

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00893

五种微绿球藻产油和产多不饱和脂肪酸的研究

李秀波^{1,2} 徐旭东¹ 孔任秋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: 从5种微绿球藻中鉴别出4个高产油藻种和1个产油量很低的藻种。4种高产油微绿球藻在平台期油脂含量最高, 占细胞干重的57%以上, 其中三酰基甘油的含量占细胞干重的32.4%—45.2%。分析5种微绿球藻细胞的脂肪酸组成及4种高产油藻三酰基甘油中的脂肪酸组成, 发现在高产油藻中, 总的饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸的比例达到95%以上, 多不饱和脂肪酸在5%以下, 而在产油量很低的微绿球藻中多不饱和脂肪酸比例达45%以上。高产油微绿球藻三酰基甘油的多不饱和脂肪酸含量在4%以下, 是生物柴油的优质原料, 而产油量低的微绿球藻可用于提取C20:5脂肪酸(EPA)。

关键词: 微绿球藻; 三酰基甘油; 脂肪酸

中图分类号: Q949.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)05-0893-05

能源危机是人类面临的共同问题之一。生物柴油作为一种清洁的可再生能源, 有可能部分替代化石柴油。目前, 生物柴油大多以植物来源的油脂作为原料。但是, 油料植物生产有占地面积大、生长周期长等缺点。相比之下, 产油微藻生长周期短, 单位面积产量高, 利于工业化生产。自从20世纪70年代, 美国、澳大利亚和日本等国就已展开利用微藻生产液体燃料的研究^[1]。目前利用微藻生产生物柴油的研究已得到全世界的广泛关注。不同微藻积累油脂的能力各不相同, 产油微藻含油量(占细胞干重)一般在20%—50%, 某些微藻的含油量甚至可以达到77%^[2-5]。许多产油微藻的油脂组成与油料植物相似, 脂肪酸组成以C16和C18为主^[6], 大多数为饱和或单不饱和脂肪酸, 也有一些微藻有较高的多不饱和脂肪酸^[2]。以微藻生产的生物柴油价格远远高于化石燃料和以油料作物油脂为原料生产的生物柴油^[7], 离实际应用还有一定距离。为了降低成本要对各生产环节进行技术的改进和突破, 优良藻种的筛选和产油条件的分析仍然是研究的重点之一。微绿球藻(*Nannochloropsis*)通常作为水产业优良的饵料以及色素和EPA的来源, 但研究发现, 其EPA一

般在膜脂中, 而细胞内储存物三酰基甘油中的脂肪酸大多为饱和脂肪酸^[8], 这正是生产生物柴油所需的比例, 因此利用其产油也具有一定优势。本研究筛选了4种微绿球藻产油株, 对不同生长时期的产油情况进行了分析, 测定了平台期总油脂含量及中性脂三酰基甘油的含量, 比较了藻细胞及三酰基甘油中的脂肪酸组成, 以期为进一步生产高质量的生物柴油提供依据。另一方面, 研究微绿球藻产油与产不饱和脂肪酸的关系, 对于生产EPA藻种的选育和工艺改进也具有指导意义。

1 材料与方法

1.1 藻种

颗粒微绿球藻(*Nannochloropsis granulata*)、盐生微绿球藻(*Nannochloropsis salina*)、海洋微绿球藻(*Nannochloropsis oceanica*)、湖沼微绿球藻(*Nannochloropsis limnetica*)和微绿球藻未定种(*Nannochloropsis* sp.)均由本所胡晗华副研究员提供。

1.2 藻种培养条件

除湖沼微绿球藻用BG11^[9]培养基外, 其余4种用海水培养基, 添加f/2营养盐^[10]。在25℃、持续光

收稿日期: 2009-12-12; 修订日期: 2010-06-23

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-G-060); 中国科学院太阳能行动计划(KGCX2-YW-374-12)资助

作者简介: 李秀波(1982-), 女, 辽宁辽阳人; 硕士研究生; 研究方向为藻类生物技术。E-mail: lixiubo666@yahoo.com.cn

通讯作者: 孔任秋, E-mail: kongr@ihb.ac.cn

照、光强为 $100 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 、pH 7.0–7.5 条件下通气培养。

