

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2016.20289

何思思, 高保燕, 黄罗冬, 李爱芬, 张成武. 不同培养模式下魏氏真眼点藻生长和产油特性的研究[J]. 植物科学学报, 2016, 34(2): 289~298

He SS, Gao BY, Huang LD, Li AF, Zhang CW. Growth and oil-production characteristics of *Eustigmatos vischeri* Hibberd under different cultivation modes[J]. Plant Science Journal, 2016, 34(2): 289~298

# 不同培养模式下魏氏真眼点藻生长和产油特性的研究

何思思, 高保燕, 黄罗冬, 李爱芬, 张成武\*

(暨南大学水生生物研究中心, 生态学系, 广州 510632)

**摘要:** 为了解魏氏真眼点藻(*Eustigmatos vischeri* Hibberd)的生物学特性, 探究“批量法”、“两步法”、“补料法”和“添加碳酸氢盐”4种不同培养模式对魏氏真眼点藻生长和油脂积累的影响, 本文分别采用不同初始浓度的硝酸钠供应、更换培养基、分次少量补加硝酸钠及添加低浓度  $\text{NaHCO}_3$  或  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  等方法培养魏氏真眼点藻。结果显示, “批量”培养下, 硝酸钠浓度为 3.0 mmol/L 时藻细胞生物量达到 8.41 g/L, 油脂最高可达到 65.16%, 油脂产率为  $0.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。“两步法”和“补料法”培养对藻细胞油脂积累没有显著影响, 而通过“添加碳酸氢盐”培养对该藻细胞生长和油脂积累的效果最显著, 其中  $\text{NaNO}_3 + \text{NH}_4\text{HCO}_3$  组生物量达到 11.56 g/L, 油脂最高达 60.92%, 与相同氮浓度“批量”培养相比, 生物质浓度提高了 1.0 g/L, 总脂含量提高了 10%, 大大提高了该藻的总脂产率(达到  $0.39 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )。因此, 魏氏真眼点藻是一株高产油藻株, 当添加低浓度碳酸氢铵时最有利于促进该藻生物质浓度和总脂含量的提高, 这是一种最佳的培养模式, 具有潜在的开发和利用价值。

**关键词:** 魏氏真眼点藻; 培养模式; 生物质浓度; 总脂产率; 碳酸氢盐

中图分类号: Q947; Q949.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2016)02-0289-10

## Growth and Oil-production Characteristics of *Eustigmatos vischeri* Hibberd under Different Cultivation Modes

HE Si-Si, GAO Bao-Yan, HUANG Luo-Dong, LI Ai-Fen, ZHANG Cheng-Wu\*

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

**Abstract:** We investigated the biological characteristics of the alga *Eustigmatos vischeri* Hibberd, and explored the effects of four cultivation modes (batch, two-stage, fed-batch and bicarbonate-addition culture) on its growth and lipid accumulation. We cultured *E. vischeri* by supplying different initial sodium nitrate, which was replaced with fresh medium, with a small amount of sodium nitrate and low concentrations of sodium bicarbonate or ammonium bicarbonate added. The biomass concentration in the batch culture reached 8.41 g/L, while the highest total lipid content was 65.16% and productivity was  $0.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Compared to the batch culture, the two-stage and fed-batch cultures had no significant effect on lipid accumulation in *E. vischeri*. However, the bicarbonate-addition culture did have a significant

收稿日期: 2015-09-18, 退修日期: 2015-10-27。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170337); 国家高技术研究发展计划“863”项目(2013AA065805); 广东省低碳专项(2011-051); 珠海市科技重大项目(PB20041018); 珠海市科技攻关项目(PC20081008)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31170337), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2013AA065805), Special Program for Low-Carbon, Reform and Development Commission of Guangdong Province (2011-051), Major Scientific and Technical Program of Zhuhai City (PB20041018), and Scientific and Technical R &amp; D Program of Zhuhai City (PC20081008).

作者简介: 何思思(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为微藻生物技术和分子生物学(E-mail: zjhesisi@163.com)。

\* 通讯作者(Author for correspondence): 张成武(1963-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为微藻生物学和生物技术(E-mail: tzhangcw@jnu.edu.cn)。

effect on growth and lipid accumulation, especially maximum biomass concentration in the  $\text{NaNO}_3 + \text{NH}_4\text{HCO}_3$  group, which reached 11.56 g/L, and total lipid content reached 60.92%. Thus, the biomass concentration and total lipid content increased by almost 1.0 g/L and 10%, respectively, compared with that in the batch culture under the same nitrogen concentration. In addition, the productivity of total lipids also increased ( $0.39 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Our results indicated that *E. vischeri* is an oleaginous microalga with high development and utilization value. Moreover, the addition of a low concentration of ammonium bicarbonate promoted the growth and lipid accumulation of *E. vischeri*, and is thus a suitable method for cultivation.

**Key words:** *Eustigmatos vischeri* Hibberd; Cultivation modes; Biomass concentration; Productivity of total lipids; Bicarbonate

真眼点藻纲是 Hibberd 等<sup>[1]</sup> 1970 年根据其细胞学和超微结构特征从黄藻纲(Xanthophyceae)中分离出来而成立的一个新纲。该纲的藻类仅含有叶绿素 a, 主要的类胡萝卜素为堇菜黄素、无隔藻黄素和  $\beta$ -胡萝卜素<sup>[2]</sup>。该纲的大多数种类富含油脂, 均含有二十碳五烯酸(EPA), 可作为生产 EPA 和类胡萝卜素的潜在藻株和极具微藻生物能源开发潜力的藻种资源。

魏氏真眼点藻(*Eustigmatos vischeri* Hibberd)属于真眼点藻纲真眼点藻属(*Eustigmatos*)<sup>[2]</sup>。前期的研究发现<sup>[3]</sup>, 不同初始硝酸钠浓度培养条件下魏氏真眼点藻的生长、形态变化和油脂积累明显不同, 在高氮浓度(17.6 mmol/L)下生物质浓度可达到 9.14 g/L; 低氮条件(3.0 mmol/L)下生物质浓度达到 6.51 g/L, 油脂含量达到 60.81%。表明该藻是一株高产油藻株, 在高氮浓度下其生物质积累量较高, 总脂含量则随着氮浓度的降低而升高, 具有较高的研究和开发利用价值。

