

一株荒漠产油微藻的筛选及其生长和产油的 pH 响应

戴文娜¹, 童旭¹, 张琴¹, 蒋卉², 李艳宾¹

(1. 安徽工程大学生物与化学工程学院, 安徽芜湖 241000; 2. 塔里木大学生命科学学院, 新疆阿拉尔 843300)

摘要:从新疆荒漠盐碱水滩中采集水样, 富集培养后进行微藻分离, 从中筛选得到一株产油微藻 DT025, 对该微藻生长及油脂积累特性进行分析, 并进行了分子生物学鉴定, 探讨了不同 pH 对该微藻生长及产油的影响。结果表明, 该微藻鉴定为小球藻 *Chlorella* sp., 具有较好的环境适应能力和油脂积累能力, 培养 2 d 即能迅速生长, 培养 4 d 起开始大量积累油脂, 培养 8 d 时油脂含量最高, 可达 37.13%。该微藻有较好的 pH 耐受性, 在 pH 6.0~9.0 之间均能较好地生长, 适宜产油的 pH 范围是 7.0~8.0, 其中 pH 7.5 时微藻的油脂产量与产率达到最高, 分别为 1.580 g/L、0.198 g/(L·d)。此外, 在 pH 8.0、8.5 时该微藻仍然具有相对较高的油脂产量与产率, 分别达到 1.460 g/L、0.183 g/(L·d) 和 0.859 g/L、0.107 g/(L·d), 体现出较好的耐碱产油能力。

关键词:荒漠; 产油微藻; 筛选; pH; 生长; 产油

中图分类号: Q939.97; TK6

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2020)05-0082-06

Screening of a desert oil – producing microalgae and its growth and oil production response toward pH

DAI Wenna¹, TONG Xu¹, ZHANG Qin¹, JIANG Hui², LI Yanbin¹

(1. College of Biological and Chemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, Anhui, China; 2. College of Life Science, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China)

Abstract: A strain of oil – producing microalgae DT025 was obtained by isolating after being enriched and cultured from water samples collected from salt marsh in Xinjiang desert. The growth characteristics and oil accumulation characteristics of the microalgae DT025 were analyzed, and molecular biology identification was performed. In addition, the effects of different pH on the growth and oil production of the microalgae DT025 were discussed. The results showed that the microalgal strain was identified as *Chlorella* sp., and exhibited good environmental adaptability and oil accumulation ability, which grew rapidly since culturing for 2 d, and began to accumulate abundant oil since culturing for 4 d, as a result, the maximum oil content of 37.13% was obtained when cultured for 8 d. The obtained microalgae possessed good pH tolerance, which could grow well in the pH rang of 6.0 – 9.0, and the suitable pH range for oil production was 7.0 – 8.0. The maximum oil production and yield of the microalgae were obtained at pH 7.5, which were 1.580 g/L and 0.198 g/(L·d) respectively. Besides, the relatively high oil production and yield were also obtained at pH 8.0 and 8.5, which reached 1.460 g/L, 0.183 g/(L·d) and 0.859 g/L, 0.107 g/(L·d), respectively, indicating the good alkali resistance and oil production capacity of the microalgae.

Key words: desert; oil – producing microalgae; screening; pH; growth; oil production

收稿日期: 2019-09-04; 修回日期: 2020-01-16

基金项目: 安徽工程大学“中青年拔尖人才培养计划”资助项目 (S022019007); 安徽工程大学人才启动基金项目 (2018YQQ030); 国家自然科学基金项目 (21666034)

作者简介: 戴文娜 (1996), 女, 硕士研究生, 主要从事微藻资源开发利用方面的研究 (E-mail) 1932466906@qq.com。

通信作者: 李艳宾, 教授, 博士 (E-mail) ydhant@163.com。

微藻具有光合作用效率高、生长周期短、不占用耕地、可利用废水生长、油脂含量高等优点, 近年来微藻生物柴油作为第三代生物质能源备受国内外广

泛关注^[1-2]。据估计,自然界有5万多种微藻,但只有百余种得到较好的开发利用^[3],从自然界筛选高产油藻株仍是微藻生物柴油研究开发的重点和基础^[4]。特殊环境往往蕴藏着特殊的生物资源,近年来从荒漠等极端环境中筛选抗逆藻株逐渐受到研究者的重视。荒漠恶劣的生存环境使得该地区微藻通常具有抗辐射、抗盐碱、耐受温度变化等高抗逆性和较好地适应环境变化的特点^[5-6],与其他微藻相比,更适合于大规模室外培养,特别是在利用不能耕种的荒漠和盐碱滩涂地作为培养基地方面有重要的应用潜力^[5-7]。

