

生物柴油与微生物油脂

无机碳源对小球藻自养产油脂的影响

郑洪立¹, 高振², 张齐¹, 黄和^{1,3}, 纪晓俊¹, 孙洪磊⁴, 窦畅¹

1 南京工业大学生物与制药工程学院, 南京 210009

2 南京工业大学食品与轻工学院, 南京 210009

3 材料化学工程国家重点实验室, 南京 210009

4 中国石油天然气股份有限公司石油化工研究院, 北京 100029

摘要: 旨在研究小球藻利用无机碳自养产油脂, 考察了 3 种无机碳源 (Na_2CO_3 、 NaHCO_3 和 CO_2) 及其初始浓度对小球藻产油特性的影响。结果表明, 小球藻能利用 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 和 CO_2 产油; 经 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 和 CO_2 培养 10 d 后, 随着每种无机碳源浓度的增加, 小球藻产量均先增加后减少。小球藻经 3 种无机碳源培养后, 其培养液 pH 值上升。最适宜的 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 添加量均为 40 mmol/L, 其生物量分别达到 0.52 g/L 和 0.67 g/L, 产油量分别达到 0.19 g/L 和 0.22 g/L。在 3 种无机碳源中, CO_2 是最佳无机碳源, 当 CO_2 浓度为 6% 时, 小球藻生长最快, 生物量达 2.42 g/L, 产油量最高达 0.72 g/L; 当 CO_2 浓度过低时, 无机碳供应不足, 油脂产量低; 当 CO_2 浓度过高时, 培养液 pH 偏低, 小球藻油脂积累受到抑制。 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 较 CO_2 更有利于小球藻积累不饱和脂肪酸。

关键词: 小球藻, 自养, 无机碳, 生物柴油

Effect of inorganic carbon source on lipid production with autotrophic *Chlorella vulgaris*

Hongli Zheng¹, Zhen Gao², Qi Zhang¹, He Huang^{1,3}, Xiaojun Ji¹, Honglei Sun⁴, and Chang Dou¹

1 College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

2 College of Food Science and Light Industry, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

3 State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, Nanjing 210009, China

4 Petroleum Research Institute, China National Petroleum Corporation, Beijing 100029, China

Abstract: We studied the effects of three inorganic carbon sources, Na_2CO_3 , NaHCO_3 and CO_2 , and their initial concentrations

Received: September 6, 2010; **Accepted:** February 21, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 20936002), National Basic Research Program of China (973 Program) (Nos. 2007CB707805, 2009CB724700, 2011CB200906), the Fifth of Six Projects Sponsoring Talent Summits of Jiangsu Province, College Industrialization Project of Jiangsu Province, Program for Century Excellent Talents in University from the Ministry of Education of China (No. NCET-09-0157), Fok Ying Tung Education Foundation, Ministry of Education of China (No. 123014).

Corresponding author: Zhen Gao. Tel/Fax: +86-25-83172094; E-mail: gaozhen@njut.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 20936002), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (Nos. 2007CB707805, 2009CB724700, 2011CB200906), 江苏省六大大人才高峰项目, 江苏省高校科研成果产业化推进项目, 教育部新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-09-0157), 教育部霍英东教育基金资助 (No. 123014) 资助。

on lipid production of *Chlorella vulgaris*. *Chlorella vulgaris* could utilize Na_2CO_3 , NaHCO_3 and CO_2 to produce lipids. After 10-day cultivation with each of the three inorganic carbon sources, lipid yield of *Chlorella vulgaris* reached its peak with the concentration increase of the inorganic carbon source, but dropped again by further increase of the concentration. The pH value of the culture medium for *Chlorella vulgaris* increased after the cultivation on inorganic carbon source. The optimal concentration of both Na_2CO_3 and NaHCO_3 was 40 mmol/L, and their corresponding biomass dry weight was 0.52 g/L and 0.67 g/L with their corresponding lipid yield 0.19 g/L and 0.22 g/L. When the concentration of CO_2 was 6%, *Chlorella vulgaris* grew the fastest and its biomass dry weight was 2.42 g/L with the highest lipid yield of 0.72 g/L. When the concentration of CO_2 was too low, the supply of inorganic carbon was insufficient and lipid yield was low. A too high concentration of CO_2 caused a low pH and lipid accumulation was inhibited. Na_2CO_3 and NaHCO_3 were more favorable for *Chlorella vulgaris* to accumulate unsaturated fatty acids than that of CO_2 .

