

培养条件对丝状微藻克里藻生长与亚油酸合成的影响

赵丹月¹, 李璐², 陈林², 刘天中²

(1. 中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国科学院 青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266101)

摘要:为开发亚油酸生产新资源,对筛选获得的一株丝状微藻克里藻,考察培养基氮浓度、培养基磷浓度、光强、培养温度和环境 pH 对其生长、氮消耗、油脂含量和油脂脂肪酸组成的影响。结果表明:培养基氮浓度对克里藻生长没有明显影响,但高氮不利于油脂和不饱和脂肪酸的合成;培养基磷浓度过低会抑制细胞生长,过高对细胞有毒害作用;适当提高光强有利于细胞生长,但对细胞内油脂含量影响不大,低光强培养有利于亚油酸等不饱和脂肪酸的合成;培养温度对克里藻生长与油脂积累影响不大,低温培养有利于亚油酸的合成;环境 pH 对细胞生长、油脂积累和亚油酸合成影响明显,pH 6.0~7.5 的弱酸-中性条件下细胞生长最快,油脂含量更高;控制初始氮浓度 3~6 mmol/L、磷浓度 0.115~0.230 mmol/L、光强 100~300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、培养温度 15~30 $^{\circ}\text{C}$ 、环境 pH 7.5 左右,克里藻细胞可积累 42% 左右的油脂,油脂中亚油酸含量在 65%~75%。综上,丝状微藻克里藻是一种有潜力的亚油酸生产新资源。

关键词:克里藻;培养条件;油脂;亚油酸;pH

中图分类号:Q815;TS201.4 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)04-0088-09

Effects of cultivation conditions on growth and synthesis of linoleic acid of filamentous microalgae *Klebsormidium* sp.

ZHAO Danyue¹, LI Lu², CHEN Lin², LIU Tianzhong²

(1. School of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong, China;
2. Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China)

Abstract: In order to develop new resources for the production of linoleic acid, with a filamentous microalgae *Klebsormidium* sp. isolated as object, the effect of nitrogen concentration, phosphorus concentration in medium, and light intensity, temperature and environmental pH on the growth, nitrogen consumption, oil content and fatty acid composition of *Klebsormidium* sp. were investigated. The results showed that nitrogen concentration in the medium did not affect the growth of *Klebsormidium* sp., but high nitrogen concentration was detrimental to the synthesis of oil and unsaturated fatty acids. Low phosphorus concentration in the medium inhibited cell growth, while high phosphorus concentration had a toxic effect on cells. Appropriately increasing light intensity was beneficial to cell growth, but had little effect on oil accumulation. More unsaturated fatty acids such as linoleic acid was synthesized under lower light intensity cultivation. Temperature had little effect on the growth and oil accumulation of *Klebsormidium* sp., but low temperature was beneficial to the synthesis of linoleic acid. The growth, oil accumulation and

linoleic acid content of *Klebsormidium* sp. were significantly affected by the environmental pH. Cells grew the fastest and had higher oil content in weakly acidic-neutral environments with pH 6.0-7.5. Under the conditions of nitrogen concentration 3-6 mmol/L, phosphorus concentration 0.115-0.230 mmol/L, light intensity 100-300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, temperature 15-30 $^{\circ}\text{C}$, environmental pH 7.5, the

收稿日期:2023-03-20;修回日期:2024-01-11

基金项目:国家重点研发计划项目(2021YFA0909704);国家自然科学基金青年科学基金项目(31600310)

作者简介:赵丹月(1998),女,硕士研究生,研究方向为食品生物技术(E-mail) zhaodanyue2022@163.com。

通信作者:陈林,副研究员,博士(E-mail) chenlin@qibebt.ac.cn。

maximum oil content reached about 42%, of which linoleic acid accounted for 65% – 75%. In summary, filamentous microalgae *Klebsormidium* sp. is a promising new resource for linoleic acid production.

Key words: *Klebsormidium* sp. ; cultivation condition; oil; linoleic acid; pH

亚油酸(C18:2)又名顺,顺-9,12-十八碳二烯酸,属于 ω -6型多不饱和脂肪酸,其与亚麻酸是人类生命活动必不可少的必需脂肪酸^[1]。众多药理学研究表明,亚油酸能显著降低血液中的甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇和极低密度脂蛋白胆固醇的含量,从而维持血脂的代谢平衡,在预防和治疗动脉粥样硬化、高血压、心肌梗死等疾病方面有重要作用^[2-3]。以亚油酸为底物通过化学^[4]或生物^[5]异构法制备的共轭亚油酸具有调节血脂,预防和控制肥胖、癌症、糖尿病^[6],以及抗炎和抗过敏功能,可加速伤口愈合^[7],对皮肤具有深层保湿效果^[8-9]。此外,亚油酸还可与乙醇水热合成生物燃料^[10]。

全球亚油酸行业持续发展,至2022年全球亚油酸年需求量高达500万t(估计值)^[11],同时食品级亚油酸需求占总亚油酸需求已超过50%(2020年)^[12]。传统亚油酸主要从自然资源获得,包括红花籽^[13]、芝麻^[14]、葵花籽^[15]及大豆^[16]等。然而,这些自然资源采收周期长,原料来源不稳定,并且随着人口的不断增长,温室效应导致的干旱和土壤沙漠化等,使通过油料植物生产亚油酸受到巨大冲击,因此寻求新的稳定且持续的商业亚油酸来源显得尤为迫切^[17]。

微藻由于结构简单、生长速度快、油脂含量高,且“不与粮争地,不与粮争水”,被认为是一种潜在的新型可持续的油脂资源,特别是功能性油脂生产新资源。利用黄丝藻(*Tribonema* sp.)生产富含棕榈油酸(C16:1)的油脂^[18],利用微拟球藻(*Nannochloropsis* sp.)生产高含EPA油脂^[19],以及利用寇氏隐甲藻(*Cryptocodinium cohnii*)生产DHA^[20]等已受到广泛关注并逐步实现产业化。克里藻(*Klebsormidium* sp.)是一种在世界分布极其广泛的丝状绿藻^[21],其可食用,不具有基因毒性,可作为食品成分和饲料等安全使用^[22-23]。由于克里藻的丝状藻体特征和强大的环境抗逆性,其抗轮虫等原生动物的能力强,易于培养和采收,广泛用于饲料生产和废水处理^[23-26]。研究表明,克里藻在缺氮环境下可以积累18%~58%的油脂,且油脂中的亚油酸含量达60%左右^[27]。因此,克里藻具有作为商业亚油酸新资源的潜力。目前对克里藻的研究主要集中在培养基氮浓度、光强及培养温度对克里藻生长及总脂生产的影响,较少关注培养过程环境

