

小球藻产油脂培养条件的优化

李翠芬¹, 吴小情², 尹爱国²

(1. 茂名职业技术学院, 广东 茂名 525000; 2. 广东石油化工学院, 广东 茂名 525000)

摘要: 为了更好的开发利用小球藻, 探讨了光照强度、pH 值及氮盐、磷盐、铁盐质量浓度等因素对小球藻油脂产量的影响, 并采用单因素和正交试验对小球藻的培养条件进行优化。结果表明, 小球藻的最佳培养条件为光照 5 000 lx、pH 值 6、氮盐质量浓度 100 mg/L、磷盐质量浓度 160 mg/L、铁盐质量浓度 100 mg/L, 在此条件下, 小球藻油脂产量最大, 为 615.12 mg/L。

关键词: 小球藻; 油脂; 产量; 正交试验

中图分类号: S968.41 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)10-0156-04

Optimization of Culture Conditions on Lipid Production of *Chlorella*

LI Cui-fen¹, WU Xiao-qing², YIN Ai-guo²

(1. Maoming Polytechnic, Maoming 525000, China; 2. Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming 525000, China)

Abstract: To better exploit and utilize *Chlorella*, the effects of pH value, light intensity concentration of nitrogen salt, phosphorus salt and iron salt on lipid production of *Chlorella* were studied, and the culture conditions of *Chlorella* were optimized by the single factor and orthogonal experiments. The results showed that the optimum culture conditions of *Chlorella* were light intensity of 5 000 lx, pH value of 6, nitrogen salt concentration of 100 mg/L, phosphorus salt concentration of 160 mg/L, iron salt concentration of 100 mg/L, under the above conditions, the lipid output of chlorella was the largest with 615.12 mg/L.

Key words: *Chlorella*; lipid; output; orthogonal experiment

石油作为燃料造成的污染越来越严重。因此, 各国纷纷开发新的清洁的“绿色环保型能源”, 如风力发电、潮汐能发电、太阳能利用等。而其中, 生物能源的发展最为蓬勃, 其具有生长要求简单、易于大量繁殖、开发成本低等各种优点。在众多的生物能源当中, 微藻具有光合作用效率高、环境适应能力强、生长周期短、生物产量高的特点^[1], 是获得生物柴油和生物质油的优良原料来源^[2]。大多数微藻的产油量均可以超过油料作物^[3-5], 美国能源部的研究项目已经确切证实硅藻具有极高的生长能力, 在单位面积、单位时间内微藻比陆生作物能提供更多的能量^[4,6]。微藻油脂

的年产量是油菜籽的 200 倍、大豆的 75 倍、油棕的 15 倍^[7]。利用微藻油脂转化生产生物柴油及其他相关代谢产品, 部分替代化石能源, 是可持续发展的必然要求。目前, 关于小球藻的研究主要集中在小球藻异养生产和叶黄素的提取^[8-9]、小球藻生产虾青素^[10]、小球藻多糖的分离鉴定^[11]等。随着全球能源短缺日益严峻, 人们把目光转向了小球藻生产生物柴油的研究。通过优化小球藻培养条件来提高小球藻的油脂产量, 以满足小球藻生产生物柴油的需要。为此, 通过单因素和正交试验对小球藻产油脂培养条件进行优化, 为利用小球藻制备生物柴油提供理论依据。

收稿日期: 2014-03-07

基金项目: 茂名市科技计划项目(2012B01032)

作者简介: 李翠芬(1965-), 女, 广东茂名人, 高级工程师, 本科, 主要从事园林及环境生态方面的研究。

E-mail: 739209001@qq.com

1 材料和方法

1.1 供试材料

小球藻来源于广东海洋大学。

试剂: NaNO_3 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、 Na_2EDTA 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。生化试剂: 维生素 B_1 、维生素 B_{12} 、生物素。

仪器: SPX-250B-G 微电脑光照培养箱、SW-CJ-2F 洁净工作台、立式压力蒸汽灭菌器、D2F-6050 真空干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂), 80-2 电动离心机(常州澳华仪器有限公司), FA210-6050 电子分析天平(上海良平仪器仪表有限公司), 722N 可见分光光度计(上海元析仪器有限公司), JY92-2D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司), RM-220 实验室专用超纯水机(重庆利迪实验室仪器设备有限公司)。

1.2 培养基

培养小球藻的培养基参照 f/2 培养基^[12], 其配方为: NaNO_3 75 mg、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5 mg、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3.16 mg、 Na_2EDTA 4.36 mg、 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 20 mg、维生素 B_1 1×10^{-4} mg、维生素 B_{12} 5×10^{-4} mg、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.012 mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 mg、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.07 mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.023 mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.18 mg、生物素 5×10^{-4} mg, 加自然海水至 1 L。

