

不同质量浓度 NaNO_3 对 3 种微藻生长及总脂肪酸含量和组成的影响

杨凯¹, 王涌¹, 史全良^{1,①}, 江香梅²

(1. 苏州大学医学部基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123; 2. 江西省林业科学院植物生物技术重点实验室, 江西 南昌 330032)

摘要: 以 BG11 为基本培养液, 研究了不同质量浓度 NaNO_3 ($37.5 \sim 1\ 875.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 对微藻 P9 (*Klebsormidium* sp.)、TH6 (*Oedocladium* sp.) 和 CF5 (*Stigonema* sp.) 生长及总脂肪酸含量和组成的影响。结果显示, 调整 (减少或增加) 培养液中 NaNO_3 的质量浓度, 对 3 种微藻的生长量及总脂肪酸含量和脂肪酸组成均有一定的影响; NaNO_3 的质量浓度较低 (37.5 或 $75.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 3 种微藻的鲜质量随培养时间的延长呈先逐渐增加然后略有降低的趋势; 而在 NaNO_3 质量浓度为 $150.0 \sim 1\ 875.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下, 在一定的培养时间 ($18 \sim 33 \text{ d}$) 内, 3 种微藻的鲜质量均逐渐增加; 总体上看, 3 种微藻的生长量随 NaNO_3 质量浓度的提高呈现逐渐增加的趋势, 但仅在含 $1\ 875.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO_3 的培养液中 3 种微藻的生长量高于对照 ($1\ 500.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaNO}_3$)。在含 $375.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaNO}_3$ 的培养液中培养 33 d, 微藻 P9 的总脂肪酸含量最高 (25.39%), 是对照的 1.79 倍, 软脂酸、亚油酸、油酸和硬脂酸的相对含量分别是对照的 2.50、2.72、2.24 和 2.08 倍; 在含 $37.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaNO}_3$ 的培养液中培养 33 d, 微藻 TH6 的总脂肪酸含量最高 (20.69%), 是对照的 1.89 倍, 软脂酸、亚油酸和油酸的相对含量分别是对照的 3.37、1.79 和 1.92 倍; 不同处理组间微藻 CF5 的总脂肪酸含量及组成有一定差异, 但随着 NaNO_3 质量浓度的提高变化趋势不明显。研究结果表明, 适当提高培养液中的 NaNO_3 浓度对微藻的生长有一定的促进作用, 不同种类微藻适宜的 NaNO_3 浓度有一定的差异。综合考虑生长量和总脂肪酸含量及脂肪酸组成等因素, 确定适宜于微藻 P9、TH6 和 CF5 培养的 NaNO_3 质量浓度分别为 375.0 、 37.5 和 $150.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词: 微藻; NaNO_3 浓度; 生长; 总脂肪酸含量; 脂肪酸组成; 生物柴油

中图分类号: Q945.3; Q547 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2010)01-0043-07

Effect of different concentrations of NaNO_3 on growth, content and composition of total fatty acids of three microalgae YANG Kai¹, WANG Yong¹, SHI Quan-liang^{1,①}, JIANG Xiang-mei² (1. School of Medicine and Life Sciences, Medical College of Suzhou University, Suzhou 215123, China; 2. Jiangxi Provincial Bio-tech Key Laboratory for Plant, Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang 330032, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2010, 19(1): 43-49

Abstract: Effect of different concentrations of NaNO_3 ($37.5 \sim 1\ 875.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) on growth and content and composition of total fatty acids of three microalgae including P9 (*Klebsormidium* sp.), TH6 (*Oedocladium* sp.) and CF5 (*Stigonema* sp.) was studied using BG11 as basic liquid medium. The results show that NaNO_3 concentration adjustment (increase or decrease) in liquid medium has a certain influence on increment, total fatty acid content and fatty acid composition of three microalgae. In condition of lower concentration of NaNO_3 (37.5 or $75.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), the fresh weight of three microalgae appears the change trend of first gradually increasing and then slightly decreasing with culture time prolonging. But in condition of $150.0 \sim 1\ 875.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaNO}_3$, the fresh weight of three microalgae increases gradually during a certain culture time ($18 \sim 33 \text{ d}$). In general, three microalgae increments appear gradually increasing trend with NaNO_3 concentration rising, but three microalgae increments only

收稿日期: 2009-09-02

基金项目: 江西省植物生物技术重点实验室经费资助 (S8134801)

