

# 促进黄丝藻储能物质高效富集的氮调控策略

郭昱昊<sup>1</sup>, 李苑虹<sup>2</sup>, 曹燕<sup>2</sup>, 王飞飞<sup>1,2</sup>, 祝振洲<sup>1,2</sup>

(1. 国家富硒农产品加工技术研发专业中心, 武汉轻工大学 食品科学与工程学院, 武汉 430023;

2. 武汉轻工大学 硒科学与工程现代产业学院, 武汉 430048)

**摘要:** 为了促进黄丝藻胞内储能物质的高效积累, 研究了不同氮形态( $\text{NO}_3^-$ 、Urea 和  $\text{NH}_4^+$ ) 及初始氮浓度(1、3、6、9、18 mmol/L) 对黄丝藻生长、碳水化合物和总脂积累的影响, 在此基础上建立了基于氮调控促进黄丝藻生物量和储能物质同步高效积累的“低氮(初始氮浓度 3 mmol/L) 转高氮(初始氮浓度 18 mmol/L)” 两步法培养策略, 并对两步法培养策略的培养时间进行优化。结果表明: 与 Urea 和  $\text{NH}_4^+$  比较, 黄丝藻更倾向于利用  $\text{NO}_3^-$ , 分别在 3 mmol/L 和 18 mmol/L 条件下获得最高生物量(3.69 g/L) 和总脂含量(57.3%); 在“低氮转高氮” 两步法培养中, 低氮培养时间 6 d 转高氮培养 12 d 可显著提高黄丝藻胞内储能物质的积累, 储能物质产率最高, 达到 274.26 mg/(L·d), 其中生物量、总脂产率和碳水化合物产率分别为 6.37 g/L、152.92 mg/(L·d) 和 121.35 mg/(L·d)。基于“低氮转高氮” 的氮调控两步法是一种极具前景的培养模式, 可在保证总脂产率相当的情况下显著提高生物量和碳水化合物产率。

**关键词:** 黄丝藻; 氮形态; 两步法; 储能物质; “低氮转高氮” 培养

中图分类号: TS222; Q949.97 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2023)12-0121-07

## Nitrogen regulatory strategies for promoting efficient enrichment of energy storage compounds in *Tribonema* sp.

GUO Yuhao<sup>1</sup>, LI Yuanhong<sup>2</sup>, CAO Yan<sup>2</sup>, WANG Feifei<sup>1,2</sup>, ZHU Zhenzhou<sup>1,2</sup>

(1. National R&D Center for Se-rich Agricultural Products Processing, School of Food Science and

Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China; 2. School of

Modern Industry for Selenium Science and Engineering, Wuhan

Polytechnic University, Wuhan 430048, China)

**Abstract:** In order to promote efficient enrichment of energy storage compounds in *Tribonema* sp., the effects of different nitrogen forms ( $\text{NO}_3^-$ , Urea and  $\text{NH}_4^+$ ) and initial nitrogen concentration (1, 3, 6, 9, 18 mmol/L) on the growth, carbohydrate and lipid accumulation of *Tribonema* sp. were investigated. Then a two-step culture strategy from low nitrogen (initial nitrogen concentration 3 mmol/L) to high nitrogen (initial nitrogen concentration 18 mmol/L) based on nitrogen regulation was established to promote the simultaneous and efficient accumulation of biomass and energy storage compounds in the alga, and the culture time of the two-step culture strategy was optimized. The results indicated that the

highest biomass concentration (3.69 g/L) and total lipid content (57.3%) were obtained at 3 mmol/L and 18 mmol/L of  $\text{NO}_3^-$  in *Tribonema* sp., respectively, compared with Urea and  $\text{NH}_4^+$ . In the two-step culture strategy of "low nitrogen to high nitrogen", 6 d of low nitrogen culture to 12 d of high nitrogen culture could significantly increase the accumulation of energy storage compounds in *Tribonema* sp., and the highest

收稿日期: 2022-07-30; 修回日期: 2023-07-29

基金项目: 湖北省自然科学基金(2021CFB224); 江苏省自然科学基金(BK20200734); 武汉轻工大学科研项目资助(2021Y06); 湖北省高校优秀中青年科技创新团队(T2020012); 湖北省重点研发项目(2020BBA043)

作者简介: 郭昱昊(1998), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品加工与安全(E-mail)GYHwhpu@163.com。

通信作者: 王飞飞, 讲师(E-mail)twangff@whpu.edu.cn; 祝振洲, 教授(E-mail)zhenzhouzhu@126.com。

energy storage compounds yield was 274.26 mg/(L · d), of which the biomass and yields of total lipid and carbohydrate were 6.37 g/L, 152.92 mg/(L · d), 121.35 mg/(L · d), respectively. The two-step nitrogen regulation based on "low nitrogen to high nitrogen" is a promising culture model that can significantly increase biomass and carbohydrate yield while ensuring comparable total lipid yield.

