

研究报告



光强及氮浓度对丝状绿藻双星藻生长及生化组成的影响

戴晨明 高保燕 苏敏 黄罗冬 王飞飞 赵伟 张成武*

暨南大学生态学系水生生物研究中心 广东 广州 510632

摘要:【背景】环境因子和营养因子对微藻的生长和生化组成都有显著的影响,其中光强和氮浓度是最重要的两个条件。【目的】研究不同光强和初始氮浓度对丝状绿藻-双星藻(*Zygnema* sp.)生长及生化组成的影响。【方法】采用改良的BBM培养基,设置了两组光强[100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]和6种初始氮浓度(3、6、9、12、15和18 mmol/L)在柱状光生物反应器中对双星藻进行培养。【结果】在高光强条件下[300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$],12 mmol/L初始氮浓度最有利于双星藻生物量的积累,其最高生物量可以达到6.60 g/L,而初始低氮浓度(3 mmol/L)则促进了油脂和脂肪酸的积累,油脂最高含量占干重的32.13%,且脂肪酸组成主要包括棕榈酸($\text{C}_{16:0}$)、油酸($\text{C}_{18:1}$)、亚油酸($\text{C}_{18:2}$)和亚麻酸($\text{C}_{18:3}$),其中油酸含量最高达到总脂肪酸含量的55.01%;在低光强条件下[100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$],初始氮浓度为18 mmol/L时,总蛋白质和总碳水化合物的含量达到最高,分别占干重的16.35%和37.70%,而总脂含量仅占干重10.16%。【结论】光强和初始氮浓度对双星藻生长具有较大影响,通过调节光强和初始氮浓度可有效提高双星藻目标代谢产物的积累。

关键词:丝状绿藻,双星藻,生物量,生化组成,脂肪酸组成

Effects of light intensity and nitrogen concentration on the growth and biochemical composition of filamentous green alga *Zygnema* sp.DAI Chen-Ming GAO Bao-Yan SU Min HUANG Luo-Dong WANG Fei-Fei
ZHAO Wei ZHANG Cheng-Wu*

Research Centre for Hydrobiology, Department of Ecology, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

Abstract: [Background] Environmental factors and nutrient factors have significant effects on the growth and biochemical composition of microalgae, and light intensity and nitrogen concentration are two of important environmental factors. [Objective] The effects of different light intensities and initial nitrogen concentrations on the growth and biochemical composition of filamentous green alga, *Zygnema* sp. was investigated. [Methods] The alga was grown in bubble column glass photobioreactor with modified BBM medium under two light intensities (100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ and 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) and six initial nitrogen

Foundation items: National High Technology Research and Development Program of China (2013AA065805); Equipment and Technologies for Emergency Disposal of Cyanobacterial Blooms in Water Supply Reservoirs of Guangdong Province (2015B020235007); Scientific Research Projects of Academy of Petrochemical Sciences (ST18005-2)

*Corresponding author: Tel: 86-20-85222025; E-mail: tzhangcw@jnu.edu.cn

Received: 06-03-2019; Accepted: 07-05-2019; Published online: 12-06-2019

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2013AA065805); 广东省供水水库蓝藻水华应急处置装备与技术项目(2015B020235007); 石油化工科学研究院科研项目(ST18005-2)

*通信作者: Tel: 020-85222025; E-mail: tzhangcw@jnu.edu.cn

收稿日期: 2019-03-06; 接受日期: 2019-05-07; 网络首发日期: 2019-06-12

concentration gradients (3, 6, 9, 12, 15 and 18 mmol/L). **[Results]** The highest biomass was observed at high light intensity (300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) and 12 mmol/L initial nitrogen concentration, which was 6.60 g/L. The initial low nitrogen concentration (3 mmol/L) was conducive to the accumulation of total lipid and fatty acids of *Zygnema* sp., and the highest total lipid content reached 32.13% of dry weight. The main components of fatty acid were palmitic acid, oleic acid, linoleic acid and α -linolenic acid, and oleic acid content accounted for 55.01% of total fatty acid. Under low light intensity (100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$), the highest protein and carbohydrate content was obtained under 18 mmol/L initial nitrogen concentration, which was 16.35% of dry weight and 37.70% of dry weight, respectively. Meanwhile, the total lipid content accounted for only 10.16% of dry weight. **[Conclusion]** The light intensity and initial nitrogen concentration had a great influence on the growth and biochemical composition of *Zygnema* sp., the target accumulation of metabolites of *Zygnema* sp. could be effectively increased by adjust the light intensity and initial nitrogen concentration.

Keywords: Filamentous green alga, *Zygnema* sp., Biomass, Biochemical composition, Fatty acid composition

微藻是一种微型光合生物,主要存在于海洋和淡水环境中,其优势在于光能转换效率高、生长速率快、二氧化碳利用率高、非季节性培养、可以诱导产生高含量的初生代谢产物(油、淀粉、蛋白质等)或次生代谢产物(类胡萝卜素、长链多不饱和脂肪酸、萜类等)^[1]。在大规模培养过程中,微藻的采收成本约占微藻生产总成本的 20%–30%,微藻采收的高能耗是阻碍微藻产业化发展的主要原因之一^[2]。丝状微藻具有易采收、能抵抗原生动物吞食等特点,从而能降低生产成本^[3]。而针对丝状微藻的研究主要集中于生产营养保健品,螺旋藻是目前产业化规模最大、养殖成本最低的丝状微藻,富含蛋白质、 β -胡萝卜素、钴胺素、维生素 E 以及大量矿物质等,具有提高人体免疫系统功能,抗炎症,预防糖尿病、抑郁症等疾病,降低心血管疾病等重要生理功能,在商业化生产中常用过滤装置进行采收,丝状易采收特性是其产业化推广普及的关键因素之一^[4]。利用丝状微藻处理不同类型废水,得到的生物质应用在生物能源、农业等方面,如 Neveux 等^[5]利用鞘藻属(*Oedogonium* sp.)处理城市废水后,水中氮、磷和化学需氧量分别降低 62%、75%和 57%,微生物浓度、金属污染物均降低了 99%,处理废水后产生的生物质可用于生产生物原油; Coppens 等^[6]利用丝藻(*Ulothrix* sp.)和克里藻(*Klebsormidium* sp.)处理梭鲈养殖废水,所获得的生物质用作生物缓释肥料种植西红柿,结果发现生

