

不同碳氮比对小球藻增殖及油脂积累的影响

范同强 黄有军* (浙江农林大学林业与生物技术学院 浙江杭州 311300)

摘要 为了研究不同碳氮比对小球藻增殖及油脂积累的影响,采用BBM培养基,以蔗糖为碳源,硝酸铵为氮源,在12 h光照和12 h黑暗的条件下混合培养小球藻。设计不同的碳氮比例,采用 OD_{680} 来评价小球藻的生长情况,以盐酸破壁后用提取液提取油脂,计算不同处理下的小球藻油脂积累情况,并利用气相测定脂肪酸成分。结果表明:60/1比例下藻种出现最大的生长量,其次是30/1。而30/1比例下藻种出现最大的油脂积累率,其次是60/1。检测得各处理所含脂肪酸成分基本相同,均含有 C_{14} 、 C_{15} 、 C_{16} 、 C_{17} 、 C_{18} 、 C_{20} ;而30/9和60/1处理还含有 C_{12} 成分。30/1和60/1这2个处理含主要脂肪酸为 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ 和 $C_{18:2}$,含量为70%~74%,其余4个处理主要脂肪酸为 $C_{16:0}$ 和 $C_{18:0}$,含量为80%~86%。

关键词 小球藻;碳氮比;生长量;油脂积累

中图分类号 TE667 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)11-0007-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.11.007

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Effect of Different Carbon-Nitrogen Ratio on the Proliferation and Lipid Accumulation of *Chlorella*

FAN Tong-qiang HUANG You-jun (School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Agriculture & Forestry University, Hangzhou, Zhejiang 311300)

Abstract To investigate the effects of different carbon-nitrogen ratios on *Chlorella*'s proliferation and lipid accumulation, BBM medium was used to culture *Chlorella* under 12-hour of light and 12-hour of darkness with sucrose as carbon source and ammonium nitrate as nitrogen source. Different ratios of carbon and nitrogen were designed, OD_{680} was used to evaluate the growth of *Chlorella*, the oil was extracted after the cell wall was broken by hydrochloric acid. The oil accumulation of *Chlorella* was calculated under different treatments. And the composition of fatty acids was determined by gas-phase. The experimental results showed that the maximum growth rate of *Chlorella* was 60/1, followed by 30/1. While 30/1 ratio showed maximum oil accumulation rate, followed by 60/1. The fatty acid composition in each group was basically the same, including C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} and C_{20} , while the treatment of 30/9 and 60/1 also contained another C_{12} . The main fatty acids in 30/1 and 60/1 groups were $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ and $C_{18:2}$, with the content of about 70%~74%, while the other four treatments were $C_{16:0}$ and $C_{18:0}$, with the content of about 80%~86%.

Key words *Chlorella*; Carbon-nitrogen ratio; Growth; Lipid accumulation

近年来随着煤炭、石油等化石燃料的日益枯竭,科学家们将研究对象转向高效、清洁、可再生的生物能源。生物柴油是一种以动植物油脂为原料制备、可替代化石柴油的绿色新能源。然而,以动植物油脂为原料的生物柴油其原料成本占总生产成本的75%左右并且消耗大;可食用的植物油脂以餐饮废弃油脂为原料虽然可有效降低生产成本,但原料来源有限,难以满足大规模生产的需要,且产品的质量难以保证。微藻是一类单细胞藻类,其在特定的条件下可大量积累油脂,而且藻油具有与一般植物油脂类似的脂肪酸结构,因此被认为是一种具有巨大潜力的新型生物柴油油脂原料^[1]。与油料作物相比,微藻具有细胞增殖快、生产周期短、不受季节和土地的限制和所需的培养基来源丰富等优点^[2]。因此,通过培养微藻获取藻油对于保证油脂原料的可持续供应,促进生物柴油的广泛生产和应用具有重要意义^[3-4]。该研究以小球藻(*Chlorella* sp.)为材料,通过设计不同的碳氮比例对小球藻进行培养,记录过程中小球藻各指标的变化情况,计算并分析相关数据得出有关规律,最终选出最适于小球藻增殖和油脂积累的碳氮比。

