

# 钙化微藻的筛选及 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度对其生长和钙化效果的影响

赵前,冉朝刚,赵靖文,张永奎,谢通慧\*  
(四川大学,四川成都610065)

**摘要:**通过筛选耐受高浓度  $\text{Ca}^{2+}$  且钙化速率较高的藻株,分析初始  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对其生长和钙化效果的影响。从喀斯特地区湖泊水样分离得到多株微藻,筛选出钙化能力较高的斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*) B-7。收集藻细胞并进行扫描电镜观察和能谱仪(SEM-EDS)分析,发现细胞表面存在针状霏石形貌的钙化结晶,具有明显的钙化现象。进一步在不同  $\text{Ca}^{2+}$  浓度下培养藻株 B-7,测定细胞生长和培养基 pH 随时间的变化情况以及  $\text{Ca}^{2+}$  消耗量,结果表明,初始  $\text{Ca}^{2+}$  浓度与细胞生长呈负相关。从细胞生长和生物钙化量综合考虑,400 mg/L  $\text{Ca}^{2+}$  为藻株 B-7 进行生物钙化提供了适宜的环境;在此质量浓度下,生物钙化程度最大,生物钙化率达到 86.09%。

**关键词:**钙化微藻;生物矿化;钙化率;生长;筛选

中图分类号:Q89

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2020)04-0119-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2020.04.026

## Screening of calcified microalgae and influences of calcium ion concentration on its growth and calcification effect

ZHAO Qian, RAN Chao-gang, ZHAO Jing-wen, ZHANG Yong-kui, XIE Tong-hui\*  
(Sichuan University, Chengdu 610065, China)

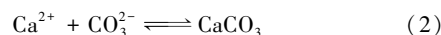
**Abstract:** This work aims to screen out microalgal strains with strong  $\text{Ca}^{2+}$ -resistant ability and high calcification rate, and investigate the effects of initial  $\text{Ca}^{2+}$  concentration on the growth and calcification of the selected microalgal strains. Several microalgal strains are isolated from water samples of Karst regions. Among them, *Scenedesmus obliquus* B-7 exhibits the highest calcification rate in  $\text{Ca}^{2+}$ -rich media. Microalgal cells are collected, and analyzed by scanning electron microscope and energy disperse spectroscopy (SEM-EDS). It is found that calcification crystals with needle-like aragonite morphology are observed on the cell surface, which implies an in vivo calcification phenomenon. Furthermore, B-7 microalgal strain is cultured under a series of initial  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. The changes of cell growth and medium pH with time, and  $\text{Ca}^{2+}$  consumption are measured. It is found that cell growth is negatively correlated with initial  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. In consideration of both cell growth and biocalcification, the optimum initial  $\text{Ca}^{2+}$  concentration is 400 mg·L<sup>-1</sup>, in which the highest biocalcification proportion of 86.09% can be obtained.

**Key words:** calcified microalgae; biomineralization; calcification rate; growth; screening

随着工业化进程的发展,导致的温室效应不容忽视<sup>[1]</sup>。而  $\text{CO}_2$  被认为是产生温室效应的重要因素<sup>[2]</sup>。目前,  $\text{CO}_2$  的碳捕获与封存技术(Carbon capture and storage,简称CCS)因成本过高和长期封存的不稳定性备受质疑<sup>[3]</sup>。生物矿化主要是利用微生物对环境  $\text{CO}_2$  进行吸收,借助代谢过程固碳从而形成碳酸盐沉积<sup>[4]</sup>,避免了 CCS 面临的渗漏、地质破坏等潜在风险<sup>[5]</sup>。

生物矿化过程主要通过碳浓缩机制(Carbon concentration mechanism,简称CCM)实现。以生物钙化为例,将  $\text{CO}_2$  固定为  $\text{CaCO}_3$ 。生物钙化被认

为是 CCM 的胞外过程,主要发生在胞外鞘(Exopolysaccharide sheath,简称EPS)或蛋白质表层(Proteinaceous surface layer,简称S-layer)。当  $\text{CO}_2$  水合反应催化剂碳酸酐酶(Carbonic anhydrase,简称CA)在叶绿体内消耗  $\text{H}^+$ <sup>[4]</sup>,泵出的  $\text{OH}^-$  使 EPS 或 S-layer 形成碱性微环境,促进碳酸盐缓冲体系向  $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{CO}_3^{2-}$  积累的方向移动<sup>[6-7]</sup>。同时 EPS 或 S-layer 上包含  $\text{Ca}^{2+}$  的结合域, $\text{Ca}^{2+}$  与  $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{CO}_3^{2-}$  结合形成  $\text{CaCO}_3$ <sup>[8]</sup>:



