

高、低氮浓度对 2 株真眼点藻的生长和油脂积累的影响

吴桂秀 高保燕 周芷薇 雷学青 黄罗冬 李爱芬 张成武*

(暨南大学 生态学系 水生生物研究中心 广东 广州 510632)

摘要:【目的】研究氮浓度对真眼点藻纲(Eustigmatophyceae)的 2 株高产油微藻大真眼点藻(*Eustigmatos magnus*, EM)和波氏真眼点藻(*Eustigmatos polyphem*, EP)的细胞形态、生长、总脂含量、脂质组成和脂肪酸组成与含量的时序变化规律。【方法】利用高氮(18.0 mmol/L NO₃⁻-N)和低氮(3.6 mmol/L NO₃⁻-N)浓度培养微藻。【结果】形态观察结果表明,大真眼点藻(*E. magnus*)和波氏真眼点藻(*E. polyphem*)营养细胞具有 1 个周生的裂叶状叶绿体,细胞质中有液泡,内含能够振动的颗粒物,以及一个较为明显的红色色素体;生殖方式通过形成 2 个 D 形或 4 个四角形的似亲孢子;随着培养周期的延伸和营养盐的消耗,细胞中油体逐步形成,其数量不断增加,体积不断增大。实验结果表明,初始氮浓度对 2 种微藻的总脂积累及生长均有显著影响($P < 0.05$),低氮浓度下 2 种微藻的生物物质浓度分别为 9.0 g/L 和 8.5 g/L,均低于高氮浓度下的生物物质浓度。而低氮浓度下 2 种微藻的总脂、中性脂和总脂肪酸的含量以及总脂、中性脂与总脂肪酸的单位体积产率均明显高于高氮浓度组,其最高值分别为:59.10%、51.90%、46.95%和 0.28、0.24、0.22 g/(L·d) (EM); 64.20%、56.80%、50.01%和 0.32、0.28、0.25 g/(L·d) (EP)。脂肪酸分析结果表明,两种微藻的脂肪酸主要成分均为棕榈酸(C16:0)、棕榈油酸(C16:1)、油酸(C18:1)和二十碳五烯酸(C20:5, EPA),四者的总含量(占总脂肪酸)分别达到 85.83%和 85.48%,其中棕榈油酸的含量最高。【结论】低氮浓度胁迫有利于大真眼点藻和波氏真眼点藻细胞内油脂的积累,两种微藻均为适合于生产生物柴油的油脂生产藻株。

关键词:大真眼点藻,波氏真眼点藻,总脂,中性脂,脂肪酸,单位体积产率

Effects of high and low nitrogen concentration on the growth and lipids accumulation pattern of two oleaginous microalgae

WU Gui-Xiu GAO Bao-Yan ZHOU Zhi-Wei LEI Xue-Qing HUANG Luo-Dong
LI Ai-Fen ZHANG Cheng-Wu*

(Research Center for Hydrobiology, Department of Ecology, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

Abstract: [Objective] To study the time-course changes in the cell morphology, growth, total lipid contents, lipid fractions and fatty acids profiles of *Eustigmatos magnus* and *Eustigmatos polyphem* (Eustigmatophyceae) under two different initial nitrate concentrations. [Methods] The cultured

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2013AA065805); 国家自然科学基金项目(No. 31170337); 广东省低碳专项项目(No. 2011-051); 珠海市科技重点项目(No. PB20041018); 珠海市科技攻关项目(No. PC20081008)

*通讯作者: Tel: 86-20-85224366; ✉: tzhangew@jnu.edu.cn

收稿日期: 2014-11-03; 接受日期: 2014-12-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-01-22

concentration were 18.0 mmol/L (high nitrogen concentration) and 3.6 mmol/L (low nitrogen concentration). **[Results]** The cell morphology and formation process of oil bodies of *E. magnus* and *E. polyphem* were also observed. The results showed that the vegetative cells of *E. magnus* and *E. polyphem* are usually oval to spherical. There are a single parietal, lobed chloroplast, conspicuous vacuoles, many vibrating granules and a large reddish pigment body in cytoplasm. The main reproduction way is by forming two D-shaped or four tetragonal autospores. The oil bodies emerged in cytoplasm along with cultivation time extending and nutrients exhausting. The initial nitrate concentration had a significantly influence on the growth and lipids accumulation of these two microalgae ($P < 0.05$). The biomass concentrations of *E. magnus* and *E. polyphem* cultured under low nitrogen concentration were 9.0 g/L and 8.5 g/L, respectively, which were less than those gained at high nitrogen group. However, the higher contents and volumetric productivities of total lipids, neutral lipids and total fatty acids of these two microalgae were obtained at low nitrogen concentration. Their highest values reached 59.10%, 51.90%, 46.95%, 0.28 g/(L·d), 0.24 g/(L·d), 0.22 g/(L·d) (*E. magnus*); 64.20%, 56.80%, 56.80%, 0.32 g/(L·d), 0.28 g/(L·d), 0.25 g/(L·d) (*E. polyphem*), respectively. The fatty acids analysis indicated that the main fatty acids compositions of these two microalgae were palmitic acid, palmitoleic acid, oleic acid and eicosapentaenoic acid, which were up to 85.83% and 85.48% (of total fatty acids), respectively, among them, the content of palmitoleic acid was highest one. **[Conclusion]** Low-nitrogen stress is conducive to storage lipids accumulation of *E. magnus* and *E. polyphem*, and both two microalgae are promising feedstock for biodiesel production.

Keywords: *Eustigmatos magnus*, *Eustigmatos polyphem*, Total lipids, Neutral lipids, Fatty acids, Volumetric productivity

生物柴油(Biodiesel)是指通过醇解植物油和动物脂肪制备所获得的脂肪酸甲酯或乙酯,可用于压燃式发动机的新型清洁的可再生能源^[1]。在自然界中可用于提取油脂制备生物柴油的生物资源有很多种,在欧洲、北美主要利用植物油来生产,日本则通过回收废弃的食用油^[2-3],但其效率往往较低,难以满足工业化生产的需要。产油微藻具有生长速度快、占地资源少、分布较广和含油量高的特点,且油脂产率明显高于普通油料作物^[4],因此微藻是一种具有极大潜力的可持续生物燃料的来源^[5],微藻生物燃料因其独特的优势吸引了越来越多的决策者和研究者的关注^[6-8]。