1 材料与方法

1.1 藻种 小球藻(*Chlorella sorokiniana*)从中国科学院武汉水生生物所购得。

作者简介 范同强(1995—),男,安徽淮南人,硕士研究生,研究方向:生物学。*通信作者,副教授,博士,硕士生导师,从事发育生物学、生物信息学研究。

收稿日期 2019-11-07

1.2 仪器和设备 AL204型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);LDZX-75KBS型立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);SW-CJ-1C型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);SpH-3332型基本型大容量双层摇瓶机(上海海平实验设备有限公司);7230G型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);TDL80-2B型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);101-1型电热鼓风干燥箱(上海锦屏仪器仪表有限公司通州分公司);CF16RXII型高速冷冻离心机(Hitachi Koki Co., Ltd.);HH-4型数显恒温水浴锅(上海梅香仪器有限公司);GC-2010型气相色谱仪(日本岛津公司)。

1.3 不同培养基的配置 小球藻采用BBM培养基(4.5 L)为基本培养液(表1)。另在BBM培养液中加入蔗糖和硝酸铵的量分别为10.26、0.08,10.26、0.24,10.26、0.72,20.52、0.08,20.52、0.24,20.52、0.72 g/L,使6种培养基中的C/N比为30/1、30/3、30/9、60/1、60/3、60/9。

1.4 藻种培养 试验在装液量为300 mL的500 mL圆底烧瓶中进行。接种量为5 mL^[3],培养温度为室温,初始pH为7.0,光照时间为12 h,黑暗交替,光照强度为2 000 lx,摇床转速为120 r/min。自接种日到试验结束共培养18 d。

1.5 样品测定

1.5.1 细胞生长的测定。采用7230G型紫外分光光度计测定藻液在680 nm波长处的吸光度值,用 OD_{680} 变化表征小球藻的生长情况^[5],每个比例选择一个样品做3个重复,结果取平均值。从接种日起,隔2 d测1次,培养18 d后结束。

表1 BBM 培养基
Table 1 BBM medium

编号 No.	药品 Chemicals	浓度 Concentration//g/L
I	(×100)	
	NaNO ₃	0.25
	CaCl ₂ ·2H ₂ O(或CaCl ₂)	0.025(0.018 9)
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075
	KH ₂ PO ₄ ·3H ₂ O	0.175
II	NaCl	0.025
	(×100)	
	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.075
	PIV(6 mL/L)	
	1 L 水中加入 0.75 g ED-TA-2Na 充分溶解后加入(pH 6.4):	
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	97 mg
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	41 mg
	ZnCl ₂	5 mg
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	2 mg
	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	4 mg

1.5.2 藻粉的收集。收集不同培养阶段的小球藻藻液,以 3 000 r/min 的转速离心 5 min,弃上清液,蒸馏水冲洗藻泥,收集藻液,在 80 ℃ 的温度下烘干至恒重。

1.5.3 油脂的收集及含量测定。①将收集的干燥小球藻藻粉研磨均匀。②每个比例都称取 0.04 g 左右(重量计为 *m*)藻粉放入 10 mL 的离心管中。每个样品做 3 个重复。③向装有藻粉的离心管中加入 0.5 mL 的浓盐酸,盖上盖子在 80 ℃ 水浴 10 min,开盖继续水浴 5 min。④经盐酸处理后,再向离心管内加入 1:1 的乙酸乙酯和正己烷的提取液进行提取。加入提取液的离心管在水浴中多次摇晃混匀,提取

10 min,共提取 3 次,每次提取液的量分别为 5、4、4 mL。⑤在 11 000 r/min 的转速下离心 10 min,提取后的溶液合并入 20 mL 的离心管中,加入 6 mL 蒸馏水,在 3 000 r/min 的转速下离心 5 min。⑥准备足量干燥的培养皿并称重记为 *W*₁,将离心后的上层液取出混合放入已准备的干净培养皿内,恒温水浴挥干提取剂。⑦培养皿烘干后,再称取培养皿重量记为 *W*₂,故油脂含量 $C = (W_2 - W_1) / m \times 100\%$ 。

