

产油微藻的分离、筛选及自养培养氮源、碳源的优化

王立柱¹ 温皓程¹ 邹渝² 周稳稳¹ 谢通慧¹ 张永奎^{1*}

(1. 四川大学化工学院制药与生物工程系 四川 成都 610065)

(2. 成都兴华信创业科技信息有限公司 四川 成都 610041)

摘要: 从云南滇池的水样中分离筛选得到一株自养产油小球藻(*Chlorella vulgaris*, *C. vulgaris*), 其油脂产率可达 28.6 mg/(L·d), 进一步考察了不同氮源、氮源浓度和添加无机碳源对其自养生长和油脂积累的影响。结果表明, 硝酸钠为优化氮源, 氮元素的优化浓度为 123 mg/L, 油脂含量随氮元素浓度升高而降低; 添加 NaHCO₃ 显著提高了 *C. vulgaris* 生物量产率和油脂产率, 其优化浓度为 800 mg/L。在氮源和碳源的优化浓度下, *C. vulgaris* 的最大生物量产率和油脂产率可达 332.8 mg/(L·d) 和 100.2 mg/(L·d), 分别是对照组的 3.6 和 3.4 倍。

关键词: 自养微藻, 氮源, 无机碳源, 生物量, 生物柴油

Isolation, Selection of Microalgae for Lipid Production and Optimization of Its Nitrogen Resource and Carbon Resource in Autotrophic Culture

WANG Li-Zhu¹ WEN Hao-Cheng¹ ZOU Yu² ZHOU Wen-Wen¹
XIE Tong-Hui¹ ZHANG Yong-Kui^{1*}

(1. Department of Pharmaceutical and Biological Engineering, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

(2. Chengdu Sinocreat Technology Information Co. Ltd., Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: An autotrophic oleaginous *Chlorella vulgaris* with lipid productivity at 28.6 mg/(L·d), was isolated from the water sample of Dianchi Lake in Yunnan province. The effects of nitrogen sources, nitrogen concentrations, and inorganic carbon (NaHCO₃) on cell growth as well as lipid accumulation of *C. vulgaris* were investigated. The results showed that the optimum nitrogen source and nitrogen concentration were sodium nitrate and 123 mg/L, respectively. Lipid content decreased with the increasing of nitrogen concentration. Biomass productivity and lipid productivity of *C. vulgaris* remarkably rose by addition of NaHCO₃. The optimized concentration of NaHCO₃ was 800 mg/L. Under the optimal conditions, biomass productivity and lipid productivity of *C. vulgaris* could reach up to 332.8 mg/(L·d) and 100.2 mg/(L·d), respectively, which were 3.6 and 3.4 times as much as the control group.

Keywords: Autotrophic microalgae, Nitrogen source, Inorganic carbon source, Biomass, Biodiesel

* 通讯作者: Tel: 86-28-85408255; ✉: zhangyongkui@scu.edu.cn

收稿日期: 2009-11-12; 接受日期: 2010-01-07

随着世界经济不断发展,全球对化石能源的需求和消耗迅猛增长,发展可替代能源已迫在眉睫。我国作为第二大能源消费国,石油短缺已经成为制约我国经济发展的主要因素之一。生物柴油与化石柴油相比具有运动粘度高、闪点高、抗爆性能优良、环境友好、可再生等优点,是最具潜力的替代能源^[1-2]。微藻具有生长周期短、易工业化培养以及脂类物质含量高等优点,是制备生物柴油的良好材料,以藻类制备生物柴油已成为当前的研究热点^[3-4]。

目前国内对产油微藻的研究以异养培养为主^[5]。这使得以微藻为原料生产生物柴油培养成本和能耗较高,同时还会增加 CO₂ 排放^[6]。自养产油微藻可以在廉价光能作用下将氮源和无机碳源等营养成分转化成生物量和油脂等高附加值产品,而且其生产相对绿色环保,可以有效解决异养培养存在的问题,开发高油脂含量且生长迅速的藻种具有重要意义,是将微藻应用于工业生产的前提。但国内关于产油微藻的自养培养鲜有报道。本文通过人工分离得到自养生长的产油微藻,并就氮源与无机碳源(碳酸氢钠)对其自养生长和油脂积累的影响进行研究,以期自养产油微藻的进一步研究及大规模培养提供参考。