**Key words:** *Tribonema* sp.; nitrogen form; two-step method; energy storage compound; "low nitrogen to high nitrogen" culture

能源被视为影响经济增长和社会发展的重要因素,特别是在新兴经济国家所面临的工业化、城市化和现代化的快速发展阶段,全球能源供应已急剧增加<sup>[1]</sup>。针对化石燃料持续性消耗所引起的温室效应及环境污染等问题,开发可再生且环境友好型的高效替代燃料是当前研究的热点<sup>[2]</sup>。微藻是生产第三代清洁能源的优质生物质原料,具有生长速度快、储能物质含量高、培养周期短、不占用耕地及固碳去污等诸多优势。然而,到目前为止,微藻生物能源的发展始终受制于高昂的生产成本,具体表现为生物质培养和收获成本高、油脂积累效率低等<sup>[3]</sup>。因此,筛选具有优良生物学特性的产油藻株,并通过培养条件优化促进储能物质的高效积累是突破经济屏障亟须解决的难题。

黄丝藻(*Tribonema* sp.)是一种油脂和碳水化合物含量高且富含多种生物活性物质的丝状微藻,由于其在培养过程中具有易收获、抗污染等优势,被认为是生产生物质燃料及相关高附加值生物产品的潜力藻株<sup>[4]</sup>。前期研究发现,黄丝藻可积累超过细胞干质量60%的油脂,其中90%以上是三酰甘油,且三酰甘油富含棕榈油酸,赋予了生物柴油良好的燃烧性能,而且生物质中碳水化合物可通过酸解和发酵直接转化成生物乙醇,极具综合炼制潜力<sup>[5]</sup>。目前,已经开发出多种营养调控方法来提高藻类储能物质的产量,这些因素包括对藻类环境中的氮、硫、磷或铁等元素,光强,盐度和二氧化碳的调控。其中,氮是微藻生长所必需的大量营养元素,其在培养过程中的供给条件直接影响着藻类生长代谢,特别是对油脂、淀粉、类胡萝卜素等重要代谢产物积累具有重要影响<sup>[6-7]</sup>。一般而言,低氮胁迫会刺激微藻储能物质(油脂或碳水化合物)的快速富集,但对于黄丝藻而言,其生长和储能物质积累却表现出独特的响应规律,即低氮胁迫降低了油脂含量却促进了生物量积累,但其内在调控机制有待进一步阐明<sup>[8]</sup>。因此,本研究旨在探明氮源供给条件对黄丝藻生长和储能物质积累影响的规律上,建立基于氮调控的培养策略,以期提高储能物质产率,降低生产成本。

两步培养法是解决微藻在培养过程中生物质和目标代谢产物积累不平衡的有效手段之一<sup>[9]</sup>。针对前期研究发现的黄丝藻在低氮和高氮培养条件下的生长特性和生化组成特征,本研究期望在筛选获得适合黄丝藻生长和储能物质积累的氮源及供应水平的基础上,建立一种基于氮调控的两步法培养策略,有效促进黄丝藻生物量及碳水化合物和油脂的协同积累,为黄丝藻储能物质的高效规模化培养提供技术支持,促进微藻生物能源产业的高质量发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验菌株

黄丝藻藻株(*Tribonema* sp. FACHB-1918),购买于中国科学院淡水藻种库,现保存于武汉轻工大学微藻生物资源与生物技术实验室。

#### 1.1.2 试剂及仪器

硝酸钠、甲醇、浓硫酸、苯酚、过硫酸钾、氢氧化钠、盐酸、香兰素、磷酸、甲苯(以上均为分析纯)、正己烷(色谱级),上海国药集团;Bradford 蛋白浓度测量试剂盒,碧云天生物技术公司。

改良的 BG-11(mBG-11)培养基,其组成为 NaNO<sub>3</sub> 1.5 g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.04 g/L、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.075 g/L、CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.036 g/L、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.02 g/L、柠檬酸 0.006 g/L、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.86 × 10<sup>-3</sup> g/L、MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 1.81 × 10<sup>-3</sup> g/L、ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2.22 × 10<sup>-4</sup> g/L、NaMoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 3.90 × 10<sup>-4</sup> g/L、CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 7.90 × 10<sup>-5</sup> g/L、Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 4.94 × 10<sup>-4</sup> g/L、FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 3.15 × 10<sup>-3</sup> g/L、Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O 1.36 × 10<sup>-3</sup> g/L。

AL204 电子分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器,河南予华仪器有限公司;Evolution 220 紫外可见分光光度计,美国 Thermo Fisher 公司;ALPHA 2-4 冷冻干燥机,德国 Christ 公司;FC5718R 离心机, Ohaus 仪器公司;7890A 气相色谱仪,安捷伦科技有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 黄丝藻的批次培养

