C/N 对眼点拟微绿球藻油脂含量影响的显著性分析结果见表 4。从表 4 可以看出, 在两种不同的接种密度下, 都表现为眼点拟微绿球藻的油脂含量和 $NaNO_3$ 浓度显著相关 ($P < 0.05$), 与 C/N 有相关性, 但相关性相对较弱 ($P > 0.05$), 这说明眼

点拟微绿球藻的油脂积累受 $NaNO_3$ 的浓度和 C/N 影响, 但 $NaNO_3$ 浓度的影响更大。

2.5 C/N 对眼点拟微绿球藻油脂脂肪酸组成的影响

表 5 显示的是 C/N 对眼点拟微绿球藻油脂脂肪酸组成的影响。从表 5 可以看出, 藻油的脂肪酸主要由棕榈酸 (C16:0) 和棕榈油酸 (C16:1) 组成。C/N 对藻油脂肪酸组成的影响与 $NaNO_3$ 浓度有关。在 $NaNO_3$ 浓度为 0.025 g/L 时, 随着 C/N 的增加, 棕榈酸含量下降, 棕榈油酸含量增加; 在 $NaNO_3$ 浓度为 0.075 g/L 时, 随着 C/N 的增加, 棕榈酸含量增加, 棕榈油酸含量下降。

从表 5 还可以看当 $NaNO_3$ 浓度较低的时候, 藻油的脂肪酸主要以饱和的和单不饱和脂肪酸为主, 随着 $NaNO_3$ 浓度的增加, 藻油中的多不饱和脂肪酸含量也随之增加。特别地, $NaNO_3$ 浓度增加到 0.225 g/L 时, 藻油中 EPA (C20:5) 含量大幅提高, 达到 10% 以上。EPA 是一种良好的医疗保健品^[24], 纯度为 99% 的 EPA 在国际上

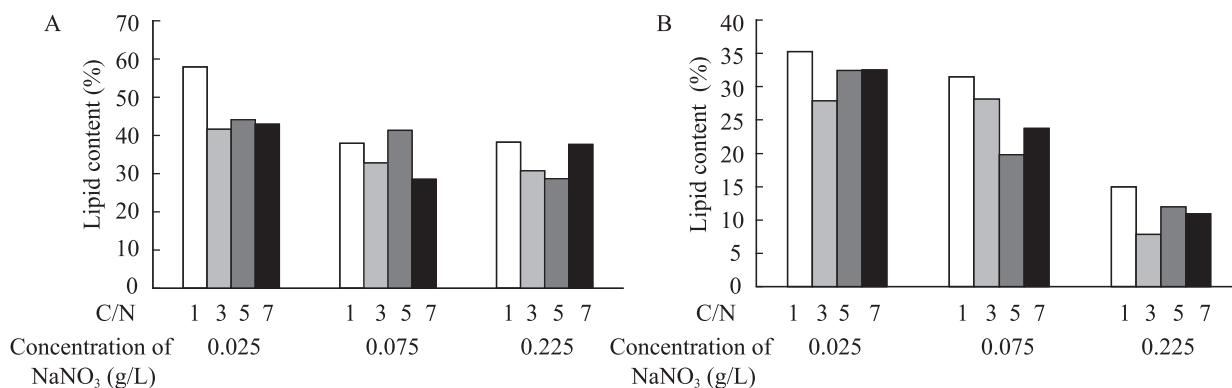


图 4 不同的初始接种密度和 $NaNO_3$ 浓度下 C/N 对眼点拟微绿球藻油脂含量的影响 (初始接种密度分别为 $OD_{440}=0.70$ (A), $OD_{440}=0.10$ (B))

Fig. 4 Effects of C/N ratio on the lipid content of *N. oculata* at different inoculation density and the concentration of $NaNO_3$. The inoculation density with OD_{440} of 0.70 (A) and 0.10 (B).