1 材料与方 法

1.1 分离微藻

取 5 mL 云南滇池水样, 10000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。补加水样至 5 mL, 重复操作 2 次, 得混合样品沉淀, 后用无菌水定容至 5 mL, 混匀, 得到相对高浓度的藻液。将制得的藻液, 以 10% (V/V) 接种量接种到 30 mL SE 培养液中, 于光照强度 4000 lux、温度 25°C 的光照培养箱中培养 15 d, 再以 10% (V/V) 接种量接种于新鲜 SE 培养基中, 连续转接 10 次。然后将得到的藻液逐步稀释成 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 和 10⁻⁶ 倍, 取后 3 个梯度涂布, 倒置于光照培养箱, 培养条件同上。后挑取单一藻种接种到 SE 培养基中, 培养条件同上, 后稀释涂布。循环操作 3 次, 最后得到所需的藻株。

1.2 培养基

SE 培养液: NaNO₃ 250 mg, K₂HPO₄·3H₂O 75 mg, MgSO₄·7H₂O 75 mg, CaCl₂·2H₂O 25 mg, KH₂PO₄ 175 mg, NaCl 25 mg, 土壤提取液 40 mL, FeCl₃·6H₂O 5 mg, Fe-EDTA 1 mL, A₅ 液 1 mL, 蒸馏水 958 mL。

1.3 培养方法

1.3.1 不同氮源对微藻生长和油脂积累的影响: 以培养至对数生长末期的藻液为种子培养液, 调整使其起始浓度相同, 以 10% (V/V) 接种量接种于无氮 SE 培养基, 并添加碳酸氢铵、硝酸钠、尿素使氮元素浓度为 41 mg/L, 置于光照强度为 4000 lux、150 r/min、25°C 的摇床中培养 28 d。

1.3.2 氮浓度对微藻生长和油脂积累的影响: 取种子培养液以 10% (V/V) 接种量接种于无氮 SE 培养基, 分别添加硝酸钠浓度为 41、123、615、1230 和 2460 mg/L, 培养条件同 1.3.1。

1.3.3 碳酸氢钠浓度对微藻生长和油脂积累的影响: 取种子培养液以 10% (V/V) 接种量接种于氮元素浓度为 123 mg/L 的 SE 培养基, 分别添加 NaHCO₃ 浓度为 0、100、200、400、800、1200 和 1600 mg/L, 培养条件同 1.3.1。

1.4 分析方法

微藻细胞密度测定: 采用紫外可见分光光度仪测定微藻溶液在 680 nm 处的吸光值 (OD₆₈₀), 并用血球计数板计数微藻个数, 建立微藻的细胞数与吸光度 OD₆₈₀ 的标准曲线, 曲线方程如下:

$$C. vulgaris: y = 5.420x - 0.076 \\ R^2 = 0.999$$

式中 x 为微藻的吸光值 OD₆₈₀, y 为微藻细胞密度 ($\times 10^7$ cells/mL)。

生物量的测定: 在对数生长末期, 取一定体积的藻液, 离心 (10000 r/min, 10 min) 收集藻细胞, 双蒸水洗涤 2 次后, 10000 r/min 离心 5 min, 经冷冻干燥, 称重, 以单位体积干重表示其生物量。

比生长速率: 比生长速率可用来评价微藻在一定时期内的总体生长情况。公式如下^[7]:

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$$

其中 μ 为比生长速率, N_1 为接种时藻细胞密度, N_2 为培养结束时藻细胞密度, $t_2 - t_1$ 为藻液接种到培养结束的时间间隔。

油脂含量测定: 重量法; 油脂含量 = (油脂质量/干藻粉质量) $\times 100\%$ 。

油脂提取: 氯仿甲醇法^[8]。

2 结果与讨论

2.1 高产油脂藻种筛选

多次分离纯化后得到 6 株纯微藻。将 6 株微藻于以尿素为氮源的 SE 培养基中培养, 培养条件同

1.3.1。不同藻种培养 28 d 后的最大生物量产率、油脂含量及油脂产率结果如表 1 所示。

从表 1 可以看到, 5 号藻种的最大生物量产率、油脂含量及油脂产率均最高, 分别为 101.8 mg/(L·d)、28.1%、28.6 mg/(L·d)。该藻为单细胞绿藻, 球形, 包含一个叶绿体, 无性繁殖, 参照《藻类与环境保护》分类^[9], 初步鉴定可知该藻属小球藻属, 建议命名为小球藻(*Chlorella vulgaris*)。选择 *C. vulgaris* 为出发藻种进行进一步研究。