因子对细胞中亚油酸含量的影响。本文针对在山东青岛筛选的一株克里藻,考察了培养基氮浓度、培养基磷浓度、光强、培养温度及环境pH对其生长、总脂合成及亚油酸含量的影响,旨在揭示克里藻生长、亚油酸合成与培养环境条件的生化响应关系,以期开发基于克里藻培养的亚油酸生产技术提供生物学基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

藻种:采自山东青岛崂山区枯桃村山(经度120.5014°,纬度36.15678°)苔藓植被,采用多次平板涂布法获得该藻的纯培养藻株,再将藻株采用BG11培养基进行多次传代驯化培养,保藏于中国科学院青岛生物能源与过程研究所微藻生物技术实验室,藻种编号为AB2015。

OLYMPUS CS-EN-V1.17 光学显微镜;玻璃气泡柱反应器(直径为5 cm,长度为70 cm);6890N 气相色谱仪(氢火焰检测器),美国安捷伦公司;FSL T8型LED灯管;Carry-50紫外分光光度计。

1.2 实验方法

1.2.1 藻种分离纯化及鉴定

使用光学显微镜对藻细胞进行形态学鉴定。采用分子鉴定法对藻种进行鉴定:18S rRNA正向引物18SF(5'-AGAGCTAATACGTGCGTAAATCCC-3')和反向引物18SR(5'-TAAGTTTCAGCCTTGCCACCAT-3');PCR反应体系为50 μ L,将PCR获得的藻株的18S rRNA基因全长序列在NCBI Genbank数据库中进行Blast同源比对,对获得的相近藻属18S rRNA基因序列进行多序列匹配排列,进行系统发育分析;使用MEGA-X序列对齐,对齐后的数据集使用邻接法(Neighbor-joining method)进行分析。

1.2.2 微藻的培养

将微藻接种于装有600 mL BG11培养基的玻璃气泡柱反应器内,通入含1% CO₂的空气,通气速率为0.25 vvm。用LED灯作为光源进行单侧连续光照,光强控制在(100 \pm 10) μ mol/(m²·s),将玻璃气泡柱下部30 cm置于(25 \pm 1)°C水浴中。将培养5 d的种子培养液抽滤,用无氮无磷的BG11培养基清洗3次作为种子重悬于600 mL不同氮、磷浓度的BG11培养基中,装入气泡柱反应器内。克里藻初

始接种量约为 0.5 g/L, 1% CO₂ 通气速率 2 vvm, 在一定光强和培养温度下培养 18 d, 每两天取样测定细胞生物量、培养液残留氮浓度、细胞油脂含量及油脂脂肪酸组成。每个条件设置 3 个平行。

1.2.3 生物量测定

采用干重法^[28]测定生物量。取一定量的藻液, 用预先在 105 °C 烘箱中烘干至恒重的混合纤维滤膜 (0.45 μm) 进行抽滤, 再将含有藻细胞的滤膜放置在 105 °C 烘箱烘至恒重。用减差法得到干微藻细胞质量, 并计算生物量。

1.2.4 油脂含量与脂肪酸组成测定

1.2.4.1 总脂含量

采用改良的 Blight - Dyer 法测定^[29]总脂含量。取约 80 mg 冻干藻粉 (藻液离心所得藻细胞于 -80 °C 冷冻干燥 24 h 得到), 使用 20 mL 氯仿 - 甲醇 (体积比 1:2) 提取油脂, 按氯仿、甲醇与水体积比 10:10:9 的比例补加氯仿及含 0.9% NaCl 的去离子水, 于 8 000 r/min 下离心 5 min 后, 取出含油有机相, 在氮气保护下蒸发至干燥获得油脂, 计算油脂含量。

1.2.4.2 脂肪酸组成

取约 5 mg 上述油脂样品与 2.5 mL 2 g/100 mL 的甲醇 - H₂SO₄ 混合物在 85 °C 下进行甲酯化反应 2.5 h, 反应结束后冷却, 依次加入 1 mL 正己烷与 1 mL 饱和 NaCl 溶液, 充分混匀, 2 000 r/min 下离心, 移取上层含有脂肪酸甲酯的正己烷相, 进行气相色谱分析。

气相色谱条件: Agilent HP - 5 毛细管柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 升温程序为起始温度 120 °C, 保持 1 min, 以 6 °C/min 的速度升高至 240 °C, 保持 5 min; 汽化室温度 270 °C; 检测室温度 280 °C; 以 N₂ 为载气, 流量 2 mL/min; 检测器温度 280 °C; 氢气流量 35 mL/min; 空气流量 350 mL/min。

根据脂肪酸甲酯标准品的保留时间定性。以 C17:0 脂肪酸甲酯为内标物, 通过峰面积对各脂肪酸进行定量。

1.2.5 氮消耗测定

取 3 mL 培养液, 通过水相针式滤器得到不含藻细胞的滤液, 稀释 n 倍后采用紫外分光光度计分别在 220 nm 与 275 nm 处测定吸光值 (D_{220} 、 D_{275})。培养基中硝态氮质量浓度 (C_N) 按公式 (1) 计算。

$$C_N = n \times 4.5054 \times (D_{220} - 2 \times D_{275}) \quad (1)$$

1.2.6 数据分析

使用 SPSS 11.0 软件 (SPSS Inc., Chicago, USA), 采用方差分析评估个体差异的显著性, 概率阈值为 0.05, 然后进行 Tukey 检验。

