

## NaHCO<sub>3</sub>及培养时间对球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 生长、蛋白质和脂肪酸组成的影响

王星宇<sup>1</sup>,黄旭雄<sup>1,2,3</sup>,杨碧莲<sup>1</sup>

1. 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306

2. 上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306

3. 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306

**摘要:** 本文研究了培养液中添加0、0.5、1.0、1.5和2.0 mg/mL NaHCO<sub>3</sub>对球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 生长、细胞蛋白质含量及脂肪酸组成的影响, 并进一步探讨了添加适宜NaHCO<sub>3</sub>后不同培养阶段对细胞营养组成的影响。结果表明: NaHCO<sub>3</sub>对球等鞭金藻的生长和细胞营养价值有显著影响。批次培养模式下培养液中添加1.5 mg/mL NaHCO<sub>3</sub>可以获得最大细胞密度和比生长率。球等鞭金藻细胞中蛋白质含量随培养液中NaHCO<sub>3</sub>添加量的增大而显著减少; 而细胞中得单不饱和脂肪酸 (MUFA) 显著增加, 多不饱和脂肪酸 (PUFA) 显著降低。在添加1.5 mg/mL NaHCO<sub>3</sub>的培养条件下, 不同培养阶段的藻细胞蛋白和脂肪酸组成也有显著变化, 随着培养时间的延长, SFA和MUFA含量逐渐增加, PUFA含量则显著减少。培养液中添加NaHCO<sub>3</sub>有助于提升球等鞭金藻作为生物柴油原料的品质。

**关键词:** 球等鞭金藻; NaHCO<sub>3</sub>; 生长; 蛋白质; 脂肪酸

**中图分类号:** S985.4+9

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-2324(2016)03-0345-08

## Effects of NaHCO<sub>3</sub> and Culture Phase on Growth, Protein Content and Fatty Acid Composition of *Isochrysis galbana*

WANG Xing-yu<sup>1</sup>, HUANG Xu-xiong<sup>1,2,3\*</sup>, YANG Bi-lian<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Genetic Resources for Freshwater Aquaculture and Fisheries, Shanghai 201306, China

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai 201306, China

3. Aquatic Animal Genetic Breeding Center Collaborative Innovation Center in Shanghai(ZF1206), Shanghai 201306, China

**Abstract:** The growth, cellular protein content and fatty acid profile in micro-algae *Isochrysis galbana* were evaluated when the culture was supplemented with 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg/mL NaHCO<sub>3</sub> respectively. Then the protein content and fatty acid profile in cell at different growth phase were also investigated when the culture medium was added with 1.5 mg/mL NaHCO<sub>3</sub>. The results indicated there were significant effects of NaHCO<sub>3</sub> supplementation on growth, cellular protein content and fatty acid profiles. The treatment supplemented with 1.5 mg/mL NaHCO<sub>3</sub> displayed the highest cell density and special growth rate. The cellular protein content decreased significantly along with the increasing supplementation of NaHCO<sub>3</sub> in culture medium. The monounsaturated fatty acids increased significantly while the polyunsaturated fatty acids decreased significantly along with the increase of NaHCO<sub>3</sub> supplementation. There were significant differences in cellular protein content and fatty acid profile among the cells which were at a different growth phase when the cells were cultured in the medium supplemented with 1.5 mg/mL NaHCO<sub>3</sub>. The saturated fatty acids and monounsaturated fatty acids increased significantly while the polyunsaturated fatty acids decreased significantly along with the culture duration. Therefore it was suggested that NaHCO<sub>3</sub> supplementation in culture medium was helpful for improving the micro-algae quality for bio-diesel production.

**Keywords:** *Isochrysis galbana*; NaHCO<sub>3</sub>; growth; protein content; fatty acid

球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 因其无细胞壁, 易消化, 富含高不饱和和脂肪酸等营养物质, 一直被认为贝类等水产无脊椎动物苗种的优良的饵料微藻<sup>[1]</sup>, 也一度被视为是生产 DHA、EPA 等生理活性物质的潜力藻种<sup>[2,3]</sup>。近些年, 随着微藻生物柴油开发成为微藻应用研究的又一热点, 球等鞭金藻因其经环境诱导后可以蓄积高比例油脂的特点, 还被视为生产微藻生物柴油的优良原料<sup>[4]</sup>。然而无论是作为饵料微藻还是生物柴油原料, 获得高的生物量及细胞中高的目标营养物质含量是球等鞭金藻实现产业化开发的重要前提。因此, 开展培养条件及营养盐浓度对球等鞭金藻生长及细胞组成

**收稿日期:** 2015-10-20

**修回日期:** 2015-11-03

**基金项目:** 上海市科技兴农项目(沪农科推字(2013)第 2-1 号;沪农科攻字(2015)第 1-2 号)

**作者简介:** 王星宇(1994-),男,陕西延安人,本科生,研究方向:生物技术与生物饵料. E-mail:robsten8@126.com

的影响研究,是实现球等鞭金藻产业化开发的基础性工作。多种环境因子及培养液中营养水平等培养条件对球等鞭金藻生长和细胞组成的影响已有报道<sup>[5-7]</sup>。二氧化碳是藻类进行光合作用的底物,培养液中补充二氧化碳在多种微藻培养中已被证实可以促进藻类的生长<sup>[8,9]</sup>。同时,培养液中的二氧化碳可以  $\text{H}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{HCO}_3^-$  及  $\text{CO}_3^{2-}$  形式存在,三者构成了培养液中二氧化碳缓冲体系。已有的研究证实,某些藻类如栅藻 (*Scenedesmus* sp.)<sup>[10]</sup>、微绿球藻 (*Nannochloropsis salina*)<sup>[11]</sup> 和小球藻 (*Chlorella kessleri*)<sup>[12]</sup> 可以利用  $\text{HCO}_3^-$  实现快速生长,而另一些藻类培养过程中添加  $\text{HCO}_3^-$  则并无促生长效果<sup>[8]</sup>。梁英等报道了培养液中  $\text{NaHCO}_3$  浓度对球等鞭金藻的生长特性有显著影响<sup>[13]</sup>。然而,添加  $\text{NaHCO}_3$  对球等鞭金藻细胞营养组成的影响未见报道。此外,处于不同生长阶段的藻细胞其细胞营养组成会有巨大差异<sup>[14,15]</sup>,在培养液中补充  $\text{NaHCO}_3$  后,培养阶段对藻细胞的营养组成的影响也未见报道。本研究探讨了培养液中添加  $\text{NaHCO}_3$  及培养时间对球等鞭金藻生长和细胞营养价值的影响,以期为高效开发球等鞭金藻积累基础性数据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 藻种来源