海水从茂名市的中国第一滩取得, 经沙滤、煮沸、滤纸过滤、灭菌后使用。

1.3 小球藻培养条件的单因素试验

将小球藻种按照体积比为 1:3 接种至 f/2 液体培养基中, 在温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光暗周期 12 h/12 h 的培养箱中光照培养 7 d, 每天不定期摇瓶数次, 以防止藻细胞沉淀或贴壁生长。

1.3.1 光照强度 在培养基 pH 值 6、温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光暗周期为 12 h/12 h 的条件下, 研究光照强度 1 600、5 000、6 600、10 000 lx 对小球藻油脂产量的影响。

1.3.2 pH 值 在光照强度 5 000 lx、温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光暗周期 12 h/12 h 的条件下, 研究培养基 pH 值(5、6、7、8)对小球藻油脂产量的影响。

1.3.3 氮盐质量浓度 在培养基 pH 值 6、光照强度 5 000 lx、温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光暗周期 12 h/12 h 的条件下, 研究氮盐质量浓度(50、100、200、300 mg/L)

对小球藻油脂产量的影响。

1.3.4 磷盐质量浓度 在培养基 pH 值 6、光照强度 5 000 lx、温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光暗周期 12 h/12 h 的条件下, 研究磷盐质量浓度(10、20、80、160 mg/L)对小球藻油脂产量的影响。

1.3.5 铁盐质量浓度 在培养基 pH 值 6、光照强度 5 000 lx、温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光暗周期 12 h/12 h 的条件下, 研究铁盐质量浓度(10、20、40、100 mg/L)对小球藻油脂产量的影响。

1.4 油脂的粗提取

参照文献[13]的方法, 离心收集初始接种时和第 9 天的藻细胞, 冻干后按照以下方法测定油脂含量: 在 15 mL 离心管中加入 25 mg(W)干燥粉、2 mL 氯仿、1 mL 甲醇, 混匀, 25°C 保持 24 h; 混匀后用超声波细胞粉碎机间隔 10 s 的频率破碎 20 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液到已称质量的干净小瓶中(W_1); 向离心管中再加入 1 mL 氯仿-甲醇混合液(体积比 2:1), 3 000 r/min 离心 10 min, 将上清液转入上述收集第 1 次上清液的小瓶中; 将小瓶置入 65°C 烘箱中烘干至恒质量(W_2)。油脂含量(C)计算公式为: $C = (W_2 - W_1) / W \times 100\%$ 。

1.5 油脂产量的计算

参照文献[14]的方法, 在培养结束时, 精确量取每个培养管中藻液体积(V), 根据生物量(B)、油脂含量(C), 计算油脂产量(P), $P = B \times C / V$ 。

1.6 小球藻培养条件的正交试验

在单因素试验基础上, 对小球藻培养基中的氮盐、磷盐、铁盐质量浓度进行三因素四水平 $L_{16}(4^3)$ 正交试验, 试验设计见 1。

表 1 小球藻培养条件的正交试验设计 mg/L

水平	因素		
	NaNO_3 质量浓度(A)	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度(B)	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度(C)
1	50	10	10
2	100	20	20
3	200	80	40
4	300	160	100

2 结果与分析

2.1 小球藻培养条件的单因素试验结果

2.1.1 光照强度 由图 1 可知, 随着光照强度增加小球藻油脂产量先增加后降低最终趋于平缓, 当光照强度为 5 000 lx 时, 小球藻油脂产量最高, 为

167.66 mg/L,之后随光照强度增加油脂产量略有下降。因此,综合考虑,培养小球藻的光照强度以 5 000 lx 为佳。

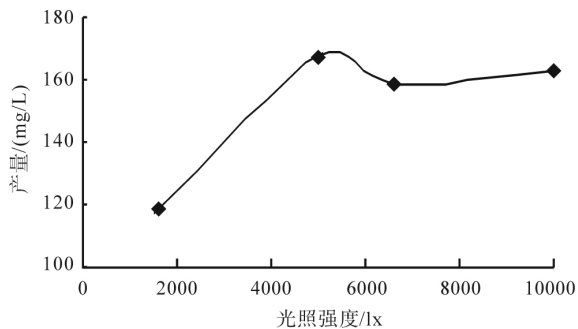


图 1 光照强度对小球藻油脂产量的影响

2.1.2 pH 值 由图 2 可知,随着培养基 pH 值升高,小球藻油脂产量明显升高,当 pH 值为 6 时,小球藻油脂产量最高,为 164.22 mg/L;当 pH 值超过 6 时,小球藻油脂产量明显下降。因此,培养小球藻的 pH 值以 6 为佳。

