

两株硅藻筒柱藻和纤细角毛藻的油脂生产

彭小伟, 张 维, 刘天中

(中国科学院 生物燃料重点实验室, 中国科学院 青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266101)

摘要: 通过气泡柱光反应器评价了两株硅藻筒柱藻(*Cylindrotheca fusiformis*)和纤细角毛藻(*Chaetoceros gracilis*)的生物量、油脂及甘油三酯的积累。结果发现, 其生物量与油脂产率相当, 脂肪酸组成方面, 也均以 C16:0 和 C16:1 为主, 但是筒柱藻的油脂组成以甘油三酯为主, 纤细角毛藻的油脂以单酰甘油酯、磷脂和糖脂为主。通过培养条件的优化, 发现相比于降低初始氮元素与硅元素, 降低培养液盐度, 能够获得更高的生物量、油脂以及甘油三酯产率。通过筒柱藻批次培养最高获得了 0.36 g/(L·d)的甘油三酯产率, 且甘油三酯占收获干物质的 50%以上, 具有相当好的应用潜力。

关键词: 筒柱藻(*Cylindrotheca fusiformis*); 纤细角毛藻(*Chaetoceros gracilis*); 生物量; 总脂含量; 评价
中图分类号: Q175 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)02-0043-05

生物柴油与传统石化燃料相比, 因具有可持续、可再生、碳中性和环境友好的特点而受到世界各国重视^[1]。微藻是一种单细胞的光合微生物类群, 光合效率高、生长周期短、生物量大、油脂含量高, 并且可以高效固定二氧化碳从而缓解温室气体效应问题, 因此被认为是最具潜力的生物柴油原料之一^[2]。然而微藻产油过程目前还面临着原料与成本两大瓶颈, 即规模化困难与生产成本高等问题^[2]。因此, 为了进一步提高生产效率, 筛选速生高产高含油和强抗逆性的优质藻种, 被认为是突破上述瓶颈的关键^[3-5]。

在微藻的众多种类中, 硅藻属中有着许多高含油的品种, 许多硅藻经驯化培养后具备制取生物柴油的潜力。筒柱藻(*Cylindrotheca fusiformis*)和纤细角毛藻(*Chaetoceros gracilis*)是一种重要的饵料藻类, 易培养, 并且富含多不饱和脂肪酸(PUFA), 在医药保健领域也有重要应用。但是关于它们制备生物柴油的潜力如何、是否适合作为能源微藻却鲜见报道。本研究针对这两株硅藻, 通过气泡柱式光生物反应器进行培养, 考察其生长与油脂含量及其影响因素, 从而评价其培养性状和油脂生产能力, 探讨其作为能源微藻的可行性。

1 材料与方 法

1.1 藻种与培养

筒株藻 *Cylindrotheca fusiformis*(MACC/B169)和纤细角毛藻 *Chaetoceros gracilis*(MACC/B13)取自中国海洋大学微藻种质库, 由梁英老师惠赠。

细胞培养在气泡柱式光生物反应器(3 cm × 30 cm, 玻璃材质)中进行, 培养温度 22℃±1℃, 24 h 连续单侧光照, 光照强度为 100 μmol/(m²·s), 1% 的 CO₂ 与空气的混合气体持续通入气泡柱底部实现系统混合与补碳, 通气量为 0.2vvm。

培养基采用盐度为 30 的海水, 并添加不同浓度的 f/2 营养, 分别配置为 4F 培养基(8 倍 f/2 培养基)、4F-2N(硝酸钠减半的 4F)、4F-2Si(硅酸钠减半的 4F)、4F-Si/2(Si 元素减为 1/8 的 4F)、f/2 培养基, 进行对照培养。

不同盐度对筒柱藻影响试验, 采用灭菌蒸馏水将海水盐度稀释为原来盐度(30)的 3/4(3/4 S)、1/2(1/2 S)和 1/4(1/4 S), 来配置 4F 培养基培养筒柱藻。

