

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00426

高产油小球藻的筛选及其油脂分析

徐进^{1,2} 徐旭东¹ 方仙桃¹ 胡晗华¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 小球藻广泛分布于各种生境, 特别是淡水环境中, 适应性强。其同化产物主要是淀粉, 但在环境胁迫条件下可显著积累中性脂, 其脂肪酸类型主要为 C16 和 C18, 适合作为生物柴油的原料。我们从中国部分地区水体中分离纯化到若干株小球藻, 通过薄层层析比较分析了 21 株产油小球藻的油脂含量, 筛选到一株三酰基甘油含量较高的藻株 *Chlorella* sp. NMX37N。其适宜生长温区为 15—35℃, 在 25℃ 时生长速率最快, 比生长速率为 0.53/d, 生长的最适光强为 250 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。批量培养实验显示, 藻细胞的三酰基甘油含量随培养时间延长而增加, 并在培养的稳定期达到最大值, 此时培养液中氮基本被耗尽。在批量培养条件下培养 *Chlorella* sp. NMX37N 约 40d, 藻细胞中总脂含量可达到 33% 左右, 与此相比通过两步培养方式, 将培养至对数后期(约 20d)的藻细胞缺氮处理 48h 后, 得到的总脂产率相当。通过两步培养方式可以大大缩短培养时间, 使得该藻细胞快速有效积累油脂。另外, 气相色谱分析显示, 该藻的总脂和三酰基甘油的脂肪酸均以 C16:0 和 C18:2 为主, 占总脂肪酸的 70% 以上, 且不含 C20 以上的长链脂肪酸, 可以作为优质的生物柴油原料。

关键词: 小球藻; 三酰基甘油; 脂肪酸; 生物柴油

中图分类号: Q819 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)03-0426-07

由于化石燃料的不可再生性, 以及其燃烧对环境的影响, 清洁燃料和可再生新能源引起了当今世界各国的广泛关注^[1]。生物质能源是地球上最普遍的一种可再生能源, 它是通过植物光合作用, 将太阳能以化学能的形式储存在生物体内的一种能量形式, 被称为绿色能源。生物柴油是指来自生物体的油脂经转酯作用而形成的脂肪酸甲酯或乙酯, 是一种生物质液体燃料, 近年来已成为生物质能源研究中的热点^[2, 3]。目前生物柴油大多以植物来源的油脂作为原料, 其规模受到成本和原料供给的严重制约。与油料作物和林木相比较, 一些产油的微型藻类具有单位面积年收获量高、能量密度高、成本低廉、适合于工厂化生产、采收和加工的特点。利用产油微藻作为生物柴油的原料可望显著提高生物柴油的产业规模和用地效率, 具有广阔的发展前景。

小球藻是一种球形或椭球形单细胞绿藻, 细胞大小约 2—12 μm , 主要生长在土壤、潮湿的岩石表面以及淡水中^[4]。小球藻属大约有 9 个已定种, 但只有 4 个种类被认为是真正的小球藻^[5]。小球藻的同化产物是淀粉, 但在环境胁迫条件下可显著积累中性脂, 含量为 5%—63%(干重)^[6-8], 且主要脂肪酸类型为 C16:0、C18:1、C18:2 和 C18:3^[2]。小球藻适应性强、易于大规模培养, 细胞中丰富的短链脂肪酸与柴油分子中的碳数(15 个左右)相近, 被认为是优质的生物柴油原料。本研究从我国部分地区水体中分离纯化产油小球藻, 并对其中一株中性脂含量较高的藻株 *Chlorella* sp. NMX37N 进行了研究, 分析其温度、光强适应性以及油脂积累与氮浓度的关系, 并测定了藻细胞中总脂与三酰基甘油的脂肪酸组成, 为利用该藻作为生物柴油的原料提供理论依据。

收稿日期: 2011-04-02; 修订日期: 2012-01-07

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2011CB200901); 中国科学院创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-G-060)资助

