

Chlorococcum sp. 混养过程碳氮调控对累积类胡萝卜素和脂肪酸成分影响研究*

柴 鹏^{1,2} 丰平仲¹ 王学伟³ 王忠铭^{1**} 李谢昆^{1,2} 袁振宏¹

(1 中国科学院广州能源研究所 中国科学院可再生能源重点实验室 广州 510640)

(2 中国科学院大学 北京 100039 3 中国科学院广州能源研究所 佛山三水能源环境技术创新与育成中心 佛山 528137)

摘要 在 BG-11 培养液的基础上,选择不同的乙酸钠和硝酸钠浓度组合培养绿球藻 *Chlorococcum* sp.,分析培养过程中干重、类胡萝卜素、总脂及脂肪酸成分,完成 *Chlorococcum* sp. 生长及油脂积累的评价。实验结果表明,外源碳源乙酸钠对 *Chlorococcum* sp. 的生长和油脂积累有很好的促进作用。乙酸钠和硝酸钠浓度分别为 2g/L 和 1g/L 条件下,*Chlorococcum* sp. 培养 16 天后生物质产率高达 276.19mg/(L·d),同时类胡萝卜素和总脂的产率也分别高达 1.347mg/(L·d) 和 108.59mg/(L·d),高附加值脂肪酸二十碳五烯酸(EPA)与二十二碳六烯酸(DHA)占脂肪酸总量也超过了 1.5%。

关键词 绿球藻 混养 干重 类胡萝卜素 脂肪酸

中图分类号 TQ645.6

化石能源的持续燃烧使全球生存环境日益恶化,人们对于清洁能源的呼声也空前高涨。生物柴油作为一种绿色环保的可再生能源,不仅在生产过程有效地吸收温室气体,而且作为化石能源的替代品能够很好地适配现阶段的汽车引擎^[1]。能源微藻具备产油率高、生产周期短、生存环境广等特点,被认为是制备生物柴油的理想原料^[2,3]。

部分微藻可以混养,即在光照条件下进行光合自养的同时利用外源有机碳异养提高微藻的生长速率及油脂产率。一些文献曾报道过混合营养培养方式中有有机碳源对螺旋藻和单针藻生长及油脂积累的影响^[4,5]。

本文以乙酸钠作为外源碳源,通过测定绿球藻 *Chlorococcum* sp. 生长过程中干重、油脂产率及脂肪酸组成探寻适宜的乙酸钠添加量,在此基础上设置不同梯度的硝酸钠浓度考察氮源与外源碳源的协同作用,为深入研究 *Chlorococcum* sp. 的混合营养生长提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验藻株及培养条件

本实验中所使用的绿球藻 *Chlorococcum* sp. 由中国科学院广州能源研究所生物质能生化转化实验室分离纯化保藏。

采用自主设计的培养体积为 1L 的柱状(Φ8.5cm, H75cm)气升式光生物反应器,石英通气管(Φ0.6cm, Φ0.8cm)由中心位置开孔的橡胶塞固定。单侧日光灯提供光强为 315μmol/(m²·s)的连续光照,通气管由底部通入含 5% CO₂ 的压缩空气,培养温度为(25±1)℃。选用 BG-11 液体培养基^[6]扩充种子液。

1.2 实验设计

1.2.1 乙酸钠对微藻生长的影响 藻种接种至装有灭菌处理的 BG-11 液体培养基的气升式光生物反应器培养 6 天,此时绿球藻达到对数生长期。取样离心,藻泥用无菌超纯水清洗 3 遍,接种至不同浓度乙酸钠(0g/L、0.25g/L、0.5g/L、1g/L、2g/L 和 4g/L)的 BG-11 培养基中,接种起始 OD_{550nm} 为 0.564,每组做两个平行。培养 16 天,隔天取样测定干重,实验结束后收集藻液

收稿日期:2015-03-12 修回日期:2015-04-16

* 广东省中国科学院全面战略合作项目(2011B090300063),佛山市院市合作项目(2012HY100415)资助项目

**通讯作者,电子信箱:wangzm@ms.giec.ac.cn

测定总脂、色素及脂肪酸成分。

1.2.2 硝酸钠对微藻生长的影响 参考标准 BG-11 液体培养基中 1.5g/L 硝酸钠对应的质量浓度,设计氮元素浓度(0g/L、0.1g/L、0.5g/L、1.0g/L 和 1.5g/L)不同,其他营养成分不变的 BG-11 培养基,按照 1.2.1 实验完毕后选出较优的乙酸钠添加浓度向 5 个实验组进行添加,每组做两个平行。培养 16 天,隔天取样称量干重,第 4、8、12、16 天取样进行总脂、色素及脂肪酸成分分析。

