



# Effect of High Concentrations of CO<sub>2</sub> on the Cell Density, Lipid Content and Fatty Acid Components of *Nannochloropsis oceanica*

Wang Yuejie, Meng Fanping\*, Cui Hongwu, Duan Weiyan, Yi Xiaoyan

College of Environmental Science and Engineering, Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, China

## Email address:

wyuejie@163.com (Wang Yuejie), mengfanping@ouc.edu.cn (Meng Fanping), hongwuc@tom.com (Cui Hongwu), duanweiyan@163.com (Duan Weiyan), xifanni2011@126.com (Yi Xiaoyan)

\*Corresponding author

## To cite this article:

Wang Yuejie, Meng Fanping, Cui Hongwu, Duan Weiyan, Yi Xiaoyan. Effect of High Concentrations of CO<sub>2</sub> on the Cell Density, Lipid Content and Fatty Acid Components of *Nannochloropsis oceanica*. *Science Discovery*. Vol. 4, No. 2, 2016, pp. 122-128.

doi: 10.11648/j.sd.20160402.21

Received: May 2, 2016; Accepted: May 17, 2016; Published: May 18, 2016

**Abstract:** In order to evaluate the capability of *Nannochloropsis oceanica* to product biodiesel, the cell density, lipid content and fatty acid components of *N. oceanica* under different CO<sub>2</sub> concentrations were analyzed. The results indicated that the cell density and lipid content of *N. oceanica* were increased under 5% CO<sub>2</sub>, but the growth of *N. oceanica* was inhibited under 10% and 15% CO<sub>2</sub>. Over 88% of the *N. oceanica* lipids produced consisted of C16 ~ C18 fatty acids and the concentration of unsaturated fatty acids (>69%) is high and suitable for biofuel production. The highest content of eicosapentaenoic acid (EPA) was also obtained under 5% CO<sub>2</sub>. The present results suggested that *N. oceanica* was suitable biodiesel feedstock and the maximum economic effectiveness will be obtained using flue gas containing 5% CO<sub>2</sub> in the cultivation of *N. oceanica*.

**Keywords:** *Nannochloropsis oceanica*, CO<sub>2</sub> Concentrations, Fatty Acid Components, Biodiesel, EPA

## 高浓度CO<sub>2</sub>对海洋微绿球藻 (*Nannochloropsis oceanica*) 生长、油脂积累及脂肪酸组成的影响

王曰杰, 孟范平\*, 崔鸿武, 段伟艳, 易晓燕

中国海洋大学海洋环境与生态教育部重点实验室, 环境科学与工程学院, 青岛, 中国

## 邮箱

wyuejie@163.com (王曰杰), mengfanping@ouc.edu.cn (孟范平), hongwuc@tom.com (崔鸿武), duanweiyan@163.com (段伟艳), xifanni2011@126.com (易晓燕)

**中文摘要:** 为探究海洋微绿球藻 (*Nannochloropsis oceanica*) 的生物柴油生产性能, 在不同高浓度CO<sub>2</sub>下考察了微藻的藻细胞密度、油脂含量及脂肪酸组成。实验结果表明, 5% CO<sub>2</sub>显著提高了海洋微绿球藻的藻细胞密度和油脂含量, 而10%和15% CO<sub>2</sub>则在一定程度上抑制了微藻生长; 微藻油脂的GC-MS分析显示, 海洋微绿球藻的C16~C18脂肪酸及不饱和脂肪酸含量较高, 分别可达88%及69%以上, 适合于作为生物柴油生产的原料; 5% CO<sub>2</sub>下海洋微绿球藻的二十碳五烯酸 (EPA) 含量最高。本研究表明, 海洋微绿球藻适于作为生物柴油生产的原料, 且工业上采用含5% CO<sub>2</sub>的烟道气培养海洋微绿球藻可获得最大的经济效益。

**关键词:** 海洋微绿球藻, CO<sub>2</sub>浓度, 脂肪酸组成, 生物柴油, 二十碳五烯酸

## 1. 引言

近年来, 面临日益增加的能源消耗, 寻求可替代化石燃料的可再生能源已成为国际研究热点[1]。其中, 生物柴油因具有十六烷值高、燃烧性能好、可生物降解、可再生、无毒以及环境友好等优点[2-4], 已受到各国学者的极高关注。相比于油菜籽、大豆等传统生物柴油原料, 微藻具有生长速度快、成熟期短[5]、占地面积少[6]、环境适应性强[7]、油脂含量高[8]等优点。而且藻基生物柴油中C16和C18脂肪酸及不饱和脂肪酸(UFAs)的含量较高[9], 符合生物柴油对于碳链长度要求的同时还可防止油脂固化, 增强生物柴油的低温流动性。因此微藻已成为最具潜力的生物柴油原料。

