

低氮胁迫对蛋白核小球藻生化组分和絮凝性能的影响

赵艳, 汪成

(浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江杭州 310018)

摘要:【目的】蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 蛋白含量高, 富含各种必需氨基酸和多种营养保健因子, 2012 年被我国增列为新资源食品。本文以蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 为材料, 研究低氮胁迫对自养和兼养来源的藻细胞生化组分和絮凝性能的影响, 为开发应用提供技术支撑。【方法】分别以 BG11 基本培养基和 BG11 添加 10 g/L 葡萄糖接种培养蛋白核小球藻, 获得自养和兼养来源的种子藻细胞。以 BG11 基本培养基中 18 mmol/L 硝酸钠为正常供氮对照, 设置硝酸钠水平为 3、6、9 mmol/L 的低氮胁迫培养基。种子藻细胞培养 14 天后, 分别采用干重法、脂染色法测定藻细胞干重生物量和总脂含量; 蛋白和淀粉含量的测定采用紫外分光光度法; 用三维荧光光谱分析藻细胞胞外聚合物 (extracellular polymeric substances, EPS) 组分和含量。

【结果】1) 自养与兼养来源的蛋白核小球藻在低氮胁迫处理下均能生长, 自养来源藻细胞更能迅速感应低氮胁迫的条件变化, 转接后第 1 天即开始快速生长。四个胁迫处理中, 以硝酸钠 6 mmol/L 组藻细胞干重和油脂含量最高。该低氮胁迫培养 4 天后, 所有藻细胞样品生长到达稳定期, 此时自养与兼养来源的藻细胞干重分别为 2.56 g/L 和 4.62 g/L, 藻细胞油脂含量分别为 15.5% 和 39.3%, 与正常对照组 (硝酸钠 18 mmol/L) 相比均显著增加。2) 低氮胁迫处理能提高蛋白核小球藻的油脂产率。其中 6 mmol/L 胁迫处理 4 天后, 兼养藻细胞油脂产率最高, 达到 129.56 mg/(L·d), 同比是自养来源藻细胞的 7.95 倍。3) 兼养组藻细胞胞内外蛋白、淀粉 (多糖) 初始含量显著高于自养组。藻细胞油脂、蛋白、淀粉含量在低氮胁迫处理培养 2 天或 3 天内均显著下降, 之后低氮胁迫组藻细胞胞内外蛋白含量持续下降, 细胞油脂与胞内淀粉含量开始回升, 在第 4 天出现明显的拐点。4) 6 mmol/L 低氮胁迫处理 4 天后, 自养来源藻细胞中, 对藻细胞絮凝有促进作用的蛋白类色氨酸物质含量比对照组增加 40.3%, 兼养来源藻细胞蛋白类色氨酸物质和对藻细胞絮凝有抑制作用的胡敏酸和富里酸类腐殖酸物质的含量分别为对照组的 83.6%、74.8% 和 54.8%。兼养和自养组藻细胞自絮凝率分别为 78.5% 和 80.3%, 均比对照组显著提高。【结论】自养与兼养来源的蛋白核小球藻对低氮胁迫处理的响应存在差异, 藻细胞生化组分含量变化受培养基供氮水平和培养时间的影响。低氮胁迫通过影响藻细胞促进和抑制藻细胞自絮凝的生化组分的比例, 显著提高其收获期的自絮凝率。针对供试藻种, 以硝酸钠 6 mmol/L 低氮胁迫处理 4 天对蛋白核小球藻的油脂产率和絮凝性能的提升效果最佳。

关键词: 蛋白核小球藻; 低氮胁迫; 生化组分; 胞外聚合物; 絮凝

Effects of low nitrogen stress on the biochemical components and flocculation property of *Chlorella pyrenoidosa*

ZHAO Yan, WANG Cheng

(College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: 【Objectives】*Chlorella pyrenoidosa* are high in protein contents and rich in all kinds of essential amino acids and various nutritional health care factors, which have been listed as a new resource of food in China in 2012. The paper studied the specific nitrogen stress levels and days for culture of *Chlorella pyrenoidosa*.

【Methods】The *Chlorella pyrenoidosa* was inoculated to the basic BG11 medium for autotrophic cultivation and BG11 medium supplemented with 10 g/L glucose for mixotrophic cultivation, then obtained seed algae cells.

