

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.01027

不同氮源对异养小球藻生物量和油脂积累的影响

朱义平 宋东辉 杨国兰

(天津科技大学海洋科学与工程学院, 天津市海洋资源与化学重点实验室, 天津 300457)

摘要: 小球藻因其快速生长和易培养等特性可用于制备生物能源。与传统的光自养相比, 异养小球藻可获得更多的生物量和更高的油脂含量。低成本的马铃薯淀粉水解液可作为小球藻的理想碳源, 在氮饥饿条件下可诱导产生更多的油脂。为了探讨不同氮源对异养小球藻生物量和油脂积累的影响, 并筛选出异养条件下的最适氮源, 实验研究了不同浓度无机氮源 NaNO_3 以及有机氮源丙氨酸和酪氨酸对异养小球藻生物量和油脂积累的影响。以马铃薯淀粉水解液为唯一碳源, 在 SE 培养基中分别添加不同氮源培养小球藻。设定的 NaNO_3 和丙氨酸浓度均为 1.5 mmol/L、3.0 mmol/L、6.0 mmol/L, 酪氨酸浓度为 0.75 mmol/L、1.5 mmol/L 和 3.0 mmol/L。所有小球藻培养实验均为暗培养并持续 10 d 时间。实验过程测定的指标为: 小球藻的细胞数目、比生长速率、叶绿素含量、中性脂含量和总脂含量。实验结果表明: (1) 在异养条件下以硝酸盐为无机氮源时, 氮源促进叶绿素积累从而促进小球藻的生长, 减少硝态氮可以使小球藻快速进入稳定期积累油脂。在 NaNO_3 中氮含量为 1.5 mmol/L 时, 生物量和油脂含量分别为 2.65 g/L 和 51.21%, 总油脂含量为 1.36 g/L。(2) 在不添加其他氮源的异养培养基中, 丙氨酸可促进小球藻的生物量增加, 在稳定期仍促进单位细胞的叶绿素含量, 但总油脂含量普遍偏低。(3) 酪氨酸可抑制小球藻生物量增加, 使细胞膨大从而促进单位细胞内叶绿素和油脂合成, 油脂含量高达 38.78%—47.02%。这些结果表明小球藻可通过诱导氨基酸转运系统适应氮源的变化, 其中酪氨酸所在的第三个转运系统在葡萄糖诱导条件下可促进油脂的合成。

关键词: 小球藻; 异养; 氮源; 丙氨酸; 酪氨酸

中图分类号: Q142 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)06-1027-08

近年来, 有很多学者对利用微藻制备生物柴油的可行性进行研究, 并取得了一定的成效, 但成本居高不下, 限制了其工业化生产。降低培养藻类成本最重要的就是降低培养基的成本。培养基成本占异养培养成本的 50%, 而常用有机碳葡萄糖却占整个培养基成本的 80%^[1], 因此采用廉价的原料如淀粉和纤维素水解液取代葡萄糖是一种很好的策略。减少氮源可以降低成本, 同时能促进小球藻油脂的积累, 但减氮会一定程度减少生物量, 利用有机碳作碳源能有效增加生物量克服这一缺陷。Lu, *et al.*^[2] 采用木薯淀粉水解产物代替葡萄糖作为异养小球藻的有机碳源, 能够达到较高的产油量。常用的氮源是硝酸盐, 如果能研究廉价的氮源也可以降低成本,

Shen, *et al.*^[3] 在异养条件下采用尿素、酵母提取液、硝酸盐做氮源, 发现采用绿色藻种在含 2.4 g/L KNO_3 的 MB 培养基中油脂含积累最多为 654 mg/L/d。而 Xiong, *et al.*^[4] 在异养条件下采用甘氨酸、酵母提取液、硝酸钾做氮源, 结果是 4 g/L 酵母提取液作为最佳氮源最高油脂含量为 8.28 g/L。但是酵母提取液成分复杂, 含有各种氨基酸、维生素和生长因子, 很难解释促进油脂积累的机理。如果能研究具体何种氨基酸促进了油脂的积累, 就能选择更合适的氮源。故本实验研究了马铃薯淀粉水解液作碳源异养培养小球藻时, 不同浓度无机氮源硝酸盐和有机氮源丙氨酸及酪氨酸对小球藻生物量和油脂积累的影响, 旨在选出低成本异养条件下可能的最适氮源,

收稿日期: 2011-08-02; 修订日期: 2012-07-09

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术计划(08JCYBJC10600)资助

作者简介: 朱义平(1986—), 女, 山东莒南人; 硕士研究生; 主要从事微藻生物技术研究。E-mail: zhuyiping417@163.com

通讯作者: 宋东辉, 博士, 副教授; 主要从事微藻生物技术研究。E-mail: dhsong@tust.edu.cn

并探讨氨基酸对小球藻生长和油脂积累影响。

1 材料与方法

1.1 藻种和培养基

本实验所用藻种为普通小球藻(*Chlorella vulgaris* FACHB-7), 购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库。