采用  $\Phi 6.0 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$  光柱状玻璃生物反应器,以 mBG-11 培养基作为基础培养基,培养体积为 1.2 L。藻种首先在低光条件下扩种,待培养至对数期(7~8 d),过滤收获藻种细胞,并用无菌去离子水洗涤两次后,接种至含有不同氮形态[硝酸钠( $\text{NO}_3^-$ )、尿素(Urea)、碳酸氢铵( $\text{NH}_4^+$ )]及初始氮浓度(1、3、6、9、18 mmol/L)的 mBG-11 培养基中进行光自养培养,初始接种量为 0.2~0.3 g/L,提供单侧持续性光照(24 000 lx),培养温度控制在  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,并通入富含 1%  $\text{CO}_2$  的压缩空气鼓泡培养 12 d。培养过程中定期吸取藻液,测定不同氮形态及初始氮浓度下黄丝藻生物量及培养液中氮含量;培养结束后收获藻细胞并冷冻干燥,测定其生化组成。

### 1.2.2 黄丝藻的“低氮转高氮”两步法培养

按 1.2.1 方法,将黄丝藻在以  $\text{NO}_3^-$  为氮源,氮浓度为 3 mmol/L(低氮条件)的 mBG-11 培养基中分别培养 3、6、9 d 和 12 d,期间每隔 3 d 定量补充 3 mmol/L  $\text{NO}_3^-$ ,然后转移到含有 18 mmol/L  $\text{NO}_3^-$ (高氮条件)的 mBG-11 培养基中继续培养,整个培养周期为 18 d,收集样品,测定不同补氮方式下黄丝藻生物量、生化组成及培养基中氮含量。同时以黄丝藻在 3 mmol/L 和 18 mmol/L  $\text{NO}_3^-$  的 mBG-11 培养基中批次培养 18 d 作为对照。补氮方式以“低氮浓度(培养时间)→高氮浓度(培养时间)”标记,如低氮培养 3 d 转入高氮培养至 18 d 标记为 3(3)→18(15)。

### 1.2.3 生物量的测定

将孔径为 0.45  $\mu\text{m}$  硝酸纤维素滤膜提前置于 105  $^\circ\text{C}$  恒温烘箱中干燥 10 h 以上,直至恒重,称质量,记为  $W_1$ ;吸取 10 mL 藻液,用预先称过质量的滤膜进行抽滤,滤膜置于 105  $^\circ\text{C}$  恒温烘箱中干燥至恒重,称质量,记为  $W_2$ ;生物量( $x$ )按式(1)计算。

$$x = (W_2 - W_1) / 10 \quad (1)$$

### 1.2.4 培养基中氮含量的测定

培养基中氮含量参照 GB/T 11894—1989《水质总氮的测定 碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法》进行测定。

### 1.2.5 总脂含量测定

总脂含量参照文献[10]采用磷酸香草醛比色法测定。

标准曲线绘制:取 10、20、40、60、80、100  $\mu\text{L}$  的标准脂质溶液[质量浓度 2 mg/mL,以商品食用大豆

油为标准品,溶于氯仿-甲醇混合液(体积比 2:1)]于具塞试管中,90  $^\circ\text{C}$  水浴加热 10 min 去除有机溶剂后,加入 2 mL 浓硫酸,并于 100  $^\circ\text{C}$  水浴加热处理 5 min;待冷却至室温后,加入 5 mL 磷酸香草醛溶液(51% 磷酸溶液与香草醛溶液混合配成香草醛质量浓度 2 g/L),并在 200 r/min 摇床中振荡处理 5 min,测定反应液在 530 nm 波长处的吸光度( $A$ ),绘制标准曲线,得到回归方程为  $A_{530} = 0.0041x - 0.0245$  ( $R^2 = 0.9933$ )。

将 20 mg 冻干藻粉溶解到 20 mL 去离子水中,取 100  $\mu\text{L}$  藻液置于具塞玻璃试管中,按上述方法处理后测定反应液在 530 nm 波长处的吸光度,代入标准曲线回归方程计算总脂质量浓度,藻粉中总脂含量以总脂占细胞干重的比例计算。

### 1.2.6 碳水化合物含量测定

参照文献[11]采用苯酚-硫酸法测定藻细胞内碳水化合物含量。

### 1.2.7 脂肪酸组成与含量测定

参考 Cohen 等<sup>[12]</sup>的方法并稍作改进。称取 25 mg 冻干藻粉,置于 10 mL 螺口玻璃管中并放入转子,加入 2 mL 含有 2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  的无水甲醇-甲苯(体积比 1:1),加入 100  $\mu\text{L}$  0.25% 的十七烷酸作为内标,充入惰性气体后密封,80  $^\circ\text{C}$  水浴搅拌 1.5 h,之后加入 1 mL 正己烷和 1 mL 去离子水,3 000 r/min 离心 5 min,取上层有机相,进气相色谱仪检测。

气相色谱条件:SP-2560 色谱柱(100 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.20  $\mu\text{m}$ ),柱升温程序为柱温 140  $^\circ\text{C}$  保持 20 min,以 4  $^\circ\text{C}/\text{min}$  升温到 240  $^\circ\text{C}$ ,保持 20 min;进样量 1  $\mu\text{L}$ ;FID 检测器,检测口温度 260  $^\circ\text{C}$ ;进样口温度 250  $^\circ\text{C}$ 。采用面积归一法定量。