收稿日期: 2018-03-13 接受日期: 2018-06-11

基金项目: 浙江省一流学科建设经费 (食品科学与工程 1110JYN6517001G); 国家自然科学基金项目 (31772100) 资助。

联系方式: 赵艳 Tel: 0571-28008970; E-mail: yanzhao9918@163.com

The conventional nitrogen supply of 18 mmol/L sodium nitrite in the BG11 basic medium was used as control, mediums with 3, 6 and 9 mmol/L sodium nitrite were prepared as low nitrogen stress treatments. The algae cell biomass was measured by dry weight and the total lipid was quantified by staining method. The protein and starch contents of algae cells were determined by ultraviolet spectrophotometry, and the three-dimensional fluorescence spectra was used to analyze the components and contents of algae extracellular polymeric substances (EPS).

【 Results 】 1) The *Chlorella pyrenoidosa* cells from both autotrophic and mixotrophic cultivation could grow under low nitrogen stress conditions, algae cells from autotrophic cultivation responded more rapidly to the change of low nitrogen stress and started to grow rapidly on the first day after transfer. The highest cell dry weight and lipid content of the algae were harvested in the NaNO₃ 6 mmol/L treatment groups. After culturing for 4 days, the algae growth reached stable phase, the cells dry weight from autotrophic and mixotrophic cultivation sources was 2.56 and 4.62 g/L, respectively, and the corresponding lipid contents reached to 15.5% and 39.3%, which were all notably higher than their normal N controls. 2) Low N stress could improve the lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa*. Both the highest lipid productivities of algae cells derived from mixotrophic cultivation were in NaNO₃ 6 mmol/L treatment, that for the mixotrophic algae cells was 129.56 mg/(L·d) on the 4th day, which was 7.95 times of that for the autotrophic algae cells. 3) The initial contents of intra- and extra-cellular protein and starch (polysaccharide) in cells from mixotrophic group were notably higher than those from autotrophic group. The lipid, protein, starch contents were decreased significantly in the 2nd or 3rd day of culture, then the intra- and extra-cellular protein contents continued to decline, while the lipid and intracellular starch contents began to increase with an apparent inflection points. The change trends of the lipid and intracellular starch content in algal cells were basically synchronous. 4) The EPS components in the *Chlorella pyrenoidosa* contained the tryptophan-like proteins (TLP) that advantage to algae cells flocculating and some humic substances including humic acid (HA) and fulvic acid (FA) that disadvantage to flocculation. After culturing for 4 days in NaNO₃ 6 mmol/L medium, the content of TLP in algae cells from autotrophic cultivation was increased by 40.3% than the control, while the content of TLP, HA and FA in algae cells from mixotrophic cultivation were 83.6%, 74.8% and 54.8% of that in control groups, respectively. The corresponding self-flocculation rate of algae cells from autotrophic and mixotrophic cultivation source were 78.5% and 80.3% respectively, which were notably improved than their corresponding controls. **【 Conclusions 】** The response to low-nitrogen stress varied between the autotrophic and mixotrophic *Chlorella pyrenoidosa* cells. The biochemical component contents of algal cells are influenced by the culture medium nitrogen supply levels and culturing days. The low nitrogen stress influences the self-flocculation rate of algae cells remarkably by changing the EPS compositions of *Chlorella pyrenoidosa*. For the tested *Chlorella pyrenoidosa*, the suitable nitrogen stress level is NaNO₃ 6 mmol/L and the cultural time is 4 days for the highest lipid productivity and flocculation performance.

Key words: *Chlorella pyrenoidosa*; low nitrogen stress; biochemical components; extracellular polymeric substances; flocculation

以小球藻为代表的微藻是一类能进行光合自生长的单细胞绿藻，易于培养且生长迅速，富含蛋白、油脂、维生素、矿物质及多种生理活性成分，在医药、食品、饲料和生物柴油新能源方面的应用潜力巨大^[1-2]。2011年，我国“神舟8号”搭载小球藻上天进行生态循环科学实验，发现小球藻能提供氧气，并作为食物来源确保宇航员在空间站的全面营养，而且还可能对很多医学难题提供重要的解决方案^[3]。特别是蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*)

具有蛋白含量高，富含各种必需氨基酸和多种营养保健因子，2012年被我国增列为新资源食品^[4]，其研究开发很快成为热点。微藻的大规模培养是实现工业化生产的前提。人工培养技术中比基因工程或代谢工程手段更简单有效的策略是通过改变培养基或培养条件影响藻细胞代谢途径，以达到提高油脂、多糖等目标化合物生产率的目的^[5]。氮是蛋白质、核酸、磷脂和叶绿素等物质合成的基本元素，在新陈代谢中至关重要。研究表明，降低培养基中的氮素

