

培养基、光照强度和初始氮浓度对克里藻生长及生物活性代谢产物积累的影响

洪建,戴晨明,张虎,高保燕,张成武

(暨南大学水生生物研究中心,广州 510632)

摘要:为利用克里藻 JNU41 高效生产油脂、亚油酸和叶黄素等重要代谢产物,对其进行培养条件的优化及代谢产物积累的评估。采用改良的 BG-11 (mBG-11) 和 BBM (mBBM) 培养基,设置 3 组光照强度[单侧 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、单侧 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和双侧 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 和 6 种初始氮浓度(3、6、9、12、15、18 mmol/L) 对克里藻 JNU41 进行培养,并测定其生长曲线、生化组成、总脂产率、脂肪酸组成及叶黄素含量。结果表明:克里藻 JNU41 在 mBBM 培养基、双侧光照强度 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、初始氮浓度 6 mmol/L 条件下,生物量和总脂产率最高,分别为 8.38 g/L 和 281.71 mg/(L·d);在 mBG-11 培养基、双侧光照强度 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、初始氮浓度 3 mmol/L 条件下,总脂和总脂肪酸含量最高,分别为 55.12% 和 47.10%。克里藻 JNU41 主要脂肪酸组成为棕榈酸、油酸、亚油酸和亚麻酸,其中亚油酸含量最高,亚油酸最高相对含量为 65.87%。此外,克里藻 JNU41 还积累一定量叶黄素,最高含量可达 1.64 mg/g。因此,克里藻 JNU41 是一株可用于生产多种高附加值产物的潜力藻株。

关键词:克里藻;培养基;光照强度;氮浓度;油脂;脂肪酸;叶黄素

中图分类号:TS201.3;TS221 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)01-0106-09

Effects of media, light intensity and initial nitrogen concentration on the growth and bioactive metabolites accumulation of *Klebsormidium* sp. JNU41

HONG Jian, DAI Chenming, ZHANG Hu, GAO Baoyan, ZHANG Chengwu

(Research Center of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: To efficient production of important metabolites such as oil, linoleic acid and lutein by *Klebsormidium* sp. JNU41, the culture conditions were optimized and the accumulation of metabolites in *Klebsormidium* sp. JNU41 was evaluated. The growth curve, biochemical composition, total lipid yield, fatty acid composition and lutein content of *Klebsormidium* sp. JNU41 were studied using modified BG-11 (mBG-11) and BBM (mBBM) as the media, and three sets of light intensities [unilateral 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, unilateral 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ and bilateral 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] and six initial nitrogen concentrations (3, 6, 9, 12, 15, 18 mmol/L) were used for culture. The results showed that under the conditions of mBBM media, bilateral light intensity 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ and initial nitrogen concentration 6 mmol/L, the biomass (8.38 g/L) and total lipid yield [281.71 mg/(L·d)] reached a maximum value. Under the conditions of mBG-11 media, bilateral light intensity 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ and initial nitrogen concentration 3 mmol/L, the

highest total lipid and total fatty acid contents reached 55.12% and 47.10%, respectively. The main components of fatty acids were palmitic acid, oleic acid, linoleic acid and linolenic acid, and linoleic acid content was the highest with the highest relative content of 65.87%. In addition,

收稿日期:2022-07-06;修回日期:2023-07-27

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金项目(2020A1515110802);国家自然科学基金(32002412)

作者简介:洪建(1997),男,在读硕士,研究方向为能源微生物与生物技术(E-mail)1527752249@qq.com。

通信作者:张成武,教授(E-mail)tzhangcw@jnu.edu.cn。

Klebsormidium sp. JNU41 also accumulated a certain amount of lutein, up to 1.64 mg/g. Therefore, *Klebsormidium* sp. JNU41 is an algal strain that can be used to produce high value-added products.

Key words: *Klebsormidium* sp.; media; light intensity; nitrogen concentration; lipid; fatty acid; lutein

微藻是一些重要生物活性物质的宝贵来源,例如蛋白质、脂肪、多不饱和脂肪酸、多糖、色素等,在功能食品、医药、生物饲料和生物燃料等领域具有极大的应用潜力^[1]。以往的研究与开发以单细胞微藻为主,与单细胞微藻相比,丝状微藻具有明显的优势,它们不仅能够代谢积累多种重要的生物活性物质,而且其藻体较长,更容易进行重力沉降和过滤收获,且不容易被原生动植物吞食,适合应用于大规模生产中,且能降低商业化生产成本^[2-4]。因此,筛选具有生长速率快、易收获、脂质含量高、高附加值成分丰富等优良性状的丝状微藻,对生物燃料和生物制品商业化应用具有重要意义。

微藻生长需要碳、氮、磷、硫、钾、钙、镁等大量和中量营养元素,同时还需要铁、铜、锌、钴、钼、硼等微量元素。不同微藻对于各种营养元素组成和浓度的需求不尽相同,由于不同培养基其组成和营养盐浓度各不相同,使得微藻在不同培养基中的生长状况会有差异。因此,在微藻培养的过程中,选择合适的培养基对其生长和代谢产物的积累至关重要。

光照是影响微藻生长和代谢的重要环境因素之一^[5],包括光质、光照强度、光照周期等,现有研究对光照强度的研究较为深入,当光照强度高于光饱和点时,微藻的生长会受到抑制^[6],而当光照强度低于光饱和点时,会促使微藻合成较多的类胡萝卜素、脂类、碳水化合物、多不饱和脂肪酸等抗逆性物质^[7]。同时,光照强度的增加和光照时间的延长有利于微藻细胞内饱和脂肪酸含量的增加,而不利于细胞内单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸的积累^[8]。