2 结果与讨论

2.1 藻株的分类鉴定

采用 1.2.1 方法对筛选的藻株构建进化树, 结果如图 1 所示。

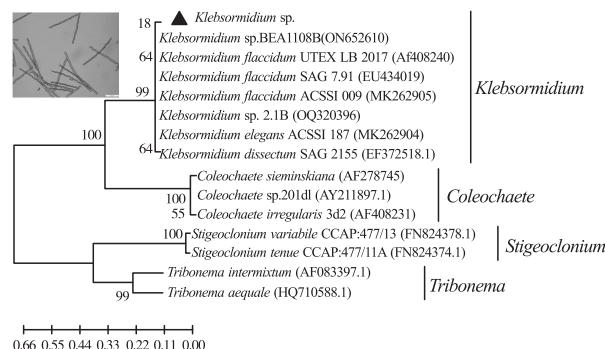


图 1 藻株的进化树

由图 1 可知, 筛选的藻株与克里藻属 (*Klebsormidium*) 亲缘关系最近, 与多个克里藻属 18S rRNA 基因序列相似度达到 99%, 判定该藻属于克里藻属 (*Klebsormidium*)。

2.2 培养条件对藻株生长及油脂合成影响

2.2.1 营养盐浓度的影响

在光强 200 μmol/(m²·s)、磷浓度 0.230 mmol/L、培养温度 25 °C 条件下, 设置 3、6、9、18、36 mmol/L 和 54 mmol/L 6 个氮浓度梯度, 考察氮 (NaNO₃) 浓度对克里藻生长、氮消耗、油脂合成及脂肪酸组成的影响, 结果如图 2 和表 1 所示。在光强 200 μmol/(m²·s)、氮浓度 6 mmol/L、培养温度 25 °C 条件下, 设置 0.029、0.038、0.058、0.115、0.230、0.460 mmol/L 和 0.690 mmol/L 7 个磷浓度梯度, 考察磷 (K₂HPO₄) 浓度对克里藻生长、氮消耗、油脂合成及脂肪酸组成的影响, 结果如图 3 和表 1 所示。

由图 2 可知, 在 6 个氮浓度梯度下, 克里藻的生长曲线几乎重合, 表明培养基初始氮浓度对该藻株的生长影响不显著。培养基中的氮消耗主要发生在培养前期 (4 d 内), 之后氮浓度变化不大。当培养基初始氮浓度在 9 mmol/L 以下时, 4 d 后培养基中的氮浓度接近于零, 克里藻开始处于缺氮培养阶段。而当培养基初始氮浓度大于 9 mmol/L 时, 经过 18 d 的培养, 氮也不能被完全消耗, 始终处于富氮培养。当培养基初始氮浓度从 3 mmol/L 升高到 9 mmol/L 时, 细胞内油脂含量从 45% 降低到 29%, 这与大多数微藻如小球藻^[30]、微拟球藻^[31] 和莱茵衣藻^[32] 的油脂积累受缺氮诱导的结论一致。当继续提高培养基初始氮浓度时, 细胞内油脂含量不再降低, 基本稳定在 29% 左右。

由表 1 可知, 氮浓度对克里藻油脂脂肪酸含量有

明显影响。随着培养基初始氮浓度的升高,克里藻油脂中主要的不饱和脂肪酸亚油酸(C18:2)含量由3 mmol/L时的67.19%总体下降至54 mmol/L时的50.63%,相反,主要的饱和脂肪酸棕榈酸(C16:0)含量则由18.21%波动升高至27.51%。随氮浓度升高,克里藻油脂中饱和脂肪酸含量升高,多不饱和脂肪酸含量总体降低,单不饱和脂肪酸含量变化不大。因此,培养基低氮有利于克里藻不饱和脂肪酸的合成,而高氮则有利于饱和脂肪酸的合成。

磷是影响微藻生长代谢的另一重要大量元素,其与细胞内三磷酸腺苷(ATP)合成息息相关,关乎细胞中能量运输的快慢。由图3可知,随着培养基初始磷浓度从0.230 mmol/L不断降低至0.029 mmol/L,培养18 d的克里藻生物量不断降低,由5 g/L左右降至

1.8 g/L。更高的初始磷浓度(0.460、0.690 mmol/L)下,克里藻在培养4 d时开始出现发黄,8 d完全死亡,表明高磷培养基对克里藻产生了严重的毒害作用。在相同的初始培养基氮浓度(6 mmol/L)时,随着培养基初始磷浓度的降低,氮消耗速率下降。当培养基初始磷浓度低于0.115 mmol/L时,由于胞内磷浓度过低,ATP合成受阻,没有足够的能量吸收胞外无机氮,氮不能被完全消耗。磷浓度从0.230 mmol/L降低至0.029 mmol/L时,油脂含量由35%降低至29%,减少了约17%。

由表1可知,磷浓度在0.029~0.115 mmol/L内,随磷浓度增加,克里藻中棕榈酸亚油酸含量均总体略有升高,多不饱和脂肪酸和饱和脂肪酸含量均变化不大。这表明培养基初始磷浓度对于脂肪酸含量影响不大。