作者简介: 杨凯 (1983—), 男, 安徽明光人, 硕士研究生, 主要从事能源藻类的筛选与开发。

①通信作者 E-mail: shiquanliang@suda.edu.cn

in the liquid medium with $1\ 875.0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO_3 are higher than that of the control ($1\ 500.0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO_3). On culture for 33 d in the liquid medium with $375.0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO_3 , total fatty acid content of microalga P9 is the highest with a content of 25.39%, which is 1.79 times compared the control, and the relative contents of palmitic acid, linoleic acid, oleic acid and stearic acid are 2.50 times, 2.72 times, 2.24 times and 2.08 times compared the control, respectively. The total fatty acid content of microalga TH6 is the highest with a content of 20.69% under the condition of $37.5\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO_3 for 33 d, which is 1.89 times compared the control, and the relative contents of palmitic acid, linoleic acid and oleic acid are 3.37 times, 1.79 times and 1.92 times compared the control, respectively. However, the total fatty acid content and fatty acid composition of microalga CF5 have a certain difference among different treatment groups, but there is no obvious change trend with NaNO_3 concentration rising. It is suggested that growth of microalgae can have a certain promotion by properly increasing NaNO_3 concentration in liquid medium, but the suitable NaNO_3 concentration for different species of microalgae is various. By comprehensive consideration of some factors, such as increment, total fatty acid content and fatty acid composition, the appropriate liquid medium to microalga P9, TH6 and CF5 is BG11 liquid medium containing 375.0, 37.5 and $150.0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO_3 , respectively.

Key words: microalgae; NaNO_3 concentration; growth; total fatty acid content; fatty acid composition; biodiesel

生物柴油 (biodiesel) 是指以植物和动物油脂等可再生生物资源生产的可用于压燃式发动机的新型清洁替代燃油^[1], 其主要化学成分是软脂酸、硬脂酸、油酸、亚油酸等长链饱和或不饱和脂肪酸与甲醇或乙醇等醇类所形成的酯类物质。自然界中可用于提取及制备生物柴油的生物资源有很多种, 其中微藻因具有生长速度快、生物量较大和含油量高等特点而倍受瞩目, 将微藻作为制备生物柴油的原料来源具有广阔的应用前景。

不同种类微藻的脂肪酸成分与含量变化很大, 而且与环境条件(温度、光照、营养盐浓度和植物激素等^[2])密切相关, 其中培养基中的氮浓度对微藻脂肪酸组成的影响比较显著。不同种类微藻所含的多不饱和脂肪酸(PUFAs)与氮营养的关系有一定差异, 甚至相反。Yongmanitchai 等^[3]发现, 在高氮浓度下, 小球藻(*Chlorella* sp.)、栅藻(*Scenedesmus* sp.)和三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin)的PUFAs含量增加。Chen 等认为, 培养基中的氮源组成主要影响微藻细胞内饱和及不饱和脂肪酸的比例, 当培养基中C/N比升高时, *Chlorella sorokiniana* 细胞内PUFAs的含量升高^[4]。当处于缺氮条件时, 微藻细胞能够选择性地优先利用1种或多种含氮大分子, 使细胞内的含氮物质(如蛋白质等)的含量下降, 而使细胞内的碳水化合物(如多糖及脂肪酸等)的含量升高^[5-6]。一般来说, 微藻可以利用的氮源种类较多, 无机氮源有铵盐、硝酸盐和尿素等, 有机氮源有酵母膏、胰蛋白胍和氨基酸等^[7]。

鉴于不同微藻藻种对氮源有不同的适应性, 作者以微藻 P9 (*Klebsormidium* sp.)、TH6 (*Oedocladium* sp.) 和 CF5 (*Stigonema* sp.) 为研究对象, 探讨了在培养液中添加不同浓度硝态氮(NaNO_3)对其生长和总脂肪酸含量及脂肪酸组成的影响, 以便确定培养过程中不同微藻适宜的硝态氮浓度, 并筛选出可作为生物柴油原料的微藻藻种, 以期利用微藻制备生物柴油提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

实验以微藻 P9、TH6 和 CF5 为材料, 由苏州大学医学部史全良副教授鉴定。其中, 微藻 P9 为采自海南的第9号样本, 生长在潮湿的土壤上, 植物体为单列细胞组成的不分枝的丝状体, 无特殊的基细胞和顶端细胞, 易断裂成单个细胞, 细胞略呈桶形, 横壁略收缩, 长度为宽度的1~3倍, 初步判定为绿藻门(Chlorophyta)绿藻纲(Chlorophyceae)丝藻目(Ulotrichales)丝藻科(Ulotrichaceae)克里藻属(*Klebsormidium* Silva)种类; 微藻 TH6 为采自江苏苏州太湖的第6号样本, 生长于潮湿的土壤上, 植物体呈丝状, 有分枝, 以假根状枝着生于其他植物体上或漂浮于水面上, 不具刺毛, 营养细胞为柱状或近柱状, 初步判定为绿藻门绿藻纲鞘藻目(Oedogoniales)鞘藻科(Oedogoniaceae)枝鞘藻属(*Oedocladium* Stahl)种类; 微藻 CF5 为采自江苏苏州车坊镇的第5号样本,