微藻的自养生长过程需消耗大量无机碳源, 向微藻培养体系中通入一定浓度的CO<sub>2</sub>气体可有效促进微藻生长[10]。因此, 工业上可将富含CO<sub>2</sub>的工业烟道气用于微藻培养。微藻在提高自身生长获得更多生物质的同时, 还可通过光合作用固定烟道气中的CO<sub>2</sub>, 在一定程度上缓解温室效应[11]。然而, 多数微藻无法耐受工业烟道气中较高的CO<sub>2</sub>浓度(5%~15%, v/v)[12], 同时CO<sub>2</sub>浓度还能影响微藻油脂的脂肪酸组成, 进而影响微藻生物柴油的品质[13]。因此, 研究高浓度CO<sub>2</sub> (5%~15%)对微藻生长和脂肪酸组成的影响极为重要。

微绿球藻(*Nannochloropsis*)具有较高的生物量和油脂含量, 被认为是最具潜力的工业产油模式藻种[14-16]。同时, 微绿球藻油脂中含有较高浓度的多不饱和脂肪酸(PUFAs), 如对人体有益的二十碳五烯酸(EPA)[17]。因此微绿球藻的生物质不仅能用于生物柴油生产, 对其附加产品EPA的开发可实现其生物质的综合利用, 有利于降低生物柴油生产成本。该属微藻目前已鉴定出6种: 海洋微绿球藻(*N. oceanica*)、加的斯微绿球藻(*N. gaditana*)、湖泊微绿球藻(*N. limnetica*)、颗粒微绿球藻(*N. granulata*)、拟眼点微绿球藻(*N. oculata*)和盐生微绿球藻(*N. salina*)。其中, 有关眼点微绿球藻(*N. oculata*)和海洋微绿球藻(*N. oceanica*)在生物柴油生产中的应用潜力研究较多[14, 18, 19]。而对于海洋微绿球藻, 目前还尚未见到其高浓度CO<sub>2</sub>下产油特性的研究报道。本研究以海洋微绿球藻为研究对象, 分别向其培养体系中通入浓度5%、10%和15%的CO<sub>2</sub>, 根据藻细胞密度、油脂含量、脂肪酸组成以及EPA含量, 分析其对高浓度CO<sub>2</sub>的适应性以及利用其生物质生产油脂和EPA的可行性。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

海洋微绿球藻(*N. oceanica*)购自中国科学院海洋研究所(青岛)。该微藻属于绿藻门、真眼点藻纲

(Eustigmatophyceae), 为单细胞海水藻, 细胞直径2 μm~5 μm, 大小较均匀。

实验采用f/2培养基[20], 每1L海水(取自青岛石老人近岸海域, 使用前经0.45 μm醋酸纤维滤膜抽滤)中含有以下化学试剂和生化试剂: 74.8 mg NaNO<sub>3</sub>、4.4 mg NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.023 mg ZnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O、0.012 mg CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、3.9 mg FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·5H<sub>2</sub>O、4.35 mg Na<sub>2</sub>-EDTA、0.178 mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O、0.010 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、0.0073 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.0005 mg维生素B12、0.100 mg维生素B1、0.0005 mg生物素。培养基使用前于120℃下灭菌20 min。

CO<sub>2</sub>气体: 青岛市瑞丰气体有限公司生产, 体积浓度分别为5%、10%和15%, 装于40L高压钢瓶内。

高纯氮气: 青岛市瑞丰气体有限公司生产, 纯度99.99%, 装于40L高压钢瓶内。

试剂: 氯仿、甲醇、丙酮、正己烷、KOH等试剂均为分析纯试剂, 尼罗红为生物试剂。

标准品: 正构十九碳脂肪酸甲酯(19:0)(美国Sigma-Algrich公司)、C4-C24之间的混合标准(美国Sigma-Algrich公司)。

### 2.2. 仪器

GXZ型智能光照培养箱(宁波江南仪器厂); 血球计数板(Nikon公司); JY92-II型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); DHG-9030A型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); XW-80A型漩涡混合器(上海精科实业有限公司); 7670530型冷冻干燥机(美国Labconco公司); DL-5-B型离心机(上海安亭科学仪器厂); LDZX-50KBS型蒸汽高压灭菌锅(上海申安医疗器械厂); Fluo View™ FV1000型激光共聚焦显微镜(日本奥林巴斯), Agilent 7890A/5975C型气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)(美国Thermo公司)。

### 2.3. 方法

#### 2.3.1. 微藻培养

将海洋微绿球藻接种于装有足量 f/2 培养基的三角瓶中, 于温度 25℃、光强 100 μmol/(m<sup>2</sup>·s)、光照时间 24 h/d 的条件下预培养, 每天摇瓶 3 次, 培养至指数生长期。