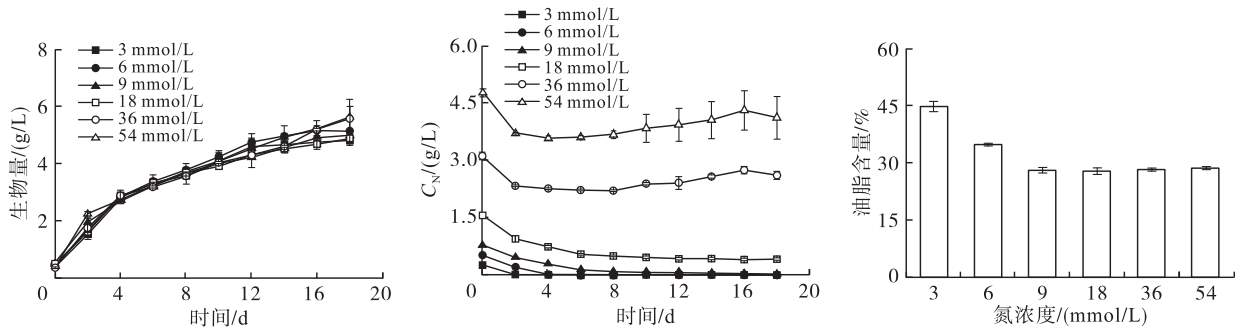


图2 氮浓度对克里藻生长、氮消耗及油脂合成的影响

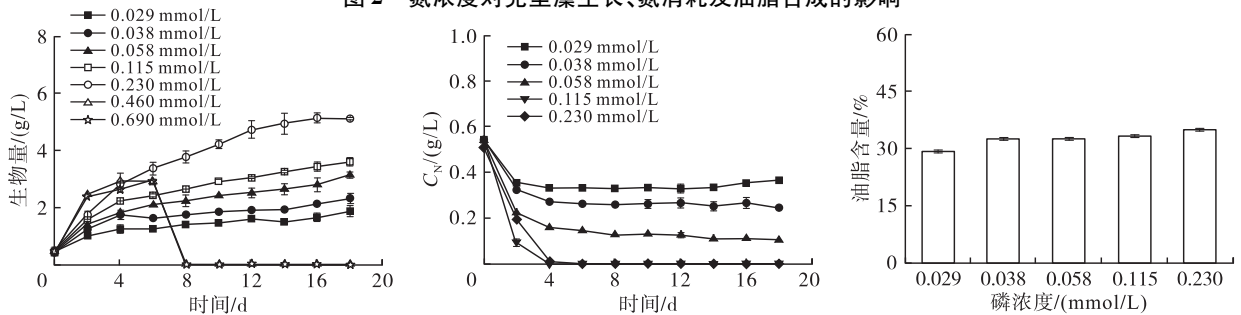


图3 磷浓度对克里藻生长、氮消耗及油脂合成的影响

表1 营养盐浓度对克里藻油脂脂肪酸组成的影响

营养盐浓度	含量/%											
	C14:0	C16:0	C16:2	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:2	其他	SFA	MUFA	PUFA
对照	1.21	17.75	1.45	3.18	5.16	66.32	2.14	1.16	1.64	22.14	5.16	71.07
氮浓度/(mmol/L)												
3	0.73	18.21	1.31	2.71	4.85	67.19	0.24	1.49	3.28	21.65	4.85	70.22
9	1.56	20.47	2.80	0.67	2.80	61.04	3.47	1.24	5.95	22.70	2.80	68.55
18	1.95	20.77	2.55	2.84	1.92	62.66	3.75	0.75	2.80	25.56	1.92	69.71
36	1.72	22.13	2.56	2.27	3.76	60.31	3.52	0.99	2.74	26.12	3.76	67.38
54	2.59	27.51	3.14	3.60	3.71	50.63	4.37	1.04	3.41	33.71	3.71	59.17
磷浓度/(mmol/L)												
0.115	2.71	23.08	3.17	-	0.17	67.38	1.74	-	1.76	25.79	0.17	72.28
0.058	2.61	24.73	3.03	-	0.14	66.87	1.55	-	1.08	27.34	0.14	71.45
0.038	2.16	21.58	2.90	-	0.36	64.86	5.26	-	2.88	23.74	0.36	73.01
0.029	2.01	21.89	3.36	-	0.12	64.00	2.58	1.79	4.27	23.89	0.12	71.32

注:对照培养条件为氮浓度6 mmol/L、磷浓度0.230 mmol/L、光强200 μmol/(m²·s)、培养温度25℃,SFA为饱和脂肪酸,MUFA为单不饱和脂肪酸,PUFA为多不饱和脂肪酸;-表示未检出。下同

2.2.2 光强的影响

克里藻最适光强在 $50 \sim 300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 因此在氮浓度 $6 \text{ mmol}/\text{L}$ 、磷浓度 $0.230 \text{ mmol}/\text{L}$ 、培养温度 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下, 控制光强分别为 100 、 200 、 300

$\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和 $400 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 考察光强对克里藻生长、氮消耗、油脂合成及脂肪酸组成的影响, 结果如图 4 和表 2 所示。

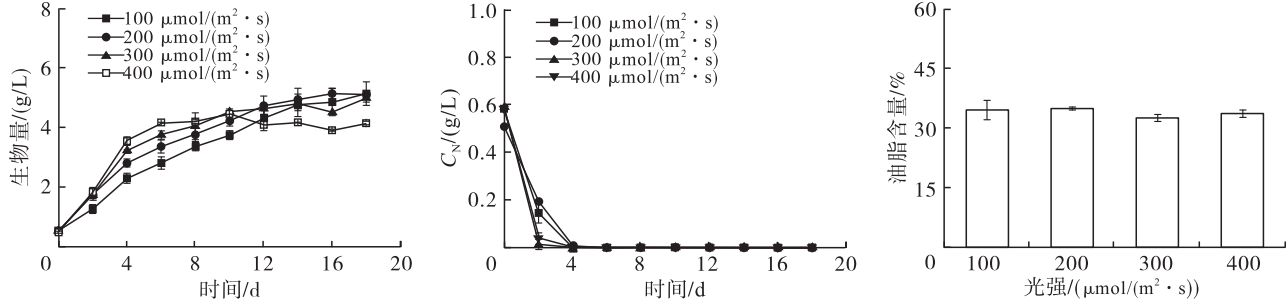


图 4 光强对克里藻生长、氮消耗及油脂合成的影响

表 2 光强对克里藻油脂脂肪酸组成的影响

光强/ ($\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)	含量/%											
	C14:0	C16:0	C16:2	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:2	其他	SFA	MUFA	PUFA
100	1.29	16.76	1.41	2.43	4.22	68.09	2.11	1.07	2.61	20.48	4.22	72.68
200	1.21	17.75	1.45	3.18	5.16	66.32	2.14	1.16	1.64	22.14	5.16	71.07
300	1.76	19.04	1.40	2.50	2.26	66.04	2.67	0.96	3.38	23.30	2.26	71.06
400	1.86	23.19	1.24	0.23	4.99	58.52	1.57	1.16	7.24	25.28	4.99	62.49