微藻生长与油脂积累受光照、温度、营养、pH等诸多环境因素的影响^[8-9],其中pH是微藻培养中最关键的环境条件之一,其决定了CO₂和营养物质的溶解度和可利用性,对微藻生长和胞内产物的形成有重要影响^[10-11]。有研究指出,一些小球藻、栅藻等在高pH下培养,胞内油脂积累得更快^[12-13],在此环境中微生物的多样性也相对较低,因此有利于对耐高pH产油微藻进行室外开放培养^[14]。但另一方面,高pH也将一定程度限制CO₂的可利用性,从而抑制细胞生长^[10]。每种微藻都有一个最佳的pH范围适于细胞生长和油脂积累,且该pH范围较窄,并具有菌株特异性,难以得出最优pH的一般规律^[10]。因此,对于特定的微藻,探明pH对其生长和油脂积累的影响,并合理控制藻液pH,是促进微藻快速生长并大量积累油脂的重要保证。

新疆是典型的大陆性干旱气候区,吴蕾等^[15]曾对该地区的微藻进行了广泛调查,共鉴定出陆生藻77种、水生藻272种,表明该地区有丰富的藻类资源。目前为止,针对我国荒漠地区微藻的研究,大多仍集中在微藻资源的收集^[16]、鉴定^[17]、群落分析^[15,18]等阶段,也有少数以荒漠化治理为目的开展了相关研究^[19-20],但将荒漠微藻用于开发生物能源相关的系统研究仍鲜有报道。积极开展荒漠产油微藻资源的收集与筛选,对微藻生物柴油的开发应用将起到重要的推动作用。本研究从新疆塔里木盆地荒漠盐碱水滩中分离得到一株产油微藻,在分析其生长与产油特性的基础上,进一步对该藻株进行了鉴定,并探讨了pH对微藻生长和油脂积累特性的影响,以为荒漠产油微藻资源的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 水样

本实验分离微藻所用水样采自新疆塔里木盆地

荒漠盐碱水滩(N40°38.198',E81°53.145'),该水滩为地下渗水,地表无注入水源,水面有少许油膜,水滩周围有少量芦苇,测得该水pH为7.8。用25号浮游生物网将表层水进行浓缩,置于30 mL水样瓶保存。

1.1.2 培养基及培养条件

藻种分离及培养所用培养基以BG11培养基为基础加以改良:葡萄糖10 g、KNO₃ 1.25 g、KH₂PO₄ 1.25 g、MgSO₄·7H₂O 1 g、FeSO₄·7H₂O 0.05 g、CaCl₂·2H₂O 0.111 g、EDTA 0.5 g、H₃BO₃ 0.114 2 g、MnCl₂·4H₂O 0.014 2 g、Na₂MoO₄ 0.007 1 g、CuSO₄·7H₂O 0.015 7 g、CoSO₄ 0.001 g、水1 000 mL,pH 7.0,115℃灭菌20 min。固体培养基添加琼脂粉18 g/L,藻种分离培养基加30 μg/mL硫酸链霉素。

微藻基本培养条件:温度28℃,光照强度5 000 lx,光照周期12 h/12 h。

1.1.3 试剂与仪器

葡萄糖、KNO₃、KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O、FeSO₄·7H₂O、CaCl₂·2H₂O、EDTA、H₃BO₃、MnCl₂·4H₂O、Na₂MoO₄、CuSO₄·7H₂O、CoSO₄、NaOH、HCl、DMSO、甲醇、氯仿,均为分析纯;尼罗红(≥98%),Sigma公司。