表 4 不同的初始接种密度下 NaNO_3 浓度和 C/N 对眼点拟微绿球藻油脂含量影响的方差分析Table 4 The ANOVA of the effects of the concentration of NaNO_3 and C/N ratio on the lipid content of *N. oculata* at different inoculation density

	Source of variance	SS	df	MS	F	P-value	The critical value of F
Inoculation density at OD_{440} of 0.7	A	70.887	2.000	35.443	2.085	0.205	$F_{0.05}(2,6)=5.143$
	B	16.563	3.000	5.521	0.325	0.808	$F_{0.05}(3,6)=4.757$
	Error	102.007	6.000	17.001			
	Total	189.457	11.000				
Inoculation density at OD_{440} of 0.1	A	192.345	2.000	96.173	6.980	0.027	$F_{0.05}(2,6)=5.143$
	B	19.207	3.000	6.402	0.465	0.717	$F_{0.05}(3,6)=4.757$
	Error	82.668	6.000	13.778			
	Total	294.220	11.000				

A: the effects of the concentration of NaNO_3 ; B: the effects of the concentration of NaHCO_3

表 5 C/N 和 NaNO_3 浓度对眼点拟微绿球藻脂肪酸组成的影响Table 5 Effects of C/N ratio and the concentration of NaNO_3 on the fat acid constituents of *N. oculata*

Concentration of NaNO_3 (g/L)	0.025				0.075				0.225				
	C/N	1	3	5	7	1	3	5	7	1	3	5	7
C14:0		4.60	4.4	3.7	3.9	4.5	4.8	5.5	5.1	5.9	6.65	7.1	6.1
C16:0		45.0	42.9	41.2	40.6	40.2	42.6	42.4	45.0	34.6	32.8	41.1	32.5
C16:1		37.9	36.8	43.0	49.4	43.4	37.8	33.5	32.0	34.0	34.4	32.1	40.9
C18:2		/	0.8	1.2	/	0.5	0.7	0.8	0.93	1.7	2.1	2.6	1.5
C18:1		9.1	9.5	7.6	5.4	7.2	9.3	11.2	10.5	6.4	2.7	7.1	2.4
C18:0		1.3	1.6	1.2	0.8	0.9	1.2	1.5	2.3	1.7	1.3	2.53	1.1
C20:4		0.74	1.5	1.0	/	1.4	1.5	1.9	1.6	4.2	4.7	/	3.9
C20:5		0.96	2.5	1.3	/	2.0	2.3	3.2	2.7	11.5	15.4	7.5	11.6

的售价已经达到了 200 美元/g^[25]，在获取微藻生物柴油的时候得到高价值的副产物能在很大的程度上降低微藻生物柴油的成本。

C/N 和 NaNO_3 浓度对眼点拟微绿球藻藻油饱和、单不饱和、多不饱和脂肪酸含量影响的显著性分析结果见表 6。从表 6 中可以看出 C/N 对眼

点拟微绿球藻藻油脂肪酸组成成分的影响不显著 ($P>0.05$)；眼点拟微绿球藻藻油脂肪酸的组成与 NaNO_3 浓度的相关性随着藻油脂肪酸不饱和度的增加而逐渐增加，微藻藻油中多不饱和脂肪酸的含量与 NaNO_3 浓度极显著相关 ($P<0.01$)，所以在培养眼点拟微绿球藻的时候适当地提高

表 6 C/N 和 NaNO₃ 浓度对眼点拟微绿球藻油脂脂肪酸组成影响的方差分析

Table 6 The ANOVA of the effects of the concentration of NaNO₃ and C/N ratio on the fat acid constituents of *N. oculata*