供应使藻细胞处于低氮胁迫状态能影响藻细胞光合效率、生物量与生化组分合成^[6]。低氮胁迫作为提高微藻生产效益的低成本技术, 增效作用在不同藻种之间差异很大^[7], 这是因为藻种不同细胞氮代谢途径和整体代谢网络模式不同, 对低氮胁迫信号的响应机制也不一致。只有针对不同藻种研究低氮胁迫的适宜水平和收获时间等因素才能使收益最大化。代瑞华等^[8]报道适宜的低氮胁迫处理会促进铜绿微囊藻细胞分裂, 缩短生长周期。吴桂秀等^[9]发现低氮胁迫有利于大真眼点藻和波氏真眼点藻的总脂和中性脂的积累。Adams 等^[6]研究了低氮胁迫对 6 种微藻生长与油脂积累的影响, 发现普通小球藻经 4 mmol/L 低氮胁迫培养 12 天后, 其生物量比对照减少了 51%, 但藻细胞油脂含量增加了 302%。Gong 等^[10]研究了低氮胁迫对 4 株海洋微藻油脂含量的影响, 发现培养 5 天后角毛藻、三角褐指藻和绿色巴夫藻细胞内总脂肪酸含量已增加了一倍, 眼点拟微绿球藻总脂肪酸含量却增长不明显。此外, 微藻作为一个代谢整体, 在氮胁迫下生长和生化组分的合成变化密切相关。如球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 当细胞内源型储存氮达到最低阈值时, 藻细胞生长缓慢同时细胞内的脂质和类胡萝卜素开始大量积累^[11]。微拟球藻在氮源不足时, 细胞蛋白与氨基酸含量显著下降, 碳代谢流向碳水化合物或者脂质从而提高糖类或油脂积累量^[12]。莱茵衣藻在低氮胁迫条件下, 淀粉含量和油脂合成之间存在着竞争关系^[13]。国内外对低氮胁迫下微藻的代谢研究鲜见涉及蛋白核小球藻藻种, 报道多集中于微藻生长和胞内生化组分方面, 尚缺乏自养和葡萄糖兼养营养方式来源的藻细胞对低氮胁迫响应的系统比较, 而且对胞外聚合物 (extracellular polymeric substances, EPS) 研究极少。葡萄糖不仅是细胞的主要能量来源, 还可以作为信号触发特定的信号转导通路控制细胞代谢状态^[14], 葡萄糖兼养藻细胞对低氮胁迫处理的生化反应是否与自养藻细胞存在差异值得探究。微藻 EPS 主要为多糖、蛋白质等代谢产物, 积累在细胞表面, 通过稳定的膜结构来保护细胞, 与藻细胞絮凝性能密切相关, 并且在营养缺失时能为细胞提供碳与能量供应^[15]。由此推测培养条件的改变可能通过影响 EPS 组成进而影响细胞絮凝收获性能。由于微藻细胞尺寸小, 当前普遍采用的离心沉降等物理收获方法成本约占微藻生产总成本的三分之一, 严重限制了其生产应用^[16], 因此研究低氮胁迫对藻细胞 EPS 组分及絮凝性能的影响具有重要现实意义。系统比较研究自养和兼养来源的蛋白核小球藻在生长速率、油脂含量、胞内外蛋白

和淀粉等生化组分对低氮胁迫处理的响应差异, 从 EPS 组分变化角度初步探究低氮胁迫处理对藻细胞絮凝性能的影响和相关机制, 为蛋白核小球藻的人工培养技术优化提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

蛋白核小球藻藻种购自中国科学院武汉水生生物研究所, 藻种编号为 FACHB-1222。

1.2 主要仪器与试剂来源

电热鼓风干燥箱 101-3 购自上海申光制造仪器公司; 智能人工气候箱 safe PRX-600B 购自宁波赛福实验仪器有限公司; 台式冷冻恒温振荡器 THZ-C-1 购自苏州培英实验设备有限公司; 电热恒温水浴锅 XMTD-8222 购自上海精宏实验设备有限公司; 台式高速离心机 H1650 购自湘仪仪器有限公司; 超速冷冻离心机 Centrifuge 5417R 购自北京伯乐有限公司; 显微镜 BM1000 购自江南永新; 荧光光度计 HitachiF-7000 型购自日立高新技术公司。葡萄糖、NaNO₃ 等生化试剂购自上海生工公司。