AR1140电子天平,奥克斯国际贸易(上海)有限公司;PHS-3C精密pH计,上海虹益仪器仪表有限公司;SW-CT-CF超净工作台,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;TD6M低速离心机,湖南凯达仪器科学仪器公司;DK-8D数显恒温水浴锅,金坛市医疗仪器厂;DM1000双目正置生物显微镜,徕卡;BX53荧光数码显微镜,奥林巴斯;GZX-80B光照培养箱,上海力辰邦西仪器科技有限公司;DHG-9053A鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 微藻分离与产油微藻筛选

采集的水样经6 000 r/min离心10 min,弃上清液,于液体分离培养基中富集培养3~5 d,每天定期摇晃1次。而后在固体培养基上进行划线培养,并挑取单藻落反复划线纯化,在光学显微镜下检测微藻形态,同时采用尼罗红染色法^[21]对微藻细胞油脂含量进行定性检测,选择生长良好、产油量高的纯藻株,接种至斜面,4℃下保藏。

1.2.2 产油微藻的培养

将配制好的培养基分装至150 mL培养瓶中,每瓶装30 mL,灭菌后进行微藻活化与培养。用接种环挑取4~5环藻细胞至培养基中进行微藻活化,培

养 7 d 后按 10% (体积比) 接种量接种至新鲜培养基中培养, 每 2 d 取样用血球计数板计藻细胞数, 并测定微藻细胞油脂含量。

1.2.3 尼罗红染色法定性检测微藻细胞油脂含量^[21]

挑取适量微藻细胞悬于 200 μL 无菌生理盐水中, 依次加入尼罗红染液 3 μL 、二甲基亚砜 (DMSO) 75 μL , 振荡混匀, 40 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温保持 10 min, 然后 6 000 r/min 离心 10 min, 去掉上清液, 以无菌生理盐水混匀后离心, 反复洗涤 4 次, 最后加入 200 μL 生理盐水, 混匀后制片, 在荧光显微镜下观察。荧光强弱可反映微藻细胞内油脂含量的高低。

1.2.4 微藻细胞油脂含量定量测定及油脂产量、油脂产率计算

取两瓶培养至一定时间的培养液, 均以 6 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用蒸馏水反复洗涤 3 次, 得到湿藻体, 其中一瓶的湿藻体烘干至恒重, 另一瓶的湿藻体用于油脂含量的测定。采用氯仿-甲醇法测定油脂含量: 向湿藻体中添加盐酸 (按每克湿藻体加 10 mL 4 mol/L 的盐酸), 振荡混匀, 室温下处理一定时间后, 沸水浴 3~5 min, 立即置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 速冷, 冷却后, 加入与盐酸等体积的甲醇, 振荡 2 min 混匀, 再加等体积氯仿, 振荡 2 min, 6 000 r/min 离心 10 min, 收集下层氯仿层, 再加入等体积的 0.15% 氯化钠溶液, 混匀后 6 000 r/min 离心 10 min, 收集下层氯仿层, 在旋转蒸发器上蒸除氯仿, 于 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘至恒重, 记录质量。按下式计算油脂含量、油脂产量和油脂产率。

$$\text{油脂含量} = \text{油脂质量} / \text{藻体干重} \times 100\%$$

$$\text{油脂产量} = \text{油脂质量} / \text{藻液体积}$$

$$\text{油脂产率} = \text{油脂质量} / (\text{藻液体积} \times \text{培养时间})$$

1.2.5 产油微藻分子生物学鉴定

微藻培养至对数生长期后, 6 000 r/min 离心 10 min, 收集藻细胞。取 100 mg 藻细胞, 在无菌研钵中用液氮研磨, 用 DNA 提取试剂盒 (EasyPureTM Plant Genomic DNA Kit) 提取微藻总 DNA, 用 ITS1/ITS4 通用引物 (ITS1: 5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3'; ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') PCR 扩增其 ITS 序列, 送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。测序结果在 GenBank 上进行 BLAST 同源序列搜索, 挑选相关近源藻序列, 用 ClustalW 软件进行多序列对齐, 并用 MEGA 6.05 软件以相邻法构建其系统发育树, 重复 1 000 次计算 bootstrap 值。