生长在水中木桩上,植物体由丝状体构成,具有不规则的侧生分枝,呈各种各样弯曲,成熟藻丝由单列或2列细胞组成,初步判定为蓝藻门(Cyanophyta)蓝藻纲(Cyanophyceae)真枝藻目(Stigonematales)真枝藻科(Stigonemataceae)真枝藻属(*Stigonema* Ag.) 种类。

1.2 方法

1.2.1 微藻培养 采用BG11培养液配方配制微藻P9、TH6和CF5的基本培养液(pH 7.5),其中 NaNO_3 质量浓度设置8个水平,分别为37.5、75.0、150.0、300.0、375.0、750.0、1500.0及1875.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,其中含1500.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO_3 的BG11培养液为对照。接种后将各处理组微藻置于温度(25±1)℃、光照强度50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光照时间12 h·d⁻¹的白色日光灯下培养,每天定时摇瓶3次,每个浓度设置3个平行组。培养过程中每3天于超净工作台上称量1次,去除培养液后称量微藻及培养瓶的总质量,扣除培养瓶质量后即为微藻的生长量,每一样品重复测量3次,结果取平均值。

1.2.2 脂肪酸的提取及气相色谱分析 培养33 d后,取出藻体,于40℃条件下烘干48 h后,将干燥藻体研磨成粉末。取0.5 g藻体粉末,用索氏抽提法^[8]抽提脂肪酸,并按文献[9]的方法酯化后用于气相色谱分析。

参考文献[2]的色谱条件,采用美国Varian公司生产的CP-3800型气相色谱仪测定脂肪酸含量,进样量为1 μL 。

1.3 数据处理

总脂肪酸含量和各脂肪酸成分相对含量的计算公式同文献[2]。采用SPSS 13.0统计分析软件进行ANOVA分析。

2 结果和分析

2.1 不同质量浓度 NaNO_3 对3种微藻生长的影响

2.1.1 对微藻P9生长的影响 在BG11基本培养液中添加不同质量浓度 NaNO_3 ,不同培养时间微藻P9的鲜质量见表1。由表1可知,在33 d的培养期中,在培养液中添加37.5~1875.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO_3 对微藻P9的生长均有一定的影响。在BG11培养液中添加37.5或75.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO_3 ,随培养时间延长,微藻P9的鲜质量逐渐增加,并分别在培养的第24天或第21天达到峰值,然后再逐渐降低,但降低幅度不大且微藻P9的鲜质量均明显高于培养初期;培养液中 NaNO_3 添加量为150.0~1875.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,微藻P9的鲜质量则随培养时间的延长逐渐增加,至培养结束时明显高于培养初期。

表1 不同质量浓度 NaNO_3 对微藻P9 (*Klebsormidium* sp.) 生长的影响¹⁾

Table 1 Effect of different concentrations of NaNO_3 on growth of microalga P9 (*Klebsormidium* sp.)¹⁾

质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration	不同培养时间微藻P9的鲜质量/g Fresh weight of microalga P9 at different culture times											
	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d	24 d	27 d	30 d	33 d
37.5	0.25	0.71	0.85	1.53	1.62	1.65	1.69	1.78	1.81	1.79	1.77	1.77
75.0	0.25	0.65	0.83	1.30	1.72	1.89	1.97	1.98	1.89	1.85	1.81	1.79
150.0	0.25	0.62	0.77	1.35	1.94	2.04	2.05	2.13	2.15	2.18	2.32	2.48
300.0	0.25	0.58	0.87	1.27	1.85	2.13	2.21	2.36	2.43	2.49	2.53	2.61
375.0	0.25	0.65	0.86	1.63	1.97	2.31	2.43	2.53	2.54	2.59	2.65	2.78
750.0	0.25	0.75	0.90	1.54	1.99	2.38	2.45	2.56	2.66	2.83	2.94	3.01
1500.0(CK)	0.25	0.71	0.99	1.52	2.12	2.48	2.67	2.77	2.89	2.95	3.14	3.32
1875.0	0.25	0.59	0.76	1.45	2.01	2.32	2.74	2.78	2.99	3.18	3.38	3.57

¹⁾基本培养液为BG11液体培养基 The basic medium is BG11 liquid medium.

