一株绿藻(*Chlamydomonas* sp. PD-4)产油性能的初步评价

彭小伟 (宁波浮田生物技术有限公司,浙江宁波 315700)

摘要 [目的]评价绿藻 *Chlamydomonas* sp. PD-4 能否作为油藻的备选藻株。[方法]研究该藻基本的生化组成以及不同培养条件下该藻的生长、油脂含量以及脂肪酸组成,并且观察该藻的气浮现象。[结果]该藻在 100 μmol/(m²·s)培养 9 d 可产 25.81%蛋白、18.82%油脂以及 23.50%糖。该藻在 200 μmol/(m²·s)的光以及氮浓度限制条件下培养,其油脂含量和多不饱和脂肪酸含量都会进一步提高。在较高的光强下静置培养,该藻可以自身气浮。[结论]该藻具有产油微藻的潜力。

关键词 *Chlamydomonas* sp. PD-4;生化组成;油脂含量;脂肪酸组成
中图分类号 Q949.93 **文献标识码** A
文章编号 0517-6611(2020)03-0058-03
doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.03.018
开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Preliminary Evaluation of Oil Production Performance of a Green Algae (*Chlamydomonas* sp. PD-4)

PENG Xiao-wei (Ningbo Futian Biotechnology Co., Ltd., Ningbo, Zhejiang 315700)

Abstract [Objective]The research aimed to evaluate the possibility as a candidate for biodiesel production of a green algae *Chlamydomonas* sp. PD-4. [Method]The basic bio-chemical composition, the capability in the growth, the lipid accumulation and the carbon chain composition of main fatty acid of *Chlamydomonas* sp. PD-4 were studied, the flotation of *Chlamydomonas* sp. PD-4 was also studied. [Result]The algae accumulated 25.81% protein, 18.82% total lipid and 23.50% carbonhydrate after 9 d cultured in 100 μmol/(m² · s) radiation. The algae were cultured under the conditions of light of 200 μmol/(m² · s) and nitrogen concentration, and the oil content and polyunsaturated fatty acid content were further improved. The algae was cultured in a resting place at higher light intensity, and the algae could float on its own. [Conclusion]The algae is a valuable and useful oleaginous algae.

Key words *Chlamydomonas* sp. PD-4;Bio-chemical composition;Lipid content;Fatty acid composition

微藻能源是最具有发展潜力的生物能源之一[1]。目前大规模培养微藻生产油脂仍存在 2 个重要的限制因素:一个是微藻油脂的产率相对较低,另一个是微藻生产和采收成本较高[2]。提高藻种生物量和油脂产量,或用产高附加值产物的藻株生产生物柴油,选择便于采收的藻株,是降低微藻油成本较为理想的途径。该研究探讨了一株筛选自青岛平度泽河中的衣藻。该藻在采样水体中处于优势地位且易于气浮分布于水体表面。通过对该藻生长、产油性状以及自气浮特性的观察初步判断该藻是否具有产油藻的潜力,为后续研究类似藻株(自身气浮)作为产油藻株提供一定的借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料的获取 在平度泽河与秀水河交汇处取样。将部分水样离心、用灭菌蒸馏水洗涤、稀释后通过平板分离获得纯种藻株 PD-4。

1.2 藻株的分子生物学鉴定 取 20 mL 培养的藻细胞 5 000 r/min 离心 5 min,收集藻细胞。将藻细胞于液氮中研磨后转入 1.5 mL 离心管。使用 TIANGEN 植物总 DNA 试剂盒(TIANGEN)提取基因组 DNA,操作方法按照试剂盒说明书进行。

DNA 经 PCR 扩增,回收试剂盒(OMEGA)纯化,连接至 pMD18-T 质粒载体(TaKaR)上,转化后筛选阳性菌落到上海桑尼生物技术有限公司测序。向 NCBI 提交测序结果,搜索同源序列。

1.3 该藻基本生化组成的测定 将处于对数期的藻接种在柱状光生物反应器中(ϕ3 cm×30 cm,玻璃材质),通气、全光照培养,通气量为 0.2 V/V·min,CO_2 含量为 1%。光照强度为 100 μmol/(m²·s),培养温度为(25±1)℃。培养 9 d 后,将藻样离心(Beckman 离心机,美国 Beckman 公司)、蒸馏水清洗 3 次,冻干(低温冷冻干燥机,北京博医康)。

蛋白质含量的测定通过 Vario EL 元素分析仪(德国 Elemtnar 公司)测定 N 的含量(%),蛋白含量为 N×6.25[3]。总糖按照蒽酮比色法测定[4]。总脂测定见文献[5]。

1.4 该藻在不同培养条件下的产油性状 将处于对数期的藻种接种在柱状光生物反应器,通气、全光照培养,初始接种量为 0.15 g/L,通气量为 0.2 V/V·min,CO_2 含量为 1%,培养基为 BG11,其中一组 $NaNO_3$ 浓度有所改变。详见表 1。