光是藻细胞进行自养培养的唯一能量来源, 直接影响细胞生长及细胞生物化学组成^[33-34]。由图 4 可知, 随着光强增加, 前 4 d 克里藻生长较快, 生物量快速增加。在培养基初始氮浓度为 $6 \text{ mmol}/\text{L}$ 条件下, 培养 4 d 时培养基中所有的氮均被完全吸收消耗。值得注意的是, 4 种光强下克里藻油脂含量均在 33% 左右, 这表明光强与克里藻细胞最大油脂积累能力之间没有显著关系。

由表 2 可知, 随着光强由 $100 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 增加到 $400 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 棕榈酸含量由 16.76% 上升至 23.19%, 亚油酸含量由 68.09% 降低至

58.52%。对应地, 脂肪酸中饱和脂肪酸含量由 20.48% 上升至 25.28%, 多不饱和脂肪酸含量由 72.68% 降低至 62.49%。从利用克里藻生产亚油酸的角度, 在 $400 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 以下的较低光强培养比较适宜。

2.2.3 培养温度的影响

在氮浓度 $6 \text{ mmol}/\text{L}$ 、磷浓度 $0.230 \text{ mmol}/\text{L}$ 、光强 $200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 条件下, 控制培养温度分别为 15 、 25 、 30 、 $35 \text{ }^\circ\text{C}$, 考察培养温度对克里藻生长、氮消耗、油脂合成及脂肪酸组成的影响, 结果如图 5 和表 3 所示。

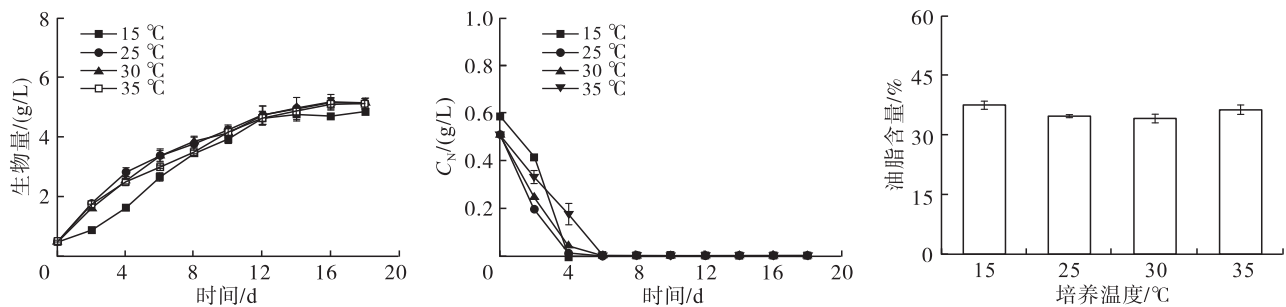


图 5 培养温度对克里藻生长、氮消耗及油脂合成的影响

表 3 培养温度对克里藻油脂脂肪酸组成的影响

培养温度/ $^\circ\text{C}$	含量/%											
	14:0	16:0	16:2	18:0	18:1	18:2	18:3	20:2	其他	SFA	MUFA	PUFA
15	2.13	18.49	0.68	0.47	3.85	68.24	4.49	0.00	1.65	21.08	3.85	73.42
25	1.21	17.75	1.45	3.18	5.16	66.32	2.14	1.16	1.64	22.14	5.16	71.07
30	1.25	18.14	1.35	3.16	5.45	65.38	2.17	0.98	2.12	22.55	5.45	69.88
35	1.51	20.65	1.04	3.69	7.04	62.79	0.91	1.07	1.30	25.85	7.04	65.81

温度通过影响细胞内化学反应酶活间接影响细胞生长速率及化学组成。了解在不同温度下克里藻的生存能力对于大规模生产克里藻有着重要借鉴。由图5可知,除了在15℃低温培养时前6d生长稍慢外,其他温度下克里藻的生长曲线几乎重合,表明克里藻有较宽的温度适应范围。这与Karsten等^[35]研究结果一致:克里藻既能在5℃的低温下生长,也能耐受45℃的高温。相对应,除35℃下培养时氮消耗速率稍有减缓外,总体上克里藻对培养基中氮的吸收利用速率受温度影响的差别不大。另外,4个培养温度下细胞内油脂含量也没有明显差异。

由表3可知,当培养温度从15℃升高至35℃,克里藻油脂中亚油酸含量由68.24%降低至62.79%,降低了约8%,油脂中多不饱和脂肪酸含量由73.42%降低至65.81%,饱和脂肪酸含量由21.08%提高至25.85%。Smith-Bädorf等^[36]研究发现,克里藻在20℃下培养比30℃下培养能够积累更多的多不饱和脂肪酸,与本文研究结果一致。微藻在低温下合成较多的不饱和脂肪酸,可使细胞膜脂质的流动性增加,以保持其正常的生理功能,从而提高对低温的耐受能力。

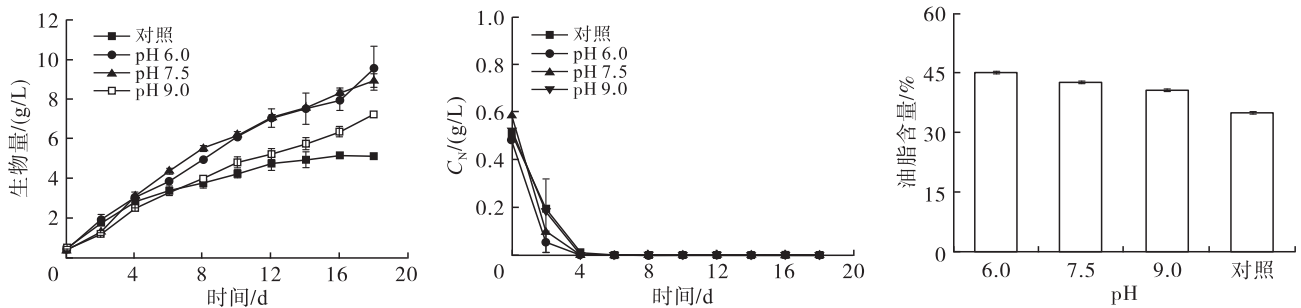


图6 环境pH对于克里藻生长、氮消耗及油脂合成的影响

表4 环境pH对于克里藻油脂脂肪酸组成的影响

环境 pH	含量/%											
	14:0	16:0	16:2	18:0	18:1	18:2	18:3	20:2	其他	SFA	MUFA	PUFA
对照	1.21	17.75	1.45	3.18	5.16	66.32	2.14	1.16	1.64	22.14	5.16	71.07
6.0	1.25	19.15	1.15	1.69	1.61	65.39	4.58	2.14	3.05	22.09	1.61	73.25
7.5	1.35	18.41	0.69	0.53	4.82	73.39	-	-	0.81	20.29	4.82	74.08
9.0	2.14	19.81	1.13	-	0.67	71.95	-	-	4.30	21.95	0.67	73.08