1.2.6 数据处理

实验数据均平行测定 3 次, 采用 SPSS 18.0 和

Origin 8.5 软件进行统计分析、作图。

2 结果与分析

2.1 荒漠产油微藻的分离筛选

从采集的水样中共分离到 10 余株纯藻株, 根据镜检及其生长特征, 初步鉴定均为绿藻, 其中大部分为小球藻, 有 4 株疑为实球藻、空球藻和栅藻。从尼罗红染色结果观察来看, 所有微藻均能检测到不同强度的红色荧光, 其中一株编号为 DT025 的小球藻荧光发射强度最高 (见图 1), 故选择该藻株进行后续实验。该藻以单细胞状态存在, 藻落呈绿色奶油状、扁平形, 初步判断为小球藻。

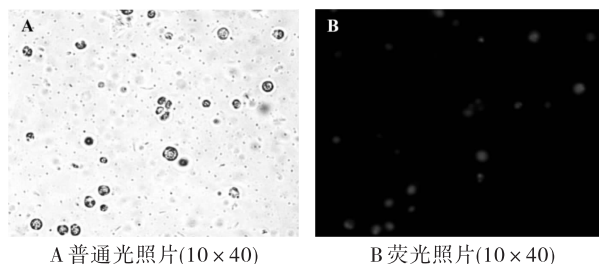


图 1 荒漠产油微藻 DT025 普通光及尼罗红染色荧光激发照片

2.2 微藻 DT025 的生长及油脂积累特性

荒漠产油微藻 DT025 按 1.2.2 方法活化、培养, 其生长曲线及油脂积累特性见图 2。

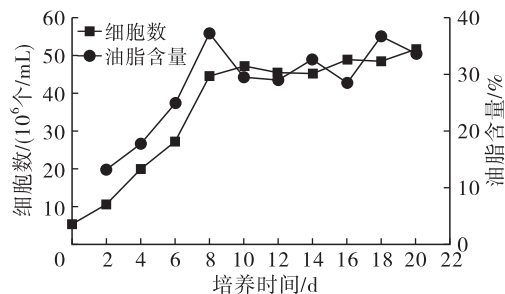


图 2 荒漠产油微藻 DT025 的生长曲线与油脂积累特性

从图 2 可以看出: 培养前 2 d, 微藻 DT025 的生长趋势相对较缓, 可视此阶段为延缓期, 但从细胞数量上来说, 培养 2 d 时微藻细胞增长了几近 1 倍, 说明微藻 DT025 能较好地适应培养环境, 在本实验培养条件下延缓期不明显; 培养 2~8 d, 微藻细胞近指数增长, 此阶段为对数生长期; 培养 8~10 d, 微藻细胞增长变缓, 此阶段为平稳期, 此后微藻细胞数量变化不大, 增长缓慢。

从图 2 还可以看出: 在培养前 8 d, 微藻细胞油脂含量逐渐升高, 特别是从培养 4 d 起, 油脂含量增加迅速, 此时对应微藻对数生长期, 表明在此培养条件下, 微藻油脂积累在时间上与微藻细胞生长同步, 这与其他报道^[11,22]的结果类似, 可能是在培养过程中, 除了细胞增殖, 微藻还利用培养基中的碳源进行油脂的合成^[11]; 培养 8 d 时微藻细胞油脂含量达到

峰值(37.13%),此后油脂含量呈现小幅波动下降,但整体上维持在30%左右,直到培养18 d时油脂含量又有一定幅度上升。从生长及油脂积累特性来看,微藻 DT025 生长迅速,含油量较高,具有较好的开发利用价值。

2.3 微藻 DT025 的分子生物学鉴定

将按 1.2.2 方法培养 7 d 的微藻 DT025,按 1.2.5 方法用通用引物对其 ITS 序列进行 PCR 扩增

并测序,获得扩增序列长度为 787 bp,该序列已提交 GenBank,登录号为 MN 328729。挑选部分相似序列与该藻系列构建系统发育树(见图 3),结果发现,微藻 DT025 与小球藻 *Chlorella* sp. SLA-04、*Chlorella* sp. Rys、*Chlorella sorokiniana* UTEX246 聚为一类,同源性均在 99% 以上,其中与 *Chlorella* sp. SLA-04 同源性达 99.59%。综上,将微藻 DT025 鉴定为小球藻,命名为 *Chlorella* sp. DT025。