1.3 分析方法

1.3.1 取样 取样前需向反应器中补加微藻培养过程中蒸发水分,然后用灭菌处理的移液管在无菌操作台中取 10ml 用于微藻干重及类胡萝卜素含量的分析,取样后将反应器放回培养架,5min 后划线标记液面位置。

在第 4、8、12 天分别量取 300ml、150ml、100ml 藻液用冷冻离心机 5 000r 离心 5min,倒去上清液,用超纯水清洗并离心 3 次,冷冻干燥处理成藻粉备用。

1.3.2 细胞生长测定 本实验采用改良的 Zhu 和 Lee^[7] 的干重测定方法,玻璃纤维滤膜(Whatman, Φ47 mm)放于 80℃ 烘箱 12h,取出放入干燥皿冷却 30min 至恒重。称取初重记为 dw_x (mg),将滤膜放于抽滤装置,移液枪量取 5ml 藻液抽滤,放回 80℃ 烘箱烘干至恒重,冷却后称重记为 DW_x (mg)。

微藻细胞干重计算公式为

$$M(\text{g/L}) = (DW_x - dw_x) \div V$$

细胞生物物质产率计算公式为

$$P[\text{mg}/(\text{L} \cdot \text{d})] = 1\,000 \times (M_x - M_0) \div T_x$$

式中, T_x 表示微藻培养天数; dw_x 与 DW_x 分别表示第 x 天抽滤操作前后滤膜的质量; M_x 与 M_0 分别表示第 x 天和第 0 天微藻的细胞干重。

1.3.3 总脂含量测定 总脂的测定参照 Bigogno 等^[8] 的方法并对总脂的提取步骤稍作改进。具体操作如下:准确称取 100 ~ 150mg 干藻粉于螺口玻璃瓶中,加入体积分数为 10% DMSO 的甲醇溶液 2ml,密封 45℃ 水浴搅拌 45min; 3 000r/min 离心 10min,收集上清液;以上提取步骤重复两次。取 4ml 乙醚:正己烷为 1:1 (体积比)的混合液加入玻璃瓶中,密封 45℃ 水浴搅拌 60min,离心 10min,收集上清液;以上提取步骤重复两次。合并以上所得上清液,添加 6ml 去离子水,溶液静置 5h 分层,上层包含总脂成分,转移上层到预称重的 EP 管中,在氮保护下蒸发溶剂并冰冻干燥至少 24h,称重求得总脂含量。

1.3.4 类胡萝卜素含量的测定 类胡萝卜素的测定参

照 Lichtenthaler^[9] 的方法,用分析纯甲醇试剂在水浴中加热提取色素,测定 665nm、652nm 和 470nm 处吸光值,总类胡萝卜素含量可以用下式计算得到

$$\text{Chl. a} = 16.72 \times OD_{665} - 9.16 \times OD_{652}$$

$$\text{Chl. b} = 34.09 \times OD_{652} - 15.28 \times OD_{665}$$

$$\text{Cartenoid} = 221 \times (1\,000 \times OD_{470} - 1.63 \times \text{Chl. a} - 104.96 \times \text{Chl. b})$$

式中 Chl. a、Chl. b 和 Cartenoid 分别表示叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量,单位为 mg/L; OD_{470} 、 OD_{652} 和 OD_{665} 分别为 470nm、652nm 和 665nm 波长下的吸光值。