氮是藻类生长与代谢所必需的营养元素,其中氮浓度影响叶绿素合成和光合作用速率,从而控制细胞生长和能量代谢。当氮充足时,藻细胞内光合作用固定碳的速率是氮同化速率的7~10倍;而当氮缺乏时,藻细胞的光合作用能力降低,细胞内光合作用固定碳的能力超过吸收含氮化合物的需要,过量的碳被转化为脂类和碳水化合物等储能化合物。一般而言,培养基中氮供应的缺乏使碳库更倾向于碳水化合物或脂质^[9-10],蛋白质含量在缺氮/限氮条件下存在明显的物种差异,一些物种维持了细胞内大部分的蛋白质含量,而另一些物种细胞内的蛋白质含量则大幅下降。

克里藻 JNU41 (*Klebsormidium* sp. JNU41) 是一株新分离的气生丝状绿藻,隶属于链藻门 (Streptophyta)、克里藻纲 (Klebsormidiophyceae)、克里藻属 (*Klebsormidium*)。在本研究中,以克里藻 JNU41 为研究材料,通过设置 2 种培养基、3 组光照强度和 6 种不同初始氮浓度对该藻进行培养,研究克里藻 JNU41 的形态特征和分类,以及不同培养基、光照强度和初始氮浓度对其细胞生长和生化组成和含量的影响,从而筛选出适合克里藻 JNU41 生长、代谢产物积累的最适光照强度及最适氮浓度,为克里藻 JNU41 应用于油脂以及高附加值产品生产提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

克里藻 JNU41 (以下简称“克里藻”),来自暨南大学,现保存于暨南大学水生生物研究中心微藻生物资源与生物技术实验室藻种库。

Lowry 法蛋白质含量测定试剂盒,上海荔达生物有限公司;十七烷酸 (C17:0)、乙酸乙酯, Sigma - Aldrich 公司;正己烷、浓硫酸、无水乙醚、苯酚、乙腈、硝酸钠、氢氧化钠等,广州化学试剂厂;二甲基亚砜、甲醇、正己烷,上海麦克林生化科技股份有限公司。

LS-100 HD 高压蒸汽灭菌锅,江阴滨江医疗设备有限公司;VirTis wizard 2.0 冷冻干燥机,德国 Christ 公司;ZHJH-C1109B 超净工作台,上海智城分析仪器制造有限公司;DF-1 磁力搅拌水浴锅,天津市赛得利斯实验仪器有限公司;N-EVAPTM 111 氮吹仪,美国 Organomation 公司;Icyler 荧光定量 PCR 仪、电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;Agilent 689N 气相色谱仪,美国 Agilent 公司;SC2000 显微镜,日本 Olympus 公司;UV-2450 紫外可见分光光度计,美国 Hach 公司;Kubota 6500 高速冷冻离心机,美国 Eppendorf 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 克里藻培养

本研究设置 3 组光照强度 [单侧 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、单侧 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和双侧 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 和 6 种不同初始氮浓度 (3、6、9、12、15、18 mmol/L,氮源为 NaNO_3),分别以改良的 BG-11 (mBG-11) 和 BBM (mBBM) 培养基对克里藻进

行 24 h 持续光照培养。取对数生长期的克里藻接种于 $\Phi 4.5 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$ 柱状生物反应器,接种量为 $(0.40 \pm 0.10) \text{ g/L}$, 通入含 1% CO_2 的压缩空气进行通气培养,培养时间为 15 d,培养温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 设置 3 个生物学平行。mBBM 和 mBG-11 培养基配方参照 Wang 等^[2] 的方法。

1.2.2 克里藻细胞显微形态学观察

每隔 72 h 通过显微镜对克里藻进行形态观察,并拍照记录。

1.2.3 藻粉制备

收集不同培养条件下的藻泥,置于 -20°C 冰箱中冷冻,然后用冷冻干燥机冻干,密封,保存于 4°C 冰箱中。

1.2.4 生物量测定

预先将孔径为 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜干燥至恒重,取 10 mL 藻液真空抽滤烘干至恒重,根据公式(1)计算生物量。

$$W = (W_b - W_a) \times 100 \quad (1)$$

式中: W 为生物量, g/L ; W_a 为干燥的微孔滤膜质量, g ; W_b 为烘干后微藻与微孔滤膜质量之和, g 。

1.2.5 总脂含量的测定

参考文献[11]测定微藻中总脂含量。称量 75 mg 冻干藻粉,加入 2 mL 二甲基亚砜-甲醇(体积比 1:9)溶液, 50°C 下加热搅拌 1.5 h 后,以 3 000 r/min 离心 5 min,收集上清;向沉淀中加入 4 mL 正己烷-乙醚(体积比 1:1)溶液,冰浴搅拌 1.5 h 后,以 3 000 r/min 离心 5 min,收集上清,重复以上操作至藻渣呈灰白色。合并上述所有上清,加入 4 mL 去离子水,充分混匀后静置分层,分离有机相,氮吹浓缩后转至 EP 管,再氮吹至恒重,根据公式(2)计算总脂含量。

$$\omega_1 = (m_3 - m_2) / m_1 \times 100\% \quad (2)$$

式中: ω_1 为总脂含量; m_1 为藻粉质量, g ; m_2 为 EP 管质量, g ; m_3 为 EP 管与提取总脂的质量之和, g 。

根据生物量和总脂含量计算总脂产率,计算方法见文献[12]。

1.2.6 总碳水化合物含量的测定

参考文献[12]测定微藻中总碳水化合物的含量。称量 10 mg 干燥脱脂藻渣,加入 5 mL 0.5 mol/L H_2SO_4 溶液后 100°C 水浴搅拌 4 h,冷却至室

温后,以 3 000 r/min 离心 5 min,将上清转移至 25 mL 容量瓶中,重复上述操作 3 次,合并上清并定容。取 0.5 mL 上清加去离子水稀释至 2 mL,迅速加入 6% 苯酚和 98% 浓硫酸后混匀,用紫外可见分光光度计测定其在 490 nm 处吸光值,根据标准曲线方程计算总碳水化合物含量。以葡萄糖为标准物的标准曲线方程为 $y = 18.048x + 0.010$ (x 为葡萄糖质量浓度, y 为吸光值; $R^2 = 0.9997$)。