分别将处于指数生长期的微藻接种于装有 400 mL 培养基的三角瓶中, 初始接种密度均为 1.5×10<sup>6</sup> cells/mL。向 9 只三角瓶(分为三组)中分别通入体积浓度为 5%、10%、15%的CO<sub>2</sub>气体(经 0.45 μm 滤膜过滤), 流量均为 0.1 vvm (每min每升藻液中通入的气体体积(L))。另外 3 只三角瓶中通入空气(CO<sub>2</sub>体积浓度 0.04%), 作为对照组。即: 每个处理组或对照组各设三个重复, 于恒温光照培养箱中培养。前期预实验研究表明, 温度 25℃, 光照强度 120 μmol/(m<sup>2</sup>·s), 光照时间 24 h/d 为海洋微绿球藻的最

优生长条件。在处理组、对照组的微藻达到指数生长期末期时, 分别采集一定体积的藻液, 用于测定藻细胞密度、总脂含量及脂肪酸组成。

### 2.3.2. 微藻细胞密度测定

各处理组微藻培养至指数生长期末期时, 取样采用血球计数板法进行计数, 单位 cells/mL。

### 2.3.3. 微藻油脂含量测定

采用氯仿-甲醇法[21]测定。在具塞离心管中加入冷干藻粉 0.1g 和蒸馏水、氯仿、甲醇(体积比 2:2.5:5)混合液 7.6 mL, 漩涡混合 1 min 后, 冰浴中超声破碎 2min(功率 700W, 间隔 5s、工作 5s), 再加入 1mL 氯仿和 1mL 蒸馏水, 漩涡混合 1min, 静置 10min, 5000rpm 离心 10min, 将有机相转移到已称重的烧杯中。再向原离心管中加入 2mL 氯仿, 按前述方法提取 2 次, 有机相均合并到烧杯中, 用高纯 N<sub>2</sub> 吹至恒重。按下式计算总脂含量:

$$\omega = \frac{W_t}{W_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中  $\omega$  为总脂的百分含量(%);  $W_0$  为藻粉干重(g);  $W_t$  为粗脂重(g)。

### 2.3.4. 藻细胞中油脂滴形态观察

采用尼罗红染色法[22]。向 1mL 藻液中加入 100  $\mu$ L 尼罗红染料(质量浓度为 100  $\mu$ g/mL 丙酮), 避光反应 15min(视染色情况而定, 时间可适当延长)后, 于 4000rpm 离心 5min, 弃去上清液后加入 1mL 蒸馏水, 经漩涡混合洗去多余染料, 避免对后续观察产生干扰。在激光共聚焦显微镜的 100 倍油浸物镜下选取所需观察对象, 启动扫描软件进行图像扫描。荧光激发波长 488 nm, 利用仪器自带的图片处理系统对图像进行处理。

### 2.3.5. 微藻脂肪酸组分测定

参照李高阳等(2005)[23]的方法。称取冻干藻粉 20~50mg, 加入具塞玻璃瓶内, 再加入 1mL 2mol/L KOH-CH<sub>3</sub>OH 溶液(将 2mol KOH 溶于 1L 甲醇)和 40  $\mu$ L 标准品。混匀后于 80℃ 水浴中甲酯化反应 1 h, 冷却后加入 3mL 蒸馏水和 2mL 正己烷, 漩涡震荡后静置分层, 将上层液体置于 2mL 微量离心管中, 封口待测。GC-MS 色谱分析采用 DB-5ms 色谱柱(50m  $\times$  250  $\mu$ m  $\times$  0.25  $\mu$ m), 从 150℃ 开始, 以每分钟 10℃ 程序升温到 300℃, 保持 5 min。载气为 He, 柱流量 1.0 mL/min, 进样口温度 300℃, 分流比 20:1。质谱条件: 离子源温度为 230℃, MS 四级杆 150℃, 扫描范围为 40~500 amu, 进样量为 1.0  $\mu$ L。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. CO<sub>2</sub> 浓度对海洋微绿球藻生长及油脂含量的影响

海洋微绿球藻培养体系中通入不同浓度 CO<sub>2</sub> 培养后, 指数生长期末期的藻细胞密度及油脂含量见图 1。藻细胞密度在不同浓度的 CO<sub>2</sub> 处理组中有很大差异 ( $p < 0.05$ )。与

通入空气(CO<sub>2</sub> 浓度 0.04%)的对照组相比, 浓度 5% 的 CO<sub>2</sub> 处理组中微藻细胞密度增加明显, 其细胞数比对照组高出 34%。相反, 当通入浓度 10%、15% 的 CO<sub>2</sub> 时, 微藻生长受到较大抑制作用, 藻细胞密度分别仅为对照组的 66% 和 37%。可见, 海洋微绿球藻对 10%~15% 浓度 CO<sub>2</sub> 的耐受性较差, 工业上不宜直接利用 CO<sub>2</sub> 浓度高于 10% 的烟道气培养海洋微绿球藻。Miyachi 等[24] 曾研究提出, 能够耐受 CO<sub>2</sub> 浓度为 2%~5%、5%~20%、20%~100% 的微藻分别属于耐受性较高、非常高和极高的藻种。由此认为海洋微绿球藻属于 CO<sub>2</sub> 耐受性较高的藻种。