1.2 干重的测定

混合纤维滤膜(50 mm, 0.45 μm)已蒸馏水清洗, 105℃ 烘干至恒重后称量(w_1)。将一定体积(v)的藻液通过真空抽滤至膜上后, 置于 105℃ 烘干至恒重, 干燥器内冷却后称重(w_2)。微藻干重为 $m=(w_2-w_1)/v$ 。

1.3 油脂的提取与测定

离心收集接种时和收获时的藻细胞, 蒸馏水清

收稿日期: 2012-04-27; 修回日期: 2012-11-19

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAD14B01); 中国科学院重要方向性项目(KGCX-EW-309)

作者简介: 彭小伟(1980-), 男, 研究实习员, 主要从事产油微藻的研究, E-mail: pengxw@qibebt.ac.cn; 张维, 通信作者, 电话: 86-532-80662737, E-mail: zhangwei@qibebt.ac.cn

洗 3 次, 离心收集藻泥, 冷冻干燥后采用氯仿-甲醇法^[6]抽提油脂, 并称量获得细胞总脂含量, 具体方法参见文献[7]: 干藻粉加入 7.5 mL 甲醇、氯仿的混合液(甲醇 氯仿 =2 1), 振荡提取 12 h 以上后离心取上清, 加入 1% NaCl 和氯仿(1 1), 混匀后离心留下层; 残渣重复抽提 1 次, 将 2 次所得的下层合并于氮吹仪下吹干, 再于真空干燥箱中至恒重并称量, 即为抽提细胞总脂重量。

油脂含量=细胞总脂含量/抽提干藻粉重量。

油脂组成分析采用棒状薄层层析-氢火焰检测器(TLC-FID, MK-6, Iatron Laboratories, Inc. Japan), 操作见文献[8]。两相展开剂体系分别为: 150 60 2 (v v v)的苯 氯仿 无水乙酸; 1 1(v v)的苯 己烷。氢火焰检测器中氢气流量为 160 mL/min, 空气流量为 0.2 L/min。标准物甘油三酯(TAG)、甘油二酯(DAG)、甘油单酯(MAG)、固醇酯(Sterol ester, SE)与固醇(Free sterol, FS)分别购自于 Sigma 公司, 溶于庚烷中待用。

1.4 脂肪酸组成的测定

脂肪酸的组成采用气相色谱分析测定(Agilent GC 7890A, 安捷伦科技有限公司), 色谱条件和计算方法等参见文献[7]: 取 2~8 mg 总脂样品, 加入 2.5 mL 含 2% 硫酸的甲醇溶液和 50 μg 十九烷酸甲酯, 于 85 ℃ 水浴中孵育 2.5 h 后冷却至室温, 加入 1 mL 饱和氯化钠溶液 (0.18 g/mL) 以及 1 mL 正庚烷萃取, 离心取上层正庚烷相进行气相色谱分析。

色谱条件为: 毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)。程序升温: 120 ℃ 恒温 1 min 后以 6 ℃/min 的升温速度至 240 ℃, 保持 5 min; 汽化室温度为 270 ℃, 检测室温度为 280 ℃。以高纯 N₂ 为载气, 流速为 2 mL/min; 检测器温度为 280 ℃, 氢气为 35 mL/min, 空气流速为 350 mL/min。以十九烷酸甲酯为内标物, 作为校准各组分的质量校正因子, 依照下列公式计算脂肪酸甲酯的含量 *W*。

$$W = \frac{m_s \times f_i \times A_i}{m \times A_s} \times 100\%$$

式中, *m_s* 为内标物的质量, *f_i* 为 *i* 组分的质量校正因子, *A_i* 为 *i* 组分的峰面积, *m* 为总的试样质量, *A_s* 为内标物的峰面积。