表 1 试验藻株培养条件

Table 1 Culture conditions of test algae

处理组 Treatment group	N 浓度 Nitrogen condition mmol/L	光照强度 Irradiation intensity μmol/(m²·s)
L-N	17.6	100
L-N/4	4.4	100
H-N	17.6	200

注:L-N 指低光全氮组;L-N/4 指低光低氮组;H-N 指高光全氮组
Note: L-N refers to the low-light total nitrogen group; L-N/4 refers to the low-light and low-nitrogen group; H-N refers to the high-light total nitrogen group

培养 9 d 测定各组干重、油脂含量并对 H-N 组油脂的脂肪酸组成进行测定。干重的测定:将一定体积(v)、混匀的藻液抽滤到已烘干称重的滤纸上(重量为 w_1),经 105 ℃烘干称重,其重量记为 w_2,则藻的干重为 $m=(w_2-w_1)/v$,单位为 g/L。油脂的测定方法见文献[6]。脂肪酸的组成用气相色谱分析测定(Agilent GC 7890A,安捷伦科技有限公司)。色谱条件和计算方法见文献[6]。

作者简介 彭小伟(1980—),男,湖北十堰人,工程师,硕士,从事藻类生理生态研究。
收稿日期 2019-07-25

1.5　该藻气浮现象的观察　取一定量的藻细胞,接种于含 150 mL BG11 培养基的 250 mL 三角瓶中,于 200 μmol/(m^2·s)光强处静置培养,观察该藻能否悬浮分层。另外,将三角瓶中自气浮的藻(上层)和沉淀到容器底部的藻(下层)分别收集,用透射电镜对上下层藻细胞进行结构观察。电镜样品制作方法见文献[6]。

2　结果与分析

2.1　藻株鉴定　经 Blast 检索,结合细胞形态,判断试验藻株 PD-4 为 *Chlamydomonas* sp.。向 NCBI 提交 18sDNA 碱基序列后,该藻株序列获得的登录号为 JQ247307。

2.2　该藻基本生化组成　该藻经全光照培养 9 d,其体内的蛋白质含量最高,为 25.81%±0.69%,其次是总糖,为 23.50%±1.15%,油脂最低,为 18.82%±0.73%。仅从蛋白、油脂、多糖含量来讲,这株藻稍显平庸。

2.3　该藻产油性状分析　从绿藻 *Chlamydomonas* sp. PD-4 在不同条件下的产油性状(表 2)可以看出,经过 9 d 的培养,*Chlamydomonas* sp. PD-4 油脂含量为 18.63%~26.19%,油脂产率为 68~116 mg/(L·d)。与一些公认的含油量和油脂产率较高的藻株(表 3)相比,其油脂含量和产率并不低,表明该藻株具有作为产油微藻的潜力。

表 2　*Chlamydomonas* sp. PD-4 在不同条件下细胞总脂含量、油脂产率

Table 2　Cellular lipids content, lipid productivity of *Chlamydomonas* sp. PD-4 in different culture conditions

处理组 Treatment group	生物量 Biomass g/L	油脂含量 Oil content %	油脂产率 Oil productivity mg/(L·d)
L-N	3.43±0.01	18.63±0.28	68
L-N/4	2.88±0.24	26.19±0.86	79
H-N	4.66±0.34	23.28±0.66	116