物缓释肥料能提高果实中糖分和类胡萝卜素含量,改善了果实的品质。丝状微藻也可作为鱼类、家禽和家畜的饲料添加成分,如 Vucko 等^[7]利用鞘藻(*Oedogonium* sp.)制成颗粒状饲料、商业配方饲料和等比混合饲料喂养鲶鱼,10 个月后发现,只喂养鞘藻的鲶鱼与商业和混合饲料喂养的鲶鱼相比具有相同的生长速度、身体状况、颜色、繁殖力和受精率,证明了鞘藻作为草食性鱼类的饲料或饲料原料的可行性。丝状微藻大量培养后所获的生物质可用于生物燃料(生物酒精、生物柴油等)的制备,如 Wang 等^[8]以丝状产油微藻黄丝藻(*Tribonema* sp.)为原料生产生物柴油和生物乙醇,微藻生物质经酸水解后分离的脂质可转化为微藻生物柴油,转化率为 98.47%,生物乙醇产量达 56.1%。丝状微藻也可用于制备生物材料,如纤维素和纳米纤维素等, Mihriyan 等^[9]利用季节性暴发的刚毛藻藻华生产过滤介质、药物载体、建筑材料中的增强纤维和导电纤维复合材料,同时又可减轻与季节性藻华有关的严重环境问题。

环境因子(光强、温度、pH 等)和营养元素(氮、磷、碳、铁、微量元素等)都会影响微藻的生长和细胞生化组成^[10]。光照强度不仅直接影响藻类的光合作用和微藻的生长,而且色素含量、脂类含量、多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFA)等均与光照强度有直接的关系^[11]。氮是藻类细胞生长和代谢所需的重要营养元素,也是蛋

白质和核酸形成的基本元素,氮元素还是藻细胞中所有结构和功能蛋白的重要组成部分,占细胞干重的7%–10%^[12]。Gao等^[13]对类波氏真眼点藻(*Eustigmatos cf. polyphem*)的研究发现,藻细胞生物量在高光照强度条件下显著高于低光照强度实验组。印尤强等^[11]在两种光强下对缺刻缘绿藻[*Parietochloris incisa* (Reisigl) S. Watanabe]进行培养发现,油脂积累与氮浓度呈负相关,增加光照强度能显著诱导油脂的积累。同时,Seyfabadi等^[14]将小球藻(*Chlorella vulgaris*)在3种光强下进行培养后发现,在相同光暗周期下,细胞总蛋白质含量与光照强度呈正相关,增加光照强度可诱导蛋白质含量的积累。Wang等^[15]研究发现初始氮浓度对类波氏真眼点藻生长、生化组成均有影响,在最低初始氮浓度(1 mmol/L)条件下总脂含量高于正常初始氮浓度(18 mmol/L)实验组,并且总脂含量随着培养基中初始氮浓度的增加而减少;生物量、藻细胞总碳水化合物以及总蛋白质含量在正常初始氮浓度条件下高于低初始氮浓度实验组。因此,光照强度和氮浓度是影响藻类生长、生化组成的重要因素。

绿藻门中丝状藻种类繁多,双星藻隶属于链藻门(*Streptophyta*)双星藻纲(*Zygnematophyceae*)双星藻目(*Zygnematales*)双星藻科(*Zygnemataceae*)双星藻属(*Zygnema*),常见于较浅的水坑、溪流、潮湿的土壤和石头表面^[16]。双星藻为不分枝丝状体,具有易沉降、易采收等特点。有关双星藻的生长和生化组成的研究鲜有报道。因此,本研究以本实验室分离纯化的一株双星藻(*Zygnema* sp.)为实验材料,探究不同的光照条件及氮浓度对其生长和生化组成的影响,以期对丝状微藻的研究及培养条件的优化提供一定的基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

双星藻(*Zygnema* sp.)藻株,保存于暨南大学水生生物研究中心微藻生物能源与生物技术实验室

藻种库。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

Lowry法蛋白含量测定试剂盒,上海荔达生物科技有限公司。紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;光学显微镜,奥林巴斯公司;冷冻干燥机,Christ公司;氮吹仪,Organomation公司。改良的BBM培养基具体营养盐成分参照Wang等^[17]。

1.3 实验设计

实验使用 $\varnothing 4.5$ cm \times 60 cm的柱状光生物反应器为培养容器,以改良的BBM培养基为基础培养基,设置了两种光强[100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]和6种初始氮浓度(3、6、9、12、15和18 mmol/L)进行实验。取对数生长期双星藻接种,初始接种的生物量浓度为 0.65 ± 0.05 g/L,荧光白炽灯24 h持续单侧光照,通入富含1% CO_2 (体积比)的压缩空气进行通气培养,培养温度为 25 ± 1 $^\circ\text{C}$,培养周期为18 d,每种氮浓度实验组均设置3个平行。

1.4 试验方法

1.4.1 藻细胞形态学观察

每隔72 h取藻液制片,通过光学显微镜(40 \times)进行藻细胞形态结构观察,拍照记录不同培养时期细胞形态的变化和细胞内油滴形成过程。

1.4.2 藻粉制备

培养周期结束后收集不同培养条件下的藻泥,置于 -20 $^\circ\text{C}$ 冰箱中冷冻,然后用冷冻干燥机进行冻干,冻干后的藻粉分别密封保存于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中,冷藏备用。