在不同培养阶段,在 NaNO_3 添加量不同的各培养液中微藻P9的生长量明显不同,尤其是在培养第18天后,均表现为随 NaNO_3 质量浓度的提高微藻P9的鲜质量逐渐增加。若以添加1500.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO_3 的培养液为对照,在培养18 d后,仅在 NaNO_3 添加量最高(1875.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的培养液中微藻P9的鲜质量

略高于对照,而 NaNO_3 添加量低于对照的其他处理组微藻P9的鲜质量在不同培养时间均低于对照。

2.1.2 对微藻TH6生长的影响 在BG11基本培养液中添加不同质量浓度 NaNO_3 ,不同培养时间微藻TH6的鲜质量见表2。由表2可看出,在33 d的培养期内,随 NaNO_3 质量浓度的提高,微藻TH6的鲜质量

均相应增加。在 NaNO_3 质量浓度较低 ($37.5 \sim 75.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的培养液中, 微藻 TH6 的鲜质量随培养时间的延长先逐渐增加, 至培养第 27 天时达到峰值, 然后略微降低, 但其鲜质量均明显高于培养初期; 培养液中 NaNO_3 添加量为 $150.0 \sim 1\ 875.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 微藻 TH6 的鲜质量均随培养时间的延长逐渐增加, 至培养结束时达到最高。若以添加 $1\ 500.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaNO}_3$ 的培养液为对照, 在添加了 $37.5 \sim 750.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaNO}_3$ 的培养液中微藻 TH6 的鲜质量在各个生长时间段均小于对照, 但均表现出随 NaNO_3 质量浓度的提高逐渐增加的趋势; 只有在含 $1\ 875.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaNO}_3$ 的培养液中微藻 TH6 的鲜质量在各个生长时间段均高于对照, 其中在培养第 33 天时, 微藻 TH6 的鲜质量最高, 比对照增加了 5.09% 。

2.1.3 对微藻 CF5 生长的影响 在 BG11 基本培养液中添加不同质量浓度 NaNO_3 , 不同培养时间微藻 CF5 的鲜质量见表 3。由表 3 可知, 在 33 d 的培养期内, 随 NaNO_3 质量浓度的提高, 微藻 TH6 的鲜质量均

相应增加。其中, 在添加了 $37.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaNO}_3$ 的培养液中, 随培养时间的延长, 微藻 CF5 的鲜质量先逐渐增加, 在培养至第 21 天时达到峰值, 随后逐渐降低, 但降低幅度不明显, 且其鲜质量明显高于培养初期; 而在 NaNO_3 添加量为 $75.0 \sim 1\ 875.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养液中, 微藻 CF5 的鲜质量总体上随培养时间的延长逐渐增加, 并在培养结束时达到最高。

以添加 $1\ 500.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaNO}_3$ 的 BG11 培养液为对照, 在添加 $37.5 \sim 750.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaNO}_3$ 的培养液中, 培养前期 ($0 \sim 9 \text{ d}$) 微藻 CF5 的鲜质量或低于对照或高于对照, 无明显的规律性; 而在培养的中后期 ($12 \sim 33 \text{ d}$), 在添加 $37.5 \sim 750.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaNO}_3$ 的培养液中微藻 CF5 的鲜质量均低于对照, 且总体上呈现随质量浓度提高逐渐增加的趋势, 即: NaNO_3 质量浓度越高, CF5 鲜质量越大。在添加 $1\ 875.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaNO}_3$ 的培养液中, 微藻 CF5 鲜质量在大多数培养时间段均高于对照, 至培养结束 (33 d) 时, 微藻 CF5 的鲜质量最大 (3.81 g), 比对照增加了 4.96% 。

表 2 不同质量浓度 NaNO_3 对微藻 TH6 (*Oedocladium sp.*) 生长的影响¹⁾

Table 2 Effect of different concentrations of NaNO_3 on growth of microalga TH6 (*Oedocladium sp.*)¹⁾