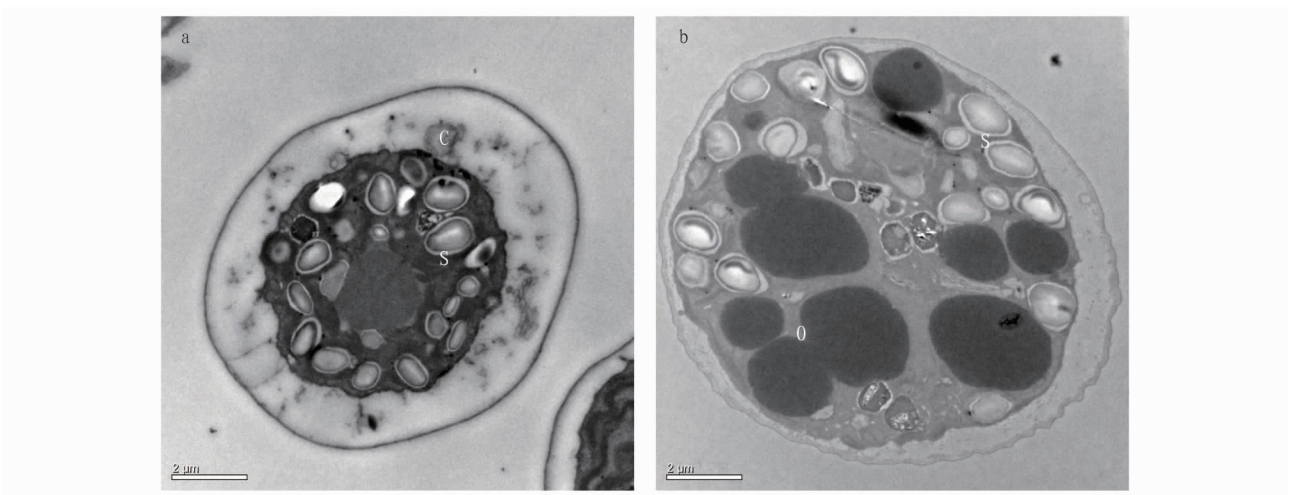
脂肪酸测定结果表明,该藻 C16:0、C16:4、C18:0、C18:1、C18:2、C18:3的含量分别为33.43%、2.41%、12.50%、29.31%、11.08%、5.14%,另有 6.14%的未定性脂肪酸。脂肪酸主要是由 C16 和 C18 组成,这与柴油分子 15 个左右的碳链极其相似[8]。该藻油脂含有较高含量的油酸(C18:1)。较高含量的油酸增强了生物柴油长期储存的氧化稳定性[9],降低了其在寒冷地区使用时的冷滤点(CFPP)[10]。因此,*Chlamydomonas* sp. PD-4 抽提的油脂适用于高品质的生物柴油的生产。

表 3　一些油脂含量和油脂产率相对较高的藻[7]

Table 3　Some microalgal species with relatively high lipid content and productivities

藻种 Algae species	油脂含量 Oil content %	油脂产率 Oil productivity mg/(L·d)
C. prototheocoides	15~58	1 214
Chlorococcum sp.	19	54
Chlorella sorokiniana	19~22	45
D. salina	6~25	116
Ellipsodion sp.	27	47
Nannochloropsis sp.	21~36	38~61
Nannochloropsis oculata	22~30	84~142
Neochloris oleoabundans	29~65	90~134
Pavlova salina	31	49
Pavlova lutheri	36	50
Phaeodactylun tricomutum	18~57	45
Scenedesmus sp.	20~21	41~54

2.4　该藻自气浮现象　该藻在较高的光强(200 μmol/(m^2·s))下静止培养 3 d 就可以观察到该藻在液面处漂浮了一层,到了第 12 天,藻体基本都悬浮到水体的上层。透射电镜的结果显示(图 1),上层细胞和下层细胞的结构有明显的区别。下层细胞具有荚膜,细胞内有较多的淀粉粒;上层细胞基本没有荚膜结构,含有较多的油滴。细胞构成的变化可能是这些藻悬浮的重要原因,而该藻在特定阶段易于悬浮的特性便于采收。



注:C. 荚膜;S. 淀粉粒;O. 油滴

Note: C. Capsule; S. Starch grain; O. Oil droplets

图 1　该藻下层(a)和上层(b)细胞透射电镜

Fig. 1　Transmission electron microscopy of the lower layer(a) and upper layer(b) cells of the algae

在敞开的玻璃容器中培养该藻同样观察到自气浮现象，并且没有观察到杂藻污染；在河道采集地某些静水区域该藻长期占据绝对优势并在水体上层形成厚厚的一层。在规模培养中，藻易受捕食者和病原体的侵扰，形成杂藻、原生动物等污染，导致群落更替或被原生动物取代等[11]。该藻在野外能够长期占据优势，表明该藻对环境适应性强，对病虫害的抵抗力强，这个特点也使其比较适合大规模培养。

3 结论与讨论

该试验研究了绿藻 *Chlamydomonas* sp. PD-4 基本的生化组成以及不同培养条件下该藻的生长、油脂含量以及脂肪酸组成，并且观察了该藻的气浮现象。结果表明，该藻在 100 μmol/(m^2·s)培养 9 d 可产 25.81%蛋白、18.82%油脂以及 23.50%糖；该藻在 200 μmol/(m^2·s)的光以及氮浓度限制条件下培养，其油脂含量和多不饱和脂肪酸含量都会进一步提高；在较高的光强下静置培养，该藻可以自身气浮。这表明该藻具有产油微藻的潜力。

Chlamydomonas sp. PD-4 因其它生长快、油脂含量较高、采收方便、对污染抵抗力强等特点具有一定的培养价值，也具有一定的潜力来做进一步的研究。现有筛选产油藻株时，通常只关注了生长速度、含油量这 2 个最核心的相关参数，对于藻的其余性状则关注不多。通过该研究可知气浮于液体表层的藻不仅含有较高的油脂含量(油滴较多)，而且该性状便于藻类收集，在一定程度上可能用于产油藻的筛选。

参考文献

[1] 刘天中，王俊峰，陈林. 能源微藻及其生物炼制的现状与趋势[J]. 生物产业技术，2015(4)：31-39.