1.2.7 总蛋白质含量的测定

使用 Lowry 法蛋白质含量测定试剂盒测定微藻中总蛋白质含量。称取约 30 mg 干燥脱脂藻渣,加入 5 mL 0.5 mol/L NaOH 溶液后 80°C 水浴搅拌 10 min,以 3 000 r/min 离心 5 min,将上清转移至 25 mL 容量瓶中,重复上述操作 3 次,合并上清并定容,用紫外可见分光光度计测定上清在 750 nm 处吸光值,根据标准曲线方程中计算总蛋白质含量。标准曲线方程为 $y = 0.4984x - 0.0043$ (x 为蛋白质质量浓度, y 为吸光值; $R^2 = 0.9996$)。

1.2.8 脂肪酸组成及含量的测定

参考文献[13]测定微藻中脂肪酸组成及含量。称取 25 mg 冻干藻粉,加入 2 mL (2% H_2SO_4 - 甲醇) - 甲苯(体积比 9:1)混合液,同时加入 100 μL 0.25% 十七烷酸标样(C17:0),充氩气进行密封后, 80°C 水浴搅拌 1.5 h,冷却后加入去离子水和正己烷各 1 mL,以 3 000 r/min 离心 5 min,转移上层有机相至样品瓶中,利用气相色谱仪测定克里藻脂肪酸组成及含量。气相色谱条件参照 Gao 等^[14] 的方法。

1.2.9 总叶黄素含量的测定

称取 10 mg 冻干藻粉,加入 5 mL 甲醇溶液,遮光冰浴搅拌 16 h,以 3 000 r/min 离心 5 min,取上清,使用 0.2 μm 有机膜过滤,过滤液转至进样瓶中,使用高效液相色谱仪测定总叶黄素含量。高效液相色谱条件参照 Gao 等^[14] 的方法。

1.2.10 数据处理

使用 Office Excel 2010、Origin 2018 和 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析,以 $p < 0.05$ 代表差异显著。

2 结果与讨论

2.1 克里藻形态学分析

克里藻的形态学特征如图 1 所示。

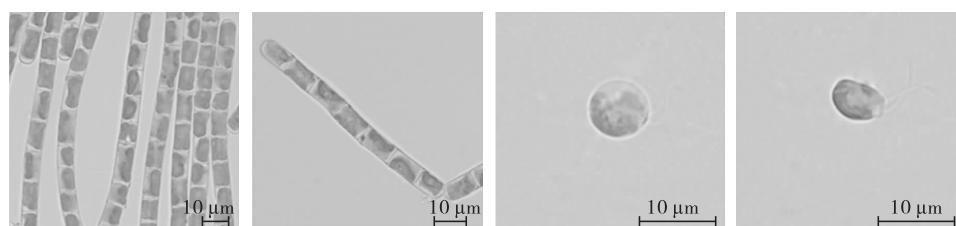


图 1 克里藻形态学特征

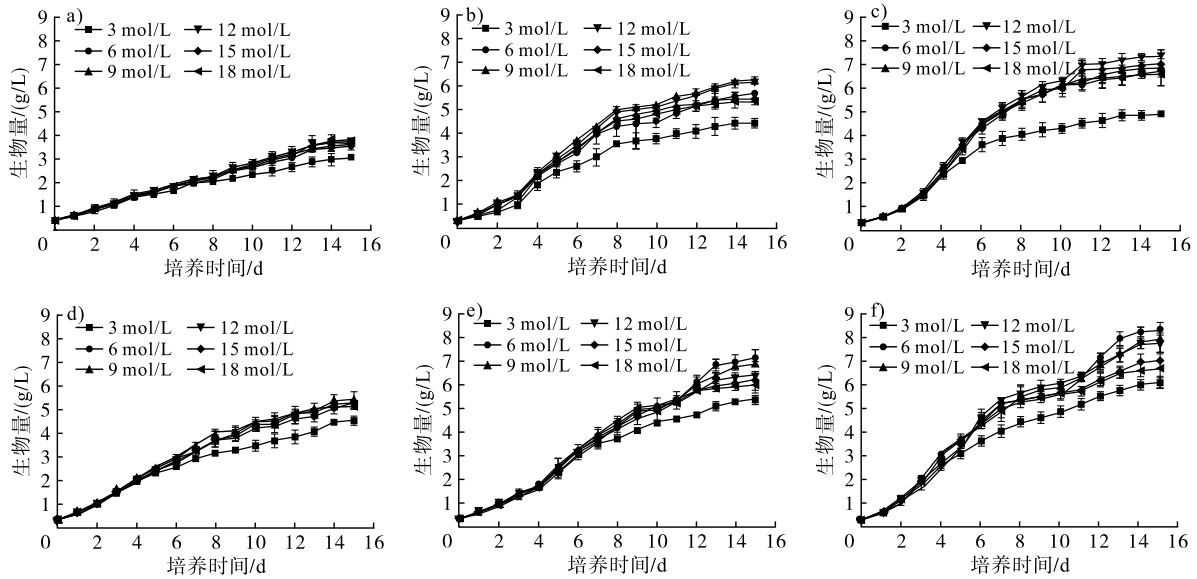
从图1可以看出,克里藻呈单链、不分枝的丝状体,由单列细胞构成,细胞呈圆柱状,每个细胞都含有单个位于周缘的叶绿体,具有一个蛋白核,细胞壁薄,丝状体易断裂。从顶部进行观察时,细胞形态近乎球形,而从侧面进行观察时,细胞形态近似梨形,整体长度为5~8 μm ,具有两根等长鞭毛。克里藻分布广泛,能够在干燥、暴晒、炎热或寒冷的陆地等