质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration	不同培养时间微藻 TH6 的鲜质量/g Fresh weight of microalga TH6 at different culture times											
	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d	24 d	27 d	30 d	33 d
37.5	0.25	0.39	0.54	0.78	0.87	1.32	1.46	1.58	1.63	1.65	1.63	1.61
75.0	0.25	0.42	0.69	0.80	0.93	1.36	1.56	1.61	1.71	1.77	1.77	1.73
150.0	0.25	0.45	0.75	0.81	1.07	1.50	1.69	1.74	1.84	1.87	1.95	1.98
300.0	0.25	0.53	0.77	0.81	1.22	1.57	1.83	1.89	1.99	2.19	2.36	2.55
375.0	0.25	0.58	0.88	0.96	1.36	1.63	1.91	2.08	2.21	2.45	2.67	2.89
750.0	0.25	0.66	0.94	1.15	1.42	1.74	1.97	2.13	2.43	2.57	2.86	3.12
1 500.0 (CK)	0.25	0.69	1.11	1.32	1.49	1.79	2.01	2.18	2.62	2.78	2.98	3.34
1 875.0	0.25	0.72	1.38	1.54	1.64	1.87	2.03	2.21	2.68	2.83	3.01	3.51

¹⁾ 基本培养液为 BG11 液体培养基 The basic medium is BG11 liquid medium.

表 3 不同质量浓度 NaNO_3 对微藻 CF5 (*Stigonema sp.*) 生长的影响¹⁾

Table 3 Effect of different concentrations of NaNO_3 on growth of microalga CF5 (*Stigonema sp.*)¹⁾

质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration	不同培养时间微藻 CF5 的鲜质量/g Fresh weight of microalga CF5 at different culture times											
	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d	24 d	27 d	30 d	33 d
37.5	0.25	0.63	0.85	1.23	1.48	1.65	1.69	1.73	1.71	1.68	1.66	1.64
75.0	0.25	0.65	0.81	1.30	1.78	1.89	1.94	2.01	2.00	2.09	2.13	2.19
150.0	0.25	0.57	0.77	1.25	1.78	1.98	2.05	2.13	2.15	2.21	2.29	2.37
300.0	0.25	0.58	0.87	1.21	1.89	2.01	2.13	2.24	2.31	2.46	2.58	2.84
375.0	0.25	0.65	0.63	1.63	1.97	2.23	2.32	2.37	2.48	2.62	2.83	2.97
750.0	0.25	0.75	0.70	1.54	1.99	2.29	2.45	2.49	2.55	2.69	2.94	3.11
1 500.0 (CK)	0.25	0.71	0.68	1.52	2.12	2.48	2.59	2.65	2.78	2.95	3.34	3.63
1 875.0	0.25	0.95	0.91	1.78	2.11	2.43	2.59	2.71	2.89	3.21	3.61	3.81

¹⁾ 基本培养液为 BG11 液体培养基 The basic medium is BG11 liquid medium.

综合上述实验结果可看出,采用 BG11 培养液并改变(增加或减少)原有配方中 NaNO₃的质量浓度,均对微藻的生长量有一定的影响。在 37.5 ~ 1 875.0 mg · L⁻¹质量浓度范围内,随 NaNO₃质量浓度的提高,微藻的生长量逐渐增加;在低氮条件下,微藻的生长受到一定的抑制,NaNO₃质量浓度为 37.5 mg · L⁻¹时,3 种微藻的鲜质量均最小,并且随培养时间的延长,微藻的鲜质量呈下降趋势;而高氮(1 875.0 mg · L⁻¹ NaNO₃)条件对微藻的生长则有一定的促进作用,培养结束时,3 种微藻的鲜质量均最大。另外,在同样的条件下,3 种微藻的生长量有一定的差异,随培养时间的延长生长量的变化趋势也有一定的差异,与微藻种类的不同有关。

2.2 不同质量浓度 NaNO₃对 3 种微藻总脂肪酸含量和脂肪酸组成的影响

2.2.1 对微藻 P9 总脂肪酸含量和脂肪酸组成的影响

在 BG11 培养液中添加不同质量浓度 NaNO₃对微藻 P9 总脂肪酸含量及脂肪酸组成的影响见表 4。在 37.5 ~ 1 875.0 mg · L⁻¹质量浓度范围内,随 NaNO₃质量浓度的提高,微藻 P9 的总脂肪酸含量呈现先增加后减少的变化趋势(表 4),且不同质量浓度处理组间微藻 P9 的总脂肪酸含量有明显的差异。

表 4 不同质量浓度 NaNO₃对微藻 P9 (*Klebsormidium* sp.) 总脂肪酸含量和脂肪酸组成的影响¹⁾
Table 4 Effect of different concentrations of NaNO₃ on total fatty acid content and fatty acid composition of microalga P9 (*Klebsormidium* sp.)¹⁾

质量浓度/mg · L ⁻¹ Concentration	总脂肪酸含量/% Content of total fatty acids	各脂肪酸的相对含量/% Relative content of different fatty acids			
		软脂酸 Palmitic acid	亚油酸 Linoleic acid	油酸 Oleic acid	硬脂酸 Stearic acid
37.5	14.16	24.39	15.24	17.61	19.13
75.0	15.56	11.12	4.27	4.86	5.76
150.0	16.02	14.22	6.13	7.35	8.09
300.0	19.74	16.02	6.16	7.71	8.32
375.0	25.39	30.25	18.47	19.75	22.29
750.0	17.11	14.07	8.58	10.81	3.95
1 500.0(CK)	14.18	12.09	6.78	8.81	10.73
1 875.0	19.65	6.85	6.19	7.58	8.15

¹⁾ 基本培养液为 BG11 液体培养基 The basic medium is BG11 liquid medium.