Keywords: *Chlorella vulgaris*, autotrophy, inorganic carbon, biodiesel

目前人类使用的能源主要是化石能源, 而化石能源存在不可再生、其使用后造成环境污染、危害人类健康、 CO_2 排放等严重的问题, 开发化石能源的替代能源已经成为科技工作者的当务之急^[1-2]。生物柴油以其可再生、环境友好、安全的特性, 被视为本世纪最具发展潜力的新能源之一。生物柴油的原料有很多, 但是相比之下, 微藻油脂作为生物柴油原料有其独特的优势, 因微藻光合作用效率高、生长周期短、单位面积产量大、易于培养、油脂含量高、减排 CO_2 , 而且能将产油脂与太阳能利用、废水净化相结合; 微藻生物柴油已成为国内外科学家的研究热点^[3]。

小球藻是一种富含油脂的微藻^[4], 其油脂是以 CO_2 为光合作用反应物经一系列代谢而合成。研究报道表明^[5], 小球藻还能利用细胞表面的碳酸酐酶将 HCO_3^- 转化成 CO_2 供 RUBPase 固定, 因此小球藻只能固定水中 CO_2 和 HCO_3^- 两种形式的溶解无机碳。目前, 小球藻生物柴油研究过程中采用的碳源一般为无机碳源, 所用无机碳源多为 CO_2 , 研究多集中于 CO_2 浓度优化^[6]、通 CO_2 速率对小球藻产油的影响^[7], 在小球藻利用 CO_2 产油研究方面已取得了较大进展。 CO_3^{2-} 和 HCO_3^- 形式的无机碳源对小球藻产油的影响未见报道。海水中存在 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等离子, 会对 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 和 CO_2 三种无机碳源在培养液中所形成的溶解无机碳形式及其比例产生影响。培养液中溶解无机碳形式及其比例影响小球

藻对其中 HCO_3^- 和 CO_2 的利用, 因而 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 和 CO_2 三种无机碳源会影响小球藻生长及其油脂合成代谢。而目前尚未见有关不同无机碳源 (Na_2CO_3 、 NaHCO_3 和 CO_2) 及其初始浓度对海洋小球藻光合作用及其油脂合成代谢、脂肪酸分布影响的报道。

本文以海洋小球藻为实验对象, 研究 3 种无机碳源 (Na_2CO_3 、 NaHCO_3 和 CO_2) 及其各初始浓度下小球藻的产油特性, 并分析脂肪酸组成的差异, 旨在提高小球藻对无机碳源的利用效率及其产油效率, 为自养小球藻工业化高产油脂和减排 CO_2 提供理论基础和实验依据, 推动微藻生物柴油的发展。

1 材料与方法

1.1 试验材料

藻种: 试验所用的小球藻 *Chlorella vulgaris* LICME001 (中国典型培养物保藏中心编号: CCTCC No: M 209256) 由南京工业大学工业催化与代谢工程实验室保藏。

保种培养基: 采用 f/2 液体培养基。

试验培养基 (g/L): 海盐 34, Na_2EDTA 0.1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, KH_2PO_4 0.1 和 KNO_3 0.3。分别加入初始浓度为 0、20、40、60 和 80 mmol/L 的 Na_2CO_3 或 NaHCO_3 , 或通入浓度为 0、3%、6%、9% 和 12% 的 CO_2 (供气采用高纯 CO_2 钢瓶与高纯 N_2 钢瓶, CO_2 和 N_2 气体混合用气体混合器来实现,

通气量为 0.3 vvm), 以研究不同无机碳源下小球藻产油特性。以 0.5 mol/L NaOH 或 HCl 调节培养基的初始 pH 值。

1.2 试验方法

摇瓶培养: 根据试验设计的要求, 将对数期藻种细胞接种到 250 mL 三角瓶, 接种量 (V/V) 为 10%, 在恒温光照摇床中培养, 条件为 150 r/min, 25 °C, 光照强度 2 000 lx。

光生物反应器培养: 将摇瓶中培养到对数期的藻种接种到反应器中, 反应器为本实验室自主设计的鼓泡式光生物反应器, 反应器规格: 体积为 2 L (工作体积为 1.5 L); 外置光源 (日光灯), 接种量 (V/V) 为 10%, 整个培养过程光照强度为 5 000 lx, 光暗周期=12:12, 温度为 (25±2) °C, 培养周期为 10 d。

1.3 分析检测方法

叶绿素含量的测定: 取 5 mL 藻液, 低速离心收集藻细胞, 用双蒸水洗 3 次, 加入 5 mL 的 100% 甲醇溶液, 用移液器吹吸均匀, 室温避光静置 1 h 后, 8 000 r/min、4 °C 下离心 10 min, 取上清, 测定 OD_{652} 及 OD_{665} 值。根据下列公式分别计算出叶绿素 a 和 b 含量 (单位: mg/L)^[8]:

$$\text{Chl a} = (16.29 \times OD_{665}) - (8.54 \times OD_{652});$$

$$\text{Chl b} = (30.66 \times OD_{652}) - (13.58 \times OD_{665}).$$

pH 值测定: 取 30 mL 藻液于离心管中, 用 pH 计 (雷磁 pHs-3D, 上海精密科学仪器有限公司) 测定。

生物量的测定: 用 UV-1200 型紫外可见分光光度计 (上海美谱达仪器有限公司) 在 680 nm 处测定藻液光密度 (OD), 每天测定 1 次, 根据标准曲线回归方程 C (生物量干重) = $0.560 \times OD_{680}$ ($R^2=0.986$) 换算成藻生物量干重。