1.3 试验方法

1.3.1 小球藻的培养和生长指标测定 以 BG11 培养基^[17]为基础培养基, 挑取单藻落纯化后接入 BG11 培养至对数期作为种子细胞, 分别接入 BG11 自养培养基和添加 10 g/L 葡萄糖的 BG11 兼养培养基, 接种初始浓度均为 2×10^6 cell/mL。待培养至稳定期, 收获藻细胞接种到低氮培养基, 藻细胞接种后初始浓度均为 1×10^7 cell/mL。培养条件为 25℃, 光强 2000 Lux, 光周期中光暗比 L : D 为 12 h : 12 h, 每天早晚各摇动一次。每组设置 3 个平行, 自养和兼养来源藻细胞的培养周期均为 5 d。BG11 基本培养基氮素为 18 mmol/L 硝酸钠 (1N), 作为对照; 以添加 3 种不同初始浓度 (3、6、9 mmol/L 氮浓度, 即, 1/6N、1/3N、1/2N) 的硝酸钠作为低氮胁迫处理培养基。

接种培养后每天取样一次, 取样时间为光照 10 h 后, 离心收集适量藻细胞并烘干至恒重, 计算干重生物量。

1.3.2 藻细胞油脂提取和含量的测定 采用溶剂提取法和脂染色法对蛋白核小球藻油脂含量进行测定, 并建立油脂含量与脂染色后在 645 nm 吸光度 (A) 的线性回归方程, 采用脂染色法测定培养过程中的油脂。溶剂提取法操作参考 Zhao 等^[18]的方法, 脂

染色法具体操作参照任洁等^[19]的方法。油脂产率按照如下公式计算：

藻细胞油脂产率 $[\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{d})]$ = 收获藻细胞干重 $(\text{mg}/\text{L}) \times$ 油脂含量/培养天数 (d)

1.3.3 小球藻胞内蛋白的提取和测定 在 PBS 缓冲液中冰浴条件下以超声波破碎藻细胞后，用 0.1 mol/L 的 NaOH 振荡提取 2 h，8000 r/min 离心 15 min，收集上清，即为总蛋白。采用 Bradford 法^[20]以牛血清白蛋白作标准测定蛋白浓度，换算出每克干重藻细胞总蛋白质含量。总蛋白含量减去藻细胞 EPS 中蛋白含量即为胞内蛋白含量。

总蛋白含量 (mg/g) ，藻细胞干重 (g) = 蛋白浓度 $(\text{mg}/\text{mL}) \times$ 提取液体积 $(\text{mL})/\text{藻细胞干重}(\text{g})$

1.3.4 小球藻胞内淀粉的提取和测定 参照徐斌等^[21]的方法，以淀粉标准溶液测定绘制的标准曲线计算样品中淀粉含量。藻细胞总淀粉含量减去胞外聚合物 (EPS) 中淀粉含量即为胞内淀粉含量。

1.3.5 小球藻胞外产物 EPS 的提取与分析 小球藻 EPS 的提取与分析参照 Yang 等^[22]的方法。培养结束后，取藻细胞干重相当于 0.1 g 的微藻悬浮液，8 000 r/min 离心 10 min，弃上清，用 5 mL 去离子水洗涤沉淀，8 000 r/min 离心 5 min，微藻沉淀用 5 mL 去离子水悬浮并加热至 80℃，水浴 30 min。随后以 8 000 r/min 离心 10 min，得上清液用 0.45 μm 醋酸纤维素膜过滤，滤液即 EPS 组分。按如 1.3.4 所述测定 EPS 组分中的胞外蛋白质含量和以淀粉含量表征的胞外多糖含量。

小球藻 EPS 三维荧光光谱 (3D-EEM) 的测定条件参照 Lv 等^[23]的方法。使用 150 W 氙弧灯为激发光源，光电倍增管 (PMT) 电压为 700 V；设定激发狭缝宽度为 10 nm，发射狭缝宽度为 1 nm。光谱仪扫描范围为激发波长/发射波长 (EX/EM) = 200~450 nm/250~550 nm，扫描速度为 1200 nm/min。得到每个 EX/EM 所对应的荧光强度 (Intensity，单位为

arbitrary units, a.u.)，对所有数据点采用 Origin9.0 软件进行处理，形成等高线荧光光谱图。

1.3.6 藻细胞絮凝率测定 参照 Alam 等^[24]的方法并稍作修改。测定时摇动培养液以使藻细胞分散均匀，然后将 10 mL 细胞悬浮液转移到试管中摇匀并测定藻细胞总浓度 A (cell/mL)，将培养液静置 12 h 后，在距离液面顶部 4 cm 处取细胞悬液试样，测量试样藻细胞浓度 B (cell/mL)。絮凝率按照如下公式计算：