收稿日期:2019-06-18;修回日期:2020-02-10

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(21506132);四川大学“化工之星”优秀青年人才培养计划(2019-2020)

作者简介:赵前(1994-),男,硕士研究生,研究方向为微藻固碳的研究,515326063@qq.com;谢通慧(1986-),女,博士,副教授,主要从事微藻资源化利用的研究,通讯联系人,xietonghui@scu.edu.cn。

微藻属于经典的生物矿化微生物之一,已观察到蓝藻在胞外形成钙化晶体。此外,微藻分布广泛、适应性强,对极端环境有耐受性<sup>[9]</sup>。基于此,笔者从具有喀斯特地貌的湖泊水样中富集分离纯化微藻,根据生长和  $\text{Ca}^{2+}$  消耗情况筛选高钙化速率的藻株;通过 SEM-EDS 确认细胞表面钙化现象;并考察初始  $\text{Ca}^{2+}$  质量浓度对其生长和钙化的影响,为微藻矿化固定  $\text{CO}_2$  应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

从喀斯特地区湖泊采集水样,以体积分数为 50% 接种量接种至 BG11 培养基富集培养并纯化得到藻株。其中,栅列藻 (*Desmodesmus*) A-2 和 A-4 来源于四川省阿坝州九寨沟珍珠滩水样;斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) B-3 和 B-7 来源于四川省阿坝州九寨沟树正瀑布水样;小球藻 (*Chlorella vulgaris*) C-1、C-5、C-6、和 C-8 来源于四川省甘孜藏族自治州炉霍县卡娘乡水样。

### 1.2 培养基

BG11 培养基:  $\text{NaNO}_3$  1.5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.04 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.075 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.036 g/L, 柠檬酸 0.006 g/L, 柠檬酸铁铵 0.006 g/L, EDTA 0.001 g/L,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.02 g/L,  $\text{A}_5 + \text{C}_0$  1 mL/L。其中,  $\text{A}_5 + \text{C}_0$ :  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2.86 g/L,  $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1.81 g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.222 g/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.079 g/L,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.39 g/L,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.049 4 g/L。培养基采用高温高压进行灭菌。

### 1.3 培养方法

#### 1.3.1 微藻预培养

将纯化藻株接种于 100 mL BG11 培养基,置于光照培养箱中培养 2 周,培养条件为:温度为 25℃,光照强度为 3 000 Lux,光照时间为 14 h/d,每天摇瓶 3 次。

#### 1.3.2 钙化微藻筛选

将预培养藻液按体积分数 10% 接种量接种于调整  $\text{Ca}^{2+}$  质量浓度为 40 mg/L 的 BG11 培养基,置于光照培养箱中,培养条件同 1.3.1,间隔 48 h 测定微藻生物量、培养液 pH 及  $\text{Ca}^{2+}$  质量浓度。

#### 1.3.3 $\text{Ca}^{2+}$ 质量浓度对微藻生长及钙化速率影响

将预培养藻液以体积分数 10% 接种量接种于不同初始  $\text{Ca}^{2+}$  质量浓度 (9.8、40、200、400、2 000 mg/L 和 4 000 mg/L) 的 BG11 培养基中培养,培养

条件同 1.3.1。间隔 24 h 测定微藻生物量和培养液 pH,并检测  $\text{Ca}^{2+}$  消耗量,以未接种的培养基为空白组。

### 1.4 分析方法

生物量测定:采用分光光度法测定藻液在 680 nm 处吸光度值 ( $OD_{680}$ );当吸光度过大时,需用蒸馏水稀释藻液,使其吸光度值处于 0.2 ~ 0.8 之间。

pH 测定:以 pH 计测定微藻培养液 pH。

$\text{Ca}^{2+}$  质量浓度的测定<sup>[10]</sup>:采用双波长紫外-可见分光光度法。分别取 1 mL 样品和 1 mL 蒸馏水空白,与 1% 三乙醇胺溶液 0.4 mL、0.05% DDTTC 溶液 (铜试剂) 0.4 mL、氨-氯化铵缓冲溶液 (pH 10.5) 2 mL、0.05% 酸性铬兰 K 溶液 1.2 mL 依次混合,用蒸馏水定容至 10 mL,摇匀后静置 30 min。测定混合液在 528 nm 和 541 nm 处的吸光度值 ( $A_{528}$  和  $A_{541}$ ),计算  $\Delta A = A_{528} - A_{541}$ 。再根据  $\Delta A$  与  $\text{Ca}^{2+}$  质量浓度 ( $C_{\text{Ca}}$ , mg/L) 的标准曲线得到样品  $\text{Ca}^{2+}$  浓度。