作者简介: 徐进(1986—), 男, 湖北黄冈人; 硕士研究生; 从事藻类生物柴油研究。E-mail: xjlf198624@sina.com

通讯作者: 胡晗华, E-mail: hanhuahu@ihb.ac.cn

1 材料与方法

1.1 藻种分离纯化

从我国湖北、江苏和内蒙古等地水体及土壤采集了大量的水样和泥土样品。采集的样品用 BG11^[9] 培养基稀释后涂布到 1.5% 琼脂的 BG11 固体平板上, 在 25℃、冷白荧光灯提供 30—50 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的连续光强条件下培养一段时间长出单藻落。挑取单藻落在 1.5% 琼脂的 BG11 固体平板上反复划线分离, 最后得到单一的藻种, 并经镜检确认。将属于小球藻的种类接种到含 20 mL BG11 培养基的 50 mL 三角瓶中, 在 25℃、50—70 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的连续光照条件下静置培养 20d 至稳定期, 收获藻细胞提取总脂利用薄层层析法比较三酰基甘油的含量, 得到一株三酰基甘油含量较高的藻株 *Chlorella sp.* NMX37N, 该藻株来自于内蒙古自治区察哈尔右翼后旗白音查干二广高速和 208 国道交界处的火车道旁边水沟(41°29'06"N, 113°22'21"E), 水沟水体偏碱性, 较浑浊。

1.2 细胞的显微结构及 18S rDNA 序列分析

取处于对数生长期藻细胞液于玻片上, 在 Leica CRT5000 型光学显微镜下进行观察, 照相。藻株的基因组 DNA 用玻璃奶试剂盒提取(Fermentas, Vilnius, Lithuania), 以引物 18S-1: 5'-tggttgatcctgccagtagtc-3' 和 18S-2: 5'-tgatcctctgcaggttcacc-3' 进行 PCR 扩增获得片段。用凝胶电泳和胶回收试剂盒分离、回收获得纯的 18S rDNA 基因片段。得到的片段克隆到 pMD18-T(Takara)载体上, 并测序得到 18S rDNA 序列。18S rDNA 序列用 MEGA 4.0 进行对位排列, 比对中采用默认设置, 比对后对比对结果进行手工调整。调整后约 1.7 kb 的序列用软件 MEGA 4.0 构建邻接树、最大简约树以及用 Phylipwpx 软件构建最大相似树。

1.3 薄层层析分析

藻细胞的总脂利用氯仿/甲醇萃取的方法提取^[10]。经 6000 r/min 离心收集的藻细胞加入一定体积的氯仿: 甲醇 (1:1), 在旋涡振荡器上以最大速度振荡 1—2min, 然后加入 3/10 体积的 1 mol/L 氯化钾的 0.2 mol/L 磷酸溶液, 稍振荡后 12000 r/min 离心 5min, 吸取下层氯仿相至新的 EP 管中, 置于通风橱中吹干, -20℃ 保存备用。

薄层层析参照文献^[11]进行。薄层层析板的型号是 Silica gel 60 F254 (Merk KgaA Darmstadt, Ger-

many), 展层剂体系为正己烷: 乙醚: 乙酸(70:30:1, v/v/v)。展层完毕从展层缸中取出层析板, 置于通风橱内吹干展层剂, 然后放置到含有一定量颗粒碘的烧杯中于 37℃ 下显色 5—10 min^[12]。标准品三油酸甘油购自 sigma 公司。

1.4 不同温度下 *Chlorella sp.* NMX37N 的生长及光合放氧

接种对数生长期的 *Chlorella sp.* NMX37N 于含 50 mL BG11 培养基的 100 mL 三角瓶中, 静置于单侧光强为 100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的连续光照下培养, 隔天测定 A_{750} 值以检测藻细胞在 15、20、25、30、35 和 40℃ 下的生长, 接种起始 $A_{750}=0.05$ 。

光合放氧速率测定按文献报道的方法并稍有改动^[13]。将 *Chlorella sp.* NMX37N 在 25℃、100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 条件下培养至对数期, 6000 r/min 离心收集藻细胞, 重悬于新鲜的培养基中, 调整 $A_{750}=1.0$, 取 2 mL 藻细胞悬液置于 Oxy-Lab 氧电极 (Hansatech) 反应池中, 测定藻细胞在 100、250、500、1000 和 2000 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的光强下的光合放氧, 测定温度为 25℃。