有关 CO<sub>2</sub> 浓度对微绿球藻属其它藻种生长影响的研究已有较多报道。李凤娟等[25] 研究了浓度 0.04%、2% 和 5% 的 CO<sub>2</sub> 对湖泊微绿球藻 (*N. limnetica*) 生长的影响, 结果显示, 浓度 5% 的 CO<sub>2</sub> 能够明显抑制微藻生长。Chiu 等[26] 用 0.04% (对照)、2%、5%、10% 和 15% 的 CO<sub>2</sub> 培养眼点微绿球藻 (*N. oculata*), 在 2% 的 CO<sub>2</sub> 下获得最大藻生物量, 而其它浓度 CO<sub>2</sub> 下藻生物量均低于对照水平。可见, 上述两种微绿球藻对 CO<sub>2</sub> 的耐受性不及本研究所用的海洋微绿球藻。Razzak 等[27] 在眼点微绿球藻 (*N. oculata*) 的兼养培养(培养基中含有机碳源)体系中, 通入浓度 4%~12% 的 CO<sub>2</sub>, 以 CO<sub>2</sub> 浓度为 8% 时生物量最高, 有机碳源的存在有利于提高眼点微绿球藻对 CO<sub>2</sub> 的耐受性。李林等[28] 在 CO<sub>2</sub> 浓度为 0.04%、5% 和 10% 时培养微绿球藻 (*Nannochloropsis* sp. CCMM7001), 以 5% CO<sub>2</sub> 处理组的藻生物量最高, 而 10% CO<sub>2</sub> 则抑制微藻生长, 这与本研究的结果相同。因此, 即便是同一属的微藻, 对高浓度 CO<sub>2</sub> 的耐受性也因藻种、培养条件的不同而存在较大差异。

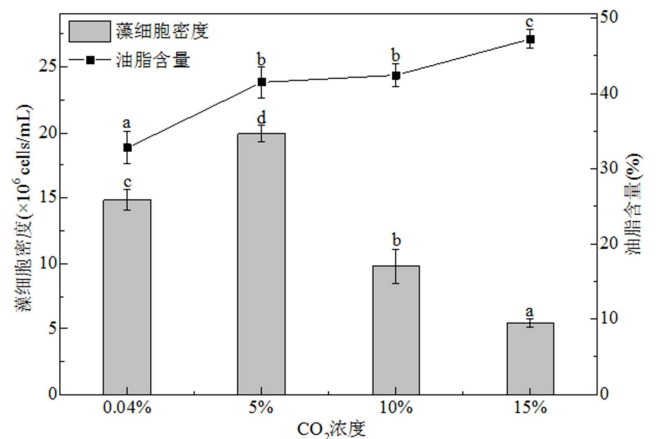


图1 海洋微绿球藻在不同 CO<sub>2</sub> 浓度下的藻细胞密度和油脂产量 (n=3)。标有不同字母的数值间存在显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

### 3.2. CO<sub>2</sub> 浓度对海洋微绿球藻油脂积累的影响

根据图 1, 海洋微绿球藻的油脂含量随 CO<sub>2</sub> 浓度升高而升高, 三个处理组 (5%、10% 和 15% CO<sub>2</sub>) 中微藻的油脂含量 (41.51%、42.43% 和 47.22%) 均显著高于对照水平 (32.86%) ( $p < 0.05$ )。这种变化在经尼罗红染色后的藻细胞形态荧光图中同样能够观察到 (图 2): 藻细胞经染色后, 其所含的中性脂呈现鲜明绿色, 与对照组相比, 通入高浓度 CO<sub>2</sub> 的藻液中有较多细胞带有绿色光泽。这表明高浓度 CO<sub>2</sub> 能够促进藻细胞中油脂的积累。文献报道, 微藻

在正常生长条件下的油脂含量相对较低，当其处于物理、化学逆境下，油脂则会大量合成[29]。相对于空气中的CO<sub>2</sub>而言，本研究所通入的三个浓度CO<sub>2</sub>也会在藻细胞内产生逆境，因为高浓度CO<sub>2</sub>的通入可造成藻液严重酸化，当CO<sub>2</sub>浓度高于10%时，藻培养基的pH值即低于5.5[30]，严重抑制微藻生长。而当补充的CO<sub>2</sub>浓度相对较低时，CO<sub>2</sub>经CCM (CO<sub>2</sub>浓缩机制)转运后，微藻光合作用的关键酶——核酮糖-1, 5-二磷酸羧化/加氧酶(Rubisco)活性位点处的CO<sub>2</sub>浓度得以提高，其羧化活性增强而氧化活性受抑制，促进了微藻光合作用，并有利于微藻中性脂的合成[24]。因此在本研究中，相对于对照组，在通入浓度5%的CO<sub>2</sub>后，即可获得最高的生物量，同时其油脂含量也得到相应提升。在工业上利用烟道气培养海洋微绿球藻生产生物柴油时，通入含有5%体积浓度CO<sub>2</sub>的烟道气为最优条件。而工业烟道气的CO<sub>2</sub>浓度大多高于5%，但可预先采用空气进行稀释使CO<sub>2</sub>浓度降为5%，以期获得最高的微藻油脂产量。