培养基为改良的 SE 培养基^[5]: 0.75 g/L NaNO₃, 0.23 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.23 g/L K₂HPO₄, 0.53 g/L KH₂PO₄, 0.03 g/L NaCl, 0.01 g/L FeSO₄·6H₂O, 2.0 mL/L Fe-EDTA, 1.0 mL/L A₅ solution。

马铃薯淀粉水解液的主要制备方法^[2]: 先取马铃薯淀粉 20.0 g 按 1:4 比例与水混合, 调 pH 6.0—7.0, 然后 60℃ 加热, 并且混匀不断搅拌, 防止局部焦糊, 糊化 20 min, 然后加入 0.1%—0.2% 的 α-淀粉酶, 维持 30 min, 搅拌均匀。先将上述酶沸水加热 20 min 灭活, 用 HCl 调 pH 4.5—5.0, 加入 0.4% 的糖化酶, 搅拌均匀, 保持 60℃, 维持 1 h。取淀粉水解液 4000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 将上清液加热灭活酶后过滤。

1.2 实验设置

以改良的 SE 培养基为基础, 向实验组分别添加 1.5、3.0、6.0 mmol/L 的 NaNO₃; 以相同氮含量的丙氨酸和酪氨酸取代培养基中的 NaNO₃, 即 1.5、3.0、6.0 mmol/L 丙氨酸和 0.75、1.5、3.0 mmol/L 酪氨酸。在进行高压灭菌前, 将 pH 调到 6.0, 然后在 120℃ 下灭菌 20 min。在超净台上以 10% 的相同接种量(约 1.6×10^6 cell/mL)接种小球藻于 100 mL 培养液中, 添加灭菌过的淀粉水解液(终浓度 20 g/L)。在 (25 ± 1)℃、150 r/min 的条件下进行摇床暗培养。每实验组设三个平行样, 培养时间为 10 d。

1.3 小球藻的生长^[6]

小球藻的细胞数用血球计数板法在光学显微镜下观察测定。小球藻的比生长速率由以下生长公式计算: $\mu = (\ln N_t2 - \ln N_t1) / \Delta t$

其中: μ , 比生长速率; N_t2 , 在 t_2 天时的藻细胞生长浓度(cell/L); N_t1 , 在 t_1 天时的藻细胞生长浓度(cell/L)。Δ t , 小球藻细胞生长的倍增时间。本研究以小球藻在 10d(240 h) 内的倍增时间计, 即 Δ t = 10。

1.4 叶绿素抽提和测定

每 48 h 取 3.0 mL 藻液(稀释细胞密度约为 9.0×10^6 个/mL), 4000 r/min 离心 10 min 后弃上清液, 加甲醇 3.0 mL, 4℃ 提取过夜, 在 752 型紫外可见分

光光度计上, 分别读取 665 nm、652 nm 下的 OD 值, 按 Wellburn, *et al.* 方法计算叶绿素含量^[7]:

$$C(a+b)(\text{mg/L}) = 1.44A_{665} + 24.93A_{652}$$

1.5 中性脂的测定

中性脂测定采用尼罗红 (9-diethylamino-SH-benzo [a]phenoxazine-5-one) 活体染色法^[8-10]。主要方法为: 取 5.0 mL 藻液(稀释细胞密度约为 9.0×10^6 个/mL), 加入 250 mL DMSO, 加入 500 μL 的尼罗红溶液 (0.1 mg/mL 丙酮), 60℃ 水浴 1 min, 在 480 nm 激发波长和 580 nm 发射波长下读取荧光值, 再减去尼罗红和藻细胞在 580 nm 波长下的自发荧光值。

1.6 总脂含量的测定

采用乙醚-石油醚法^[11]提取小球藻细胞总脂。取 0.3 g 充分研磨的藻粉, 加入 3.0 mL 无水乙醚、石油醚(体积比为 1:2), 在 40℃ 条件下浸提。期间适当振荡混匀, 待提取结束后, 加入质量分数 10% 的氢氧化钾溶液沉淀小球藻细胞, 摇匀静置一段时间后, 将混合溶液在 4000 r/min 转速下离心 10 min, 收集上清液于已烘干恒重的离心管中, 于 60℃ 水浴中迅速蒸去多余的溶剂, 称量, 计算油脂含量。用以下公式计算总脂百分含量: 总脂百分含量 = (总脂/干藻重) × 100%

2 结果

2.1 氮源对小球藻生长的影响

用 NaNO₃ 作为氮源, 小球藻的生长情况呈现不同浓度间的差异(图 1)。利用含 6.0 mmol/L NaNO₃ 的培养基培养小球藻, 经过 240 h 培养后, 小球藻仍处于对数生长期; 而利用 NaNO₃ 浓度为 3.0 mmol/L 的培养基时, 240 h 时小球藻刚进入稳定期, 这说明硝态氮可以延长小球藻的生长分裂期。观察藻液, 肉眼直接观察出不同浓度间的差异。随着氮源浓度增加, 藻生长旺盛, 颜色碧绿, 随着藻体的生长而颜色加深, 并且很少沉底; 反之则颜色变黄。在实验的范围内 (1.5—6.0 mmol/L NaNO₃), 所有实验组的小球藻都能较快生长, 氮浓度越高, 生命活动越旺盛, 比生长速率越大(表 1), 说明氮的浓度还没有达到上限。