1.5 藻株油脂积累分析

将处于对数生长期的 *Chlorella sp.* NMX37N 接种到含 1.5 L BG11 培养基的 2 L 三角瓶中, 在 25℃、单侧光强为 250 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的条件下通空气培养, 分别在对数生长前、中、后和稳定期取样, 利用薄层层析法分析藻细胞的油脂含量, 分析前以细胞数为基准调整上样体积。同时, 测定培养液的 A_{750} 值和利用分光光度法(OD_{220})检测 NO_3^- 的浓度^[14]。

1.6 总脂含量的测定

将 *Chlorella sp.* NMX37N 接种到含 1.5 L BG11 培养基的 2 L 三角瓶中, 在 25℃、单侧光强为窗 150 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 条件下通气培养至稳定期, 6000 r/min 离心收集藻细胞, 用灭菌 ddH₂O 洗涤三次, 将收集的藻细胞液氮速冻后, 冷冻干燥备用。总脂的提取及定量参照文献^[10]。称取 100 mg 干藻粉加入一定体积的氯仿: 甲醇 (1:2) 溶剂萃取充分, 然后加入一定比例的灭菌 ddH₂O 促使分层, 离心收集下层的氯仿层, 转入已称重的称量瓶中, N₂ 吹干有机溶剂, 然后用分析天平称重, 计算总脂的含量。

1.7 脂肪酸分析

提取的藻细胞总脂和用薄层层析板回收的三酰基甘油先进行甲酯化。将一定量的总脂和三酰基甘

油转移到 1.5 mL Aglient 玻璃瓶中, 加入 1 mL 1 mol/L 的硫酸甲醇溶液, 充 N_2 后密封, 于 100°C 反应 1h。冷却后, 加入 200 μL 蒸馏水, 混匀后, 以 200 μL 正己烷萃取三次, 合并有机相, N_2 吹干后定容至 100 μL , 取 1 μL 用 Ultra Trace 气相色谱分析仪 (Thermo Scientific, United States) 进行脂肪酸组成分析。

2 结果与讨论

2.1 产油小球藻株的筛选

我们从内蒙古自治区的鄂尔多斯、乌兰察布、锡林郭勒盟等荒漠地区和湖北省以及太湖周边采集了一些水样和泥土样品, 利用固体 BG11 平板分离纯化得到大量藻株。利用形态观察及 18S rDNA 分析的方法, 从这些藻株中鉴定出若干株小球藻。将属于小球藻的藻株在 BG11 液体培养基中进行扩大培养, 收集藻细胞后提取总脂进行薄层层析分析, 鉴定出产油的小球藻株(图 1 显示部分产油小球藻株)。薄层层析结果显示, 共得到 21 株产油小球藻, 其中 *Chlorella* sp. NMX37N 的生长较快、油脂含量相对最高, 用于本实验的后续研究。

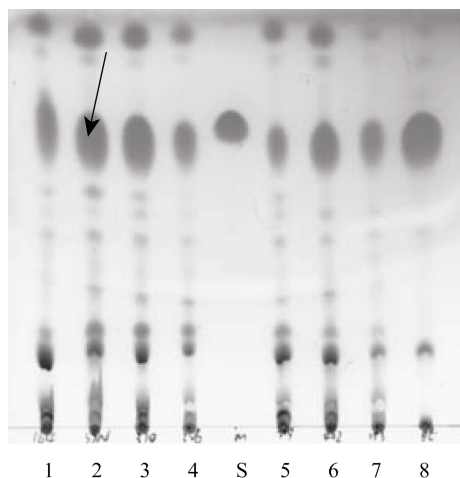


图 1 部分小球藻株三酰基甘油的硅胶板薄层层析图(箭头所示为三酰基甘油)

Fig. 1 Comparison of triacylglycerol (indicated by the arrow) contents in *Chlorella* species by thin layer chromatography 1—7. 其他小球藻; 2. *Chlorella* sp. NMX37N; S. 三油酸甘油标准品(0.02 mg); 8. 三角褐指藻