在 NaNO₃添加量为 375.0 mg · L⁻¹的培养液中微藻 P9 的总脂肪酸含量最高,达到 25.39%,为对照组(NaNO₃质量浓度为 1 500.0 mg · L⁻¹)微藻 P9 总脂肪酸含量的 1.79 倍,但随培养液中 NaNO₃质量浓度继

续提高,微藻 P9 的总脂肪酸含量并没有增加,反而略有下降,说明对于微藻 P9 的培养而言,若以获取脂肪酸为培养目的,则培养液中最佳的 NaNO₃质量浓度应为 375.0 mg · L⁻¹。而且,在 NaNO₃添加量为 375.0 mg · L⁻¹的培养液中,软脂酸、亚油酸、油酸和硬脂酸的相对含量分别为 30.25%、18.47%、19.75% 和 22.29%,依次为对照组的 2.50、2.72、2.24 和 2.08 倍,其中,饱和脂肪酸相对含量为 52.54%,不饱和脂肪酸相对含量为 38.22%。因而,无论是从总脂肪酸含量还是从制备生物柴油所需的这 4 种脂肪酸的相对含量看,含有 375.0 mg · L⁻¹NaNO₃的 BG11 培养液不但适合微藻 P9 的生长而且对脂肪酸合成有明显的促进作用,且脂肪酸的组成也适合制备生物柴油。

2.2.2 对微藻 TH6 总脂肪酸含量和脂肪酸组成的影响

在 BG11 培养液中添加不同质量浓度 NaNO₃对微藻 TH6 总脂肪酸含量及脂肪酸组成的影响见表 5。随培养液中 NaNO₃质量浓度的提高,微藻 TH6 的总脂肪酸含量无明显变化趋势,但不同质量浓度 NaNO₃处理组间总脂肪酸含量有一定的差异。其中,在 NaNO₃添加量为 37.5 mg · L⁻¹的 BG11 培养液中,微藻 TH6 的总脂肪酸含量最高,达到 20.69%,为对照组(NaNO₃质量浓度为 1 500.0 mg · L⁻¹)的 1.89 倍,也明显高于其他处理组;且其饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸的相对含量分别为 33.23% 和 14.75%,其中的软脂酸、亚油酸和油酸的相对含量也最高,分别达到 28.07%、6.91% 和 7.84%,分别为对照组的 3.37、

表 5 不同质量浓度 NaNO₃对微藻 TH6 (*Oedocladium* sp.) 总脂肪酸含量和脂肪酸组成的影响¹⁾
Table 5 Effect of different concentrations of NaNO₃ on total fatty acid content and fatty acid composition of microalga TH6 (*Oedocladium* sp.)¹⁾

质量浓度/mg · L ⁻¹ Concentration	总脂肪酸含量/% Content of total fatty acids	各脂肪酸的相对含量/% Relative content of different fatty acids			
		软脂酸 Palmitic acid	亚油酸 Linoleic acid	油酸 Oleic acid	硬脂酸 Stearic acid
37.5	20.69	28.07	6.91	7.84	5.16
75.0	13.02	10.16	6.67	7.71	8.19
150.0	11.16	7.38	1.58	2.57	4.55
300.0	12.08	8.26	0.97	1.44	7.43
375.0	11.87	8.56	2.4	3.15	6.03
750.0	13.39	4.67	1.67	3.16	3.08
1 500.0(CK)	10.93	8.33	3.86	4.09	5.23
1 875.0	12.26	10.77	1.42	1.56	9.00

¹⁾ 基本培养液为 BG11 液体培养基 The basic medium is BG11 liquid medium.