注:对照为全过程未控制pH

由图6可知,与全过程未控制pH(对照)相比,控制恒定pH时细胞的生长速率均明显升高。培养18d时,pH为6.0和7.5时具有最高生物量(9.2g/L左右),平均生长速率约0.49g/(L·d),比对照组提高了84%,比Xu等^[40]在相同氮浓度下培养克里藻的生长速率[0.415g/(L·d)]提高了18.07%;pH为9.0时,生物量稍有降低,为7.2g/L;以上说明克里藻

2.2.4 环境pH的影响

培养基pH会影响细胞内酶活性和代谢途径,从而影响细胞的生长和组成变化。对多株克里藻的研究发现,克里藻能耐受广泛的pH,多数克里藻最适pH在7~8,仅嗜酸克里藻能耐受pH4的极端环境^[37-38]。以前研究培养基pH对微藻生长代谢影响时,一般只考虑了培养基初始pH的影响。然而,微藻在碳酸盐体系中培养时,藻细胞不断吸收消耗水体中的HCO₃⁻或CO₂,碳酸盐平衡体系受到破坏,促使CO₃²⁻不断水解,pH逐渐升高。因此,仅培养基初始pH不能真实反映环境对克里藻生长与代谢的影响。因此,将克里藻接种于m-BG11(氮浓度6mmol/L、磷浓度0.230mmol/L)培养基中,用0.5mol/L的NaOH或0.5mol/L的稀硫酸调节培养基初始pH分别为6.0、7.5和9.0。在整个培养过程中通入纯CO₂气体,气泡柱中悬置一个pH计在线监测培养液中pH,并通过pH反馈控制器控制CO₂气路的通断^[39],从而使整个培养过程的培养基pH始终保持恒定。在光强200μmol/(m²·s)、培养温度25℃条件下,考察环境pH对克里藻生长、氮消耗、油脂合成及脂肪酸组成的影响,结果如图6和表4所示。

是中性偏弱酸性微藻,且培养过程维持培养基pH稳定在6.0~7.5比不控制pH能够明显提升培养效率。4种pH条件下,克里藻对培养基中氮的消耗速率相近。环境pH对克里藻的油脂含量有明显影响,当pH为6.0时,油脂含量达到最高,为45.11%,相较于对照组油脂含量(34.93%)提高了29.14%。克里藻主要利用溶解性CO₂,在酸性环境下培养基内无机碳中

溶解性 CO₂ 占比更高, 缺氮下充足的碳供应有利于合成油脂。即使在环境 pH 为 7.5 和 9.0 时, 细胞内油脂含量也比对照组的高, 表明对于克里藻培养, 采用适宜的措施维持比较稳定的环境 pH, 不但有利于细胞生长, 也有利于细胞内油脂合成。

由表 4 可知, 当环境 pH 为 7.5 时, 油脂中的亚油酸含量最高, 达到 73.39% [产率为 0.15 g/(L·d)], 比对照组和 pH 6.0 下亚油酸含量分别高 7.07%、8.00 个百分点, 比之前报道的 65.87%^[40]、67.50%^[41] 分别高 11.42%、8.73%, 显示出此环境 PH 下克里藻较强的亚油酸合成能力。环境 pH 对克里藻细胞棕榈酸合成的影响不大, 其含量仅占总脂肪酸的 18% 左右。

综上, 在控制培养基初始氮浓度 3~6 mmol/L、磷浓度 0.115~0.230 mmol/L、光强 100~300 μmol/L/(m²·s)、培养温度 15~30℃、环境 pH 7.5 左右, 克里藻细胞可积累 42% 左右的油脂, 油脂中亚油酸含量为 65%~75%。

对比克里藻与常见富含亚油酸的油料^[13-14,16,42-45]发现: 葡萄籽、大豆、玉米及水冬瓜籽含油量不足 30%, 且亚油酸含量较低; 芝麻含油量为 45%~63%, 油脂中亚油酸含量为 39%~68%, 红花籽含油量为 22.8%~28.4%, 油脂中亚油酸含量为 75.0%~79.3%; 而克里藻的亚油酸含量与芝麻和红花籽的相差不大。考虑红花籽平均年产在 1 500 kg/hm² 左右^[46], 芝麻的年产在 1 200~1 650 kg/hm²^[47], 克里藻即便是在开放式跑道池中的优化条件下养殖, 年生物量在 15 000 kg/hm² 以上^[48-49], 以此计算, 克里藻的亚油酸产量可达到 4 100~4 700 kg/hm², 明显高于上述典型作物, 而且微藻养殖可利用盐碱地等边际土地, 不与粮争地, 不与粮争水, 因此利用克里藻养殖来生产亚油酸无疑具有很大的潜力和优势。

3 结论

以筛选的一株丝状微藻——克里藻为研究对象, 考察了培养基氮浓度、培养基磷浓度、光强、培养温度和培养环境 pH 对克里藻生长、氮消耗、油脂含量和油脂脂肪酸组成的影响。结果表明, 克里藻是一株生长快、对氮和磷需求低及对温度和光照适应性较广的产油微藻。控制初始氮浓度 3~6 mmol/L, 磷浓度 0.115~0.230 mmol/L 及培养过程中光强 100~300 μmol/(m²·s), 培养温度 15~30℃, 环境 pH 7.5 左右, 克里藻细胞可积累 42% 左右的油脂, 油脂中亚油酸含量为 65%~75%。因此, 克里藻是一株比较有潜力的亚油酸生产新资源。