1—7. Other *Chlorella* species; 2. *Chlorella* sp. NMX37N; S. Tri-olein (0.02 mg); 8. *Phaeodactylum tricornutum*

2.2 *Chlorella* sp. NMX37N 的形态与系统进化

Chlorella sp. NMX37N 为单细胞, 有时数个细

胞聚集在一起, 细胞球形, 色素体一个; 具一个明显蛋白核; 细胞直径 $4-6\ \mu\text{m}$ 。18S rDNA 序列分析表明 *Chlorella* sp. NMX37N 的 18S rDNA 基因序列与 *Chlorella* sp. NDem 9/21 T-13d (AY197628) 最为接近, 仅有一个碱基替换; 与来自南极的一种小球藻 *Chlorella* sp. NJ-18 (DQ377324) 也只有两个碱基替换。不同系统分析方法得到拓扑结构一致的系统树, *Chlorella* sp. NMX37N 与四种真正的小球藻出现在同一支系, 这进一步确证他们之间存在很近的亲缘关系(图 2)。

2.3 *Chlorella* sp. NMX37N 的温度与光强适应性

图 3 A 显示在不同温度下 *Chlorella* sp. NMX37N 的生长情况。在 $15-35^\circ\text{C}$ 范围内该藻均能生长, 其中 25°C 时生长最快, 比生长速率达到了 $0.53/\text{d}$, 20°C 与 30°C 下的比生长速率与之相当, 分别为 $0.51/\text{d}$ 和 $0.52/\text{d}$, 15°C 和 35°C 下的比生长速率均为 $0.41/\text{d}$, 而 40°C 时该小球藻不能生长。取对数生长的 *Chlorella* sp. NMX37N 测定 5 个梯度光强下其光合放氧的速率。结果显示, 该藻在 $100-250\ \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强下光合放氧速率呈增长趋势, $250\ \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 下达到最大, 然后随光强增加而缓慢下降, 但在光强为 $2000\ \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时其光合放氧速率仍然达到 $300\ \mu\text{mol O}_2\cdot\text{mg}/(\text{Chl}\cdot\text{h})$ (图 3B)。可见, 该株小球藻有较高的温度与光强适应性。

2.4 *Chlorella* sp. NMX37N 油脂积累与氮浓度的关系

将 *Chlorella* sp. NMX37N 接种到 1.5 L 1/5 NaNO_3 的 BG11 培养基中, 收集不同生长时期的藻细胞提取油脂, 用薄层层析的方法分析其油脂积累规律, 同时测定培养液中 NO_3^- 浓度的变化与细胞密度(图 4)。结果显示, 在培养第 4 天仅能检测到少量的三酰基甘油的积累, 培养的第 10 天细胞内积累的油脂开始明显增加, 至第 17 天达到最大值, 并在随后趋于稳定。通过检测培养基中的 NO_3^- 浓度的变化可以看出, 自第 17 天后, 培养液中 NO_3^- 基本被消耗殆尽, 而此后藻细胞的生长变得缓慢, 处于生长的稳定期。可见, 在培养液中的氮被消耗后, 藻细胞开始大量积累中性脂。

研究表明, 通常在对数生长后期藻细胞可开始积累油脂, 至稳定期积累的油脂可达到最大值^[15, 16]。我们的结果与此相似, 细胞内油脂的积累随培养时间的延长而增加, 至稳定期达到最大值, 而此时培