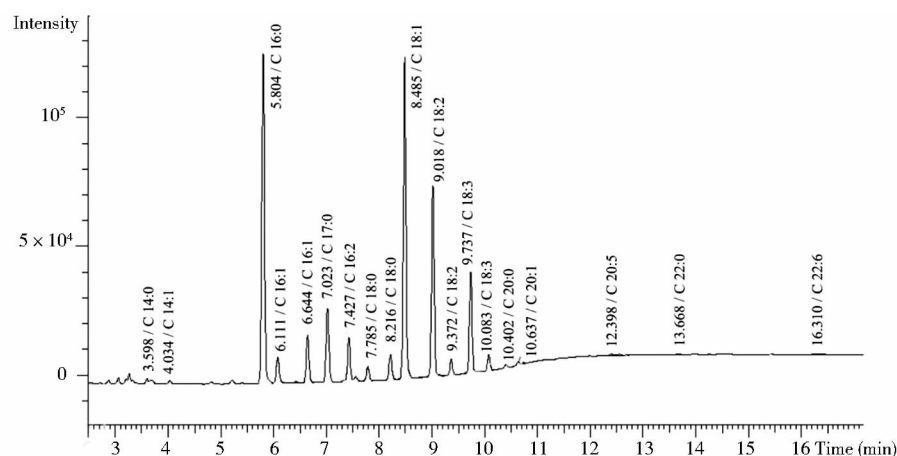
1.3.5 脂肪酸组成及相对含量的测定 本研究提取微藻脂肪酸的同时进行酯交换反应,通过分析脂肪酸甲酯成分从而实现对微藻脂肪酸的评价^[10-11]。具体操作步骤如下:称取 20mg 左右冻干藻粉装入 10ml 玻璃管中,加入 2.5ml 含 2% 硫酸的甲醇溶液,80℃ 下搅拌加热 2.5h 完成脂肪酸的甲酯化。样品冷却至室温后加入 1ml 饱和 NaCl 溶液和 1ml 正己烷,振荡后静置分层,通过有机系微孔滤膜(津腾, 0.22μm)过滤,加入正十七烷酸甲酯作为内标,定容至 1ml。脂肪酸甲酯利用岛津 GC2010 气相色谱进行定量分析,检测器为 FID。升温程序为:190℃ 保持 5min,以 10℃/min 升温至 250℃,再保持 7min。色谱柱为:DB-WAX (Agilent, USA),厚度 0.25μm、长度 30m、内径 0.25μm。脂肪酸甲酯标样正十七烷酸甲酯购自 Sigma 公司。

2 结果与讨论

2.1 *Chlorococcum* sp. 藻油脂肪酸成分的确定

取甲酯化处理之后的 *Chlorococcum* sp. 藻油,采用气相色谱进行分析。结果如图 1 所示。

图 1 显示 *Chlorococcum* sp. 藻油主要由 15 种脂肪酸组成,分别是饱和脂肪酸:豆蔻酸(C14:0),棕榈酸(C16:0),硬脂酸(C18:0),花生酸(C20:0),山嵛酸(C22:0);单不饱和脂肪酸:棕榈油酸(C16:1),油酸(C18:1),二十碳烯酸(C20:1);多不饱和脂肪酸:十六碳二烯酸(C16:2),亚油酸(C18:2),亚麻酸(C18:3),二十碳五烯酸(C20:5),二十二碳六烯酸(C22:6)。该藻株与 Patterson^[12] 报道的 *Chlorella sorokiniana* 藻株的脂肪酸组成十分接近^[12]。采用正十七烷酸甲酯内标法对藻油进行定量分析发现,样品中可作为生物柴油原料的 C16 和 C18 脂肪酸成分占总脂肪酸的 90% 以上,表明 *Chlorococcum* sp. 是一株生产生物柴油原料油有潜力的藻株。

图1 *Chlorococcum* sp. 藻油甲酯化后的气相色谱图Fig.1 Gas chromatogram of fatty acid methyl ester of *Chlorococcum* sp.

2.2 乙酸钠对 *Chlorococcum* sp. 生长及油脂积累的影响

在添加不同浓度梯度乙酸钠的条件下, *Chlorococcum* sp. 干重的变化如图2所示。从图2中可以发现,乙酸钠添加浓度为0~2g/L, *Chlorococcum* sp. 接种后没有明显的延滞期,经过4天的对数期增长后进入稳定期。*Chlorococcum* sp. 干重随乙酸钠浓度增加而升高。乙酸钠添加浓度增加到4g/L在起始阶段明显抑制 *Chlorococcum* sp. 的生长,经过4天的延滞期后微藻才到达对数期。

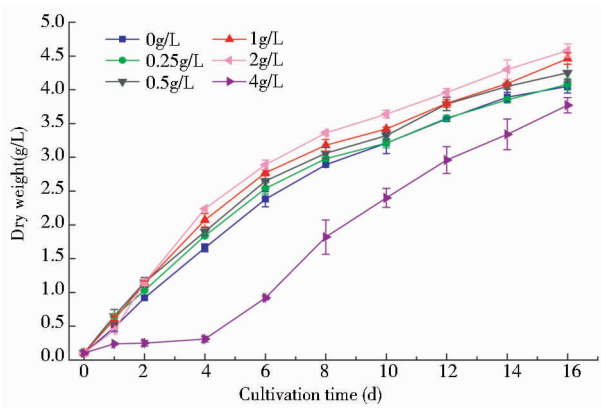
图2 *Chlorococcum* sp. 在不同浓度乙酸钠条件下的生长曲线Fig.2 Growth curves for *Chlorococcum* sp. grown under six sodium acetate concentration levels within sixteen days (means \pm SD)

