

培养条件对蛋白核小球藻生长及油脂合成的影响

肖雪花¹, 占凌云¹, 戴静璇¹, 何勇锦^{1,2}, 陈必链^{1,2}

(1. 福建师范大学 生命科学学院, 福州 350117; 2. 福建师范大学 工业微生物教育部工程研究中心, 福州 350117)

摘要:以富油蛋白核小球藻为出发藻株, 研究自养、异养和混养培养模式对小球藻生物量和油脂含量的影响, 以及异养发酵培养基葡萄糖质量浓度、氮源种类及质量浓度对小球藻生长的影响。结果表明, 与自养和混养培养模式相比, 采用异养发酵方式培养蛋白核小球藻可获得最大的生物量和油脂含量。通过气相色谱法测得异养蛋白核小球藻油主要脂肪酸为棕榈酸(36.07%)、油酸(34.26%)、亚油酸(20.17%)和亚麻酸(6.12%)。经单因素试验优化得到最适蛋白核小球藻生长异养发酵培养基的葡萄糖质量浓度为60 g/L, 最适的氮源为酵母粉, 质量浓度为4 g/L, 在此条件下经192 h发酵, 蛋白核小球藻生物量可达12.43 g/L, 油脂产量为5.45 g/L。研究结果表明, 异养发酵培养获得的蛋白核小球藻油是一种潜在且可再生的新油源。

关键词:蛋白核小球藻; 异养发酵; 生物量; 油脂

中图分类号: TS222.1; Q936

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2021)01-0132-05

Effects of culture condition on the growth and oil synthesis of *Chlorella pyrenoidosa*

XIAO Xuehua¹, ZHAN Lingyun¹, DAI Jingxuan¹, HE Yongjin^{1,2}, CHEN Bilian^{1,2}

(1. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China;

2. Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education,

Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China)

Abstract: With oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* as original strain, the effects of different cultivation modes (autotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultivations) on the biomass and oil content of the microalga and the effects of glucose mass concentration, type and mass concentration of nitrogen source in the heterotrophic medium on the growth of the microalga were investigated. The results showed that *Chlorella pyrenoidosa* had the highest biomass and oil content by heterotrophic cultivation in comparison to the autotrophic and mixotrophic cultivations. The main fatty acids of *Chlorella pyrenoidosa* oil by heterotrophic cultivation were palmitic acid (36.07%), oleic acid (34.26%), linoleic acid (20.17%) and linolenic acid (6.12%) based on the GC results. The optimal heterotrophic cultivation conditions for *Chlorella pyrenoidosa* growth were obtained by single factor experiment as follows: glucose mass concentration 60 g/L, with yeast as nitrogen source and the mass concentration 4 g/L. Under the optimal conditions, *Chlorella pyrenoidosa* achieved 12.43 g/L of biomass and the oil yield was 5.45 g/L after fermentation for 192 h. These results showed that *Chlorella pyrenoidosa* oil obtained by heterotrophic cultivation was a potential and new edible oil source.

Key words: *Chlorella pyrenoidosa*; heterotrophic fermentation; biomass; oil

收稿日期: 2020-04-06; 修回日期: 2020-08-21

基金项目: “十三五”海洋经济创新发展示范项目(FZHJ04)

作者简介: 肖雪花(1995), 女, 在读硕士, 研究方向为小球藻异养发酵(E-mail) 17862971488@163.com。

通信作者: 陈必链, 教授, 博士(E-mail) chenbil@fjnu.edu.cn。

近年来, 随着我国经济形势稳定持续增长, 居民对食用植物油的需求也不断增加。2018年, 我国食用油年总消费量达3 849.6万t, 而国产油料榨油总产量为1 192.8万t^[1]。食用油对外依存度较高, 为

缓解目前食用油供需矛盾,增加自给率,开发新油源成为研究趋势。我国传统的食用植物油是花生油、菜籽油和大豆油。与花生、油菜籽、大豆等油料作物相比,微生物具有发酵周期短和油脂产量高的特点,因此利用微生物发酵开发食用油具有更广阔的应用前景,而开发微生物食用油成为食用油研究领域的热点方向之一。