1.3 总脂提取

总油脂按氯仿/甲醇萃取的方法^[11,12]提取。以 6000 r/min 离心收集藻细胞, 用灭菌 ddH₂O 洗涤三次, 收集并冷冻干燥, 称取 100 mg 冷冻干燥的藻提取总脂。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; 再加入 3/10 体积的 1 mol/L 氯化钾的 0.2 mol/L 磷酸溶液, 稍振荡, 使相位分离; 12000 r/min 离心 5min, 吸取下层氯仿相至新的 EP 管中, 置通风厨中吹干溶剂, 以分析天平称重, 计算总脂含量。

1.4 薄层层析和三酰基甘油的分离

薄层层析参照文献[12]进行, 所用薄层层析板的型号是 Silica gel 60 F254 (Merk KgaA Darmstadt, Germany), 展层剂体系为正己烷: 乙醚: 乙酸(90:10:1)。展层完毕从展层缸中取出层析板, 待层析板上的展层剂挥发干向上喷 50%硫酸并立即置 160℃ 烘箱中烘烤 5min 显色。分离三酰基甘油时, 取总脂 15 mg, 与三油酸甘油标样一起进行薄层层析。然后, 将三油酸甘油对应的位置在板上用小刀切割并将硅胶粉刮下, 放入 Ep 管中, 用 10—20 mL 甲醇洗脱, N₂ 气吹干, 即得到较纯的三酰基甘油。以分析天平称重, 计算三酰基甘油含量。

1.5 脂肪酸测定

分别将藻细胞总脂和三酰基甘油进行甲脂化, 将脂化液用正己烷萃取三次定容至 100 μL , 取 1 μL 进行气相色谱分析。气相色谱分析条件为在柱温 50℃ 保持 1min 后, 以 40℃/min 的升温速度升至 170℃, 保持 1min, 再以 18℃/min 的速度升至 210℃, 保持

28min; 进样口温度为 270℃, 分流比为 50:1; 以 N₂ 为载气, 恒流方式, 流量为 2 mL/min; 检测器温度为 280℃, 空气流量为 350 mL/min, 氢气为 35 mL/min。

2 结果

2.1 总脂和三酰基甘油含量分析

将 5 种微绿球藻培养至平台期, 以相同生物量提取油脂, 进行薄层层析比较三酰基甘油含量。结果显示, 湖沼微绿球藻的三酰基甘油含量很少, 而其余 4 种均能产生较多的三酰基甘油(图 1)。

分别培养 4 种含油量较高的藻种, 在第 4 天、第 7 天、第 11 天、第 14 天和第 17 天收集藻细胞提取油脂, 以薄层层析法分析比较(图 2)。各时期油脂

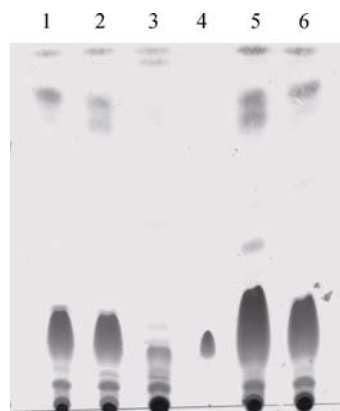


图 1 以薄层层析法比较 5 种微绿球藻油含量

Fig. 1 Comparison of oil contents in 5 *Nannochloropsis* species by thin layer chromatography (TLC)

1. 颗粒微绿球藻; 2. 盐生微绿球藻; 3. 湖沼微绿球藻; 4. 三油酸甘油酯标样(0.02 mg); 5. 微绿球藻未定种; 6. 海洋微绿球藻
1. *N. granulata*; 2. *N. salina*; 3. *N. limnetica*; 4. triolein (0.02 mg); 5. *Nannochloropsis* sp.; 6. *N. oceanica*