极端条件下存活并正常生长^[15];同时能够积累一定量的油脂,是继黄丝藻(*Tribonema*)后又一真核产油丝状微藻^[16]。

2.2 培养基、光照强度和初始氮浓度对克里藻的影响

2.2.1 对生长的影响

光照强度、培养基和初始氮浓度对克里藻生长的影响如图2所示。



注:a、d.单侧光照强度 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$; b、e.单侧光照强度 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$; c、f.双侧光照强度 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$; a、b、c.mBG-11培养基;d、e、f.mBBM培养基。下同

图2 光照强度、培养基和初始氮浓度对克里藻生长的影响

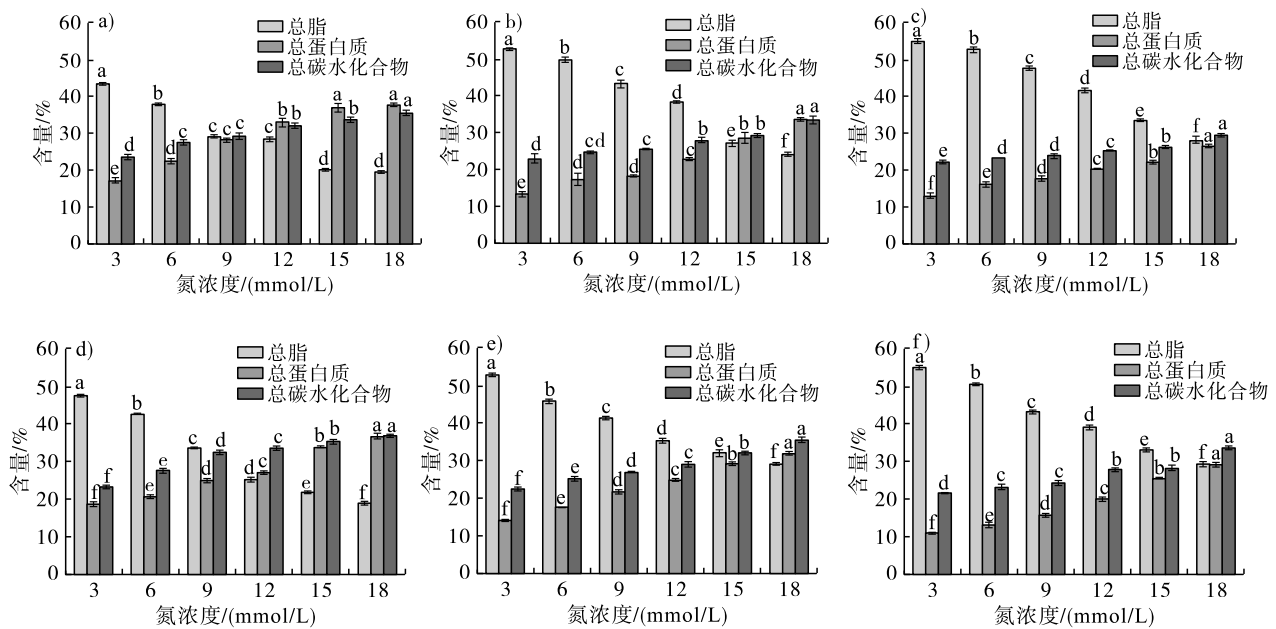
由图2可以看出:不同条件下克里藻生物量均随培养时间的延长而不断增加;在低光照强度下(图2a、2d),克里藻生物量增加缓慢;而在高光照强度下(图2b、2e),藻细胞经过2 d的适应后进入指数生长,培养15 d时生物量远大于低光照强度下的。通过比较图2a、2b、2c与图2d、2e、2f发现,mBBM培养基中生物量普遍高于mBG-11培养基。经检验,克里藻在6种不同初始氮浓度下培养,3组光照强度间的生物量存在显著差异($p < 0.05$)。在mBBM培养基、双侧光照强度 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和初始氮浓度6 mmol/L条件下培养15 d克里藻生物量达到最大值,为8.38 g/L(图2f),此时单位体积生物量为558.67 mg/(L·d)。综上所述,有利于克里藻生长的培养条件是mBBM培养基、双侧光照强度 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和初始氮浓度6 mmol/L。

本研究发现,双侧 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照强度能够维持克里藻的快速生长。然而多裂克里藻(*Klebsormidium dissectum*)的生长响应模式在光照强度为 $30 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时最优,而光照强度超过 $85 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时生长受到抑制^[17];锯缘克里藻(*Klebsormidium crenulatum*)在低光照强度时生长速

率最快,而光照强度超过 $85 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时增长率大幅下降^[18]。这与本研究结果并不一致,可能是因为多裂克里藻和锯缘克里藻是来自于高寒土壤的适应低温的藻株,而本实验中的藻株是采于全年平均温度 $20 \sim 28 \text{ }^\circ\text{C}$ 的亚热带平原地区,属于常温藻株,它们之间存在较大的种间差异。此外,在本实验中光照强度并没有到达克里藻光饱和点,其生长还未受到抑制,证明克里藻具有较强的光耐受能力。本研究发现,克里藻的生长情况还与氮浓度有关,随着氮浓度的升高克里藻生长速率加快,但过高的氮浓度反而会有抑制作用。在本研究中,培养基中6 mmol/L NaNO_3 最有利于克里藻的生长,这个氮源下6 mmol/L的浓度同样最有利于克里藻 Lgx80 (*Klebsormidium* sp. Lgx80)的生长^[16],但克里藻 Lgx80在9 mmol/L尿素下有更高的生长速率^[16],因此为了更好地优化克里藻 JNU41的培养条件,后续需对氮源进行研究。根据克里藻生长情况,以培养15 d的微藻进行后续研究。