微藻油脂的积累与培养条件密切相关,特别是在低氮胁迫条件下能促进微藻细胞内油脂的积累^[9-10]。Klok 等^[9]在氮浓度限制的条件用平板光生物反应器对富油新绿藻(*Neochloris oleoabundans*)进行连续培养,发现在氮限制条件下总脂含量大量积累,并发现储藏性油脂主要为三酰甘油(TAG),可以为微藻光合作用提供能量。同样,Adams 等^[10]通过定量氮浓度需求进行分批培养 6 种微藻时,生

物量和脂质在培养周期内均有所提高。虽然氮胁迫能促进微藻细胞内脂质的积累,但同时也会导致生物量的减少^[11-13],已有研究表明,大部分微藻大量积累油脂发生在细胞分裂受阻或抑制时(如氮缺乏等逆境条件下),由于光合作用并未中断,碳继续被细胞固定同化^[14-17],此时细胞内油脂大量积累但细胞数目增长缓慢甚至减少,这致使总生物量的增长减缓,进而制约了总油脂生产量的提高^[18]。

大真眼点藻(*Eustigmatos magnus*)和波氏真眼点藻(*Eustigmatos polyphem*)均隶属于异鞭藻门(Heterokontophyta)、真眼点藻纲(Eustigmatophyceae)、真眼点藻属(*Eustigmatos*),是 2 株极具潜力的高产油黄绿色单细胞微藻^[19]。此前对真眼点藻的研究主要集中在生化组分分析、光合生理特性、色素提取与测定,但对真眼点藻在氮因子胁迫下油脂含量是否会提高还鲜见报道。为此本研究以大真眼点藻、波氏真眼点藻为实验材料,探讨高氮(氮充足)和低氮浓度胁迫对其生长、总脂含量、总脂组分、脂肪酸组成以及单位总脂产率的影响,以期在生长率和含油率之间求得平衡,为能源

微藻的研究及培养条件的优化提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验藻种大真眼点藻(*E. magnus*)、波氏真眼点藻(*E. polyphem*)为暨南大学水生生物研究中心微藻生物技术与生物能源实验室保藏。

1.2 仪器及试剂

光学显微镜,日本奥林巴斯公司;高速冷冻离心机,日本久保田公司;冷冻干燥机,美国 VIRTIS 公司;氮吹仪,美国 Organomation 公司;气相色谱仪,美国安捷伦公司。

正己烷(色谱纯);硫酸、十七烷酸(C17:0)、硝酸钠、二甲基亚砷、甲醇、乙醚、氯仿、甲苯、丙酮等,国产分析纯。

1.3 实验设计

为了比较高、低氮浓度对大真眼点藻(*E. magnus*)和波氏真眼点藻(*E. polyphem*)生长和油脂积累的影响,两株微藻分别培养于改良的 BG-11 培养基(高氮浓度,培养基成分为:18.0 mmol/L NaNO_3 , 0.22 mmol/L K_2HPO_4 , 0.3 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.24 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 31.2 $\mu\text{mol/L}$ Citric acid, 22.2 $\mu\text{mol/L}$ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.69 $\mu\text{mol/L}$ Na_2EDTA , 0.19 mmol/L Na_2CO_3 , 1 mL A5 微量元素溶液)和 NaNO_3 浓度降为 3.6 mmol/L 的 BG-11 培养基(低氮浓度)中, \varnothing 3.0 cm \times 60 cm 的柱状光生物反应器为培养容器,入射表面的光照强度为 $300 \pm 10 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,持续光照,通入富含 1.0% CO_2 的压缩空气通气培养,温度为 $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$,取对数生长期微藻接种,藻细胞初始接种浓度为 $OD_{750} = 0.70 \pm 0.02$,培养 18 d,每个氮浓度实验组均设置 3 个平行。

1.4 实验方法

1.4.1 藻细胞形态学观察:每隔 72 h 取两实验组的藻液制片,通过 Olympus 光学显微镜(100 \times)进行藻细胞形态结构观察,并拍照记录不同培养时期细胞形态的变化和细胞内油体形成过程。

1.4.2 生物量测定:通过重量法测定生物量来监测

细胞的生长。每隔 24 h 取藻液 10 mL,用预先烘至恒重(记为 M_0)的混合纤维滤膜(0.45 μm)真空抽滤,然后于 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘干至恒重(M_1)。生物量(Dry weight, DW)计算公式为: $DW (\text{g/L}) = (M_1 - M_0) \times 100$ 。

1.4.3 藻粉的制备:根据微藻培养物的生物量大小,每隔 3 d 收获一定体积的藻液,3 000 r/min 离心 5 min,收获的藻泥 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻结,然后冷冻干燥 24 h。冻干的藻粉于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存待用。

1.4.4 总脂含量的测定:将培养周期中每隔 3 d 获得的冻干藻粉,参考文献[20]方法进行改进测定其中的总脂含量。称取 80–100 mg 冻干藻粉(记为 m_0),置于体积为 15 mL 具胶垫瓶盖的螺口玻璃离心管中,放入磁性转子,加入 2 mL 二甲基亚砷-甲醇混合液(1:9, 体积比),于磁力搅拌水浴锅中 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 1 h;然后在冰浴抽提 1 h,3 000 r/min 离心 5 min,用滴管吸取上清置于洁净干燥的小玻璃瓶中。剩余藻渣再加入 4 mL 正己烷-乙醚混合液(1:1, 体积比),冰浴下磁力搅拌抽提 1 h,3 000 r/min 离心 5 min,转移上清液至上述对应的小玻璃瓶中。以上操作重复至少一遍直至藻渣变为灰白色。在合并抽提液中加入 4 mL 纯水,使水:甲醇:乙醚:正己烷的体积比为 1:1:1:1,静置分层,有机相转移到另一小玻璃瓶中,在通风橱中用氮吹仪吹干浓缩,将浓缩液转移至预先称重的 2.0 mL 塑料离心管中(管重记为 m_1),用氮气吹干至恒重(记为 m_2),置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。利用差量法计算干燥粉中总脂的含量,计算公式为:总脂含量 $\omega_1(\% \text{DCW}) = (m_2 - m_1) / m_0 \times 100$ 。

1.4.5 总脂分级:参考 Alonzo 等^[21]对浮游动物中性脂与极性脂研究的方法进行优化,用提取的总脂为样品,采用硅胶层析柱对总脂组分进行分级分离。先用三氯甲烷活化硅胶层析柱,然后分别用 3 种洗脱剂对样品进行洗脱,洗脱顺序如下:三氯甲烷洗脱中性脂、丙酮-甲醇混合液(9:1, 体积比)洗脱糖脂、甲醇洗脱磷脂。然后将洗脱分离的各组份用氮吹仪加热吹干后加入乙醚分别溶解,再转移至称重过的 2.0 mL 塑料离心管中,再次用氮气吹干至恒