根据吸光度值分别计算叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 的值, 两项相加得到总叶绿素的含量, 以隔天的总叶绿素含量作图(图 2)。叶绿素增加趋势与生长曲线一致。3.0 mmol/L 和 6.0 mmol/L NaNO₃ 比较, 细胞个

数相差不多, 但是 6 mmol/L 的单位细胞内叶绿素含量明显增多(21.46 pg/cell), 可见增加硝态氮可促进单位细胞叶绿素增加(表 1)。综上, 增加硝态氮能促进细胞分裂延长对数期并促进单位细胞叶绿素积累从而促进小球藻的生长(图 1、表 1)。

用有机氮源丙氨酸做氮源时, 小球藻的生长情况与无机氮源 NaNO_3 的不同。实验组小球藻在 144h 都进入稳定期, 细胞数量基本不再增加(图 3)。丙氨酸浓度为 6.0 mmol/L 时, 小球藻生物量最大。随着有机氮源浓度的增加, 小球藻生物量增加, 比生长速率也增加(表 1), 这说明增加丙氨酸的浓度, 能促进小球藻的生长。

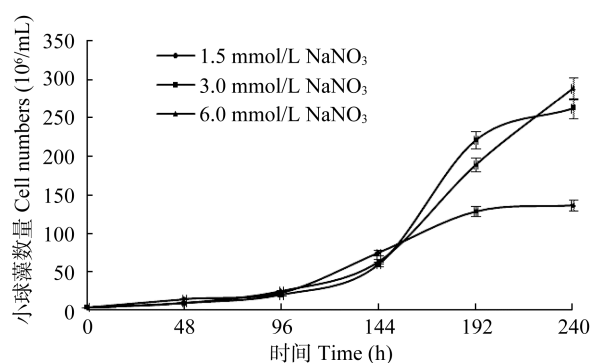


图 1 在不同浓度 NaNO_3 培养基中小球藻的生长情况

Fig. 1 Growth curves of *C. vulgaris* under different NaNO_3 concentrations

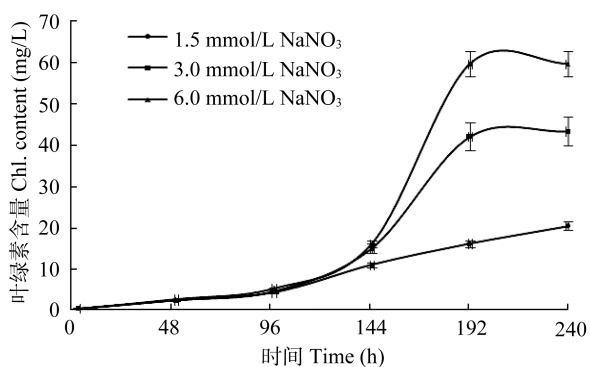


图 2 在不同浓度 NaNO_3 下小球藻的叶绿素积累情况

Fig. 2 Total chlorophyll contents of *C. vulgaris* under different NaNO_3 concentrations

根据隔天的总叶绿素含量作图(图 4), 叶绿素含量变化趋势与生长曲线趋势不一致, 虽然细胞生长 144 h, 进入稳定期 (图 3), 但是叶绿素含量仍在增加 (图 4)。稳定期细胞数目增加趋势减缓, 但叶绿素总量在增加, 这说明丙氨酸在稳定期促进单位细胞的叶绿素含量。

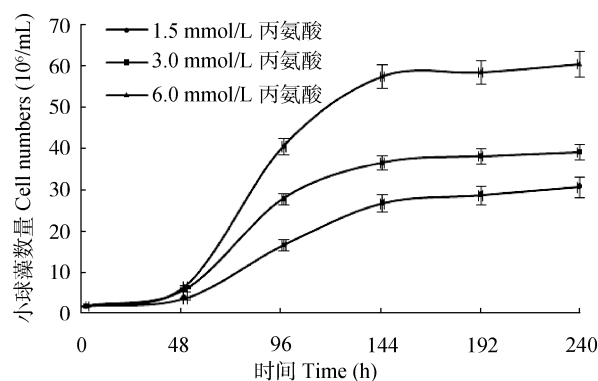


图 3 在不同浓度丙氨酸下小球藻的生长情况

Fig. 3 Growth curves of *C. vulgaris* under different alanine concentrations

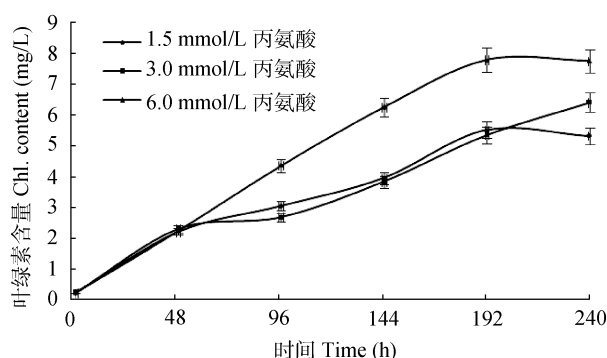


图 4 在不同浓度丙氨酸下小球藻的叶绿素积累

Fig. 4 Total chlorophyll contents of *C. vulgaris* under different alanine concentrations

