

文章编号:1006-396X(2011)01-0001-05

## 三角褐指藻提取生物柴油的生态响应研究

何 峰, 傅鹏程\*, 徐春明

(中国石油大学(北京)新能源研究中心,北京 102249)

**摘 要:** 为了考察光暗对比以及不同碳源类型和浓度对于三角褐指藻生化物质的影响,用含有葡萄糖、乙酸钠和甘油的培养基对三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)进行培养,并测定生物量、细胞浓度、生化物质以及脂肪酸含量。结果表明,三角褐指藻具有光自养和兼养生长的能力;三角褐指藻对底物浓度与有机碳源具有选择性,其中利用葡萄糖的最佳浓度为 20 mmol/L;在 500 mL 三角瓶培养过程中生长适宜条件为:温度(25±1) °C,光强 25 μmol/(m<sup>2</sup>·s),pH 为 7.5。不管哪种碳源均能够促进三角褐指藻生物量的积累。将细胞浓度达到 2.5×10<sup>6</sup> 个/mL 培养末期的藻液进行蛋白质、还原糖、叶绿素以及总脂(TOL)含量分析,考察不同生长条件下生化物质的积累以及细胞生物量的变化。通过超声波萃取及索氏抽提总脂,质量分数达到 20%(干重);利用 GC-MS 分析脂肪酸含量及组成,其中以 C16:1, C16:0 居多,质量分数分别为 34.8%,11.9%,可以用于提取生物柴油。

**关键词:** 三角褐指藻; 有机碳源; 光暗对比; 葡萄糖; 生物量; 总脂含量; 生物柴油

**中图分类号:** TE39      **文献标识码:** A      **doi:**10.3696/j.issn.1006-396X.2011.01.001

## Technology of *Phaeodactylum Tricornutum* to Extract Fatty Acid for the Biodiesel Production

HE Feng, FU Peng-cheng\*, XU Chun-ming

(Research Center of Renewable Energy, China University of Petroleum (Beijing), Beijing 102249, P. R. China)

Received 27 October 2010; revised 11 November 2010; accepted 20 December 2010

**Abstract:** In order to understand the effect of light, carbon sources and concentration on the *phaeodactylum tricornutum*, the culture medium containing glucose, acetate and glycerol were chose, the biomass, cell concentration, biochemical substances and fatty acid content were tested. The results show that the *phaeodactylum tricornutum* is photoautotroph and mixotroph, which with selectivity for substrate concentration and organic carbon sources, the optimum concentration of glucose is 20 mmol/L, the optimal growth condition in 500 mL flask contains that the temperature is (25±1) °C, the light intensity is 50 μmol/(m<sup>2</sup>·s), the pH is 7.5. Whatever the carbon sources are able to promote the biomass accumulation. When the cell concentration achieve to 2.5×10<sup>6</sup> cells/mL in the evening of the culture, the protein, sugar, chlorophyll and TOL content were analyzed. The biomass accumulation and biomass change in different growth conditions were determined. By ultrasonic extraction and Soxhelt extraction, the total of lipid reaches 20%(dry weight); The fatty acid content and composition with GC-MS were measured, and found the C16:0 and C16:1 are 34.8% and 11.9% (mass fraction) respectively, which are more than other components and could be used to extract bio-diesel.

**Key words:** *Phaeodactylum tricornutum*; Organic carbon source; Light/darkness; Glucose; Biomass; Total liquid; Biodiesel

\* Corresponding author. Tel. : +86-10-89731091; e-mail: hefeng20024406@126.com

微藻是一类具有生产高附加值化学和营养品如多不饱和脂肪酸(PUFAs)和生物活性成分的有潜力的资源<sup>[1]</sup>。同时做为原料生产生物柴油等生物质

燃料受到国内外广泛关注,微藻因其具有生长速度快、脂肪酸含量高、生长条件温和、不受水质、自然环境等影响而被认为是值得推广的第三代生物质燃料。硅藻三角褐指藻富含油脂(占细胞干重 40%~60%)<sup>[2]</sup>,且短链脂肪酸(C14 和 C16)占细胞中总脂肪酸的 67%~70%<sup>[3]</sup>。