1.4.3 生物量测定

预先将孔径为 0.45 μm 的微孔滤膜编号并放入 105 $^\circ\text{C}$ 烘箱中烘至恒重后称量质量(W_a),每天固定时间收取藻液10 mL,使用循环水式真空泵进行真空抽滤,将抽滤后带有藻细胞的微孔滤膜置于 105 $^\circ\text{C}$ 烘箱中烘干至恒重(W_b)。生物量(g/L)=($W_b - W_a$) $\times 100$ 。

1.4.4 总脂含量测定

参照Khozin-Goldberg^[18]测定总脂的方法并

稍作修改。称取 50 mg 冻干藻粉(m_1)置于 10 mL 玻璃离心管中, 放入磁力转子, 加入 2 mL 二甲亚砜-甲醇(体积比 1:9)混合液, 于 50 °C 水浴锅中搅拌提取 1.5 h, 3 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液于玻璃小瓶中。藻渣中加入正己烷-乙醚(体积比 1:1)混合液 4 mL, 于冰浴下磁力搅拌提取 1.5 h, 3 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液于同一小瓶中, 重复上述操作直至藻渣呈现灰白色。合并上清液后再加 4 mL 纯水, 充分混匀后静置分层, 有机相用另一玻璃小瓶收集, 用氮气吹干浓缩后再转移至已称重(m_2)的 2 mL EP 管中, 用氮气吹干直至恒重(m_3)。总脂含量(%DW) = $(m_3 - m_2) / m_1 \times 100$ 。

1.4.5 脂肪酸含量测定

采用 Bigogno 等^[19]的方法并稍作改进。准确称量冻干藻粉 25 mg, 置于 10 mL 玻璃离心管中, 放入磁力转子, 加入 2 mL 含有 2% H_2SO_4 的无水甲醇-甲苯混合液, 同时加入 100 μ L 0.25% 的十七烷酸标样($C_{17:0}$), 充氩气后置于 80 °C 水浴锅中搅拌抽提 1.5 h, 冷却至室温后加入 1 mL 去离子水和 1 mL 正己烷, 混匀后 3 000 r/min 离心 5 min, 转移上层有机相至气相色谱样品瓶中, 利用气相色谱仪测定藻细胞的脂肪酸组成及其含量。

1.4.6 总碳水化合物含量测定

利用 Dubois 等^[20]的苯酚-硫酸法进行总碳水化合物含量的测定。配制不同浓度的葡萄糖标准溶液, 加入 6% 苯酚和浓 H_2SO_4 , 490 nm 波长处测定吸光值(OD_{490}), 横坐标为葡萄糖浓度, 纵坐标为吸光值, 绘制标准曲线, 得出回归方程 $y = 18.048x + 0.0106$, $R^2 = 0.9997$ 。称量 10 mg 脱脂藻粉(M), 放置于 10 mL 玻璃离心管中, 放入磁力转子, 加入 5 mL 0.5 mol/L 的 H_2SO_4 , 在 100 °C 磁力水浴锅中水浴提取 4 h, 冷却至室温后 3 000 r/min 离心 5 min, 将上清液移至 25 mL 容量瓶中, 并用去离子水洗涤藻渣, 离心合并上清液 3 次后定容至 25 mL, 取 0.5 mL 提取液加水至 2 mL, 依次加入 1 mL 6% 苯酚和 5 mL 浓 H_2SO_4 混匀进行显色, 30 min 后测定 490 nm 波长下的吸光度, 代入

回归方程并计算含量。总碳水化合物含量(%DW) = $(OD_{490} - 0.0106) \times 100 / (18.048 \times 1000 \times M) \times 100$ 。

1.4.7 总蛋白质含量测定

使用 Lowry 法蛋白含量测定试剂盒测定总蛋白质含量。配制不同浓度的蛋白质标准溶液, 按照 Lowry 法进行测定, 750 nm 波长处测定吸光值(OD_{750}), 横坐标为蛋白质浓度, 纵坐标为吸光值, 绘制标准曲线, 得出回归方程 $y = 0.4984x - 0.0043$, $R^2 = 0.9995$ 。称量 30 mg 脱脂藻粉(M), 放置于 10 mL 玻璃离心管中, 放入磁力转子, 加入 5 mL 0.5 mol/L 的 NaOH, 于 80 °C 水浴锅中提取 10 min, 3 000 r/min 离心 5 min 后将上清液转移至 25 mL 容量瓶中, 重复 3 次, 定容至 25 mL, 制成样品液进行测定。总蛋白质含量(%DW) = $(OD_{750} + 0.0043) \times 25 / 498.4 \times M \times 100$ 。

1.4.8 数据分析

使用 Excel、Origin 9.1 和 SPSS 软件对数据进行分析处理、作图以及差异显著性分析, 以 $P < 0.05$ 代表差异显著。

2 结果与分析

2.1 双星藻细胞的形态学观察

利用光学显微镜观察双星藻的细胞形态, 发现双星藻为不分枝丝状体, 细胞呈圆柱形, 每个细胞具有两个上下排列的星芒状色素体(图 1A、B)。双星藻细胞体宽 16–24 μ m, 长 25–39 μ m。观察 3 mmol/L 初始氮浓度条件下双星藻细胞形态发现油滴清晰可见, 而且随着培养时间的延长, 油滴在不断积累(图 1C、D)。

2.2 两种光强下不同初始氮浓度对双星藻生长的影响

两种光强下不同初始硝酸钠浓度对双星藻生物量的影响如图 2 所示。在 100 μ mol/($m^2 \cdot s$)光强条件下, 不同初始氮浓度组均随着培养时间的延长, 生物量在不断地增加。在 9 mmol/L 初始氮浓度条件下第 18 天时达到最高生物量, 为 5.03 g/L, 与 12、15 mmol/L 初始氮浓度实验组无显著性差异($P > 0.05$), 然而显著高于 3、6、18 mmol/L 初始氮