1.79 和 1.92 倍,但硬脂酸的相对含量则较对照减少了 0.07 百分点。实验结果表明,在低氮条件下 (NaNO_3 质量浓度为 $37.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 培养有利于微藻 TH6 总脂肪酸的合成,也利于其中不饱和脂肪酸组分的合成。

2.2.3 对微藻 CF5 总脂肪酸含量和脂肪酸组成的影响 在 BG11 培养液中添加不同质量浓度 NaNO_3 对微藻 CF5 总脂肪酸含量及脂肪酸组成的影响见表 6。研究表明,随着 NaNO_3 质量浓度的提高,微藻 CF5 的总脂肪酸含量没有明显的变化趋势,但各处理组的总脂肪酸含量均高于对照组 (NaNO_3 质量浓度为 $1500.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),表明培养液中 NaNO_3 质量浓度的改变对微藻 CF5 的总脂肪酸合成有一定的影响,但这种影响效应不明显。

在 NaNO_3 添加量为 $1875.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养液中,微藻 CF5 的总脂肪酸含量最高 (18.79%); 在 NaNO_3 添加量为 $150.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养液中,微藻 CF5 的饱和脂肪酸相对含量最高 (21.93%); 而在 NaNO_3 添加量为 $750.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养液中,微藻 CF5 的不饱和脂肪酸相对含量最高 (16.14%)。综合以上研究结果后可看出,虽然在 NaNO_3 质量浓度为 $150.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BG11 培养液中微藻 CF5 的总脂肪酸含量并不是各处理组中最高的,且其不饱和脂肪酸的相对含量也低于 $75.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO_3 处理组,但考虑到微藻 CF5 的生长量,最终确定微藻 CF5 培养的适宜 NaNO_3 质量浓度为 $150.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 6 不同质量浓度 NaNO_3 对微藻 CF5 (*Stigonema* sp.) 总脂肪酸含量和脂肪酸组成的影响¹⁾

Table 6 Effect of different concentrations of NaNO_3 on total fatty acid content and fatty acid composition of microalga CF5 (*Stigonema* sp.)¹⁾

质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration	总脂肪酸含量/% Content of total fatty acids	各脂肪酸的相对含量/% Relative content of different fatty acids			
		软脂酸 Palmitic acid	亚油酸 Linoleic acid	油酸 Oleic acid	硬脂酸 Stearic acid
37.5	17.73	7.80	3.96	4.86	5.88
75.0	17.35	13.19	7.07	8.24	5.77
150.0	17.46	14.18	5.39	6.02	7.75
300.0	18.61	11.22	3.06	7.43	6.56
375.0	17.06	7.63	4.83	7.12	2.29
750.0	18.18	9.54	7.31	8.83	4.24
1500.0(CK)	13.75	7.70	6.16	6.93	3.54
1875.0	18.79	7.13	4.84	5.33	5.83

¹⁾ 基本培养液为 BG11 液体培养基 The basic medium is BG11 liquid medium.

3 讨 论

在培养微藻时硝态氮被广泛用作氮源,但当藻类受到氮胁迫时,由于光合作用并未中断,碳元素的同化作用仍继续进行,导致脂肪酸合成模式的改变,转而合成中性的甘油三酯^[10],并以油滴的形式贮藏在细胞质中。Yongmanitchai 等^[3]发现,在缺氮条件下,有 15 种绿藻的总脂肪酸含量较高;Piorreck 等^[11]也发现一些藻类在缺氮条件下脂类含量升高;Thomas 等^[12]和 Fábregas 等^[13]的研究结果也表明,在缺氮条件下,三角褐指藻和 *Dunaliella tertiolecta* 的脂类开始累积;Suen 等^[6]报道,在缺氮条件下,拟微球藻 (*Nannochloropsis* sp. QII) 的总脂肪酸含量可高达 55%,而在氮饱和时总脂肪酸的含量只有 24%。因此,氮含量对控制微藻脂肪酸含量有非常重要的作用,有些微藻在氮营养不足时脂肪酸含量并不增加,相反,在一定范围内氮浓度较高时脂肪酸的含量增加,说明这些藻类的代谢途径有所不同。Reitan 等^[14]曾研究了三角褐指藻等 7 种微藻在氮限制条件下脂肪酸含量的变化,结果表明:随氮盐不足的加剧,总脂肪酸中多数不饱和脂肪酸的百分比呈下降趋势;梁英等^[15]研究了 NaNO_3 浓度对 2 株三角褐指藻脂肪酸组成的影响,认为三角褐指藻的 EPA 含量有随 NaNO_3 质量浓度提高而增加的趋势。