参考文献:

- [1] DAS U. Essential fatty acids: A review[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2006, 7(6): 467-482.
- [2] MARANGONI F, AGOSTONI C, BORGHI C, et al. Dietary linoleic acid and human health: Focus on cardiovascular and cardiometabolic effects [J]. *Atherosclerosis*, 2020, 292: 90-98.
- [3] YOON S Y, AHN D, HWANG J Y, et al. Linoleic acid exerts antidiabetic effects by inhibiting protein tyrosine phosphatases associated with insulin resistance[J/OL]. *J Funct Foods*, 2021, 83: 104532 [2023-03-20]. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104532>.
- [4] DEMIR A S, TALPUR F N. Chemoenzymatic conversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(3): 1646-1652.
- [5] DONG M, QI S. Conjugated linoleic acid production by fermentation[J/OL]. *Int J Food Eng*, 2006, 2(4): 1128 [2023-03-20]. <https://doi.org/10.2202/1556-3758.1128>.
- [6] FUKU G, NORBERG J L. Systematic evaluation on the effectiveness of conjugated linoleic acid in human health [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2016, 57(1): 1-7.
- [7] PEREIRA L M, HATANAKA E, MARTINS E F, et al. Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats[J]. *Cell Biochem Funct*, 2008, 26(2): 197-204.
- [8] INNES J K, CALDER P C. Omega-6 fatty acids and inflammation [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2018, 132: 41-48.
- [9] TAN B, GRIJPMAN D W, NABUURS T, et al. Crosslinkable surfactants based on linoleic acid-functionalized block copolymers of ethylene oxide and ε-caprolactone for the preparation of stable PMMA latices[J]. *Polymer*, 2005, 46(4): 1347-1357.
- [10] BESSE X, SCHURMAN Y, GUILHAUME N. Hydrothermal conversion of linoleic acid and ethanol for biofuel production [J]. *Appl Catal A-Gen*, 2016, 524: 139-148.
- [11] 2023 年亚油酸市场分析: 全球亚油酸市场规模逐渐扩大[EB/OL]. (2023-09-24) [2024-01-11]. <https://m.chinabgao.com/info/1246307.html>.
- [12] 全球亚油酸行业持续发展, 食品和饮料行业成为最大需求领域[EB/OL]. (2022-06-28) [2024-01-11]. <https://globalmarketmonitor.com.cn/report-blog/853115.html>.
- [13] ZEMOUR K, ADDA A, LABDELLI A, et al. Effects of genotype and climatic conditions on the oil content and its fatty acids composition of *Carthamus tinctorius* L. seeds [J/OL]. *Agronomy*, 2021, 11(10): 2048 [2023-03-20]. <https://doi.org/10.3390/agronomy11102048>.

- [14] 回瑞华, 侯冬岩, 李铁纯, 等. 黑芝麻和白芝麻中脂肪酸组成的比较[J]. 食品科学, 2009, 30(18): 333–334.
- [15] GAGOUR J, AHMED M N, BOUZID H A, et al. Proximate composition, physicochemical, and lipids profiling and elemental profiling of rapeseed (*Brassica napus* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) grown in Morocco [J/OL]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 3505943 [2024-01-11]. <https://doi.org/10.1155/2022/3505943>.
- [16] CHERIF A, SLAMA A, ELFALLEH W. Stability and change in fatty acids composition of soybean, corn, and sunflower oils during the heating process [J]. J Food Qual, 2022, 2022: 1–17.
- [17] WHELAN J, FRITSCHKE K. Linoleic acid [J]. Adv Nutr, 2013, 4(3): 311–312.
- [18] ZHOU W, JI X, ZHENG L, et al. Producing high value unsaturated fatty acid by whole-cell catalysis using microalga: A case study with *Tribonema minus* [J]. Biotechnol Bioeng, 2022, 119(9): 2482–2493.
- [19] MA X N, CHEN T P, YANG B, et al. Lipid production from *Nannochloropsis* [J/OL]. Mar Drugs, 2016, 14(4): 61 [2024-01-11]. <https://doi.org/10.3390/md14040061>.
- [20] MENDES A, REIS A, VASCONCELOS R, et al. *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: A review [J]. J Appl Phycol, 2008, 21(2): 199–214.
- [21] DE VRIES J, ARCHIBALD J M. Plant evolution: Landmarks on the path to terrestrial life [J]. New Phytol, 2018, 217(4): 1428–1434.
- [22] BRICKEL J A, MATULKA R A, STEFFEK A E. KALGAE™ (*Klebsormidium flaccidum* var. ZIVO) dried algal biomass – 90-day dietary toxicity study and genotoxicity studies [J]. Toxicol Rep, 2018, 5: 959–969.
- [23] FANG H, ZHUANG Z, HUANG L, et al. Dietary *Klebsormidium* sp. supplementation improves growth performance, antioxidant and anti-inflammatory status, metabolism, and mid-intestine morphology of *Litopenaeus vannamei* [J/OL]. Front Nutr, 2022, 9: 857351 [2024-01-11]. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.857351>.
- [24] LAWTON R J, GLASSON C R K, NOVIS P M, et al. Productivity and municipal wastewater nutrient bioremediation performance of new filamentous green macroalgal cultivars [J]. J Appl Phycol, 2021, 33(6): 4137–4148.
- [25] SAMOLOV E, MIKHAILYUK T, LUKESOVA A, et al. Usual alga from unusual habitats: Biodiversity of *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) from the phylogenetic superclade G isolated from biological soil crusts [J]. Mol Phylogenet Evol, 2019, 133: 236–255.
- [26] ORANDI S, LEWIS D M. Biosorption of heavy metals in a photo-rotating biological contactor: A batch process study [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(11): 5113–5123.
- [27] ZHANG W, ZHAO Y G, CUI B J, et al. Evaluation of filamentous green algae as feedstocks for biofuel production [J]. Bioresour Technol, 2016, 220: 407–413.
- [28] WANG J F, CHENG W T, LIU W, et al. Field study on attached cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) with carbon dioxide as carbon source [J]. Bioresour Technol, 2019, 283: 270–276.
- [29] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. Can J Biochem Physiol, 1959 37(8): 911–917.
- [30] CONVERTI A, CASAZZA A A, ORTIZ E Y, et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production [J]. Chem Eng Process, 2009, 48(6): 1146–1151.
- [31] FAKHRY E M, EL MAGHRABY D M. Lipid accumulation in response to nitrogen limitation and variation of temperature in *Nannochloropsis salina* [J/OL]. Bot Stud, 2015, 56: 6 [2024-01-11]. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:1835121>.
- [32] ZHENG S, ZOU S, WANG H, et al. Reducing culture medium nitrogen supply coupled with replenishing carbon nutrient simultaneously enhances the biomass and lipid production of *Chlamydomonas reinhardtii* [J/OL]. Front Microbiol, 2022, 13: 1019806 [2024-01-11]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1019806>.
- [33] PIERANGELINI M, RYSANEK D, LANG I, et al. Terrestrial adaptation of green algae *Klebsormidium* and *Zygnema* (Charophyta) involves diversity in photosynthetic traits but not in CO₂ acquisition [J]. Planta, 2017, 246(5): 971–986.
- [34] KARSTEN U, RINDI F. Ecophysiological performance of an urban strain of the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium* sp. (Klebsormidiales, Klebsormidiophyceae) [J]. Eur J Phycol, 2010, 45(4): 426–435.
- [35] KARSTEN U, HERBURGER K, HOLZINGER A. Photosynthetic plasticity in the green algal species *Klebsormidium flaccidum* (Streptophyta) from a terrestrial and a freshwater habitat [J]. Phycologia, 2017, 56(2): 213–220.
- [36] SMITH-BÄDORF H D, CHUCK C J, MOKEBO K R, et al. Bioprospecting the thermal waters of the Roman baths: Isolation of oleaginous species and analysis of the FAME profile for biodiesel production [J/OL]. Amb Express, 2013, 3(1): 9 [2024-01-11]. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-9>.