在酪氨酸作氮源情况下, 小球藻生长趋势与 NaNO_3 和丙氨酸作为氮源都不同。随着酪氨酸浓度的增加, 反而抑制了小球藻的细胞数增加, 最高值出现在 0.75 mmol/L 浓度下的 144 h, 而酪氨酸 3.0 mmol/L 条件下小球藻生长相对缓慢(图 5)。

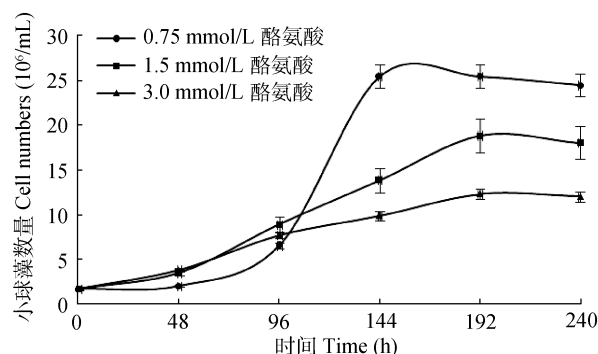


图 5 在不同浓度酪氨酸下小球藻的生长情况

Fig. 5 Growth curves of *C. vulgaris* under different tyrosine concentrations

表 1 不同条件下小球藻比生长速率和单位细胞叶绿素含量变化
Tab. 1 Growth rates and chlorophyll contents of *C. vulgaris* under different nutrient levels

氮源 Nitrogen sources	1.5 mmol/L NaNO ₃	3.0 mmol/L NaNO ₃	6.0 mmol/L NaNO ₃	1.5 mmol/L alanine	3.0 mmol/L alanine	6.0 mmol/L alanine	0.75 mmol/L tyrosine	1.5 mmol/L tyrosine	3.0 mmol/L tyrosine
比生长速率 Special growth rates	0.74	0.85	0.86	0.49	0.52	0.59	0.46	0.40	0.34
单位细胞叶绿素含 量 Chlorophyll content, pg/cell	15.10	16.68	21.46	13.21	16.88	16.72	12.33	15.62	29.89

但是随氮源浓度增加, 叶绿素的浓度先减少后增加, 当酪氨酸氮为 1.5 mmol/L, 叶绿素浓度最低至 2.57 mg/L; 3.0 mmol/L 时, 叶绿素浓度最高, 达到 4.28 mg/L(图 6)。而单位细胞叶绿素含量的变化却不一致, 虽然叶绿素浓度最高出现在酪氨酸氮浓度为 3.0 mmol/L 时, 但单位细胞叶绿素浓度最低 12.33 pg/cell 则出现在酪氨酸氮含量为 0.75 mmol/L 时(表 1)。

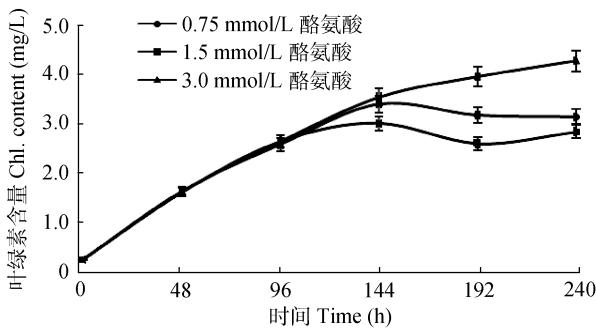


图 6 不同浓度酪氨酸下小球藻的叶绿素积累

Fig. 6 Total chlorophyll contents of *C. vulgaris* under different tyrosine concentrations

在三种氮源培养条件下, 小球藻生长的比生长速率和单位细胞叶绿素含量明显不同(表 1)。当小球藻利用硝态氮, 其比生长速率很高, 在 0.74—0.86, 且随着氮源浓度增加, 比生长速率增加, 单位细胞内叶绿素含量增加。这进一步说明增加硝态氮可提高生长速率, 促进叶绿素积累。当小球藻利用丙氨酸作氮源, 其比生长速率明显低于硝态氮的, 单位细胞叶绿素含量较高。酪氨酸作氮源, 比生长速率普遍偏低, 随氮源浓度增加, 比生长速率降低, 进一步验证了酪氨酸可抑制细胞分裂, 促进单位细胞内叶绿素含量增加。