不同培养条件下藻细胞的生长存在较大的差异, 而目前有较多的研究主要集中在光照强度、温度、pH 值和盐度等环境因素对藻类细胞生长的影响<sup>[4]</sup>。为了进一步提高微藻油脂产率、降低生产成本, 应针对不同培养方式对微藻生长和代谢产物积累的影响进行深入研究。Procházková 等<sup>[5]</sup>认为, 通过改变培养基中的营养盐浓度或者采用不同的培养方式, 可以改变微藻生长及其细胞内脂类、多糖和色素等代谢产物的合成途径, 是一种较为快速、有效提高微藻生长和代谢产物积累的手段。

因此, 本研究利用不同氮浓度供应、更换培养基、补加氮源或添加低浓度  $\text{NaHCO}_3$  或  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  等方法, 测定魏氏真眼点藻不同培养条件下生物质

浓度、总脂含量和总脂产率等指标的变化规律, 比较“批量”、“两步法”、“补料法”和“添加碳酸氢盐”4 种培养模式对魏氏真眼点藻生长和油脂积累的影响, 旨在为获得微藻的优化培养方式和提高微藻油脂产率提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种

魏氏真眼点藻(*Eustigmatos vischeri* Hibberd Strain JNU4), 购自德国哥廷根大学藻种库, 由暨南大学水生生物研究中心微藻生物技术与生物能源实验室保藏。

### 1.2 主要仪器与试剂

仪器: 高速冷冻离心机(SORVALL biofuge)、紫外分光光度计(UV-2450)、冷冻干燥机(VirTis wizard 2.0)、氮吹仪(N-EVAP™111)、恒温磁力搅拌器(94-2 ThermoFinnigan)等。

试剂: 硝酸钠、碳酸氢钠、碳酸氢铵、二甲基亚砜、甲醇、乙醚、正己烷等试剂均为分析纯。

### 1.3 魏氏真眼点藻的培养

利用柱状光生物反应器( $\varnothing 3 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$ )培养藻细胞, 加富 1%  $\text{CO}_2$  的压缩空气,  $300 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  单侧连续光照, 培养温度控制在  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 初始接种浓度为  $\text{OD}_{750} = 0.55 \pm 0.02$ , 培养基为改良的 BG-11 培养基。培养周期为 18 d, 每天取样测定生物质浓度, 每 3 d 收集藻样冻干测定总脂含量, 每个实验组设置 3 个平行。

#### 1.3.1 “批量”培养

以硝酸钠为氮源, 设置 18.0、12.0、6.0、3.0 mmol/L 4 种初始浓度, 培养至第 18 d。

### 1.3.2 “两步法”培养

以硝酸钠为氮源, 设置 18.0、12.0、6.0、3.0 mmol/L 4 种初始浓度, 培养至对数中期(第 9 d)时, 离心弃出原培养基, 将藻细胞分别转入不含氮源的新鲜 BG-11 培养基中, 继续培养至第 18 d。

### 1.3.3 “补料法”培养

(1) 3.0 mmol/L 补氮组: 以 3.0 mmol/L 硝酸钠浓度为初始培养浓度, 每隔 3 d 向培养液中补加硝酸钠 3.0 mmol/L, 共补氮 5 次, 总共补加氮浓度为 18.0 mmol/L, 培养至第 18 d。

(2) 1.5 mmol/L 补氮组: 以 1.5 mmol/L 硝酸钠为初始浓度, 每隔 2 d 补加硝酸钠 1.5 mmol/L, 共补氮 7 次, 最终总氮浓度为 12.0 mmol/L, 培养至第 18 d。

### 1.3.4 “添加碳酸氢盐”培养

(1)  $\text{NaNO}_3 + \text{NH}_4\text{HCO}_3$  组: 先以 3.0 mmol/L 硝酸钠浓度作为初始培养浓度, 每隔 3 d 补加 3.0 mmol/L 硝酸钠, 补加 2 次后培养至第 9 d, 再向其中加入 3.0 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 总氮浓度仍为 12.0 mmol/L, 分别通空气和 1%  $\text{CO}_2$  两种通气方式培养至第 18 d。

(2)  $\text{NaNO}_3 + \text{NaHCO}_3$  组: 每隔 3 d 补加 3.0 mmol/L 硝酸钠, 补加 2 次后培养至第 9 d, 再加入 3.0 mmol/L  $\text{NaNO}_3$  和 25 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ , 维持总氮浓度在 12.0 mmol/L, 分别通空气和 1%  $\text{CO}_2$  培养至第 18 d。

(3) 以 3.0 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  作为初始氮源, 3.0 mmol/L + 3 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  组每隔 3 d 补加 3.0 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 共补加 3 次; 3.0 mmol/L + 1 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  组先每隔 3 d 补加 3.0 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 补加 2 次培养至第 9 d, 随后每隔 2 d 补加 1.0 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 共补加 3 次, 最终总氮浓度为 12.0 mmol/L。

### 1.4 pH 值测定

每天取少量“添加碳酸氢盐”培养模式下各个实验组的样品, 利用 pH 测试仪实时测定培养液的 pH 值。

### 1.5 生物质浓度的测定

每天取各个培养组的藻液 5 mL, 于 0.45  $\mu\text{m}$  混合纤维滤膜(预先烘至恒重)真空抽滤, 然后于 105℃ 烘箱中烘干至恒重。用单位体积藻样的干重

(dry cell weight, DCW) 表示, 即:

$$\text{DCW}(\text{g/L}) = 200 \times (W_2 - W_1)。$$

其中,  $W_1$  为混合纤维滤膜烘至恒重后的重量;  $W_2$  为滤膜和藻样烘至恒重后的总重量。

### 1.6 总脂含量的测定

每隔 3 d 取各个实验组一定体积的藻液, 3000 r/min 离心 5 min, 收集藻泥置于小塑料瓶中, 于冷冻干燥机中冷冻干燥。冻干的藻粉贮存在 4℃ 冰箱中备用。取适量冻干的藻粉, 按照 Khozin-Goldberg 等<sup>[6]</sup> 的方法并加以改良提取总脂。操作步骤为:

① 准确称取一定量的藻粉(记为  $M_0$ ), 置于预先放入转子的玻璃离心管中; ② 加入 2 mL 二甲基亚砜-甲醇混合液( $V:V = 1:9$ ), 50℃ 水浴搅拌 1.5 h, 再冰浴磁力搅拌 1.5 h, 3000 r/min 离心 3 min, 收集上清液; ③ 再向上述藻渣中加入 4 mL 乙醚-正己烷混合液( $V:V = 1:1$ ), 冰浴搅拌抽提 1.5 h, 3000 r/min 离心 3 min, 收集上清液; ④ 重复上述步骤, 直至藻渣提取完全, 变成白色或灰白色; ⑤ 合并所有上清液, 加入 4 mL 蒸馏水, 静置分层; ⑥ 将上层有机相浓缩转移至预先称重的 2 mL EP 管中, 用氮气完全吹干至不含有机溶剂, 称重, 于-20℃ 冰箱中保存备用。每个取样点设置 2 个平行, 利用差重法计算总脂的绝对含量(占藻粉干重的百分比), 计算公式为:

$$\text{总脂含量}(\% \text{ DCW}) = (M_2 - M_1)/M_0 \times 100\%。$$

其中,  $M_1$  为空 EP 管的重量;  $M_2$  为含总脂的 EP 管的总重量。

### 1.7 总脂产率的计算

单位体积总脂产率:  $P (\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}) = (m_t \times L_t)/t$ 。

其中,  $m_t$  为收获时藻的生物质浓度(g/L);  $L_t$  为收获时总脂含量(% DCW);  $t$  为培养时间(d)。

### 1.8 数据处理与分析

采用 Excel 和 Origin 8.6 对数据进行分析处理, 并用软件 SPSS 13.0 对数据进行单因素方差分析(Duncan 法),  $P < 0.05$  表示差异显著水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养方式下魏氏真眼点藻生物质浓度的时相变化

通过比较“批量”、“两步法”、“补料法”、

“添加碳酸氢盐”4 种培养模式下魏氏真眼点藻生物质浓度在培养周期内的变化情况可知, 以硝酸钠为初始氮源对魏氏真眼点藻进行“批量”培养(图 1: A), 在培养末期其生物质浓度获得最高值, 且随着氮源浓度的加大而升高的大小顺序为: 18.0 mmol/L 组 (10.69 g/L) > 12.0 mmol/L 组 (10.58 g/L) > 6.0 mmol/L 组 (10.56 g/L) > 3.0 mmol/L 组 (8.41 g/L)。单因素方差分析结果表明, 18.0 mmol/L 组、12.0 mmol/L 组和 6.0 mmol/L 组三者之间差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 但与 3.0 mmol/L 低氮组差异显著 ( $P < 0.05$ )。

与“批量”培养相比, “两步法”培养(图 1: B)通过更换培养基的方法, 在培养至第 9 d 后改用新无氮 BG-11 培养基进行培养, 此时藻细胞的生物质浓度先小幅下降、然后快速生长, 培养至第 18 d 时, 18.0 mmol/L 组和 12.0 mmol/L 组生长最快, 分别获得生物质浓度 10.82 g/L 和 10.79 g/L, 各浓度组与“批量”培养相比没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。

采用“补料法”培养的 3.0 mmol/L 补氮组和 1.5 mmol/L 补氮组的结果显示(图 1: C、D), 随着培养时间的推移和硝酸钠的不断补给, 3.0 mmol/L 补氮组藻细胞的生长逐渐趋向于 18.0 mmol/L 组, 至培养末期生物质浓度达到 10.30 g/L; 同样 1.5 mmol/L 补氮组与“批量”培养的 12.0 mmol/L 组接近, 最终生物质浓度达到 10.90 g/L。与“批量”培养相比, “补料法”培养对魏氏真眼点藻细胞生长的影响不显著 ( $P > 0.05$ )。

采用“添加碳酸氢盐”培养方式培养魏氏真眼点藻的结果显示(图 1: E、F), 各实验组生物质浓度间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 通  $\text{CO}_2$  培养的各组藻细胞生长显著快于通空气培养 ( $P < 0.01$ ), 且通  $\text{CO}_2$  培养中  $\text{NaNO}_3 + \text{NH}_4\text{HCO}_3$  组又显著快于  $\text{NaNO}_3 + \text{NaHCO}_3$  组 ( $P < 0.05$ ), 至第 18 d 时获得最高生物质浓度分别为 11.56 g/L 和 10.52 g/L (图 1: E)。其最高生物质浓度与“批量”培养相比提高了约 1.0 g/L。因此, 继续以 3.0 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  为初始氮源并结合补料法进行培养, 设置 3.0 mmol/L + 3 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  组和 3.0 mmol/L + 1.0 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  组进行实验, 结果显示(图 1: F), 随着培养时间的延长, 各组藻细胞呈快速生

长状态, 3.0 mmol/L + 1.0 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  组和 3.0 mmol/L + 3.0 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  组之间没有显著差异 ( $P > 0.05$ ), 最终生物质浓度分别达到 11.51 g/L 和 11.56 g/L, 并且高于 12.0 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  组 (10.57 g/L)。

综上分析可见, “添加碳酸氢盐”培养对魏氏真眼点藻细胞生长影响最显著, 其中  $\text{NaNO}_3 + \text{NH}_4\text{HCO}_3$  组、3.0 mmol/L + 3.0 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  组和 3.0 mmol/L + 1.0 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  组的效果最显著, 与“批量”培养相比生物质浓度提高了约 1.0 g/L; 而“两步法”培养和“补料法”培养对该藻生长影响不显著。