### 1.2.8 叶绿素含量测定

根据 Huo 等<sup>[13]</sup>的方法并稍作改进。称取 10 mg 冻干藻粉,置于带盖的玻璃管中,加入 5 mL 甲醇,避光 4  $^\circ\text{C}$  条件下搅拌提取 12 h,3 000 r/min 离心 5 min 后,取上清测定 665、650、644、452 nm 波长处的吸光度( $A$ )。按式(2)~式(4)分别计算叶绿素 a( $X_1$ )、叶绿素 b( $X_2$ )及类胡萝卜素含量( $X_3$ )。

$$X_1 = 10.3A_{665} - 0.918A_{650} \quad (2)$$

$$X_2 = 19.07A_{644} - 3.87A_{665} \quad (3)$$

$$X_3 = 4.2A_{452} - (0.0246X_1 + 0.426X_2) \quad (4)$$

### 1.2.9 总脂、碳水化合物、储能物质产率计算

分别利用式(5)、式(6)和式(7)计算总脂( $y_1$ )、碳水化合物( $y_2$ )、储能物质( $y_3$ )产率。

$$y_1 = WL/t \quad (5)$$

$$y_2 = WC/t \quad (6)$$

$$y_3 = W(L+C)/t \quad (7)$$

式中:  $W$  为生物量, g/L;  $L$ 、 $C$  分别为总脂及碳水化合物含量;  $t$  为培养时间, d。

### 1.2.10 数据处理

实验均设置 3 个平行样, 数据以“平均值  $\pm$  标准差”表示, 通过 SPSS 软件中 ANOVA 分析实验数据。采用最小显著性差异进行多重比较, 检验组间

差异。  $p < 0.05$  表示差异显著,  $p < 0.001$  表示差异极显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同氮形态及初始氮浓度对黄丝藻生长和氮吸收的影响

按照 1.2.1 方法采用 3 种氮形态 ( $\text{NO}_3^-$ 、Urea、 $\text{NH}_4^+$ ) 及 5 个初始氮浓度 (1、3、6、9、18 mmol/L) 对黄丝藻进行培养, 考察氮形态及初始氮浓度对黄丝藻生长和氮吸收的影响, 结果分别见图 1、图 2。