重后称其重量, 利用差量法计算中性脂、糖脂和磷脂分别在总脂和干燥粉中的百分含量。

1.4.6 脂肪酸组成分析: 参考 Bigogno 等^[22]方法进行改进, 称取 25 mg 冻干藻粉, 置于预先加入转子的具胶垫螺口瓶盖体积为 15 mL 的玻璃离心管中, 加入 2 mL 含有 2% H₂SO₄ 的无水甲醇-甲苯(9:1, 体积比)混合液, 同时加入 25 μL 1% 的十七烷酸(C17:0)作为内标, 充氩气后, 将离心管置于磁力搅拌水浴锅中, 80 °C 恒温搅拌 1.5 h, 然后分别加入 1 mL 纯水和正己烷, 振荡后 3 000 r/min 离心 5 min, 将上层有机相转移至小玻璃瓶用氮气吹干, 再加入 100 μL 正己烷密封, 保存于-20 °C 待测。利用气相色谱质谱分析柱为对样品进行测定分析, 通过标准品脂肪酸的峰面积计算得到脂肪酸组成及其含量。进样温度 250 °C, 起始柱温 50 °C, 持续 5 min; 然后以 10 °C/min 的速度升温至 140 °C, 持续 5 min;

再以 4 °C/min 的速度升温至 210 °C, 持续 20 min; 最后以 5 °C/min 的速度升温至 240 °C, 持续 2 min。样品进样量为 1 μL。

1.4.7 单位体积总脂、中性脂和总脂肪酸产率: 总脂单位体积产率= $\rho \times \omega_1 / T$; 中性脂单位体积产率= $\rho \times \omega_1 \times \omega_2 / T$ 。式中: ρ 为生物量, g/L; ω_1 为总脂含量, %; ω_2 为中性脂含量(%TL); T 为培养时间, d。

1.5 数据处理

分别用采用 Excel 2010 和 Origin 8.5 对数据进行分析处理并作图, 并用 SPSS 17.0 软件对数据进行显著性差异分析, 显著性水平设定为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 藻细胞的形态变化和油体的形成过程

利用光学显微镜观察大真眼点藻(*E. magnus*)和波氏真眼点藻(*E. polyphem*)细胞在不同时相的细胞形态和油体形成过程, 如图 1 所示。从图 1 可以看

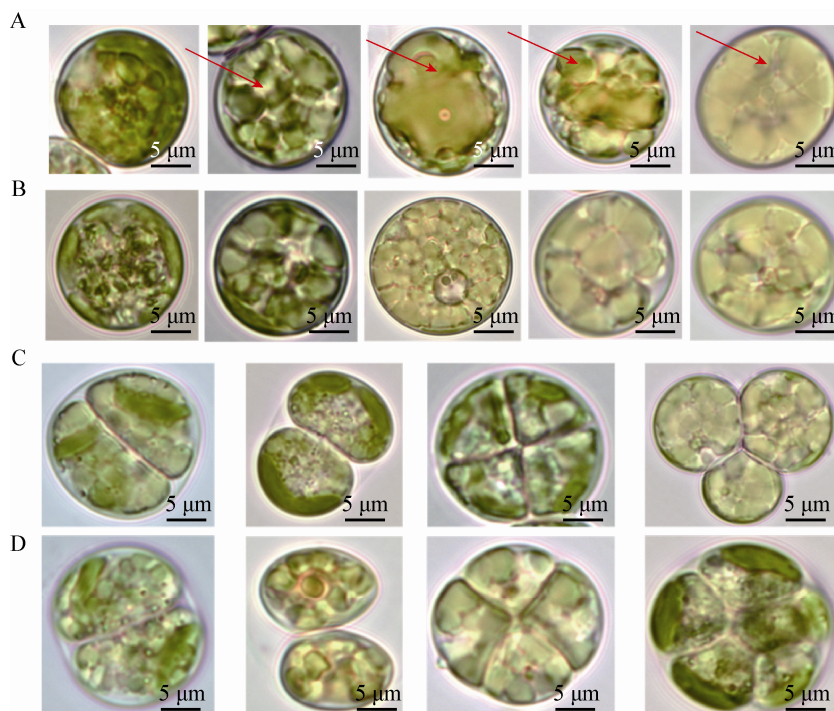


图 1 大真眼点藻和波氏真眼点藻细胞形态和油体形成随时相的变化

Figure 1 The variation of cell morphology and lipid bodies formation of *E. magnus* and *E. polyphem* during the different cultivation periods

注: A: 大真眼点藻(*E. magnus*)细胞形态和细胞内的油体形成; B: 波氏真眼点藻(*E. polyphem*)细胞形态和细胞内油体形成; C: 大真眼点藻(*E. magnus*)细胞繁殖方式; D: 波氏真眼点藻(*E. polyphem*)细胞繁殖方式(二分裂和四分裂为主)。箭头所示为油体。

Note: A: *E. magnus*; B: *E. polyphem*; C: Reproduction way of *E. magnus*; D: Reproduction way of *E. polyphem* (binary and quadripartion division). Arrow shows the lipid bodies.

出,大真眼点藻和波氏真眼点藻形态相似,其营养细胞为黄绿色球形,细胞中具有1个周生的裂叶状叶绿体,其中在一些营养细胞中会有一个明显的蛋白核,细胞质中有液泡,内含能够振动的颗粒物,生殖方式通过形成两个D形或四角形的似亲孢子。大真眼点藻与波氏真眼点藻的形态区别是大真眼点藻在液体培养条件下细胞大小变化范围大,有时会出现大细胞(40 μm 左右),而波氏真眼点藻大多直径为11 μm 左右。图1A和B分别为3.6 mmol/L初始硝酸钠浓度组大真眼点藻和波氏真眼点藻细胞内油体形成随时相的变化。培养初期,藻细胞内裂叶状叶绿体和振动颗粒物清晰可见;随着培养时间的延长,氮源不断被消耗,叶绿体逐渐解体,细胞内出现数目不等、大小不一的油体,至培养末期,油体相互融合成更大的油体,占据细胞的大部分空间,胞内物的颜色也由黄绿色转变为橙黄色。