$$\Delta A = 0.0014 C_{\text{Ca}} + 0.0178, R^2 = 0.9994 \quad (3)$$

生物钙化现象表征:藻液于 10 000 r/min 低速离心 10 min,收集细胞沉淀,冷冻干燥后进行扫描电镜-能谱仪 (SEM-EDS) 分析。

钙化率 ( $\omega$ , %) 计算:通过培养过程中  $\text{Ca}^{2+}$  的消耗量占总量的比例来表示,计算式为:

$$\omega = (C_{\text{Ca}-0} - C_{\text{Ca}-t}) / C_{\text{Ca}-0} \quad (4)$$

式中:  $C_{\text{Ca}-0}$  和  $C_{\text{Ca}-t}$  分别为培养初始和结束时培养基  $\text{Ca}^{2+}$  质量浓度, mg/L。

生物钙化率 ( $\mu$ , %) 的计算:通过实验组与空白组的  $\text{Ca}^{2+}$  消耗比较间接表征,计算式为:

$$\mu = [(C_{\text{Ca}-0} - C_{\text{Ca}-t}) - (C_0' - C_t')] / (C_{\text{Ca}-0} - C_{\text{Ca}-t}) \quad (5)$$

式中:  $C_0'$ 、 $C_t'$  分别为空白组初始和结束时培养基  $\text{Ca}^{2+}$  质量浓度, mg/L。

显著性差异分析:采用 Microsoft Excel 2013 进行计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 钙化微藻筛选

经过 24 d 的培养,各藻株生长曲线如图 1 所示。

从图 1 中可以看出,0~6 d 内,藻株生长经历迟滞期,生物量没有显著变化。6~16 d,斜生栅藻 B-7 和 B-3 的生长较其他藻种体现出优势,其中 B-7

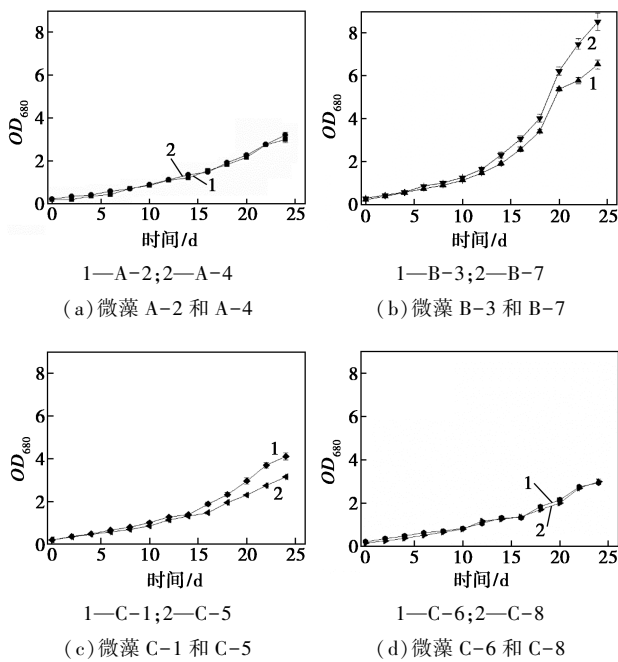


图1 藻株生长曲线

栅藻生物量最高。当培养结束时(24 d),藻株 B-7 生物量最大,  $OD$  值达到 8.52; 其次为藻株 B-3 和 C-1,  $OD$  值分别为 6.54 和 4.11; 而藻株 A-2、A-4、C-5、C-6 和 C-8 的  $OD$  值均维持在 3 左右。