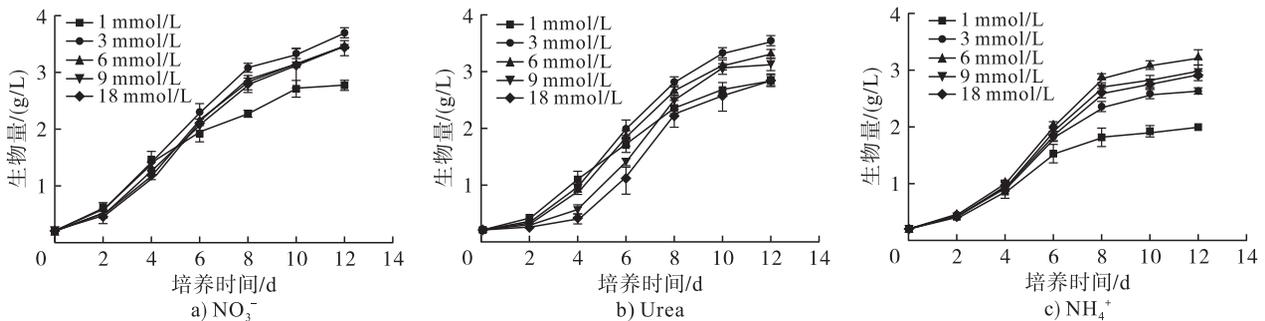


图 1 不同氮形态及初始氮浓度对黄丝藻生长的影响

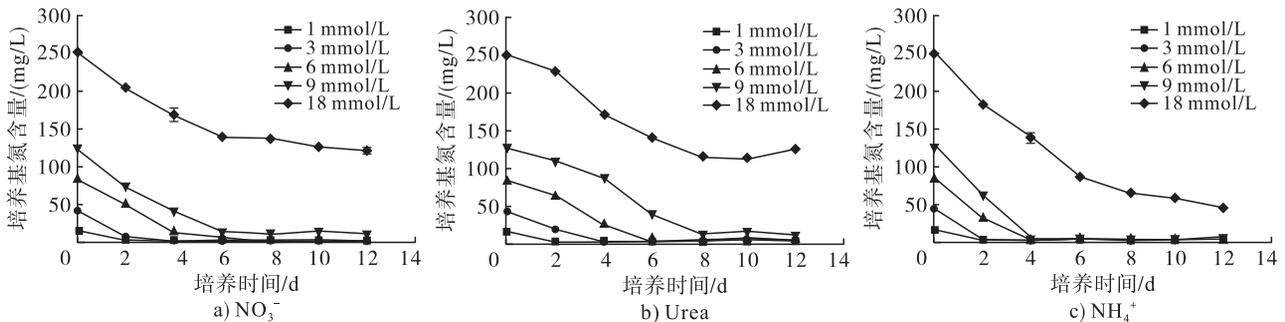


图 2 不同氮形态及初始氮浓度对黄丝藻氮吸收的影响

由图 1 可知, 黄丝藻在 3 种氮源及 5 个初始氮浓度条件下均可生长, 但其生物量积累有所不同。其中, 相同初始氮浓度下以  $\text{NO}_3^-$  和 Urea 为氮源的生物量积累水平相近, 且明显高于以  $\text{NH}_4^+$  为氮源的。但是, 无论使用哪一种氮源, 其初始氮浓度变化对黄丝藻生长都具有相似的影响, 即生物量均随着初始氮浓度增加呈先增加后降低的趋势, 其中以  $\text{NO}_3^-$  和 Urea 为氮源在初始氮浓度为 3 mmol/L 时获得最高生物量, 培养 12 d 生物量分别为 3.69、3.53 g/L, 以  $\text{NH}_4^+$  为氮源在初始氮浓度为 6 mmol/L 时获得最高生物量。以上结果表明, 过低或过高的初始氮浓度都不利于黄丝藻物质积累, 而且相比于  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  和 Urea 则更适合作为黄丝藻的氮源, 这可能与藻株对氮源偏爱性以及  $\text{NH}_4^+$  的毒性相关。

由图 2 可知, 黄丝藻对 3 种氮源的吸收效率也

略有不同。相比于  $\text{NO}_3^-$  和 Urea, 黄丝藻对  $\text{NH}_4^+$  的利用速率更快, 当初始氮浓度为 9 mmol/L 时, 在培养至第 4 天时就已经耗尽培养基中的  $\text{NH}_4^+$ , 而前两者则分别要在第 6 天和第 8 天才能达到最大吸收值, 但无法完全吸收, 这可能是因为  $\text{NH}_4^+$  是藻类可直接吸收利用的氮源, 而  $\text{NO}_3^-$ 、Urea 则分别要经过还原和脲酶途径转化成  $\text{NH}_4^+$  才能被吸收<sup>[14]</sup>。但是, 当培养基中初始氮浓度为 18 mmol/L 时, 即使是  $\text{NH}_4^+$ , 黄丝藻也无法完全将培养基中氮素同化, 且在培养至第 8 天后, 培养基中氮浓度变化不大, 表明该藻对外界氮存在吸收阈值。

### 2.2 不同氮形态及初始氮浓度对黄丝藻生化组成的影响

图 3 为不同氮形态及初始氮浓度下培养 12 d 的黄丝藻生化组成及储能物质产率的变化。

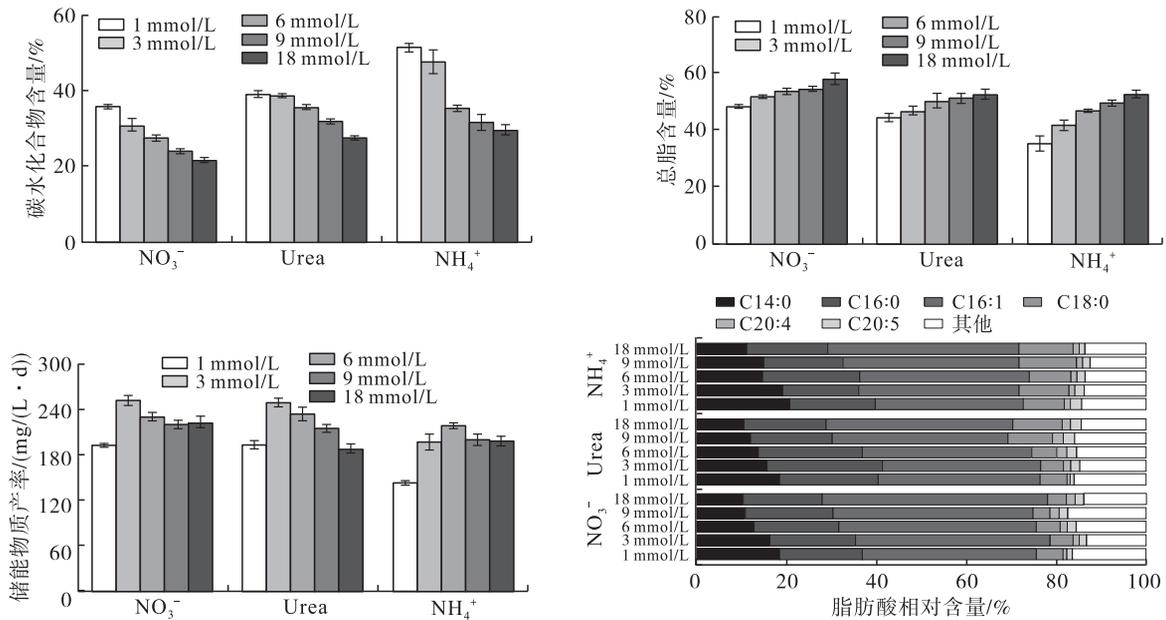
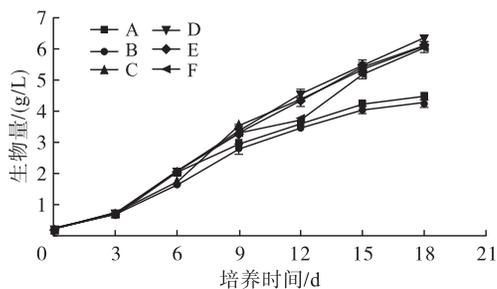