2012年,《中华人民共和国食品安全法》和《新资源食品管理办法》已批准蛋白核小球藻为新资源食品。2015年,美国 TerraVia 公司通过异养发酵富油小球藻,向市场推出首款小球藻食用油(Culinary algae oil),品牌为 Thrive, 售价约为 190 元/kg。蛋白核小球藻是一种能够利用无机碳源(如 CO₂、碳酸盐等)进行自生长的单细胞圆形绿藻^[2]。与油料作物相比,蛋白核小球藻具有生长速度快、培养不占用耕地、油脂含量高、亚麻酸含量高等优势,受到食品行业的关注^[3]。蛋白核小球藻可通过自养、异养和混养 3 种模式进行培养获得油脂^[4]。与自养和混养模式相比,采用异养发酵小球藻合成油脂可使用现有微生物发酵设备装置并且油脂产量更高^[5]。Cerón - García 等^[6]在 2 L 发酵罐中异养培养小球藻,最终得到 64 g/L 的细胞干重,藻细胞中的油脂含量达到 50%。毕生雷等^[7]在 50 L 发酵罐中异养培养小球藻半连续发酵 112 h,藻细胞干重可达 100.9 g/L,油脂含量为 44.89%。因此,利用异养发酵蛋白核小球藻开发食用油可能是一种具有潜力的培养模式。

本文就实验室保存的 1 株富油蛋白核小球藻,研究培养条件(培养模式、葡萄糖质量浓度、氮源种类和氮源质量浓度)对微藻生长的影响,为开发小球藻食用油提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 藻种、试剂和培养基

蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*),本实验室保存。葡萄糖、硝酸钾、磷酸二氢钾、硫酸镁、硫酸亚铁、酵母粉、尿素、丙酮、氯仿、甲醇、正己烷,均为分析纯。

自养培养基采用改良 BG11 培养基^[8],氮源为 KNO₃, pH 6.5。异养和混养培养基:葡萄糖 20 g/L, KNO₃ 1.50 g/L, KH₂PO₄ 1.25 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.25 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 20 mg/L, A5 微量元素液 1 mg/L^[9], pH 6.5。

1.1.2 仪器与设备

HIRAYAMA 高压蒸汽灭菌锅,日立 CR21G 高速冷冻离心机, DHG - 9070A 电热鼓风干燥箱, SW - CJ - 2FD 超净工作台, Spectrum SP - 754 紫外分光光度计, Savtorius BSA124S 分析天平, 湘仪 H1650 - W 离心机, XW - 80A 旋涡振荡器, Christ ALPHA 2 - 4 LD PLUS 冻干机, DK - S 24 水浴锅, DYY - 6B 稳压稳流电泳仪。

1.2 试验方法

1.2.1 小球藻的自养培养和混养培养

将培养至对数期的藻种按 10% 接种量接入装有 100 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中,置于培养温度(28 ± 1)℃、光照强度 30 μmol/(m² · s)、摇床转速 200 r/min 下培养 192 h。测定蛋白核小球藻生物量,叶绿素、蛋白质、油脂含量。

1.2.2 小球藻的异养培养

将培养至对数期的藻种按 10% 接种量接入装有 100 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中,置于培养温度(28 ± 1)℃、避光以及摇床转速 200 r/min 下培养 192 h。测定蛋白核小球藻生物量,叶绿素、蛋白质、油脂含量及油脂脂肪酸组成,同时考察培养基中葡萄糖质量浓度、氮源种类及质量浓度对蛋白核小球藻生长的影响。

1.2.3 指标的测定

采用毕生雷等^[7]的方法测定蛋白核小球藻的生物量。蛋白核小球藻油采用氯仿 - 甲醇萃取法^[10]进行提取,油脂含量(Y₀)按下式计算。

$$Y_0 = m_0/m \times 100\% \quad (1)$$

式中:m₀为提取的总脂质量;m为原料质量。

采用李旭冉等^[11]的方法测定蛋白核小球藻的叶绿素 a 含量。

利用考马斯亮蓝法^[12]测定蛋白核小球藻的蛋白质含量。采用紫外可见分光光度计测定样液在 595 nm 下的吸光度。标准曲线及蛋白质含量(Y₁)计算如下。

$$OD_{595} = 0.0087X + 0.0543 (R^2 = 0.9828) \quad (2)$$

$$Y_1 = V_a X/m_c \times 100\% \quad (3)$$

式中:OD₅₉₅为 595 nm 处的吸光值;X为蛋白质质量浓度,μg/mL;V_a为藻液体积,mL;m_c为细胞干重,μg。

采用董丽荣等^[13]的方法将提取的蛋白核小球藻油进行甲酯化,再采用配备 DB - 35MS 毛细管柱(柱长 30 m,内径 0.25 mm,液膜厚 0.25 μm)和 FID 检测器的 5973N - 6890 气相色谱仪(Agilent, USA)分析油脂脂肪酸组成。测定条件:载气为 N₂,燃气