各微藻培养体系的 pH 变化情况如图 2 所示。

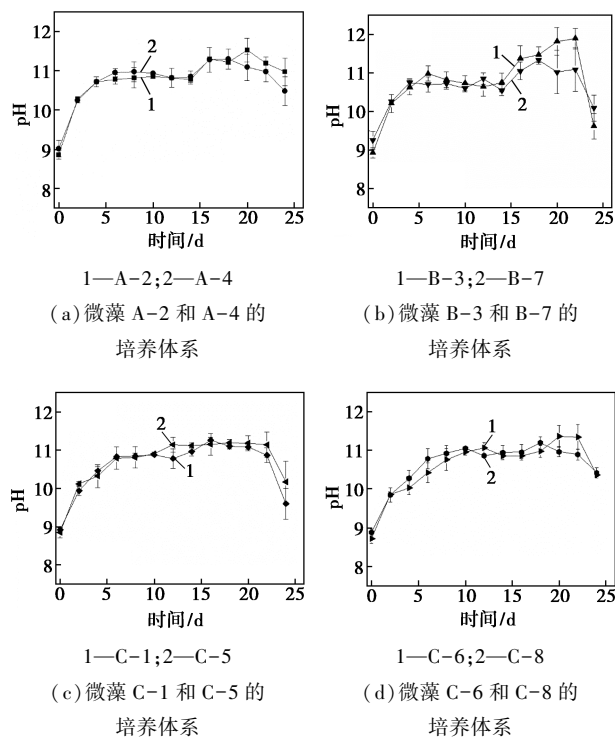
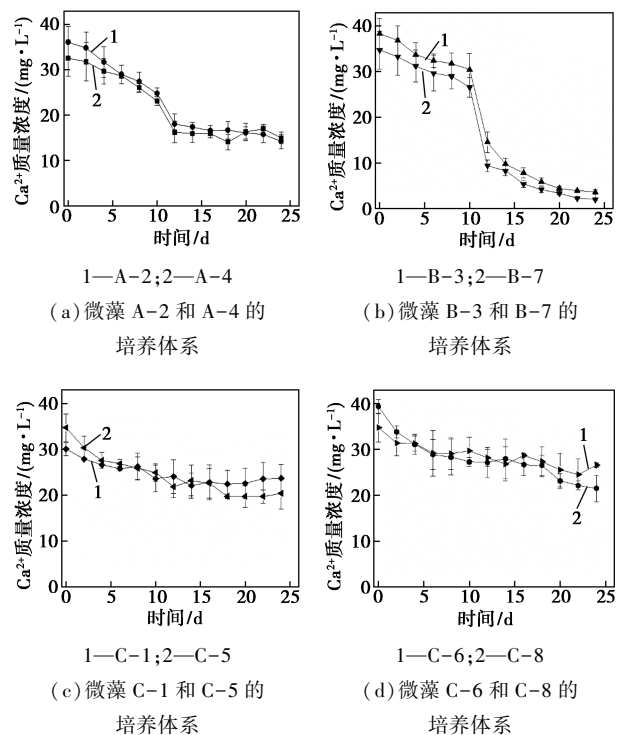


图2 微藻培养体系 pH 曲线

由图 2 中可以看出, 0~6 d 培养基 pH 均逐渐升高; 6~22 d, 除 B-3 外各藻株 pH 均趋于稳定; 培养

22 d 后, 培养液 pH 均有所下降。结合图 1 可以看出, 0~6 d 内藻细胞生长处于迟滞期, 细胞进行光合作用时消耗  $\text{H}^+$ , 从而细胞释放  $\text{OH}^-$  导致培养体系 pH 升高<sup>[11]</sup>; 6~22 d 内, 藻细胞进入对数生长期, 钙化作用消耗培养环境中  $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{CO}_3^{2-}$ , 一定程度上使 pH 相对保持稳定; 22 d 后藻细胞进入对数生长末期, 营养物的消耗和代谢产物的累积不利于细胞光合作用, 培养基 pH 呈降低趋势。

微藻培养体系  $\text{Ca}^{2+}$  消耗曲线如图 3 所示。

图3 微藻培养体系  $\text{Ca}^{2+}$  消耗曲线

由图 3 中可以看出, 培养周期内藻株 B-3 和 B-7 体系  $\text{Ca}^{2+}$  消耗速率较快; 而其他藻株 C-1、A-2 和 A-6 等体系  $\text{Ca}^{2+}$  质量浓度均在 0~12 d 逐渐降低, 12~24 d 趋于稳定。结合图 1、图 2 分析可知, 藻细胞在 0~12 d 处于迟滞期及对数生长前期, 光合作用较强, CA 酶活性较强<sup>[12]</sup>, 其参与生物钙化作用对  $\text{Ca}^{2+}$  消耗也较显著, 故培养基  $\text{Ca}^{2+}$  质量浓度均表现出下降; 12 d 后, 藻细胞进入对数生长中后期, 光合作用与钙化作用相互平衡。相比于其他藻株, 藻株 B-3 和 B-7 的生长速率逐渐提高, 其光合作用增强, 钙化作用也相应逐渐增强<sup>[13]</sup>, 培养基  $\text{Ca}^{2+}$  质量浓度持续下降。综合图 1~图 3 的结果可知, B-7 生物量增长、钙化速率最快。与文献的对比结果如表 1 所示, 综合考虑钙化率和生长情况, 故选择斜生栅藻 B-7 进行后续研究。