实验结果表明,培养 33 d 后,随着 NaNO_3 质量浓度的提高,3 种微藻鲜质量均逐渐增大,但在选择微藻适宜的培养液时,不但要考虑微藻的生长量,更重要的是还要考虑微藻中总脂肪酸含量及脂肪酸组成的变化。随 NaNO_3 质量浓度的提高,微藻 P9 的总脂肪酸含量增加,且在 NaNO_3 添加量为 $375.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养液中总脂肪酸含量最高,不饱和脂肪酸的相对含量为 38.22%,饱和脂肪酸的相对含量为 52.54%,饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的相对含量分别是对照组的 2.30 和 2.45 倍,因此,在实验室条件下培养微藻 P9 时 NaNO_3 的添加量应为 $375.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。低氮 ($37.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO_3) 条件下,微藻 TH6 的总脂肪酸含量最高,为对照组的 1.89 倍,亚油酸、油酸和硬脂酸的相对含量变化不显著,但是软脂酸相对含量较对照提高了约 3 倍,因此,在实验室条件下培养微藻 TH6 时 NaNO_3 的添加量应为 $37.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 NaNO_3 质量浓度不同的培养条件下,微藻 CF5 的总脂

肪酸含量差异不大,且软脂酸、亚油酸、油酸和硬脂酸含量的变化也不明显,但从饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比例考虑,在实验室条件下培养微藻 CF5 时 NaNO_3 的添加量应为 $150.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。上述研究结果也表明,由于不同种类微藻的代谢机制不同,因而不同微藻适应的氮浓度也有明显的差异。

在脂肪酸的合成过程中,乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACCase) 是脂肪酸合成的关键限速酶;然而,对脂类代谢而言,ACCase 和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 的相对活性影响着脂类代谢途径的走向;通过糖酵解途径产生丙酮酸后,ACCase 催化底物乙酰辅酶 A 进入脂肪酸合成途径;乙酰辅酶 A 的浓度累积激活 PEPC,催化丙酮酸合成草酰乙酸进入氨基酸合成途径,因此,抑制 PEPC 活性有助于提高 ACCase 催化底物进入脂肪酸合成途径^[16]。研究结果表明,硝态氮浓度可能在一定程度上提高 ACCase 的活性、促进脂肪酸合成、增加藻类总脂肪酸的含量,但是其作用机制以及是否具有抑制 PEPC 活性的作用,目前尚不清楚。通过进一步的研究,如果能够准确控制微藻脂肪酸合成与代谢过程中 ACCase 和 PEPC 的活性,使代谢产物向脂肪酸合成途径方向进行转化,从而大幅度提高微藻中的总脂肪酸含量,并使脂肪酸的组成更适合用于制备生物柴油,可为生产生物柴油提供更加廉价的原料。

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] 杨 凯, 史全良. 不同浓度 IAA 对微藻 TH6 (*Oedocladium* sp.) 生长及脂肪酸含量的影响 [J]. *植物资源与环境学报*, 2009, 18(2): 80-83, 96.
- [3] Yongmanitchai W, Ward O P. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 1991, 57(2): 419-425.
- [4] Chen F, Johns M R. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1991, 3(3): 203-209.
- [5] Kaplan D, Richmond A E, Dubinsky Z, et al. Algal nutrition [M] // Richmond A. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boca Raton: CRC Press, 1986.
- [6] Suen Y, Hubbard J S, Holzer G, et al. Total lipid production of the green alga *Nannochloropsis* sp. QII under different nitrogen regimes [J]. *Journal of Phycology*, 1987, 23(2): 289-296.
- [7] Regan D L. Other micro-algal [M] // Borowitzka M A, Borowitzka J. *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.
- [8] 大连轻工业学院, 华南理工大学, 郑州轻工业学院, 等. 食品分析 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 73-223.
- [9] 邵海艳, 吉宏武, 章超桦, 等. 刺松藻化学成分测定及其营养评价 [J]. *食品研究与开发*, 2007, 28(10): 160-162.
- [10] Shaw R. The polyunsaturated fatty acids of microorganisms [J]. *Advances in Lipid Research*, 1966, 4: 107-174.
- [11] Piorreck M, Baasch K H, Pohl P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23: 207-216.
- [12] Thomas W H, Seibert D L R, Alden M, et al. Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. I. Introduction and *Phaeodactylum tricornutum* experiments [J]. *Biomass*, 1984, 5: 181-209.
- [13] Fábregas J, Abalde J, Herrero C. Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate [J]. *Aquaculture*, 1989, 83(3/4): 289-304.
- [14] Reitan K L, Rainuzzo J R, Olsen Y. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae [J]. *Journal of Phycology*, 1994, 30(6): 972-979.
- [15] 梁 英, 麦康森, 孙世春. 硝酸钠浓度对2株三角褐指藻生长及脂肪酸组成的影响 [J]. *黄渤海海洋*, 2001, 19(4): 56-62.
- [16] Song D H, Fu J J, Shi D J. Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24(3): 341-348.