	Source of variance	SS	df	MS	F	P-value	The critical value of F
Saturated fatty acid	A	70.887	2.000	35.443	2.085	0.205	$F_{0.05(2,6)}=5.143$
	B	16.563	3.000	5.521	0.325	0.808	$F_{0.05(3,6)}=4.757$
	Error	102.007	6.000	17.001			
	Total	189.457	11.000				
Monounsaturated fatty acid	A	192.345	2.000	96.173	6.980	0.027	$F_{0.05(2,6)}=5.143$
	B	19.207	3.000	6.402	0.465	0.717	$F_{0.05(3,6)}=4.757$
	Error	82.668	6.000	13.778			
	Total	294.220	11.000				
Polyunsaturated fatty acid	A	460.893	2.000	230.447	21.961	0.002	$F_{0.05(2,6)}=5.143$
	B	26.873	3.000	8.958	0.854	0.514	$F_{0.05(3,6)}=4.757$
	Error	62.962	6.000	10.494			
	Total	550.728	11.000				

A: the effects of the concentration of NaNO₃; B: the effects of the concentration of C/N.

NaNO₃ 浓度能够大幅度地提高眼点拟微绿球藻藻油中多不饱和脂肪酸的含量,从而提高眼点拟微绿球藻在生产医疗保健产品上的价值。

2.6 眼点拟微绿球藻最佳培养条件的筛选

微藻培养的最终目标是获得高的油脂产率,微藻油脂产率与微藻生长密度和油脂含量有关。

在初始接种量为 $OD_{440}=0.70$ 时, NaNO₃ 浓度和 C/N 对眼点拟微绿球藻油脂产率的影响见图 5。从图 5 中可以看出,在 3 种不同的 NaNO₃ 浓度下,都表现为当 C/N=1 时,眼点拟微绿球藻能够获得较大的油脂产率,这和油脂含量的结论是一致的;在 C/N=1 时,3 种不同 NaNO₃ (0.025 g/L, 0.075 g/L, 0.225 g/L) 浓度下,油脂产率分别为 53.4 mg/(L·d), 38.4 mg/(L·d), 56.7 mg/(L·d), EPA 产率分别是 0.5 mg/(L·d),

0.8 mg/(L·d), 6.5 mg/(L·d)。考虑到 NaNO₃ 浓度较低时 (0.025 g/L 和 0.075 g/L), EPA 产率较低,并且生物量较低,微藻采收困难,采收成本高;而 NaNO₃ 浓度超过 0.225 g/L 时, NaNO₃ 成本

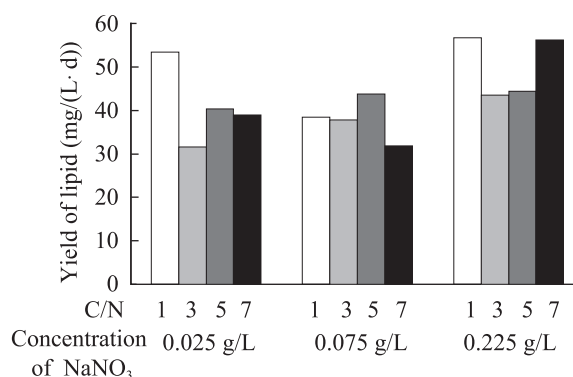


图 5 不同 NaNO₃ 浓度下, C/N 对眼点拟微绿球藻油脂产率的影响

Fig. 5 The effects of C/N ratio on the lipid productivity of *N. oculata* at different concentration of NaNO₃.

增加, 单位质量的 NaNO_3 的油脂产率下降, 从 NaNO_3 浓度 0.025 g/L 时的 2135.9 mg/(L·d·g NaNO_3) 下降到 NaNO_3 浓度 0.225 g/L 时的 252.2 mg/(L·d·g NaNO_3)。综合上述各因素, 选择以 NaHCO_3 为碳源, 初始接种密度为 $OD_{440}=0.70$ (285×10^4 个/mL), $C/N=1:1$, $C_{\text{NaNO}_3}=0.225$ g/L 作为优化的培养条件。