2 结果与分析

2.1 生物量的积累

如图 1 所示, 对比两株硅藻在 4F 培养基中培养

前后的生物量, 在初始接种浓度均为 0.5g/L 左右的情况下, 经 9 d 的培养, 筒柱藻和纤角毛藻的生物量分别达到 4.1g/L 和 4.6g/L, 平均日生物量产率分别为 0.456g/(L·d)和 0.511g/ (L·d), 纤角毛藻略好于筒柱藻。对比李涛等^[11]采用气泡柱对 20 株淡水及海洋微藻的评价结果, 虽然其通过长时间的培养获得了较高的生物量, 但是单从日生物量产率来看, 除 *Nannochloropsis oculata* 具有 0.47g/(L·d)外, 其他品种均低于本研究结果。筒柱藻和纤角毛藻生物量产率还可以通过优化培养条件得到进一步的提高, 梁英等^[12]发现筒柱藻在 8F 和 16F 培养基中, 其日均分裂频率比在 4F 培养基中培养时候要高; 孙利芹等^[13]认为的纤角毛藻最适生长条件为温度 23 ℃, 光照强度 8 mW/cm², 通气速率 0.6 vvm。因此, 筒柱藻和纤角毛藻在生物量生产上完全具有可利用的前景。

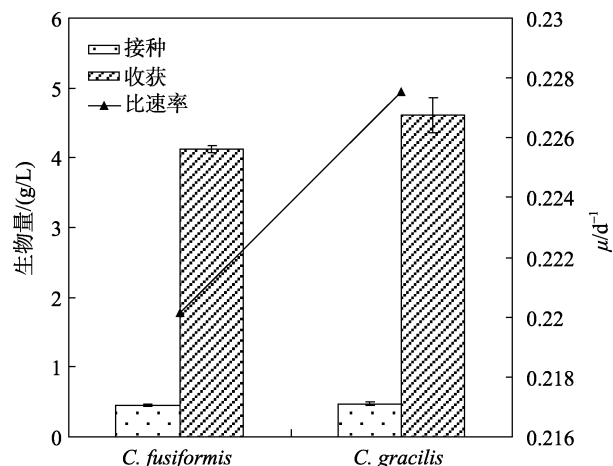


图 1 两株硅藻培养生长速率和生物量变化

Fig. 1 The comparison of dry weight and growth rate of two diatoms species

2.2 油脂的积累

脂类是生物产油生产的主要油脂原料, 因此评价一个藻种是否适合, 收获物中的油脂含量是一个关键因素。如表 1 所示, 经过 9 d 培养后的筒柱藻和纤角毛藻收获物中的总脂含量分别为 59.87%和 44.41%。目前人们所熟知的部分微藻品种的含油量差异较大, 其中含油比较丰富的包括 *C. protothecoides*(15%~58%); *Nannochloropsis* sp.(21%~36%); *Neochloris oleoabundans*(29%~65%); *Phaeodactylum tricorutum*(18%~57%)^[10,15]。从总脂的生产潜力看, 这两株藻在微藻类群中均已达到较高的水平。筒柱

藻和纤细角毛藻的日总脂产率为 0.273 g/(L·d)和 0.227 g/(L·d)。相较而言,李涛等^[11]在 20 个藻种的气泡柱培养中仅在 *Scenedesmu* sp. 中获得了最高的 0.219 g/(L·d)的总脂产率。

Krohn 等^[14]认为只有甘油三酯和游离脂肪酸能生产出合乎 ASTM 标准的生物柴油,因此收获物中中性成分尤其是甘油三酯的比重同样重要。如表 1 所示,两株硅藻在油脂组成上出现了明显的差异,在筒柱藻的细胞总脂中,甘油三酯占主体,为 60.25%;而在纤细角毛藻中,极性脂类包括磷脂与糖脂占主体,甘油三酯仅占 23.76%。因此,从这方面来说,筒柱藻比纤细角毛藻更适宜做生物柴油的原材料。

表 1 收获物中的油脂含量及组成
Tab. 1 The lipid content and composition in harvested biomass

类别	含量(%)	
	筒柱藻	纤细角毛藻
总脂	59.87±1.88	44.41±1.19
甾醇酯类	0.48±0.01	0.59±0.13
甘油三酯类	60.25±0.47	23.76±0.99
甘油二酯类	2.48±0.20	6.79±0.73
单脂酰甘油及极性脂类	36.79±0.28	68.86±1.84