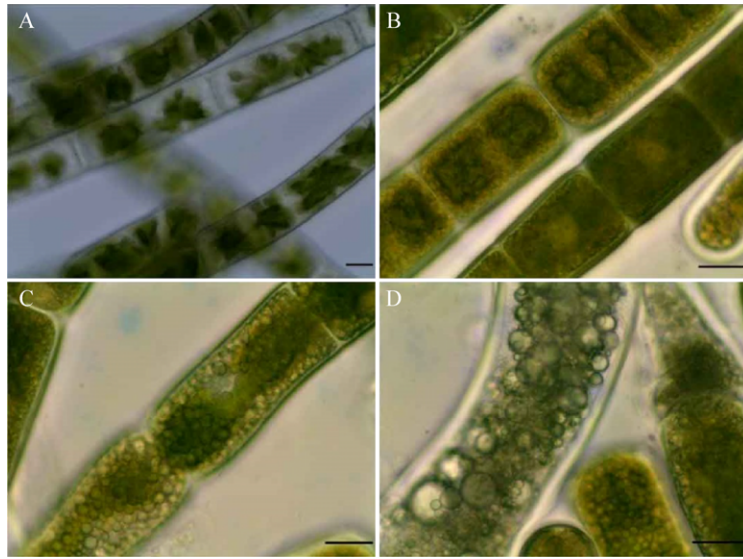


图1 低氮浓度条件下(3 mmol/L)双星藻细胞形态和内含物的变化

Figure 1 Changes of cell morphology and inclusions of *Zygnema* sp. under low nitrogen concentration (3 mmol/L)

Note: Bar: 10 μ m.

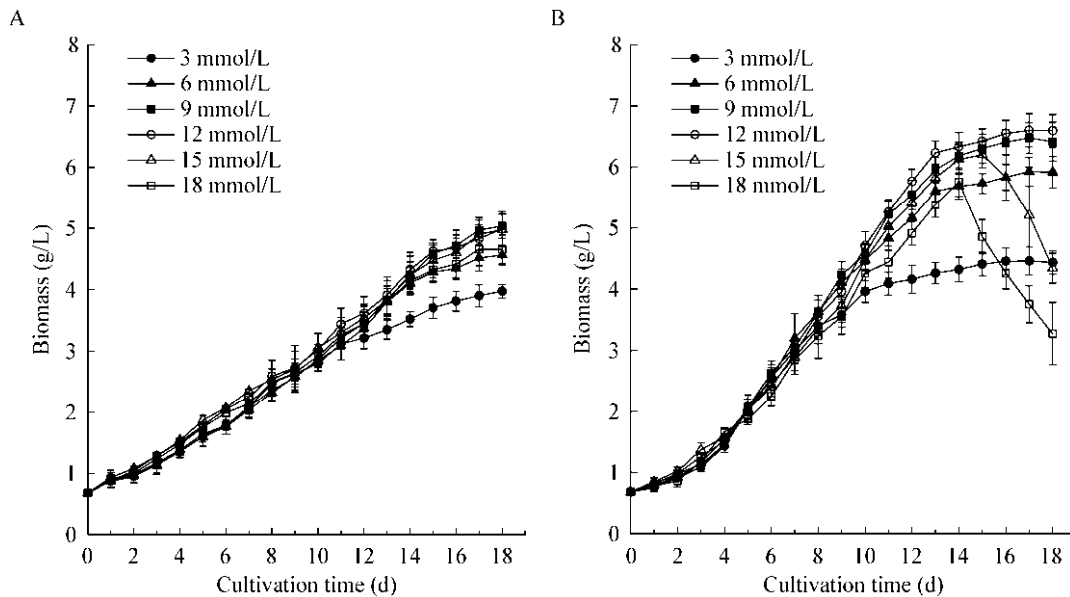


图2 两种光强下不同初始氮浓度对双星藻生长的影响

Figure 2 Cell growth of *Zygnema* sp. cultured under different initial nitrogen concentrations with two different light intensities

注: A: 100 μ mol/(m²·s)光强; B: 300 μ mol/(m²·s)光强.

Note: A: Light intensities of 100 μ mol/(m²·s); B: Light intensities of 300 μ mol/(m²·s).

浓度实验组($P < 0.05$)。在 300 μ mol/(m²·s)光强下,随着培养时间的延长,初始氮浓度为 3、6、9、12 mmol/L 初始氮浓度条件下生物量不断地增加,生长速率高于低光照强度实验组; 15、18 mmol/L

初始氮浓度条件下生物量先增加后减少,分别在第 14、15 天达到最大值。12 mmol/L 初始氮浓度培养至第 17 天时达到最高生物量 6.60 g/L,与 9 mmol/L 初始氮浓度实验组无显著性差异($P > 0.05$),显著高

于 3、6、15、18 mmol/L 初始氮浓度实验组($P<0.05$)。因此, 最有利于双星藻细胞生长的培养条件是 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强和 12 mmol/L 的初始氮浓度。

2.3 两种光强下不同初始氮浓度对双星藻生化组成的影响

两种光强条件下不同初始氮浓度对双星藻生化组成的影响如图 3 所示。两种光强下, 双星藻总脂含量随着初始氮浓度的增加而减少, 均在 3 mmol/L 初始氮浓度条件下达到最高, 在 18 mmol/L 初始