为空气,进样口温度 300 ℃,检测器温度 250 ℃;初始柱温 150 ℃保持 1 min,以 3 ℃/min 升温至 230 ℃保持 10 min;汽化室温度 300 ℃。

2 结果与讨论

2.1 培养模式对比

分别对蛋白核小球藻进行自养、异养和混养培养 192 h,测定培养结束时蛋白核小球藻的生物量、叶绿素 a 含量、油脂含量、蛋白质含量,结果见图 1。

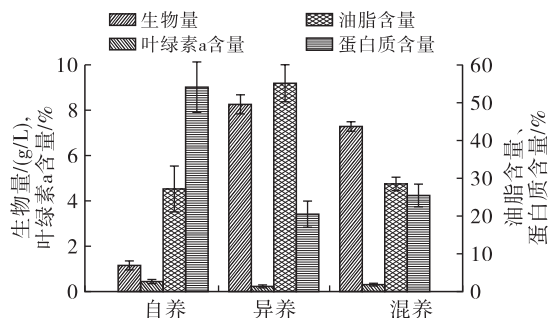


图 1 蛋白核小球藻在 3 种培养模式下的生物量、叶绿素 a 含量、油脂含量及蛋白质含量

由图 1 可知,经过 192 h 培养后,自养、异养和混养培养所得蛋白核小球藻的生物量分别为 1.14、8.23 g/L 和 7.27 g/L。桂林等^[14]选择 Basal 培养基,采用自养、异养和混养 3 种模式培养蛋白核小球藻 15-2070,生物量分别是 0.4、19.8 g/L 和 20.9 g/L。Lin 等^[15]发现以蔗糖为碳源, *Chlorella* sp. Y8-1 在自养、异养及混养条件下,最大生物量分别达到 0.22、0.17 g/L 和 0.40 g/L。与本文结果有出入,可能是因为小球藻的生物量与藻种来源、培养基组成等有关。

3 种培养模式中,自养模式培养的蛋白核小球藻具有最高的叶绿素 a (0.44%) 与蛋白质含量 (55%) 及最低的油脂含量 (27.43%);相反,异养模式培养的蛋白核小球藻具有最低的叶绿素 a (0.20%) 和蛋白质含量 (20%) 及最高的油脂含量 (54.79%)。这些结果与 Wang 等^[16]的研究结果一致。与异养模式相比,自养和混养模式培养的蛋白核小球藻受到光诱导作用,促进了微藻叶绿素 a 的合成,微藻细胞利用光合作用合成的糖类骨架向蛋白质方向转移,使自养或混养的微藻细胞具有更高的叶绿素 a 和蛋白质含量,异养模式培养的蛋白核小球藻由于缺乏光诱导作用和高浓度碳源使叶绿素 a 合成降低,同时蛋白质含量下降,转而合成脂肪酸^[17]。因此,异养培养是最适合该蛋白核小球藻合成油脂的培养模式。

异养培养的蛋白核小球藻脂肪酸组成见表 1。

表 1 异养蛋白核小球藻油的脂肪酸组成

脂肪酸	含量/%
C14:0	2.50 ± 1.12
C16:0	36.07 ± 5.08
C18:0	0.88 ± 0.26
C18:1	34.26 ± 4.89
C18:2	20.17 ± 4.01
C18:3	6.12 ± 1.79

由表 1 可知,蛋白核小球藻油的主要脂肪酸是棕榈酸 (36.07%)、油酸 (34.26%)、亚油酸 (20.17%) 和亚麻酸 (6.12%)。与花生油 (0.12%)^[18]、大豆油 (5.18%)^[19] 和玉米油 (0.48%)^[20] 相比,异养蛋白核小球藻油具有较高的亚麻酸含量。食用含亚麻酸的油脂可以促进机体合成二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸^[21]。因此,蛋白核小球藻油是一种可再生的新油源,可开发成为天然食用油。