表 1 不同微藻的钙化率

藻种	初始 Ca <sup>2+</sup> 质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	钙化率/%	最终生物量(OD 值)	文献
斜生栅藻	40	94.30	8.52	本文
蓝藻	50~400	50~70	<1	[14]
螺旋藻	4000	35.20	—	[15]
绿藻	80~320	7.90~58.80	—	[16]

## 2.2 细胞钙化表征

将微藻细胞冷冻干燥后进行 SEM-EDS 分析,其中扫描电镜分析结果如图 4 所示。

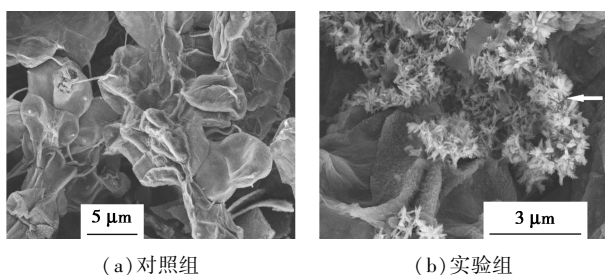


图 4 藻细胞 SEM 图

从图 4 中可以看出,对照组细胞表面平整,未见明显结晶物质附着。在 Ca<sup>2+</sup> 质量浓度为 40 mg/L 的实验组藻细胞表面附着有大量针状结晶(见图中箭头),长度约 0.4 μm,呈放射状向外扩散,类似针状霏石的显微结构<sup>[17]</sup>。Ca<sup>2+</sup> 与 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 化学反应形成沉淀时,其晶型主要是菱形的方解石和少量的球形文石,而与藻细胞表面的针状结晶不同,这些针状霏石状的胞外结晶受到藻细胞生长代谢的影响,通过生物钙化途径产生碳酸钙晶体。进一步对藻细胞表面进行 EDS 元素分析确认其成分,结果如图 5 所示。

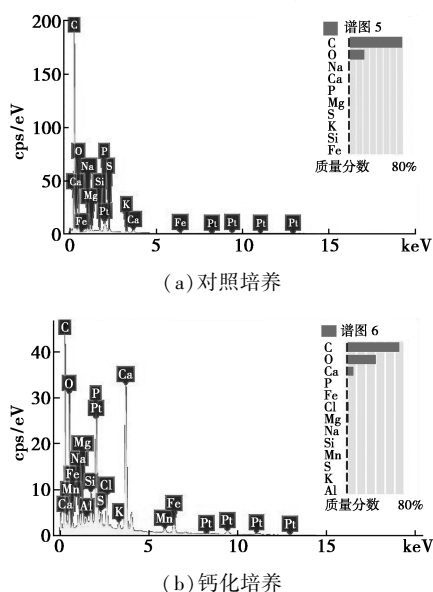


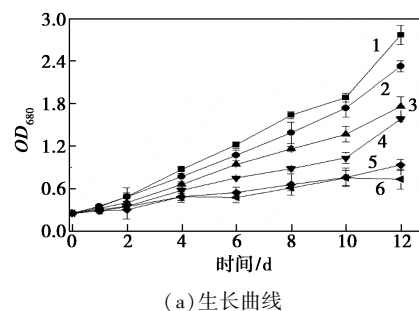
图 5 细胞表面 EDS 图谱

由图 5(a)可以看出,对照组细胞表面碳、氧元素质量分数远高于其他元素,与藻细胞壁的组成元素相符,结合图 4 中扫描电镜观察结果说明,藻株 B-7 在 BG11 培养基对照组中未发生明显钙化现象。由图 5(b)中可以看出,细胞表面碳、氧、钙元素质量分数高于其余元素,表明图 4 观察到的针状结构为钙化作用产生的碳酸钙晶体。查阅文献<sup>[18-19]</sup>可知,光合作用下细胞释放的 OH<sup>-</sup> 使细胞表面微环境呈碱性产生 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>,与细胞表面的 Ca<sup>2+</sup> 经钙化作用生成碳酸钙。

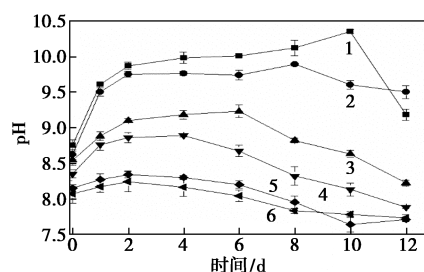
## 2.3 Ca<sup>2+</sup> 质量浓度对微藻生长和钙化的影响

### 2.3.1 Ca<sup>2+</sup> 质量浓度对微藻生长的影响

将斜生栅藻 B-7 接种于不同 Ca<sup>2+</sup> 质量浓度培养基中,考察 Ca<sup>2+</sup> 主要消耗阶段(0~12 d) 细胞生长和藻液 pH 随时间的变化情况,结果如图 6 所示。



