

温度和光径对微绿球藻生长及营养成分含量的影响

杜晓凤, 邹宁, 孙东红, 常林, 赵萍

(鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘要: 研究了温度和光生物反应器的光径对微绿球藻(*Nannochloropsis oculata* Hibberd)生长及细胞内几种营养成分含量的影响。结果表明, 温度对微绿球藻的生长有显著影响($P<0.05$), 对几种营养成分的含量有极显著影响($P<0.01$), 在 28℃ 的培养条件下, 细胞生长速度最快, 此时蛋白质含量最高, 为 5.66%, 多糖含量最低, 仅为 1.47%, 但最大生物产量却是在 30℃ 的条件下获得, 总脂与叶绿素 a 的含量随温度的升高而降低, 类胡萝卜素含量随温度升高而增大。光生物反应器的光径对微绿球藻的生长和总脂、可溶性蛋白、色素的含量有极显著影响($P<0.01$), 对多糖含量有显著影响($P<0.05$), 比生长速率、最高细胞密度和单位体积产量均随光径的增大而减小, 单位面积产量随光径的增大而增大; 总脂、可溶性蛋白和多糖的含量随光径的增大而降低, 叶绿素和类胡萝卜素含量随光径增大而增大, 类胡萝卜素含量的增大趋势比叶绿素更明显。

关键词: 微绿球藻(*Nannochloropsis oculata* Hibberd); 温度; 光径; 蛋白质; 多糖; 总脂; 色素

中图分类号: Q949.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2014)04-0050-05

doi: 10.11759/hyxx20120419002

微绿球藻是一种海洋单胞藻, 呈球形, 其细胞壁极薄, 易于消化吸收, 加上其易培养、繁殖迅速、营养丰富等特点, 是泥蚶、蟹、虾等幼苗及轮虫的优良饵料, 在水产养殖中应用较为广泛。微绿球藻细胞含有极丰富的二十碳五烯酸(EPA)、蛋白质、多糖等物质, 是健康食品和药品的重要资源之一^[1]。

目前国内外对微绿球藻的研究多集中在藻的培养工艺^[2-3]、分子系统学^[4]及环境因子对脂肪酸组成及含量^[5-7]的影响等方面, 对其培养条件的研究多集中在光照^[8]、温度^[6, 9-10]、氮源及氮浓度^[11-14]、pH^[15]等方面。本研究所用反应器为自行研制的气升式平板光生物反应器, 与传统反应器相比, 能有效防止污染, 实现高密度纯种培养, 还可以增加光照面积, 提高光能利用率。作者旨在研究温度和反应器的光径对微绿球藻生长状况的影响, 并分析了各营养成分的含量, 为今后平板光生物反应器的应用及微绿球藻的培养研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

微绿球藻(*Nannochloropsis oculata* Hibberd)藻种由鲁东大学生命科学学院藻类研究所提供。

1.2 培养方法及培养条件

采用气升式平板光生物反应器, 反应器底部安

装由玻璃条固定的多孔通气管, 向反应器内通入空气。将反应器和通气管洗净, 加满自来水, 然后按 1 mL/L 的量加入次氯酸, 灭菌 24 h 后, 将自来水倒出, 加入灭菌的培养基和海水, 培养所用海水取自自然海水, 过滤灭菌后使用, 培养基配方参见邹宁等^[16]。同时接入相同的藻种, 控制接入后的藻种密度相同或接近, 同时在自然光、室温下进行培养, 培养基的初始 pH 为 8.0。

1.3 实验方法

1.3.1 实验梯度设置

温度对微绿球藻影响: 选用光径为 5cm 的反应器, 用碘钨灯做光源, 控制光照强度约为 5000 lx, 光周期 L:D 为 10:14, 在碘钨灯与反应器之间放置加满水的空白反应器降温, 控制温度梯度为: 20、25、28、30、32℃, 每组设置 3 个平行。

光径对微绿球藻的影响: 选取光径分别为 5、10、15、20cm 且长度和高度均相同的 4 组反应器, 每组 3 个平行, 培养过程测得光照强度为: 1300~31000 lx, 白天温度为 23~30℃。

收稿日期: 2013-06-12; 修回日期: 2014-02-18

作者简介: 杜晓凤(1985-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 研究方向: 藻类细胞培养及活性物质的提取, 电话: 15589528961, E-mail: efeng000999@163.com; 邹宁, 通信作者, E-mail: ningzou76@126.com