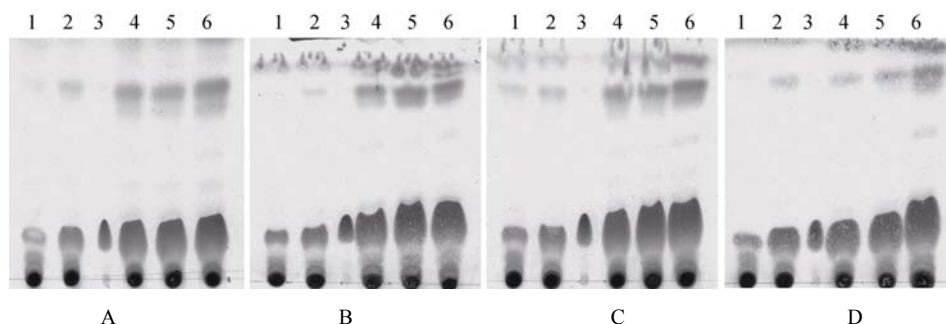


图 2 以薄层层析法显示 4 种微绿球藻不同生长时期含油量

Fig. 2 Display of oil contents in 4 *Nannochloropsis* species at different growth stages by thin layer chromatography

A. 颗粒微绿球藻; B. 盐生微绿球藻; C. 微绿球藻未定种; D. 海洋微绿球藻; 1. 培养第 4 天; 2. 培养第 7 天; 3. 三油酸甘油酯标样 (0.02 mg); 4. 培养第 11 天; 5. 培养第 14 天; 6. 培养第 17 天

A. *N. granulata*; B. *N. salina*; C. *Nannochloropsis* sp.; D. *N. oceanica*; 1. the 4th day of cultivation; 2. the 7th day of cultivation; 3. triolein (0.02 mg); 4. the 11th day of cultivation; 5. the 14th day of cultivation; 6. the 17th day of cultivation

上样量都是以相同细胞量(1.8×10^8 cells)提取的。4 种微绿球藻在对数生长前期(第 4 天)就能检测到三酰基甘油的积累,但含量比较少,之后随着培养时间的延长逐渐增加。其中,颗粒微绿球藻、盐生微绿球藻和微绿球藻未定种在进入平台期(14—17d)含油量达到最大,并保持相对稳定,而海洋微绿球藻在平台期随着培养时间的延长,三酰基甘油含量还有明显提高。

将 4 种含油量较高的藻培养至平台期,提取总脂,分离纯化三酰基甘油,计算总油脂含量和三酰基甘油含量(图 3)。4 种微绿球藻总脂含量都达到了 57%以上,其中颗粒微绿球藻、盐生微绿球藻和海洋微绿球藻的总脂含量分别为($57.5 \pm 7.3\%$)、($60.0 \pm 6.5\%$)和($58.5 \pm 2.2\%$)%,微绿球藻未定种的总脂含量最高,为细胞干重的($74.9 \pm 6.5\%$)%。4 种微绿球藻三酰基甘油含量稍有差异,颗粒微绿球藻、盐生微绿球藻和海洋微绿球藻的三酰基甘油含量基本相当,分别为($33.1 \pm 6.1\%$)%、($32.4 \pm 4.4\%$)%和($36.4 \pm 1.5\%$)%,微绿球藻未定种最高,可达细胞干重的($45.2 \pm 9.1\%$)%。颗粒微绿球藻、盐生微绿球藻、微绿球藻未定种和海洋微绿球藻三酰基甘油含量分别占总脂的($57.7 \pm 8.3\%$)%、($54.0 \pm 3.6\%$)%、($60.1 \pm 7.1\%$)%和($62.3 \pm 4.2\%$)%。

2.2 脂肪酸组成的分析

以培养至平台期的 5 种微绿球藻,分析了细胞中的脂肪酸组成及相对含量。表 1 显示,4 种高产油微绿球藻的脂肪酸组成相似,饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸总量都在 95%以上,其中 C16:0、C16:1 和