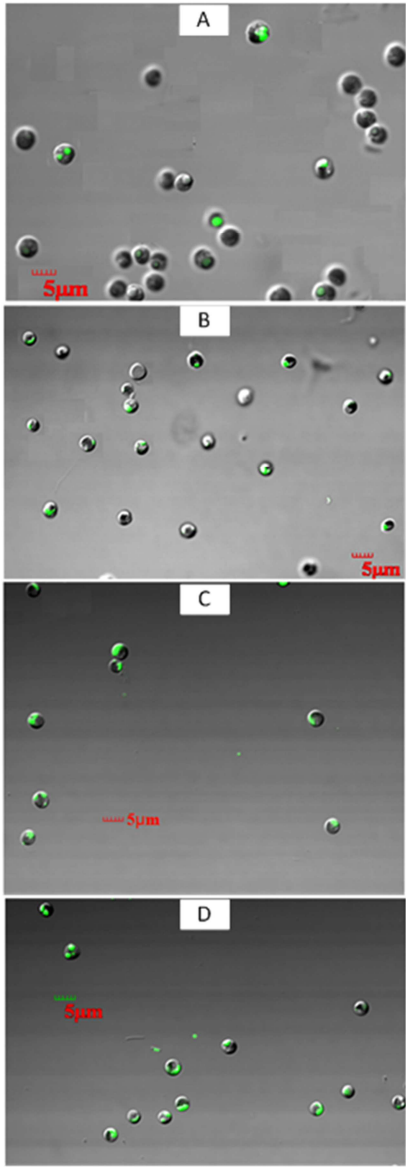


图2 海洋微绿球藻各CO<sub>2</sub>梯度(A: 0.04% CO<sub>2</sub>; B: 5% CO<sub>2</sub>; C: 10% CO<sub>2</sub>; D: 15% CO<sub>2</sub>)下的脂质体图。

3.3. CO<sub>2</sub>浓度对海洋微绿球藻脂肪酸组成的影响

微藻的脂肪酸组成可显著影响微藻生物柴油的品质[31]。在不同浓度CO<sub>2</sub>下，海洋微绿球藻油脂中各脂肪酸组成的总量比例见表1。主要脂肪酸为棕榈酸(16:0)、棕榈油酸(16:1)、油酸(18:1)、EPA (20:5)，它们的含量之和占油脂含量的百分比分别为88.09% (0.04% CO<sub>2</sub>)、86.97% (5% CO<sub>2</sub>)、85.07% (10% CO<sub>2</sub>)、86.77% (15% CO<sub>2</sub>)。而肉豆蔻酸(14:0)、硬脂酸(18:0)、亚油酸(18:2)等脂肪酸含量较低，不足总量的5%。

表1 海洋微绿球藻在不同CO<sub>2</sub>浓度下脂肪酸的组成。

脂肪酸成分	不同CO <sub>2</sub> 浓度下海洋微绿球藻脂肪酸含量(%)			
	0.04%	5%	10%	15%
C8:0	n. d.	0.04	0.20	0.18
C9:0	0.01	0.06	0.28	0.37
C10:0	0.02	0.03	0.09	0.42
C12:0	0.02	0.07	0.21	0.14
C14:0	2.36	3.04	3.77	4.90
C14:1	0.02	n. d.	n. d.	n. d.
C15:0	0.21	0.23	0.17	n. d.
C16:0	16.40	16.76	17.38	22.48
C16:1	58.70	57.90	57.78	54.59
C16:2	0.14	0.18	0.26	1.11
C16:3	2.11	2.54	3.39	n. d.
C17:0	0.12	0.11	n. d.	n. d.
C18:0	1.03	1.35	2.18	1.86
C18:1	7.65	6.36	5.26	5.79
C18:2	1.52	2.18	1.76	1.65
C18:3	0.93	n. d.	0.95	0.70
C18:4	1.22	0.98	n. d.	n. d.
C20:0	0.06	n. d.	0.07	0.09
C20:1	n. d.	0.06	n. d.	0.07
C20:2	0.05	0.05	n. d.	n. d.
C20:4	0.62	0.87	0.78	1.01
C20:5	5.34	5.95	4.65	3.91
C21:0	0.09	0.13	0.25	n. d.
C22:0	0.13	0.11	0.14	0.10
C22:1	0.05	n. d.	n. d.	n. d.
C22:5	0.05	n. d.	n. d.	n. d.
C22:6	0.48	0.34	n. d.	0.25
C24:0	0.58	0.53	0.39	0.31
C24:1	0.09	0.13	0.06	0.07

n. d. 未检出

一般认为，适合于生产生物柴油的最佳原料应当富含C16~C18脂肪酸，包括棕榈酸(16:0)、棕榈油酸(16:1)、硬脂酸(18:0)、油酸(18:1)、亚油酸(18:2)、亚麻酸(18:3)等[32]。本研究中各处理组的海洋微绿球藻油脂中C16~C18脂肪酸的比例均高于88% (图3)，从这一点看，海洋微绿球藻适合于作为生产生物柴油的原料。