三角褐指藻富含大量的多不饱和脂肪酸和色素

收稿日期:2010-10-27

作者简介:何峰(1983-),男,黑龙江宾县,在读博士。

基金项目:国家 973 科技计划项目资助(S2010021001)。

\* 通讯联系人。

等,如二十碳五烯酸(EPA),具有很高的经济利用价值<sup>[4]</sup>。也有报道称国外已用三角褐指藻生产抗氧化剂(岩藻黄素)等产品<sup>[5]</sup>,关于它的研究国内进行了大量的工作,如对温度、光强、时间、营养盐及微量元素等进行了探讨。暨南大学段舜山课题组分别利用不同氮源<sup>[6]</sup>、不同铁浓度诱导海洋三角褐指藻的生长进行了研究<sup>[7]</sup>,梁英等<sup>[8]</sup>研究了温度对于三角褐指藻叶绿素荧光特性以及生长的影响,也有研究利用不同温度考察三角褐指藻的生长以及甘油三酯的积累情况,并且利用絮凝法收集藻种,提高了藻种的收集效率,另外,海洋微藻在受到环境胁迫后,如氮限制<sup>[9-12]</sup>、超声波、紫外光等对微藻的化学组成也产生了很大的影响<sup>[13]</sup>。目前已经有许多报道藻类的兼养培养比光自养培养生长速度快。例如在户外管式反应器中以 0.1 mol/L 葡萄糖为底物兼养培养小球藻白天最高产量达到 10.2 g/(L·d),晚上达到 5.9 g/(L·d),比正常情况下小球藻类似的光自养产量要高三倍。兼养培养是光自养生产物质的一种转换,生长速率及生物量的增加是光和无机组作用的结果。然而目前国内对于硅藻三角褐指藻在油脂积累以及代谢方面的研究较少,本研究以大规模培养三角褐指藻并且分析其脂肪酸含量及组成为目标,采用兼养培养的方式是目前研究较少的培养方式,因其高效且脂肪含量相对较高而体现了创新性与可操作性。

## 1 实验部分

### 1.1 材料与方法

1.1.1 藻种来源 中国科学院海洋研究所购得三角褐指藻藻种。

1.1.2 培养条件 人造海水配置 f/2 培养基配方为:NaNO<sub>3</sub>, 74.8 mg; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.4 mg; Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O, 8.4~16.7 mg; f/2 微量元素溶液, 1 mL; f/2 维生素溶液, 1 mL; 海水, 1 000 mL。其中 f/2 微量元素溶液基本配方为: ZnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 23 mg; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 178 mg; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 10 mg; FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·5H<sub>2</sub>O, 3.9 g; NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 7.3 mg; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 12 mg; Na<sub>2</sub>EDTA, 4.35 g。f/2 维生素溶液基本配方: 维生素 B<sub>12</sub>, 0.5 mg; 维生素 B<sub>1</sub>, 100 mg; 维生素 H, 0.5 mg; 纯水, 1 000 mL。盐度 3‰, pH=7.5, 藻种密度 0.15 g/L, 光照培养箱 25 ℃, 光照 5 000 lux, 光照时间为 16 h(暗反应时间为 8 h), 培养 14 d, 同时进行暗反应对照。对数生长期的藻种进行接种, 每组实验 3 个平行, 每天定期摇动 3 次并随机变换位置使吸收光照均匀。所有实验均在中国石油大学(北京)光合资源化利用实验

室开展。

1.1.3 仪器设备 紫外分光光度计(Unico 上海科学仪器厂); 高速冷冻离心机(湖南湘仪实验仪器厂); 光照培养箱(上海科学仪器厂); 超声波破碎仪(上海德强医学仪器公司); 光强测定仪(LI-250); 超净工作台(哈东联科学仪器厂); 磁力搅拌器(江苏太仓科学仪器厂); 恒温摇床(江苏太仓科学仪器厂)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 收集培养 采用 500 mL 的摇瓶进行培养, 同时后期利用 10 L 光合生物反应器进行扩大培养, 收集培养至对数生长末期的藻液 5 000 g, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集藻细胞, 蒸馏水洗涤 3 次, 收集藻粉, 烘干, 于 -20 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 生物量的测定 采用干重法测定。将恒重的滤膜抽滤一定体积的藻液, 80 ℃ 恒温烘干 24 h, 测定质量无变化后测定滤膜的质量差, 即可获得细胞的生物量。

1.3 还原性糖、叶绿素 a 以及蛋白质含量的测定

1.3.1 还原性糖测定 采用 DNS, 每两天测定一次 485 nm 下的吸光度, 通过查找标准曲线对应的数值来确定还原糖类的变化。同时考察不同糖类在代谢过程中底物的消耗情况。