2.2 高氮和低氮浓度条件下两种产油微藻生物质浓度的时相变化

大真眼点藻(*E. magnus*)和波氏真眼点藻(*E. polyphem*)在高氮和低氮浓度条件下培养时的生长状况如图2所示。

由图2可发现,培养初期,藻细胞生长出现了短暂的延滞期,随后进入指数生长期,最后缓慢进入平台期。两种微藻初始接种时的生物质浓度分别

为0.46 g/L和0.39 g/L,单因素方差分析表明,细胞培养早期,即培养3-4 d内,培养基内营养物质充足,各浓度组间的生物质浓度没有明显差异($P>0.05$)。随着培养时间的推移生物质浓度随着培养基中 NaNO_3 初始浓度的不同而有所差异。在整个培养周期中,随着培养时间的延长,各实验组的生物浓度均呈不断上升趋势。培养至18 d时,高氮浓度条件下两种微藻的生物质浓度分别为9.75 g/L和9.62 g/L;而低氮浓度条件下两种微藻生物质浓度分别为9.00 g/L和8.50 g/L。单因素方差分析表明,初始氮浓度对两种微藻的生长均有显著影响($P<0.05$)。

2.3 高氮和低氮浓度条件下大真眼点藻和波氏真眼点藻细胞内总脂含量的变化规律

当每隔3 d收取一定藻液经离心收获的藻细胞冷冻干燥为藻粉后,再采用改进的总脂测定方法^[20]测定大真眼点藻和波氏真眼点藻细胞内总脂含量的变化,结果如图3所示。总脂的分析结果表明,随着培养时间的延长,各实验组的总脂含量均呈逐渐上升的趋势;而在同一培养时间内,低氮浓度组的总脂含量均高于高氮浓度组。在培养初期大真眼点藻和波氏真眼点藻总脂含量分别为细胞干重的27.35%和28.48%,当培养至第18天时,低氮浓度组的总脂含量出现一定幅度提升,其中大真眼点藻

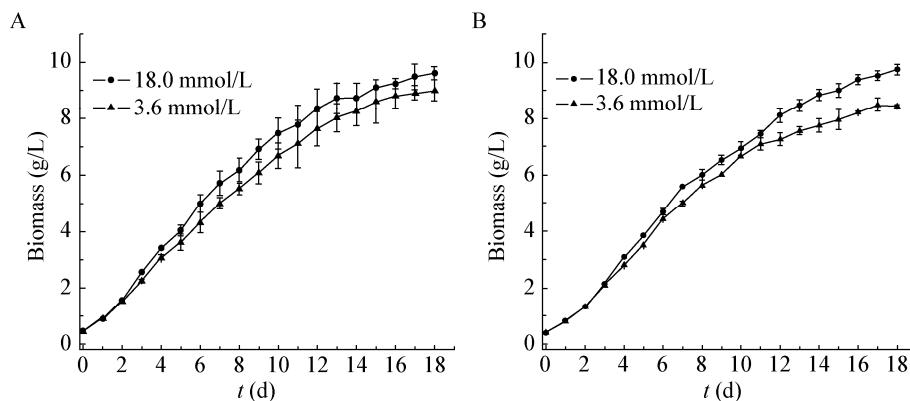


图2 高氮和低氮浓度条件下大真眼点藻和波氏真眼点藻的生长状况

Figure 2 The growth of *E. magnus* and *E. polyphem* under high and low concentrations of nitrogen conditions

注: A: 波氏真眼点藻; B: 大真眼点藻。

Note: A: *E. polyphem*; B: *E. magnus*.

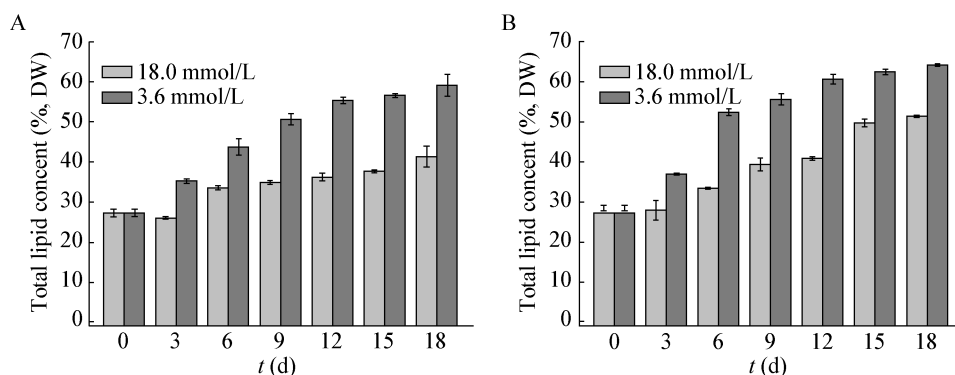


图 3 高氮和低氮浓度条件下大真眼点藻和波氏真眼点藻细胞内总脂含量的变化

Figure 3 The time-course changes in total lipid contents of *E. magnus* and *E. polyphem* under high and low concentrations of nitrogen conditions

注: A: 大真眼点藻; B: 波氏真眼点藻.

Note: A: *E. polyphem*; B: *E. magnus*.

的最高总脂含量为 59.10%，波氏真眼点藻的最高总脂含量为 64.20%；高氮浓度组的总脂含量提升幅度较小，大真眼点藻和波氏真眼点藻的最高总脂含量分别为 41.35%和 51.40%。单因素方差分析表明，初始氮浓度对两种微藻的总脂积累均有显著影响($P < 0.05$)。

2.4 高氮和低氮浓度条件下大真眼点藻和波氏真眼点藻总脂组分及其含量的时相变化

高氮和低氮浓度条件下生长的大真眼点藻和波氏真眼点藻其总脂经硅胶柱层析分级分离后，各脂组分占总脂和细胞生物质干重的百分含量分别如图 4 和 5 所示。

由图 4 可知，这两种微藻的总脂组分主要为中性脂、糖脂、磷脂，其中性脂比例最大，糖脂次之，磷脂最少。在低氮浓度条件下大真眼点藻和波氏真眼点藻的中性脂在第 3 天均出现了大幅度的提升，大真眼点藻的中性脂含量占总脂比例由 40.25%上升至 70.74%，波氏真眼点藻的中性脂含量占总脂的比例由 40.25%上升至 63.40%；而随着培养时间的延长，大真眼点藻和波氏真眼点藻在低氮浓度条件下中性脂呈现小幅度的递增，最终培养至第 18 天时，两者的中性脂占总脂的含量分别上升为 85.18%和 90.20%；在高氮浓度条件下，大真眼点藻和波氏真眼点藻的中性脂随着培养时间的延长两者之间

的差距不大，同样在第 18 天时，两者的中性脂占总脂的含量分别提升为 81.69%和 82.32%。

大真眼点藻和波氏真眼点藻总脂组分占细胞干重的含量随着培养时间的延长呈现不断上升的趋势，而糖脂和磷脂占干重的比例逐渐降低。各实验组在第 0 天时中性脂占干重的含量都是 11.29%；在低氮浓度条件下培养至第 3 天时大真眼点藻和波氏真眼点藻中性脂占干重的含量分别是 26.25%和 23.66%；培养至 18 d 时，中性脂占干重的含量分别为 51.92%和 56.86%；高氮浓度条件下培养至第 3 天时，大真眼点藻和波氏真眼点藻的中性脂占干重的含量分别为 12.22%和 11.67%；而到了第 18 天时，两者的中性脂占干重的含量分别上升至 42.13%和 35.90%。