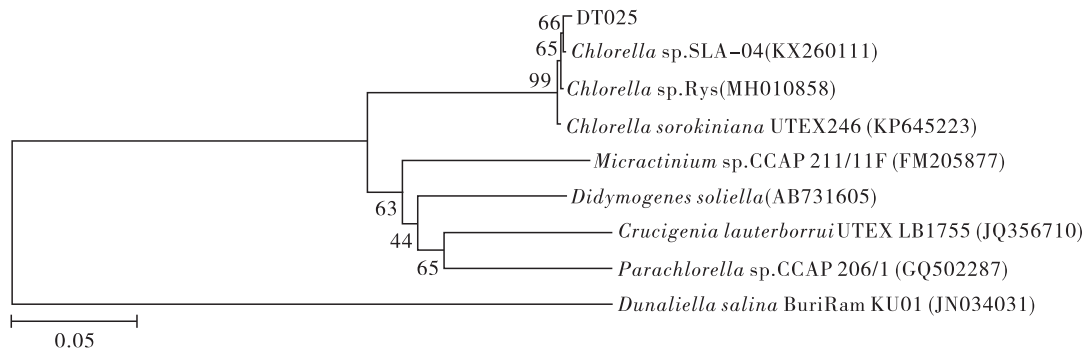


图3 基于 ITS 序列的荒漠产油微藻 DT025 系统发育树

2.4 pH 对 *Chlorella* sp. DT025 生长及油脂积累的影响

采用磷酸盐缓冲液和硼砂缓冲液将培养基 pH 分别调节至 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5,

然后按 1.2.2 方法对 *Chlorella* sp. DT025 进行活化、培养,考察 *Chlorella* sp. DT025 在不同 pH 下的生长及油脂积累情况,结果如图 4 所示。