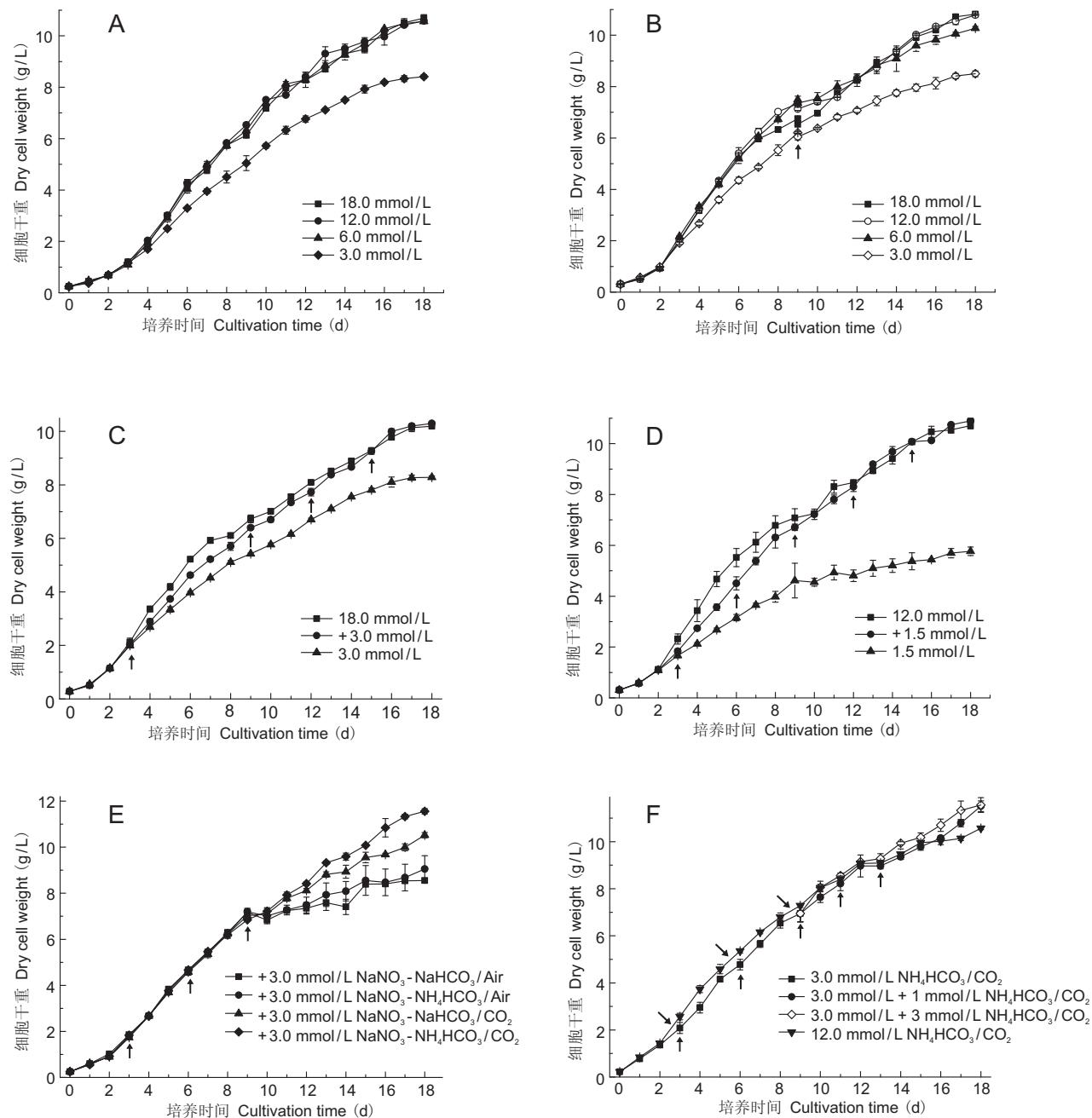
## 2.2 “添加碳酸氢盐”培养对培养基中 pH 值的影响

向培养基中加入  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  或  $\text{NaHCO}_3$  进行“添加碳酸氢盐”培养过程中, 实时检测培养基中 pH 值的变化。从图 2: A 可看出, 添加低浓度  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  和  $\text{NaHCO}_3$  后分别进行通空气和通  $\text{CO}_2$  培养, 培养前期 (0 ~ 9 d) 各实验组培养条件相同, 藻细胞生长状况一致, pH 维持在 7.5 左右, 第 9 d 加入  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  或  $\text{NaHCO}_3$  后, 通空气培养的培养基中 pH 迅速上升,  $\text{pH} > 9$  甚至达到 11, 而通  $\text{CO}_2$  的实验组中添加  $\text{NaHCO}_3$  后培养基 pH 到达 8.0 左右, 添加  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  后 pH 略有下降, 约为 7.3。从图 2: B 可看出, 随着培养时间的延长, 3.0 mmol/L + 3.0 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  组和 3.0 mmol/L + 1.0 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  组培养基中的 pH 均发生了变化, 在整个培养周期内 pH 呈持续下降的趋势, 且最终维持在 pH 5.0 左右。

## 2.3 不同培养方法对魏氏真眼点藻油脂积累的影响

“批量”、“两步法”、“补料法”、“添加碳酸氢盐”4 种培养模式对魏氏真眼点藻总脂含量均产生了影响(图 3)。

从“批量”培养过程可以看出(图 3: A), 整个培养周期内, 魏氏真眼点藻细胞内油脂逐渐积累, 且随着硝酸钠浓度的降低, 细胞内总脂含量(占细胞干重)升高, 到第 18 d 时达到最高值, 各浓度组总脂含量分别为 50.59% (18.0 mmol/L 组)、51.30% (12.0 mmol/L 组)、61.27% (6.0 mmol/L 组) 和 65.16% (3.0 mmol/L 组)。



A: “批量”培养; B: “两步法”培养; C 和 D 分别代表“补料法”培养的 2 个处理组; E 和 F 为“添加碳酸氢盐”培养的各处理组(箭头指示各处理组更换培养基位点或补氮位点)。

A: Batch culture; B: Two-stage culture; C and D: Two groups of fed-batch culture, respectively; E and F: Bicarbonate-addition culture (arrows indicate change in medium or addition of nitrogen).