表1显示了不同乙酸钠浓度对 *Chlorococcum* sp. 干重及油脂积累的影响。从表中数据可以看出,乙酸钠的添加在提高 *Chlorococcum* sp. 干重的同时也促进藻细

胞油脂的积累,与 Roessler^[13]“丰富的碳源有利于油脂的积累”的研究结论相符合。乙酸钠添加浓度在2g/L的条件下, *Chlorococcum* sp. 的干重为4.58g/L,相较于空白组4.05g/L提升了13.1%;总脂产率为98.31mg/(L·d),相较于空白组78.06mg/(L·d)提升了25.9%;脂肪酸产率为85.02mg/(L·d),相较于空白组65.76mg/(L·d)提升了29.3%。

以上实验结果表明, *Chlorococcum* sp. 在 BG-11 培养基中添加2g/L的乙酸钠,干重与油脂产率都能够得到很大幅度的提升。

2.3 硝酸钠对 *Chlorococcum* sp. 生长和油脂积累的影响

在缺氮 BG-11 培养基中加入2g/L的乙酸钠,设计5个硝酸钠添加浓度(0g/L、0.1g/L、0.5g/L、1g/L、1.5g/L), *Chlorococcum* sp. 生长情况见图3。

Chlorococcum sp. 藻细胞干重、类胡萝卜素及高级脂肪酸经甲酯化反应后生成脂肪酸甲酯的产率变化情况见图4。

综合图3与图4(a)发现, *Chlorococcum* sp. 生长过程中无明显的延滞期,第0天进入对数期,第4天转入稳定期,从图3培养液颜色及图4生长曲线能够得知:硝酸钠浓度为0~1g/L时, *Chlorococcum* sp. 的生长情况与硝酸钠浓度呈正相关;而当硝酸钠浓度达到1.5g/L时对 *Chlorococcum* sp. 生长的促进作用降低。Merzlyak 等^[14]指出,长时间氮匮乏条件下,叶绿素a(蓝绿色)与叶绿素b(黄绿色)的含量明显下降。图3显示随着培养天数的增加,0g/L和0.1g/L硝酸钠实验组中培养液颜色由绿色逐渐变成黄色,这与 Merzlyak 等的研究结果一致。

表 1 不同浓度乙酸钠条件下 *Chlorococcum* sp. 的生长指标
Table 1 Growth parameters for *Chlorococcum* sp. under six sodium acetate concentration levels within sixteen days (means \pm SD)

Concentration level (g/L)	Dry weight (g/L)	Lipid content (% of dry weight)	Lipid productivity [mg/(L · d)]	FAMEs content (% of dry weight)	FAMEs productivity [mg/(L · d)]
0	4.05 \pm 0.04	31.16 \pm 0.40	78.06 \pm 2.93	26.23 \pm 0.53	65.76 \pm 2.95
0.5	4.08 \pm 0.11	32.72 \pm 0.21	82.62 \pm 1.21	28.33 \pm 0.25	71.58 \pm 2.15
1	4.25 \pm 0.05	32.34 \pm 0.25	85.08 \pm 1.92	27.04 \pm 0.88	71.21 \pm 4.49
1.5	4.46 \pm 0.08	32.55 \pm 0.78	89.91 \pm 0.46	27.17 \pm 0.47	75.10 \pm 2.74
2	4.58 \pm 0.10	34.63 \pm 0.42	98.31 \pm 3.36	29.93 \pm 0.30	85.02 \pm 1.00
4	3.77 \pm 0.12	36.23 \pm 0.43	84.54 \pm 1.56	33.39 \pm 0.86	78.05 \pm 4.38