2.2.2 对生化组成的影响

光照强度、培养基和初始氮浓度对克里藻生化组成的影响如图3所示。



注:不同字母表示组间有显著差异($p < 0.05$)。下同

图3 光照强度、培养基和初始氮浓度对克里藻生化组成的影响

由图3可以看出:3种光照强度下克里藻总脂含量均随培养基中初始氮浓度的增加而不断减少,在氮浓度为18 mmol/L时总脂含量最低;在两种培养基中初始氮浓度相同时,细胞内总脂含量随光照强度的增加而增加,而总碳水化合物与总蛋白质含量则随光照强度的增加而减少。克里藻以mBG-11或mBBM培养基培养时,其藻细胞总脂、总蛋白质、总碳水化合物含量在3种光照强度、6种初始氮浓度之间存在显著差异($p < 0.05$)。在mBG-11和mBBM培养基中培养时,克里藻总脂含量均在双侧光照强度 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、初始氮浓度3 mmol/L时达到最高,分别为55.12%和54.87%,而总碳水化合物和总蛋白质含量均在单侧光照强度 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、初始氮浓度为18 mmol/L时最高,分别为35.58%、37.69%和36.96%、36.72%。

研究发现,小球藻(*Chlorella* sp.)和单针藻(*Monoraphidium dybowskii*)在高光照强度下总脂含量高于低光照强度组,而碳水化合物和蛋白质含量在低光照强度组更有利于积累^[19]。这与本研究的结果相似,高光照强度条件下,微藻会合成较多的油脂等抗逆性物质,用于抵御光氧化^[20]。由图3可知,随光照强度增加克里藻总脂含量已增加缓慢,再进一步提高光照强度,总脂含量的增加幅度可能会很小,因此需要平衡好光照强度增加带来的能耗与总脂含量增加的经济效益之间的关系。Nzayisenga等^[21]在对杜氏盐藻(*Dunaliella tertiolecta*)进行研究时发现,较高的脂质含量与较低的蛋白质含量相关,

说明脂质合成主要依赖于蛋白质的降解或蛋白质合成受阻,蛋白质含量随光照强度的增加而下降可能归因于氮的消耗。

2.2.3 对总脂产率的影响

光照强度、培养基和初始氮浓度对克里藻总脂产率的影响如图4所示。

由图4可知:初始氮浓度对克里藻总脂产率有显著影响,且总脂产率随着光照强度的增加而增加;在mBBM培养基、双侧光照强度 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和初始氮浓度6 mmol/L时克里藻总脂产率最高,为 $281.71 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{d})$,结合图1可知,该条件也有利于生物量的积累。据文献报道,祖芬根小球藻(*Chlorella zofingiensis*)在缺氮条件下得到最大的油脂含量(65.1%)和油脂产率 $[87.1 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{d})]$,氮缺乏诱导脂质产生^[22]。这是因为氮缺乏时,藻细胞的光合作用能力显著降低,细胞内光合作用固定碳的能力可能超过吸收含氮化合物的需要,过量的碳可能被转化为脂质类等储存化合物。一般而言,培养基中氮的缺乏使碳更倾向于合成碳水化合物和脂质^[23-24],如斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)在氮缺乏条件下获得最高碳水化合物含量和产量,分别为51.8%和 $383.4 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{d})$ ^[25]。而本研究发现,克里藻在高氮(18 mmol/L)条件下碳水化合物含量较高。这可能是因为克里藻中碳和能量储存的初期积累物主要为碳水化合物,后期主要以油脂的形式,但斜生栅藻(*S. obliquus*)在胁迫条件下主要以碳水化合物作为碳和能量的储存产物。