图 1 不同培养模式下魏氏真眼点藻生物质浓度的变化

Fig. 1 Changes in biomass concentration of *Eustigmatos vischeri* under different cultivation modes

分别比较“两步法”、“补料法”、“添加碳酸氢盐”3 种培养模式下藻细胞油脂积累情况,结果显示(图 3: B ~ F),3 种培养模式下油脂积累规律与“批量”培养相同,均在培养末期达到最高值。

“两步法”培养(图 3: B)的各浓度组总脂含量分别为 50.34% (18.0 mmol/L 组)、53.83% (12.0 mmol/L 组)、61.13% (6.0 mmol/L 组)和 65.16% (3.0 mmol/L 组),与“批量”培养各浓度组相比没有显著差异( $P > 0.05$ )。

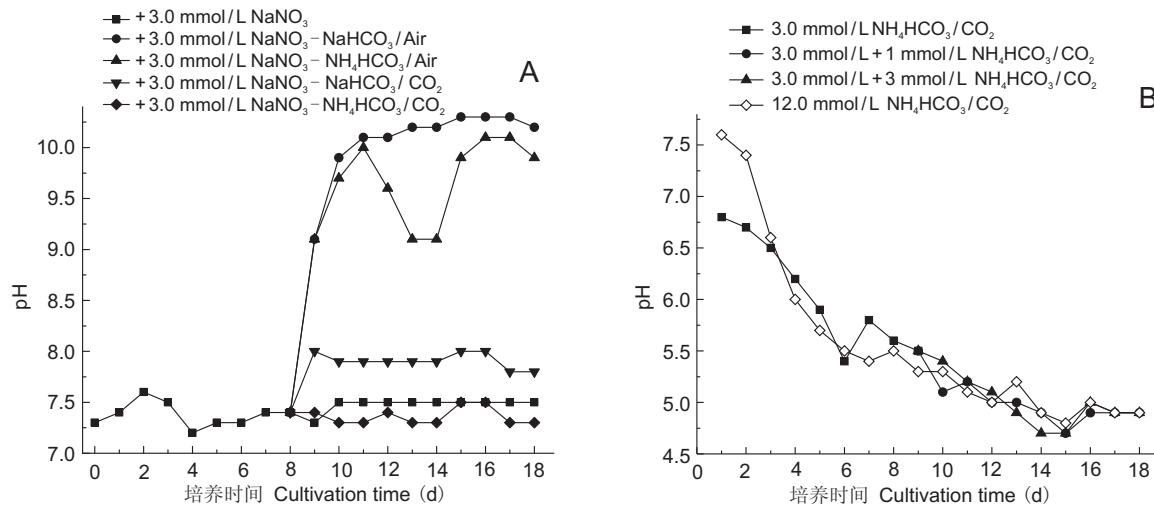


图2 “添加碳酸氢盐”培养中培养基 pH 值的变化  
Fig. 2 Changes in the pH of the medium with bicarbonate-addition culture

通过“补料法”培养发现(图3: C 和 D)，随着硝酸钠的不断加入和培养时间的延长，3.0 mmol/L 补氮组藻细胞油脂积累明显高于18.0 mmol/L 组(50.62%)，油脂含量达到细胞干重的54.71%，增加了4.09%。而1.5 mmol/L 补氮组(48.46%)与12.0 mmol/L 组(51.30%)相比略有下降。其原因可能是补加的氮源浓度过低，随着培养时间延长细胞内氮素消耗殆尽，藻细胞内油脂积累受到影响。

“添加碳酸氢盐”培养过程中，各浓度组总脂含量呈快速上升趋势(图3: E 和 F)。培养至12 d后增长缓慢并逐渐趋于稳定。当培养到第18 d时，通空气培养的NaNO<sub>3</sub> + NaHCO<sub>3</sub>组与NaNO<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>组总脂含量分别为60.25%和58.55%，通CO<sub>2</sub>培养条件下2个处理组分别为60.29%和60.92%，这4个培养组间没有显著差异( $P > 0.05$ )，但与“批量”培养的12.0 mmol/L 组(51.30%)相比提高了约10%且差异极显著( $P < 0.01$ )。而3.0 mmol/L + 3.0 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>组和3.0 mmol/L + 1.0 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>组藻细胞的总脂含量分别为55.74%和57.73%，分别提高了4.44%和6.43%。