2.2 氮源对油脂含量的影响

藻细胞经尼罗红染色后的荧光强度与细胞内油脂含量显著相关, 所以尼罗红染色荧光强度反映了

中性油脂的含量高低。我们的实验表明, NaNO₃ 是促进小球藻生长和积累油脂的较好氮源(图 7)。在 NaNO₃ 中氮含量为 1.5 mmol/L 时, 生物量仅为 2.65 g/L。经乙醚-石油醚法提取藻细胞所得上清总脂部分呈现透明亮黄色, 且未观察到混有其他色素杂质, 油脂含量高达 51.21%, 总油脂含量为 1.36 g/L(表 2), 乙醚-石油醚提取总脂经尼罗红染色反应也表明, 其单位体积荧光强度 9.55×10^3 a.u. 和相对荧光强度 7.07 a.u. 都远远高于其他实验组(图 7), 说明单位体积藻液油脂和单细胞油脂含量都最高。在 NaNO₃ 浓度为 6.0 mmol/L 时, 虽然生物量为 4.94 g/L 最高, 但是由于油脂含量低仅为 13.65%, 导致总油脂含量较低(表 2)。所以 NaNO₃ 作为无机氮源时, 随着氮源浓度增加, 虽然藻干重增加, 但单位细胞内油脂和总脂含量却呈下降趋势。

利用丙氨酸作有机氮源时, 藻干重和油脂含量都较低, 导致总油脂含量普遍偏低, 只有 0.10—0.14 g/L, 而在相同氮含量下, NaNO₃ 培养出小球藻油脂总量的是丙氨酸的 7—10 倍(表 2)。在丙氨酸浓度为 1.5 mmol/L 时, 相对荧光强度 2.73 a.u. 和油脂含量(30.78%)都是较高, 而随着丙氨酸氮源浓度增加到 3.0 mmol/L 和 6.0 mmol/L, 细胞干重增加到 0.46 g/L 和 0.50 g/L, 相对荧光强度分别下降至 1.25 a.u. 和 0.10 a.u., 油脂含量下降到 28.72% 和 19.50%(表 2、图 7), 说明较低浓度丙氨酸能促进小球藻积累油脂。

利用酪氨酸作氮源时, 随着氮浓度的增加, 细胞干重下降, 总脂含量下降, 但是单位细胞内油脂含量很高。氮浓度从 1.5 mmol/L 到 6.0 mmol/L, 细胞干重下降到 0.23 g/L, 而相对荧光强度一直高达 2.42—2.86 a.u., 其相对荧光强度跟 3.0 mmol/L NaNO₃(2.82 a.u.) 和 1.5 mmol/L 丙氨酸(2.73 a.u.) 时的基本一致(图 7), 其油脂含量保持在 38.78%—47.02%(表 2)。这表明用酪氨酸作有机氮源时, 都促

表 2 不同氮源对小球藻生物量和油脂含量的影响
Tab. 2 Effects of different nitrogen sources on biomass accumulation and lipid content of *C. vulgaris*

氮源 Nitrogen source	干重 Dry cell weight(g/L)	油脂含量 Lipid content(%)	油脂 Lipid weight(g/L)
1.5 mmol/L NaNO ₃	2.65	51.21	1.36
3.0 mmol/L NaNO ₃	4.56	27.67	1.26
6.0 mmol/L NaNO ₃	4.94	13.65	0.67
1.5 mmol/L 丙氨酸	0.44	30.78	0.14
3.0 mmol/L 丙氨酸	0.46	28.72	0.14
6.0 mmol/L 丙氨酸	0.50	19.50	0.10
0.75mmol/L 酪氨酸	0.25	47.02	0.12
1.5 mmol/L 酪氨酸	0.23	46.42	0.11
3.0 mmol/L 酪氨酸	0.23	38.78	0.09