球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 来自于上海海洋大学微藻藻种室。藻种在温度 25 °C,光照强度 3000 lux,盐度 26 的灭菌海水中采用 f/2 配方培养基<sup>[16]</sup> 进行逐级扩大培养后用于试验。

### 1.2 培养液中添加不同水平 $\text{NaHCO}_3$ 对球等鞭金藻生长及细胞组成影响试验

以  $\text{NaHCO}_3$  为碳源,设置 5 个  $\text{NaHCO}_3$  的质量浓度分别为 0, 0.5, 1, 1.5 和 2 mg/mL 的试验组,每个梯度 3 个平行。培养在 1000 mL 三角烧瓶中进行,初始接种密度  $3 \times 10^5$  cell/mL,将三角烧瓶置于光照培养箱内培养 (L:D=18:6),培养温度 25 °C,光照强度 3000 lux,盐度 26。培养周期 10 d,每天定时摇瓶 3 次。培养期间每日定时取样计数藻细胞密度。藻细胞密度的测定采用 XB-K-25 血球计数板计数法,每个样品平行测定 4 次。

培养结束时,摇匀取 30 mL 藻液经混合纤维素酯滤膜 (孔径为 0.45  $\mu\text{m}$ ) 过滤,置于烘箱中 105 °C 烘干至恒重,得到细胞干重。另摇匀取 1 mL 藻液加入 1 mL 2N NaOH,95 °C 水浴 10 min,冷却至室温,加入 1 mL 1.6N HCl 中和,离心后取上清,采用福林-酚试剂测定蛋白质含量<sup>[17]</sup>。剩余藻液经离心后,冷冻干燥用于脂肪酸组成的测定。

### 1.3 培养时间对球等鞭金藻生长及细胞组成影响试验

根据 1.2 试验结果,筛选出 5 组中球等鞭金藻生长密度最高组 (1.5 mg/mL) 为放大试验组,将扩大培养后的藻液接种于 60 L 柱状气升式光生物反应器 (高 1 m,直径 0.3 m) 中培养,初始接种密度  $3 \times 10^6$  cell/mL。反应器中内置 LED 光源,光照强度 2500 lux,连续光照,室温培养。培养周期 10 d,培养期间每日定时取样计数藻细胞密度,隔天定期收获 5 L 藻液用于细胞蛋白和脂肪酸组成的测定。

### 1.4 脂肪酸的测定

细胞脂肪酸组成的测定参照 Griffiths<sup>[18]</sup> 等的方法,移取一定量藻粉依次加入甲醇钠 ( $\text{NaOMe}$ , 0.5 mol/L) 和  $\text{BF}_3$ -甲醇溶液 (14%) 进行两步甲酯化,提取出含有脂肪酸甲酯的正己烷-甲苯混合物,转移至进样瓶。然后采用气-质联用仪 (Agilent 7890A/5975C) 分析脂肪酸甲酯,毛细管柱为 Supelco Omegawax 320 (30.0  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ )。根据脂肪酸标准品 (Sigma, 美国) 的分析图谱和保留时间对样品脂肪酸进行定性分析,利用峰面积归一化法计算各脂肪酸的相对百分含量,每组样品平行测量 3 次。

### 1.5 数据统计与分析

藻细胞生长的比生长率  $\mu$  计算公式如下:  $\mu = (\ln X_t - \ln X_0) / T$

其中,  $X_0$  为培养初始藻细胞密度,  $X_t$  为经 T 时间后培养液中的藻细胞密度。

根据脂肪酸组成预测微藻生物柴油的品质,其中十六烷值 (Cetane Number, CN) 的计算参考 Piloto-Rodríguez<sup>[19]</sup> 等人的方法进行;运动黏度的计算参照<sup>[20]</sup> 的方法进行;碘值参照<sup>[21]</sup> 的方法进行。

实验结果以平均值  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示。数据采用 SPSS 11.0 软件 (SPSS Inc., USA) 进行单

因子方差分析(One-Way ANOVA),并用Duncan氏检验进行多重比较,差异显著性水平为 $P<0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养液中添加不同水平 NaHCO<sub>3</sub>对球等鞭金藻生长及细胞组成影响

培养液中添加不同浓度的 NaHCO<sub>3</sub>对球等鞭金藻生长的影响如图1所示。在培养前期,碳酸氢钠添加与否对球等鞭金藻细胞生长无显著影响( $P>0.05$ )。培养第7d,A组(未添加NaHCO<sub>3</sub>)的细胞浓度开始下降,而B、C、D、E组浓度继续增加,碳酸氢钠对藻细胞生长的影响开始显现。培养第9d,D、C和B组藻细胞密度显著高于E和A组( $P<0.05$ ),且D、C和B组藻细胞密度分别达到最大值,其中D组最大密度为 $2.64\times 10^6$  cell/mL。培养第10d,各组藻细胞密度均较前一日有所下降。

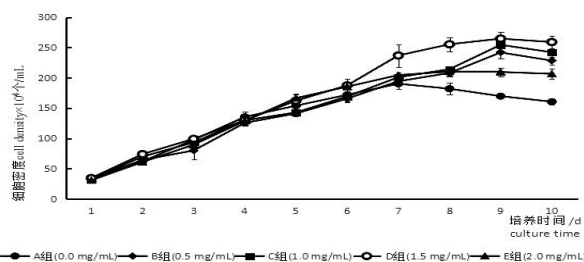


图1 培养液中添加不同浓度的NaHCO<sub>3</sub>对球等鞭金藻生长的影响

Fig.1 Effect of NaHCO<sub>3</sub> concentration on growth of the micro-algae *Isochrysis galbana*

由不同组别的藻细胞比生长率(表1)也可知,培养8d,D和E组比生长率显著高于A组( $P<0.05$ );培养9d和10d,A组比生长率显著低于其他组( $P<0.05$ )。

表1 不同浓度的NaHCO<sub>3</sub>对球等鞭金藻比生长速率( $\mu$ )的影响

Table 1 Effect of NaHCO<sub>3</sub> concentration on specific rate of growth of *Isochrysis galbana*