在不同浓度CO<sub>2</sub>下，海洋微绿球藻油脂中脂肪酸的饱和程度见图4。相比于饱和脂肪酸(SFAs)，各处理组微藻油脂中UFAs含量更高，均在69%以上，这种特征使微藻油脂更适合于生物柴油生产。因为UFAs的熔点一般较低，利用UFAs含量高的微藻油脂生产的生物柴油具有较低熔点及较高流动性，有利于其在温带及寒带地区使用[33]。



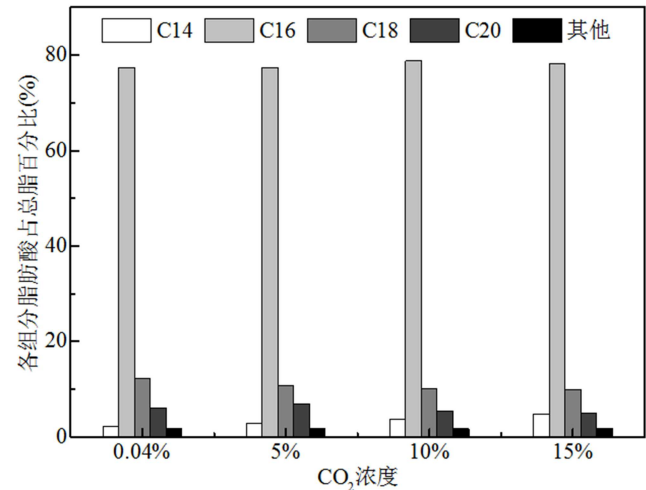


图3 在不同CO<sub>2</sub>浓度下海洋微绿球藻脂肪酸成分比例。

Talebi等[2]曾指出，与其他属的微藻相比，微绿球藻属的微藻脂肪酸组成的最显著特点是其PUFAs含量较高。本研究中海洋微绿球藻在不同CO<sub>2</sub>浓度下PUFAs的含量在8%~13%之间（图4），高于欧盟的国际车辆生物柴油标准(EN14214)限值[34]。过多的PUFAs会对微藻生物柴油的氧化稳定性造成影响[15]。考虑到海洋微绿球藻的PUFAs以EPA为主（表1），而后者是一种高质量的人体营养品和食品添加剂[17]。因此，为使基于海洋微绿球藻生产的生物燃料更符合生物柴油标准，可将EPA预先从微藻脂肪酸中分离以得到良好的附加产品，同时可以提高生物柴油的稳定性。另外，Schenk等[35]研究指出，要保证生物柴油同时满足较高的稳定性和低温流动性，其C16:1、C18:1和C14:0脂肪酸的质量比应满足5:4:1。然而，藻基生物柴油很难达到如此理想的脂肪酸比例。因此，只有通过混合多种不同来源的脂肪酸，才可获得较为理想的高质量生物柴油[36]。

3. 4. CO<sub>2</sub>浓度对海洋微绿球藻EPA含量的影响

PUFAs特别是其中的EPA对防治动脉硬化、心脏疾病、风湿关节炎、癌症、气喘和糖尿病等疾病具有明显效果[37]。由于从微藻中提取EPA的工艺较为简单，因此微藻日益成为人们获取EPA的重要来源[38]。微绿球藻属微藻普遍含有较高含量的EPA，是优良的EPA生产原料，目前已有大范围养殖微绿球藻生产EPA的报道[39]。本研究中，当通入0.04%、5%、10%和15% CO<sub>2</sub>培养海洋微绿球藻后，微藻油脂中EPA的含量分别为5.34%、5.95%、4.65%和3.91%（表1）。浓度5%的CO<sub>2</sub>处理组中，微藻所含EPA最多，同时其藻细胞密度也最大（图1），因此该浓度CO<sub>2</sub>下海洋微绿球藻的EPA产量也最高。目前已有较多研究报道了提高海洋微绿球藻EPA含量的方法。Chen等[17]的研究显示，红光光质的LED光源下微藻的EPA含量达到最高值。Hu等[40]研究发现，在自养条件下微绿球藻的EPA含量高于兼养培养条件。Hoshida等[41]的研究表明，采用浓度为2%的CO<sub>2</sub>培养微绿球藻(*Nannochloropsis* sp.)时，微藻EPA含量高于采用空气的对照组，且微藻在不同培养阶段的EPA含量相差较大，指数生长期末期的EPA含量最高。而本