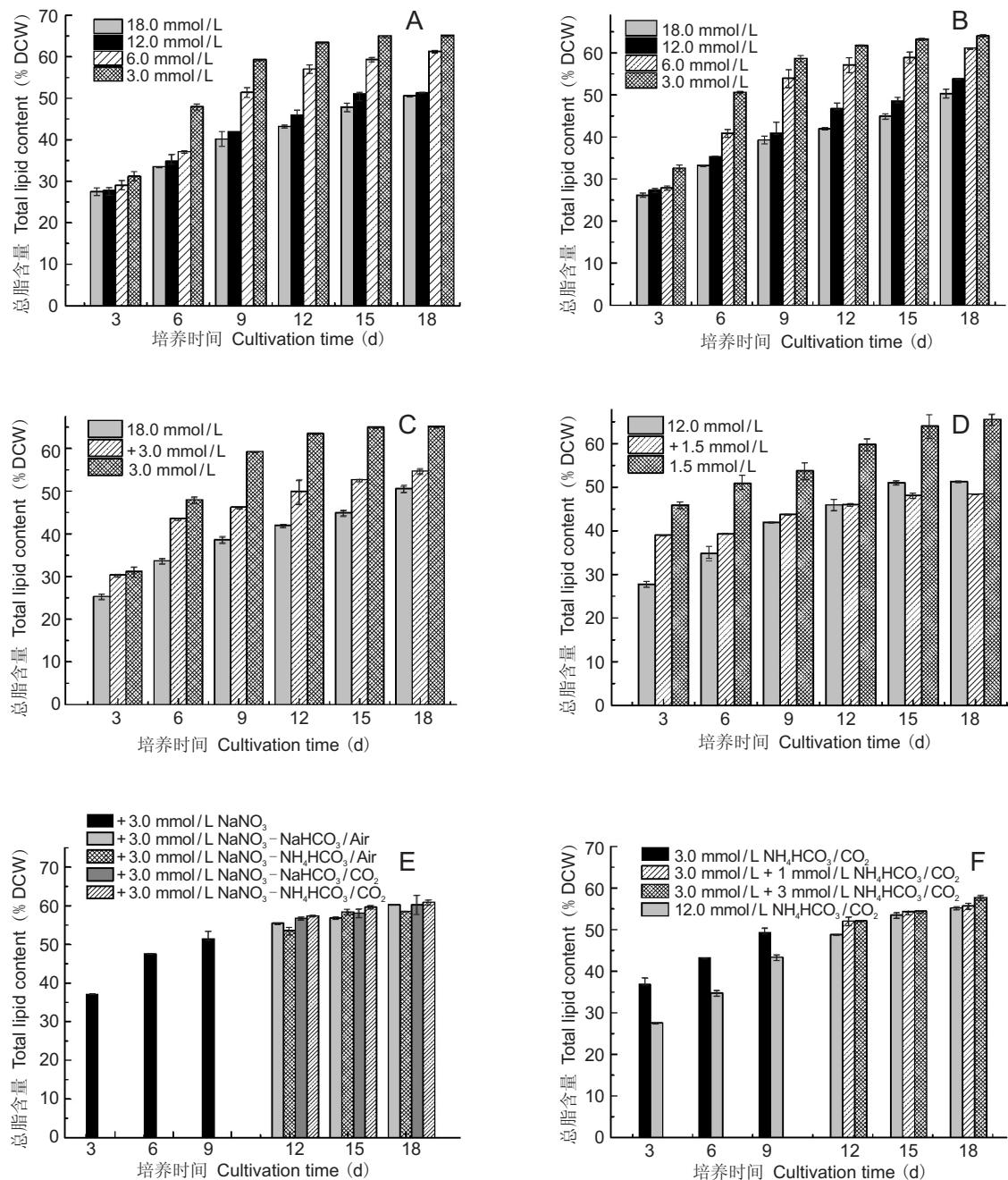
以上结果表明，“两步法”培养对魏氏真眼点藻细胞油脂积累没有显著影响；“补料法”培养对油脂的积累有一定促进作用，但效果不显著；“添加碳酸氢盐”培养对该藻细胞油脂积累影响最显著。

#### 2.4 不同培养方式对魏氏真眼点藻总脂产率的影响

采用4种培养模式培养魏氏真眼点藻至第18 d时，各处理组藻细胞总脂产率的变化各有不同(图4)。

“批量”培养条件下藻细胞总脂产率在6.0 mmol/L组最高，达到 $0.36 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ；18.0 mmol/L组、12.0 mmol/L组和3.0 mmol/L组之间没有显著差异( $P > 0.05$ )，约为 $0.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。“两步法”培养条件下，各个浓度组总脂产率与“批量”培养各处理组相比差异不显著( $P > 0.05$ )，其中在6.0 mmol/L组获得最高值( $0.35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )。“补料法”培养条件下3.0 mmol/L补氮组和1.5 mmol/L补氮组获得的总脂产率分别为 $0.31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $0.29 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ，与“批量”培养中的18.0 mmol/L组和12.0 mmol/L组相近，两者之间差异不显著( $P > 0.05$ ，图4: A)。

“添加碳酸氢盐”培养的结果显示(图4: B)，通CO<sub>2</sub>培养的各处理组明显高于通空气培养的各处理组，各处理组总脂产率的大小为：NaNO<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>组( $0.39 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )>3.0 mmol/L + 3.0 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>组( $0.37 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )>3.0 mmol/L + 1.0 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>组( $0.36 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )>NaNO<sub>3</sub> + NaHCO<sub>3</sub>组( $0.35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )，与“批量”培养的12.0 mmol/L组总脂产率( $0.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )相比，增长幅度较大，最高增长幅度为 $0.09 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。



A: “批量”培养；B: “两步法”培养；C 和 D 分别代表“补料法”培养的 2 个处理组；E 和 F 为“添加碳酸氢盐”培养的各处理组。

A: Batch culture; B: Two-stage culture; C and D: Two groups of fed-batch culture, respectively; E and F: Bicarbonate-addition culture.

图 3 不同培养模式对魏氏真眼点藻总脂积累的影响

Fig. 3 Effects of different cultivation modes on total lipid accumulation in *Eustigmatos vischeri*

以上结果表明，“两步法”培养和“补料法”培养对总脂产率的提高作用不明显。然而，通过“添加碳酸氢盐”培养最有利于提高魏氏真眼点藻细胞总脂产率。

### 3 讨论

铵盐、尿素和硝酸盐是微藻培养过程中常见的氮素来源。目前硝酸盐的应用广泛，在微藻中的研

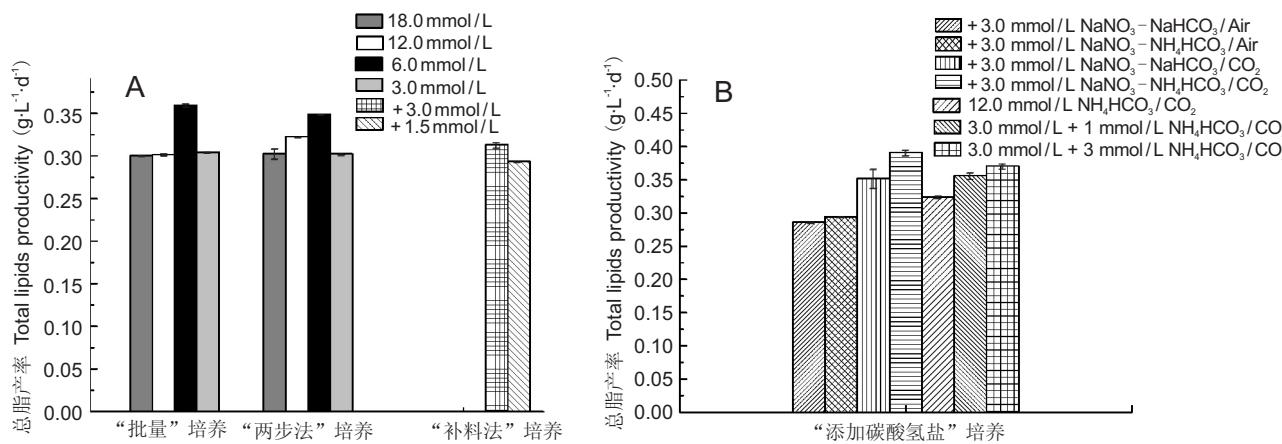


图 4 不同培养模式对魏氏真眼点藻总脂产率的影响

Fig. 4 Effects of different cultivation modes on the productivity of total lipids in *Eustigmatos vischeri*