2.2 蛋白核小球藻异养培养基的优化

在氮源为硝酸钾下研究了不同葡萄糖质量浓度 (20、40、60、80 g/L) 的单一变量对小球藻生物量的影响。同时在葡萄糖质量浓度 60 g/L、其余培养基组分不变的条件,研究了不同质量浓度的硝酸钾、尿素、酵母粉等无机和有机氮源对蛋白核小球藻生长的影响。

2.2.1 不同葡萄糖质量浓度对蛋白核小球藻生物量的影响 (见图 2)

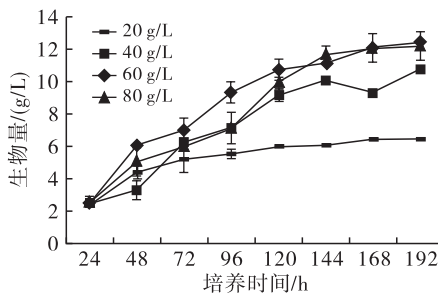


图 2 不同葡萄糖质量浓度对蛋白核小球藻生物量的影响

由图 2 可知,当葡萄糖质量浓度分别为 20、40、60、80 g/L 时,经 192 h 的异养发酵后,蛋白核小球藻的生物量分别为 6.48、10.69、12.21、12.19 g/L。经方差分析,葡萄糖质量浓度为 60 g/L 的蛋白核小球藻生物量与葡萄糖质量浓度为 80 g/L 的蛋白核小球藻生物量无显著差异。因此,选择适宜的葡萄糖质量浓度为 60 g/L。

2.2.2 不同硝酸钾质量浓度对蛋白核小球藻生物量的影响 (见图 3)

从图 3 可以看出,硝酸钾质量浓度为 4 g/L 时,异养培养 192 h 蛋白核小球藻的生物量达到最大,

为12.22 g/L。张薇等^[22]在硝酸钾质量浓度为0.08 g/L条件下异养培养 *C. pyrenoidosa* No. 2 7 d, 其生物量达3.73 g/L。桂林等^[14]在硝酸钾质量浓度为7 g/L条件下异养培养 *C. pyrenoidosa* 6 d, 其生物量可达19.8 g/L。这些研究所得蛋白核小球藻生物量与本文所得结果不一样, 可能是因为蛋白核小球藻的来源和培养条件不同。由图3还可以看出, 过高的硝酸钾质量浓度(6 g/L)会抑制蛋白核小球藻的生长。因此, 选择适宜的硝酸钾质量浓度为4 g/L。

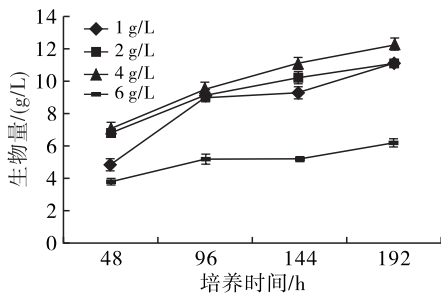


图3 不同硝酸钾质量浓度对蛋白核小球藻生物量的影响

2.2.3 不同尿素质量浓度对蛋白核小球藻生物量的影响(见图4)

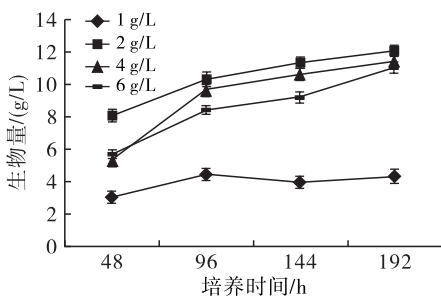


图4 不同尿素质量浓度对蛋白核小球藻生物量的影响

从图4可以看出: 将异养培养基的硝酸钾替换成尿素; 当尿素质量浓度为1 g/L时, 经192 h 异养发酵蛋白核小球藻生物量仅为4.44 g/L; 当尿素质量浓度增加到2 g/L时, 蛋白核小球藻生物量达

12.08 g/L; 当尿素质量浓度超过2 g/L时, 蛋白核小球藻的生物量反而下降, 这可能是因为过高尿素浓度会抑制蛋白核小球藻的生长。与硝酸钾为氮源(质量浓度4 g/L)相比, 尿素(质量浓度2 g/L)并不能显著提高蛋白核小球藻的生物量。因此, 尿素可能不是该蛋白核小球藻生长的最佳氮源。在这种情况下, 有必要对酵母粉进行进一步评估。

2.2.4 不同酵母粉质量浓度对蛋白核小球藻生物量的影响(见图5)