产油量测定: 待测定藻液经离心收集藻体后, 藻体用蒸馏水洗涤 3 次, 经溶菌酶破碎 (破碎条件: 50 °C, 10 h, 酶用量: 50 mg/L), 提取油脂, 油脂提取采用 Bligh 和 Dyer 法^[9], 油脂重量测定采用称重法^[10]。试验重复 3 次, 取平均值。

油脂组成 GC-MS 检测: 分别取经 Na_2CO_3 (浓度: 40 mmol/L)、 NaHCO_3 (浓度: 40 mmol/L) 和 CO_2 (浓度: 6%) 培养 10 d 的藻粉 0.5 g, 经提取油脂, 采用 KOH- CH_3OH 甲酯化^[11], 脂肪酸的气相色谱-质谱定性定量分析参考文献^[12]。

2 结果与分析

2.1 三种无机碳源对小球藻生长的影响

2.1.1 三种无机碳源对小球藻光合色素的影响

叶绿素是小球藻的光合色素, 其含量的高低直接影响光合作用效率^[13]。图 1 为不同初始浓度 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 和 CO_2 对小球藻叶绿素 a 和 b 含量的影响。由图 1 可见, 经过 10 d 培养, 当 Na_2CO_3 初始浓度从 0 mmol/L 增加到 80 mmol/L 时, 叶绿素 a 含量从 1.18 mg/L 增加到 6.16 mg/L, 叶绿素 b 含量从 0.15 mg/L 增加到 1.96 mg/L; 当 Na_2CO_3 初始浓度为 40 mmol/L 时, 其叶绿素 a 含量为 6.16 mg/L 和叶绿素 b 含量为 1.96 mg/L, 均达到各自的最高。培养 10 d 后, 当 NaHCO_3 初始浓度从 0 mmol/L 增加到 80 mmol/L 时, 叶绿素 a 含量从 1.14 mg/L 增加到 8.71 mg/L, 叶绿素 b 含量从 0.28 mg/L 增加到 3.08 mg/L; 当 NaHCO_3 初始浓度为 40 mmol/L 时, 其叶绿素 a 和 b 含量均达到各自的最大值, 分别为 8.71 和 3.08 mg/L。随着 CO_2 浓度的增加, 其对应的叶绿素 a 和 b 含量均分别呈先增加后下降的趋势; 当 CO_2 浓度为 6% 时, 其叶绿素 a 含量为 18.14 mg/L, 叶绿素 b 含量为 6.02 mg/L, 均达到各自的最大值。三种无机碳源培养后, 叶绿素 a 与 b 的比例为 2:1~4:1。

三种无机碳源中, 直接通 CO_2 时叶绿素含量最高, 说明最有利于小球藻光合作用; 实验过程发现: 添加 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 时, 培养液变浑浊, 这可能与培养液添加了海盐, 所使用的海盐中含有 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等离子有关; 试验中添加的 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 与海盐中的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等离子形成了 MgCO_3 、 CaCO_3 等沉淀, 从而影响了小球藻光合作用过程中无机碳

的供给和光合色素合成。而通入 CO_2 培养液没有变浑浊, 说明没有形成沉淀, 因此小球藻无机碳源的供给不受影响, 其光合色素合成不受影响, 光合作用效率高。在藻培养过程中 NaHCO_3 有两个作用: 一是作为无机碳源, 二是调节培养液 pH 值, 保持碱性环境, 可抑制污染生物繁殖, 保证藻养殖质量。Yoo 等的研究也表明无机碳源的供给影响小球藻的生长^[6]。

2.1.2 三种无机碳源对小球藻培养结束时 pH 值的影响

将培养液的初始 pH 调至 7.2, 接种海洋小球藻藻种, 培养 10 d 后, 测定其培养液 pH, 各小球藻培养液的 pH 值见图 2。经过 10 d 培养, 当 Na_2CO_3 初始浓度从 0 mmol/L 增加到 80 mmol/L 时, pH 值从 7.6 上升到 9.2; 当 Na_2CO_3 初始浓度为 40 mmol/L 时, 其 pH 值达到最高为 9.2。培养 10 d 后, 当 NaHCO_3

初始浓度从 0 mmol/L 增加到 80 mmol/L 时, pH 值从 7.7 上升到 9.8; 当 NaHCO_3 初始浓度为 40 mmol/L 时, 其 pH 值达到最高为 9.8。随着 CO_2 浓度的增加, 其对应的 pH 值呈先增加后下降的趋势; 当 CO_2 浓度为 6% 时, 其 pH 值达到最大为 9.5。较初始 pH 值, 小球藻经不同初始浓度 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 和 CO_2 培养 10 d 后, 其培养液 pH 值均上升, 即出现 pH 漂移现象, 但漂移程度不同。研究结果表明, 在不同初始浓度 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 和 CO_2 培养下, 小球藻生长越快, 其 pH 漂移越明显 (图 2、3)。随着 pH 的升高, 小球藻生长变缓, 说明改变后的 pH 可能已经偏离该藻的最佳生长范围。