(a) 生长曲线



(b) pH 变化曲线

1—BG11(9.8 mg/L); 2—40 mg/L; 3—200 mg/L; 4—400 mg/L; 5—2 000 mg/L; 6—4 000 mg/L

图 6 Ca<sup>2+</sup> 质量浓度对斜生栅藻 B-7 生长的影响

由图 6(a)可以看出,随着初始 Ca<sup>2+</sup> 质量浓度的增大,藻株 B-7 生物量逐渐降低。结合图 6(b)可知,随着培养基 Ca<sup>2+</sup> 质量浓度的增加,相同时间下培养液 pH 逐渐下降,表明微藻细胞代谢能力减弱,导致排出胞外的 OH<sup>-</sup> 下降<sup>[8]</sup>。可见,培养基 Ca<sup>2+</sup> 质量浓度与细胞生物量增长呈负相关( $P < 0.001$ )。

### 2.3.2 Ca<sup>2+</sup> 质量浓度对藻株 B-7 钙化影响

以藻株 B-7 在不同 Ca<sup>2+</sup> 质量浓度培养基中培养 12 d 为实验组,以未接种藻液空白培养基为空白组,测定培养基培养 12 d 前后 Ca<sup>2+</sup> 质量浓度的变

化情况,结果如表2所示。

表2 藻株B-7在不同Ca<sup>2+</sup>质量浓度培养基中的Ca<sup>2+</sup>消耗

初始Ca <sup>2+</sup> 质量浓度/ (mg·L <sup>-1</sup> )	实验组Ca <sup>2+</sup> 消耗量/ (mg·L <sup>-1</sup> )	空白组Ca <sup>2+</sup> 消耗量/ (mg·L <sup>-1</sup> )	生物钙化率/ %
9.8	2.84±0.67	1.80±0.43	36.62±0.19
40	14.30±1.05	9.41±0.65	34.20±0.29
200	147.51±6.73	28.43±2.69	80.73±0.94
400	308.18±11.81	42.88±3.75	86.09±0.68
2000	1950.04±61.28	285.67±16.04	85.35±0.36
4000	3859.79±119.62	1026.15±53.92	73.41±0.57

由表2可以看出,空白组消耗量与其初始Ca<sup>2+</sup>质量浓度呈正相关( $P < 0.001$ )。空白组消耗的Ca<sup>2+</sup>是由于培养基灭菌和培养周期中空气CO<sub>2</sub>溶入沉淀生成。接种藻株B-7的实验组Ca<sup>2+</sup>消耗均大于相同条件的空白组。扣除空白影响,藻株B-7对培养基Ca<sup>2+</sup>的净消耗与其初始Ca<sup>2+</sup>质量浓度呈正相关( $P < 0.001$ )。该结果与图4和图5中相同条件下细胞表面未发生明显钙化现象的结果吻合。结合图6分析可知,培养基初始Ca<sup>2+</sup>质量浓度与藻细胞生物量呈负相关( $P < 0.001$ )。在不同Ca<sup>2+</sup>质量浓度体系中,Ca<sup>2+</sup>质量浓度400 mg/L体系培养的藻株B-7生物钙化率最高。这一质量浓度与颗石藻*Emiliania huxleyi*光合作用和钙化作用达到最佳饱和点的Ca<sup>2+</sup>质量浓度基本一致<sup>[20]</sup>。微藻能提高1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)周围CO<sub>2</sub>浓度,以提高其羧化酶活性并抑制氧化酶活性<sup>[21]</sup>。CA酶广泛分布于藻细胞内及细胞壁上,在CCM机制中发挥重要作用<sup>[22]</sup>。高钙环境下,胞外CA酶高效催化水合反应加速矿化过程,促进CO<sub>2</sub>向碳酸盐沉积的转变<sup>[23]</sup>。但是结合表2和图6的分析结果,随着Ca<sup>2+</sup>质量浓度的进一步提高,过高的Ca<sup>2+</sup>质量浓度会影响参与钙化作用的生物酶活性,如CA酶,从而导致生物钙化率的下降。而且,随着Ca<sup>2+</sup>质量浓度的升高,细胞生长由于盐分胁迫使光合作用降低,导致培养基中的HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量降低<sup>[16]</sup>,也会使得生物钙化率有所下降。因此,Ca<sup>2+</sup>质量浓度为400 mg/L时较适合于生物钙化。