培养时间 Growth phase	比生长率 Specific growth rate				
	A组(0)	B组(0.5)	C组(1.0)	D组(1.5)	E组(2.0)
1 d	-	-	-	-	-
8 d	0.235±0.013 <sup>b</sup>	0.262±0.025 <sup>ab</sup>	0.266±0.014 <sup>ab</sup>	0.286±0.019 <sup>a</sup>	0.274±0.014 <sup>a</sup>
9 d	0.197±0.007 <sup>b</sup>	0.248±0.023 <sup>a</sup>	0.254±0.014 <sup>a</sup>	0.255±0.016 <sup>a</sup>	0.24±0.013 <sup>a</sup>
10 d	0.169±0.01 <sup>b</sup>	0.214±0.019 <sup>a</sup>	0.22±0.015 <sup>a</sup>	0.224±0.014 <sup>a</sup>	0.211±0.012 <sup>a</sup>

注:同一行数值上标有相同小写字母表示差异不显著( $P>0.05$ ),下表同。

Notes: Values in the same line supermarked with the same letter mean no significant difference( $P>0.05$ ). The same as follows.

经过10d培养,培养液中碳酸氢钠浓度对藻细胞蛋白质含量有显著影响( $P<0.05$ )(图2)。随着培养液中碳酸氢钠浓度的增加,藻细胞中蛋白质含量显著降低。E组藻细胞蛋白质含量显著低于其他组( $P<0.05$ ),而C和D组无显著差异( $P>0.05$ ),但显著低于A和B组( $P<0.05$ ),A和B组间细胞蛋白质含量无显著差异( $P>0.05$ )。

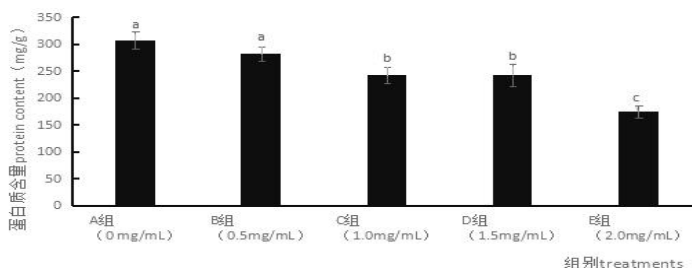


图2 培养液中添加不同浓度的NaHCO<sub>3</sub>对球等鞭金藻蛋白质含量的影响

Fig.2 Effect of NaHCO<sub>3</sub> concentration on protein content of *Isochrysis galbana*

注:上标不同字母表示组间差异显著( $P<0.05$ ),下同。

Note: The different letters marked on the column indicate significant difference among the treatments ( $P<0.05$ ). The same as follows.

从各处理组球等鞭金藻细胞脂肪酸组成(表2)可知,球等鞭金藻细胞中主要的脂肪酸为18:1n9、16:0、14:0、18:4n3、18:3n3和22:6n3。随着培养液中NaHCO<sub>3</sub>添加量的增加,不同脂肪酸呈现不同的变化趋势,14:0呈现先降低后升高的变化;16:0和18:1n9含量显著增加;18:3n3和18:4n3含量显

著降低; 22:6n3 含量呈现先升高后降低的变化。随着培养液中 NaHCO<sub>3</sub> 添加量的增加, 饱和脂肪酸 (SFA)呈波动变化, 总体增加; 单不饱和脂肪酸 (MUFA) 显著增加; 而多不饱和脂肪酸 (PUFA) 显著降低。

表 2 培养液中添加 NaHCO<sub>3</sub> 对球等鞭金藻细胞脂肪酸组成的影响

Table 2 Effect of NaHCO<sub>3</sub> concentration on fatty acid profiles of the micro-algae *Isochrysis galbana*