1.5.4 油脂成分的测定。用气相色谱测定脂肪酸成分,以氢火焰检测器检测。其工作条件为载气(*N*₂)流速为 3 mL/min;升温程序:100 ℃ 保持 3 min,以 10 ℃/min 的速度升温至 180 ℃,再以 3 ℃/min 的速度升至 240 ℃,保持 9 min;氢火焰检测器中 *H*₂ 的流速为 47 mL/min,空气流速为 400 mL/min,温度为 250 ℃。

1.6 数据分析 用 Excel 2003 分析统计数据,并作图。用 SPSS15.0 软件进行方差分析和多重比较(Duncan's 检验, $\alpha = 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同碳氮比对小球藻增殖的影响 小球藻从接种到收获共培养 18 d。随着培养时间的推移,培养液颜色逐渐由无色变成绿色再变成棕黄色最后变成黄白色。但培养液颜色发生变化的起始时间及变化程度因碳氮比例不同而不同。具体地,60/9 处理最先发生颜色变化;随后,30/9、60/3、30/3 等处理依次发生变化;而 30/1、60/1 处理在培养过程中颜色变化不明显(图 1)。Prabakaran 等^[6]研究表明,氮源供应不足会导致藻胞内叶绿素和胡萝卜素合成受到限制,使得藻胞呈色变化不明显。这合理地解释了我们所观察到的现象。

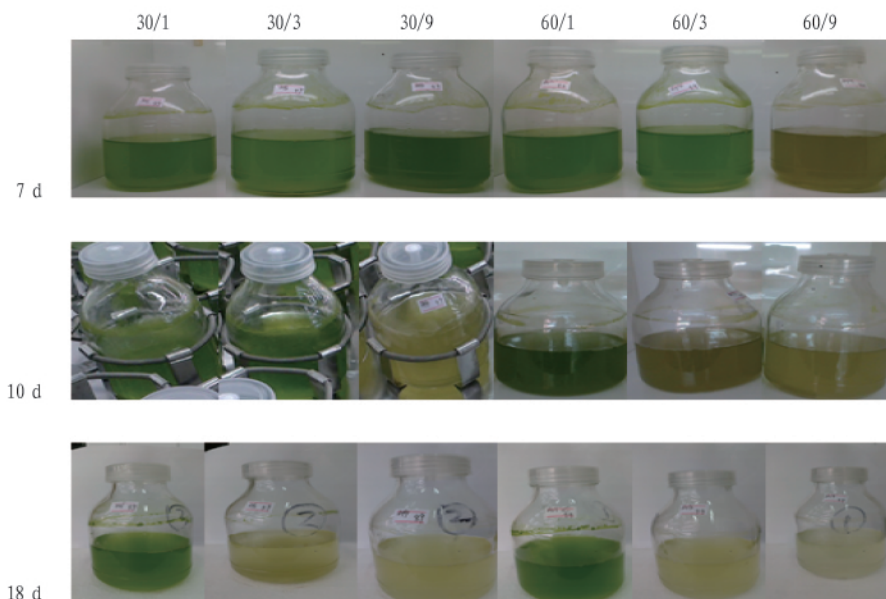


图1 不同时间点各 C/N 藻液颜色变化

Fig.1 The algal liquid color changes of each C/N at different time points

小球藻培养 18 d 内每个样品各测取 OD₆₈₀ 6 次,数据显示每个处理的变化趋势是随着时间推移而波动的。由图 2 可知,当小球藻生长达到稳定期时,碳氮比为 60/1 的小球藻 OD₆₈₀ 最大,达 0.916;其次是 30/1 的处理,为 0.767;60/3、30/3

和 30/9 这 3 个处理的最终值相近,为 0.650~0.690;而 60/9 处理的 OD₆₈₀ 最小,为 0.544。其中,60/1、30/1 这 2 个处理的数值变化逐渐上升;60/3、30/3 和 30/9 这 3 个处理的变化是先上升后下降;而 60/9 处理的变化不明显。数据表明碳氮