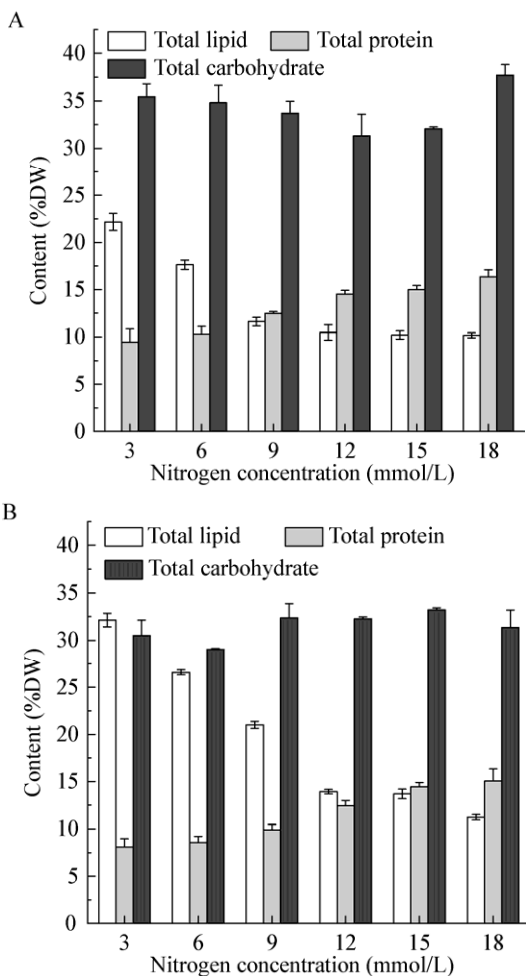


图 3 两种光强下不同初始氮浓度对双星藻生化组成的影响

Figure 3 Biochemical compositions of *Zygnema sp.* cultured under different initial nitrogen concentrations with two different light intensities

注: A: $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强; B: $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强.

Note: A: Light intensities of $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$; B: Light intensities of $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$.

氮浓度条件下总脂含量最低。在初始氮浓度相同时, 高光强实验组总脂含量均高于低光强实验组, 其中在光强为 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时, 最高总脂含量占总干重的 32.13%, 显著高于其它氮浓度实验组($P<0.05$)。两种光强下双星藻总蛋白质含量随着初始氮浓度的增加而增加, 均在 18 mmol/L 的初始氮浓度条件下达到最高, 在 3 mmol/L 初始氮浓度条件下总蛋白质含量最低。在初始氮浓度相同时, 低光强实验组总蛋白质含量均高于高光强实验组, 其中在光强为 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时, 总蛋白质含量最高占总干重的 16.35%, 与 12、15 mmol/L 初始氮浓度实验组无显著性差异($P>0.05$), 然而显著高于 3、6、9 mmol/L 初始氮浓度实验组($P<0.05$)。双星藻细胞总碳水化合物含量在两种光强和不同初始氮浓度条件下均能达到 29% 以上, 在 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强和 18 mmol/L 初始氮浓度条件下总碳水化合物含量最高占总干重的 37.70%, 与 3、6 mmol/L 初始氮浓度实验组无显著性差异($P>0.05$), 然而显著高于 9、12、15 mmol/L 初始氮浓度实验组($P<0.05$)。在 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强和 15 mmol/L 初始氮浓度条件下总碳水化合物含量最高, 占总干重的 33.21%。

2.4 两种光强下不同初始氮浓度对双星藻脂肪酸组成的影响

研究结果显示两种光强、不同初始氮浓度对双星藻总脂肪酸的绝对含量和各脂肪酸占总脂肪酸的相对含量均有影响。由图 4 折线所示的总脂肪酸占干重含量的结果可知, 双星藻总脂肪酸的绝对含量在最低初始氮浓度条件下高于其他初始氮浓度条件, 并且绝对含量在不同培养条件下的变化趋势与总脂含量变化趋势相似。双星藻主要脂肪酸组成有棕榈酸($\text{C}_{16:0}$)、棕榈油酸($\text{C}_{16:1}$)、油酸($\text{C}_{18:1}$)、亚油酸($\text{C}_{18:2}$)和亚麻酸($\text{C}_{18:3}$), 其中主要积累油酸, 占总脂肪酸含量的 22.04%–55.01%, 并在 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强和 3 mmol/L 初始氮浓度条件下达到最高相对含量, 占总脂肪酸含量的 55.01%, 最高绝对含量占干重的 15.20%; 其次是亚

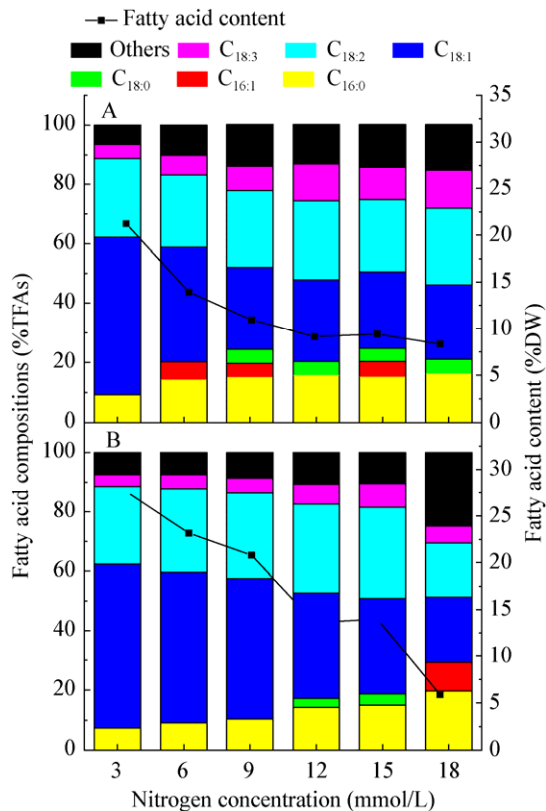


图 4 两种光强下不同初始氮浓度对双星藻脂肪酸组成的影响

Figure 4 Fatty acid compositions of *Zygnema* sp. cultured under different initial nitrogen concentrations with two different light intensities

注: A: $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强; B: $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强.