本研究结果表明三种无机碳源培养小球藻, 出现 pH 漂移现象。这是由于小球藻在密闭光生物反应器中一定 pH 值的添加海盐培养液及适宜温度、光照等条件下连续照光, 随小球藻光合作用对无机碳

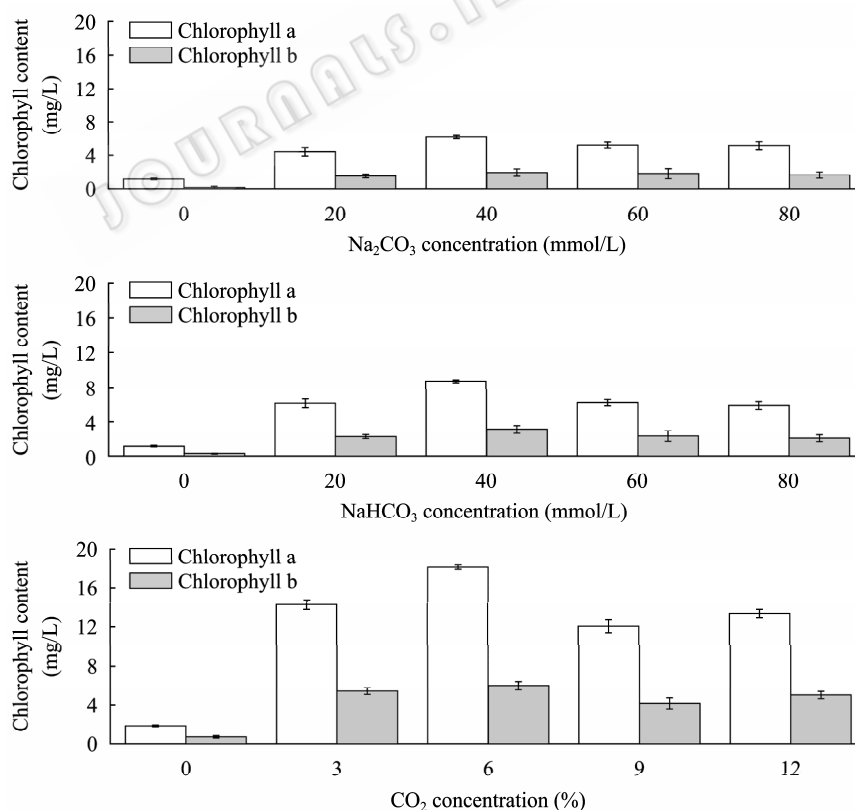


图 1 三种无机碳源对叶绿素含量的影响

Fig. 1 Effect of three kinds of inorganic carbon source on chlorophyll content of *Chlorella vulgaris*.

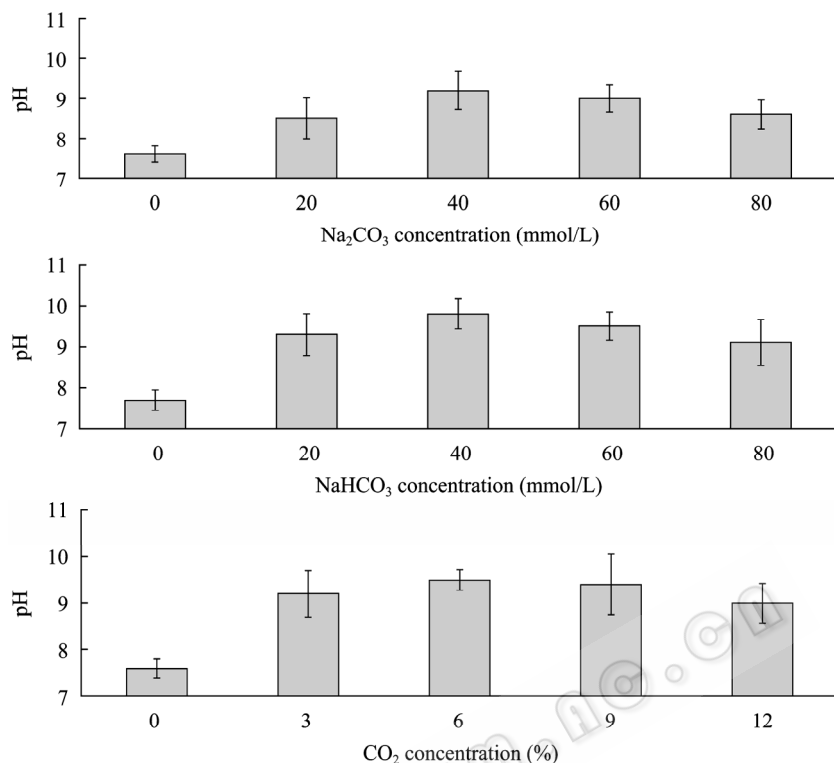


图2 三种无机碳源对小球藻培养液 pH 的影响

Fig. 2 Effect of three kinds of inorganic carbon source on the pH of *Chlorella vulgaris* culture medium.