比值较大可促进小球藻生长,碳氮比值大即碳源量相对较大,这与刘香华等^[7]研究表明的碳源有利于小球藻的增殖理论相一致。同时可初步确定小球藻生长所需的碳氮最适配比为 60/1,其次是 30/1。

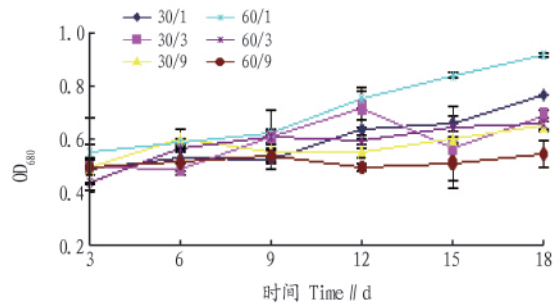


图 2 不同 C/N 藻种的 OD₆₈₀ 变化

Fig.2 OD₆₈₀ changes of algae species under different C/N treatments

2.2 不同碳氮比对小球藻油脂积累的影响

2.2.1 油脂积累情况。取不同培养时间的小球藻藻液测定其油脂百分含量,共计 3 次。分析发现,培养初期,小球藻的油脂积累率最高为处理 30/1,最高值为 27.86%;培养中期,小球藻的油脂积累率最大值为 30.70%,该值在处理 30/1 中测得;培养末期,小球藻的油脂积累率由高到低的处理顺序是 30/1、60/1、30/3、60/9、30/9、60/3,最高达 34.32%(图 3)。其中,30/1 处理在培养末期达到最大的油脂积累率,为 34.32%;其次是处理 60/1,达 30.09%,而 30/3、60/3、30/9、60/9 四者的油脂积累率相近,为 17.6%~25.70%。

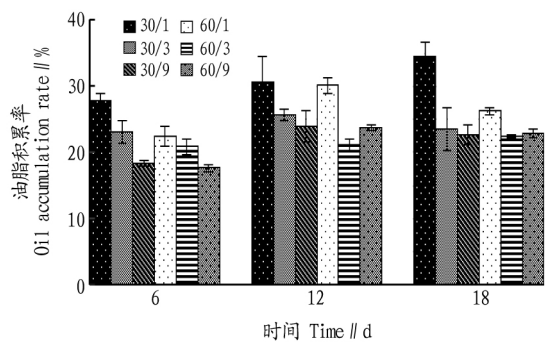


图 3 不同时间不同 C/N 藻种油脂积累率

Fig.3 The oil accumulation rate of algae species under different C/N treatments in different time

2.2.2 油脂积累率方差分析。第 6 天,处理 30/1 和其他 5 组处理间存在极显著性差异(表 2);处理 30/3 分别和 30/9、60/9 存在极显著性差异;处理 60/1、60/3 与 30/9、60/9 也存在极显著差异。第 12 天,处理 30/1 和处理 30/9、60/3、60/9 存在极显著差异;处理 60/1、30/3 和处理 30/9、60/3、60/9 也都存在极显著差异。第 18 天,处理 30/1 和其余各处理都存在极显著差异。综上可初步确定小球藻油脂积累的最佳碳氮配比是 30/1,其次是 60/1。

2.3 不同碳氮比对小球藻脂肪酸组成的影响 研究表明^[8]在同浓度的相同碳源中,处于稳定期的小球藻更趋向于油脂的积累,该试验所研究的即是稳定期不同碳氮比培养基中小

球藻脂肪酸组成成分(表 3)。6 个不同碳氮比处理的小球藻油脂中都包含了 C₁₄、C₁₅、C₁₆、C₁₇、C₁₈、C₂₀ 6 种脂肪酸成分;而处理 30/9 和 60/1 的小球藻油脂中除上述 6 种脂肪酸外还具有 C₁₂ 脂肪酸。其中 30/1 和 60/1 两者的小球藻油脂中主要脂肪酸为 C_{16:0}、C_{18:0} 和 C_{18:2},占总脂肪酸含量的 70%~74%,其余四者的小球藻油脂中主要脂肪酸为 C_{16:0} 和 C_{18:0},占总脂肪酸含量的 80%~86%;各个处理油脂成分都由饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸三者组成,其中饱和脂肪酸总量远大于不饱和脂肪酸总量。具体地,30/1 和 60/1 组合多不饱和脂肪酸大于单不饱和脂肪酸的现象较为明显,而其余组合这 2 种不饱和脂肪酸的含量相差不明显^[9]。