Note: A: Light intensities of $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$; B: Light intensities of $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$.

油酸($\text{C}_{18:2}$)和亚麻酸($\text{C}_{18:3}$), 分别占总脂肪酸含量的 18.10%–30.57%和 3.96%–12.78%。在 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强和 15 mmol/L 初始氮浓度条件下亚油酸达到最高相对含量, 占总脂肪酸含量的 30.57%, 最高绝对含量占干重的 7.22%; 在 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强和 18 mmol/L 初始氮浓度下亚麻酸达到最高相对含量占总脂肪酸含量的 12.78%, 最高绝对含量占干重的 1.14%。

2.5 两种光强下不同初始氮浓度对双星藻单位体积生物量、总脂、总碳水化合物和总脂肪酸产率的影响

研究结果显示, 两种光强下不同初始氮浓度

对双星藻单位体积的生物量、总脂、总碳水化合物和总脂肪酸产率均有影响。由图 5 可知, 在两种光强、不同初始氮浓度条件下培养至第 18 天, 在 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和 12 mmol/L 初始氮浓度条件下单位体积的生物量产率达到最大值, 为 $366.67 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{d})$;

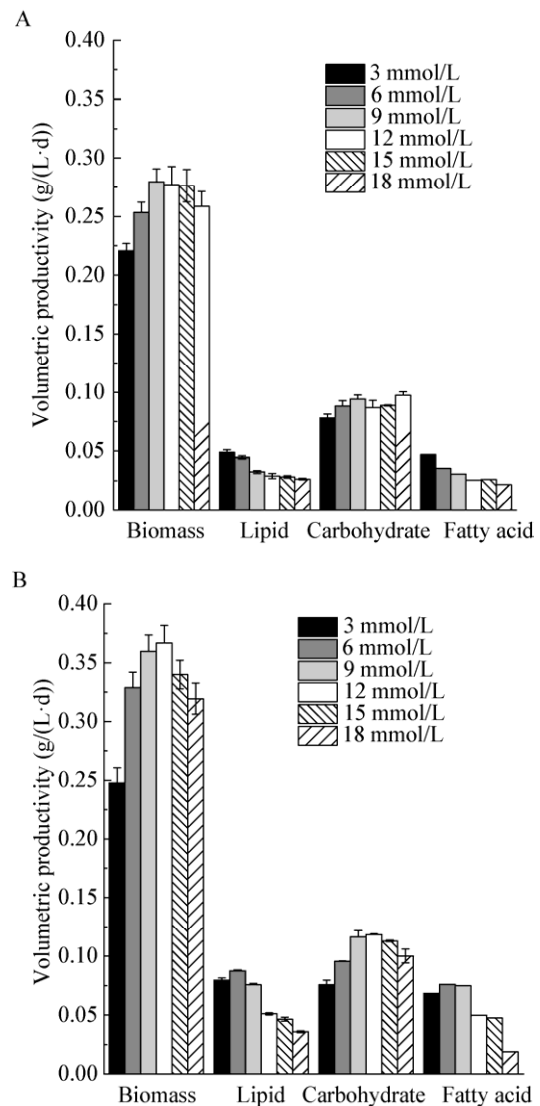


图 5 两种光强下不同初始氮浓度对双星藻单位体积生物量、总脂、总碳水化合物和总脂肪酸产率的影响

Figure 5 Volumetric productivities of biomass, total lipid, total carbohydrate and total fatty acid of *Zygnema* sp. under different initial nitrogen concentrations with two different light intensities

注: A: $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强; B: $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强.

Note: A: Light intensities of $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$; B: Light intensities of $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$.

在 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和 6 mmol/L 初始氮浓度条件下单位体积的总脂、总脂肪酸产率达到最大值, 分别为 87.41 、 $76.13 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$; 在 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和 12 mmol/L 初始氮浓度条件下单位体积的总碳水化合物产率达到最大值, 为 $118.34 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 。总体看来, 在 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和 9 mmol/L 初始氮浓度条件下单位体积的总脂、总碳水化合物产率之和达到最大值, 为 $191.98 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 。

3 讨论与结论

本研究中的双星藻为不分枝丝状体, 细胞呈圆柱形, 每个细胞内具有两个上下排列的星芒状色素体, 细胞体宽 $16\text{--}24 \mu\text{m}$, 长 $25\text{--}39 \mu\text{m}$ (图 1)。双星藻具有易沉降的特点, 采收方便, 无需离心收集, 可节约能耗, 降低培养成本。本文主要研究了光照强度以及初始氮浓度对双星藻生长以及生化组成的影响, 揭示了丝状绿藻-双星藻生长以及生化组成的规律。

Solovchenko 等^[21]对缺刻缘绿藻(*P. incisa*)的研究发现, 在 $400 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强条件下藻细胞达到最高生物量 8 g/L , 生长速率为 0.47 mg/d , 显著高于 200 、 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强条件下的生物量和生长速率; 在 3 种光照条件下正常初始氮浓度实验组的生物量和生长速率均显著高于无氮实验组。在本研究中也发现了相似的结果, 双星藻在高光强条件下 [$300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$] 不同初始氮浓度实验组所获得的生物量均高于低光强条件 [$100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$], 最高生物量分别在 9 mmol/L [$100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强条件下] 和 12 mmol/L [$300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强条件下] 初始氮浓度条件下达到, 并且最低初始氮浓度实验组 (3 mmol/L) 的生物量最低 (如图 2 所示)。最高生物量并非在最高初始氮浓度下达到, 这是由于藻细胞在培养液硝酸盐浓度过高时, 可能会使硝酸还原酶的活性增强, 进而导致藻细胞内亚硝酸盐含量过高, 对藻细胞产生毒害作用^[22], 因此在微藻培养过程中, 生物量和初始氮浓度只在一定范围内成正比。光强对微藻生长的影响可分为光限制阶段、光饱和