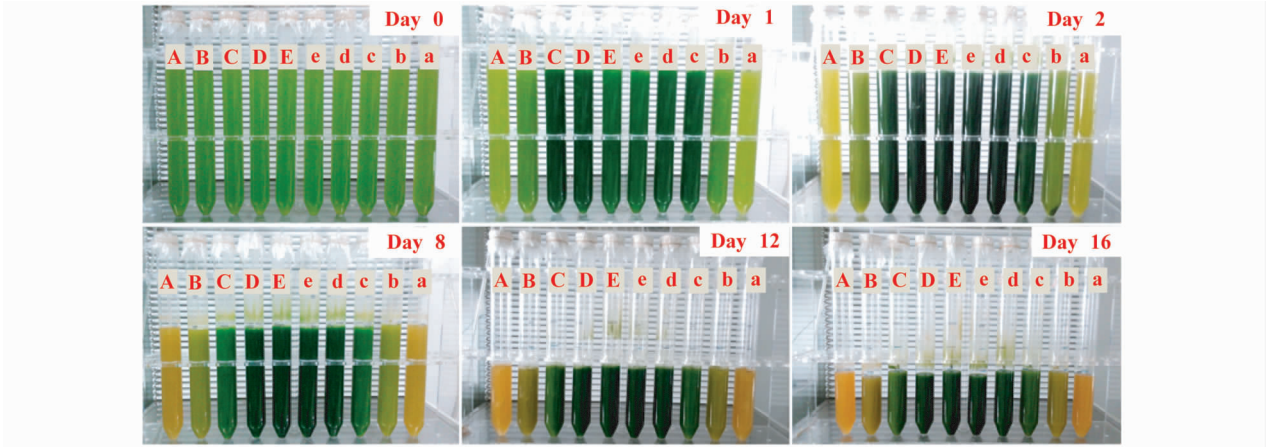


图 3 不同浓度硝酸钠对 *Chlorococcum* sp. 生长的影响
Fig. 3 Effects of sodium nitrate concentrations on the growth of *Chlorococcum* sp. with five different pretreatments 0g/L; Parallel group, A and a; 0.1g/L; Parallel group, B and b; 0.5g/L; Parallel group, C and c; 1.0g/L; Parallel group, D and d; 1.5g/L; Parallel group, E and e