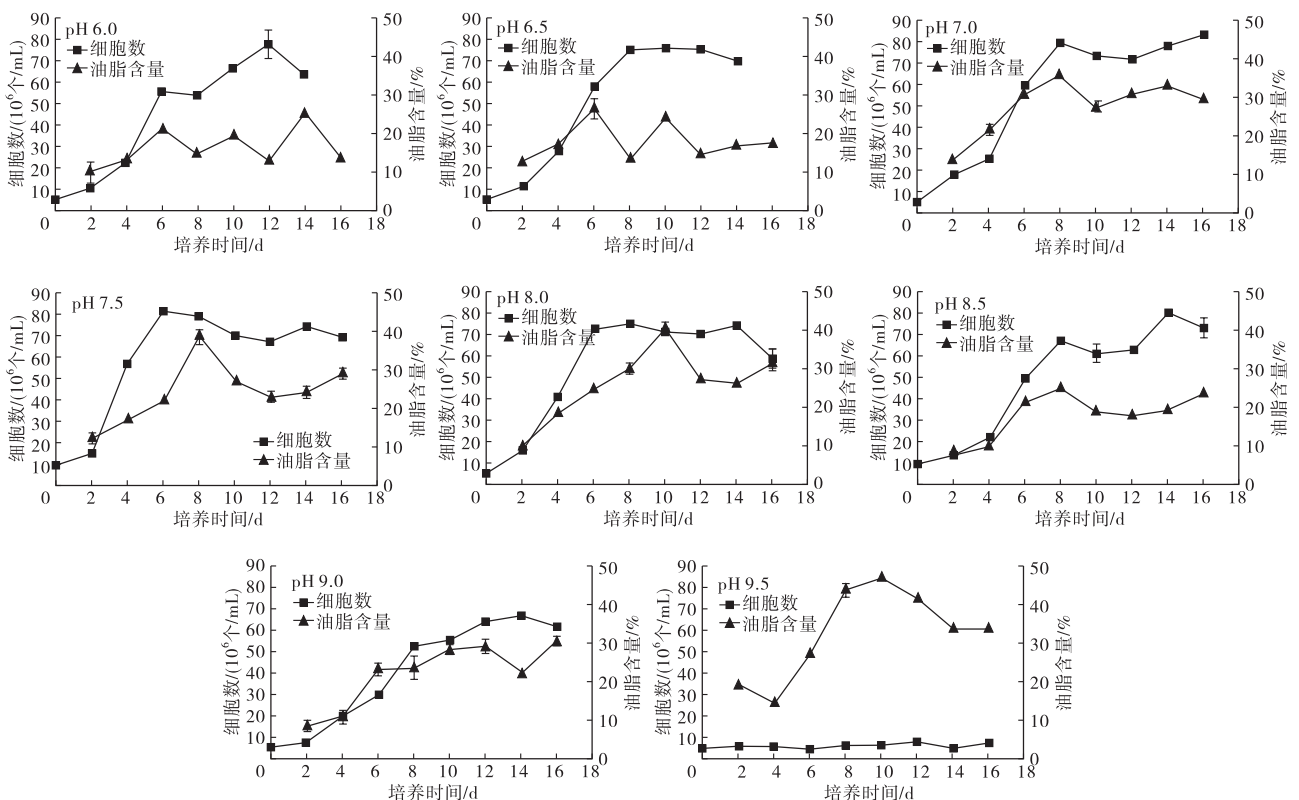


图4 pH 对 *Chlorella* sp. DT025 生长及油脂积累的影响

从图 4 可以看出,在 pH 6.0~9.0 范围内,微藻 DT025 均能较好地生长,说明其具有较宽的 pH 耐

受范围。另外,在 pH 6.0~9.0 范围内,微藻 DT025 的生长表现出相似的趋势,总体在培养 2 d 起,细胞

数量快速增长,进入对数生长期, pH 7.5 和 pH 8.0 在培养 6 d 时进入稳定期, pH 6.5、7.0、8.5 在培养 8 d 时进入稳定期,而 pH 6.0、9.0 则生长相对较缓,分别在培养 12、14 d 时达到峰值进入稳定期,说明 pH 过高或者过低,均会对微藻的生长造成较大影响。此外, pH 9.5 时微藻的生长几乎处于停滞状态,细胞数相比接种时无明显变化,能观察到微藻有明显的絮凝沉降,表明该微藻不适合在 pH 大于 9.5 的环境中生长。

从图 4 还可以看出:在培养前 4 d,各 pH 下微藻细胞的油脂含量普遍较低,之后随培养时间的延长,除了 pH 6.0,其余 pH 的微藻细胞油脂含量均迅速增加,达到峰值后逐渐呈现降低趋势,这与前述微藻油脂积累特性分析结果一致。在培养周期内, pH 6.0 时微藻细胞油脂含量较低,增加缓慢,说明低 pH 不利于油脂积累。高 pH 时微藻细胞油脂含量普遍要高于低 pH 时的,在 pH 9.5 时微藻细胞油脂含量最高,培养 10 d 可达到 46.93%,说明高 pH 胁迫有利于油脂积累,这与已有研究报道^[12-13]结论一致。

胁迫环境下如何平衡微藻产油量和生长量之间的关系是微藻油脂开发的重要问题^[23]。虽然在 pH 9.5 时微藻细胞油脂含量高,但此时微藻细胞数量很少,这将影响最终的油脂产量。为比较微藻在不同 pH 时的产油能力,计算了不同 pH 时微藻在稳定期的油脂产量和产率,结果见表 1。

表 1 不同 pH 时 *Chlorella* sp. DT025 的油脂产量与产率

| pH | 培养时间/d | 油脂产量/(g/L) | 油脂产率/(g/(L·d)) |
|-----|--------|------------|----------------|
| 6.0 | 8 | 0.525 | 0.066 |
| 6.5 | 8 | 0.545 | 0.068 |
| 7.0 | 8 | 1.475 | 0.184 |
| 7.5 | 8 | 1.580 | 0.198 |
| 8.0 | 8 | 1.460 | 0.183 |
| 8.5 | 8 | 0.859 | 0.107 |
| 9.0 | 10 | 0.495 | 0.050 |
| 9.5 | 10 | 0.624 | 0.062 |