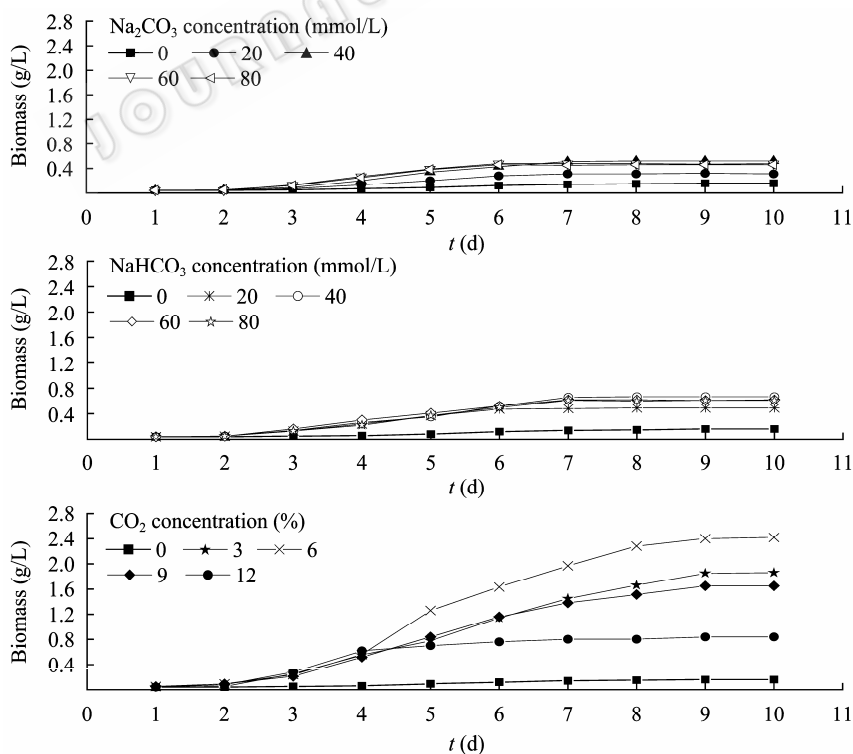


图3 三种无机碳源对小球藻生物量的影响

Fig. 3 Effect of three kinds of inorganic carbon source on biomass of *Chlorella vulgaris*.

的利用,水中无机碳不断减少,导致 pH 值不断升高,故出现 pH 漂移的现象^[14]。pH 影响培养液中 HCO_3^- 、 CO_2 和 CO_3^{2-} 的存在形式和比例,为消除培养液初始 pH 值差异的影响,本实验 3 种无机碳培养液初始 pH 均调为 7.2,此时培养液中 HCO_3^- 、 CO_2 和 CO_3^{2-} 存在形式和比例是一样的^[15]。实验结果(图 3)表明通 CO_2 最有利于小球藻对溶解无机碳的利用, NaHCO_3 次之, Na_2CO_3 利用效果最差。这是由于在配培养液时(调初始 pH 前), NaHCO_3 和 Na_2CO_3 与培养液所添加海盐中的 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(根据培养液的浑浊程度判断),而通 CO_2 没有形成沉淀;故添加 NaHCO_3 、添加 Na_2CO_3 和通 CO_2 培养液中所含 HCO_3^- 、 CO_2 和 CO_3^{2-} 的摩尔数不一样,通 CO_2 培养液所含 HCO_3^- 、 CO_2 和 CO_3^{2-} 的摩尔数 > 添加 NaHCO_3 培养液 > 添加 Na_2CO_3 培养液。培养液 pH 影响溶解无机碳形式及其比例,当海水 pH 值小于 6 时,溶解无机碳以 HCO_3^- 和 CO_2 两种形式存在,其中以 CO_2 形式为主;当海水 pH 值介于 6 和 9 之间时,溶解无机碳以 HCO_3^- 、 CO_2 和 CO_3^{2-} 三种形式存在,其中以 HCO_3^- 形式为主;当海水 pH 值大于 9 时,溶解无机碳以 HCO_3^- 和 CO_3^{2-} 两种形式存在,其中以 CO_3^{2-} 形式为主^[15]。而小球藻只能固定 CO_2 和 HCO_3^- 两种形式的溶解无机碳^[5],本实验 pH 漂移影响小球藻对溶解无机碳的利用,故 pH 漂移影响小球藻的生长和产油。因此,对小球藻利用无机碳源产油的后续研究应进一步调控培养液 pH,以期得到更理想的单位产油量。