点和光抑制阶段^[11], 光照强度超过光饱和点即达到光抑制阶段, 会抑制微藻生长。Li 等^[23]设置 6 组光照强度 [0 、 15 、 30 、 60 、 120 和 $200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$] 对凯氏小球藻 (*C. kesslerii*) 进行培养, 研究发现藻细胞在 $120 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强下最高生物量以及生长速率高于其他光强实验组, 这说明凯氏小球藻在弱光强下处于光限制阶段, 其生长随着光照强度的增加而增加, 增至 $120 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强时则接近或达到光饱和点, 进一步增加光强则出现光抑制现象, 因此在微藻培养过程中, 生物量和光照强度只在一定范围内成正比。由此可见, 光照强度和初始氮浓度共同影响微藻的生长, 并且在一定范围内增加光照强度、调整初始氮浓度有利于微藻的生长, 提高生物量。由此可见, 光强和初始氮浓度共同影响微藻的生长, 且在一定范围内增加光照强度、调整初始氮浓度有利于微藻的生长, 提高生物量。

He 等^[24]对小球藻 (*Chlorella* sp.) 和单针藻 (*Monoraphidium dybowskii*) 的研究发现, 在最低尿素浓度 (0 g/L) 时藻细胞总脂含量高于其他尿素浓度组 (0.1 、 0.25 、 0.5 g/L); 高光强条件下总脂含量高于中、低光强实验组, 而总碳水化合物和总蛋白质含量均低于中、低光强实验组, 高光照强度促进中性脂生成, 并且提高了生物柴油生产中有用的脂肪酸组分。本研究中油脂积累规律与之类似, 双星藻在 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强和 3 mmol/L 初始氮浓度条件下总脂和总脂肪酸含量达到最高, 分别占总干重的 32.13% 和 27.62% (图 3、4), 显著高于其他初始氮浓度实验组; 提高光照强度能增加双星藻总油脂含量, 并且藻细胞总脂含量随着初始氮浓度的增加而减少。这是由于较高的光强条件下, 藻细胞将多余的光能转化为化学能, 以脂质形式储存起来, 以避免细胞发生光氧化损伤^[25]; 低初始氮浓度胁迫会使藻细胞的部分类囊体膜降解、酰基水解酶活性降低、磷脂水解作用减弱, 这些变化会导致脂肪酸酰基辅酶 A 的积累, 而此时二酰甘油酰基转化酶活性增强, 所以大量的酰基辅酶 A 便形成三酰甘油, 促使细胞内油脂, 尤其是中性脂 (主要是三

酰甘油, TAGs)含量的增加^[23]。在本研究中, 双星藻在正常初始氮浓度条件下总碳水化合物、总蛋白质含量均达到最高, 总碳水化合物含量在各实验组条件下均能达到总干重的 29% 以上, 最高可以达到总干重的 37.70%; 双星藻细胞总蛋白质含量最高占总干重的 16.35% (图 3), 以上研究结果与 Wang 等^[15]的研究结果相一致。典型藻类细胞中总脂含量大约占细胞干重的 8%–15%, 而总碳水化合物含量大约占细胞干重的 20%–40%^[12]。双星藻能同时积累大量油脂和总碳水化合物, 最高可达到细胞干重的 62.63%; 在 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强和 9 mmol/L 初始氮浓度条件下单位体积的总脂、总碳水化合物产率之和达到最大值, 为 191.98 mg/(L·d) (图 5)。

双星藻脂肪酸组成主要包括棕榈酸($\text{C}_{16:0}$)、棕榈油酸($\text{C}_{16:1}$)、油酸($\text{C}_{18:1}$)、亚油酸($\text{C}_{18:2}$)和亚麻酸($\text{C}_{18:3}$) (图 4)。生物柴油中最为常见的脂肪酸甲酯包括棕榈酸($\text{C}_{16:0}$)、硬脂酸($\text{C}_{18:0}$)、油酸($\text{C}_{18:1}$)、亚油酸($\text{C}_{18:2}$)和亚麻酸($\text{C}_{18:3}$), 相较于多不饱和脂肪酸, 单不饱和脂肪酸有助于提高生物柴油的点火性和抗氧化性^[3]。双星藻细胞中棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸相对含量之和可达到总脂肪酸含量的 90% 以上, 其中油酸含量最高达到总脂肪酸含量的 55.01%, 此株双星藻可成为油酸的一种新型来源。亚油酸是在植物中产生的一种必需脂肪酸, 是亚麻酸(ALA)和花生四烯酸(AA)的代谢前体。亚油酸尤其能降低血液中的胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇浓度, 可以降低心血管疾病的发病率和死亡率; 亚油酸还具有降低血压、提高胰岛素的敏感性等作用^[26]。ALA 是二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)的前体, EPA 和 DHA 对大脑发育、心血管健康以及炎症反应等都有重要作用。ALA 还具有保护心血管、抗癌、保护神经、抗骨质疏松、抗炎和抗氧化作用^[27-28]。研究表明, 双星藻除了能大量积累油酸, 作为油酸的一种新型来源, 还能积累大量亚油酸和亚麻酸, 最高分别占总脂肪酸含量的 30.57% 和 12.78%, 其绝对含量分别