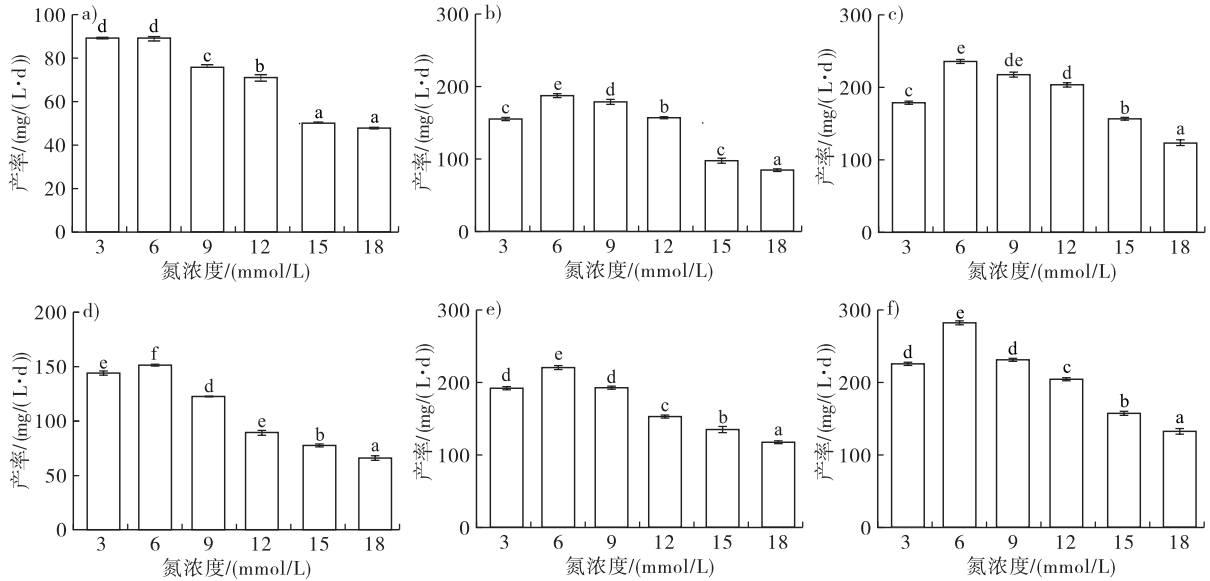


图4 光照强度、培养基和初始氮浓度对克里藻总脂产率的影响

2.2.4 对脂肪酸组成的影响

酸组成的影响如图5所示。

光照强度、培养基和初始氮浓度对克里藻脂肪

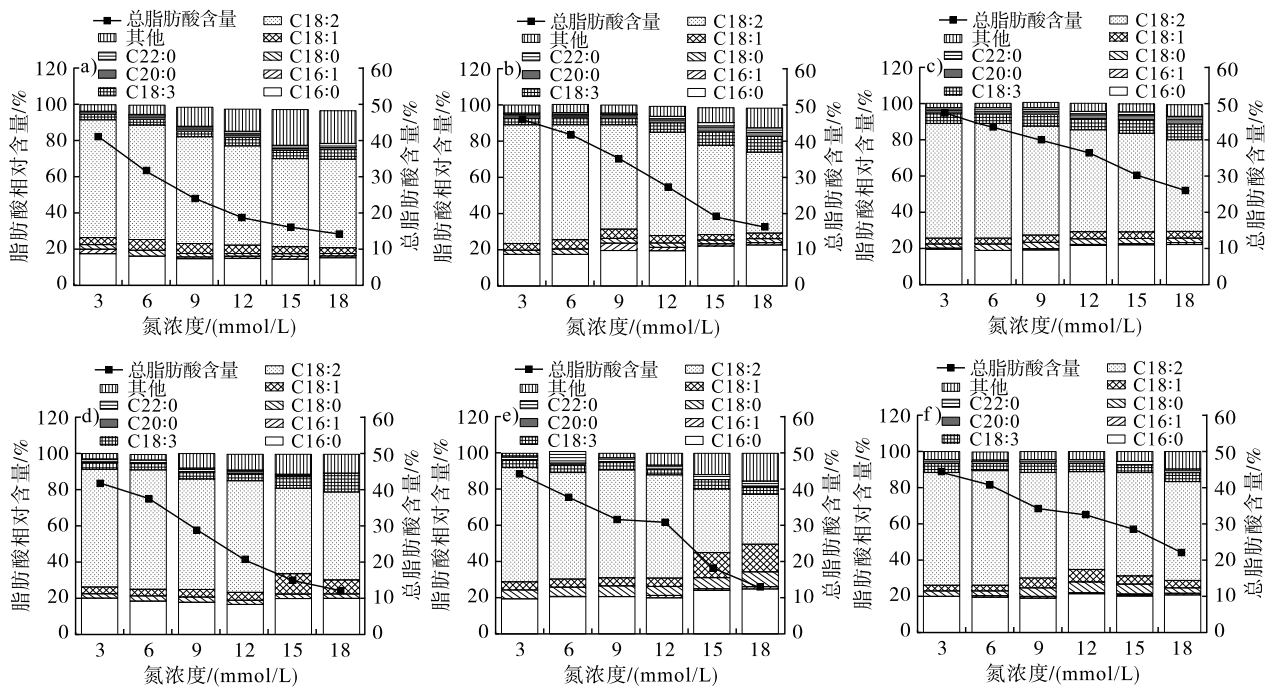


图5 光照强度、培养基和初始氮浓度对克里藻脂肪酸组成的影响

由图5可以看出,克里藻总脂肪酸含量(脂肪酸绝对含量)总体随初始氮浓度的增加而减少,在双侧光照强度 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、初始氮浓度 3 mmol/L 、mBG-11 培养基下总脂肪酸含量最高,为 47.10% 。克里藻主要脂肪酸有棕榈酸(C16:0)、油酸(C18:1)、亚油酸(C18:2)和亚麻酸(C18:3),还含有少量的硬脂酸(C18:0)、棕榈油酸(C16:1)、二十烷酸(C20:0)与二十二烷酸(C22:0)。在单侧光照强度 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、初始氮浓度 3 mmol/L 、mBG-11 培养基下亚油酸相对含量达到

最高,为 65.87% ;在单侧光照强度 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、初始氮浓度 18 mmol/L 、mBBM 培养基下棕榈酸相对含量达到最高,为 25.07% ;在单侧光照强度 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、初始氮浓度 18 mmol/L 、mBBM 培养基下油酸相对含量达到最高,为 15.38% ;在单侧光照强度 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、初始氮浓度 18 mmol/L 、mBG-11 培养基下亚麻酸相对含量达到最高,为 8.90% 。

微藻细胞的多不饱和脂肪酸由于可用于人类或运动营养而受到更多关注^[26-27]。对克里藻脂肪酸组成

的研究表明,丝状微藻含有大量的必需脂肪酸——亚油酸(C18:2 ω -6)和 α -亚麻酸(C18:3 ω -6)。其中亚油酸是 γ -亚麻酸和花生四烯酸的前体物质;而 α -亚麻酸是重要的 ω -3多不饱和脂肪酸,可进一步转化为超长链多不饱和脂肪酸二十碳五烯酸(EPA, C20:5 ω -3)和二十二碳六烯酸(DHA, C22:6 ω -3)。此外,Nzayisenga等^[24]研究发现,链带藻(*Desmodesmus* sp.)和斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)中的脂肪酸含量与光照强度呈正相关,这与本研究所观察到的现象一致。这可能是因为高光