3 结论

在 NaCO_3 、 NaHCO_3 、葡萄糖这三种碳源中, NaHCO_3 更利于眼点拟微绿球藻的生长密度的提高和油脂含量的积累。在较高的 NaNO_3 浓度时, C/N 对眼点拟微绿球藻的生长速率和生物量的影响较小; 在较低的 NaNO_3 浓度时, C/N 比对眼点拟微绿球藻的生长速率和生物量的影响存在最佳值, 最佳的 C/N 比与接种密度有关。在接种密度 $OD_{440}=0.10$ 的时候, 最佳的 C/N 为 3; 接种密度 $OD_{440}=0.70$ 的时候, 最佳 C/N 为 5。 C/N 比对微藻油脂含量有较大影响, 在不同的接种密度和 NaNO_3 浓度下, $C/N=1$ 最利于微藻油脂的积累。藻油的脂肪酸主要由棕榈酸和棕榈油酸组成。 NaHCO_3 浓度对藻油脂肪酸组成的影响与 NaNO_3 浓度有关。在 NaNO_3 浓度为 0.025 g/L 时, 随着 NaHCO_3 浓度的增加, 棕榈酸含量下降, 棕榈油酸含量增加; 在 NaNO_3 浓度为 0.075 g/L 时, 随着 NaHCO_3 浓度的增加, 棕榈酸含量增加, 棕榈油酸含量下降。随着 NaNO_3 浓度的增加, 藻油中 EPA ($C_{20}:5$) 含量大幅提高, 当 NaNO_3 浓度为 0.225 g/L 时, 藻油中 EPA 含量达到 10% 以上。本实验的最佳培养条件为以 NaHCO_3 为碳源, 初始接种密度为 $OD_{440}=0.70$ (285×10^4 个/mL,

$C/N=1:1$, $C_{\text{NaNO}_3}=0.225$ g/L, 此时油脂产率为 56.7 mg/(L·d), EPA 产率为 6.5 mg/(L·d)。

REFERENCES

- [1] Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, et al. A Look Back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae. Golden: National Renewable Energy Laboratory of the U. S. Department of Energy, 1998: 328.
- [2] Wang ZK. Marine diatom based biofuel production. *Fishery Modernization*, 2008, 35(2): 59-63 (in Chinese).
王兆凯. 基于海洋硅藻的生物燃料油生产. *渔业现代化*, 2008, 35(2): 59-63.
- [3] Milne TA, Evans RJ, Nagle N. Catalytic conversion of microalgae and vegetable oils to premium gasoline, with shape selective zeolites. *Biomass*, 1990, 21: 219-232.
- [4] Minowa T, Yokoyama SY, Kishimoto M, et al. Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction. *Fuel*, 1995, 74: 1735-1738.
- [5] Brown MR, Jeffrey SW, Volkman JK, et al. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 1997, 151: 315-331.
- [6] Hu ZX, An M, Duan XS, et al. Effects of nitrogen sources on the growth, contents of total lipids and total hydrocarbons of *Botryococcus brauni*. *Acta Ecolog Sin*, 2009, 29(6): 3288-3294 (in Chinese).
胡章喜, 安民, 段舜山, 等. 不同氮源对布朗葡萄藻生长、总脂和总烃含量的影响. *生物科学*, 2009, 29(6): 3288-3294.
- [7] Chen F, Jiang Y. *Biotechnology of Microalgae*. Beijing: China Light Industry Press, 1999 (in Chinese).
陈峰, 姜悦. 微藻生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [8] Roessler PG. Environmental control of glycerol lipid metabolism in microalgae commercial implications and future research directions. *J*