2.1.3 三种无机碳源对小球藻生物量的影响

图 3 为不同初始浓度 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 和 CO_2 对小球藻生物量的影响。从图 3 中可以看出,当 Na_2CO_3 初始浓度为 0~80 mmol/L 时,各初始浓度对小球藻生物量的影响趋势相近,接种后 2 d 内,各浓度的生物量没有差异;2 d 后,随着培养天数的增加,各浓度的生物量均呈先增加后达到稳定,生物量在培养 7 d 左右达到稳定,各浓度的最大生物量

介于 0.16~0.52 g/L 之间。当 NaHCO_3 初始浓度为 0~80 mmol/L 时,各初始浓度下小球藻生物量增长趋势相近,接种后 2 d 内,各浓度的生物量没有差异;2 d 后,随着培养天数的增加,各浓度的生物量均呈先增加后达到稳定,生物量在培养 7 d 左右达到稳定,各浓度的最大生物量介于 0.16~0.67 g/L 之间。当 CO_2 初始浓度为 0~12% 时,各初始浓度下小球藻生物量增长趋势相近,接种后 2 d 内,各浓度的生物量没有差异;2 d 后,随着培养天数的增加,各浓度的生物量均呈先增加后达到稳定,生物量在培养 9 d 左右达到稳定,各浓度的最大生物量介于 0.16~2.42 g/L 之间。当 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 和 CO_2 初始浓度分别为 40 mmol/L、40 mmol/L 和 6% 时,其生物量(分别为:0.52、0.67 和 2.42 g/L)均达到各自的最大值,分别是未添加无机碳的 3.3、4.2 和 15.1 倍; Na_2CO_3 、 NaHCO_3 和 CO_2 初始浓度过高或过低生物量均减少。

直接通 CO_2 生物量最高,说明最有利于小球藻生长;而 Na_2CO_3 作为无机碳源时生物量最低,说明最不利于小球藻生长。这可能与 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 作为碳源会与海盐中 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等相关离子产生沉淀有关。在配培养液时, NaHCO_3 和 Na_2CO_3 与培养液所添加海盐中的 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(根据培养液的浑浊程度判断),从而添加 Na_2CO_3 比添加 NaHCO_3 对小球藻利用无机碳源的影响更大;而通 CO_2 没有形成沉淀,不影响小球藻对无机碳源的利用。本试验研究表明适宜浓度的无机碳源有利于小球藻的生长;这与刘然等的研究结果一致^[16]。

2.2 三种无机碳源对小球藻油脂的影响

2.2.1 三种无机碳源对小球藻油脂产量的影响

不同初始浓度 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 和 CO_2 对小球藻油脂产量的影响见图 4。由图 4 可知,接种后前 2 天,各浓度油脂产量均不增加,此后随着培养天数增加,对应的油脂产量均分别呈先快速增加后稳定增加;当 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 和 CO_2 初始浓度分别为

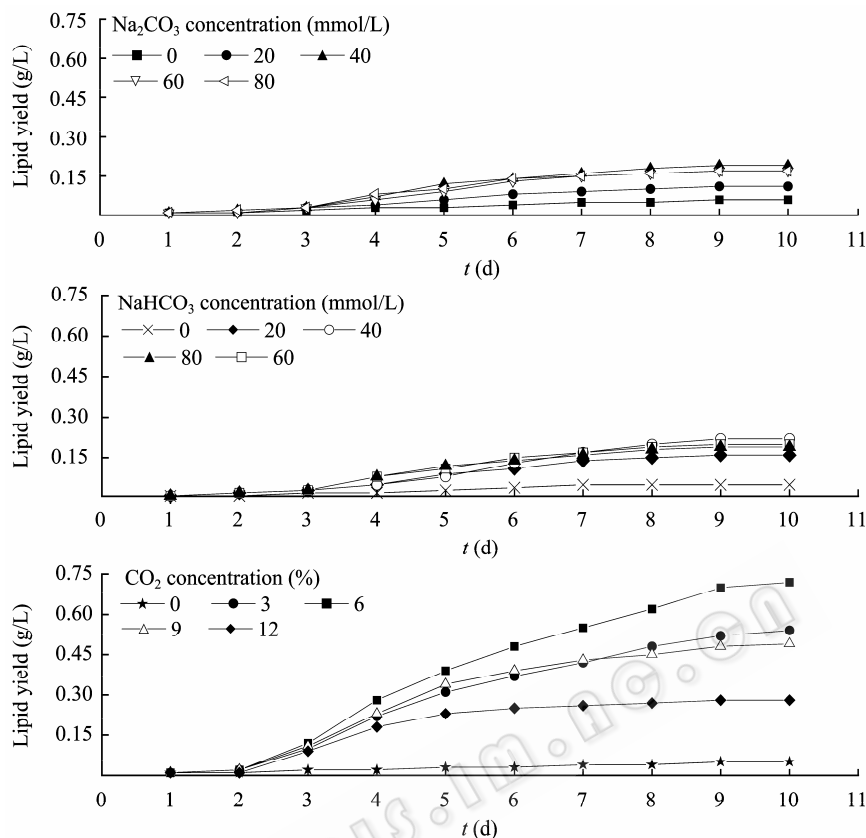


图4 三种无机碳源对小球藻油脂产量的影响

Fig. 4 Effect of three kinds of inorganic carbon source on lipid yield of *Chlorella vulgaris*.