### 3 结论

通过微藻生长、钙化速率综合比较,筛选出1株

来自于喀斯特地区的斜生栅藻B-7,通过SEM-EDS检测发现,B-7于胞外形成针状霰石结构晶。Ca<sup>2+</sup>质量浓度梯度实验表明,培养体系Ca<sup>2+</sup>质量浓度与细胞生长负相关,生物钙化率随着培养体系Ca<sup>2+</sup>质量浓度的增加呈先升高后下降的趋势,在Ca<sup>2+</sup>质量浓度为400 mg/L时达到最高86.09%。

### 参考文献

- [1] Qin H T, Huang Q H, Zhang Z W, et al. Carbon dioxide emission driving factors analysis and policy implications of Chinese cities: Combining geographically weighted regression with two-step cluster [J]. *The Science of the Total Environment*, 2019, 684: 413-424.
- [2] Khesghi H, Coninck H, Kessels J. Carbon dioxide capture and storage: Seven years after the IPCC special report [J]. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 2012, 17(6): 563-567.
- [3] 马睿,王瑞兴,王凯.碳酸酐酶及其矿化捕获CO<sub>2</sub>研究[J]. *环境科学研究*, 2014, 27(10): 1205-1211.
- [4] Kim I G, Jo B H, Kang D G, et al. Biomining-based conversion of carbon dioxide to calcium carbonate using recombinant carbonic anhydrase [J]. *Chemosphere*, 2012, 87(10): 1091-1096.
- [5] 谢和平,谢凌志,王昱飞,等.全球二氧化碳减排不应是CCS,应是CCU[J]. *四川大学学报(工程科学版)*, 2012, 44(4): 1-5.
- [6] Liu Z, Bartlow P, Dilmore R M, et al. Production, purification, and characterization of a fusion protein of carbonic anhydrase from *Neisseria gonorrhoeae* and cellulose binding domain from *Clostridium thermocellum* [J]. *Biotechnology Progress*, 2009, 25(1): 68-74.
- [7] Samarrita B, Abhijit R, Kaustubha M, et al. CO<sub>2</sub> biofixation and carbonic anhydrase activity in *Scenedesmus obliquus* SA1 cultivated in large scale open system [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 164(7): 323-330.
- [8] Jansson C, Northen T. Calcifying cyanobacteria—the potential of biomineralization for carbon capture and storage [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(3): 365-371.
- [9] 孟范平,谢爽,于腾,等.耐酸性和耐高浓度CO<sub>2</sub>的海洋微藻筛选[J]. *化工进展*, 2009, (S1): 310-317.
- [10] 贺提昌,徐心茹,杨敬一,等.分光光度法测定原油中的钙含量[J]. *华东理工大学学报:自然科学版*, 2010, 36(3): 406-410.
- [11] Bilan M, Usov A. Polysaccharides of calcareous algae and their effect on the calcification process [J]. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, 27(1): 2-16.
- [12] Hopkinson B M, Meile C, Shen C. Quantification of extracellular carbonic anhydrase activity in two marine diatoms and investigation of its role [J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(2): 1142-1152.
- [13] Peach K E, Koch M S, Blackwelder P L. Effects of elevated pCO<sub>2</sub> (2) and irradiance on growth, photosynthesis and calcification in *Halimeda discoidea* [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2016, 544: 143-158.
- [14] 张道勇,潘响亮,张京梅.环境因子对*Synechocystis* sp.钙化动力学的研究[J]. *矿物岩石地球化学通报*, 2008, 27(2): 105-111.

(下转第128页)

表面变化对萜烯选择性没有影响。

### 3.4.3 HCl 浓度对萜烯选择性的影响

HCl 浓度对萜烯选择性的影响如图 6 所示。

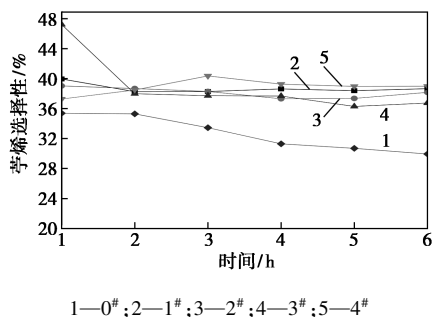


图 6 HCl 浓度对萜烯选择性的影响

由图 6 中可以看出,反应进行 6 h, 1<sup>#</sup>~4<sup>#</sup>样品的萜烯选择性在 36.74%~38.98% 之间, 0<sup>#</sup>样品选择性为 29.93%, 改性样品与参比样品(0<sup>#</sup>)相比, 萜烯选择性大幅增加了 30% 左右, 说明 HCl 处理可明显改善 H-丝光沸石对萜烯的催化选择性。这是由于萜烯选择性与沸石微孔孔容有关, 经 HCl 处理后沸石微孔孔容扩大, 导致  $\alpha$ -蒎烯经 H-丝光沸石催化异构时更易于生成萜烯。