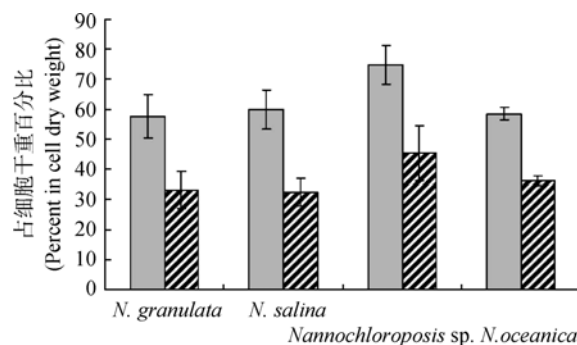


图 3 四种微绿球藻总脂及三酰基甘油含量

Fig. 3 Contents of total lipids and triacylglycerol in 4 *Nannochloropsis* species

灰色柱代表总脂,斜纹柱代表三酰基甘油

Grey bars, total lipids; striped bars, triacylglycerol

C18:1 可达到总脂肪酸的 90%以上, C16 脂肪酸(C16:0 和 C 16:1) 达总脂肪酸的 66%—82%。各藻种都只检测到含量在 1%以下的亚麻酸(C18:3)。C20 脂肪酸含量在 2%—3.6%, 大多以多不饱和形式存在(4 个或 5 个不饱和键)。含油量低的湖沼微绿球藻脂肪酸组成则与其他藻有较大区别,其 C16 和 C18 的饱和和单不饱和脂肪酸仅占 51.04%,而 C20 脂肪酸共占 45.05%, C20 多不饱和脂肪酸高达 44.75%, EPA (C20:5)含量为 38.36%。

进一步分析 4 种高产油藻的三酰基甘油中脂肪酸的组成及相对含量,发现与藻细胞总的脂肪酸组成相似,总的饱和与单不饱和脂肪酸含量达到 95%以上,但多不饱和脂肪酸含量与全细胞相比更低。表 2 显示,三酰基甘油中脂肪酸组成也以 C16 和

表 1 五种微绿球藻中脂肪酸含量(摩尔百分比)

Tab. 1 Fatty acid composition(mol%)of 5 *Nannochloropsis* species

脂肪酸 Fatty acids	<i>N. limnetica</i>	<i>N. granulata</i>	<i>N. salina</i>	<i>Nannochloropsis</i> sp.	<i>N. oceanica</i>
C14: 0	0.23±0.33	6.47±0.86	1.87±0.08	3.79±0.94	2.73±0.09
C14: 1	0.12±0.01	0.09±0.01	0.03±0.01	0.03±0.00	0.02±0.00
C 16: 0	17.19±1.64	32.13±2.65	38.85±2.04	41.60±2.56	44.20±0.24
C16:1 (7)	32.80±3.03	34.44±0.20	39.93±1.20	34.20±1.87	37.56±0.36
C 18: 0	0.54±0.06	1.40±0.01	2.17±0.38	2.04±0.43	1.53±0.06
C18:1 (9)	0.51±0.09	21.26±1.40	11.30±1.08	13.57±2.50	9.04±0.13
C18:2 (9, 12)	2.94±0.28	1.58±0.11	1.42±0.08	1.10±0.28	0.68±0.03
γ-C18:3(6, 9, 12)	0.31±0.27	ND	0.79±0.05	0.28±0.12	0.43±0.02
α-C18:3(9,12,15)	ND	0.24±0.33	ND	0.11±0.15	0.05±0.04
C18: 4	0.32±0.28	ND	ND	ND	0.06±0.02
C20: 0	0.30±0.09	ND	0.22±0.03	ND	0.10±0.02
C20: 4	6.39±0.87	0.41±0.58	1.60±0.19	0.74±0.25	1.46±0.05
C20: 5	38.36±3.55	1.98±1.28	1.82±0.41	2.53±0.82	2.15±0.15

Note: ND. not detected; the same below

表 2 四种微绿球藻三酰基甘油中脂肪酸含量(摩尔百分比)
Tab. 2 Fatty acid composition (mol%) of triacylglycerol in 4 *Nannochloropsis* species