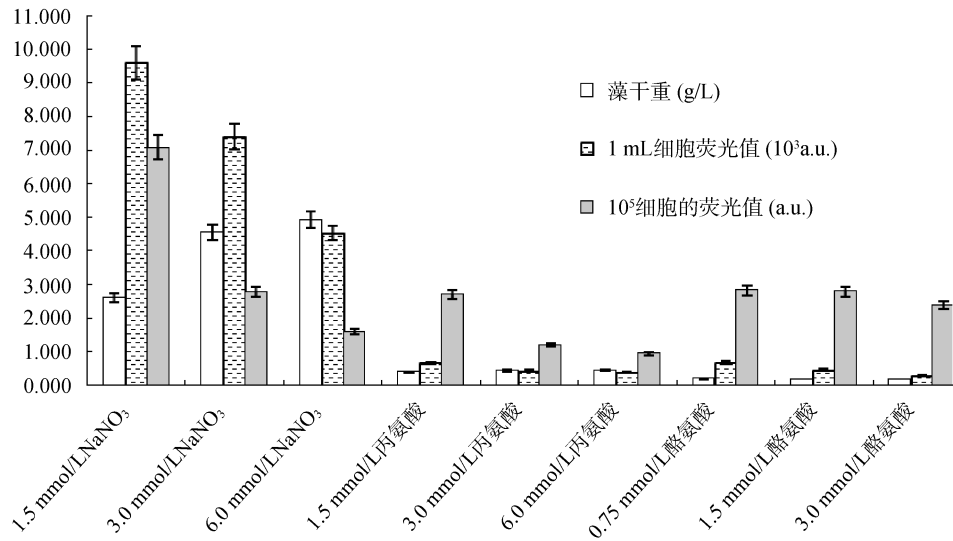


图 7 不同氮源对小球藻生物量和尼罗红染色荧光强度的影响

Fig. 7 Effects of different nitrogen sources on biomass accumulation and fluorescence intensity of *C. vulgaris* cells

进单位细胞油脂积累。但由于酪氨酸抑制了藻细胞数量增长致使其干重仅为 0.23—0.25 g/L，所以总脂积累受到一定限制，甚至还不如丙氨酸总脂积累情况。经显微镜观察，发现酪氨酸培养的藻细胞膨大，明显大于另外两种氮源培养的藻细胞(图 8)。这可能由于母体细胞的细胞壁的弹性和厚度增加，不断膨胀，子细胞分裂后无法冲破母体细胞壁，不能脱离母体所致^[12]。

3 讨论

研究表明，很多胁迫条件能明显影响藻的生长和油脂积累，许多藻在胁迫条件下显著增加了油脂的积累，油脂含量可占总干重的 30%—60%。其中降低氮源含量是一种比较经济和容易操作的方法^[13, 14]。

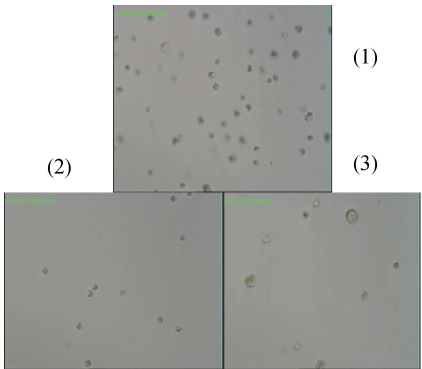


图 8 不同氮源培养下的小球藻普通光学显微照片(×400)
Fig. 8 Optical microscope photographs of *C. vulgaris* under different nitrogen sources (×400)
(1)氮源为 NaNO₃(2)氮源为丙氨酸(3)氮源为酪氨酸
(1) NaNO₃ as the nitrogen source (2) alanine as the nitrogen source (3) tyrosine as the nitrogen source

本实验研究表明,在异养条件下,硝酸盐是较好的氮源,降低氮源浓度能有效促进总脂含量增加:在 NaNO_3 中氮含量为 1.5 mmol/L 时,生物量为 2.65 g/L ,经乙醚石油醚提取所得油脂含量高达 51.21% (表2)。据研究,蛋白小球藻(*C. protothecoides*)和普通小球藻(*C. vulgaris*),在异养条件下比自养条件下积累更多的油脂,实际上,这是由于在异养条件下提供了自养条件远远不能达到的碳氮比。此外,低温^[17]、光胁迫^[15, 16]、高盐^[15]、高铁^[9],已被证实可以抑制藻细胞生长但可促进细胞油脂积累。

一般说来,异养条件明显缩短了培养周期,虽然自养生长模式利用低成本的无机盐和光照生长,但是生长周期缓慢是限制其发展的主要障碍。Liu, *et al.*^[9]采用高铁方法培养海水小球藻 25 d 才达到 56.6% 的油脂含量。本实验采用淀粉水解液异养培养模式促使小球藻积累油脂,大大缩短了培养周期,仅为 10 d 。同是异养培养小球藻, Qiao, *et al.*^[18]所得小球藻油脂仅为 23.7% , Liang, *et al.*^[19]所得小球藻生物量为 2 g/L ,油脂含量为 54 mg/L/d 。而本实验低成本的异养培养小球藻,获得生物量为 2.65 g/L ,油脂含量为 51.21% ,均高于上述文献报道的数值。

Lu, *et al.*^[12]也研究过利用木薯淀粉水解液异养培养蛋白小球藻(*Chlorella protothecoides*),最高生物量和油脂含量分别为 $(4.26\pm 0.18)\text{ g/L}$ 和 $(2.14\pm 0.11)\text{ g/L}$ 。本实验利用更低成本的马铃薯淀粉水解液培养普通小球藻,获得最高生物量和油脂含量分别为 2.65 g/L 和 1.36 g/L ,相比之下普通小球藻油脂含量较少,这可能是由于马铃薯淀粉水解液成分以及不同氨基酸代谢途径有异,也可能跟小球藻品种有关,致使油脂代谢途径的调控有别与上述结果,还需进一步开展优化培养试验以提高生物量及油脂含量。