表 2 不同时间各处理间油脂积累率的差异显著性

Table 2 The significant differences of oil accumulation rate between the treatments in different time

时间 Time//d	处理 Treatment	0.05	0.01
6	30/1	a	A
	30/3	b	B
	60/1	b	B
	60/3	bc	BC
	30/9	cd	C
	60/9	d	C
12	30/1	a	A
	60/1	a	A
	30/3	b	AB
	30/9	b	B
	60/9	b	B
	60/3	b	B
18	30/1	a	A
	60/1	b	B
	30/3	b	B
	60/9	b	B
	30/9	b	B
	60/3	b	B

3 结论与讨论

氮源供应不足会导致藻胞内叶绿素和胡萝卜素合成受到限制,使得藻胞呈色变化不明显。较大的碳氮比可促进小球藻的生长,即高碳低氮的处理环境有利于小球藻增殖。该试验初步确定小球藻生长所需的碳氮最适配比为 60/1,其次是 30/1。在氮浓度较低的情况下,碳氮比较小者可促进油脂的积累。该试验初步确定有利于小球藻油脂积累的最适碳氮配比是 30/1,其次是 60/1。各处理所含脂肪酸成分基本相同,分别为 C₁₄、C₁₅、C₁₆、C₁₇、C₁₈、C₂₀ 6 种,而 30/9 和 60/1 处理除以上成分之外,还含有 C₁₂ 脂肪酸。30/1 和 60/1 这 2 个处理主要脂肪酸为 C_{16:0}、C_{18:0} 和 C_{18:2},含量为 70%~74%,其余四者主要脂肪酸为 C_{16:0} 和 C_{18:0},含量为 80%~86%。各个处理油脂成分都由饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸三者组成,其中饱和脂肪酸总量远大于不饱和脂肪酸总量。

表3 不同 C/N 对小球藻的脂肪酸组成的影响

Table 3 The effect of different C/N on fatty acid composition in *Chlorella*

脂肪酸 Fatty acid	30/1	30/3	30/9	60/1	60/3	60/9
C _{12:0}	0	0	0.07	0.03	0	0
C _{12:1}	0	0	0.76	0.65	0	0
C _{14:0}	0.72	1.27	1.19	0.48	1.34	1.28
C _{15:0}	0.21	0.71	1.17	0.20	0.93	1.20
C _{15:1}	0.17	1.00	1.51	0.19	1.41	1.38
C _{16:0}	36.28	55.74	55.63	34.94	57.24	58.21
C _{16:1}	1.15	0.79	0.75	1.05	0.80	0.67
C _{16:2}	7.13	3.48	3.41	8.00	3.62	3.08
C _{17:0}	1.46	4.51	3.87	2.53	4.11	3.85
C _{17:1}	3.63	0.61	0.28	4.00	0.42	0.27
C _{18:0}	23.65	26.19	28.74	15.10	26.06	27.79
C _{18:1}	2.45	1.80	0.88	2.45	1.20	0.76
C _{18:2}	14.85	2.17	0.78	21.09	1.57	0.71
C _{18:3}	7.97	1.19	0.33	9.13	0.58	0.24
C _{20:0}	0.25	0.25	0.28	0.09	0.23	0.26
C _{20:1}	0.07	0.28	0.37	0.05	0.48	0.31
ΣSFA	62.57	88.67	90.95	53.37	89.91	92.59
ΣMUFA	7.47	4.48	4.91	8.39	4.31	3.39
ΣPUFA	29.95	6.84	4.52	29.09	5.77	4.03

注: SFA 为饱和脂肪酸; MUFA 为单不饱和脂肪酸; PUFA 为多不饱和脂肪酸

Note: SFA is saturated fatty acid; MUFA is monounsaturated fatty acid; PUFA is polyunsaturated fatty acid