2.3 藻株脂肪酸组成

如表 2 所示,根据气相色谱分析经过甲酯化后总脂样品中的脂肪酸组成,筒柱藻和纤细角毛藻的脂肪酸主要为碳 16 链长,分别占 70.96%和 63.91%。其中均以 C16:0 和 C16:1 为主。它们间的差异主要体现在 C14:0 脂肪酸含量,其比例分别为 7.25%和

18.17%。相比而言,纤细角毛藻积累更多的 C14 短链脂肪酸。C16 和 C14 与柴油分子 15 个左右的碳链极其相似^[16],因此从脂肪酸组成看两株硅藻适合作为生物柴油的原料。另外,实验中筒柱藻和纤细角毛藻脂肪酸组成中都含有较低含量的多不饱和脂肪酸 (EPA<5%),EPA 的存在可能降低生物柴油产品的稳定性^[2],但是 EPA 的营养价值,使它们同时具有生产高附加值产品的能力。

表 2 两株硅藻脂肪酸组成(%)
Tab. 2 Fatty acid composition of two diatoms(%)

脂肪酸	筒柱藻	纤细角毛藻
C14:0	7.25	18.17
C16:0	41.22	26.49
C16:1	27.93	31.75
C16:2	0	3.33
C16:3	1.11	2.34
C18:0	1.13	2.16
C18:1	6.31	5.85
C18:2	3.48	2.36
C18:3	1.33	1.59
Others	10.24	5.96

2.4 筒柱藻在不同条件下的油脂积累

由于高的油脂含量,相比于纤细角毛藻,筒柱藻有着更大的生物柴油应用价值。为进一步评价筒柱藻的产油性能,不同培养条件被用于其培养。如表 3,在 N、Si 元素限制下,筒柱藻的生长受到一定的影响,但是其油脂和甘油三酯含量相对提高,在营养添加更低的 f/2 中则因为生物量明显降低,因而导致总脂和甘油三酯产率过低,而在基于 4F 培养基一

表 3 筒柱藻在不同培养条件下油脂含量和产率
Tab. 3 Lipid content and productivities of *Cylindrotheca fusiformis* under different culture conditions

培养条件	生物量产率 (g/ (L·d))	总脂含量 (%)	总脂产率 (g/ (L·d))	总脂中甘三酯含量 (%)	甘油三酯产率 (g/ (L·d))
4F	0.54	58.14±1.70	0.31	60.44±2.44	0.19
4F-2N	0.45	67.12±0.16	0.29	67.16±1.16	0.20
4F-2Si	0.49	59.12±0.34	0.29	67.16±0.25	0.18
4F-Si/2	0.44	65.42±0.43	0.29	67.16±0.97	0.19
f/2	0.13	71.22±0.50	0.09	67.16±2.40	0.07
S	0.54	50.06±0.44	0.30	60.47±3.94	0.18
3/4S	0.62	67.82±1.11	0.42	72.35±2.52	0.30
1/2S	0.66	69.19±1.76	0.46	70.86±0.29	0.32
1/4S	0.70	72.76±3.29	0.51	71.80±0.26	0.36

一定程度上减少氮和硅的添加量并没有对它们的产量有明显影响。相比较而言,将筒柱藻在盐度稀释后的4f培养基中进行培养,结果发现,盐度越低,油脂与甘油三酯产率依次增高。当培养基盐度降为原海水盐度的1/4时,生物量和油脂含量分别由海水盐度(S)下的 $(3.37\pm 0.03)\text{g/L}$ 、 $(56.07\pm 0.04)\%$ 提高到 $(6.76\pm 0.01)\text{g/L}$ 、 $(72.76\pm 0.02)\%$,而且在低盐度下,筒柱藻仍然有被提高的生物量积累。因此相比于氮与硅的添加量调节而言,通过稀释海水用于筒柱藻产油,更可能产生有效的效果。