絮凝率 (flocculating ability) = $(A-B)/A \times 100\%$

1.4 数据处理与统计分析

每个试验处理设 3 次重复，各指标测定结果以“平均数 \pm 标准误”表示，应用 SPSS22.0 软件对对照和各处理组数据进行方差分析， $P < 0.05$ 为差异显著， $P < 0.01$ 为差异极显著。采集数据利用 Origin 9.0 软件进行分析作图。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖兼养培养对蛋白核小球藻生长和油脂积累的影响

表 1 显示，自养与兼养的蛋白核小球藻分别在培养 15 d 和 10 d 时生长达到稳定期，此时兼养组的藻细胞干重生物量、油脂含量同比是自养组的 1.62~2.82 倍，油脂产率达到自养组的 7.60 倍。可见葡萄糖兼养培养使藻细胞生长周期缩短，产油效益大幅度提升。

2.2 低氮胁迫对不同来源蛋白核小球藻生长和油脂积累的影响

不同浓度低氮胁迫处理，自养和兼养来源的蛋白核小球藻生长和油脂积累如图 1 所示。自养和兼养来源的蛋白核小球藻均在 1/3N 培养基中生长最快，4 d 后进入稳定期，藻细胞干重分别达到 2.56 g/L 和 4.62 g/L，分别为对照组 (1N) 的 1.13 倍和 1.18 倍，差异显著。

表 1 自养与兼养培养对蛋白核小球藻生长和油脂积累的影响

Table 1 The effect on growth and lipid accumulation of *Chlorella pyrenoidosa* of autotrophic and mixotrophic culture

项目 Item	自养组 Autotrophic group	兼养组 Mixotrophic group
培养天数 Culture days (d)	15	10
细胞浓度 Cell concentration ($\times 10^7$ cell/mL)	1.80 \pm 0.23	5.05 \pm 0.28**
干重 Dry weight (g/L)	1.37 \pm 0.11	2.22 \pm 0.15**
油脂含量 Lipid contents (%)	17.07 \pm 0.32	48.18 \pm 0.52**
油脂产率 Lipid productivity [mg/(L·d)]	13.76 \pm 0.41	105.16 \pm 2.64**

注 (Note) : *— $P < 0.05$; **— $P < 0.01$.