40 mmol/L、40 mmol/L 和 6% 时，其对应油脂产量（分别为：0.19、0.22 和 0.72 g/L）均达到各自的最大值；通 CO₂ 的最大油脂产量是添加 Na₂CO₃、NaHCO₃ 和未添加无机碳的 3.8、3.3 和 12 倍；Na₂CO₃、NaHCO₃ 和 CO₂ 初始浓度过高或过低均不利于油脂的合成。添加无机碳源较未添加的油脂产量高。

在三种无机碳源中，直接通 CO₂ 油脂产量最高，说明最有利于小球藻油脂积累；而 Na₂CO₃ 作为无机碳源时油脂产量最低，说明最不利于小球藻油脂积累。在通入 CO₂ 过程中会形成对培养液的搅拌作用，搅拌作用一方面有利于藻细胞与培养液中营养物质等之间的充分接触，同时可避免藻细胞在培养过程中下沉。另一方面有利于藻在反应器中暗、光照区的交换，提高其光合效率，因此促进小球藻的生长和油脂积累^[17]。低或高浓度 CO₂ 均不利于油脂积累，这可能是由于 CO₂ 是光合作用和油脂合成的底物，

CO₂ 浓度低则光合作用和油脂合成的底物供应不足。而 CO₂ 浓度过高则会引起培养液的 pH 过低^[17]。pH 下降势必影响小球藻油脂合成过程中核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶、乙酰辅酶 A 羧化酶等关键酶活性。本研究还发现：通过驯化，可以显著提高小球藻对 CO₂ 浓度的耐受能力；经过 5 个驯化周期，小球藻耐 CO₂ 浓度可达 10% 以上，这有待进一步研究。

2.2.2 三种无机碳源对小球藻脂肪酸组成的影响

为考察三种无机碳源对小球藻脂肪酸组成的影响，利用 GC-MS 检测了最佳初始浓度 Na₂CO₃ (40 mmol/L)、NaHCO₃ (40 mmol/L) 和 CO₂ (6%) 对应小球藻主要脂肪酸的组成。由表 1 可得，培养 10 d 后，三种无机碳源 (Na₂CO₃、NaHCO₃ 和 CO₂) 培养的小球藻所含主要脂肪酸种类相同，且其碳链长度均介于 C14 到 C20 之间，其中 95% 以上脂肪酸是 C16 和 C18 系列脂肪酸；三种无机碳源培养的小

表 1 三种无机碳源对小球藻脂肪酸组成 (占总脂肪酸含量的百分比) 的影响

Table 1 Effect of three kinds of inorganic carbon source on fatty acids composition of *Chlorella vulgaris* (percent of total fatty acids)

Fatty acids	Na ₂ CO ₃	NaHCO ₃	CO ₂
C14:0	0.42	0.58	0.66
C16:0	18.25	17.29	22.76
C16:1	25.59	26.75	23.31
C16:2	3.27	2.44	1.95
C18:0	0.34	0.88	1.09
C18:1	46.51	45.85	45.36
C18:2	3.99	3.52	1.14
C20:0	1.63	2.69	3.73
Polyunsaturated fatty acids	79.36	78.56	71.76
Saturated fatty acids	20.64	21.44	28.24

球藻不饱和脂肪酸含量均在 70% 以上, 而添加 Na₂CO₃ 和 NaHCO₃ 其不饱和脂肪酸比例较通入 CO₂ 高。这可能与不利条件下生长的微藻其不饱和脂肪酸含量会增加有关^[18]。研究表明生物柴油含有的脂肪酸主要是棕榈酸 (C16:0)、十六碳烯酸 (16:1)、硬脂酸 (C18:0)、油酸 (C18:1) 和亚麻酸 (C18:3)^[19], 而以上 5 种脂肪酸在本实验小球藻脂肪酸中所占比例在 90% 以上, 因此小球藻油脂是良好的生物柴油原料。

3 结论

三种无机碳源及其初始浓度对小球藻生长及产油均具有显著影响。Na₂CO₃、NaHCO₃ 和 CO₂ 均可作为小球藻自养产油脂的碳源, Na₂CO₃、NaHCO₃ 和 CO₂ 最佳初始浓度分别为 40 mmol/L、40 mmol/L 和 6%, Na₂CO₃、NaHCO₃ 和 CO₂ 初始浓度过高或过低均不利于小球藻生长及产油。由于本实验小球藻是海洋小球藻, 所用海盐中存在 Ca²⁺、Mg²⁺等离子, Na₂CO₃ 和 NaHCO₃ 作为无机碳源的效果较差。CO₂ 是最佳无机碳源; CO₂ 作为无机碳源不会与海盐中的 Ca²⁺、Mg²⁺等离子形成沉淀, 而向藻液中通入 CO₂ 所形成的搅拌有利于小球藻受光、营养物质