图3 不同氮形态及初始氮浓度对黄丝藻生化组成及储能物质产率的影响

由图3可看出,3种氮源下黄丝藻碳水化合物含量均随着初始氮浓度增加而降低,在 $\text{NO}_3^-$ 、Urea、 $\text{NH}_4^+$ 初始氮浓度为1 mmol/L下碳水化合物积累最多,含量分别达到35.9%、39.2%和51.6%。而黄丝藻总脂含量随着初始氮浓度增加而增加,且均在18 mmol/L下获得最高的总脂含量,分别为57.3%、51.9%和52.1%,这与徐梓钧<sup>[4]</sup>、张婷<sup>[8]</sup>等报道的结果相一致。比较3种氮源, $\text{NH}_4^+$ 更利于黄丝藻碳水化合物的积累, $\text{NO}_3^-$ 更有利于总脂的积累。由图3可知,随初始氮浓度增加黄丝藻储能物质产率先增加后降低,且 $\text{NO}_3^-$ 和Urea的储能物质产率相对较高,结合总脂含量最终优选 $\text{NO}_3^-$ 作为黄丝藻的氮源,并控制培养基初始氮浓度为3 mmol/L和18 mmol/L进行两步法的氮调控策略优化。



注:A.3(18)→18(0);B.3(0)→18(18);C.3(3)→18(15);D.3(6)→18(12);E.3(9)→8(9);F.3(12)→18(6)。下同

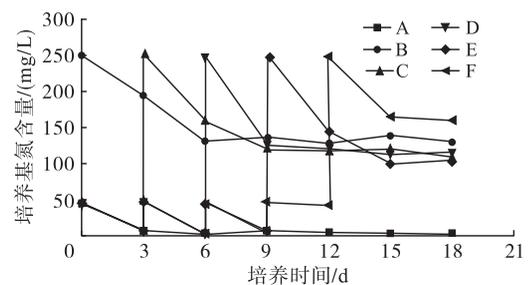
图4 “低氮转高氮”两步法对黄丝藻生物量及氮吸收的影响

由图4可看出,通过两步法可显著提高黄丝藻生物量积累,最高可以达到6.37 g/L,为3 mmol/L批次培养的1.41倍。然而不同阶段培养时间的调整对生物量影响总体不显著,这可能是因为第一阶段(低氮培养)持续性低氮输入延长和补氮次数增加,使得藻体对氮的吸收达到饱和,从而导致生物量的增长不显著。

微藻油脂中脂肪酸组成直接影响生物柴油的燃烧性能,由图3可知,不同氮形态及初始氮浓度对黄丝藻脂肪酸相对含量的影响效应不同,3种氮源条件下,黄丝藻中C14:0相对含量随着初始氮浓度增加而降低,C16和C18脂肪酸相对含量随着初始氮浓度增加总体增加。黄丝藻的主要脂肪酸(C16和C18)是制备生物柴油所需要的主要脂肪酸成分,从制备生物柴油的角度来看,初始氮浓度18 mmol/L培养的黄丝藻更具有成为生物柴油资源的潜力。

### 2.3 “低氮转高氮”两步法对黄丝藻生长和氮吸收的影响

图4为“低氮转高氮”两步法对黄丝藻生物量及氮吸收的影响。



由图4可看出,在第一阶段培养过程中,黄丝藻能够迅速吸收外源氮,在补加2次氮后,也会很快就被再次耗尽,说明此时外界氮供给水平低于黄丝藻生长的需要。在经过3次补氮后,即第一阶段补氮培养到第9天时氮吸收接近饱和,氮吸收量为9 mmol/L左右。同时可看出,培养基中初始氮浓度

为 18 mmol/L 时,该藻无法完全同化吸收氮。但是,每个实验组在转入高氮培养基后仍会继续吸收氮,最终 3(3)→18(15)、3(6)→18(12)、3(9)→18(9)、3(12)→18(6) 组的氮消耗量分别为 175.70、216.39、266.07、214.05 mg/L,显著高于 3(0)→18(18)