2.5 高氮和低氮浓度条件下大真眼点藻和波氏真眼点藻脂肪酸组成及含量的时相变化

对高氮和低氮条件下培养时大真眼点藻和波氏真眼点藻细胞内脂肪酸组成和相对含量(占总脂肪酸)的时相变化进行了比较，分析结果如表 1 所示。大真眼点藻和波氏真眼点藻的主要脂肪酸组成为棕榈酸(C16:0)、棕榈油酸(C16:1)、油酸(C18:1)和二十碳五烯酸(C20:5, EPA)。这 4 种脂肪酸的含量在大真眼点藻和波氏真眼点藻中占细胞内总脂肪酸含量分别可达到 85.83%和 85.48%左右，其中 C16:1 的含量最高，能占到细胞内总脂肪酸的 39.58%–57.82%，而且其

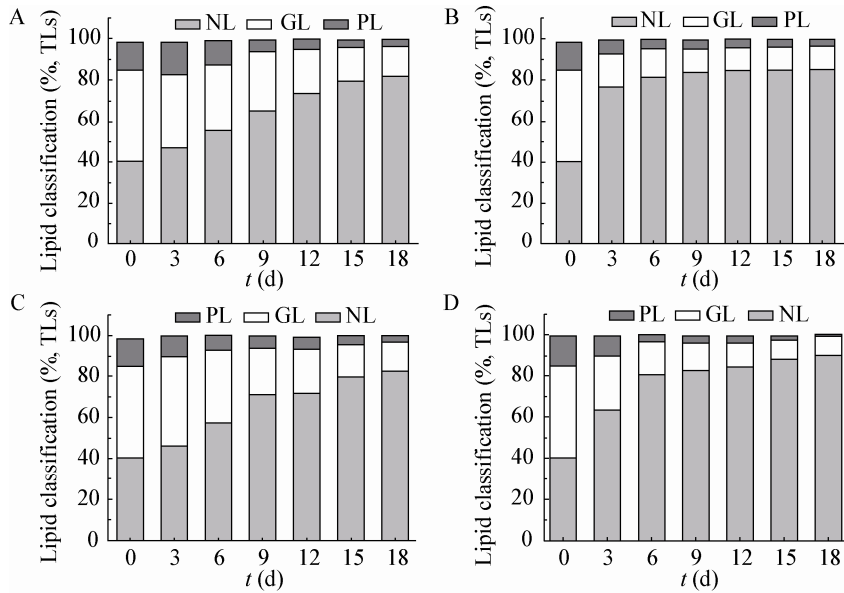


图4 高氮和低氮浓度条件下大真眼点藻和波氏真眼点藻脂组分及其含量(占总脂)的变化

Figure 4 The time-course changes in lipid fraction contents on the basis of total lipids of *E. magnus* and *E. polyphem* under high and low concentrations of nitrogen conditions

注: A: 高氮条件下的大真眼点藻; B: 低氮条件下的大真眼点藻; C: 高氮条件下的波氏真眼点藻; D: 低氮条件下的波氏真眼点藻. NL: 中性脂; GL: 糖脂; PL: 磷脂.

Note: A: *E. magnus* under high concentrations of nitrogen conditions; B: *E. magnus* under low concentrations of nitrogen conditions; C: *E. polyphem* under high concentrations of nitrogen conditions; D: *E. polyphem* under high concentrations of nitrogen conditions. NL: Neutral lipid; GL: Glycolipid; PL: Phospholipid.

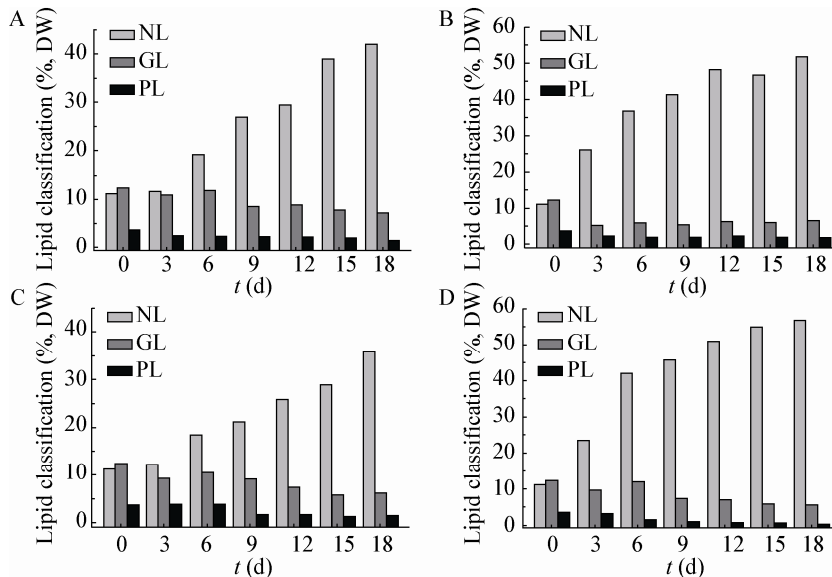


图5 高氮和低氮浓度条件下大真眼点藻和波氏真眼点藻脂组分及其含量(占干重)的变化

Figure 5 The time-course changes in lipid fraction contents on the basis of dry biomass of *E. magnus* and *E. polyphem* under high and low concentrations of nitrogen conditions

注: A: 高氮条件下的大真眼点藻; B: 低氮条件下的大真眼点藻; C: 高氮条件下的波氏真眼点藻; D: 低氮条件下的波氏真眼点藻. NL: 中性脂; GL: 糖脂; PL: 磷脂.

Note: A: *E. magnus* under high concentrations of nitrogen conditions; B: *E. magnus* under low concentrations of nitrogen conditions; C: *E. polyphem* under high concentrations of nitrogen conditions; D: *E. polyphem* under high concentrations of nitrogen conditions. NL: Neutral lipid; GL: Glycolipid; PL: Phospholipid.