- [37] RYSANEK D, HOLZINGER A, SKALOUD P. Influence of substrate and pH on the diversity of the aeroterrestrial alga *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Streptophyta): A potentially important factor for sympatric speciation [J]. *Phycologia*, 2016, 55(4): 347–358.
- [38] ŠKALOUD P, LUKEŠOVÁ A, MALAVASI V, et al. Molecular evidence for the polyphyletic origin of low pH adaptation in the genus *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) [J]. *Plant Ecol Evol*, 2014, 147(3): 333–345.
- [39] LIU W, WANG J, LIU T. Low pH rather than high CO₂ concentration itself inhibits growth of *Arthrospira* [J]. *Sci Total Environ*, 2019, 666: 572–580.
- [40] XU Z, HE Q, GONG Y, et al. Assessment of a novel oleaginous filamentous microalga *Klebsormidium* sp. Lgx80 (Streptophyta, Klebsormidiales) for biomass and lipid production [J]. *J Phycol*, 2021, 57(4): 1151–1166.
- [41] 戴晨明. 三株新分离丝状微藻对光强和氮浓度的响应及油脂抗氧化性研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2020.
- [42] LANGYAN S, YADAVA P, SHARMA S, et al. Food and nutraceutical functions of sesame oil: An underutilized crop for nutritional and health benefits [J/OL]. *Food Chem*, 2022, 389: 132990 [2024-01-11]. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-9>.
- [43] HASSAN M A M. Studies on Egyptian sesame seeds (*Sesamum indicum* L.) and its products 1: Physicochemical analysis and phenolic acids of roasted Egyptian sesame seeds (*Sesamum indicum* L.) [J]. *World J Dairy Food Sci*, 2012, 7(2): 195–201.
- [44] DISTEFANO V, BONGIORNO D, BUZZANCA C, et al. Fatty acids and triacylglycerols profiles from Sicilian (cold pressed vs. Soxhlet) grape seed oils [J]. *Sustainability*, 2021, 13(23): 1–10.
- [45] 薛刚, 苏印泉, 杨芳霞, 等. 溶剂法提取水冬瓜籽油的研究 [J]. *西北林学院学报*, 2010, 25(3): 154–157.
- [46] 林寒, 李刚, 刘虹, 等. 中国红花种质资源的种类与分布 [J]. *生物资源*, 2018, 40(4): 314–320.
- [47] 2020年中国芝麻种植面积、产量、进出口现状分析, 国内市场缺口将近百万吨 [EB/OL]. (2021-12-08) [2024-01-11]. <http://huaon.com/channel/trend/768443.html>.
- [48] 许洪高, 周琪乐, 绯鲁, 等. 螺旋藻养殖加工和安全性研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(6): 10–19.
- [49] 彭日东, 赵云忠. 对鄂托克旗螺旋藻产业发展情况的调查 [J]. *内蒙古金融研究*, 2024(4): 51–52.
- et al. Role of Sn promoter in Ni/Al₂O₃ catalyst for the deoxygenation of stearic acid and coke formation: Experimental and theoretical studies [J]. *Catal Sci Technol*, 2019, 9(13): 3361–3372.
- [37] HWANG K R, CHOI I H, CHOI H Y, et al. Biofuel production from crude *Jatropha* oil: Addition effect of formic acid as an in-situ hydrogen source [J]. *Fuel*, 2016, 174: 107–113.
- (上接第 82 页)
- [34] WANG D, MA B, WANG B, et al. One-pot synthesized hierarchical zeolite supported metal nanoparticles for highly efficient biomass conversion [J]. *Chem Commun*, 2015, 51(82): 15102–15105.
- [35] 张静, 马慧玲, 曾得福, 等. 水热催化制备绿色柴油工艺中催化剂的失活与再生 [J]. *化工进展*, 2022, 41(2): 682–289.
- [36] REANGCHIM P, SAELEE T, ITTHIBENCHAPONG V,