脂肪酸 Fatty acids	NaHCO <sub>3</sub> (mg/mL)				
	A 组 (0)	B 组 (0.5)	C 组 (1.0)	D 组 (1.5)	E 组 (2.0)
14:0	11.87±0.08 <sup>a</sup>	8.17±0.06 <sup>d</sup>	9.41±0.18 <sup>c</sup>	9.16±0.45 <sup>c</sup>	10.09±0.26 <sup>b</sup>
15:0	0.84±0.03 <sup>a</sup>	0.52±0.02 <sup>bc</sup>	0.46±0.04 <sup>c</sup>	0.51±0.12 <sup>bc</sup>	0.63±0.03 <sup>b</sup>
16:0	15.92±0.14 <sup>d</sup>	17.54±0.11 <sup>c</sup>	20.19±0.37 <sup>a</sup>	18.62±0.4 <sup>b</sup>	20.43±0.51 <sup>a</sup>
16:1n7	4.48±0.03 <sup>a</sup>	3.71±0.15 <sup>b</sup>	2.77±0.03 <sup>d</sup>	3.06±0.21 <sup>c</sup>	2.73±0.19 <sup>d</sup>
16:2	1.7±0.09 <sup>a</sup>	1.11±0.03 <sup>b</sup>	0.66±0.08 <sup>d</sup>	0.76±0.04 <sup>d</sup>	0.92±0.16 <sup>c</sup>
S16	22.1±0.25 <sup>b</sup>	22.36±0.26 <sup>b</sup>	23.62±0.42 <sup>a</sup>	22.43±0.31 <sup>b</sup>	24.09±0.6 <sup>a</sup>
18:0	0.87±0.03 <sup>c</sup>	1.09±0.04 <sup>b</sup>	1.25±0.07 <sup>ab</sup>	1.14±0.14 <sup>b</sup>	1.34±0.1 <sup>a</sup>
18:1n9	19.18±0.13 <sup>d</sup>	21.65±0.46 <sup>c</sup>	27.2±0.62 <sup>b</sup>	26.99±0.54 <sup>b</sup>	28.58±0.32 <sup>a</sup>
18:1n7	2.81±0.03 <sup>bc</sup>	3.58±0.05 <sup>a</sup>	2.92±0.22 <sup>bc</sup>	3.14±0.35 <sup>b</sup>	2.66±0.2 <sup>c</sup>
18:2n6	1.95±0.03 <sup>c</sup>	2.44±0.13 <sup>b</sup>	3.32±0.06 <sup>a</sup>	3.32±0.37 <sup>a</sup>	3.07±0.14 <sup>a</sup>
18:3n3	8.48±0.1 <sup>a</sup>	8.17±0.13 <sup>a</sup>	5.57±0.04 <sup>b</sup>	5.71±0.3 <sup>b</sup>	4.9±0.31 <sup>c</sup>
18:4n3	18.71±0.06 <sup>a</sup>	12.99±0.23 <sup>b</sup>	9.06±0.25 <sup>cd</sup>	10.03±0.97 <sup>c</sup>	9.7±0.27 <sup>cd</sup>
S18	52±0.16 <sup>a</sup>	49.93±0.26 <sup>bc</sup>	49.33±0.75 <sup>c</sup>	50.34±0.44 <sup>b</sup>	50.25±0.43 <sup>b</sup>
22:0	0.54±0.07 <sup>c</sup>	1.1±0.1 <sup>bc</sup>	1.55±0.38 <sup>ab</sup>	1.84±0.52 <sup>a</sup>	1.44±0.41 <sup>ab</sup>
22:1	1.79±0.06 <sup>bc</sup>	2.11±0.08 <sup>a</sup>	1.93±0.05 <sup>ab</sup>	1.93±0.12 <sup>ab</sup>	1.64±0.26 <sup>c</sup>
20:5n3	0.52±0.03 <sup>c</sup>	0.73±0.04 <sup>a</sup>	0.63±0.03 <sup>a</sup>	0.64±0.04 <sup>b</sup>	0.61±0.05 <sup>b</sup>
22:5n3	1.3±0.25 <sup>a</sup>	0.75±0.13 <sup>b</sup>	0.75±0.1 <sup>b</sup>	0.86±0.05 <sup>b</sup>	0.78±0.02 <sup>b</sup>
22:5n6	0.97±0.03 <sup>bc</sup>	1.2±0.02 <sup>a</sup>	1.13±0.05 <sup>ab</sup>	1.22±0.2 <sup>a</sup>	0.77±0.14 <sup>c</sup>
22:6n3	8.06±0.07 <sup>d</sup>	13.13±0.23 <sup>a</sup>	11.19±0.79 <sup>b</sup>	11.06±0.42 <sup>b</sup>	9.72±0.63 <sup>c</sup>
SFA	31.29±0.11 <sup>b</sup>	29.44±0.21 <sup>c</sup>	33.24±0.58 <sup>a</sup>	31.37±1.03 <sup>b</sup>	34.13±0.38 <sup>a</sup>
MUFA	27±0.16 <sup>d</sup>	29.67±0.35 <sup>c</sup>	33.53±0.82 <sup>b</sup>	33.82±0.37 <sup>ab</sup>	34.58±0.46 <sup>a</sup>
PUFA	41.71±0.26 <sup>a</sup>	40.9±0.42 <sup>a</sup>	33.23±1.4 <sup>b</sup>	34.81±1.37 <sup>b</sup>	31.3±0.77 <sup>c</sup>

表 3 培养液中添加 NaHCO<sub>3</sub> 对球等鞭金藻细胞生物柴油品质的影响

Table 3 Effect of NaHCO<sub>3</sub> concentration on biodiesel quality of the micro-algae *Isochrysis galbana*

品质指标 Quality items	NaHCO <sub>3</sub> (mg/mL)				
	A 组 (0)	B 组 (0.5)	C 组 (1.0)	D 组 (1.5)	E 组 (2.0)
运动黏度(Vis, mm <sup>2</sup> ·s <sup>-1</sup> )	3.78±0.01 <sup>c</sup>	3.91±0 <sup>a</sup>	3.86±0.02 <sup>b</sup>	3.83±0.05 <sup>b</sup>	3.82±0.01 <sup>bc</sup>
碘值(IV, gI <sub>2</sub> ·100g <sup>-1</sup> )	164.26±1.04 <sup>a</sup>	169.02±1.49 <sup>a</sup>	145.23±5.09 <sup>b</sup>	148.5±1.61 <sup>b</sup>	138.48±2.63 <sup>c</sup>
十六烷值(CN)	52.75±0.03 <sup>d</sup>	52.76±0.05 <sup>d</sup>	54.46±0.19 <sup>b</sup>	53.97±0.29 <sup>c</sup>	54.92±0.21 <sup>a</sup>

随着培养液中碳酸氢钠添加量的增加, 运动黏度有所提高, 碘值逐步减少, 十六烷值逐步增大。

## 2.2 培养时间对添加 1.5 mg/mL NaHCO<sub>3</sub> 的球等鞭金藻生长和细胞组成的影响

图 3 所示为添加 1.5 mg/mL NaHCO<sub>3</sub> 条件下球等鞭金藻在 60 L 光生物反应器中的生长曲线。可知, 1~7 d 藻细胞密度随培养时间的延长而增加, 在第 7 d 藻细胞密度达到最大值, 为 4.4×10<sup>6</sup> cell/mL。之后细胞密度随培养时间的延长而逐渐降低。

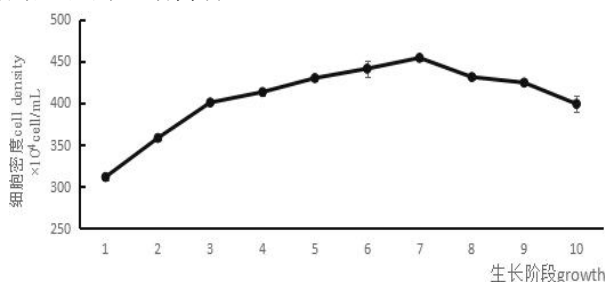


图 3 添加 1.5 mg/mL NaHCO<sub>3</sub> 条件下球等鞭金藻在 60 L 光生物反应器中的生长曲线

Fig.3 The growth curve of *Isochrysis galbana* cultured in 60 L bioreactor with medium supplemented with 1.5 mg/mL NaHCO<sub>3</sub>

培养阶段对球等鞭金藻细胞蛋白质含量有显著影响 ( $P < 0.05$ ) (图4)。随着培养时间的延长,藻细胞中蛋白质含量有所降低。第9d藻细胞蛋白质含量显著低于其他组 ( $P < 0.05$ ), 而第5d和第7d藻细胞蛋白质含量无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 但显著低于第1d和第3d ( $P < 0.05$ ), 第1d和第3d藻细胞蛋白质含量无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