2.2 不同氮源对 *C. vulgaris* 生长和油脂积累的影响

氮源对微藻的生长、发育、繁殖及油脂的积累等生理活动都有重要的影响。通常可以被微藻利用的氮源有铵盐、硝酸盐及尿素等, 但在吸收速度与利用程度上有所差别^[10]。实验考察了碳酸氢铵、硝酸钠、尿素等氮源对 *C. vulgaris* 生长和油脂积累的影响(图 1、2 及表 2)。

表 1 不同藻种生长和油脂积累
Table 1 Cell growth and lipid accumulation of different strains

藻种 Strain	最大生物量产率 Maximum biomass productivity [mg/(L·d)]	油脂含量 Lipid content (% W/W)	油脂产率 Lipid productivity [mg/(L·d)]
No.1	91.5	9.8	9.0
No.2	80.6	15.5	12.5
No.3	76.1	11.6	8.8
No.4	68.1	12.9	8.8
No.5	101.8	28.1	28.6
No.6	60.9	18.3	11.1

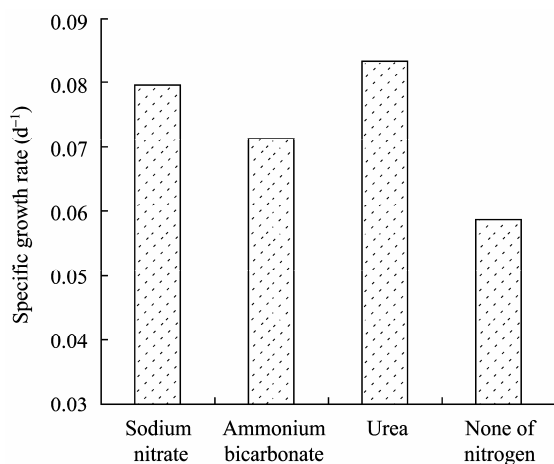


图 1 氮源对 *C. vulgaris* 比生长速率的影响
Fig. 1 Effect of nitrogen sources on specific growth rate of *C. vulgaris*

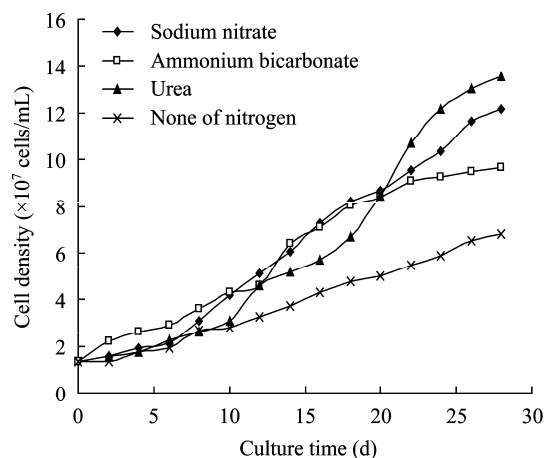


图 2 不同氮源下 *C. vulgaris* 的生长曲线
Fig. 2 Growth curves of *C. vulgaris* with different nitrogen sources

表 2 氮源对 *C. vulgaris* 生长和油脂积累的影响
Table 2 Effect of nitrogen sources on the growth and lipid accumulation of *C. vulgaris*

氮源 Nitrogen source	最大生物量产率 Maximum biomass productivity [mg/(L·d)]	油脂含量 Lipid content (% W/W)	油脂产率 Lipid productivity [mg/(L·d)]
硝酸钠 Sodium nitrate	93.3	33.6	31.3
碳酸氢铵 Ammonium bicarbonate	74.4	27.3	20.3
尿素 Urea	103.8	28.9	30.0
不加氮源 None of nitrogen	52.4	40.2	21.1