1.3.2 叶绿素 a 含量的变化 收集经 4 000 r/min, 离心 5 min 后所得到的藻种, 冻干 24 h, 用质量分数为 90% 丙酮进行萃取, 叶绿素是一种检测光合效率的手段, 叶绿素荧光分别在 645 nm 和 663 nm 处有最大吸收, 质量浓度 = (20.2 × OD<sub>645</sub> + 8.02 × OD<sub>663</sub>) × 稀释倍数<sup>[15]</sup>。

1.3.3 蛋白质的测定

(1) 细胞内蛋白质的提取: 用带刻度的离心管量取一定体积的藻液, 在 5 000 r/min 下离心 10 min, 小心吸取上清液, 余下的藻泥用蒸馏水定容至 10 mL, 用超声波细胞粉碎仪进行细胞破碎, 5 000 r/min 下离心 10 min, 将上清液移入比色管中, 即得蛋白质提取液。

(2) 细胞内蛋白质的测定方法: 细胞内蛋白质的含量用紫外吸收法测定。取蛋白质的提取液置于光径 1 cm 的石英比色杯中, 测定其在 280 nm 和 260 nm 的波长, 分别读取。用蒸馏水做空白对照。根据下列公式计算藻液中的蛋白质质量浓度: 质量浓度 = 1.55A<sub>280</sub> - 0.76A<sub>260</sub>, 根据藻液的浓缩比和对应生物量计算出蛋白质质量浓度。

1.3.4 总脂含量的测定 将收集的藻种进行离心烘干, 分别取 0.5 g 干藻种用正己烷进行萃取, 后将藻种进行超声波破碎 5 min, 并导入新的离心管, 用

$N_2$  吹干正己烷, 称重计算总脂的含量。

#### 1.4 脂肪酸的提取

在螺口试管中称取烘干的藻粉 50 mg, 加入 2.0 mL 的质量分数 2% 的  $H_2SO_4$  甲醇溶液, 充入氮气。将螺口试管放入 80 °C 砂浴 1 h, 冷却至室温, 分别加入 10 mL 的蒸馏水和 1.0 mL 的正己烷, 充分振荡, 4 000 r/min 离心 5 min。取出正己烷层放置到一小玻璃瓶中, 氮气吹干, 加入 100  $\mu$ L 正己烷。转移到另一个小玻璃瓶中, 封口备测。

#### 1.5 脂肪酸组成的测定

利用 Finnigan Trace DSQ 气质联用仪分析脂肪酸组成以及含量。毛细管色谱柱 HP-5 (30 m  $\times$  320  $\mu$ m  $\times$  0.25  $\mu$ m, 质量分数 5% 的苯酚)。进样口温度为 270 °C, 扫面范围 50~600 u; 55 °C 保持 1 min, 以 30 °C/min 的速度升至 175 °C, 以 2 °C/min 的速度升至 240 °C, 再以 6 °C/min 的速度升至 300 °C, 在 300 °C 保持 10 min。离子源为电子轰击源 (EI, 70 eV), 载气为高纯氦气, 流速 1 mL/min, 以面积归一化法得到各脂肪酸组分的相对百分含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 藻类细胞密度以及生物量的变化

#### 2.1.1 不同有机碳源对藻类生长的影响

##### (1) 细胞密度的变化

各对照组均以 0.15 g/L 的藻密度进行接种。在不同的有机碳源以及不同浓度下进行对照试验, 以不加有机碳源的光反应为对照组, 同时考察暗反应条件下, 藻液的生长情况, 如图 1 所示。

从图 1(a) 中可以看到随着时间的变化, 细胞生物量呈线性增加, 不同的葡萄糖浓度对于藻类细胞密度的影响有所不同, 其中 20 mmol/L 的葡萄糖浓度最适合藻细胞密度的增加, 从 5~100 mmol/L 的趋势内变化显著。图 1(b) 中含 5~50 mmol/L 的乙酸钠的培养基对细胞生物量的增加均有显著提高, 并且随着时间的变化成线性趋势, 当乙酸钠浓度达到 100 mmol/L 时, 细胞密度变化很小, 说明该浓度会抑制细胞的生长, 而 5 mmol/L 乙酸钠满足生长需求。图 1(c) 中添加不同甘油均使藻细胞在兼养条件下细胞密度有所提高, 但是不同的添加浓度对于细胞密度的增加趋势变化不明显。图 1(d) 中将光反应与暗反应进行对比发现, 在黑暗胁迫条件下, 细胞的生长受到了严重抑制, 细胞密度变化很小, 因此说明黑暗条件不适合三角褐指藻的生长, 而光自养与光兼养均能适合三角褐指藻生长。