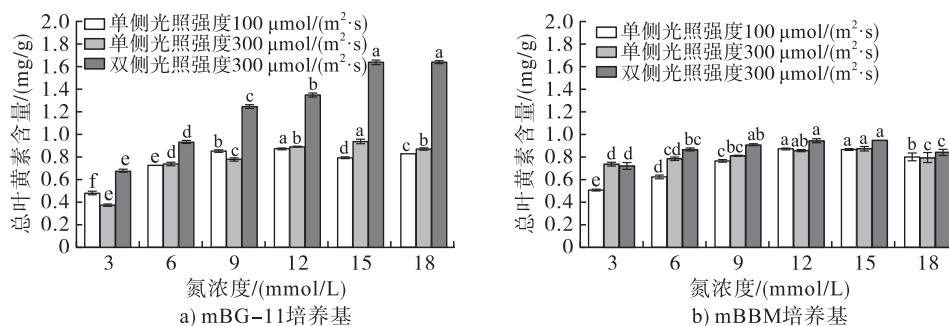


图6 光照强度、培养基和初始氮浓度对克里藻总叶黄素的影响

由图6可以看出:以mBG-11培养基培养时,克里藻细胞内总叶黄素含量在双侧光照强度300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和初始氮浓度15 mmol/L时达到最高,为1.64 mg/g;以mBBM培养基培养时,克里藻细胞内总叶黄素含量在双侧光照强度300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和初始氮浓度15 mmol/L时达到最高,为0.94 mg/g。因此,最有利于克里藻积累叶黄素的培养条件是双侧光照强度300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、初始氮浓度15 mmol/L和mBG-11培养基。在本研究中高光照强度有利于克里藻JNU41细胞中叶黄素的积累,可能是因为高光照强度可以提高番茄红素 β -环化酶基因的表达水平^[29],该基因是微藻中类胡萝卜素积累的关键酶。此外,Coesel等^[30]也提出,强光胁迫可以调节植物八氢番茄红素合酶和去饱和酶的活性。

3 结论

在改良的BBM(mBBM)培养基、双侧光照强度300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、初始氮浓度6 mmol/L条件下,克里藻的生物量和总脂产率最高,分别为8.38 g/L[此时单位体积生物量为558.67 mg/(L·d)]和281.71 mg/(L·d);而在改良的BG-11(mBG-11)培养基、双侧光照强度300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、初始氮浓度3 mmol/L条件下,总脂和总脂肪酸含量最高,分别为55.12%和47.10%。克里藻的主要脂肪酸成分为棕榈酸、油酸、亚油酸和亚麻酸,其中亚油酸

照强度下,藻类通过将过量光同化物转化为脂肪酸来对抗光氧化,特别是多不饱和脂肪酸,如亚油酸、亚麻酸、EPA、DHA等^[28]。克里藻主要的脂肪酸为亚油酸,它在高光照强度下含量高于低光照强度下,同样也符合对抗光氧化的猜想。多不饱和脂肪酸对人和运动健康至关重要,因此克里藻可能成为生产亚油酸和 α -亚麻酸的潜力藻株。

2.2.5 对总叶黄素的影响

光照强度、培养基和初始氮浓度对克里藻总叶黄素的影响如图6所示。

为优势脂肪酸,其相对含量最高为65.87%。15 mmol/L的初始氮浓度有利于诱导叶黄素积累,其含量最高可达1.64 mg/g。克里藻是一种新型的产油丝状微藻,能够富集亚油酸、亚麻酸和叶黄素等高附加值产物,且丝状微藻具有易采收、易培养和易收获的性能,在生产高附加值营养保健品方面具有巨大应用前景,并适合进行生物燃料的生产。

参考文献:

- [1] DINESHBABU G, GOSWAMI G, KUMAR R, et al. Microalgae - nutritious, sustainable aqua - and animal feed source[J/OL]. J Funct Foods, 2019, 62: 103545[2022-07-06]. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103545>.
- [2] WANG H, GAO L, CHEN L, et al. Integration process of biodiesel production from filamentous oleaginous microalgae *Tribonema minus*[J]. Bioresour Technol, 2013, 142: 39-44.
- [3] SATPATI G G, PAL R. New and rare records of filamentous green algae from Indian Sundarbans Biosphere Reserve[J]. J Algal Biomass Utiln, 2016, 7(2): 159-175.
- [4] ZHANG W, ZHAO Y, CUI B, et al. Evaluation of filamentous green algae as feedstocks for biofuel production[J]. Bioresour Technol, 2016, 220: 407-413.
- [5] SINGH S P, SING P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review[J]. Renew Sust Energ Rev, 2015, 50: 431-444.
- [6] SFORZA E, SIMIONATO D, GIACOMETTI G M, et al.

- Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38975 [2002-07-06]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038975>.
- [7] 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.
- [8] AL-QASMI M, RAUT N, TALEBI S, et al. A review of effect of light on microalgae growth[C]//Proceedings of the World Congress on Engineering. London:WCE, 2012.
- [9] JUNEJA A, CEBALLOS R M, MURTHY G S. 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.
- [10] GUO F, WANG H, WANG J, et al. Special biochemical responses to nitrogen deprivation of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema* sp. [J]. *Bioresour Technol*, 2014, 158: 19-24.
- [11] 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]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2005, 1738(1/2/3): 63-71.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] GAO B, YANG J, LEI X, et al. Characterization of cell structural change, growth, lipid accumulation, and pigment profile of a novel oleaginous microalga, *Vischeria stellata* (Eustigmatophyceae), cultured with different initial nitrate supplies[J]. *J Appl Phys*, 2016, 28(2): 821-830.
- [15] MIKHAILYUK T, GLASER K, HOLZINGER A, et al. Biodiversity of *Klebsormidium* (Streptophyta) from alpine biological soil crusts (Alps, Tyrol, Austria, and Italy) [J]. *J Phycol*, 2015, 51(4): 750-767.
- [16] 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.
- [17] KARSTEN U, HOLZINGER A. Light, temperature, and desiccation effects on photosynthetic activity, and drought-induced ultrastructural changes in the green Alga *Klebsormidium dissectum* (Streptophyta) from a high alpine soil crust[J]. *Microb Ecol*, 2012, 63(1): 51-63.
- [18] KARSTEN U, LÜTZ C, HOLZINGER A. Ecophysiological performance of the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium crenulatum* (Charophyceae, Streptophyta) isolated from an alpine soil crust with an emphasis on desiccation stress[J]. *J Phycol*, 2010, 46(6): 1187-1197.
- [19] HE Q, YANG H, WU L, et al. Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae[J]. *Bioresour Technol*, 2015, 191: 219-228.
- [20] RUANGSOMBOON 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]. *Bioresour Technol*, 2012, 109: 261-265.
- [21] NZAYISENGA J C, FARGE X, GROLL S L, et al. Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater [J/OL]. *Biotechnol Biofuels*, 2020, 13: 4 [2022-07-06]. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1646-x>.
- [22] FENG P, DENG Z, FAN L, et al. Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations [J]. *J Biosci Bioeng*, 2012, 114(4): 405-410.
- [23] GUO F, WANG H, WANG J, et al. Special biochemical responses to nitrogen deprivation of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema* sp. [J]. *Bioresour Technol*, 2014, 158: 19-24.
- [24] MURTHY G S, CEBALLOS R M, JUNEJA A. 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.
- [25] HO S H, CHEN C Y, CHANG J S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N [J]. *Bioresour Technol*, 2012, 113: 244-252.
- [26] GRIFFITHS M J, HARRISON S T L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production[J]. *J Appl Phycol*, 2009, 21(5): 493-507.
- [27] BONA F, CAPUZZO A, FRANCHINO M, et al. Semicontinuous nitrogen limitation as convenient operation strategy to maximize fatty acid production in *Neochloris oleoabundans*[J]. *Algal Res*, 2014, 5: 1-6.