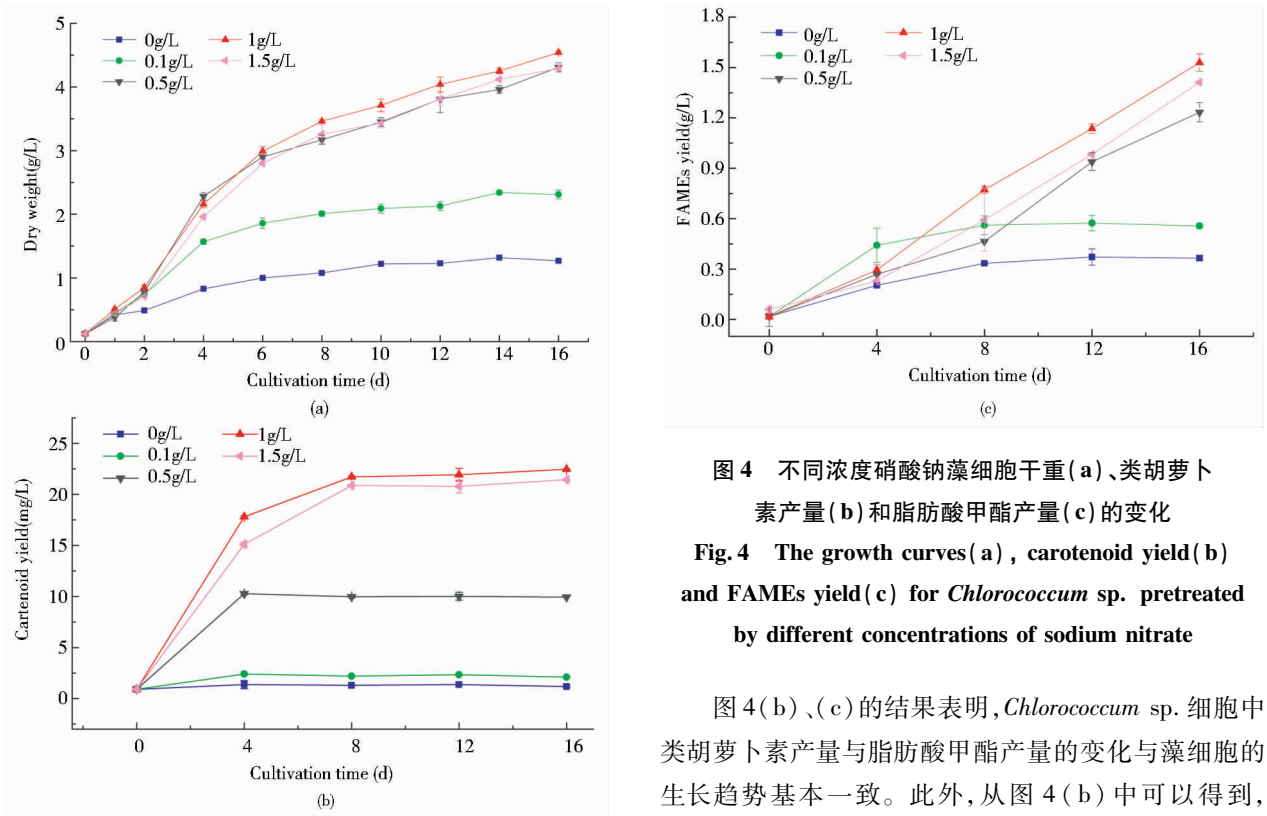


图 4 不同浓度硝酸钠藻细胞干重(a)、类胡萝卜素产量(b)和脂肪酸甲酯产量(c)的变化
Fig. 4 The growth curves (a), carotenoid yield (b) and FAMEs yield (c) for *Chlorococcum* sp. pretreated by different concentrations of sodium nitrate

图 4(b)、(c)的结果表明, *Chlorococcum* sp. 细胞中类胡萝卜素产量与脂肪酸甲酯产量的变化与藻细胞的生长趋势基本一致。此外,从图 4(b)中可以得到,

0g/L和0.1g/L 硝酸钠两组中类胡萝卜素产量并无明显升高,其他3组表明 *Chlorococcum* sp. 在0~4天类胡萝卜素产量快速增加,从第8天起,类胡萝卜素产量并没有随 *Chlorococcum* sp. 干重的增加而增加,类胡萝卜素产量在进入稳定期后变化不大;从图4(c)中分析脂肪酸甲酯产量数据表明,0.5g/L、1g/L 和1.5g/L 硝酸

钠3组的脂肪酸甲酯产量在第4天之后仍呈现线性增长。据此判断在 *Chlorococcum* sp. 生长后期积累的油脂主要成分为脂肪酸。

表2显示的是不同硝酸钠浓度梯度对 *Chlorococcum* sp. 干重及油脂积累的影响。

表2 不同浓度硝酸钠条件下 *Chlorococcum* sp. 的生长指标

Table 2 Growth parameters of *Chlorococcum* sp. under five sodium nitrate concentration levels within sixteen days (means ± SD)

Concentration level (g/L)	Dry weight (g/L)	Lipid content (% of dry weight)	Lipid productivity [mg/(L·d)]	FAMEs content (% of dry weight)	FAMEs productivity [mg/(L·d)]	Cartenoid productivity [mg/(L·d)]
0	1.27 ± 0.01	49.98 ± 0.31	38.68 ± 0.69	28.78 ± 0.11	22.02 ± 0.34	0.016 ± 0.005
0.1	2.31 ± 0.07	44.88 ± 0.37	63.81 ± 2.51	24.11 ± 0.38	34.00 ± 1.61	0.074 ± 0.004
0.5	4.31 ± 0.07	36.66 ± 0.59	97.78 ± 3.22	28.61 ± 0.12	76.25 ± 1.59	0.564 ± 0.001
1	4.54 ± 0.03	38.62 ± 0.07	108.59 ± 0.88	33.69 ± 0.10	94.78 ± 0.88	1.347 ± 0.003
1.5	4.29 ± 0.01	37.42 ± 0.14	99.34 ± 0.71	32.90 ± 0.12	87.39 ± 0.61	1.284 ± 0.004

分析表2中数据得出,在硝酸钠浓度为1g/L时, *Chlorococcum* sp. 干重达到了4.54g/L,类胡萝卜产率达到1.347mg/(L·d),比0.5g/L 硝酸钠对照组的干重和类胡萝卜素产率分别提高出5.34%和138.83%。这与薛敏^[15]的“足够氮源有利于微藻中后期积累类胡萝卜素”的结论相一致。此外,在1g/L 硝酸钠条件下,总脂产

率和脂肪酸甲酯产率也分别达到了108.59mg/(L·d)和94.78mg/(L·d),其中总脂占藻细胞干重的38.62%,与董联等^[16]以CO(NH₂)₂为氮源培养该株藻16天后取得的总脂含量38%接近。