从图 1 看出, 与不添加氮源相比向培养液中添加 3 种不同氮源均有利于 *C. vulgaris* 的生长, 其中尿素的促进作用最强。*C. vulgaris* 在不同氮源条件下的生长趋势和生长周期相似(图 2), 藻细胞密度尿素组高于硝酸钠组和碳酸氢铵组, 分别为 13.6×10^7 、 12.2×10^7 和 9.7×10^7 cells/mL。由表 2 可知, 以硝酸钠为氮源, *C. vulgaris* 的最大生物量产率为 93.3 mg/(L·d), 低于尿素的 103.8 mg/(L·d); 但油脂含量为 33.6%, 高于尿素的 28.9%, 不添加氮源时油脂含量最高为 40.2%。目前关于氮源对微藻生长影响的研究认为, 不同氮源对于微藻各项生理指标的影响不同。胡章喜等^[11]研究表明, 以尿素为氮源时, *B. braunii*765 的细胞密度最高(OD 值为 1.87), 而以硝酸盐为氮源时, 其生物量(2.15 g/L)和总烃含量(27.89%)最高。本研究结果得到相似的结论, 3 种氮源相比, 尿素最有利于 *C. vulgaris* 的生长, 而硝酸

钠最有利于 *C. vulgaris* 的油脂积累。综合考虑生物量产率和油脂含量, 选择硝酸钠作为优化氮源, 此时的油脂产率最高为 31.3 mg/(L·d) (表 2)。

2.3 氮元素浓度对 *C. vulgaris* 生长和油脂积累的影响

微藻的培养过程中, 氮元素浓度是影响微藻油脂积累的最主要因素之一^[12]。实验以硝酸钠为氮源, 研究了氮元素浓度对 *C. vulgaris* 生长和油脂积累的影响, 结果见图 3、4 及表 3。

图 3 表明, 随着氮元素浓度的升高, *C. vulgaris* 的比生长速率先增大后减小, 说明高浓度氮元素对其生长有一定抑制作用。这与尹翠玲等^[13]的报道相一致, 原因可能是由于生长后期, 磷源被耗尽,

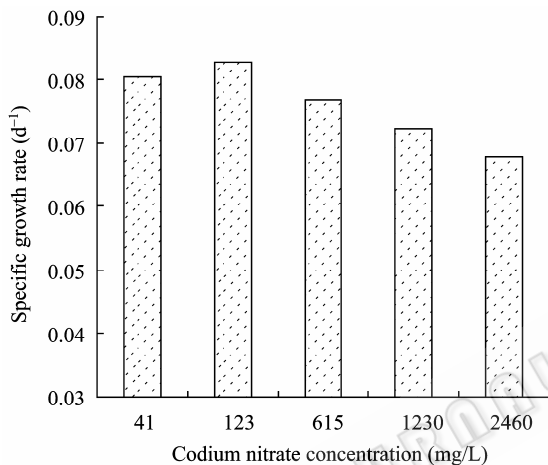


图 3 氮元素浓度对 *C. vulgaris* 比生长速率的影响
Fig. 3 Effect of nitrogen concentrations on specific growth rate of *C. vulgaris*

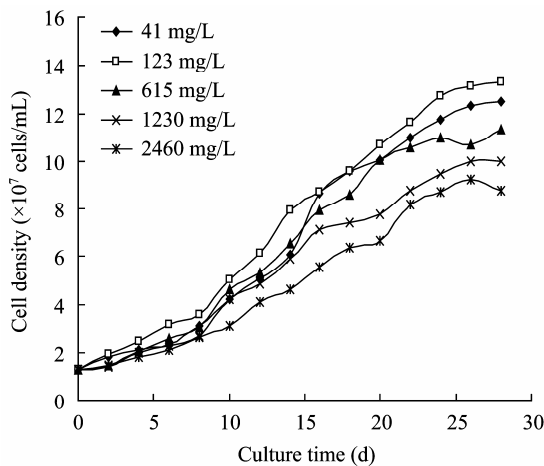


图 4 不同氮元素浓度下 *C. vulgaris* 的生长曲线
Fig. 4 Growth curves of *C. vulgaris* under different nitrogen concentrations

表 3 氮元素浓度对 *C. vulgaris* 生长和油脂积累的影响
Table 3 Effect of nitrogen concentrations on the growth and lipid accumulation of *C. vulgaris*