组的氮消耗量 120.78 mg/L,说明两步法能够有效促进黄丝藻对氮的吸收。

#### 2.4 “低氮转高氮”两步法对黄丝藻光合色素的影响

图 5 为“低氮转高氮”两步法对黄丝藻中光合色素含量的影响。

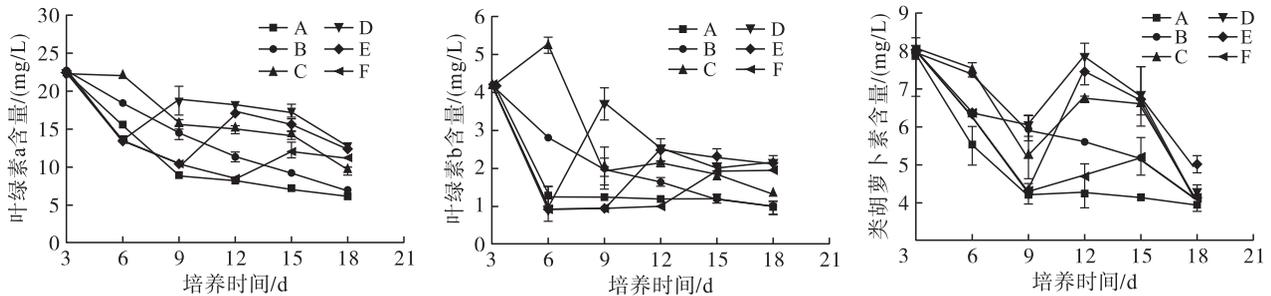


图 5 “低氮转高氮”两步法对黄丝藻叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素含量的影响

由图 5 可看出:随培养时间延长,3(18)→18(0)的叶绿素 a 含量先降低,在第 9 天后趋于稳定,而 3(0)→18(18)组则相对缓慢地持续下降,培养结束后两组的叶绿素 a 含量分别为 6.25、6.88 mg/L,类胡萝卜素含量变化规律与叶绿素 a 含量变化规律相近,培养结束时两组的含量分别为 3.92、4.11 mg/L;而 3(18)→18(0)组的叶绿素 b 含量先降低,在第 6 天后趋于稳定,3(0)→18(18)组则持续下降,培养结束时两组的含量分别为 0.92、0.95 mg/L。但是两步法培养过程中 3 种光合色素

的含量在转入高氮培养基后会迅速升高,然后再下降,最终叶绿素 a、叶绿素 b 及类胡萝卜素含量总体高于对照组。光合色素含量的升高提升了光合效率,从而促进了黄丝藻细胞的分裂与生长,造成培养过程中实验组转移到高氮培养基后,生物量的生长速率有短时间的增长。

#### 2.5 “低氮转高氮”两步法对黄丝藻储能物质和脂肪酸组成的影响

图 6 为“低氮转高氮”两步法对黄丝藻(培养 18 d)储能物质和脂肪酸组成的影响。

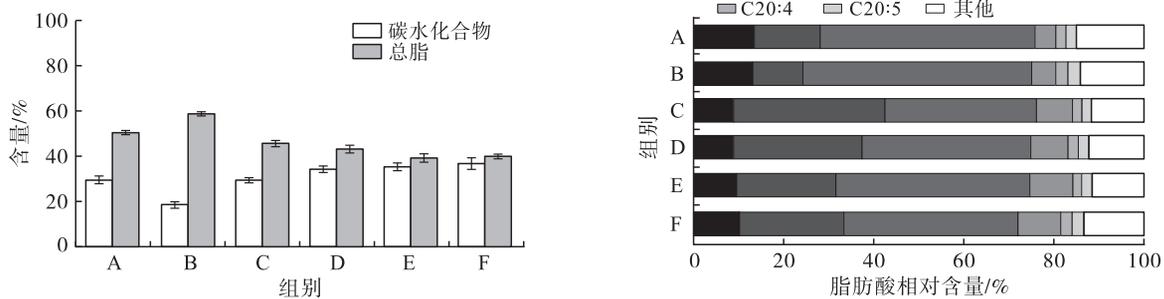


图 6 “低氮转高氮”两步法对黄丝藻储能物质和脂肪酸组成的影响

由图 6 可看出,与批次培养比较,“低氮转高氮”两步法的总脂含量下降,并随着低氮阶段培养时间延长而降低,而碳水化合物含量提高(除低氮培养 3 d 的),并随着低氮阶段培养时间延长而增大,表明“低氮转高氮”两步法培养中,低氮培养环境可诱导黄丝藻碳水化合物的积累,高氮培养环境可诱导黄丝藻油脂的积累,且适宜补氮方式的两步法更有利于碳水化合物的积累。一般而言,藻类碳水化合物和油脂的生物合成都需要相同的碳前体(如葡萄糖、乙酰辅酶 A),存在竞争关系<sup>[15-16]</sup>,而通过第一阶段的低氮处理可以有效改变黄丝藻胞内的碳流分配,使得更多碳用于碳

水化合物合成。相比于批次培养,两阶段培养 18 d 黄丝藻生物量、总脂产率、碳水化合物产率、储能物质产率都有所提高,并在 3(6)→18(12)条件下储能物质产率提高到 274.26 mg/(L·d)(见表 1)。

由图 6 可看出,相比于批次培养,“低氮转高氮”两步法培养藻油中 C16:0 和 C18:0 含量增加,C14:0 和 C16:1 含量下降,说明培养环境和氮元素与其他元素比例的变化对黄丝藻脂肪酸组成有较大影响。两步法培养的黄丝藻总饱和脂肪酸相对含量进一步提高,生产的生物柴油可能具有更高的十六烷值和更低碘值<sup>[17]</sup>。