1.3.2 生长测定方法

每天上午 9:00~10:00 取样, 用紫外分光光度计测定藻液在波长 660 nm 处的吸光值, 用血球计数板计数细胞密度。生长计算公式为: 比生长速率 $\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)^{[17]}$, 其中 N_2 为试验刚进入稳定期的细胞数目, N_1 为试验刚进入对数期的细胞数目, t_2 为试验刚进入稳定期的时间, t_1 为试验刚进入对数期的时间。

1.3.3 微藻的采收

采收处于稳定期的藻液, 用大型离心机离心, 3 000 r/min 离心 30 min, 藻泥用去离子水洗 2~3 次, 一部分制成藻泥于冰箱中冷藏保存, 用于测定色素含量; 一部分于电热鼓风干燥箱中 65℃ 烘干至恒重, 将烘干的藻粉置于干燥皿中待用。

1.3.4 总脂含量的测定

准确称取 0.15g ± 0.01g 藻粉于具塞试管中, 加入 1 mL 蒸馏水, 在混匀器上混匀后, 置于-20℃ 冰箱中反复冻融 3 次。加入 5mL 工业酒精, 混匀后在室温下提取 3 h, 将上清液移入离心管中, 加入适量高效活性白土, 于摇床上充分摇匀脱色, 6000 r/min 离心 5 min, 收集上清于恒重的称量瓶中, 残渣返回试管内重复提取 2 次, 合并上清, 将上清于旋转蒸发器中去除提取剂, 称质量, 计算油脂含量。

油脂含量 = (油脂质量 / 藻粉质量) × 100%

1.3.5 可溶性蛋白含量的测定

准确称取 0.15g ± 0.01g 藻粉于 5mL 离心管中, 加入 2 mL 蒸馏水, 在混匀器上混匀后, 置于-20℃ 冰箱中反复冻融 3 次, 再加入 2 mL 蒸馏水, 离心收集上清, 残渣加适量蒸馏水重复离心, 合并上清液, 定容到 50 mL, 每组采用 3 个平行。采用考马斯亮蓝法测定蛋白含量^[18]。

1.3.6 可溶性多糖含量的测定

准确称取 0.15 g ± 0.01 g 藻粉于 5 mL 离心管中, 加入 2 mL 蒸馏水, 在快速混匀器上混匀后, 置于-20℃ 冰箱中反复冻融 3 次, 再加入 2 mL 蒸馏水, 离

心收集上清; 残渣加适量蒸馏水, 于沸水浴中加热 3 h, 离心收集上清。合并上清液并定容到 50mL, 每组采用 3 个平行。采用蒽酮法测定多糖的含量^[19]。

1.3.7 色素含量的测定

准确称取 0.15 g ± 0.01 g 藻粉于具塞试管中, 加入 1 mL 蒸馏水, 在混匀器上混匀后, 置于-20℃ 冰箱中反复冻融 3 次。加入 5 mL 80% 的丙酮, 混匀后置于 4℃ 冰箱内提取 3 h 以上, 上清倒入 5 mL 离心管中离心, 取上清; 残渣倒入原试管中, 再加 5 mL 80% 丙酮提取 3h 以上, 离心合并上清, 于 25 mL 容量瓶中定容。用 Arnon 法测定色素含量^[20]。

1.3.8 数据处理

实验数据采用 SPSS16.0 软件进行分析, 以 $P < 0.05$ 为显著性差异, 以 $P < 0.01$ 为极显著差异。

2 结果与分析

2.1 温度对微绿球藻生长及营养成分含量的影响

2.1.1 温度对微绿球藻生长的影响

温度对微绿球藻的生长有显著影响 ($P < 0.05$), 如表 1 所示, 在适宜的温度条件下, 微绿球藻生长迅速, 30℃ 实验组的比生长速率最高, 其次为 28℃ 和 32℃ 实验组, 3 组间差异不显著; 最高细胞密度随温度的升高先升高后降低, 30℃ 实验组最高, 32℃ 实验组次之, 2 组间差异不显著。单位面积产量和单位体积产量都随温度的升高先升高后降低, 在 30℃ 时达到最高, 最高值分别为 1.988 g/(m²·d) 和 39.598 mg/(m²·d), 这与比生长速率 μ 和最高细胞密度的变化趋势一致。可粗略得出微绿球藻的最适生长温度为 28~32℃。

2.1.2 温度对微绿球藻营养成分含量的影响

温度是影响微藻脂肪含量的重要因子之一, 温度降低时藻细胞内不饱和脂肪酸含量增加, 饱和脂肪酸含量减小^[10, 21]。温度对总脂含量有极显著影响 ($P < 0.01$), 由表 2 可以看出, 在 20~32℃ 的温度范围