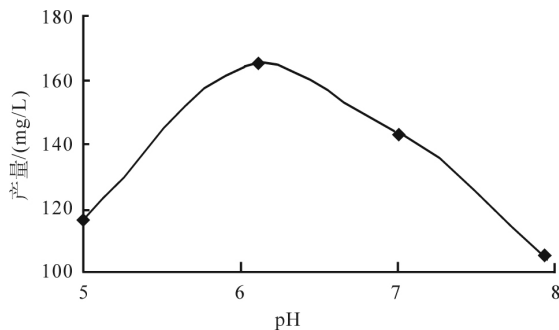


图 2 pH 值对小球藻油脂产量的影响

2.1.3 氮盐质量浓度 由图 3 可知,随着培养基氮盐质量浓度增加,小球藻油脂产量先增加后趋于平缓。氮盐质量浓度低于 200 mg/L 时,随着氮盐质量浓度增加小球藻油脂产量明显增加;当氮盐质量浓度增加到 200 mg/L 时,小球藻油脂产量为 214.71 mg/L;氮盐质量浓度增加到 300 mg/L 时,小球藻油脂产量增加不明显,为 215.65 mg/L。因此,

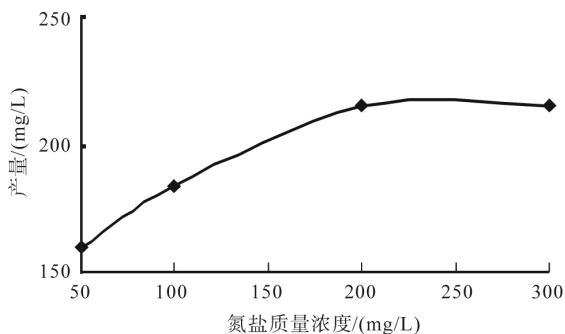


图 3 氮盐质量浓度对小球藻油脂产量的影响

综合考虑,培养小球藻的氮盐质量浓度以 200 mg/L 为佳。

2.1.4 磷盐质量浓度 由图 4 可知,随着培养基磷盐质量浓度增加,小球藻油脂产量先迅速增加后缓慢下降之后略微恢复,当磷盐质量浓度为 20 mg/L 时,油脂产量最高,为 285.17 mg/L;之后油脂产量开始缓慢下降,当磷盐质量浓度为 160 mg/L 时,油脂产量略微增加,为 284.37 mg/L。因此,综合考虑,培养小球藻的磷盐质量浓度以 20 mg/L 为佳。

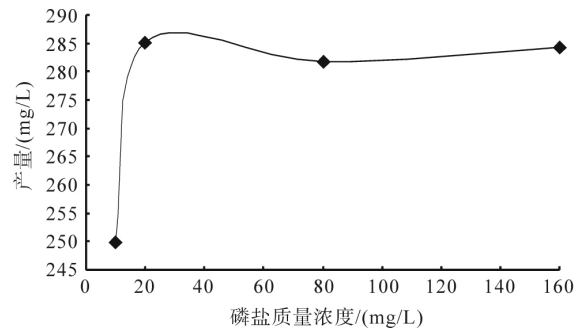


图 4 磷盐质量浓度对小球藻油脂产量的影响

2.1.5 铁盐质量浓度 由图 5 可知,随着培养基铁盐质量浓度增加,小球藻油脂产量先迅速增加后缓慢增加。当磷盐质量浓度低于 40 mg/L 时,随着培养基铁盐质量浓度增加油脂产量迅速增加;当磷盐质量浓度增加到 40 mg/L 时,油脂产量为 297.06 mg/L;当磷盐质量浓度增加到 100 mg/L 时,油脂产量略有增加,为 319.88 mg/L。因此,综合考虑,培养小球藻的铁盐质量浓度以 40 mg/L 为佳。

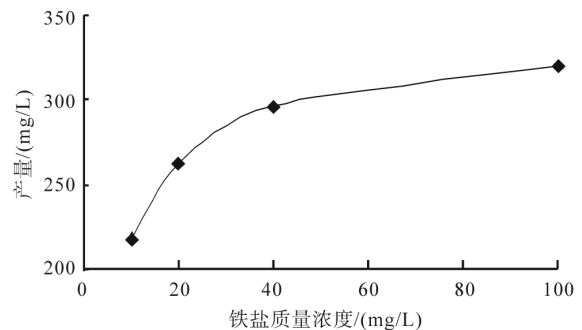


图 5 铁盐质量浓度对小球藻油脂产量的影响

2.2 小球藻培养条件的正交试验结果

在单因素试验结果的基础上,采用正交试验对影响小球藻油脂产量的氮盐、磷盐和铁盐质量浓度进行进一步的优化,试验结果见表 2。由表 2 可知,各因素对小球藻油脂生产影响的主次顺序为: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} > \text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} > \text{NaNO}_3$, 小球藻油脂生产的最佳培养条件为 NaNO_3 100 mg/L、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