尼罗红是一种脂溶性的荧光控针,具有可进行活体原位测定的特性,曾被用于脂的测定。自 Greenspan, *et al.*^[20]提出用尼罗红荧光法测定细胞内油脂含量以来,先后在多种生物如浮游动物^[21]和微藻^[22]中证明尼罗红染色后细胞荧光强度与细胞内油脂含量显著相关^[9, 20]。本实验采用尼罗红对小球藻细胞的中性脂进行相对定量分析表明,该方法确实具有检测灵敏、快速,成本低等优点,染色后的荧光强度可直接反映小球藻细胞内油脂含量高低。

有研究表明,葡萄糖可诱导出两个氨基酸转运

系统^[23-25],一个是专一转运碱性氨基酸,称为赖氨酸系统。另一个专一转运短链中性氨基酸,称为脯氨酸系统,许多研究采用甘氨酸作氮源,正是由于甘氨酸是结构最简单的氨基酸,且能被脯氨酸系统转运利用。丙氨酸是结构上仅次于甘氨酸的简单氨基酸,也属于脯氨酸系统转运的氨基酸之一,但是它作氮源促进油脂积累的效果并不如甘氨酸作氮源的促进效果^[2]。本研究表明丙氨酸能有效促进单位细胞内叶绿素含量,同样对油脂积累促进效果不明显,这可能是由于脯氨酸转运系统与脂类代谢途径受不同代谢机制调控所致。此外还有研究表明,在葡萄糖诱导过程中若有无机氮源共同作用时可诱导出第三个氨基酸转运系统^[26],该系统有较广泛的转运活性,至少能催化 10 种氨基酸的转运。在本研究中酪氨酸就属于第三个氨基酸转运系统。酪氨酸是芳香族氨基酸,结构相对复杂,且难溶于水,前人相关研究很少^[26]。我们的实验研究表明,在培养较长时间且没有无机氮源存在时,葡萄糖也能诱导出对酪氨酸的转运,在微酸条件下溶解酪氨酸作氮源培养小球藻,可促使藻细胞体积发生膨大,促进单位细胞油脂的积累。这表明酪氨酸所在的第三个氨基酸转运系统在葡萄糖诱导条件下可促进油脂的合成,这是不同于上述两种氨基酸转运系统的更为复杂的诱导机制。

参考文献:

- [1] Li X F, Xu H, Wu Q Y. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, **98**(4): 764—771
- [2] Lu Y, Zhai Y, Liu M S, *et al.* Biodiesel production from algal oil using cassava (*Manihot esculenta* Crantz) as feedstock [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2010, **22**(5): 573—578
- [3] Shen Y, Yuan W, Pei Z. Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, **160**(6): 1674—684
- [4] Xiong W, Li X F, Xiang J Y, *et al.* High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **78**(1): 29—36
- [5] Huang K. Study on methods and mechanism for removal nitrogen and phosphorus in waste water by algae. Thesis for Master of Science [D]. Nanchang University, Nanchang. 2007 [黄魁. 藻类去除污水中氮磷及其机理的研究. 硕士

学位论文, 南昌大学, 南昌. 2007]

- [6] Ye L C, Ye J A, Xu G Z, *et al.* Effects of nitrogen sources on growth of alga *Chlorella vulgaris* [J]. *Fisheries Science*, 2007, **26**(6): 319—322 [叶林超, 叶均安, 徐国忠, 等. 碳酸氢铵等不同氮源对小球藻生长的影响. 水产科学, 2007, **26**(6): 319—322]
- [7] Alan R W. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1994, **144**(3): 307—313
- [8] Chen W, Milton S, Hu Q. Microwave-assisted Nile red method for *in vivo* quantification of neutral lipids in microalgae [J]. *Bioresource Technology*, 2011, **102**: 135—141
- [9] Liu Z Y, Wang G C, Zhou B C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* [J]. *Bioresource Technology*, 2008, **99**(11): 4717—4722
- [10] Qiao H J, Wang G C, Zhang X J. Isolation and characterization of *Chlorella sorokiniana* GXNN01 (Chlorophyta) with the properties of heterotrophic and microaerobic growth [J]. *Journal of Phycology*, 2009, **45**(5): 1153—1162
- [11] Zhao W. Fatty acid metabolite regulation of *Porphyridium cruentum*. Thesis for Master of Science [D]. Fujian Normal University, Fuzhou. 2006 [赵薇. 紫球藻脂肪酸代谢调控. 硕士学位论文, 福建师范大学, 福州. 2006]
- [12] Wu Q Y. Fine cells structure and biochemical compositions of *Chlorella protothecoides* after transferring from autotrophic to heterotrophic metabolism [J]. *Journal of Nanjing University*, 1993, **29**(4): 622—630 [吴庆余. 自养小球藻转化为异养代谢生长后细胞的超微结构与相关生化组成. 南京大学学报, 1993, **29**(4): 622—630]
- [13] Illman A M, Scragg A H, Shales S W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, **27**(8): 631—635
- [14] 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
- [15] Svetlana V K, Irina M Y. Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance [J]. *Phytochemistry*, 2005, **66**(1): 73—79
- [16] 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]
- [17] Renaud S M, Thanh L V, Lambrinidis G, *et al.* Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures [J]. *Aquaculture*, 2002, **211**(1—4): 195—214
- [18] Qiao H J, Wang G C. Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* GXNN01 [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2009, **27**(4): 762—768
- [19] Liang Y N, Nicolas S, Cui Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions [J]. *Biotechnology Letters*, 2009, **31**(7): 1043—1049
- [20] Greenspan P, Mayer E P, Fowler S D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1985, **100**(3): 965—973
- [21] Alonzo F, Mayzaud P. Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red [J]. *Marine Chemistry*, 1999, **67**(3-4): 289—301
- [22] Elsey D, Jameson D, Raleigh B, *et al.* Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, **68**(3): 639—642
- [23] Cho B H, Sauer N, Komor E, *et al.* Glucose induced two amino acid transport systems in *Chlorella* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1981, **78**(6): 3591—3594
- [24] Cho B H, Komor E. Mechanism of proline uptake by *Chlorella vulgaris* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1983, **735**(3): 361—366
- [25] Cho B H, Komor E. Mechanism of arginine transport in *Chlorella* [J]. *Planta*, 1984, **162**(1): 23—29
- [26] Sauer N. A general amino-acid permease is inducible in *Chlorella vulgaris* [J]. *Planta*, 1984, **161**(5): 425—431