脂肪酸 Fatty acids	<i>N. granulata</i>	<i>N. salina</i>	<i>Nannochloropsis</i> sp.	<i>N. oceanica</i>
C14: 0	6.20±0.40	3.99±0.53	6.72±0.16	5.39±0.16
C14: 1	0.05±0.00	0.05±0.00	0.22±0.28	0.19±0.28
C 16: 0	35.20±0.36	36.14±0.55	37.44±0.25	38.03±0.13
C 16: 1(7)	37.99±0.20	46.63±1.52	38.97±0.78	39.14±0.03
C 18: 0	0.97±0.06	1.07±0.09	1.17±0.19	0.88±0.03
C 18: 1(9)	17.69±0.47	8.76±0.77	13.28±0.80	13.75±0.42
C 18: 2(9, 12)	0.93±0.08	0.68±0.00	0.47±0.41	0.35±0.01
γ -C18:3(6, 9,12)	0.11±0.15	0.67±0.00	ND	ND
C20: 4	0.39±0.56	0.49±0.70	ND	0.22±0.38
C20: 5	0.47±0.58	1.52±0.06	1.73±0.51	2.05±0.24

C18 为主, 达到总脂肪酸含量的 90%以上, 其中 C16 脂肪酸(C16:0 和 C16:1)可达总脂肪酸含量的 73%—83%。这 4 种微藻的三酰基甘油都未检测到 α -亚麻酸(α -C18:3), 颗粒微绿球藻、盐生微绿球藻中有不到 1%的 γ -亚麻酸。颗粒微绿球藻的三酰基甘油多不饱和脂肪酸含量最低, 不到 2%。

3 讨 论

本文从 5 种微绿球藻中筛选出了 4 种高产油藻种, 发现各藻种在对数生长期前期就检测到三酰基甘油的积累, 随着细胞浓度的增加, 三酰基甘油逐渐增加, 在平台期达到最高。这与其他文献的报道是一致的^[13,14]。推测藻细胞生长在进入平台期后, 培养液中氨基酸合成所必须的氮及其他营养减少了, 导致细胞内蛋白质的合成量降低, 光合作用同化的碳进入到碳水化合物和脂肪中, 出现能量积累的趋势。在 4 种微绿球藻中, 油脂在平台期均达到细胞干重的 57%以上, 其中 1 个微绿球藻未定种油脂含量高达 74.9%。在平台期细胞的油脂中, 三酰基甘油占大部分, 占总脂的 54.0%—62.3%, 占细胞干重的 32.4%—45.2%。本研究所用盐生微绿球藻含油脂达 60.0%, 比 Boussiba, *et al.*所报道^[14]的高得多, 可能是因为所用藻种属于两个不同的株以及不同的培养条件所致。因此, 对 4 种产油藻的后续研究应进一步优化培养条件, 比如通最适比例的 CO₂ 以及进行氮营养胁迫, 以期得到更理想的单位产油量。

生物柴油生产主要是用天然油脂中的三酰基甘油和甲醇在酸或者碱性催化剂和高温下进行转酯化反应, 生成相应的脂肪酸甲酯。三酰基甘油的脂肪酸组成决定了生物柴油的质量。在本研究中, 4 种产

油微绿球藻全细胞脂肪酸组成和三酰基甘油中脂肪酸组成相似, 均以 C16 和 C18 为主, 但在三酰基甘油中多不饱和脂肪酸含量更低。譬如, 颗粒微绿球藻三酰基甘油中的多不饱和脂肪酸不到 2%, 而在全细胞脂肪酸中超过 4%。可见, 三酰基甘油中含有较少的多不饱和脂肪酸。我们也检查了 1 种产油量很低的湖沼微绿球藻的脂肪酸组成, 发现其多不饱和脂肪酸含量很高, 比例达到 45%以上, 特别是 EPA 含量达 38.36%。这些结果说明, 多不饱和脂肪酸(C20:5, C20:4)在膜脂中所占比例较高, 在三酰基甘油中所占比例较低。这与前人的研究结果也是一致的^[8]。适量的不饱和脂肪酸会增加生物柴油低温下的流动性, 但过量的多不饱和脂肪酸又会影响生物柴油的稳定性, 不利于运输和储存。某些微藻、大豆和菜籽的油中含较高比例多不饱和脂肪酸。相比之下, 4 种高产油的微绿球藻, 尤其是颗粒微绿球藻的脂肪酸组成更接近或符合欧盟有关汽车用生物柴油脂肪酸组成的标准^[7]。因此, 本研究中 4 种微绿球藻所积累的三酰基甘油, 可以作为生物柴油的优质原料, 而产油量很少的湖沼微绿球藻则可能成为生产 EPA 的优良藻种。