- [8] SARMA U P, BHETARIA P J, DEVI P, et al. Aflatoxins: Implications on health[J]. *Indian J Clin Biochem*, 2017, 32(2): 124 – 133.
- [9] 陈毅保, 杨趁仙, 刘昆仑, 等. 黄曲霉毒素 AFB₁ 的脱除及其机制研究进展[J/OL]. *中国油脂*, 2022: 1 – 15 [2022 – 10 – 25]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1099.TS.20220615.1127.012.html>.
- [10] KHANAFARI A, SOUDI H, MIRABOULFATHI M. Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B₁ production in corn[J]. *Iran J Environ Health Sci Eng*, 2007, 4(3): 163 – 168.
- [11] 阴佳璐, 唐语谦, 任杰, 等. 浑浊红球菌 PD630 对黄曲霉毒素 B₁ 的生物降解特性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2020, 31(2): 39 – 46.
- [12] 张文双, 孟宇飞, 胡申才. 黄曲霉毒素 B₁ 降解菌的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. *中国酿造*, 2022, 41(8): 143 – 148.
- [13] 刘亚楠, 彭丹丹, 王敏, 等. 枯草芽孢杆菌 Q125 降解黄曲霉毒素 B₁ 发酵条件优化及活性物质分析[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2021, 42(4): 9 – 15.
- [14] 刘畅, 马现永, 马三梅, 等. 降解黄曲霉毒素 B₁ 的乳酸片球菌重组多铜氧化酶学性质[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(13): 72 – 78.
- [15] 董慧燕, 许艳华, 牛永武, 等. 铜绿假单胞菌 M4 菌株降解黄曲霉毒素 B₁ 的条件优化研究[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2021, 42(3): 50 – 57.
- [16] 孙丰芹. 固态发酵法去除花生粕中的黄曲霉毒素 B₁ [D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2010.
- [17] 张杨杨. 降解黄曲霉毒素 B₁ 解淀粉芽孢杆菌的筛选及其毒素降解活性产物分析[D]. 郑州: 河南农业大学, 2021.
- [18] 邓盾, 唐嘉虹, 王永飞, 等. AFB₁ 降解菌的分离鉴定、降解条件优化及降解产物毒性评估[J]. *南方农业学报*, 2022, 53(3): 596 – 606.
- [19] 徐阳. 黄曲霉毒素 B₁ 降解菌株的筛选及其活性酶的纯化[D]. 南京: 南京理工大学, 2019.
- [20] 于丽娜, 王明清, 张初署, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 降解菌株的筛选及鉴定研究[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(21): 167 – 171.
- [21] 谢澳文, 樊磊, 韩一鸣, 等. 降解 AFB₁ 的克雷伯氏菌分离、鉴定及降解机理初步研究[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2021, 42(2): 64 – 70.
- [22] 郭钰婷. 黄曲霉毒素 B₁ 降解菌的筛选及其降解特性研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2020.
- [23] 李超波, 李文明, 杨文华, 等. 降解黄曲霉毒素微生物筛选中降解与吸附结合作用的区分[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(5): 17 – 21.
- [24] ADEBO O A, NJOBEH P B, SIDU S, et al. Aflatoxin B₁ degradation by liquid cultures and lysates of three bacterial strains[J]. *Int J Food Microbiol*, 2016, 233: 11 – 19.
- [25] LI J, HUANG J, JIN Y, et al. Aflatoxin B₁ degradation by salt tolerant *Tetragenococcus halophilus* CGMCC 3792 [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 121: 430 – 436.
- [26] SANGARE L, ZHAO Y, FOLLY Y M E, et al. Aflatoxin B₁ degradation by a *Pseudomonas* strain [J]. *Toxins*, 2014, 6(10): 3028 – 3040.

(上接第 113 页)

- [28] JAHANGEER M, MAHMOOD Z, MASHOOQ A, et al. Comparative assessment of biomedical and nutritional status of dry fruits: A review[J]. *Life Sci J Pakistan*, 2019, 1(1): 24 – 33.
- [29] RAMOS A, COESEL S, MARQUES A, et al. Isolation and characterization of a stress – inducible *Dunaliella salina* Lcy – β gene encoding a functional lycopene β – cyclase[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79(5): 819 – 828.
- [30] COESEL S N, BAUMGARTNER A C, TELES L M, et al. Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for psy and pds steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress[J]. *Mar Biotechnol*, 2008, 10(5): 602 – 611.