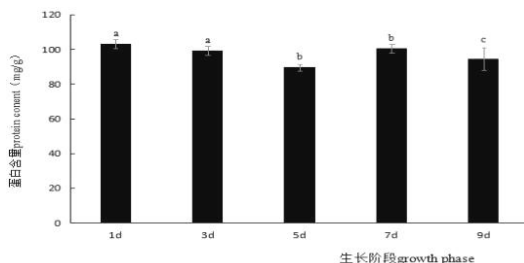


图4 培养时间对添加 1.5 mg/mL NaHCO<sub>3</sub> 的球等鞭金藻细胞蛋白质含量的影响

Fig.4 Effect of growth phase on cellular protein content of *Isochrysis galbana* cultured in medium supplemented with 1.5 mg/mL NaHCO<sub>3</sub>

由不同培养阶段球等鞭金藻脂肪酸组成可知, 在添加 1.5 mg/L NaHCO<sub>3</sub> 条件下, 随着培养天数的增加, 14:0、16:0、18:1n9 和 18:2n6 含量逐渐增加, 18:3n-3、18:4n-3 和 22:6n3 含量显著减少; SFA 和 MUFA 含量逐渐增加, PUFA 含量则显著减少 (表4)。

表4 培养时间对添加 1.5 mg/mL NaHCO<sub>3</sub> 的球等鞭金藻细胞脂肪酸组成的影响

Table 4 Effect of growth phase on fatty acid profiles of *Isochrysis galbana* cultured in medium supplemented with 1.5 mg/mL NaHCO<sub>3</sub>

脂肪酸 Fatty acids	培养时间 Growth phase				
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
14:00	11.72±0.03 <sup>d</sup>	12.2±0.04 <sup>c</sup>	12.39±0.02 <sup>b</sup>	12.87±0.02 <sup>a</sup>	12.84±0.02 <sup>a</sup>
15:00	0.61±0.02 <sup>b</sup>	0.63±0.01 <sup>ab</sup>	0.63±0.02 <sup>ab</sup>	0.66±0.03 <sup>a</sup>	0.63±0.01 <sup>ab</sup>
16:00	8.37±0.05 <sup>c</sup>	9.11±0.02 <sup>d</sup>	9.17±0.02 <sup>c</sup>	9.29±0.02 <sup>b</sup>	9.53±0.01 <sup>a</sup>
16:1n7	5.86±0.03 <sup>a</sup>	5.78±0.02 <sup>b</sup>	5.73±0.02 <sup>c</sup>	5.68±0.03 <sup>d</sup>	5.56±0.03 <sup>e</sup>
16:2	1.28±0.03 <sup>a</sup>	1.07±0.02 <sup>b</sup>	1.06±0.03 <sup>b</sup>	0.99±0.03 <sup>c</sup>	0.96±0.02 <sup>c</sup>
S16	15.51±0.04 <sup>c</sup>	15.96±0.02 <sup>b</sup>	15.96±0.05 <sup>b</sup>	15.96±0.02 <sup>b</sup>	16.04±0.04 <sup>a</sup>
18:00	0.44±0.03 <sup>a</sup>	0.61±0.02 <sup>c</sup>	0.65±0.04 <sup>bc</sup>	0.67±0.02 <sup>b</sup>	1.04±0.04 <sup>a</sup>
18:1n9	12.93±0.06 <sup>e</sup>	13.41±0.07 <sup>d</sup>	13.58±0.08 <sup>c</sup>	14.67±0.05 <sup>b</sup>	15.98±0.03 <sup>a</sup>
18:1n7	1.77±0.03 <sup>c</sup>	2.06±0.04 <sup>b</sup>	2.08±0.03 <sup>b</sup>	1.69±0.03 <sup>d</sup>	2.17±0.04 <sup>a</sup>
18:2n6	7.45±0.07 <sup>e</sup>	8.64±0.03 <sup>d</sup>	10.2±0.04 <sup>c</sup>	10.73±0.06 <sup>b</sup>	10.83±0.02 <sup>a</sup>
18:3n3	19.24±0.05 <sup>a</sup>	18.11±0.05 <sup>b</sup>	17.66±0.08 <sup>c</sup>	16.97±0.02 <sup>d</sup>	16.14±0.05 <sup>e</sup>
18:4n3	18.65±0.11 <sup>a</sup>	18.33±0.05 <sup>b</sup>	17.62±0.06 <sup>c</sup>	16.88±0.03 <sup>d</sup>	15.55±0.08 <sup>e</sup>
S18	60.49±0.06 <sup>d</sup>	61.16±0.04 <sup>c</sup>	61.79±0.07 <sup>a</sup>	61.61±0.06 <sup>b</sup>	61.71±0.02 <sup>a</sup>
20:5n3	0.76±0.02 <sup>c</sup>	0.81±0.02 <sup>b</sup>	0.83±0.02 <sup>b</sup>	0.84±0.04 <sup>b</sup>	0.97±0.02 <sup>a</sup>
22:00	0.73±0.02 <sup>a</sup>	0.54±0.02 <sup>b</sup>	0.48±0.02 <sup>c</sup>	0.4±0.01 <sup>d</sup>	0.4±0.02 <sup>d</sup>
22:1	0.64±0.03 <sup>a</sup>	0.57±0.02 <sup>b</sup>	0.52±0.02 <sup>c</sup>	0.57±0.02 <sup>b</sup>	0.41±0.02 <sup>d</sup>
22:5n3	0.36±0.02 <sup>a</sup>	0.39±0.07 <sup>a</sup>	0.29±0.02 <sup>b</sup>	0.23±0.02 <sup>bc</sup>	0.21±0.02 <sup>c</sup>
22:5n6	1.12±0.03 <sup>a</sup>	0.99±0.01 <sup>b</sup>	0.96±0.02 <sup>bc</sup>	0.91±0.02 <sup>d</sup>	0.92±0.03 <sup>cd</sup>
22:6n3	8.05±0.06 <sup>a</sup>	6.75±0.07 <sup>b</sup>	6.15±0.08 <sup>c</sup>	5.94±0.06 <sup>d</sup>	5.87±0.05 <sup>d</sup>
SFA	21.9±0.02 <sup>e</sup>	23.36±0.02 <sup>d</sup>	23.67±0.07 <sup>c</sup>	24.33±0.03 <sup>b</sup>	25.01±0.06 <sup>a</sup>
MUFA	21.29±0.14 <sup>d</sup>	21.79±0.04 <sup>c</sup>	21.87±0.08 <sup>c</sup>	22.44±0.06 <sup>b</sup>	24.11±0.03 <sup>a</sup>
PUFA	56.8±0.13 <sup>a</sup>	54.85±0.02 <sup>b</sup>	54.45±0.03 <sup>c</sup>	53.23±0.07 <sup>d</sup>	50.88±0.03 <sup>e</sup>