表 1 高氮和低氮培养条件下大真眼点藻和波氏真眼点藻脂肪酸组成和相对含量的时相变化

Table 1 The time-course changes in fatty acids composition and content on the basis of total fatty acids of *E. magnus* and *E. polyphem* under high and low concentrations of nitrogen conditions

Day	NaNO ₃ (mmol/L)	Microalgae	Individual fatty acid content							
			C14:0	C16:0	C16:1	C18:1	C18:2	C20:4	C20:5	Others
0	3.6	<i>E. magnus</i>	4.50	15.22	39.58	1.53	2.16	4.41	26.66	5.03
		<i>E. polyphem</i>	4.65	18.70	43.01	5.36	3.50	4.14	8.40	10.24
	18.0	<i>E. magnus</i>	4.50	15.22	39.58	1.53	2.16	4.41	26.66	5.03
		<i>E. polyphem</i>	4.65	18.70	43.01	5.36	3.50	4.14	8.40	10.24
3	3.6	<i>E. magnus</i>	5.17	15.29	53.89	12.38	0.98	1.34	7.22	3.74
		<i>E. polyphem</i>	4.52	20.67	48.82	8.68	2.12	2.08	8.23	4.87
	18.0	<i>E. magnus</i>	4.47	17.53	46.32	6.51	1.83	3.27	16.84	3.21
		<i>E. polyphem</i>	4.58	18.53	43.69	6.45	2.52	3.78	10.70	9.75
6	3.6	<i>E. magnus</i>	4.67	13.60	53.31	13.64	1.17	1.32	4.98	7.29
		<i>E. polyphem</i>	4.39	18.12	52.04	11.16	1.15	1.34	3.11	8.68
	18.0	<i>E. magnus</i>	3.72	15.61	46.40	6.99	1.40	2.91	13.87	9.11
		<i>E. polyphem</i>	4.62	18.41	51.22	7.00	2.02	3.21	7.67	5.85
9	3.6	<i>E. magnus</i>	4.97	13.87	56.58	15.02	1.21	1.14	4.03	3.20
		<i>E. polyphem</i>	3.69	19.88	53.02	11.08	1.44	1.32	3.13	6.44
	18.0	<i>E. magnus</i>	4.21	13.79	54.61	8.43	1.93	2.38	9.57	5.10
		<i>E. polyphem</i>	3.55	19.86	51.05	6.63	1.99	3.79	5.79	7.34
12	3.6	<i>E. magnus</i>	5.00	13.91	57.82	14.46	1.30	1.05	3.36	3.10
		<i>E. polyphem</i>	4.10	20.37	53.36	10.87	1.18	1.12	2.31	6.69
	18.0	<i>E. magnus</i>	3.91	13.27	53.37	9.76	1.84	2.09	7.37	8.39
		<i>E. polyphem</i>	3.98	18.89	50.71	6.71	2.22	3.26	5.74	8.50
15	3.6	<i>E. magnus</i>	4.81	13.42	56.95	15.31	1.52	1.15	3.59	3.24
		<i>E. polyphem</i>	3.86	19.59	54.86	10.74	1.50	1.28	2.75	5.42
	18.0	<i>E. magnus</i>	3.81	13.68	53.61	10.60	1.85	1.88	6.28	8.28
		<i>E. polyphem</i>	3.34	20.61	52.86	6.46	2.14	3.45	4.73	6.41
18	3.6	<i>E. magnus</i>	4.73	13.22	57.02	15.59	1.70	1.20	3.65	2.89
		<i>E. polyphem</i>	4.17	18.93	55.73	10.82	1.36	1.21	2.37	5.41
	18.0	<i>E. magnus</i>	3.83	12.60	55.41	11.23	1.92	1.88	6.38	6.74
		<i>E. polyphem</i>	3.73	20.97	53.46	6.94	2.35	3.13	5.08	4.33

含量随着培养时间的推移不断增高；在高氮浓度条件下大真眼点藻中棕榈油酸的最大含量为 55.41%，氮胁迫浓度培养条件下棕榈油酸的最大含量为 57.82%。波氏真眼点藻中脂肪酸主要由 4 种碳链长度的 7 种脂肪酸组成，其中多为不饱和脂肪酸。棕榈酸和棕榈油酸所占的比例较高，其次为油酸和二十碳五烯酸。各实验组测得的棕榈油酸占总脂肪酸含量介于 43.01%–55.73% 之间，且其含量的增长与氮浓度呈反比；在低氮培养条件下棕榈油酸的最高含量是 55.73%，而在高氮培养条件下棕榈油酸的最高含量为 53.46%。

同时分析了高氮和低氮培养条件下两种微藻

细胞内各脂肪酸组分占细胞干重的含量变化情况，结果如图 6 所示。大真眼点藻和波氏真眼点藻细胞内总脂肪酸占细胞干重的含量均随培养时间的推移而呈现逐渐递增的趋势，其增长趋势与氮浓度呈反比，这与细胞中总脂及中性脂含量的变化趋势一致，低氮培养条件下大真眼点藻和波氏真眼点藻总脂肪酸占细胞干重的含量均要比高氮培养条件下的高；在高氮和低氮培养条件下大真眼点藻的棕榈酸、棕榈油酸和油酸三者的绝对含量均随培养时间的推移不断升高，而二十碳五烯酸的绝对含量变化不明显(占细胞干重的含量为：1.05%–2.17%)。波氏真眼点藻在高氮条件下培养至第 3 天时，棕榈酸、

棕榈油酸和油酸三者的绝对含量分别是 3.57%、14.15%和 2.18%，培养到第 18 天时，三者的绝对含量分别上升至 4.38%、19.24%和 3.90%；当在低氮条件培养至第 3 天时，棕榈酸、棕榈油酸和油酸三者的绝对含量分别是 5.85%、23.87%和 6.34%，培养到第 18 天时，三者的绝对含量也分别上升至 6.21%、26.77%和 7.32%。

2.6 高氮和低氮条件下大真眼点藻和波氏真眼点藻的单位体积总脂、中性脂和总脂肪酸产率

评价一株微藻产油性能的优劣，不仅考虑油脂的含量，其生物质浓度也是重要指标之一。因此，在此引入总脂、中性脂和总脂肪酸产率(三者均与生

物质浓度相关联)对微藻的产油性能进行评价。图 7 所示为高氮和低氮浓度下培养至第 18 天时，大真眼点藻和波氏真眼点藻的单位体积总脂、中性脂和总脂肪酸产率。由图 7 可知，在低氮条件下大真眼点藻和波氏真眼点藻的单位体积总脂、中性脂和总脂肪酸产率均高于高氮浓度下培养时的产率；此时大真眼点藻的单位体积总脂、中性脂和总脂肪酸最高产率分别为 0.28、0.24、0.22 g/(L·d)；以及波氏真眼点藻的单位体积总脂、中性脂和总脂肪酸最高产率分别为 0.32、0.28、0.25 g/(L·d)。以上结果说明，大真眼点藻和波氏真眼点藻是 2 株极具潜力的产油微藻，且波氏真眼点藻产油性能高于大真眼点藻。