表 1 温度对微绿球藻生长的影响

Tab.1 Effect of temperature on the growth rate of *N. oculata*

温度(℃)	比生长速率 μ	最高细胞密度(×10 ⁷ 个 /mL)	单位面积产量(g/(m ² ·d))	单位体积产量(mg/(L·d))
20	0.095±0.005 a	6.063±0.034 a	1.517±0.092 a	30.451±1.164 a
25	0.101±0.004 a	6.125±0.024 a	1.640±0.061 b	32.569±0.942 b
28	0.169±0.005 b	6.210±0.031 b	1.694±0.077 c	33.677±1.836 c
30	0.241±0.006 b	6.475±0.023 c	1.988±0.074 d	39.598±1.009 d
32	0.143±0.006 b	6.420±0.019 c	1.768±0.078 e	35.158±1.651 e

注: 表中同列不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 以下表同

表 2 温度对微绿球藻可溶性蛋白、多糖、色素含量的影响

Tab.2 Effect of temperature on the lipid, soluble protein, polysaccharide and pigments contents of *N. oculata*

温度(℃)	总脂(%)	可溶性蛋白(%)	多糖(%)	叶绿素 a(%)	类胡萝卜素(%)
20	34.72±0.664 a	1.64±0.121 a	3.47±0.267 a	0.43±0.055 a	0.52±0.033 a
25	30.61±0.927 b	3.80±0.166 b	2.94±0.136 b	0.28±0.025 b	0.80±0.046 b
28	27.09±0.379 c	5.66±0.178 c	1.47±0.122 c	0.21±0.037 c	0.86±0.025 b
30	24.28±0.827 d	2.81±0.122 d	1.81±0.104 d	0.19±0.021 c	0.97±0.051 c
32	10.84±1.335 e	1.97±0.137 e	3.81±0.171 e	0.09±0.029 d	1.27±0.036 d

内,随着温度的升高,微绿球藻细胞内的总脂含量呈下降趋势。James等^[22]报道微绿球藻在 35℃ 下生长时, EPA 的含量比在 25℃ 和 30℃ 时减少 4%; 温度对可溶性蛋白和多糖含量有极显著影响($P<0.01$), 随着温度的升高,可溶性蛋白含量先升高后降低,在 28℃ 条件下达到最高值,与此相反,多糖含量先下降后升高,在 28℃ 条件下达到最低。可能是由于在适宜的温度条件下,细胞生长迅速,合成了大量的蛋白,此时消耗大量的能量,造成多糖含量减小; 温度对微绿球藻叶绿素和类胡萝卜素的含量有极显著影响($P<0.01$), 叶绿素含量随着温度的升高而减小,类胡萝卜素的含量随着温度的升高而增大。

2.2 反应器的光径对微绿球藻生长及营养成分含量的影响

2.2.1 光径对微绿球藻生长的影响

采用光生物反应器对微绿球藻进行高密度培养,通过实验得出,反应器的光径对微绿球藻生长的影响如表 3 所示。

通过方差分析和多重比较可知,反应器的光径对微绿球藻生长的影响极显著($P<0.01$)。微绿球藻在 5~20 cm 的光径范围内均能正常生长,细胞密度与光径成反比。光径越大,反应器内部的细胞接受到的有效光源越少,不能充分的进行光合作用,光合产物少,细胞生长慢。

如表 1 所示,比生长速率与最高细胞密度均与光径成反比。反应器的光径越小,细胞的生长速率越高^[23]。随着光径的增大,单位面积产量几乎呈直线上

升,从 5 cm 的 1.931 g/(m²·d) 上升到 20 cm 的 3.354 g/(m²·d)。与此相反,单位体积产量随着光径的增大而降低,从 5 cm 的 38.611 mg/(L·d) 下降到 20 cm 的 17.272 mg/(L·d),单位体积产量降了 2 倍多。

2.2.2 光径对微绿球藻细胞中营养成分含量的影响

光径对油脂积累有极显著影响($P<0.01$),由表 4 可以看出,微绿球藻细胞内总脂含量与光径成反比,5 cm 光径实验组的总脂含量显著高于其他组。在短光径平板反应器中培养微绿球藻,可以大幅提高 EPA 的含量^[24]。光径对可溶性蛋白含量有极显著影响($P<0.01$),对多糖含量有显著影响($P<0.05$),可溶性蛋白和多糖含量均随着光径的增大而减小,可知短光径的光生物反应器,不仅有利于增大细胞密度,还有利于有机物物质的积累。光径对微绿球藻叶绿素和类胡萝卜素的含量有极显著影响($P<0.01$),叶绿素和类胡萝卜素的含量均随着光径的增大而增大。在 5 cm 和 10 cm 光径条件下,类胡萝卜素的含量高于叶绿素的含量,且光径越小,高出的比例越大,这与 Zou^[25]的研究结果一致;在 15 cm 和 20 cm 的光径条件下,叶绿素含量高于类胡萝卜素的含量,且光径越大,高出的比例越大。