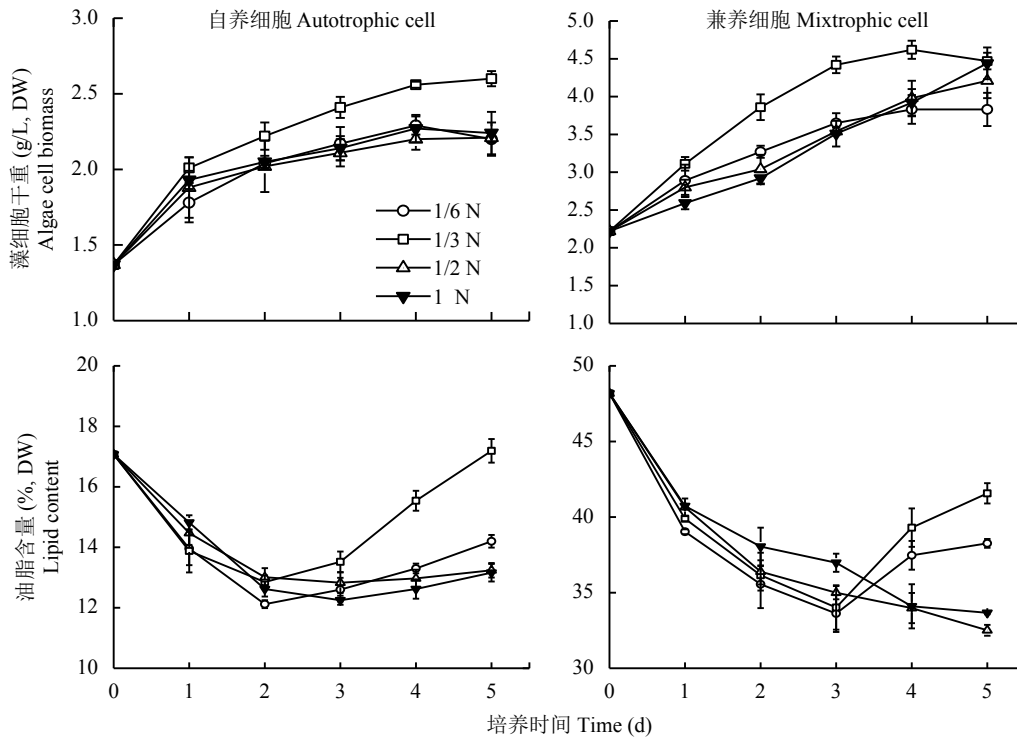


图 1 不同浓度低氮胁迫下蛋白核小球藻干重和油脂含量

Fig. 1 Dry biomass and lipid contents of *Chlorella pyrenoidosa* under low N stresses

[注 (Note): 1N, 1/6N, 1/3N, 1/2N represent NaNO_3 concentration in the culture media was 18, 3, 6, 9 mmol/L.]

随着低氮胁迫处理时间的延长, 自养和兼养来源的藻细胞油脂含量变化趋势相似, 1/2N 和 1N 处理组藻细胞油脂含量下降后回升不明显, 1/6N 和 1/3N 低氮胁迫的藻细胞油脂含量先下降后回升, 具有明显的拐点现象 (图 1), 其中 1/3N 处理组油脂含量显著高于其它组, 可见 1/3N 低氮胁迫最能激发细胞的油脂合成。自养和兼养藻细胞油脂含量回升拐点分别出现在 2 d 和 3 d, 说明兼养来源的藻细胞对低氮胁迫响应较慢。培养至 5 d 时, 1/3N 处理的自养组藻细胞油脂含量为 17.19%, 与种子藻细胞初始值相当, 但兼养组藻细胞油脂含量仍显著低于其种子细胞初始值。

综合藻细胞干重与油脂含量两个指标计算油脂产率, 自养与兼养组的蛋白核小球藻均是在 1/3N 低氮培养基中油脂产率最大, 4 d 油脂产率分别达到峰值 16.30 mg/(L·d) 和 129.56 mg/(L·d), 同比 1N 对照组增幅分别为 12.65% 和 35.82%, 均显著高于处理前藻细胞。可见, 自养组藻细胞虽然对低氮胁迫的响应较敏感, 但低氮胁迫对兼养组藻细胞油脂产率的提升效果更显著。

2.3 低氮胁迫对不同来源蛋白核小球藻胞内蛋白和淀粉含量的影响

为了研究低氮胁迫处理对小球藻细胞的油脂合

成与胞内其他生化组分的相关性, 以 1N 组为对照, 比较分析了 1/3N 低氮胁迫处理 (简称低氮组) 对自养和兼养来源的蛋白核小球藻胞内蛋白和淀粉含量的影响 (图 2)。

自养和兼养来源的藻细胞胞内蛋白初始含量不同, 兼养组藻细胞胞内初始蛋白含量 (152.07 mg/g) 比自养组藻细胞高 53.9%。转接后第 1 天兼养组藻细胞胞内蛋白含量下降幅度均超过 20.0%, 高于自养组藻细胞的下降幅度 (8.0% 以下)。自养组藻细胞胞内蛋白含量在 4 天内均逐日下降, 只是低氮组每天降幅 (8.0%~10.0%) 高于对照组 (3.0%~6.0%), 且最大降幅出现第 3 天, 比对照组 (第 2 天) 晚。兼养组藻细胞对低氮胁迫处理的反应有所不同, 1N 对照组前 3 天胞内蛋白含量持续下降至谷值 99.22 mg/g, 第 4 天显著回升至 132.17 mg/g。可见在氮素供应充足 (1N) 时, 储能相对丰富的兼养组藻细胞在转接入新鲜培养基渡过适应性初期后, 胞内蛋白即开始合成积累。相比而言, 接入 1/3N 低氮培养基的兼养组藻细胞胞内蛋白含量呈持续下降趋势。

自养组藻细胞胞内淀粉含量在转接后先下降后上升, 均于第 3 天达到谷值, 与对照组相比, 低氮组胞内淀粉含量降幅较大, 第 4 天升幅更小。兼养来源的藻细胞胞内淀粉含量于转接后第 1 天显著下降, 第