表1 不同氮添加方式下黄丝藻总脂、碳水化合物、储能物质产率的变化

组别	生物量/(g/L)	总脂产率/ (mg/(L·d))	碳水化合物产率/ (mg/(L·d))	储能物质产率/ (mg/(L·d))
A	4.50 ± 0.04	126.63 ± 1.50	73.93 ± 3.95	200.55 ± 5.45
B	4.30 ± 0.14	140.25 ± 2.05	44.98 ± 3.15	185.23 ± 5.20
C	6.12 ± 0.07	155.75 ± 4.59	100.03 ± 2.92	255.78 ± 7.51
D	6.37 ± 0.05	152.92 ± 4.78	121.35 ± 4.85	274.26 ± 9.63
E	6.13 ± 0.11	134.62 ± 5.14	120.56 ± 6.71	255.18 ± 11.85
F	6.08 ± 0.17	135.25 ± 2.73	124.30 ± 7.80	259.56 ± 10.53

### 3 结论

适度低氮浓度有利于黄丝藻碳水化合物的积累,而高氮浓度培养会促进油脂的积累。相比较而言,黄丝藻在  $\text{NO}_3^-$  存在的条件下更有利于油脂的积累,而  $\text{NH}_4^+$  则有利于碳水化合物积累。利用“低氮转高氮”两步法培养可以在保证总脂产率相当的情况下显著促进生物质和碳水化合物的积累,且在低氮处理第6天时获得了最高储能物质产率,使得黄丝藻能够获得用于炼制生物柴油和生物乙醇的生产原料,从而提高了经济可行性。

#### 参考文献:

- [1] KHAN M A, KHAN M Z, ZAMAN K, et al. Global estimates of energy - growth nexus: application of seemingly unrelated regressions [J]. *Renew Sust Energ Rev*, 2014, 29: 63 - 71.
- [2] MISHRA A, MEDHI K, MAHESHWARI N, et al. Biofuel production and phycoremediation by *Chlorella* sp. ISTLA1 isolated from landfill site [J]. *Bioresour Technol*, 2018, 253: 121 - 129.
- [3] CHRISTENSON L, SIMS R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts [J]. *Biotechnol Adv*, 2011, 29(6): 686 - 702.
- [4] 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.
- [5] DAVIS A K, ANDERSON R S, SPIERLING R, et al. Characterization of a novel strain of *Tribonema minus* demonstrating high biomass productivity in outdoor raceway ponds [J/OL]. *Bioresour Technol*, 2021, 331: 125007 [2022 - 07 - 30]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125007>.
- [6] WANG F, CHEN J, ZHANG C, et al. Resourceful treatment of cane sugar industry wastewater by *Tribonema minus* towards the production of valuable biomass [J/OL]. *Bioresour Technol*, 2020, 316: 123902 [2022 - 07 - 30]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123902>.
- [7] 冯倩, 王琳, 蔡忠贞, 等. 碳氮源和盐度对异养黄丝藻脂肪酸产量的影响 [J]. *安徽农业科学*, 2019, 47(12): 98 - 103.
- [8] 张婷, 何青, 徐梓钧, 等. 不同营养盐及浓度对黄丝藻 *Tribonema* sp. FACHB - 1786 生长及脂质积累的影响 [J]. *生物工程学报*, 2020, 36(11): 2478 - 2493.
- [9] AZIZ M M A, KASSIM K A, SHOKRAVI Z, et al. Two - stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: a review [J/OL]. *Renew Sust Energ Rev*, 2020, 119: 109621 [2022 - 07 - 30]. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109621>.
- [10] GAO F, CUI W, XU J P, et al. Lipid accumulation properties of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* in membrane photobioreactor (MPBR) fed with secondary effluent from municipal wastewater treatment plant [J]. *Renew Energ*, 2019, 136: 671 - 676.
- [11] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28(3): 350 - 356.
- [12] COHEN Z, NORMAN H A, HEIMERY M. Potential use of substituted pyridazinones for selecting polyunsaturated fatty acid overproducing cell lines of algae [J]. *Phytochemistry*, 1993, 32(2): 259 - 264.
- [13] HUO S, BASHEER S, LIU F, et al. Bacterial intervention on the growth, nutrient removal and lipid production of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema* sp. [J/OL]. *Algal Res*, 2020, 52: 102088 [2022 - 07 - 30]. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102088>.
- [14] ZUO Z, YANG L, CHEN S, et al. Effects of nitrogen nutrients on the volatile organic compound emissions from *Microcystis aeruginosa* [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 161: 214 - 220.
- [15] OHLROGGE J, BROWSE J. Lipid biosynthesis [J/OL]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 957 [2022 - 07 - 30]. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.957>.
- [16] MICHEL G, TONON T, SCORNET D, et al. Central and storage carbon metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: insights into the origin and evolution of storage carbohydrates in Eukaryotes [J]. *New Phytol*, 2010, 188(1): 67 - 81.
- [17] RAMOS J M, FERNÁNDEZ M C, CASAS A, et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties [J]. *Bioresour Technol*, 2008, 100(1): 261 - 268.