3 结论

温度对微绿球藻的生长有显著影响,反应器的光径有极显著影响。微绿球藻只有在适宜的温度条件下才能生长旺盛和积累有机物。而光径影响细胞接受到的有效光源,靠近光生物反应器表面区域内

表 3 光径对微绿球藻生长的影响

Tab.3 Effect of optical paths on the growth rate of *N. oculata*

光径(cm)	比生长速率 μ	最高细胞密度($\times 10^7$ 个/mL)	单位面积产量(g/(m ² ·d))	单位体积产量(mg/(L·d))
5	0.282±0.002 a	7.62±0.356 a	1.931±0.112 a	38.611±1.507 a
10	0.262±0.003 b	6.13±0.464 b	2.48±0.131 b	24.802±1.831 b
15	0.253±0.002 bc	5.16±0.366 c	3.038±0.143 c	20.252±1.703 c
20	0.251±0.002 c	3.90±0.325 d	3.454±0.105 d	17.272±1.405 d

表 4 子光径对微绿球藻总脂、可溶性蛋白、多糖、色素含量的影响

Tab.4 Effect of optical paths on the lipid, soluble protein, polysaccharide and pigments contents of *N. oculata*

光径(cm)	总脂(%)	可溶性蛋白(%)	多糖(%)	叶绿素 a(%)	类胡萝卜素(%)
5	32.95±1.095 a	23.62±0.526 a	3.23±0.626 a	1.04±0.084 a	1.72±0.121 a
10	22.71±1.647 b	18.97±1.245 b	2.89±0.366 b	1.43±0.126 b	1.99±0.146 b
15	16.91±1.264 c	15.19±0.836 c	2.32±0.456 c	2.61±0.152 c	2.34±0.096 c
20	16.00±0.859 c	10.23±0.615 d	2.20±0.271 d	3.72±0.091 d	2.52±0.102 d

的藻细胞才能接受到有效的光源, 光径小的反应器, 表面积体积比大, 光暗循环周期短, 光合作用效率高, 积累的蛋白质、多糖和总脂的含量高, 但较强光照对色素有一定破坏作用, 所以色素含量较低; 在相同的表面积下, 藻细胞数目与反应器的光径成正比, 所以单位面积产量随着光径的增大而增高^[26-27]。

参考文献:

- [1] 赵大显, 周志刚. 微绿球藻 DNA 质粒文库的构建[J]. 海洋科学, 2006, 30(5): 87-91.
- [2] Xu F, Hu H H, Cong W, et al. Growth characteristics and eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. in mixotrophic conditions [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(1): 51-53.
- [3] Liliana R, Graziella C Z, Laura B, et al. Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation[J]. Biomolecular Engineering, 2003, 20(4-6): 243-248.
- [4] Shoichiro S, Mika A, Hideaki M. Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanic* sp. nov. (Eustigmatophyceae) [J]. Phycologia, 2002, 41(3): 273-279.
- [5] 蒋霞敏, 郑亦周. 14 种微藻总脂含量和脂肪酸组成研究[J]. 水生生物学报, 2003, 27(3): 243-247.
- [6] 周洪琪, 易翠平, 丁卓平, 等. 环境因子对青岛大扁藻、亚心形扁藻、微绿球藻脂肪酸组成的影响[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2001, 20(Supplement): 112-117.
- [7] 魏东, 张学成, 邹立红, 等. 细胞生长时期对两种海洋微藻总脂含量和脂肪酸组成的影响[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(3): 503-509.
- [8] 杜晓凤, 邹宁, 孙东红, 等. 光照强度对微绿球藻生长及有机质积累的影响[J]. 生物过程, 2011, 1(2): 18-21.
- [9] 张海琪, 蒋霞敏, 潘双叶, 等. 光照、温度、碳源及接种密度对微绿球藻生长的影响[J]. 河北渔业, 2001, (1): 9-13.
- [10] Susan M R, Luong-Van T, George L, et al. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures[J]. Aquaculture, 2002, 211(1-4): 195-214.
- [11] 魏东, 张学成, 隋正红, 等. 氮源和 N/P 对眼点拟微绿球藻的生长、总脂含量和脂肪酸组成的影响[J]. 海洋科学, 2000, 24(7): 46-51.
- [12] 潘庭双, 胡贤江, 侯冠军, 等. 氮对微绿球藻生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2001, 29(4): 548-555.
- [13] 蒋霞敏. 温度、光照、氮含量对微绿球藻生长及脂肪酸组成的影响[J]. 海洋科学, 2002, 26(8): 9-13.
- [14] 黄旭雄, 周洪琪, 袁灿东, 等. 氮源及浓度对微绿球藻营养价值的影响[J]. 上海水产大学学报, 2003, 12(2): 113-116.
- [15] 王秀良, 刘晨临, 张学成. pH 对眼点拟微绿球藻的生长、总脂含量及脂肪酸组成的影响[J]. 海洋科学, 2002, 26(5): 63-67.
- [16] 邹宁, 孙东红, 韩亚香. CO₂ 对牟氏角毛藻高密度培养的影响[J]. 生物工程学报, 2005, 21(5): 844-847.
- [17] S. John P. Principles of microbes and cell cultivation[M]. New York: Blackwell Scientific Publications, 1975: 260-268.
- [18] 丛峰松. 生物化学实验[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2005.
- [19] 张志良. 植物生理学实验指导(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 160-162.
- [20] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导(第二版)[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2006: 81-84.
- [21] Daniel V L, Guy A T. Low temperature-Induced alterations in the chloroplast and microsomal membranes of *dunaliella salina*[J]. Plant Physiology, 1982, 69(6): 13.
- [22] James C M, Al-Hinty S, Salman A E. Growth and

- fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes[J]. *Aquaculture*, 1989, 77(4): 337-351.
- [23] Amos R, Zou N. Efficient utilisation of high photon irradiance for mass production of photoautotrophic micro-organisms[J]. *Journal of Applied Phycology*, 1999, 11(1): 123-127.
- [24] Zou N, Zhang C W, Zvi Cohen et al. Production of cell mass and eicosapentaenoic acid (EPA) in ultrahigh cell density cultures of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae)[J]. *European Journal of Phycology*, 2000, 35(2): 127-133.
- [25] Zou N, Amos R. Light-path length and population density in photoacclimation of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2000, 12(3-5): 349-354.
- [26] Zou N, Amos R. Effect of light-path length in outdoor flat plate reactors on output rate of cell mass and of EPA in *Nannochloropsis* sp.[J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 70(1-3): 351-356.
- [27] Qiang H, Yair Z, Amos R. Combined effects of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria)[J]. *European Journal of Phycology* 1998, 33(2): 165-171.

Effect of temperature and optical path on growth rate and accumulation of nutrients of *Nannochloropsis* sp.

DU Xiao-feng, ZOU Ning, SUN Dong-hong, CHANG Lin, ZHAO Ping
(College of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China)

Received: Jun., 12, 2013

Key words: *Nannochloropsis* sp.; temperature; optical path; protein; polysaccharide; lipid; pigments

Abstract: The effect of temperature and optical path of flat plate glass reactors on growth rate and organics contents of *Nannochloropsis* sp. was investigated, using a range of optical paths from 5 to 20 cm. The results showed that the temperature had a significant effect on the growth of *Nannochloropsis* ($P < 0.05$), and a very significant effect on the contents of nutrients ($P < 0.01$). The cell growth had a highest speed at 28 °C, when the content of soluble protein reached the maximum and that of polysaccharides reached the minimum. The biomass yield reached the maximum at 30 °C. The contents of lipid and chlorophyll decreased with the increase of temperature, while the content of carotenoid increased with the increase of temperature. The optical path of photobioreactors had a very significant effect on the growth of *Nannochloropsis* ($P < 0.01$). Specific growth rate, maximal cell density (10^7 cell/mL) and yield per unit volume ($\text{mg}/(\text{L} \cdot \text{d})$) decreased with increase in optical path. Yield per unit area ($\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$) increased with increased optical path. The contents of lipid, soluble protein, and polysaccharides decreased with increased optical path, but the contents of chlorophyll and carotenoid increased with increased optical path. The increase trend of carotenoids was more obvious than that of chlorophyll. In summary, the optimal optical path determines the optimal culture density, as well as yield per unit volume and the productivity of organics. Under our conditions the optimal optical path for culturing *Nannochloropsis* to accumulate lipid, protein and polysaccharide in plate reactors was 5 cm, the optimal optical path for accumulating pigments was 20 cm.

(本文编辑: 梁德海)