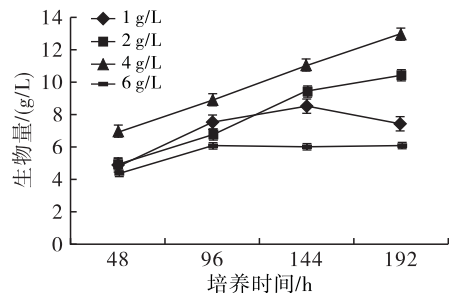


图5 不同酵母粉质量浓度对蛋白核小球藻生物量的影响

有研究表明, 在小球藻的培养基中添加适量的酵母粉, 可提高微藻的生物量^[23]。从图5可以看出, 将异养培养基中的硝酸钾替换为酵母粉, 当酵母粉质量浓度从1 g/L 提高到4 g/L时, 经过异养发酵后, 蛋白核小球藻的最大生物量逐渐增加到12.43 g/L。可是, 当酵母粉质量浓度继续增加到6 g/L时, 蛋白核小球藻的生长受到抑制, 最大生物量仅为6.05 g/L。该变化趋势与王方方等^[24]研究吻合。与硝酸钾作为氮源相比, 酵母粉更适合作为异养蛋白核小球藻的氮源。因此, 选择适宜的酵母粉质量浓度为4 g/L。

综上所述得出最适蛋白核小球藻发酵的葡萄糖质量浓度为60 g/L, 最适的氮源为酵母粉, 质量浓度为4 g/L。在此条件下经192 h 的异养发酵, 蛋白核小球藻的生物量可达12.43 g/L。不同小球藻在异养条件下生物量和油脂含量见表2。

表2 不同小球藻在异养条件下生物量和油脂含量

藻种	培养模式	生物量/(g/L)	油脂含量/%	油脂产量/(g/L)	参考文献
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	异养(优化前)	8.23 ± 0.42	54.79 ± 4.8	4.51 ± 0.02	本研究
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	异养(优化后)	12.43 ± 0.36	43.85 ± 3.2	5.45 ± 0.01	本研究
<i>Chlorella</i> sp. Y8-1	异养	0.17	5.90	0.01	[15]
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> FACHB-29	异养	5.6	25.0	1.4	[25]
<i>Chlorella vulgaris</i>	异养	2.0	23.18	0.46	[26]
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> -15	异养	4.42	19.25	0.85	[27]

由表2可知, 本文所选择的蛋白核小球藻藻种, 其生物量、油脂含量高于现有报道的结果。值得注意的是, 经优化后的蛋白核小球藻的油脂含量为43.85%, 低于优化前的结果。这可能是优化后的培

养基含有更多的酵母粉, 不利于微藻细胞合成油脂^[28]。在微藻油脂产量方面, 优化后的蛋白核小球藻油脂产量可达5.45 g/L, 比优化前提高了20.84%。为了提高富油蛋白核小球藻生物量, 今后

将对培养基的其他组分质量浓度和培养条件进行更加深入的研究。

3 结 论

研究自养、异养和混养 3 种培养模式对蛋白核小球藻生长和油脂积累的影响。结果发现,异养培养可获得最大的生物量和油脂产量,异养培养蛋白核小球藻的主要脂肪酸是棕榈酸(36.07%)、油酸(34.26%)、亚油酸(20.17%)和亚麻酸(6.12%)。经对异养培养基葡萄糖质量浓度、氮源种类及质量浓度优化,得到最适合蛋白核小球藻发酵的葡萄糖质量浓度为 60 g/L,最适的氮源为酵母粉,质量浓度为 4 g/L,在此条件下培养 192 h,生物量可达 12.43 g/L,油脂产量达 5.45 g/L。研究结果表明,异养培养蛋白核小球藻开发食用油是一种具有潜力的培养模式。

参考文献:

- [1] 何东平, 罗质, 高盼. 我国食用植物油市场的挑战及机遇[J]. 粮油食品科技, 2020, 28(1):1-5.
- [2] YOO C, JUN S Y, LEE J Y, et al. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide[J]. Bioresour Technol, 2010, 101(1):71-74.
- [3] 王宝贝, 蔡舒琳, 李丽婷, 等. 小球藻在食品中的应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(17):341-346,352.
- [4] 尚常花, 朱顺妮, 王忠铭, 等. 微藻培养方法研究进展[J]. 新能源进展, 2016, 4(2):27-32.
- [5] XU H, MIAO X, WU Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters [J]. Biotechnol, 2006, 126(4):499-507.
- [6] CERÓN-GARCÍA M C, MACÍAS-SÁNCHEZ M D, SÁNCHEZ-MIRÓN A, et al. A process for biodiesel production involving the heterotrophic fermentation of *Chlorella protothecoides* with glycerol as the carbon source [J]. Appl Energy, 2013, 103:341-349.
- [7] 毕生雷, 张成明, 李十中, 等. 异养小球藻半连续发酵生产油脂工艺探讨[J]. 食品与发酵科技, 2014, 50(5):36-40.
- [8] 欧阳峥嵘, 温小斌, 耿亚红, 等. 光照强度、温度、pH、盐度对小球藻(*Chlorella*)光合作用的影响[J]. 武汉植物学研究, 2010, 28(1):49-55.
- [9] 黄冠华, 陈峰, 魏东. 两步培养法提高蛋白核小球藻的油脂含量[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2008(12):101-105.
- [10] 温小斌, 江丽丽, 耿亚洪, 等. 微藻总脂定量分析方法的比较研究[J]. 中国油脂, 2012, 37(11):85-90.
- [11] 李旭冉, 梅鹏蔚, 王琳, 等. 丙酮萃取分光光度法测定水中叶绿素 a 实验条件的优化[J]. 环境监控与预警, 2016(3):25-27.
- [12] 王孝平, 邢树礼. 考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究[J]. 天津化工, 2009(3):43-45.
- [13] 董丽荣, 李忠荣, 阎玉鑫, 等. 香橼种子油脂成分的 GC-MS 分析[J]. 中国现代中药, 2010, 12(7):19-21.
- [14] 桂林, 史贤明, 李琳, 等. 蛋白核小球藻不同培养方式的比较[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2005, 26(5):52-55.
- [15] LIN T S, WU J Y. Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition [J]. Bioresour Technol, 2015, 184:100-107.
- [16] WANG H L, GUO S Y, ZHENG B S, et al. Growth and biochemical components of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultivations [J]. J South China Univ Technol (Nat Sci), 2004, 32(5):47-50,55.
- [17] 张大兵, 吴庆余. 小球藻细胞的异养转化[J]. 植物生理学通讯, 1996(2):140-144.
- [18] 江燕, 黎贵卿, 张思敏. 11 种食用植物油中脂肪酸组成的 GC-MS 分析[J]. 广西林业科学, 2018, 47(4):111-113.
- [19] 常云鹤, 冯红霞, 周笑犁, 等. 高压氢化法氢化大豆油的研究[J]. 农产品加工, 2019(5):1-4,9.
- [20] 贺凡, 郭芹, 顾丰颖, 等. 11 种品牌玉米油脂脂肪酸及异构体的主成分分析[J]. 现代食品科技, 2017(2):196-202.
- [21] 高颀雄, 张坚. α -亚麻酸体内转化为二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸的研究进展[J]. 中国油脂, 2015, 40(9):27-31.
- [22] 张薇, 吴虹, 宗敏华. 蛋白核小球藻发酵产油脂的研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(6):855-860.
- [23] 郑世文, 赵玉峰, 毕生雷. 不同型号酵母浸粉及补糖对异养微藻生长的影响[J]. 现代农业科技, 2014(8):178-179, 191.
- [24] 王方方, 杜风光, 刘钺, 等. 异养小球藻培养基优化筛选[J]. 食品与发酵科技, 2015, 51(3):23-26,36.
- [25] 王步江, 樊秀花, 周娜. 发酵条件对蛋白核小球藻脂肪含量的影响[J]. 天津农学院学报, 2012, 19(1):34-37.
- [26] 杨素玲, 孟佑婷, 刘桂君, 等. 小球藻自养、异养和混养特性的研究[J]. 安徽农业科学, 2013(18):20-21, 135.
- [27] 王秀锦, 李兆胜, 邢冠岚, 等. 蛋白核小球藻 *Chlorella pyrenoidosa*-15 的异养培养条件优化及污水养殖[J]. 环境科学, 2012(8):205-210.
- [28] 朱义平, 宋东辉, 杨国兰. 不同氮源对异养小球藻生物量和油脂积累的影响[J]. 水生生物学报, 2012, 36(6):1027-1034.