参考文献:

- [1] Rodolfi L, Chini Zittell G, Bassi N, *et al.* Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, **102**: 100—112
- [2] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, *et al.* Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances [J]. *The Plant Journal*, 2008, **54**: 621—639
- [3] Li Q, Du W, Liu D W. Perspective of microbial oils for biodiesel production [J]. *Applied Microbiology and Biotechnol-*

- ogy, 2008, **80**: 749—756
- [4] Metting F B. Biodiversity and application of microalgae [J]. *Journal of Industrial Microbiology*, 1996, **17**: 477—489
- [5] Spolaore P, Joannis Cassan C, Duran E, *et al.* Commercial applications of microalgae [J]. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 2006, **101**: 87—96
- [6] Ohlrogge J, Browse J. Lipid biosynthesis [J]. *Plant cell*, 1995, **7**: 957—970.
- [7] Chisti Y. Biodiesel from microalgae [J]. *Biotechnology Advances*, 2007, **25**: 294—306.
- [8] Sukenik A, Carmeli Y, Berner T. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. [J]. *Journal of Phycology*, 1989, **25**: 686—692
- [9] Stanier R Y, Kunisawa R, Mandel M, *et al.* Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order *Chroococcales*) [J]. *Bacteriology Review*, 1971, **35**: 171—205
- [10] Guillard RRL. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates [A]. In: Smith W L, Chanley M H. Culture of marine invertebrate animals [C]. Plenum: New York Press. 1975, 29—60
- [11] Bligh E G, Dyer WJ. A rapid method of lipid extraction and purification [J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, **37**: 911—917
- [12] 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 of Bacteriology*, 1997, **179**: 2969—2975
- [13] Bigogno C, Khozin-Goldberg 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**: 497—503
- [14] Boussiba S, Vonshak, Cohen Z, Avissar Y, *et al.* Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina* [J]. *Biomass*, 1987, **12**: 37—47

STUDIES ON THE PRODUCTION OF OIL AND POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN FIVE SPECIES OF *NANNOCHLOROPSIS*

LI Xiu-Bo^{1,2}, XU Xu-Dong¹ and KONG Ren-Qiu¹

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

Abstract: *Nannochloropsis* species are known for high contents of oil or polyunsaturated fatty acids (PUFA), such as EPA (C20:5). In *Nannochloropsis* species, oils contain essentially saturated and mono-unsaturated fatty acids, while polar lipids are rich in PUFA. In this study, total lipids, oils and fatty acids were analyzed in 5 *Nannochloropsis* species. Total lipids were extracted from cells using chloroform/methanol, and from total lipids, triacylglycerols were purified using thin layer chromatography. Of the five species, four were found to be of high-oil contents and one of very low-oil content. In the high-oil species, lipids could be accumulated to more than 57% of cell dry weight at late stationary growth phase, of which triacylglycerols accounted for 32.4%—45.2% of cell dry weight. The fatty acid composition of whole cells of all five species or triacylglycerol of four high-oil content species was analyzed. In high-oil content species, saturated and mono-unsaturated fatty acids accounted for more than 95% of total fatty acids, while the polyunsaturated fatty acids were less than 5%. In contrast, in the species of low-oil content, polyunsaturated fatty acids accounted for more than 45% of total fatty acids. Triacylglycerols of the four high-oil content species possessed less than 4% PUFA and may serve as excellent raw materials for biodiesel production. On the other hand, EPA may be easily produced from total lipids of the low-oil content *Nannochloropsis*.

Key words: *Nannochloropsis*; Triacylglycerols; Fatty acids