EFFECTS OF DIFFERENT NITROGEN SOURCES ON GROWTH AND LIPID ACCUMULATION OF A HETEROTROPHIC MICROALGAE-*CHLORELLA VULGARIS*

ZHU Yi-Ping, SONG Dong-Hui and YANG Guo-Lan

(Tianjin Key Lab of Marine Resource and Chemistry, College of Marine Science & Engineering,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: *Chlorella* strains have great potential as a resource for production of biofuels due to their relatively fast growth rate and easy cultivation. Heterotrophic cultivation of *Chlorella* has been developed due to higher biomass concentration and accumulation of much higher lipid content than classical photoautotrophic culture. Instead of using glucose, using low cost materials, such as starch or cellulose-hydrolyzed solution, is a good strategy to reduce the cost of culture medium and the cost of microalgae-based biofuels from heterotrophic fermentation of *Chlorella*. Potato starch is relatively cheap material in comparison with cornstarch or cassava starch, hence it could be an ideal carbon source for cultivating *Chlorella*. In a number of oil-producing microalgal species, *Chlorella* has the capacity of accumulating much higher proportion of fatty acids by nitrogen starvation. The objective of this study was to investigate the effects of various nitrogen resources on cell growth and lipid accumulation in heterotrophic *Chlorella vulgaris* using potato starch hydrolysate (PSH) as the sole carbon source. In order to illustrate the influence of various nitrogen sources on biomass and lipid content in *C. vulgaris*, the effects of these nitrogen source including inorganic and organic nitrogen source such as alanine or tyrosine on cell growth and lipid accumulation of *C. vulgaris* were examined. As the sole carbon source PSH was added to SE medium for algal cultivation prior to addition of all nitrogen sources. NaNO_3 and alanine were added to yield starting concentrations of 1.5 mmol/L, 3.0 mmol/L and 6.0 mmol/L, respectively. Tyrosine was added to yield starting concentrations of 0.75 mmol/L, 1.5 mmol/L and 3.0 mmol/L, respectively. Continuous cultivation of *C. vulgaris* was carried out under dark condition for 10 days. The cell number, special growth rate, cellular chlorophyll content, neutral lipid content and total lipid content of *C. vulgaris* under present cultural condition were determined throughout the entire experimental period. The results showed that: (1) Higher chlorophyll content and biomass production were observed with higher nitrate-nitrogen concentration, although low concentrations of nitrate-nitrogen can achieve high lipid accumulation in *C. vulgaris*. The highest biomass productivity was obtained at 1.5 mmol/L sodium nitrate, the biomass of 2.65 g/L, lipid concentration of 51.21% and the total lipid production of 1.36 g/L were achieved. (2) When alanine was used as the sole nitrogen source, it was also observed that the cell growth and total chlorophyll content increased but the lipid content reduced. (3) A low level of biomass production was observed while adding tyrosine as a nitrogen source; however, cell enlargement and high chlorophyll content were achieved under this condition, resulting in high lipid content of 38.78%—47.02%. Based on above results, it was concluded that the unicellular alga *C. vulgaris* was able to respond to nitrogen nutrient changes by inducing specific amino acid transport systems, and it seemed to have developed more specific mechanisms of amino-acid uptake and lipid production along with subtle regulatory phenomena such as induction by nitrogen starvation. Furthermore, tyrosine, as the part of the third uptake system induced by glucose transport system, can also enhance continually cellular lipid accumulation in *C. vulgaris*.

Key words: *Chlorella vulgaris*; Heterotrophic fermentation; Nitrogen source; Alanine; Tyrosine