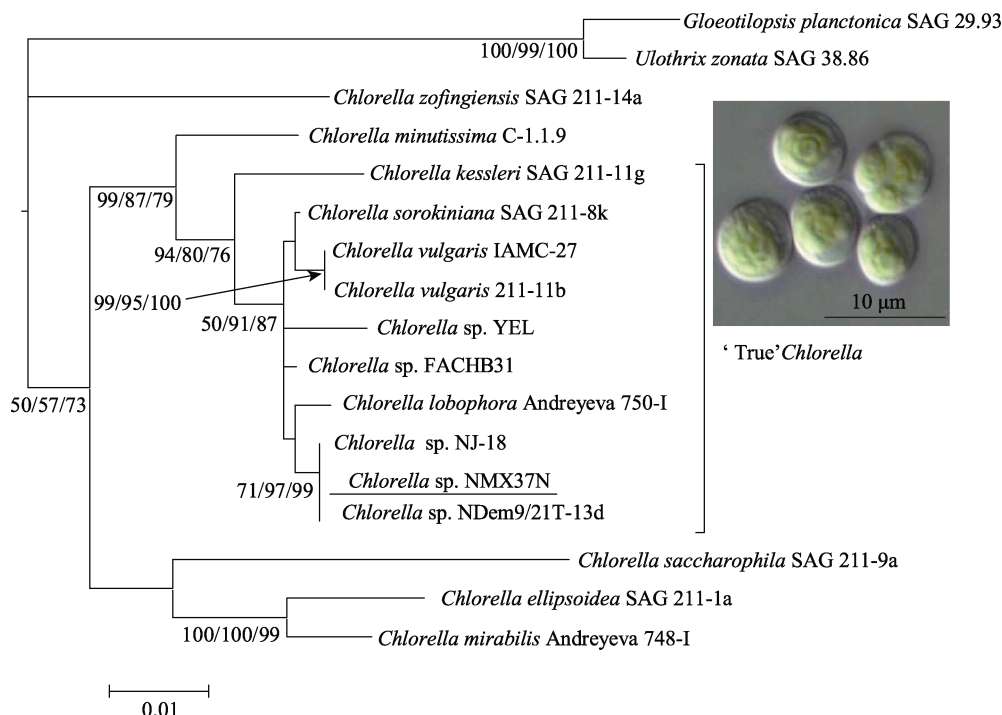


图 2 基于 18S rDNA 基因序列构建的小球藻属最大相似树(照片所示为 *Chlorella* sp. NMX37N 的光学显微镜照片)

Fig. 2 Maximum-likelihood tree of *Chlorella* species *Sensu lato* inferred from 18S rDNA gene sequences (Inset: light microscopic image of *Chlorella* sp. NMX37N)

内部节点上显示的自举支持率分别由邻接树(1000 次重复)、最大简约树(1000 次重复)与最大相似树(100 次重复)产生, 节点上的支持率必须要两个以上大于 50 才有效。分支的长度代表进化的距离, 用 0.01 的标尺显示

Bootstrap values are shown at the internal nodes for neighbor joining (1000 replications), maximum parsimony (1000 replications) and maximum likelihood (100 replications), respectively, if the node is supported by at least two bootstrap values of 50% or above. Branch lengths correspond to evolutionary distances. A distance of 0.01 is indicated by the scale

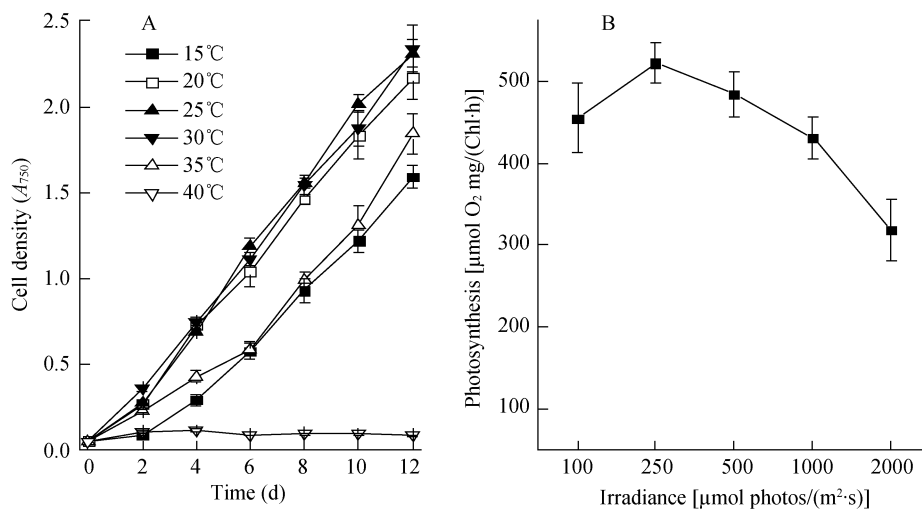


图 3 *Chlorella* sp. NMX37N 的温度(A)和光强适应性(B)