## 4 结论

(1) HCl 热处理对 H-丝光沸石比表面积有明显的影响, 且沸石结晶度变化不大, 在 HCl 浓度为 0.5~2.0 mol/L 范围内, HCl 浓度越大, H-丝光沸石的比表面积增加越多; HCl 热处理增大了丝光沸石的微孔和介孔孔容。

(2) HCl 热处理使 H-丝光沸石含有的 Brønsted 酸和 Lewis 酸中心数量增加, 且 Lewis 酸中心数量大

幅增加, 增强了沸石 Brønsted 酸和 Lewis 酸的强度。

(3) 经 HCl 处理的 H-丝光沸石反应活性下降, 在催化  $\alpha$ -蒎烯异构反应中萜烯选择性大幅提高, 蒎烯选择性不变。

## 参考文献

- [1] Janssen A H, Koster A J, Jong K P D. On the shape of the mesopores in zeolite Y: A three-dimensional transmission electron microscopy study combined with texture analysis [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2002, 106(46): 11905-11909.
- [2] Najjar H, Zina M S, Ghorbel A. Study of the effect of the acid dealumination on the physico-chemical properties of Y zeolite [J]. *Reaction Kinetics Mechanisms & Catalysis*, 2010, 100(2): 385-398.
- [3] Agustina E, Theresia P. The effect of acid dealumination of Indonesian zeolite on its physical, chemical and catalytic properties [J]. *Studies in Surface Science & Catalysis*, 1994, 84(10): 1021-1026.
- [4] Broekhoven E H V, Daamen S, Smeink R G, et al. The effect of dealumination procedure on the acidity and catalytic properties of Y zeolites [J]. *Studies in Surface Science & Catalysis*, 1989, 49(12): 1291-1300.
- [5] Triantafyllidis C S, Vlessidis A G, Nalbandian L, et al. Effect of the degree and type of the dealumination method on the structural, compositional and acidic characteristics of H-ZSM-5 zeolites [J]. *Microporous & Mesoporous Materials*, 2001, 47(2-3): 369-388.
- [6] Weitkamp J, Puppe L. *Catalysis and zeolites: Fundamentals and applications* [M]. Berlin: Springer, 1999: 226.
- [7] Sosćán H, Castellano O, Hernández J, et al. Acidity of the Brønsted acid sites of zeolites [J]. *International Journal of Quantum Chemistry*, 2015, 82(3): 143-150.
- [8] Bhan A, Iglesia E. A link between reactivity and local structure in acid catalysis on zeolites [J]. *Cheminform*, 2008, 39(29): 559-567. ■

(上接第 123 页)

- [15] Ramanan R, Kannan K, Deshkar A, et al. Enhanced algal CO<sub>2</sub> sequestration through calcite deposition by *Chlorella* sp and *Spirulina platensis* in a mini-raceway pond [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(8): 2616-2622.
- [16] Hong M E, Sun B, Kumar A, et al. Enhanced biomass and lipid production of *Neochloris oleoabundans* under high light conditions by anisotropic nature of light-splitting CaCO<sub>3</sub> crystal [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 287: 121483.
- [17] Ouhenia S, Chateigner D, Belkhir M A, et al. Synthesis of calcium carbonate polymorphs in the presence of polyacrylic acid [J]. *Journal of Crystal Growth*, 2008, 310(11): 2832-2841.
- [18] 陶羽. 混合微藻碳酸酐酶的环境调控及菌藻共生体系研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学, 2013.
- [19] Yoshinori T, Kensuke N, Yusuke M. Molecular aspects of the

biophysical CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism and its regulation in marine diatoms [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(14): 3763.

- [20] 缪晓玲. 海洋浮游藻 (*Emiliania huxleyi*) 无机碳利用机理 [J]. *上海师范大学学报 (自然科学版)*, 1998, (4): 44-49.
- [21] Ana H, Jodi Y, Spencer M, et al. The role of Rubisco kinetics and pyrenoid morphology in shaping the CCM of haptophyte microalgae [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(14): 3959.
- [22] Hwangbo K, Lim J M, Jeong S W, et al. Elevated inorganic carbon concentrating mechanism confers tolerance to high light in an arctic *Chlorella* sp. ArM0029B [J]. *Frontiers In Plant Science*, 2018, 9: 590.
- [23] Yang Z N, Li X M, Umar A, et al. Insight into calcification of *Synechocystis* sp. enhanced by extracellular carbonic anhydrase [J]. *RSC Advances*, 2016, 6(35): 29811-29817. ■