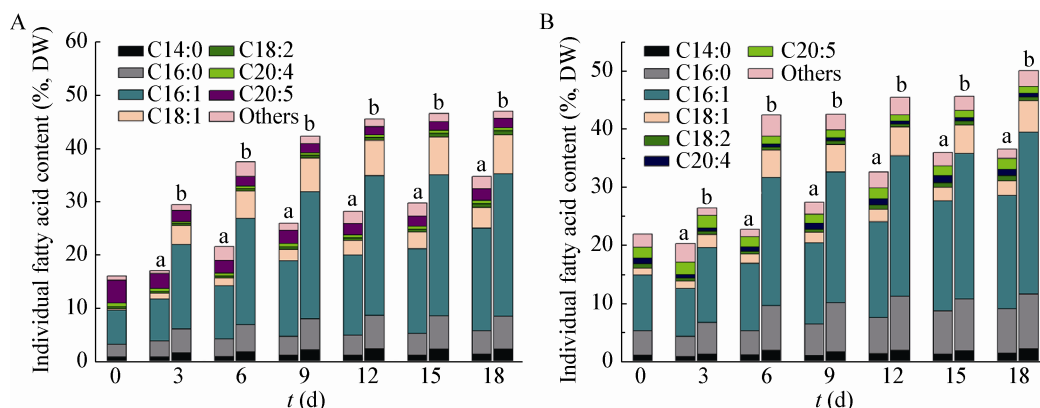


图 6 高氮和低氮培养条件下大真眼点藻和波氏真眼点藻脂肪酸组成绝对含量的变化

Figure 6 The fatty acid contents (% of dry biomass) of *E. magnus* and *E. polyphem* under high and low concentrations of nitrogen conditions

注：A：大真眼点藻；B：波氏真眼点藻。a：18.0 mmol/L NaNO₃；b：3.6 mmol/L NaNO₃。

Note: A: *E. magnus*; B: *E. polyphem*. a: 18.0 mmol/L NaNO₃; b: 3.6 mmol/L NaNO₃.

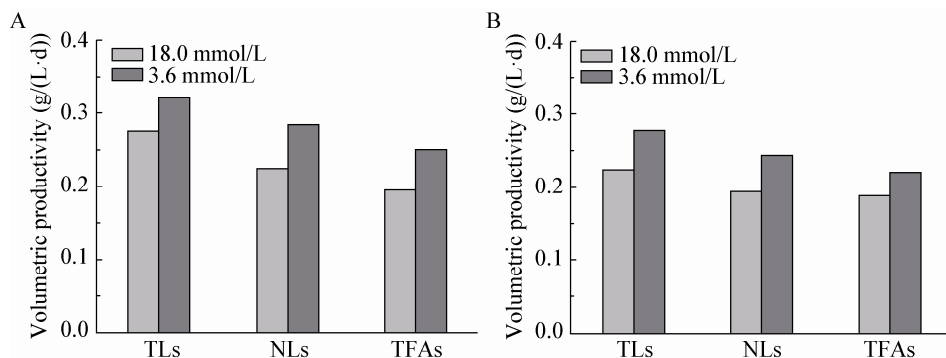


图 7 高氮和低氮培养条件下大真眼点藻、波氏真眼点藻的单位体积总脂、中性脂和总脂肪酸产率的变化

Figure 7 The volumetric productivity of total lipids, neutral lipids and total fatty acids of *E. magnus* and *E. polyphem* under high and low concentrations of nitrogen conditions

注：A：大真眼点藻；B：波氏真眼点藻。TLs：总脂；NLs：中性脂；TFAs：总脂肪酸。

Note: A: *E. magnus*; B: *E. polyphem*. TLs: Total lipids; NLs: Neutral lipids; TFAs: Total fatty acids.

3 讨论

氮是构成细胞中核酸、蛋白等大分子的重要元素,也是微藻光合作用过程中吸收光能叶绿素的主要元素^[23],氮源的种类及浓度不同都会对微藻的生理特性产生很大影响。很多研究表明,氮对微藻脂类含量及组成的影响较为显著。Gonverti 等^[24]的研究表明,当培养基中氮含量降低 75%时,眼点拟微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*)的油脂含量从 7.90% 提高到 15.31%,而普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)的油脂含量则从 5.90% 提高到 16.41%。对小球藻(*Chlorella sorokiniana*)在不同氮浓度培养条件下,发现高氮浓度(16 mmol/L)时,其最大产率为 0.07 g/(L·d)左右,低氮浓度(4 mmol/L)下,最大产率约为 0.09 g/(L·d)^[10]。同时 Roopnarain 等^[25]研究发现氮限制条件下球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)的生物量增长与油脂积累之间存在一定的相关性,当氮耗尽时,微藻细胞生长缓慢,此时细胞内的脂质开始大量积累。在很多不同种类的微藻研究中都发现缺氮条件下有利于细胞内油脂的积累,特别是三酰甘油(TAG)的积累^[26-27]。另外, Takagi 等^[28]研究发现低氮胁迫能够激活二酰甘油酰基转移酶(Diacylglycerol acyltransferase)的活性,该酶主要是把乙酰辅酶 A (Acyl-CoA)转移给三酰甘油。因此低氮胁迫可以促进微藻细胞中中性脂含量的上升。

本研究发现大真眼点藻(*E. magnus*)和波氏真眼点藻(*E. polyphem*)是两株极具潜力的高产油微藻,具有突出的产油特性,有潜力作为微藻产油的模式藻株。在两种 NaNO₃ 浓度条件下(18 mmol/L 和 3.6 mmol/L)对其进行通气培养,研究结果表明,在高氮浓度条件下大真眼点藻和波氏真眼点藻的生物量浓度最高,在低氮培养条件下其总脂含量和中性脂含量最大,这说明低氮胁迫能促进藻细胞内油脂的积累,但其不利于微藻细胞的生长。这种现象产生的原因是在氮限制条件下,大真眼点藻和波氏真眼点藻启动了抗逆生理反应,藻细胞内的蛋白合成受到抑制,无法给细胞的生长和代谢提供足够的酶系统。