氮浓度 Nitrogen concentration (mg/L)	最大生物量产率 Maximum biomass productivity [mg/(L·d)]	油脂含量 Lipid content (% W/W)	油脂产率 Lipid productivity [mg/(L·d)]
41	95.8	33.5	32.1
123	102.1	32.4	33.1
615	86.6	28.6	24.8
1230	76.5	27.6	21.1
2460	67.5	26.4	17.8

氮/磷比例失调, 而藻细胞对氮源的过量吸收, 不利于细胞的分裂^[14]。氮元素浓度为 123 mg/L 时, *C. vulgaris* 的生物量最高为 13.3×10^7 cells/mL (图 4)。由表 3 可知, 随着氮元素浓度的增加, 油脂含量趋于降低; 最大生物量产率先增加后减少。当氮元素浓度为 41 mg/L 时, 油脂含量可达 33.5%, 最大生物量产率为 95.8 mg/(L·d); 氮元素浓度为 123 mg/L 时, 油脂含量为 32.4%, 最大生物量产率为 102.1 mg/(L·d)。小球藻的油脂含量一般为 8%–27%^[15], 本研究中出现较高油脂含量可能是由于当氮含量较低时, 产油微生物的腺苷一磷酸 (AMP) 脱氢酶的酶量增加, AMP 脱氢酶将 AMP 大量转化为肌苷一磷酸 (IMP) 和氨, 相当于微生物对缺氮的一种应激反应^[16], 而线粒体中异柠檬酸脱氢酶 (ICDH) 多为 AMP 依赖性脱氢酶, 细胞内 AMP 浓度的降低将减弱甚至完全停止该酶的活性^[17]。柠檬酸更多被柠檬酸裂解酶催化生成合成脂肪酸的原料乙酰辅酶 A, 从而使细胞内脂肪的积累量增加。鉴于氮元素浓度对细胞生长和油脂含量的积累具有相反的作用, 综合考虑生物量产率和油脂含量, 确定优化氮源浓度为 123 mg/L, 此时的油脂产率最高为 33.1 mg/(L·d)。

2.4 碳酸氢钠浓度对 *C. vulgaris* 生长和油脂积累的影响

藻类培养过程中由于受到 CO₂ 供应速率的限制, 使其生物量积累不高, 适量添加 NaHCO₃ 可以促进藻细胞生物量的增加。实验考察了不同 NaHCO₃ 浓度对微藻生长和油脂积累的影响 (图 5、6 及表 4)。由于 NaHCO₃ 的加入会改变培养液的 pH 从而影响微藻的生长, 因此实验还监测了培养过程中培养液的 pH 变化趋势如图 7 所示。

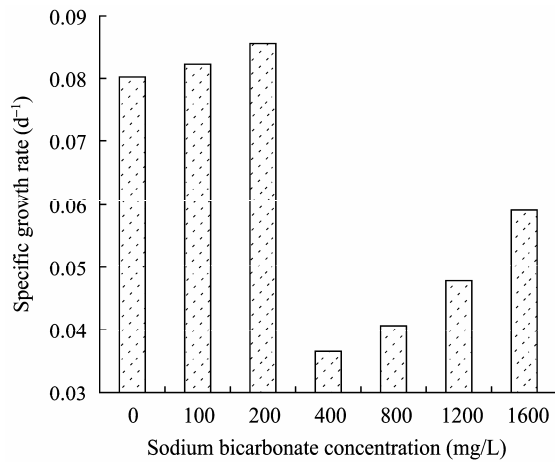


图5 NaHCO₃浓度对 *C. vulgaris* 比生长速率的影响
Fig. 5 Effect of sodium bicarbonate concentrations on specific growth rate of *C. vulgaris*