表3显示的是氮源对 *Chlorococcum* sp. 藻细胞脂肪酸组成的影响。

表3 不同浓度硝酸钠条件下 *Chlorococcum* sp. 藻细胞脂肪酸组成

Table 3 Summary of fatty acids profile for *Chlorococcum* sp. cultivated in modified BG11 culture with different sodium nitrate concentrations within sixteen days

Fatty acids composition (% of total Fatty acids)		Concentration of sodium nitrate(g/L)				
		0	0.1	0.5	1	1.5
Saturated fatty acids	C14:0	0.59	0.68	0.79	0.79	0.83
	C16:0	26.95	26.57	29.57	31.49	30.02
	C18:0	1.47	2.75	2.96	2.92	3.23
	C20:0	5.15	0.39	0.37	0.38	0.4
	C22:0	0.33	0.07	0.06	0.08	0.17
	C24:0	0.25	0.07	0.19	0.19	0.2
	Subtotal	34.74	30.53	33.94	35.85	34.85
Monoenoic fatty acids	C14:1	0.08	0.09	0.14	0.21	0.25
	C16:1	4.2	3.43	3.93	6.73	7.2
	C18:1	20.81	35.43	32.14	27.53	29.09
	C20:1	0.78	1.08	0.98	0.76	0.8
	Subtotal	25.87	40.03	37.19	35.23	37.34

续表 3

Fatty acids composition (% of total Fatty acids)		Concentration of sodium niterate(g/L)				
		0	0.1	0.5	1	1.5
Polyenoic fatty acids	C16:2	4.67	5.69	4.93	3.93	3.59
	C18:2	23.61	10.62	11.14	15.19	14.69
	C18:3	9.3	11.29	10.91	8.22	7.95
	C20:5	0.91	0.79	0.75	0.63	0.66
	C22:6	0.9	1.05	1.14	0.95	0.92
	Subtotal	39.39	29.44	28.87	28.92	27.81
C16 ~ C18		91.01	95.78	95.58	96.01	95.77

从表3中可以看出, *Chlorococcum* sp. 藻细胞脂肪酸成分主要由 C16 与 C18 组成, 占藻细胞总脂肪酸成分的 90% 以上, 而这两种类型的脂肪酸被认为是制造生物柴油的理想原料^[17]。除缺氮组之外, 0.1g/L、0.5g/L、1g/L 和 1.5g/L 4 组 C16 ~ C18 所占比例分别为 95.78%、95.58%、96.01% 和 95.77%, 其中不饱和脂肪酸所占比例达到 60% 以上, 极大地降低了后续加工成为生物柴油的凝固点^[18], 从而在严寒的条件仍具备较好的流动性。此外, 分析中检测到高附加值脂肪酸 EPA(C20:5) 与 DHA(C22:6), 两者的含量之和也占总脂肪酸的 1.5% 以上, 表明 *Chlorococcum* sp. 在高附加值产品方面也具有一定的研究价值。

3 结 论

在 BG-11 培养基中加入有机碳源乙酸钠, 降低无机氮源硝酸钠条件下, 绿球藻 *Chlorococcum* sp. 的干重及油脂含量都有显著增长。实验结果表明, 在外源碳源乙酸钠添加浓度为 2g/L, 氮源硝酸钠为 1g/L 的改良 BG-11 培养液中, *Chlorococcum* sp. 的生物质产率达到 276.19mg/(L·d), 类胡萝卜素和总脂产率分别达到 1.347mg/(L·d) 和 108.59mg/(L·d), 分析脂肪酸成分得知该培养条件下, 作为生物柴油原料的脂肪酸成分 C16 和 C18 占到总脂肪酸 96.01%, 其中不饱和度达到 64.16%, 降低了生产为生物柴油的凝固点, 从而为其更广泛的应用奠定了基础。此外, 高附加值脂肪酸 EPA 与 DHA 占脂肪酸总量也超过了 1.5%, 表明 *Chlorococcum* sp. 除了在制备生物柴油方面有明显优势外, 在高附加值产品方面也蕴藏潜力。

参考文献

[1] Scott S A, Davey M P, Dennis J S, et al. Biodiesel from algae;

challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(3): 277-286.

[2] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(3): 294-306.

[3] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J*, 2008, 54(4): 621-639.