脂肪酸的饱和程度是直接影响生物柴油性质的重要因素^[29],饱和脂肪酸所生产的生物柴油的氧化稳定性以及点火性能较高,但是低温流动性较差。但是相反的,如果由较多不饱和脂肪酸转化的生物柴油,它们的低温流动性能较好,但是它们比较容易氧化。因此,分析藻类油脂转化为生物柴油的性能主要通过分析藻类油脂中脂肪酸的组成。在本实验中,高氮和低氮浓度培养条件下大真眼点藻和波氏真眼点藻油脂的脂肪酸组成主要为肉豆蔻酸(C14:0)、棕榈酸(16:0)、棕榈油酸(16:1)、油酸(C18:1)和二十碳五烯酸(C20:5, EPA)。除此之外,大真眼点藻和波氏真眼点藻多不饱和脂肪酸,特别是棕榈油酸和油酸的含量相比其他的藻类也有一定的优势。Miao 等^[26]研究表明,碳原子在 C12-C18 之间的脂肪酸转酯生成的生物柴油的十六烷值比较高,所以比较适合作为生物柴油的原料。本实验中大真眼点藻和波氏真眼点藻碳原子在 C12-C18 之间的脂肪酸超过总脂肪酸含量 86%,说明大真眼点藻和波氏真眼点藻脂肪酸转酯生成的生物柴油具有较高的点火性(十六烷值高)。综合大真眼点藻和波氏真眼点藻生物量、总油脂含量以及脂肪酸组成,在低氮条件下培养时这 2 株藻有利于从中生产制备高品质的生物柴油。因此大真眼点藻和波氏真眼点藻作为制取生物柴油的原材料具有广泛的应用前景。

微藻的产油性能除了与藻粉中总脂含量相关外,还与生物质浓度的高低有着密切的关系,总生物质浓度低会降低油脂的产量。因此本实验通过总脂、中性脂和总脂肪酸的单位体积产率来评价这两株产油微藻的产油性能。实验结果显示,低氮条件培养时,单位体积总脂、中性脂、总脂肪酸的产率均高于高氮浓度组,这说明低氮限制有利于微藻细胞油脂的积累。

本文研究主要目的是探索大真眼点藻和波氏真眼点藻在低氮培养下的产油特性,以便为开发能源微藻提供基础数据。但生物质浓度的增长与油脂积累之间的矛盾是微藻生物油脂面临的重大技术

瓶颈,如果能够准确控制氮的需求量,使微藻的物质浓度提高,从而使微藻中总油脂的积累获得最大,可为生产生物柴油提供更为廉价的原料,这是今后需要努力解决的问题。

参 考 文 献

- [1] Shimada Y, Watanabe Y, Samukawa T, et al. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1999, 76(7): 789-793
- [2] Krawczyk T. Biodiesel-alternative fuel makes inroads but hurdles remain[J]. Inform, 1996, 7(8): 801-829
- [3] Cvengroš J, Cvengrošová Z. Quality control of rapeseed oil methyl esters by determination of acyl conversion[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1994, 71(12): 1349-1352
- [4] Rodolfi L, Chini Zittelli G, Bassi N, et al. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 102(1): 100-112
- [5] Chisti Y, Yan J. Energy from algae: current status and future trends: algal biofuels—a status report[J]. Applied Energy, 2011, 88(10): 3277-3279
- [6] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances[J]. The Plant Journal, 2008, 54(4): 621-639
- [7] Williams PJB, Laurens LML. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics[J]. Energy & Environmental Science, 2010, 3(5): 554-590
- [8] Chisti Y. Biodiesel from microalgae[J]. Biotechnology Advances, 2007, 25(3): 294-306
- [9] Klok AJ, Martens DE, Wijffels RH, et al. Simultaneous growth and neutral lipid accumulation in microalgae[J]. Bioresource Technology, 2013, 134: 233-243
- [10] Adams C, Godfrey V, Wahlen B, et al. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae[J]. Bioresource Technology, 2013, 131: 188-194
- [11] Breuer G, Lamers PP, Martens DE, et al. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains[J]. Bioresource Technology, 2012, 124: 217-226
- [12] Tevatia R, Demirel Y, Blum P. Kinetic modeling of photoautotrophic growth and neutral lipid accumulation in terms of ammonium concentration in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Bioresource Technology, 2012, 119: 419-424
- [13] Yeh KL, Chang JS. Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31: implications for biofuels[J]. Biotechnology Journal, 2011, 6(11): 1358-1366
- [14] Courchesne NMD, Parisien A, Wang B, et al. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 141(1): 31-41
- [15] Casadevall E, Dif D, Largeau C, et al. Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultrastructure, and phosphate nutrition[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1985, 27(3): 286-295
- [16] Schenk PM, Thomas-Hall SR, Stephens E, et al. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production[J]. Bioenergy Research, 2008, 1(1): 20-43
- [17] Meng X, Yang J, Xu X, et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms[J]. Renewable Energy, 2009, 34(1): 1-5
- [18] Yamaberi K, Takagi M, Yoshida T. Nitrogen depletion for intracellular triglyceride accumulation to enhance liquefaction yield of marine microalgal cells into a fuel oil[J]. Journal of Marine Biotechnology, 1998, 6(1): 44-48
- [19] Gao BY, Zhang CW, Wan LL, et al. Systematics, biological characteristics and potential application of eustigmatophyceae[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(5): 945-956 (in Chinese) 高保燕, 张成武, 万凌琳, 等. 真眼点藻纲的系统分类, 生物学特性及应用研究[J]. 水生生物学报, 2014, 38(5): 945-956
- [20] Khozin-Goldberg I, Shrestha P, Cohen Z. Mobilization of arachidonyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Parietochloris incisa*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2005, 1738(1): 63-71
- [21] Alonzo F, Mayzaud P. Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red[J]. Marine Chemistry, 1999, 67(3): 289-301
- [22] Bigogno C, Khozin-Goldberg I, Boussiba S, et al. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid[J]. Phytochemistry, 2002, 60(5): 497-503
- [23] Liu W, Huang Z, Li P, et al. Formation of triacylglycerol in *Nitzschia closterium* f. *minutissima* under nitrogen limitation and possible physiological and biochemical mechanisms[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2012, 418: 24-29
- [24] 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[J]. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2009, 48(6): 1146-1151
- [25] Roopnarain A, Gray VM, Sym S. Influence of nitrogen stress on *Isochrysis galbana* strain U4, a candidate for biodiesel production[J]. Phycological Research, 2014, 62(4): 237-249
- [26] Miao X, Wu Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(6): 841-846
- [27] Merzlyak MN, Chivkunova OB, Gorelova OA, et al. Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments, and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta)[J]. Journal of Phycology, 2007, 43(4): 833-843
- [28] Takagi M, Watanabe K, Yamaberi K, et al. Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 54(1): 112-117
- [29] Knothe G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters[J]. Fuel Processing Technology, 2005, 86(10): 1059-1070