Fig. 3 Temperature (A) and irradiance (B) tolerance of *Chlorella* sp. NMX37N

养液中的氮则基本被耗尽, 这也暗示氮缺乏可促使胞内油脂含量的增加。这一结论与在其他小球藻中的研究结果相同^[7, 8], 培养液中缺乏了细胞合成蛋白质所必须的氮元素, 光合作用同化的碳流将用于

脂肪和碳水化合物的合成。

2.5 *Chlorella* sp. NMX37N 的总脂含量分析

图 5 比较了两种不同的培养方式下 *Chlorella* sp. NMX37N 的生物量及总脂含量。在批量培养条件下,

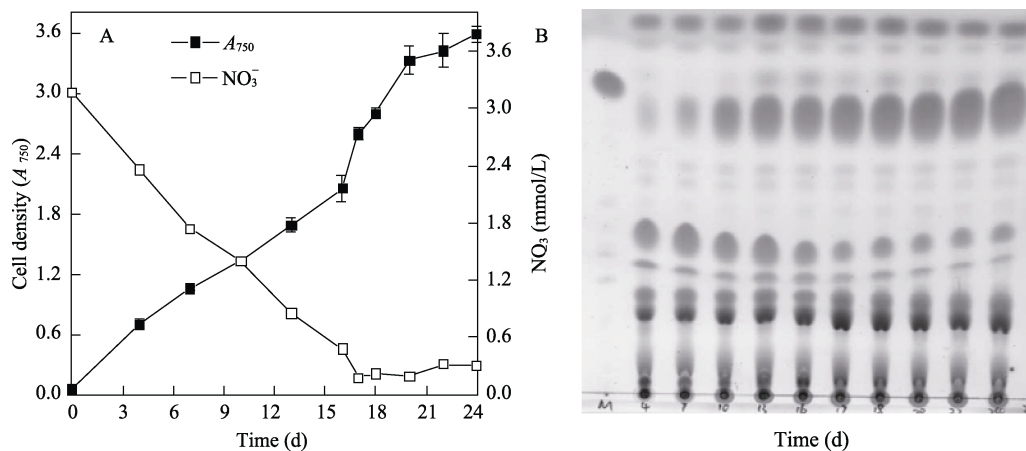


图 4 不同生长时期所对应的培养液 NO_3^- 浓度、*Chlorella* sp. NMX37N 细胞密度(A)及油脂含量(B)

Fig. 4 NO_3^- concentrations in medium, cell density (A) and oil content (B) of *Chlorella* sp. NMX37N cultured at different growth phase
S. 三油酸甘油标准品 Triolein(0.02mg)

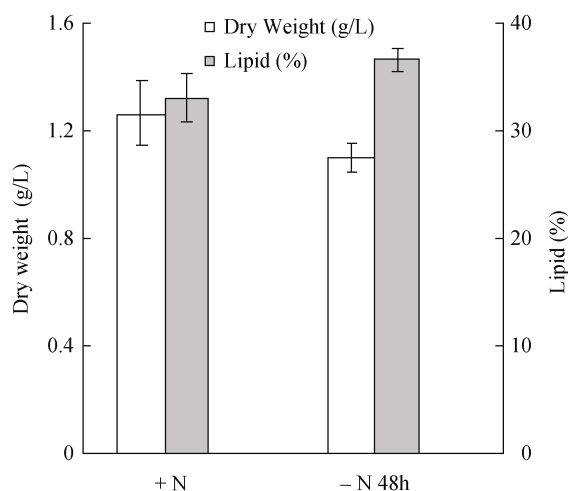


图 5 *Chlorella* sp. NMX37N 在有氮 (+N) 和缺氮 (-N) 培养下收获的干藻粉量及总脂含量

Fig. 5 The dry biomass and total lipid contents of *Chlorella* sp. NMX37N cultured under nitrogen-replete (+N) or -deplete (-N) conditions