究也较多。Xu 等<sup>[7]</sup>研究认为, 真眼点藻纲椭圆藻属(*Ellipsoidion* sp.)在铵盐中培养比在尿素和硝酸盐中培养更有利其生长和油脂积累。而对小球藻属(*Chlorella* sp.)和富油新绿藻(*Neochloris oleoabundans* Chantanachat)培养的研究结果恰恰相反<sup>[8-10]</sup>。微藻吸收氮源存在两种转化机制: NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>(细胞质)和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>(叶绿体), 最终以 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>形式进入藻细胞中<sup>[5]</sup>。所以以铵态氮为氮源比硝酸态更有利藻细胞的吸收和利用。但铵盐在培养过程中产生的 NH<sub>3</sub>对藻细胞有毒害作用, 同时, 添加铵盐培养过程中, 培养基 pH 值随着铵盐的吸收而变化, 使藻细胞无法承受过高浓度的铵盐, 因此培养时其浓度不宜过高。

微藻总脂产率是由其生物质浓度和总脂含量共同决定的。Zheng 等<sup>[11]</sup>研究发现, 改变索罗金小球藻(*Chlorella sorokiniana* Shihhara et Krauss)培养基成分进行“两步法”培养, 在第一阶段生物质浓度快速积累(从 1.3 g/L 到 73.9 g/L), 此时总脂含量仅占细胞干重的 14.5%, 第二阶段总脂开始大量积累, 达到 38.7%, 这与正常“批量”培养相比, 生物质浓度和总脂含量均大大提高。De Swaaf 等<sup>[12]</sup>研究认为, 寇氏隐甲藻(*Cryptothecodinium cohnii* (Seligo) Javornicky)通过补加乙酸进行“补料法”培养后, 生物质浓度、总脂含量和 DHA 含量均明显提高(分别达到 109、61、19 g/L)。此外, 近年来有文献报道, 高 pH 值和低氮胁迫条件有利于微藻细胞内三酰甘油(TAG)的积累, 例如: Gardner 等<sup>[13]</sup>研究发现, 绿藻纲

栅藻(*Scenedesmus* sp.)在高度碱性(pH > 9)环境下 TAG 积累量有所增加; Gardner 等<sup>[14,15]</sup>研究发现, 三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin)和莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii* Dang)培养过程中分别引入 25 mmol/L 和 50 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>有利于细胞内 TAG 积累。但并不是所有的微藻都适应高 pH 环境, pH 过高反而可能抑制藻细胞生长, 例如: 叶林超等<sup>[16]</sup>研究不同氮源对小球藻(*Chlorella vulgaris* Beijiernecke)生长影响的结果发现, 50 mg/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(弱碱性)对该藻作用效果最好。

本研究中, “批量”培养条件下魏氏真眼点藻在 18.0 mmol/L 和 12.0 mmol/L 初始硝酸钠浓度下获得了较高生物质浓度和总脂含量, 但此时与低氮浓度组相比总脂含量相对较低。“两步法”培养和“补料法”培养可使藻细胞先在高氮浓度时生长、低氮限制下积累油脂或者先在低氮条件下积累油脂、再通过不断补加氮源使细胞生长<sup>[17]</sup>。许多研究表明, “两步法”培养和“补料法”培养能有效促进微藻细胞生长和油脂积累。但在本研究中, 与“批量”培养相比, “两步法”培养未对魏氏真眼点藻细胞的生长和总脂积累产生较大影响, 这与 Zheng 等<sup>[11]</sup>的研究结果有所不同。其原因可能是, “两步法”培养的目的是通过更换培养基来去除原培养基中由于持续培养而产生的细菌和毒素等物质, 从而使藻细胞处于更为有利的环境中, 而本研究发现, 魏氏真眼点藻在连续培养过程中产生的细菌和代谢物等不利因子较少, 更换培养基前后培养

基变化不大, 对藻细胞的生长和油脂积累没有明显影响, 因此与“批量”培养相比, “两步法”培养魏氏真眼点藻没有得到预期的结果。“补料法”培养对魏氏真眼点藻细胞有一定的促进作用, 但效果并不明显。这可能是因为硝酸钠“批量”培养条件下该藻细胞已获得较高的生物质浓度和总脂含量, 再用“补料法”培养其提高空间不大。以上分析结果说明“两步法”培养和“补料法”培养并不适用于所有藻株, 要根据不同微藻选择不同的培养条件。