由表 1 可知,在 pH 7.0~8.0 时,微藻的油脂产量及产率均比较高,说明该藻适宜培养产油的 pH 在 7.0~8.0 之间,其中 pH 7.5 条件下,微藻的油脂产量与产率均为最高,分别为 1.580 g/L、0.198 g/(L·d)。此外,在 pH 8.0、8.5 时,微藻的油脂产量和产率也分别达到了 1.460 g/L、0.183 g/(L·d) 和 0.859 g/L、0.107 g/(L·d),体现出该藻良好的碱耐受能力。

3 结论

从新疆荒漠盐碱水滩中分离得到一株产油微藻

DT025,该藻能较好地适应培养环境,培养 2 d 起快速生长,4 d 起开始大量积累油脂,具备较好的开发利用价值,经分子生物学鉴定为小球藻 *Chlorella* sp.。该藻 pH 耐受范围较宽,适于培养产油的 pH 范围为 7.0~8.0,其中 pH 7.5 时产油能力达到最高。

参考文献:

- [1] SINGH S P, SINGH P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: a review[J]. *Renew Sust Energ Rev*, 2015, 50: 431-444.
- [2] GUO Y, YEH T, SONG W, et al. A review of bio-oil production from hydrothermal liquefaction of algae[J]. *Renew Sust Energ Rev*, 2015, 48: 776-790.
- [3] SU Y, SONG K, ZHANG P, et al. Progress of microalgae biofuel's commercialization[J]. *Renew Sust Energ Rev*, 2017, 74: 402-411.
- [4] CHEW K W, YAP J Y, SHOW P L, et al. Microalgae biorefinery: high value products perspectives[J]. *Biore-sour Technol*, 2017, 229: 53-62.
- [5] TREVES H, RAANAN H, FINKEL O, et al. A newly isolated *Chlorella* sp. from desert sand crusts exhibits a unique resistance to excess light intensity[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2014, 86(3): 373-380.
- [6] DAS P, THAHER M I, ALJABRI H M S J. Sustainable production of toxin free marine microalgae biomass as fish feed in large scale open system in the Qatari desert[J]. *Bioresour Technol*, 2015, 192: 97-104.
- [7] ZHANG Y, HE M, ZOU S, et al. Breeding of high biomass and lipid producing *Desmodesmus* sp. by ethylmethane sulfonate-induced mutation[J]. *Bioresour Technol*, 2016, 207: 268-275.
- [8] SINGH N K, DHAR D W. Microalgae as second generation biofuel. A review[J]. *Agron Sustain Dev*, 2011, 31(4): 605-629.
- [9] HU Q, SOMMERFELD M, JARVIS E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances[J]. *Plant J*, 2008, 54(4): 621-639.
- [10] QIU R, GAO S, LOPEZ P A, et al. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*[J]. *Algal Res*, 2017, 28: 192-199.
- [11] SAKARIKA M, KORNAROS M. Effect of pH on growth and lipid accumulation kinetics of the microalga *Chlorella vulgaris* grown heterotrophically under sulfur limitation[J]. *Bioresour Technol*, 2016, 219: 694-701.
- [12] XIA L, YANG H, HE Q, et al. Physiological responses of freshwater oleaginous microalgae *Desmodesmus* sp.