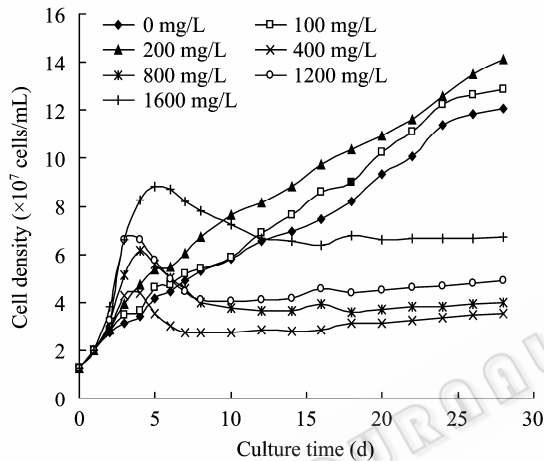


图6 不同 NaHCO₃ 浓度下 *C. vulgaris* 的生长曲线
Fig. 6 Growth curves of *C. vulgaris* under different sodium bicarbonate concentrations

表4 NaHCO₃浓度对 *C. vulgaris* 生长和油脂积累的影响

Table 4 Effect of sodium bicarbonate concentrations on the growth and lipid accumulation of *C. vulgaris*

NaHCO ₃ 浓度 Sodium bicarbonate concentration (mg/L)	最大生物量产率 Maximum biomass productivity [mg/(L·d)]	油脂含量 Lipid content (% W/W)	油脂产率 Lipid productivity [mg/(L·d)]
0 ^a	92.5	32.1	29.7
100 ^a	98.4	34.3	33.8
200 ^a	108.0	37.5	40.5
400 ^b	238.4	32.6	77.7
800 ^b	332.8	30.1	100.2
1200 ^b	358.5	28.4	101.8
1600 ^c	379.5	28.2	107.0

注: a: 第28天测定; b: 第4天测定; c: 第5天测定。

Note: a: Measured at the twenty-eighth day; b: Measured at the fourth day; c: Measured at the fifth day.

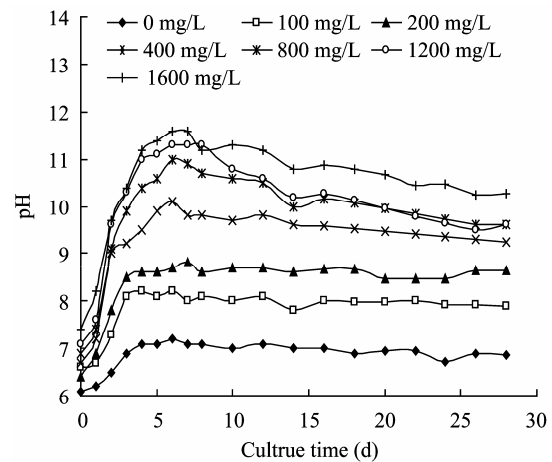


图7 不同碳酸氢钠浓度下培养液的 pH 随培养时间的变化
Fig. 7 The time-course changes of pH in the medium under different sodium bicarbonate concentrations

如图5显示,随着培养液中 NaHCO₃ 浓度的增加, *C. vulgaris* 的比生长速率先增大后减小,随后又增大。原因可能是,当 NaHCO₃ 的初始浓度小于 400 mg/L 时,培养液的 pH 始终低于 9,适于 *C. vulgaris* 的生长,且 NaHCO₃ 的浓度越高越有利于微藻生长;当 NaHCO₃ 初始浓度大于(等于) 400 mg/L 时,前3天培养液的 pH 在 6-9 之间(图7),适于 *C. vulgaris* 的生长,且在短时间内其生物量快速积累。5 d后,培养液的 pH 高于 9,对 *C. vulgaris* 的生长产生抑制。在藻类培养中,NaHCO₃ 不仅起到碳源的作用,而且起到缓冲剂的作用,一次性添加 NaHCO₃ 浓度过高时,藻液 pH 偏碱性,微藻生长就会受到限制。这与李爱芬等^[18]的研究报道相一致。当 NaHCO₃ 浓度为 200 mg/L 时, *C. vulgaris* 获得了最大的细胞密度 14.1×10^7 cells/mL (图6)。由表4可见,随着 NaHCO₃ 浓度的增加, *C. vulgaris* 的油脂含量先增加后减少。NaHCO₃ 的浓度为 200 mg/L 时, *C. vulgaris* 油脂含量最高可达 37.5%。虽然 NaHCO₃ 初始浓度大于(等于) 400 mg/L 时, *C. vulgaris* 的生长和油脂积累受到了抑制。但由于前4天的生物量积累迅速,显著地提高了生物量的生产效率。当 NaHCO₃ 初始浓度为 1600 mg/L 时, *C. vulgaris* 培养5 d 的最大生物量产率为 379.5 mg/(L·d), 油脂产率最高为 107.0 mg/(L·d)。NaHCO₃ 初始浓度为 800 mg/L 时, *C. vulgaris* 培养4 d 的最大生物量产率为 332.8 mg/(L·d), 油脂产率为 100.2 mg/(L·d)。从经济和油脂生产的角度考虑, *C. vulgaris* 的最佳 NaHCO₃ 浓度为 800 mg/L。