3 结论

筒柱藻和纤细角毛藻都具有较高的油脂产率,但是从甘油三酯产率看,筒柱藻培养更适合用于生物柴油生产,而且调整用于培养的海水盐度可以更大程度提高生物量、总脂与甘油三酯产率,本研究中最高获得了 $0.36\text{ g/(L}\cdot\text{d)}$ 的甘油三酯产率,甘油酯占干物质的50%以上,具有相当好的应用潜力。

参考文献:

- [1] 滕虎,牟英,杨天奎,等. 生物柴油研究进展[J]. 生物工程学报, 2010, 26(7): 892-902.
- [2] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances[J]. *Plant J*, 2008, 54(4): 621-639.
- [3] Mutanda T, Ramesh D, Karthikeyan S, et al. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production[J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(1): 57-70 .
- [4] Griffiths M J, Harrison S T L . Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production[J]. *J Appl Phycol*, 2009, 21: 493-507 .
- [5] Chist Y. Biodiesel from microalgae[J]. *Biotechnol Adv*, 2007, 25: 294-306.
- [6] Ben - Amotza A, Tornabene T G, Thomas W H. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids [J]. *J Phycol*, 1985, 21: 72-81.
- [7] 邱昱晶,彭小伟,张维,等. 三种不同来源的三角褐指藻的生长与油脂积累差异[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(24):14761-14763.
- [8] 陈林,张维,刘天中,等. 两步法催化高酸价微藻油脂制备生物柴油[J]. *生物质化学工程*, 2011, 7: 1-7 .
- [9] Huang G H, Chen F, Wei D, et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology[J]. *Appl Energ*, 2010, 87(1): 38-46.
- [10] Mata T M, Martins A A, Caetano N S, Microalgae for biodiesel production and other applications: A review[J]. *Renew Sust Energ Rev*, 2010, 14: 217-232.
- [11] 李涛,李爱芬,桑敏,等. 富油能源藻的筛选及产油性能评价[J]. *中国生物质工程杂志*, 2011, 31(4): 98-105 .
- [12] 梁英,麦康森,孙世春,等. 不同培养基对筒柱藻 *Cylindrotheca fusiformis* 生长及脂肪酸组成的影响[J]. *海洋湖沼通报*, 2000, 1: 60-67 .
- [13] 孙利芹,郭尽力,张海. 影响纤细角毛藻生长的因素及其脂肪酸组成的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2004, 30(12): 31-34 .
- [14] Krohn B J, McNeff C V, Yan B, et al. Production of algae-based biodiesel using the continuous catalytic Mcgyan^(R) process[J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(1): 94-100.
- [15] Gong Y, Jiang M. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel[J]. *Biotechnol Lett*, 2011, 33: 1269-1284.
- [16] Reitan K I, Rainuzza J R, Die G, et al. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae [J]. *Aquaculture*, 1997, 21: 72-81 .
- [17] Chor Koon Tan, Michael Johns R. Screening of diatoms for heterotrophic eicosapentaenoic acid production[J]. *J Appl Phycology*, 1996, 8: 59-64.

The Lipid accumulation of two oleaginous diatom species

PENG Xiao-wei, ZHANG Wei, LIU Tian-zhong

(CAS Key laboratory of Biofuel, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China)

Received: Apr.,27,2012

Key words: *Cylindrotheca fusiformis*; *Chaetoceros gracilis*; Biomass; Lipid content; evaluation

Abstract: The biomass, total lipids and Triacylglycerol contents of *Cylindrotheca fusiformis* and *Chaetoceros gracilis* were measured in batch, with bubble column photobioreactor. The results showed that the biomass and total lipid productivity were similar. The fatty acids composition of lipid from them were mainly C16:0 and C16:1, The composition of extracted lipid from *C. fusiformis* was mainly TAG, while in *C. gracilis* was mainly monoacylglycerol, phospholipids and glycolipids. Decreased the salinity of medium, the biomass, lipid productivity, and TAG productivity were higher than which N or Si was limited. In these studies, TAG productivity can reach 0.36g/(L · d), more than half of dry biomass. *C.fusiformis* has good potential capacity to be the microalgae species for microalgae biofuel production.

(本文编辑: 康亦兼)