- NMX451 under nitrogen deficiency and alkaline pH - induced lipid accumulation[J]. *J Appl Phycol*, 2015, 27(2): 649 - 659.
- [13] SKRUPSKI B, WILSON K E, GOFF K L, et al. Effect of pH on neutral lipid and biomass accumulation in microalgal strains native to the Canadian prairies and the Athabasca oil sands[J]. *J Appl Phycol*, 2013, 25(4): 937 - 949.
- [14] VADLAMANI A, VIAMAJALA S, PENDYALA B, et al. Cultivation of microalgae at extreme alkaline pH conditions: a novel approach for biofuel production[J]. *ACS Sustain Chem Eng*, 2017, 5(8): 7284 - 7294.
- [15] 吴蕾, 徐亮亮, 胡春香. 新疆的微藻及其群落结构[J]. *水生生物学报*, 2015, 39(6): 1207 - 1216.
- [16] 麦合穆提江·达吾提, 希尔艾力·奥布力, 穆海热姆·艾则孜, 等. 新疆尉犁县荒漠微藻的分离及其生物学特性分析[J]. *西北植物学报*, 2017, 37(5): 1022 - 1030.
- [17] 李芳芳, 隋正红, 周伟, 等. 两种沙漠微藻的形态学和分子生物学鉴定[J]. *干旱区资源与环境*, 2013, 27(3): 167 - 172.
- [18] ZHANG B C, ZHANG Y M, DOWNING A, et al. Distribution and composition of cyanobacteria and microalgae associated with biological soil crusts in the Gurbantunggut Desert, China[J]. *Arid Land Res Manag*, 2011, 25(3): 275 - 293.
- [19] CHEN L Z, DENG S Q, PHILIPPIS R D, et al. UV - B resistance as a criterion for the selection of desert microalgae to be utilized for inoculating desert soils[J]. *J Appl Phycol*, 2013, 25(4): 1009 - 1015.
- [20] 吴易雯, 饶本强, 梅海霞, 等. 光生物反应器和跑道式循环生物反应器对荒漠藻类生物量和多糖产量的影响[J]. *信阳师范学院学报(自然科学版)*, 2016, 29(1): 50 - 56.
- [21] 王海英, 符茹, 黄宝祥. 基于尼罗红荧光染色的小球藻脂质快速检测方法研究[J]. *中国油脂*, 2012, 37(3): 78 - 81.
- [22] 王亚洁, 赵阳国, 白洁, 等. 一株海洋微藻的分离鉴定及其产油条件优化[J]. *中国海洋大学学报*, 2014, 44(2): 95 - 101.
- [23] ANAND V, KASHYAP M, SAMADHIYA K, et al. Strategies to unlock lipid production improvement in algae[J]. *Int J Environ Sci Technol*, 2019, 16(3): 1829 - 1838.
-
- (上接第77页)
- [7] POJIC M, HADNADEV T D, HADNADEV M, et al. Bread supplementation with hemp seed cake: a by - product of hemp oil processing [J]. *J Food Quality*, 2015, 38(6): 431 - 440.
- [8] TEH S S, BEKHIT A E A, CARNE A, et al. Antioxidant and ACE - inhibitory activities of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates produced by the proteases AFP, HT, Pro - G, actinidin and zingibain [J]. *Food Chem*, 2016, 203: 199 - 206.
- [9] TANG C H, WANG X S, YANG X Q. Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates [J]. *Food Chem*, 2009, 114(4): 1484 - 1490.
- [10] 李永进, 杨睿悦, 扈学俸, 等. 大麻仁蛋白对小鼠抗疲劳和免疫调节功能的初步研究 [J]. *卫生研究*, 2008, 37(2): 175 - 178.
- [11] GIRGIH A T, ALASHI A M, HE R, et al. A novel hemp seed meal protein hydrolysate reduces oxidative stress factors in spontaneously hypertensive rats [J]. *Nutrients*, 2014, 6(12): 5652 - 5666.
- [12] 刘金伟. 酶法制备玉米高 F 值寡肽及其抗疲劳活性的研究 [D]. 济南: 山东轻工业学院, 2012.
- [13] CALDERS P, MATTHYS D, DERAIVE W, et al. Effect of branched - chain amino acids (BCAA), glucose, and glucose plus BCAA on endurance performance in rats [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 1999, 31(4): 583 - 587.
- [14] URSU A V, MARCATI A, SAYD T, et al. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris* [J]. *Bioresour Technol*, 2014, 157: 134 - 139.
- [15] NICKLISCH S C, WAITE J H. Optimized DPPH assay in a detergent - based buffer system for measuring antioxidant activity of proteins [J]. *Methods X*, 2014, 1: 233 - 238.
- [16] NIMSE S B, PAL D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms [J]. *Rsc Adv*, 2015, 5(35): 27986 - 28006.
- [17] 毛晓英, 朱新荣, 万银松, 等. 核桃蛋白的组成分析及分离提取工艺的优化 [J]. *中国食品学报*, 2019, 19(3): 195 - 205.
- [18] 谷海先, 王建. 风味蛋白酶的开发与利用 [J]. *中国酿造*, 2003, 22(1): 26 - 28.