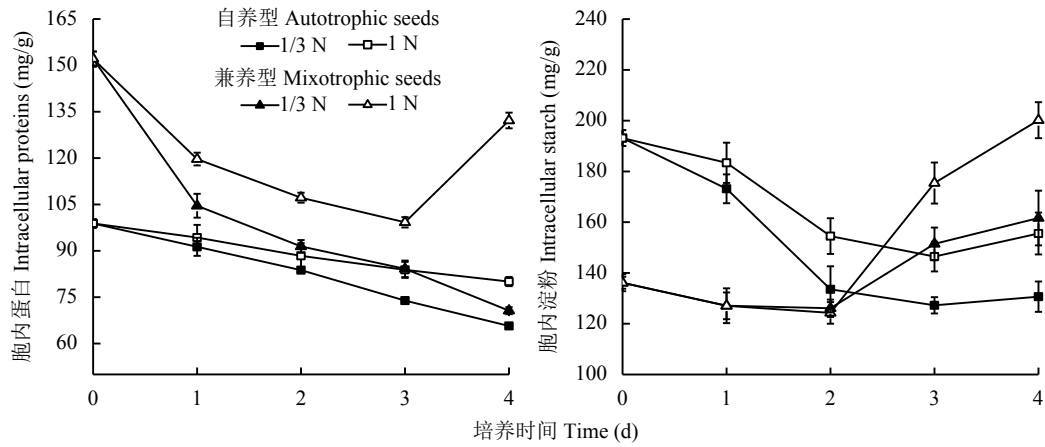


图 2 培养基供氮水平 1 N 和 1/3 N 时蛋白核小球藻胞内蛋白和淀粉含量变化

Fig. 2 Change in contents of intracellular proteins and starch of *Chlorella pyrenoidosa* grown in media with nitrogen supply levels of 1 N and 1/3 N

2~3 天维持在相对低值, 之后明显回升, 4 天时低氮组藻细胞胞内淀粉含量回升幅度也显著低于对照组。

2.4 低氮胁迫对不同来源蛋白核小球藻胞外蛋白和多糖含量的影响

图 3 表明, 兼养组藻细胞 EPS 中蛋白含量显著高于自养组, 所有藻细胞转接后 EPS 中蛋白含量均低于种子细胞的初始值。自养藻细胞对照组胞外蛋白含量持续下降, 低氮组则前 2 天逐渐降至最低值 2.69 mg/g, 之后有所回升。兼养藻细胞 EPS 中蛋白含量均持续降低, 低氮组同比对照组降幅更大, 4 天时低氮组藻细胞 EPS 蛋白含量比对照组低 33.2%。

所有试验组藻细胞 EPS 中多糖含量变化趋势一致, 均随培养时间的延长而逐渐降低。兼养组藻细胞胞外多糖含量同比高于自养组, 低氮组同比低于对照组。4 天时兼养低氮组藻细胞 EPS 中多糖含量

比对照组下降 37.7%。

2.5 低氮胁迫对不同来源蛋白核小球藻 EPS 组分和絮凝性能的影响

2.5.1 对藻细胞 EPS 组分的影响 以 1/3N 低氮胁迫处理第 4 天的藻细胞为例, 采用三维荧光扫描进一步比较了低氮胁迫处理对自养和兼养来源的藻细胞 EPS 组分的影响 (图 4)。自养与兼养组种子藻细胞 EPS 荧光扫描图谱均在 T、A 和 C 区各存在一个主峰 (图 4A、B), 分别代表不同类型的荧光基团。Chen 等^[25]对各峰的生化组分进行图谱解析可知, T 峰 (Ex/Em: 280/352 nm) 为蛋白样类色氨酸物质; A 峰 (Ex/Em: 230/373 nm) 是以富里酸为代表的类腐殖酸物质; C 峰 (Ex/Em: 330/373 nm) 是以胡敏酸为代表的类腐殖酸物质。T 峰代表的蛋白样类色氨酸物质中色氨酸属于疏水性氨基酸, 能促进藻细胞的