160 mg/L、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/L。

表 2 小球藻培养条件的正交试验结果

试验编号	因素			油脂产量/ (mg/L)
	A	B	C	
1	1	1	1	204.94
2	1	2	2	295.03
3	1	3	3	294.42
4	1	4	4	603.93
5	2	1	2	201.25
6	2	2	3	416.36
7	2	3	4	534.26
8	2	4	1	502.08
9	3	1	3	339.37
10	3	2	4	270.61
11	3	3	1	367.07
12	3	4	2	319.80
13	4	1	4	370.68
14	4	2	1	344.72
15	4	3	2	338.30
16	4	4	3	302.07
K_1	1 398.32	1 116.25	1 418.81	
K_2	1 653.95	1 326.72	1 154.37	
K_3	1 296.84	1 534.05	1 352.23	
K_4	1 355.78	1 727.88	1 779.48	
k_1	349.58	279.06	354.70	
k_2	413.49	331.68	288.60	
k_3	324.21	383.51	444.87	
k_4	338.27	431.97	450.74	
R	89.28	152.91	156.28	

2.3 小球藻油脂生产的最佳培养条件的验证

通过进一步试验验证得到,在 pH 值 6、光照 5 000 lx、温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光暗周期 12 h/12 h 的条件下,当氮盐为 100 mg/L、磷盐为 160 mg/L、铁盐 100 mg/L 时,小球藻油脂产量为 615.12 mg/L,高于表 2 中所有组合的结果。

3 结论

本研究通过单因素和正交试验,确定了小球藻产油脂的最佳培养条件,并确定了影响小球藻油脂生产的氮、铁、磷盐的主次顺序,即 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} >$

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} > \text{NaNO}_3$ 。小球藻积累油脂的最佳培养条件为:pH 值 6、光照 5 000 lx、氮盐质量浓度 100 mg/L、磷盐氮盐质量浓度 160 mg/L、铁盐氮盐质量浓度 100 mg/L,在此条件下,小球藻的油脂产量最大,达 615.12 mg/L。

参考文献:

- [1] Chisti Y. Biodiesel from microalgae[J]. Biotechnol, 2007,25(3):294-306.
- [2] 郑洪立,张齐,马小琛,等. 产生物柴油微藻培养研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2009,29(3):110-116.
- [3] 王兆凯. 基于海洋硅藻的生物燃油生产[J]. 渔业现代化,2008,35(2):60-63.
- [4] Turner J A. A realizable renewable energy future[J]. Science,1999,285:687-689.
- [5] 缪晓玲,吴庆余. 微藻油脂制备生物柴油的研究[J]. 太阳能学报,2007,28(2):219-222.
- [6] 张丽君,杨汝德. 小球藻的异养生长及培养条件优化[J]. 广西植物,2001,21(4):353-357.
- [7] Haag A. Algae bloom again[J]. Nature,2007,447:520-521.
- [8] 吴正云,曲春波,史贤明. 小球藻异养生长及叶黄素合成量影响因子的优化研究[J]. 上海交通大学学报:农业科学版,2007,15(1):6-11.
- [9] 桂林,史贤明,李琳,等. 高效液相色谱法测定蛋白核小球藻中的叶黄素[J]. 食品与发酵工业,2005,31(11):95-97.
- [10] 陈涛,向文洲,何慧,等. 不同碳源对小球藻 *Chlorella zofingiensis* 异养产虾青素的影响[J]. 微生物学通报,2007,34(5):56-58.
- [11] 李亚清,杨海波,刘艳,等. 小球藻多糖的分离纯化和组成分析[J]. 大连水产学院学报,2006,21(3):294-296.
- [12] 胡慧慧. 培养条件对小球藻生长和油脂积累的影响[D]. 宁波:宁波大学,2012.
- [13] 刘倩. 产能海洋微藻的分离筛选[D]. 宁波:宁波大学,2010.
- [14] 张桂艳,温小斌,梁芳,等. 重要理化因子对小球藻生长和油脂产量的影响[J]. 生态学报,2011,31(8):2076-2085.