表5 培养时间对添加 1.5 mg/mL NaHCO<sub>3</sub> 的球等鞭金藻细胞生物柴油质量的影响

Table 5 Effect of growth phase on biodiesel quality of *Isochrysis galbana* cultured in medium supplemented with 1.5 mg/mL NaHCO<sub>3</sub>

品质指标 Quality items	培养时间 Growth phase				
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
运动黏度(Vis, mm <sup>2</sup> ·s <sup>-1</sup> )	3.82±0 <sup>a</sup>	3.78±0 <sup>b</sup>	3.77±0 <sup>c</sup>	3.75±0 <sup>d</sup>	3.75±0 <sup>d</sup>
碘值(IV, gI <sub>2</sub> ·100g <sup>-1</sup> )	193.51±0.2 <sup>a</sup>	185.05±0.04 <sup>b</sup>	180.77±0.17 <sup>c</sup>	176.56±0.31 <sup>d</sup>	170.22±0.2 <sup>e</sup>
十六烷值(CN)	47.56±0.01 <sup>c</sup>	48.02±0.01 <sup>d</sup>	48.04±0.02 <sup>c</sup>	48.29±0.01 <sup>b</sup>	48.75±0.01 <sup>a</sup>

随着培养时间的延长, 运动黏度逐渐增加, 碘值逐渐降低, 十六烷值逐步增大。

### 3 讨论

大多数微藻的生长是基于光合作用并从外界环境中获取可溶性无机碳用于碳的固定,藻类的光合作用和碳固定过程受环境因素的调控,因此,环境因素的改变会影响到藻类的生长及细胞组成<sup>[22,23]</sup>。一般认为,藻类的光合作用的碳源底物是二氧化碳,然而,在正常海水中,因其 pH 呈碱性(约 8.1 左右),超过 90%的可溶性无机碳是以  $\text{HCO}_3^-$  形式存在的,且从  $\text{HCO}_3^-$  到  $\text{CO}_2$  的自发转化率低<sup>[24]</sup>。微藻对环境中的  $\text{HCO}_3^-$  利用存在两种机制<sup>[25,26]</sup>:一方面,微藻能够从外界环境中跨质膜运输  $\text{HCO}_3^-$  到胞液中,然后在胞液内通过胞内碳酸酐酶的作用将  $\text{HCO}_3^-$  分解成  $\text{CO}_2$  供光合作用所需。另一方面,有些微藻分泌的细胞外的碳酸酐酶也可以将环境中的  $\text{HCO}_3^-$  催化成  $\text{CO}_2$ ,然后  $\text{CO}_2$  跨膜被藻细胞利用。然而,不同的藻类产生碳酸酐酶的部位及其活性是不一样的,由此也决定了不同藻类利用环境中  $\text{HCO}_3^-$  的能力是不一样的<sup>[27,28]</sup>。White 等<sup>[11]</sup>研究发现,与不添加组相比,在培养液中添加 1 g/L 碳酸氢钠,可以提高四片藻(*Tetraselmis suecica*)和微绿球藻(*Nannochloropsis salina*)培养的细胞密度,然而,培养液中碳酸氢钠浓度不会改变四片藻细胞的特殊生长率(SGR),且微绿球藻的 SGR 随碳酸氢钠浓度的增加而降低。Gardner 等<sup>[29]</sup>发现培养液中添加碳酸氢钠会抑制栅藻(*Scenedesmus sp.*)的繁殖,但对三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*)不起作用。Yhe 等<sup>[30]</sup>认为,培养液中添加 1000 mg/L 的碳酸氢钠对提升小球藻(*Chlorella vulgaris* ESO-31)生物量是最好的。Pancho 等认为在 BG-11 培养基中添加 0.6 g/L 碳酸氢钠可以增加栅藻的生物量<sup>[10]</sup>。在培养液中添加不同浓度的  $\text{NaHCO}_3$  对等鞭藻 3011 和塔溪堤生长影响明显,对绿色巴夫藻的影响程度明显小于其它两种金藻。3 株海洋微藻的细胞浓度在  $\text{NaHCO}_3$  浓度最大时(1600 mg/L)达最大值<sup>[8]</sup>。戴玉蓉等<sup>[31]</sup>发现在 5 种微藻的培养液中添加 1000 mg/L 的  $\text{NaHCO}_3$ ,后藻细胞浓度比不加  $\text{NaHCO}_3$  的对照组显著提高。塔胞藻(*Pyramimonas sp.*)和小球藻(*Chlorella spp.*)的细胞浓度都在  $\text{NaHCO}_3$  质量浓度为 1200 mg/L 时达到最大值;新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)的细胞浓度在  $\text{NaHCO}_3$  质量浓度为 400 mg/L 时达到最大值<sup>[8]</sup>。本研究中,培养液中添加 1.5 g/L 的碳酸氢钠,球等鞭金藻的比生长率及细胞密度均是最高,添加 2 g/L 的碳酸氢钠组球等鞭金藻的比生长率及细胞密度反而有所下降。上述研究表明,培养液中添加适量碳酸氢钠对微藻类的促生长作用具有种的特异性。有研究表明,四片藻更喜欢利用胞外碳酸酐酶将  $\text{HCO}_3^-$  催化成  $\text{CO}_2$  然后转运至进细胞内,而微绿球藻倾向于将主动转运至细胞内在经碳酸酐酶作用<sup>[32]</sup>。对于那些添加碳酸氢钠可以促生长的藻类,适量添加碳酸氢钠促生长的机理推测与两方面有关:一方面,培养液中添加的碳酸氢钠增加光合作用的底物浓度从而有利于光合作用。已有的研究也证实,培养液中添加适量碳酸氢钠可以提升四片藻和微绿球藻的光合作用效率( $F_v/F_m$ )<sup>[11]</sup>;另一方面培养液中添加的碳酸氢钠促进了藻细胞对其他营养盐的吸收。在添加碳酸氢钠组培养液中微藻对培养液中氮的利用显著增加<sup>[11]</sup>。而过高的碳酸氢钠添加量抑制藻类生长,可能与培养液中过量添加的碳酸氢钠导致培养液 pH 值过高有关<sup>[30]</sup>。pH 超过藻类的最适范围会抑制藻类的生长,同时过高的 pH 会导致水体中微量矿物元素的沉淀,同时导致无机碳向  $\text{CO}_3^{2-}$  转变,而光合作用的藻类是不能利用  $\text{CO}_3^{2-}$ <sup>[33]</sup>。