研究表明，当采用工业烟道气培养海洋微绿球藻时，与油脂产量的最高条件相同，5% CO<sub>2</sub>可使微藻的EPA产量最高。因此，工业上采用含5% CO<sub>2</sub>的烟道气培养海洋微绿球藻可获得最高的经济效益。

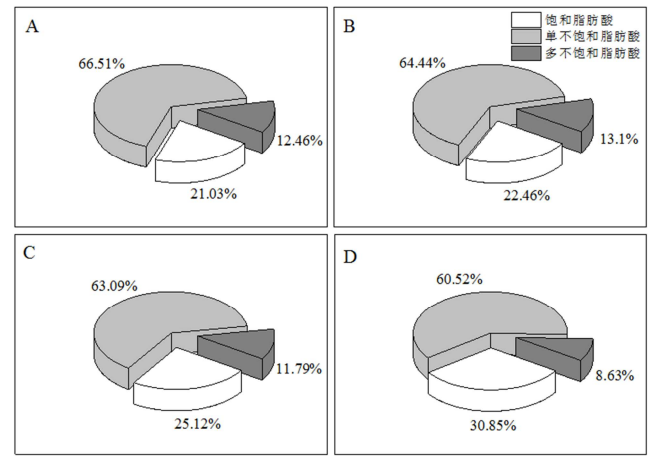


图4 不同CO<sub>2</sub>浓度下海洋微绿球藻的脂肪酸种类分布. (A: 0.04% CO<sub>2</sub>; B: 5% CO<sub>2</sub>; C: 10% CO<sub>2</sub>; D: 15% CO<sub>2</sub>)。

4. 结论

三种高浓度CO<sub>2</sub>（5%、10%和15%）通入培养体系后，5% CO<sub>2</sub>可显著提高海洋微绿球藻的藻细胞密度和油脂含量，而微藻对10%和15% CO<sub>2</sub>的耐受性较差。

各CO<sub>2</sub>处理组中海洋微绿球藻油脂的不饱和脂肪酸含量均高于69%，C16~C18脂肪酸含量均高于88%，适合于作为生产生物柴油的原料。

5% CO<sub>2</sub>条件下海洋微绿球藻的EPA含量最大，如果将其预先分离作为保健品，不仅可以增加经济产值，还能增强藻基生物柴油的氧化稳定性。

致谢

本文为国家科技支撑计划课题（2011BAD14B04）的阶段性生活成果之一。

参考文献

[1] Milano J, Ong H C, Masjuki H H, et al. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2016, 58: 180-197.

[2] Talebi A F, Mohtashami S K, Tabatabaei M, et al. Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production [J]. Algal Research, 2013, 2(3): 258-267.

[3] Demirbas A. Progress and recent trends in biodiesel fuels [J]. Energy Conversion and Management, 2009, 50(1): 14-34.