在此浓度下, *C. vulgaris* 的最大生物量产率和油脂产率分别是对照组的 3.6 和 3.4 倍。

3 结论

(1) 通过人工分离得到一株含油量高的自养微藻 *C. vulgaris*;

(2) 硝酸钠为 *C. vulgaris* 生长和产油的优势氮源, 其氮元素浓度为 123 mg/L 时, *C. vulgaris* 的最大生物量产率和油脂产率均达到最高;

(3) 适量的碳酸氢钠对 *C. vulgaris* 的生长和油脂积累有促进作用, 从经济和油脂生产的角度考虑, *C. vulgaris* 的最佳 NaHCO₃ 浓度为 800 mg/L。在此浓度下, *C. vulgaris* 的最大生物量产率和油脂产率均达到较高水平, 分别为 332.8 和 100.2 mg/(L·d)。

参 考 文 献

- [1] 李雪静, 张璐瑶, 乔明, 等. 藻类生物燃料研究开发进展. 中外能源, 2009, **14**(4): 23–26.
- [2] 宋东辉, 侯李君, 施定基. 生物柴油原料资源高油脂微藻的开发利用. 生物工程学报, 2008, **24**(3): 341–348.
- [3] 缪晓玲, 吴庆余. 藻类异养转化制备生物油燃料技术. 可再生能源, 2004, **116**(4): 41–44.
- [4] Harwood JL, Guschina IA. The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, 2009, **91**(6): 679–684.
- [5] Xu H, Miao XL, Wu QY. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Biotechnology*, 2006, **126**(4): 499–507.
- [6] 郑洪立, 张齐, 马小琛, 等. 产生物柴油微藻培养研究进展. 中国生物工程杂志, 2009, **29**(3): 110–116.
- [7] 刘晓娟, 段舜山, 李爱芬. 有机碳源对三角褐指藻生长、胞内物质和脂肪酸组分的影响. 生物工程学报, 2008, **24**(1): 147–152.
- [8] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of the total lipid extraction and purification. *Biochem Physiol*, 1959, **37**(8): 911–917.
- [9] 林毕琴, 姜彬慧. 藻类与环境保护. 沈阳: 辽宁民族出版社, 1999: 233–261.
- [10] 张诚, 邹景忠. 尖刺拟菱形藻吸收动力学以及氮磷限制下的增殖特征. 海洋与湖沼, 1997, **28**(6): 599–603.
- [11] 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. 生态学报, 2009, **29**(6): 3288–3294.
- [12] Liliana R, Graziella CZ, Niccolò B, et al. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, **102**(1): 100–112.
- [13] 尹翠玲, 梁英, 张秋丰. 氮浓度对球等鞭金藻 3011 和 8701 叶绿素荧光特性及生长的影响. 水产科学, 2008, **27**(1): 27–31.
- [14] Kolber Z, Zehr J, Falkowski P. Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy-conversion in photosystem II. *Plant Physiology*, 1988, **88**(3): 923–929.
- [15] 曹春晖, 孙世春. 30 株海洋绿藻的总脂含量和脂肪酸组成. 青岛海洋大学学报, 2000, **30**(3): 428–434.
- [16] Evans CT, Scragg AH, Ratledge C. Regulation of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous yeasts by adenine nucleotides. *Eur J Biochem*, 1983, **132**(3): 609–615.
- [17] Botham PA, Ratledge C. A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous microorganisms. *Gen Microbiol*, 1979(114): 361–375.
- [18] 李爱芬, 刘然, 刘晓娟, 等. 碳源对粉核油球藻生长和脂肪酸组成特性的影响. 水生生物学报, 2009, **33**(3): 461–466.