近年内, 科学者对小球藻增殖和油脂积累情况的研究有了不少的成果。众多研究表明培养基中氮水平是影响微藻生化成分的最主要因素。故大多数关于氮源的研究都是在低氮浓度, 即氮限制的条件下去进行的。也有少量文献报道了非限制性或高氮浓度下的微藻培养, 这通常可得到总生物量或某种成分的最大生成量, 但总脂占干重的百分数有所下降。众多研究证实随着氮浓度的减少, 小球藻生长量也随之减少但其油脂积累增加, 因为在氮不足时碳元素更多地趋向于合成脂质和碳水化合物, 同时导致细胞生长缓慢, 相对高浓度的氮源有利于生物量的增加但不利于油脂的积累^[5,7], 该试验现象与之相符。

在不同的碳氮比下研究细胞内油脂的含量和脂肪酸的组成, 发现碳限制或氮限制均能促进细胞内脂肪的合成。但前者更为明显, 因为较低的碳氮比使不饱和脂肪酸增加更为明显。当碳氮比较高时, 碳供应过量, 氮成为限制性因素, 此时细胞内脂肪含量的增加可用碳储存机制解释。氮限制性培养常会增加细胞内脂肪酸的饱和程度, 这可能是因为氮是合成氨基酸所必需的元素, 氮限制性培养会使氨基酸的合成减少, 从而引起蛋白质含量丰富的色素体的生成减少, 进而导致对磷脂以及这些细胞器相关的甘油酯(均为膜结构组分)的需求降低。细胞内主要的长链不饱和脂肪酸绝大部分位于细胞膜的极性脂中, 所以当膜结构减少时, PUFA 含量相应下降^[10]。这可以用来解释该试验中图3的部分结果。因为脂类中脂肪酸分布不同, 所以由培养条件和生长期的变化引起的脂类组成的变化将导致胞内总的脂肪酸组成的变化。

该试验研究了小球藻培养液中不同碳氮比对小球藻增殖、油脂积累和脂肪酸成分的影响, 所得结果可从碳氮比整体、碳氮各自浓度高低、生长期等各方面进行分析, 它是一个交互影响的结果。

参考文献

- [1] CHISTI Y. Biodiesel from microalgae [J]. *Biotechnol Adv* 2007, 25(3): 294-306.
- [2] 金城. 小球藻生产生物柴油的研究 [J]. *微生物学通报* 2010, 37(8): 1258.
- [3] 张璐瑶, 李雪静. 利用微藻制备生物燃料现状及应用前景 [J]. *润滑油与燃料* 2009, 19(Z3): 15-18.
- [4] 周晓琴, 苏翔, 王涛. 等. 微藻生物柴油在国内外的研究 [J]. *重庆工商大学学报(自然科学版)* 2012, 29(6): 79-84.
- [5] 吕旭阳, 张雯, 杨阳. 等. 分光光度法测定小球藻数量的方法研究 [J]. *安徽农业科学* 2009, 37(23): 11104-11105.
- [6] PRABAKARAN P, RAVINDRAN A D. Influence of different Carbon and Nitrogen sources on growth and CO₂ fixation of microalgae [J]. *Advances in applied science research* 2012, 3(3): 1714-1717.
- [7] 刘香华, 刘雷, 曾慧卿. 不同碳源及光照对小球藻生长和产油脂的影响 [J]. *安全与环境学报* 2012, 12(3): 6-10.
- [8] NIGAM S, RAI M P, SHARMA R. Effect of nitrogen on growth and lipid content of *Chlorella pyrenoidosa* [J]. *American journal of biochemistry and biotechnology* 2011, 7(3): 124-129.
- [9] 陈炜, 梁明明, 白永安. 等. 小球藻不同生长时期总脂含量和脂肪酸组成的变化 [J]. *水产科学* 2013, 32(9): 545-548.
- [10] 石娟, 潘克厚. 不同培养条件对微藻总脂含量和脂肪酸组成的影响 [J]. *海洋水产研究* 2004, 25(6): 79-85.