[4] 田辉, 谯顺彬, 彭晓东, 等. 无机与有机碳源混合营养培养对钝顶螺旋藻生长的影响. *贵州农业科学*, 2011, 39(10): 122-124. Tian H, Qiao S L, Peng X D, et al. The influence of inorganic and organic carbon sources on mixotrophic growth of *Spirulina platensis*. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2011, 39(10): 122-124.

[5] 刘平怀, 杨勋, 时杰, 等. 有机碳源对单针藻细胞生长、油脂积累和光合作用的影响. *食品工业科技*, 2012, 33(18): 224-226, 240. Liu P H, Yang X, Shi J, et al. Effect of organic carbon sources on growth rate, lipid productivity and photosynthesis of *Monorapagidium* sp. cells. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(18): 224-226, 240.

[6] Rippka R, Deruelles J, Waterbury J B, et al. Generic assignments, Strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol*, 1979, 111(1): 1-61.

[7] Zhu C J, Lee Y K. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 1997, 9(2): 189-194.

[8] Bigogno C, Khozin-Goldberg I, Boussiba S, et al. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry*, 2002, 60(5): 497-503.

[9] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids - pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol*, 1987, 148(34): 350-382.

[10] Zhu L D, Wang Z M, Shu Q, et al. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation

- with piggery wastewater treatment. Water Res, 2013, 47(13): 4294-4302.
- [11] Indarti E, Majid M I A, Hashim R, et al. Direct FAME synthesis for rapid total lipid analysis from fish oil and cod liver oil. J Food Compos Anal, 2005, 18(2-3): 161-170.
- [12] Patterson G W. Effect of culture temperature on fatty acid composition of *Chlorella sorokiniana*. Lipids, 1970, 5(7): 597-600.
- [13] Roessler P G. Environmental-control of glycerolipid metabolism in microalgae-commercial implications and future-research directions. J Phycol, 1990, 26(3): 393-399.
- [14] Merzlyak M N, Chivkunova O B, Gorelova O A, et al. Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments, and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). J Phycol, 2007, 43(4): 833-843.
- [15] 薛敏. 氮磷培养条件对栅藻 SP-01 的生长和代谢产物的影响. 广州: 中山大学, 生命科学学院, 2012.
- Xue M. Effects of Nitrogen and Phosphate on the Growth and Metabolism of *Scenedesmus* SP-01. Guangzhou: Sun Yat-sen University, School of Life Sciences, 2012.
- [16] 董联, 袁振宏, 王忠铭, 等. 光强与氮源对绿球藻 GN38 生长和油脂积累的影响. 可再生能源, 2014, 32(01): 73-80.
- Dong L, Yuan Z H, Wang Z M, et al. Effect of light intensity and nitrogen source on the growth and lipid *Chlorococcum* sp. GN38. Renewable Energy Resources, 2014, 32(01): 73-80.
- [17] Huang G H, Chen F, Wei D, et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. Appl Energy, 2010, 87(1): 38-46.
- [18] O'brien R D. Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2008.

Effect of Carbon and Nitrogen Combination on the Carotenoid and Fatty Acids Accumulation of *Chlorococcum* sp. under Mixotrophic Cultivation

CHAI Peng^{1,2} FENG Ping-zhong¹ WANG Xue-wei³ WANG Zhong-ming¹
LI Xie-kun^{1,2} YUAN Zhen-hong¹

(1 Key Laboratory of Renewable Energy, Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

(2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

(3 Foshan Innovation and Incubation Center of Energy and Environmental Technology, Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Foshan 528137, China)

Abstract The object was to analyze the effects of different combinations of additional carbon and nitrogen resources on the growth and lipid accumulation of *Chlorococcum* sp. under modified BG-11 culture pretreated by different concentrations of sodium acetate and sodium nitrate. The biomass of *Chlorococcum* sp. was determined by dry weight method. The features of lipid accumulation were analyzed by lipid productivity, carotenoid productivity and fatty acid methyl ester (FAME) composition. The results showed that *Chlorococcum* sp. cultivated in the modified BG11 with mass concentrations of sodium acetate 2g/L and sodium nitrate 1g/L had significantly improved algal growth and lipid accumulation. The final biomass, carotenoid and lipid productivity reached 276.19mg/(L·d), 1.347mg/(L·d) and 108.59mg/(L·d), respectively after 16 days' cultivation. It is worth to note that the yield of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) reached 1.58% of total fatty acids.

Key words *Chlorococcum* sp. Mixotrophic cultivation Dry weight Carotenoid Fatty acids