占干重的 7.22% 和 1.14%, 因此双星藻在医药保健方面具有一定的应用价值。

综上所述, 光强和初始氮浓度对双星藻生长有较大影响, 通过调节光强和初始氮浓度可以有效提高双星藻目标代谢产物的积累。

REFERENCES

- [1] Gouveia L. Microalgae as a Feedstock for Biofuels[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011: 3-5
- [2] Fan H, Han P, Wang JH, et al. Status and prospects of microalgae harvesting with biological flocculation[J]. Journal of Biology, 2017, 34(2): 26-32 (in Chinese)
樊华, 韩佩, 王菁晗, 等. 微藻生物采收技术的现状和展望[J]. 生物学杂志, 2017, 34(2): 26-32
- [3] Xu ZJ, Hu Q, Liu GX, et al. Novel lipid accumulation pattern in a filamentous oleaginous microalga *Tribonema utriculosum* SAG22. 94 under different initial nitrogen concentrations[J]. Plant Science Journal, 2018, 36(3): 411-419 (in Chinese)
徐梓钧, 胡强, 刘国祥, 等. 囊状黄丝藻在不同初始氮浓度条件下特殊的油脂积累规律[J]. 植物科学学报, 2018, 36(3): 411-419
- [4] Soni RA, Sudhakar K, Rana RS. *Spirulina* — from growth to nutritional product: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 69: 157-171
- [5] Neveux N, Magnusson M, Mata L, et al. The treatment of municipal wastewater by the macroalga *Oedogonium* sp. and its potential for the production of biocrude[J]. Algal Research, 2016, 13: 284-292
- [6] Coppens J, Grunert O, van Den Hende S, et al. The application of microalgae as a slow-release fertilizer: tomato cultivation as a model[A]/Proceedings of the 1st International seminar on Algal Technologies for Wastewater Treatment and Resource Recovery[C]. Delft, UNESCO-IHE. Institute for Water Education, 2015: 19
- [7] Vucko MJ, Cole AJ, Moorhead JA, et al. The freshwater macroalga *Oedogonium* intermedium can meet the nutritional requirements of the herbivorous fish *Ancistrus cirrhosus*[J]. Algal Research, 2017, 27: 21-31
- [8] Wang H, Ji CL, Bi SL, et al. Joint production of biodiesel and bioethanol from filamentous oleaginous microalgae *Tribonema* sp.[J]. Bioresource Technology, 2014, 172: 169-173
- [9] Mhryanyan A. Cellulose from cladophorales green algae: from environmental problem to high-tech composite materials[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2011, 119(4): 2449-2460
- [10] Juneja A, Ceballos RM, Murthy GS. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a

- review[J]. *Energies*, 2013, 6(9): 4607-4638
- [11] Yin YQ, Huang LD, Hu Q, et al. Effects of light intensity, nitrogen sources, and nitrogen levels on the growth, total lipids, and arachidonic acid accumulation of *Parietochloris incisa*[J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(4): 592-602 (in Chinese)
印尤强, 黄罗冬, 胡强, 等. 光强和氮源及其浓度对缺刻缘绿藻生长、油脂和花生四烯酸积累的影响[J]. *植物科学学报*, 2017, 35(4): 592-602
- [12] Hu Q. Environmental effects on cell composition[A]/Richmond A. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*[M]. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science, 2004, 1: 83-93
- [13] Gao BY, Xia S, Lei XQ, et al. Combined effects of different nitrogen sources and levels and light intensities on growth and fatty acid and lipid production of oleaginous eustigmatophycean microalga *Eustigmotos cf. polyphem*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(1): 215-229
- [14] Seyfabadi J, Ramezanpour Z, Khoeyi ZA. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23(4): 721-726
- [15] Wang FF, Gao BY, Huang LD, et al. Evaluation of oleaginous eustigmatophycean microalgae as potential biorefinery feedstock for the production of palmitoleic acid and biodiesel[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 270: 30-37
- [16] Holzinger A, Roleda MY, Lütz C. The vegetative arctic freshwater green alga *Zygnema* is insensitive to experimental UV exposure[J]. *Micron*, 2009, 40(8): 831-838
- [17] Wang FF, Gao BY, Wu MM, et al. A novel strategy for the hyper-production of astaxanthin from the newly isolated microalga *Haematococcus pluvialis* JNU35[J]. *Algal Research*, 2019, 39: 101466
- [18] Khozin-Goldberg I, Shrestha P, Cohen Z. Mobilization of arachidonyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Parietochloris incisa*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2005, 1738(1/3): 63-71
- [19] 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[J]. *Phytochemistry*, 2002, 60(5): 497-503
- [20] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350-356
- [21] Solovchenko AE, Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S, et al. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(3): 245-251
- [22] Chen AL, Gao BY, Huang LD, et al. Effects of initial combined concentrations of nutrients on the growth and lipid accumulation of *Eustigmotos cf. polyphem*[J]. *Plant Science Journal*, 2018, 36(3): 420-430 (in Chinese)
陈爱玲, 高保燕, 黄罗冬, 等. 营养盐初始组合浓度对类波氏真眼点藻生长和油脂积累的影响[J]. *植物科学学报*, 2018, 36(3): 420-430
- [23] Li YC, Zhou WG, Hu B, et al. Effect of light intensity on algal biomass accumulation and biodiesel production for mixotrophic strains *Chlorella kessleri* and *Chlorella protothecoide* cultivated in highly concentrated municipal wastewater[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(9): 2222-2229
- [24] He QN, Yang HJ, Xu L, et al. Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 191: 219-228
- [25] Ruangsombon S. Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 109: 261-265
- [26] Calder PC. Functional roles of fatty acids and their effects on human health[J]. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 2015, 39(S1): 18S-32S
- [27] Fleming JA, Kris-Etherton PM. The evidence for α -linolenic acid and cardiovascular disease benefits: comparisons with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid[J]. *Advances in Nutrition*, 2014, 5(6): 863S-876S
- [28] Kim KB, Nam YA, Kim HS, et al. α -Linolenic acid: Nutraceutical, pharmacological and toxicological evaluation[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 70: 163-178