- Phycol, 1990, 26: 393-399.
- [9] Regnanlt A, Chervin D, Chammai A, et al. Lipid composition of *Euglena gracilis* in relation to carbon-nitrogen balances. *Phytochemistry*, 1995, 3(40): 725-733.
- [10] Chen J, Jiang XM, Duan SS. Analysis of growth factors of *Nannochloropsis oculata*. *Ecologic Sci*, 2002, 21(1): 50-52 (in Chinese).
陈洁, 蒋霞敏, 段舜山. 眼点拟微绿球藻生长的生态因子分析. *生态科学*, 2002, 21(1): 50-52.
- [11] Yao R, Cheng LH, Xu XH, et al. Advances on technology of microalgal high lipid production. *Prog Chem*, 2010, 22(6): 1221-1229 (in Chinese).
姚茹, 程丽华, 徐新华, 等. 微藻的高油脂化技术研究进展. *化学进展*, 2010, 22(6): 1221-1229
- [12] Kain JM, Fogg GE. Studies on the growth of marine phytoplankton. *J Mar Biol Ass UK*, 1958, 37: 781-788.
- [13] Ma S, Fu LL, Wang M, et al. Comparison of extraction methods of crude fat from microalgae. *China Oils Fats*, 2010, 35(5): 77-79 (in Chinese).
马帅, 付莉莉, 汪萌, 等. 从微藻中提取粗脂的方法比较. *中国油脂*, 2010, 35(5): 77-79.
- [14] Zheng HL, Gao Z, Zhang Q, et al. Effect of inorganic carbon source on lipid production with autotrophic *Chlorella vulgaris*. *Chin J Biotech*, 2011, 27(3): 436-444 (in Chinese).
郑洪立, 高振, 张齐, 等. 无机碳源对小球藻自养产油脂的影响. *生物工程学报*, 2011, 27(3): 436-444.
- [15] Shen HD, Huang XX. Study on metamorphosis and survival rate of zoea I of *Eriocheir sinensis* fed on *Nannochloropsis oculata*, *Phaeodactylum tricornutum* and powder of *Spirulina platensis*. *J Shanghai Fisheries Univ*, 1999, 8(3): 202-209 (in Chinese).
沈和定, 黄旭雄. 三种藻类对中华绒螯蟹 I 期溞状幼体培育效果的比较. *上海水产大学学报*, 1999, 8(3): 202-209.
- [16] Zhang HQ, Jiang XM, Pan SY, et al. Effect of light intensity, carbon source and vaccination density on the growth of *Nannochloris oculata*. *Hebei Fishery*, 2011, 1: 9-13 (in Chinese).
张海琪, 蒋霞敏, 潘双叶, 等. 光照、温度、碳源及接种密度对微绿球藻生长的影响. *河北渔业*, 2011, 1: 9-13.
- [17] Converti A, Casazza AA, Ortiz YY, et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem Eng Proc*, 2009, 48(6): 1146-1151.
- [18] Zheng HL, Zhang Q, Ma XC, et al. *China Biotechnol*, 2009, 29(3): 110-116 (in Chinese).
郑洪立, 张齐, 马小琛, 等. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(3): 110-116.
- [19] Courchesne NM, Parisien A, Wang B, et al. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *J Biotechnol*, 2009, 141(1/2): 31-41.
- [20] 卡尔文循环 [EB/OL]. [2012-7-16]. http://jpkc.njau.edu.cn/biochemistry/BiochemistryWebCourse/View_106.asp.
- [21] Laing WA, Christeller JT. A model for the kinetics of activation and catalysis of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. *Biochem J*, 159: 563-570.
- [22] Pierce JW, McCurry SD, Mulligan RM, et al. Activation and assay of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Methods Enzymol*, 89: 47-55.
- [23] Lorimer GH. The carbonxylation and oxygenation of ribulose-1,5-bisphosphate: the primary events in photosynthesis and photorespiration. *Annu Rev Plant Physiol*, 1981, 32: 349-383.
- [24] Tapiero H, Ba GN, Couvreur P, et al. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed Pharmacother*, 2002, 56(5): 215-222.
- [25] Barlow SM, Stansby ME. *Nutritional Evaluation of Long-Chain Fatty Acids in Fish Oil*. New York: Academic Press, 1982: 25-40.

(本文责编 郝丽芳)