本研究中,培养液中添加碳酸氢钠对球等鞭金藻的细胞蛋白质含量和脂肪酸组成有显著影响,随着培养液中碳酸氢钠添加量的增大,藻细胞中蛋白质含量逐渐降低,单不饱和脂肪酸(MUFA)显著增加;而多不饱和脂肪酸(PUFA)显著降低。类似的结果在其他藻类中也得到证实。在添加 2 g/L 碳酸氢钠培养液中,微绿球藻细胞 SFA 含量显著增加, MUFA 含量显著降低<sup>[11]</sup>。藻细胞蛋白质含量随碳酸氢钠添加量的增大而降低的原因,推测与培养液中 C/N 比增大有关。培养液中高的 C/N 比在某种程度上意味着 N 的相对缺乏,而氮缺乏会抑制藻细胞合成蛋白质,转而将能量以脂类和碳水化合物的形式贮存在细胞中<sup>[34]</sup>。White 等证实,四片藻和微绿球藻的细胞脂肪含量均会随培养液中碳酸氢钠的增加而增加。培养液中添加碳酸氢钠也有助于栅藻和三角褐指藻细胞蓄积脂肪<sup>[29]</sup>。而栅藻细胞在缺氮和添加碳酸氢钠的情况下则蓄积大量的碳水化合物<sup>[10]</sup>。

本研究中,随着培养天数的增加,细胞蛋白质含量降低, SFA 和 MUFA 含量逐渐增加, PUFA 含量显著减少。已有的文献也证实了这种规律。黄旭雄<sup>[14]</sup>等研究发现,培养阶段显著影响微绿球藻的蛋白质含量、脂肪含量、氨基酸含量及脂肪酸组成,批次培养模式下随着培养时间的延长,藻细

胞蛋白质含量显著降低, SFA 含量显著增加, PUFA 含量显著降低。等鞭金藻的粗蛋白质含量随培养时间的延长而降低<sup>[35]</sup>。培养阶段影响藻细胞生化组成的原因, 推测与培养液中营养盐的变化有关。由于藻类生长过程中不断吸收利用培养液中的营养盐, 导致营养盐的缺乏有关。而营养盐缺乏, 尤其是氮的缺乏, 引起藻细胞生化组成变化的显著特点就是细胞蛋白质含量降低, 脂肪含量增加, 饱和脂肪酸增加, 多不饱和脂肪酸降低<sup>[34]</sup>。本研究中, 对比前后 2 次试验的藻细胞营养组成, 可以发现在光生物反应器中开展不同培养时间对藻细胞营养组成试验中, 球等鞭金藻表现出更低的蛋白质含量, 这与两次实验的培养条件不完全一致有关。光生物反应器中的试验因接种密度高, 且连续充气, 推测氮胁迫程度相比第一个试验更加强烈, 从而表现出更低的细胞蛋白质含量。

生物柴油即脂肪酸甲酯, 是一种可再生且可生物降解的能源, 目前已作为传统生物柴油的替代品加以利用。据 Kevin J.Harrington<sup>[36]</sup>的研究表明, 作为柴油替代品的理想物质应当具有的分子结构是: 有较长的碳直链; 含有一定量的氧元素; 分子结构尽量没有或只有很少的碳支链; 分子中不含有芳香烃结构。而本实验中球等鞭金藻的主要组成为 C16 和 C18 脂肪酸甲酯, 因此, 可作为一种柴油替代品。运动粘度是液体流动时内摩擦力的量度, 其值随温度升高而降低, 是衡量燃料流动性能及雾化性能的指标, 轻质柴油适宜的运动粘度为 1.9~6.0 mm<sup>2</sup>/s<sup>[37]</sup>。本试验中, 各试验组运动粘度变化不大, 在 3.78~3.91 mm<sup>2</sup>/s 之间, 均符合生物柴油品质标准。碘值是表示有机化合物中不饱和程度的一种指标, 是对油脂分子碳链不饱和度的度量, 指 100 g 物质中所能吸收(加成)碘的克数。而碘值高, CN 值就低, CN 值表示柴油燃料的点火延迟时间和燃烧性能, 是反映微藻生物柴油的重要指标, 一般认为, 适宜的柴油 CN 值应为 45~65<sup>[39]</sup>。若 CN 太大, 则燃料与空气未经适宜混合就予以燃烧而导致燃烧不完全并产生黑烟。若 CN 太小则燃料发火困难, 不易启动并易导致发动机爆震<sup>[38]</sup>。藻细胞的脂肪酸组成是影响 CN 的重要因素。本研究中的球等鞭金藻的 CN 值介于 47.56~54.92, 均处于生物柴油合适的范围, 且随着培养液中 NaHCO<sub>3</sub> 添加量和培养时间的延长, CN 有所改善。

综上所述, 一次性培养模式下, 培养液中添加 NaHCO<sub>3</sub> 可以提升球等鞭金藻培养密度和比生长率, 降低细胞蛋白质含量和脂肪酸中 PUFA 含量, 提升 SFA 比例, 提高运动黏度和 CN 值; 而增加培养时间也可以降低藻细胞蛋白质含量和脂肪酸中 PUFA 比例。添加 NaHCO<sub>3</sub> 可作为提升球等鞭金藻作为生物柴油原料品质的有效策略。