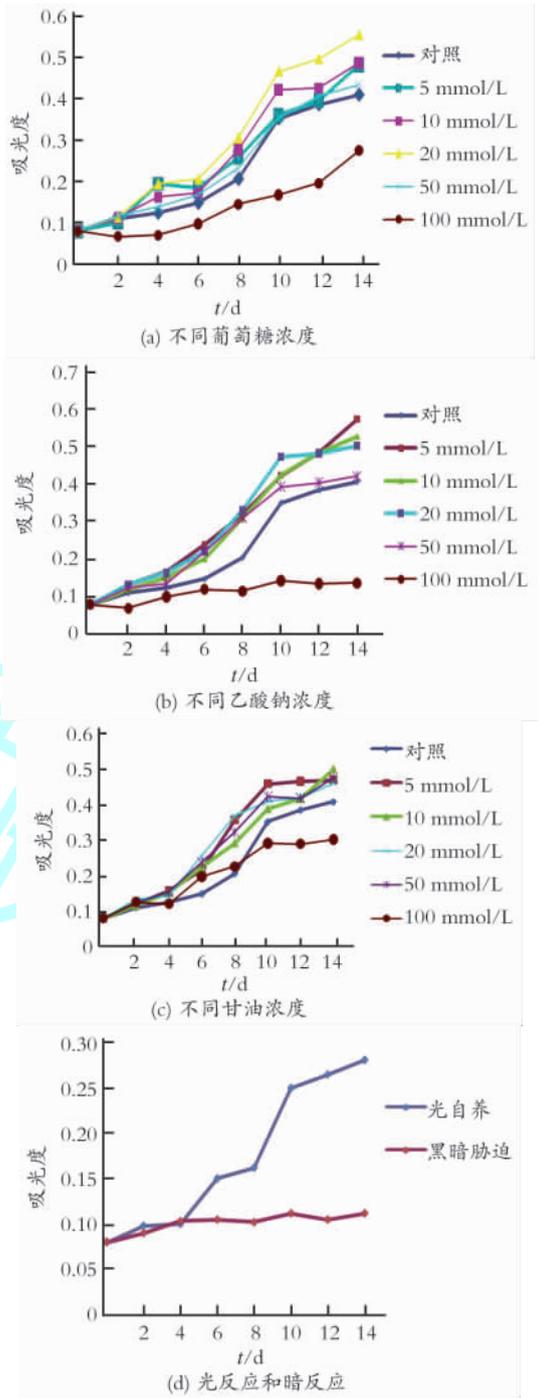


Fig. 1 Effect of algae cell density with different organic carbon source

图 1 不同有机碳源对藻类细胞密度的影响

##### (2) 藻种的生物量变化

培养到第 14 d 时, 通过干重法测定细胞的生物量, 结果如表 1 所示。

在 25 °C, 每天光照 16 h 的 500 mL 培养瓶中进行自养、异养、以及兼养培养的对比, 发现两组对比试验中添加有机碳源其生物量均有增加, 并且在光兼养条件下生物量增加显著, 最高可达到 1.001 mg/mL。

表 1 正常光照条件以及暗反应条件下细胞生物量的积累

Table 1 Biomass of microalgae between normal and darkness mg/mL

生物量 积累	自养 对照	兼养			异养		
		葡萄糖	乙酸钠	甘油	葡萄糖	乙酸钠	甘油
底物干重	0.56	0.581	1.001	0.941	0.431	0.575	0.524

## 2.2 细胞内生物物质及生化组成的变化

细胞内生物物质随时间的变化如图 2 所示。叶绿素 a 体现了藻类光合效率以及光能转化为化学能的关系,从实验中可以看到光自养与暗反应间叶绿素 a 含量变化很大(见图 2(a)),随着时间的增长,光反应叶绿素 a 一直积累,以葡萄糖为底物的异养反应中最大值可达到 0.69 mg/L,是光反应的 1.9 倍,3 种底物所积累的叶绿素含量接近;以葡萄糖为底物的暗反应最大值只有 0.45 mg/L,而暗反应条件下不加有机碳源,叶绿素 a 积累更少,只在第 6 天达到最大值 0.17 mg/L,而后逐渐减少,到第 10 天基本上不变化。