[2] 左正三，孙小曼，任路静，等. 微藻生产油脂培养新技术[J]. 中国生物工程杂志，2018，38(7)：102-109.

[3] 夏建荣，高坤山. 球形念珠藻的生化组成分析[J]. 武汉植物学研究，2002，20(3)：223-224.

[4] 李合生，孙群，赵世杰，等. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京：高等教育出版社，2000.

[5] 邱昱晶，彭小伟，张维，等. 三种不同来源的三角褐指藻的生长与油脂积累差异[J]. 安徽农业科学，2011，39(24)：14761-14763.

[6] 陈闽，陈晓琳，刘天中，等. 不同亚临界溶剂从微拟球藻湿藻中提取油脂[J]. 过程工程学报，2011，11(3)：380-385.

[7] GONG Y M，JIANG M L. Biodiesel production with microalgae as feedstock：From strains to biodiesel[J]. Biotechnology letters，2011，33(7)：1269-1284.

[8] 刘永定，范晓，胡征宇. 中国藻类学研究[M]. 武汉：武汉出版社，2001：254-261.

[9] KNOTHE G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters[J]. Fuel Process Technol，2005，86(10)：1059-1070.

[10] STOURNAS S，LOIS E，SERDARI A. Effects of fatty acid derivatives on the ignition quality and cold flow of diesel fuel[J]. J Am Oil Chem Soc，1995，72(4)：433-437.

[11] WANG H，ZHANG W，CHEN L，et al. The contamination and control of biological pollutants in mass cultivation of microalgae[J]. Bioresour Technol，2013，128：745-750.

(上接第 40 页)

看，各参试品种整齐度好，株型较紧凑，抗逆性表现都较好，抗稻瘟病，抗倒伏，纹枯病轻度发生。其中国瑞粳糯 2 号产量高、抗性好、株高偏高、熟期相对偏迟，生产应用上可适当早播。扬粳 5118 产量较高、株型较紧凑、粒重高。扬农粳 418 产量较高、株高适中、穗粒结构较为协调。上述结论仅为 1 年的试验结果，稻瘟病抗性是调查田间自然发病情况，因此各品种的抗逆性和稻米品质的优良与否以及相对应配套栽培技术有待于今后进一步研究探讨[9-10]。

表 4 参试品种(系)产量比较

Table 4 Comparison of the yield of tested varieties

品种名称 Variety name	小区产量 Plot yield//kg	产量 Yield//kg/hm^2	较对照增减产 Compared with CK//±%	产量位次 Yield rank
扬农粳 418 Yangnongjing 418	42.63	9 271.50	1.90	3
光伟 11 号 Guangwei 11	42.08	9 151.80	0.58	4
阳光 958 Yangguang 958	39.75	8 645.63	-4.98	7
绿秀 19 号 Luxiu 19	40.81	8 876.25	-2.45	6
国瑞粳糯 2 号 Guoruijingnuo 2	45.10	9 809.25	7.81	1
南粳 5758 Nanjing 5758	41.97	9 129.45	0.33	5
扬粳 5118 Yangjing 5118	43.60	9 483.15	4.22	2
徐稻 3 号 Xudao 3	41.83	9 099.00	—	—

参考文献

[1] 丁国霞，何善成，陈川，等. 淮安市机插水稻生产现状及对策[J]. 现代农业科技，2016(23)：60-63.

[2] 凌启鸿，张洪程，丁艳锋，等. 水稻丰产高效技术及理论[M]. 北京：中国农业出版社，2005.

[3] 张小明. 水稻引种试验[J]. 农村科技，2008(2)：5-6.

[4] 朱德峰，张玉屏，陈惠哲，等. 中国水稻高产栽培技术创新与实践[J]. 中国农业科学，2015，48(17)：3404-3414.

[5] 许东旭，黄长志，周秋峰. 优质小麦新品种引种试验[J]. 安徽农业科学，2019，47(11)：40-41.

[6] 杨年宝，唐防健，刘国林，等. 兴化市优质水稻新品种(系)引种试验[J]. 现代农业科技，2018(24)：24-26.

[7] 张羽，徐全，袁卫锋，等. 优质常规水稻新品种引种试验报告[J]. 基层农技推广，2018(6)：10-12.

[8] 盖钧镒. 试验统计方法[M]. 北京：中国农业出版社，2006.

[9] 杨超华，杨勇，秦青龙，等. 中籼水稻品种引种鉴定与评价[J]. 现代农业科技，2016(2)：55-56.

[10] 谢戎，何光华，杨正林，等. 水稻引种观察[J]. 西南农业大学学报，1999，21(5)：483-486.