BG11 培养的藻细胞培养至稳定期(约 40d)后, 总脂含量达到为 33%, 干生物量为 1.3 g/L。将藻细胞接种至含 1/5 NaNO_3 的 BG11 培养基中培养至对数后期(约 20d)后, 缺氮处理 48h, 收获的干生物量 (1.1 g/L) 略低于批量培养条件 (1.3 g/L), 但总脂含量则更高, 为 36%。因而, 批量培养和两步培养得到的油脂产率相当, 为 0.43 g/L 左右, 但后一种方式可以明显缩短培养时间, 且使用的氮源更少, 在实际生产中可以节约培养成本。

通过实验室的培养, 我们可以看出培养基中的起始氮浓度与藻细胞油脂积累的效率显著相关, 确定合适的起始氮浓度, 采用合理的培养方式, 将可以大大缩短培养时间, 促进藻细胞快速有效积累油

脂。对本研究采用的藻种而言, 适当降低培养液中起始的氮浓度可以在不影响生物量的同时, 明显加快藻细胞中油脂的积累。因而, 在大规模培养中, 如何确定合适的氮浓度是需要慎重考虑的因素之一。

2.6 *Chlorella* sp. NMX37N 的脂肪酸组成

将培养至稳定期的 *Chlorella* sp. NMX37N 藻细胞收集提取总脂并分离得到三酰基甘油利用气相色谱分析其脂肪酸组成(表 1)。结果显示, 无论是总脂还是三酰基甘油中, 脂肪酸以 C16:0 和 C18:2 为主, 两者之和占总脂肪酸的 70%以上。饱和和单一不饱和脂肪酸总含量约为 45%左右, 不含有 C20 以上的长链脂肪酸。

表 1 *Chlorella* sp. NMX37N 藻细胞总脂及三酰基甘油中脂肪酸组成与含量(摩尔百分比)

Tab. 1 Fatty acid composition (mol %) in total lipids and triacylglycerol of *Chlorella* sp. NMX37N

脂肪酸 Fatty acids	总脂 Total lipids	三酰基甘油 Triacylglycerol
C14:0	1.3 ± 0.05	1.6 ± 0.12
C14:1	0.21 ± 0.01	0.24 ± 0.01
C16:0	31.05 ± 1.23	30.66 ± 0.71
C16:1	0.4 ± 0.01	0.43 ± 0
C18:0	1.87 ± 0.04	1.74 ± 0.07
C18:1	13.83 ± 0.42	11.92 ± 0.14
C18:2	40.22 ± 1.2	40.08 ± 0.48
γ -C18:3	0.13 ± 0.08	0.12 ± 0.05
α -C18:3	10.98 ± 0.63	13.15 ± 0.02

大多数产油微藻的油脂组成与油料植物相似, 脂肪酸以 C16 和 C18 为主^[17, 18], 且多为饱和和单一不饱和脂肪酸, 小球藻也不例外^[19]。在本研究中筛选

到的 *Chlorella* sp. NMX37N 的总脂和三酰基甘油中脂肪酸组成基本相似, 主要是 C16 和 C18, 占总脂肪酸的 98% 以上, 符合作为生产生物柴油原料的条件。

参考文献:

- [1] Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol [J]. *Trends Biotechnology*, 2008, **26**(3): 126—131
- [2] Hu Q, Smmerfeld M, Jarvis E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances [J]. *The Plant Journal*, 2008, **54**(4): 621—639
- [3] Huang G, Chen F, Wei D, et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology [J]. *Applied Energy*, 2010, **87**(1): 38—46
- [4] Hoek C V, Mann D G, Jahns H M. *Algae: an Introduction to Phycology* [M]. Cambridge University Press. 1995, 623
- [5] Huss V A R, Frank C, Hartmann E C, et al. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (*Chlorophyta*) [J]. *Journal of Phycology*, 1999, **35**(3): 587—598
- [6] Teresa M M, Antonio A M, Nidia S C. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, **14**(1): 217—232
- [7] Converti A, Casazza A A, Ortiz E Y, 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*, 2009, **48**(6): 1146—1151
- [8] Hsieh C H, Wu W T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation [J]. *Bioresource Technology*, 2009, **100**(17): 3921—3926
- [9] Stanier R Y, Kunisawar M M, Mandel M, et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales) [J]. *Bacteriological Reviews*, 1971, **35**(2): 171—205
- [10] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of lipid extraction and purification [J]. *Canadian Journal Biochemistry and Physiology*, 1959, **37**(8): 911—917
- [11] Reiser S, Somerville C. Isolation of mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* deficient in wax ester synthesis and complementation of one mutation with a gene encoding a fatty acyl-coenzyme A reductase [J]. *Journal Bacteriology*, 1997, **179**(9): 2969—2975
- [12] Yu E T, Zendejas F J, Lane D P, et al. Triacylglycerol accumulation and profiling in the model diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) during starvation [J]. *Journal Applied Phycology*, 2009, **21**(6): 669—681
- [13] Shestakov S V, Anbudurai P R, Stanbekova G E, et al. Molecular cloning and characterization of the *ctpA* gene encoding a carboxyl-terminal processing protease. Analysis of a spontaneous photosystem II-deficient mutant strain of the *Cyanobacterium Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *Journal Biology Chemistry*, 1994, **269**(30): 19354—19359
- [14] Collos Y, Mornet F, Sciandra A, et al. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures [J]. *Journal Applied Phycology*, 1999, **11**(2): 179—184
- [15] Bigogno C, Khozin G 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
- [16] Boussiba S, Vonshak A, Cohen Z, et al. Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina* [J]. *Biomass*, 1987, **12**(1): 37—47
- [17] Ohlrogge J, Browse J. Lipid biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 1995, **7**: 957—970
- [18] Li X B, Xu X D, Kong R Q. Studies on the production of oil and polyunsaturated fatty acids in five species of *Nannochloropsis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(5): 893—897 [李秀波, 徐旭东, 孔任秋. 五种微绿球藻产油和产多不饱和脂肪酸的研究. 水生生物学报, 2010, **34**(5): 893—897]
- [19] Liu J, Huang J C, Sun Z, et al. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production [J]. *Bioresource Technology*, 2011, **102**(1): 106—110

SCREENING AND LIPID ANALYSES OF HIGH OLEAGINOUS *CHLORELLA* SPECIES

XU Jin^{1,2}, XU Xu-Dong¹, FANG Xian-Tao¹ and HU Han-Hua¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *Chlorella* species which have strong adaptability distributes widely in various habitats, especially in the freshwater. Their assimilation product is mainly starch, but environmental stress can trigger lipid accumulation within the cells. The predominant fatty acids are C16 and C18 in *Chlorella* species, which are suitable feedstocks for biodiesel production. A number of *Chlorella* strains were isolated from fresh water of China, and their triacylglycerol contents were analyzed by thin layer chromatography. Out of 21 oleaginous *Chlorella* strains, a high oleaginous strain, NMX37N, was identified. It grew at temperatures from 15 to 35°C but not at 40°C, and the optimum conditions, at 25°C and 250 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$, it grew with a specific growth rate of 0.53/d. Batch culture experiments showed that the content of triacylglycerols in *Chlorella* sp. NMX37N increased with time and reached to the highest at the late stationary phase when the nitrate was exhausted. The total lipid content was 33% of dry cell weight when *Chlorella* sp. NMX37N grew under batch culture conditions for 40d. A two-step culture method, namely, transfer to the nitrogen deficiency condition at the late exponential phase (about 20d), gave a higher total lipid (36%) compared with the batch culture method. The main fatty acids (70%) in total lipids and triacylglycerols of *Chlorella* sp. NMX37N were C16 : 0 and C18 : 2. In addition, there were no long-chain fatty acids, such as C20, in *Chlorella* sp. NMX37N. The results indicated that the triacylglycerols in *Chlorella* sp. NMX37N may serve as excellent feedstocks for biodiesel production.

Key words: *Chlorella*; Triacylglycerols; Fatty acids; Biodiesel