还原性糖类可以间接地反映藻类糖代谢的合成、转移等信息。由图 2(b)分析可知,不投加有机碳源的光反应中糖类从第 4 天开始增加,到第 12 天达到最大值为 0.35 mg/L,之后不变化,到第 12 天开始减少,第 14 天质量浓度只有 0.29 mg/L,分析原因可能是开始消耗底物的还原糖类;而黑暗胁迫条件下还原糖类积累很少,最大值只有光反应的 0.6 倍。而对于不同的反应条件包括光自养、异养和光兼养以及黑暗对照发现,光兼养条件下消耗的底物质量浓度最大,而光自养比黑暗胁迫条件下所积累的还原糖多 2.9 倍。

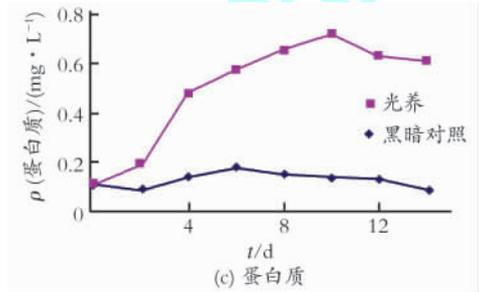


Fig. 2 Chemical position changes as the time

图 2 化学组成随时间的变化

由图 2(c)分析可知,光反应第 4 天开始,蛋白质质量浓度显著增加,到第 10 天达到最大值 0.71 mg/L,而最小值只有 0.11 mg/L,黑暗胁迫条件下蛋白质质量浓度变化不显著,第 4 天达到最大值 0.20 mg/L,之后逐渐较小。可以看出,暗反应中细胞的代谢和分裂都非常缓慢,因此物质积累很少。

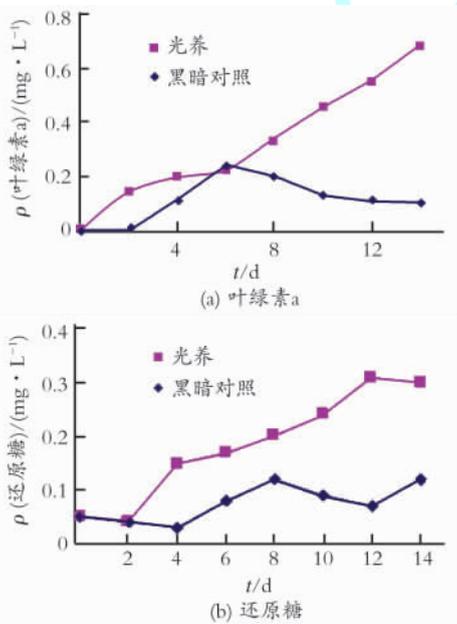
## 2.3 不同有机碳源对脂肪酸组分及含量的影响

通过 GC-MS 分析脂肪酸组成及其含量(质量分数),结果如表 2 所示。

表 2 脂肪酸含量与类型

Table 2 The type and content of fatty acid %

脂肪酸类型	自养	有机碳源		
		葡萄糖	乙酸钠	甘油
C12:0	—	2.0	3.2	0.3
C14:0	5.2	4.7	4.6	3.8
C15:0	0.3	0.3	0.2	0.3
C16:0	11.9	13.8	16.0	19.6
C16:1	34.8	39.9	38.5	39.9
C18:3n6	1.0	1.1	1.2	1.0
C18:2n6c	0.9	2.6	2.3	2.1
C18:2n6t	1.6	0.6	0.8	0.6
C18:1n9c	3.6	3.0	2.0	1.5
C18:1n9t	1.4	1.7	1.6	2.4
C18:0	—	—	—	—
C20:4n6	0.7	0.6	0.5	0.4
C20:5n3	12.2	18.9	19.1	14.4



续表 2

脂肪酸类型	自养	有机碳源		
		葡萄糖	乙酸钠	甘油
C20 : 3n3	—	1.4	1.3	0.8
C20 : 0	0.1	—	—	—
C22 : 6n3	0.7	0.9	0.6	4.2
C22 : 0	—	0.2	0.2	0.1
C24 : 0	0.9	0.9	1.0	0.9
其它	4.6	8.8	9.9	4.2
TSFA	27.5	21.9	25.2	25.0
TMUFA	34.8	39.9	38.5	39.9
TPUFA	31.4	30.8	29.4	27.4