的吸收和防止小球藻细胞下沉。小球藻只能固定水中 CO₂ 和 HCO₃⁻ 两种形式的溶解无机碳, 但 Na₂CO₃ 也可作为小球藻自养产油脂的碳源, 说明其在水中溶解后可能含有 CO₂ 和 HCO₃⁻ 两种形式或其中某一种形式。小球藻叶绿素 a 与 b 的比例为 2:1~4:1。小球藻经三种无机碳源培养后, 其培养液 pH 值上升。三种无机碳源 (Na₂CO₃、NaHCO₃ 和 CO₂) 培养的小球藻所含主要脂肪酸种类相同, 添加 Na₂CO₃ 和 NaHCO₃ 其不饱和脂肪酸比例较通入 CO₂ 高; 三种无机碳源的脂肪酸 95% 以上是 C16 和 C18 系列脂肪酸, 其不饱和脂肪酸含量均在 70% 以上, 因此小球藻油脂是制备生物柴油的良好原料。

致谢: 感谢中国石油天然气股份有限公司资助!

REFERENCES

[1] Sun T, Du W, Liu DH, et al. Stability of whole cell biocatalyst for biodiesel production from renewable oils. Chin J Biotech, 2009, 25(9): 1379-1385.
孙婷, 杜伟, 刘德华, 等. 固定化全细胞催化可再生油脂合成生物柴油的稳定性. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1379-1385.

[2] Zheng HL, Zhang Q, Ma XC, et al. Research progress on bio-diesel producing microalgae cultivation. China Biotechnol, 2009, 29(3): 110-116.
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.

[3] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnol Adv, 2007, 25(3): 294-306.

[4] Schenk PM, Thomas-Hall SR, Stephens E, et al. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. Bioenerg Res, 2008, 1(1): 20-43.

[5] Cheng LH, Zhang L, Chen HL, et al. Advances on CO₂ fixation by microalgae. Chin J Biotech, 2005, 21(2): 177-181.
程丽华, 张林, 陈欢林, 等. 微藻固定 CO₂ 研究进展. 生物工程学报, 2005, 21(2): 177-181.

[6] Yoo C, Jun SY, Lee JY, et al. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. Bioresource Technol, 2010, 101(1): S71-S74.

[7] Chiu SY, Kao CY, Tsai MT, et al. Lipid accumulation and

- CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technol*, 2009, 100(2): 833–838.
- [8] Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1989, 975(3): 384–394.
- [9] Elince GB, William MD. A rapid method of lipid extraction and purification. *Can J Biochem and Physiol*, 1959, 37: 911–917.
- [10] Converti A, Casazza AA, Ortiz EY, 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.
- [11] Volkman JK, Jeffrey SW, Nichols PD, et al. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1989, 128(3): 219–240.
- [12] Jin MJ, Huang H, Xiao AH, et al. A novel two-step fermentation process for improved arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. *Biotechnol Lett*, 2008, 30(6): 1087–1091.
- [13] Liu ZY, Wang GC. Dynamics of lipid accumulation in marine microalga *Chlorella vulgaris* promoted by iron. *Mar Sci*, 2008, 32(11): 56–59.
- 刘志媛, 王广策. 铁促进海水小球藻油脂积累的动态过程. *海洋科学*, 2008, 32(11): 56–59.
- [14] Yue GF, Wang JX, Zhu MY, et al. Progress of inorganic carbon acquisition by algae (I): origin and methods of the studies. *Mar Sci*, 2003, 27(5): 15–18.
- 岳国峰, 王金霞, 朱明远, 等. 藻类无机碳营养的研究进展(I)——研究起源及研究方法. *海洋科学*, 2003, 27(5): 15–18.
- [15] Beer S, Eshel A, Waisel Y. Carbon metabolism of seagrasses (I). The utilization of exogenous inorganic carbon species in photosynthesis. *J Exp Bot*, 1977, 28(5): 1180–1187.
- [16] Liu R, Liu XJ, Wang M, et al. Effects of inorganic carbon sources on growth of *Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP 2078. *Ecol Sci*, 2007, 26(3): 227–231.
- 刘然, 刘晓娟, 王铭, 等. 不同无机碳源对粉核油球藻生长的影响. *生态科学*, 2007, 26(3): 227–231.
- [17] Michels MHA, van der Goot AJ, Norsker NH, et al. Effects of shear stress on the microalgae *Chaetoceros muelleri*. *Bioproc Biosyst Eng*, 2010, 33(8): 921–927.
- [18] Renaud SM, Thinh LV, Lambrinidis G, et al. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 2002, 211(1/4): 195–214.
- [19] Knothe G. “Designer” biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energ Fuel*, 2008, 22(2): 1358–1364.