- [4] 吴立柱, 窦世娟, 从均广, 等. 我国微藻生物柴油的研究背景与发展战略[J]. 生物技术进展, 2015, 02:85-88.
- [5] 周继如, 朱世安. 微藻生物柴油研究现状[J]. 能源环境保护, 2015, 01:50-53.
- [6] Batan L, Quinn J, Willson B, et al. Net energy and greenhouse gas emission evaluation of biodiesel derived from microalgae [J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(20): 7975-7980.
- [7] Liang Y, Sarkany N, Cui Y, et al. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions [J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(7): 1043-1049.
- [8] Zhao B, Su Y. Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: a review [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2014, 31: 121-132.
- [9] Gouveia L. Microalgae as a Feedstock for Biofuels [M]. Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [10] Lam M K, Lee K T, Mohamed A R. Current status and challenges on microalgae-based carbon capture [J]. International Journal of Greenhouse Gas Control, 2012, 10: 456-469.
- [11] Cheah W Y, Show P L, Chang J S, et al. Biosequestration of atmospheric CO<sub>2</sub> and flue gas-containing CO<sub>2</sub> by microalgae[J]. Bioresource Technology, 2015, 184: 190-201.
- [12] Yoshihara K I, Nagase H, Eguchi K, et al. Biological elimination of nitric oxide and carbon dioxide from flue gas by marine microalga NOA-113 cultivated in a long tubular photobioreactor [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996, 82(4): 351-354.
- [13] Mudimu O, Rybalka N, Bauersachs T, et al. Influence of Different CO<sub>2</sub> Concentrations on Microalgae Growth,  $\alpha$ -Tocopherol Content and Fatty Acid Composition [J]. Geomicrobiology Journal, 2015, 32(3-4):291-303.
- [14] Ma Y, Wang Z, Zhu M, et al. Increased lipid productivity and TAG content in *Nannochloropsis* by heavy-ion irradiation mutagenesis [J]. Bioresource Technology, 2013, 136: 360-367.
- [15] Ma Y, Wang Z, Yu C, et al. Evaluation of the potential of 9 *Nannochloropsis* strains for biodiesel production [J]. Bioresource Technology, 2014, 167: 503-509.
- [16] 李秀波, 徐旭东, 孔任秋. 五种微绿球藻产油和产多不饱和脂肪酸的研究[J]. 水生生物学报, 2010, 05:893-897.
- [17] Chen C Y, Chen Y C, Huang H C, et al. Engineering strategies for enhancing the production of eicosapentaenoic acid (EPA) from an isolated microalga *Nannochloropsis oceanica* CY2 [J]. Bioresource Technology, 2013, 147: 160-167.
- [18] Malakootian M, Hatami B, Dowlatshahi S, et al. Optimization of culture media for lipid production by *Nannochloropsis oculata* for Biodiesel production [J]. Environmental Health Engineering and Management Journal, 2015, 2(3): 141-147.
- [19] Vieler A, Wu G, Tsai C H, et al. Genome, functional gene annotation, and nuclear transformation of the heterokont oleaginous alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 [J]. PLoS Genetics, 2012, 8(11): e1003064.
- [20] Guillard R R, Ryther J H. Studies of marine planktonic diatoms: I. *cyclotella nana* hustedt and *detonula confervacea* (cleve) [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1962, 8(2): 229-239.
- [21] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37(8): 911-917.
- [22] Chen W, Sommerfeld M, Hu Q. Microwave-assisted Nile red method for *in vivo* quantification of neutral lipids in microalgae [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(1): 135-141.
- [23] 李高阳, 丁霄霖. 亚麻籽油中脂肪酸成分的GC-MS分析[J]. 食品与机械, 2005, 21(5):30-32.
- [24] Miyachi S, Iwasaki I, Shiraiwa Y. Historical perspective on microalgal and cyanobacterial acclimation to low-and extremely high-CO<sub>2</sub> conditions [J]. Photosynthesis Research, 2003, 77: 139-153.
- [25] 李凤娟, 万秀, 方仙桃, 等. 不同氮源及CO<sub>2</sub>浓度下湖泊微拟球藻的生长及产油特性分析 [J] 水生生物学报, 2015, 39(2):436-440.
- [26] Chiu S Y, Kao C Y, Tsai M T, et al. Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(2): 833-838.
- [27] Razzak S A, Ilyas M, Ali S A M, et al. Effects of CO<sub>2</sub> Concentration and pH on Mixotrophic Growth of *Nannochloropsis oculata* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 176(5): 1290-1302.
- [28] 李林, 郑立, 郑明刚, 等. 富碳培养对海洋富油微藻油脂积累特性的影响[J]. 水生生物学报, 2013, 06:1013-1019.
- [29] Wijffels R H, Barbosa M J. An outlook on microalgal biofuels [J]. Science, 2010: 329: 796-799.
- [30] 王曰杰, 孟范平, 李永富, 等. 内置LED光源平板型光生物反应器用于微藻培养——普通小球藻在反应器中的固碳产油性能探究[J]. 中国环境科学, 2015, 05:1526-1534.
- [31] Knothe G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters [J]. Fuel Processing Technology, 2005, 86(10): 1059-1070.

- [32] Knothe G. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition [J]. *Energy & Environmental Science*, 2009, 2(7): 759-766.
- [33] Lam M K, Lee K T, Mohamed A R. Current status and challenges on microalgae-based carbon capture [J]. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 2012, 10: 456-469.
- [34] Doan T T Y, Sivaloganathan B, Obbard J P. Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2011, 35(7): 2534-2544.
- [35] Schenk P M, Thomas-Hall S R, Stephens E, et al. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production [J]. *Bioenergy Research*, 2008, 1(1): 20-43.
- [36] Tang D, Han W, Li P, et al. CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 3071-3076.
- [37] Tan C K, Johns M R. Screening of diatoms for heterotrophic eicosapentaenoic acid production [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1996, 8(1): 59-64.
- [38] 徐芳, 胡晗华, 丛威, 等. 通气量和CO<sub>2</sub>对*Nannochloropsis* sp. 在光生物反应器中的生长和EPA合成的影响[J]. *过程工程学报*, 2004, 05: 457-461.
- [39] Kromkamp J C, Beardall J, Sukenik A, et al. Short-term variations in photosynthetic parameters of *Nannochloropsis* cultures grown in two types of outdoor mass cultivation systems [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2009, 56(2-3): 309-322.
- [40] Hu H, Gao K. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources [J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(5): 421-425.
- [41] Hoshida H, Ohira T, Minematsu A, et al. Accumulation of eicosapentaenoic acid in *Nannochloropsis* sp. in response to elevated CO<sub>2</sub> concentrations [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2005, 17(1): 29-34.