注:TSFA 为总饱和脂肪酸, TMUFA 为总单不饱和脂肪酸, TPUFA 为多不饱和脂肪酸。

三角褐指藻在不同的培养条件下脂肪酸含量变化显著,而且不饱和脂肪酸的类型有所不同,主要的脂肪酸为 C16 : 0, C16 : 1, C20 : 5, 还有部分 C18 (C18 : 1, C18 : 2, C18 : 3, C18 : 4), 其中兼养条件下的脂肪酸含量明显高于自养,总饱和脂肪和单不

饱和脂肪酸含量在兼性条件下有所增加,多不饱和脂肪酸有所下降。

综上,通过考察光暗对比发现,暗反应条件对三角褐指藻的生长、生物量、细胞密度以及化学成分如蛋白质、还原糖、脂类积累等均有较大的影响,特别是在实验结束的前 4 天,光照条件下细胞密度随着时间增加变化显著,而黑暗条件下细胞密度仅为 33%,而且蛋白质、糖类、叶绿素均出现减少,原因是暗反应条件下细胞分裂减慢,导致生物化学物质合成能力下降。在 14 天的实验过程中,黑暗条件下的三角褐指藻仍能够缓慢生长并在实验结束时保持相对稳定的活性,说明三角褐指藻有一定的耐受黑暗胁迫的能力,从而在恶劣环境中生存。通过实验发现,三角褐指藻可以适应不同的有机碳源,并且具有最适合的底物浓度,同时对黑暗胁迫具有一定的耐受力,这也导致了其在暗反应过程中有少部分叶绿素、糖类、蛋白质的代谢和合成。需要进一步研究不同的温度、氮含量等条件对于生化物质及脂类积累的影响,从而充分利用三角褐指藻获得相关的生物柴油及相关产品。

### 参 考 文 献

- [1] Cer' on Garc' la M C, Fern' andez Sevilla J M. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile[J]. Journal of applied phycology, 2000(12):239—248.
- [2] Sheehan J, Dunahay T, Benemaxm J, et al. A look baek at the U. S. department of energy's aquatic species program—biodiesel from algae[M]. Colorado: The national renewable energy laboratory(NREL), 1998:22—27.
- [3] 蒋汉明, 高坤山. 氮源及其浓度对三角褐指藻生长和脂肪酸组成的影响[J]. 水生生物学报, 2004, 28(5):545—551.
- [4] 陈春艳. 三角褐指藻的收集及从中提取甘油三酯的方法研究[D]. 武汉: 华中师范大学, 2009.
- [5] 张继红, 马志珍. 三角褐指藻固定化培养的初步研究[J]. 海洋水产研究, 1998, 19(1):14—17.
- [6] Cai Zhuoping, Duan Shunshan. Growth characteristics and chemical compositions of *Phaeodactylum tricornutum* under different nitrogen concentrations[J]. Ecology and environment, 2007, 16(6):1633—1636.
- [7] 邢存章, 谭明臣, 吕海亮, 等. 超临界甲醇法制备生物柴油[J]. 石油化工高等学校学报, 2009, 22(1):9—12.
- [8] 梁英, 陈书秀, 田传远, 等. 温度对三角褐指藻叶绿素荧光特性及生长的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(3):377—383.
- [9] Natalia O Z, Galina S K, Tatiana G V. Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green algae *botryococcus*[J]. J. appl. phycol., 2005, 17:309—315.
- [10] Inna K G, Chiara B, Pushkar S, et al. Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidric acid in the fresh water green alga *parietochloris incis* [J]. J. phycol., 2002(38):991—994.
- [11] 陈峰, 姜悦. 微生物技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999:32—33, 44—45, 151—155.
- [12] Lee Y K, Low C S. Productivity of outdoor algal cultures in enclosed tubular photobioreactor[J]. Biotechnology bioengineering, 1992, 40(9):1119—1122.
- [13] 刘晓娟, 段舜山, 李爱芬, 等. 有机碳源对三角褐指藻生长、胞内物质和脂肪酸组分的影响[J]. 生物工程学报, 2008, 24(1):147—152.