## 参考文献

- [1] 戴俊彪, 吴庆余. 室外培养海洋单细胞微藻的生长及生化组分[J]. 海洋科学, 2000, 24(6): 29-32
- [2] Reitan KI, Rainuzzo JR, Olsen Y. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae[J]. Journal of Phycology, 1994, 30: 972-979
- [3] Khozin-Goldberg I, Iskandarov U, Cohen Z. LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91: 905-915
- [4] Roopnarain A, Gray VM, Sym S. The influence of nitrogen stress on *Isochrysis galbana* U4, a candidate for biodiesel production[J]. Phycology Research, 2014, 62 (4): 237-249
- [5] 孙利芹, 杨林涛. 环境因子对球等鞭金藻脂肪酸含量和组成的影响[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(5): 11-13
- [6] 孙颖颖, 孙利芹, 王长海. 球等鞭金藻的培养条件研究[J]. 海洋通报, 2005, 24(3): 93-96
- [7] Sánchez S, Martínez M, Espinola F. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium[J]. Biochemical Engineering Journal, 2000, 6(1): 13-18
- [8] 梁英, 麦康森, 孙世春, 等. NaHCO<sub>3</sub> 浓度对塔胞藻、小球藻和新月菱形藻生长的影响[J]. 黄渤海研究, 2001, 19(2): 71-76
- [9] 滕怀丽, 黄旭雄, 周洪琪, 等. 充气方式对盐藻生长、细胞营养成分及氮磷营养盐利用的影响[J]. 水产学报, 2000, 34(6): 942-948
- [10] Pancha I, Chokshi K, Ghosh T, et al. Bicarbonate supplementation enhanced biofuel production potential as well as nutritional stress mitigation in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077[J]. Bioresource technology, 2015, 193: 315-323
- [11] White DA, Pagarette A, Rooks P, et al. The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures[J]. Journal of Applied Phycology, 2013, 25: 153-165
- [12] El-Ansari O, Colman B. Inorganic carbon acquisition in the acid-tolerant alga *Chlorella kessleri*[J]. Physiologia of Plantarum, 2015, 153(1): 175-182
- [13] 梁英, 麦康森, 孙世春. NaHCO<sub>3</sub> 浓度对等鞭藻 3011, 等鞭藻塔溪堤品系和绿色巴夫藻生长的影响[J]. 中国水产科

- 学,2001,8(1):37-40
- [14] 黄旭雄,周洪琪,朱建忠,等.不同生长阶段微绿球藻的营养价值[J].水产学报,2004,28(4):477-480
- [15] Roopnarain A, Sym SD, Gray VM. Time of culture harvest affects lipid productivity of nitrogen-starved *Isochrysis galbana* U4 (Isochrysidales:Haptophyta)[J]. Aquaculture, 2015,438:12-16
- [16] 成永旭.生物饵料培养学[M].北京:中国农业出版社,2005
- [17] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951,193:265-275
- [18] Griffiths MJ, Van Hille RP, Harrison ST. Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae[J]. Lipids, 2010,45(11):1053-1060
- [19] Piloto-Rodríguez R, Sánchez-Borroto Y, Lapuerta M, *et al.* Prediction of the cetane number of biodiesel using artificial neural networks and multiple linear regression[J]. Energ Convers Manage, 2013,65:255-261
- [20] 段敏.小球藻油制备生物柴油的试验和优化工艺研究[D].杭州:浙江大学,2011
- [21] Kalayasiri P, Jeyashoke N, Krisnangkura K. Survey of seed oils for use as diesel fuels[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1996,73(4):471-474
- [22] Hu Q. Environmental effects on cell composition[M]//Amos and Richard. Handbook of microalgal culture, biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Publishing, 2004:83-94
- [23] Wei L, Huang X, Huang Z, *et al.* Orthogonal test design for optimization of lipid accumulation and lipid property in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel production[J]. Bioresource technology, 2013,147:534-538
- [24] Skirrow G. The dissolved gases carbon dioxide[C]//Riley JP, Skirrow G. Chemical oceanography. Academic.London:1975:1-92
- [25] Bozzo GG, Colman B, Matsuda Y. Active transport of CO<sub>2</sub> and bicarbonate is induced in response to external CO<sub>2</sub> concentration in the green alga *Chlorella kessleri*[J]. Journal of Experimental Botany, 2000,51:1341-1348
- [26] Young E, Beardall J, Giordano M. Inorganic carbon acquisition by *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) involves external carbonic anhydrase and direct HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> utilization insensitive to the anion exchange inhibitor DIDS[J]. European Journal of Phycology, 2001,36:81-88
- [27] Nimer NA, IglesiasRodriguez MD, Merrett MJ. Bicarbonate utilization by marine phytoplankton species[J]. Journal of Phycology, 1997,33:625-631
- [28] Dason JS, Huertas IE, Colman B. Source of inorganic carbon for photosynthesis in two marine dinoflagellates[J]. Journal of Phycology, 2004,40:285-292
- [29] Gardner RD, Cooksey KE, Mus F, *et al.* Use of sodium bicarbonate to stimulate triacylglycerol accumulation in the chlorophyte *Scenedesmus* sp. and the diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. Journal of Applied Phycology, 2012, 24:1311-1320
- [30] Yeh KL, Chang JS, Chen WM. Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31[J]. English Life Science, 2010,10:201-208
- [31] 戴玉蓉,卢敬让.NaHCO<sub>3</sub>在单胞藻藻种培养中的作用[J].齐鲁渔业,1997,14(5):20-21
- [32] Huertas IE, Colman B, Espie GS. Inorganic carbon acquisition and its energization in eustigmatophyte algae[J]. Functional Plant Biology, 2002,29:271-277
- [33] Chen CY, Durbin EG. Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton[J]. Marine Ecology Progress Series, 1994,109:83-94
- [34] Huang XX, Huang ZZ, Wen W, *et al.* Effects of nitrogen supplementation of the culture medium on the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*)[J]. Journal of Applied Phycology, 2013,25:129-137
- [35] Zhu CJ, Lee YK, Chao TM. Effect of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1[J]. Journal of Applied Phycology, 1997,9:451-457
- [36] Harrington KJ. Chemical and physical properties of vegetable oil esters and their effect on diesel fuel performance[J]. Biomass, 1986,9(86):1-17
- [37] 梅帅,赵凤敏,曹有福,等.三种小球藻生物柴油品质指标评价[J].农业工程学报,2013(15):229-235
- [38] Knothe G, Matheaus AC, Ryan III TW. Cetane numbers of branched and straight-chain fatty esters determined in an ignition quality tester[J]. Fuel, 2003,82(8):971-975