在硝酸钠补料培养基础上添加  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  和  $\text{NaHCO}_3$  对魏氏真眼点藻细胞培养具有显著的促进作用, 其中  $\text{NaNO}_3 + \text{NH}_4\text{HCO}_3$  组效果最显著, 生物质浓度达到最高(约 11.5 g/L), 与“批量”培养相比提高了约 1.0 g/L, 总脂含量提高了近 10%, 总脂产率也大大提高。这可能是因为培养基中加入  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  同时补充了氮源和碳源, 改变了其 C/N 比例, 使藻细胞向着更有利于油脂积累的趋势发展。同时, pH 值分析发现, 以  $\text{NaNO}_3$  培养的整个周期, pH 维持在 7.5 左右, 藻细胞生长状况较好; 在“添加碳酸氢盐”培养下, 向培养基中加  $\text{NaHCO}_3$  后, 培养基的 pH 迅速上升,  $\text{pH} > 9$  甚至达到 11, 藻细胞的生长受到了一定影响; 而  $\text{NaNO}_3 + \text{NH}_4\text{HCO}_3$  组添加  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  后 pH 略有下降, 约为 7.3。因此, 随着游离  $\text{CO}_2$  吸收利用, 培养基中 pH 不断上升, 这在一定程度上会制约藻细胞生长, 而随着  $\text{NH}_4^+$  被利用, pH 逐渐下降, 因此添加  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  可保持魏氏真眼点藻生长过程中较低的 pH 环境, 有效促进藻细胞快速生长。White 等<sup>[18]</sup> 研究发现, 添加  $\text{NaHCO}_3$  培养后四肩突四鞭藻 (*Tetraselmis suecica* Kylin (Butch)) 和拟微球藻 (*Nannochloropsis salina* Hibberd) 细胞密度、色素和总脂含量都有所提高, 且对两株藻效果不同。Gardner 等<sup>[13,14]</sup> 研究也认为, 添加  $\text{NaHCO}_3$  培养后在高 pH 和氮限制共同作用下, 小球藻 (*Chlorella* spp.)、栅藻 (*Scenedesmus* spp.) 和三角褐指藻的总脂含量显著提高。此外, 藻细胞不能直接利用  $\text{HCO}_3^-$ , 需要将其转化为  $\text{CO}_2$  后进入细胞碳固定过程:  $(\text{HCO}_3^- + \text{H}^+) / (\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O})$ <sup>[19]</sup>, 因此  $\text{CO}_2$  水溶液比  $\text{HCO}_3^-$  更有利于细胞的吸收。因此在硝酸钠补料培养基础上添加 25 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ , 魏氏真眼点藻细胞生物质浓度没有显著变化 ( $P > 0.05$ ), 但培养液 pH 有一定程度的提高, 促进了

细胞总脂含量的积累。

## 参考文献:

- [1] Hibberd DJ, Leedale GF. Eustigmatophyceae—a new algal class with unique organization of the motile cell [J]. *Nature*, 1970, 225 (5234): 758–760.
- [2] 高保燕, 张成武, 万凌琳, 李爱芬. 真眼点藻纲的系统分类、生物学特性及应用研究 [J]. 水生生物学报, 2014, 38 (5): 945–956.
- [3] Gao BY, Zhang CW, Wan LL, Li AF. Systematics, biological characteristics and potential application of Eustigmatophyceae [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38 (5): 945–956.
- [4] 何思思, 高保燕, 雷学青, 万凌琳, 李爱芬, 张成武. 初始硝酸钠浓度对魏氏真眼点藻的生长、形态和油脂积累的影响 [J]. 水生生物学报, 2015, 39 (3): 574–582.
- [5] He SS, Gao BY, Lei XQ, Wan LL, Li AF, Zhang CW. Effect of initial nitrogen supply on the growth, morphology and lipid accumulation of oleaginous microalga *Eustigmatos vischeri* (Eustigmatophyceae) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39 (3): 574–582.
- [6] 欧阳峥嵘, 温小斌, 耿亚红, 梅洪, 胡鸿钧, 张桂艳, 李夜光. 光照强度、温度、pH、盐度对小球藻 (*Chlorella*) 光合作用的影响 [J]. 武汉植物学研究, 2010, 28 (1): 49–55.
- [7] Ouyang ZZ, Wen XB, Geng YH, Mei H, Hu HJ, Zhang GY, Li YG. The effect of light intensities, temperatures, ph and salinities on photosynthesis of *Chlorella* [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2010, 28 (1): 49–55.
- [8] Procházková G, Brányiková I, Zachleder V, Brányík T. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae [J]. *J Appl Phycol*, 2014, 26 (3): 1359–1377.
- [9] 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]. *BBA-Mol Cell Biol L*, 2005, 1738 (1): 63–71.
- [10] Xu N, Zhang X, Fan X, Han L, Zeng C. Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion* sp. (Eustigmatophyta) [J]. *J Appl Phycol*, 2001, 13 (6): 463–469.
- [11] Li Y, Horsman M, Wang B, Wu N, Lan CQ. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans* [J]. *Appl microbiol Biot*, 2008, 81 (4): 629–636.
- [12] Liu ZY, Wang GC, Zhou BC. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* [J]. *Bioresource Technol*, 2008, 99 (11): 4717–4722.
- [13] Hsieh CH, Wu WT. Cultivation of microalgae for oil pro-

- duction with a cultivation strategy of urea limitation [J]. *Bioresource Technol*, 2009, 100(17): 3921–3926.
- [11] Zheng Y, Li T, Yu X, Bates PD, Dong T, Chen S. High-density fed-batch culture of a thermotolerant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production[J]. *Appl Energy*, 2013, 108: 281–287.
- [12] De Swaaf ME, Sijtsma L, Pronk JT. High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 81(6): 666–672.
- [13] Gardner R, Peters P, Peyton B, Cooksey KE. Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta [J]. *J Appl Phycol*, 2011, 23(6): 1005–1016.
- [14] Gardner RD, Cooksey KE, Mus F, Macur R, Moll K, Eu-stance E, Carlson RP, Gerlach R, Fields MW, Peyton BM. Use of sodium bicarbonate to stimulate triacylglycerol accumulation in the chlorophyte *Scenedesmus* sp. and the diatom *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *J Appl Phycol*, 2012, 24(5): 1311–1320.
- [15] Gardner RD, Lohman E, Gerlach R, Cooksey KE, Peyton BM. Comparison of CO<sub>2</sub> and bicarbonate as inorganic car-
- bon sources for triacylglycerol and starch accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(1): 87–96.
- [16] 叶林超, 叶均安, 徐国忠, 刘建新. 碳酸氢铵等不同氮源对小球藻生长的影响 [J]. 水产科学, 2007, 26(6): 319–322.
- Ye LC, Ye JA, Xu GZ, Liu JX. Effect of nitrogen sources on growth of alga *Chlorella vulgaris* [J]. *Fisheries Science*, 2007, 26(6): 319–322.
- [17] Su CH, Chien LJ, Gomes J, Lin YS, Yu YK, Liou JS, Syu RJ. Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process [J]. *J Appl Phycol*, 2011, 23(5): 903–908.
- [18] White DA, Pagarette A, Rooks P, Ali ST. The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures [J]. *J Appl Phycol*, 2013, 25(1): 153–165.
- [19] Juneja A, Ceballos RM, Murthy GS. 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.

(责任编辑: 张平)