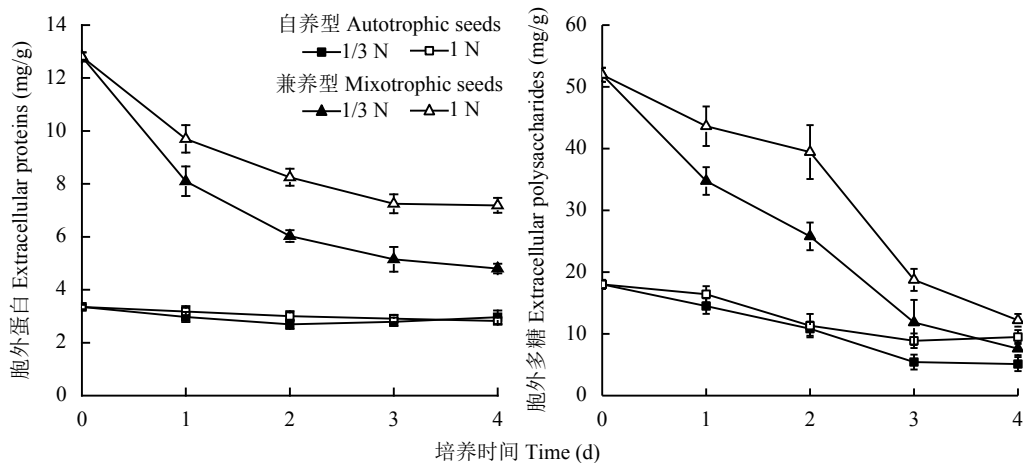


图 3 培养基供氮水平 1 N 和 1/3 N 时蛋白核小球藻胞外蛋白和多糖含量变化

Fig. 3 Change in contents of extracellular proteins and polysaccharides of *Chlorella pyrenoidosa* grown in media with nitrogen supply levels of 1N and 1/3N

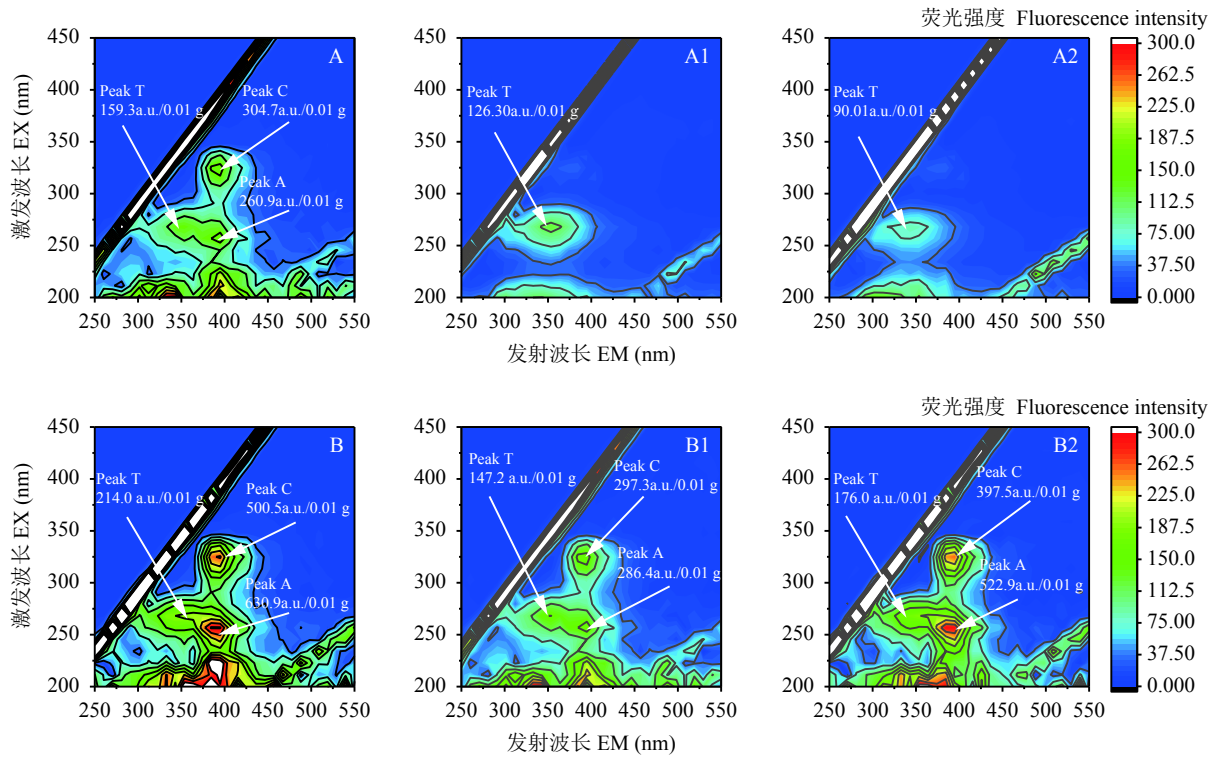


图 4 低氮胁迫影响蛋白核小球藻 EPS 组分的三维荧光光谱图

Fig. 4 The 3D fluorescence spectrums of *Chlorella pyrenoidosa* cell EPS components affected by low nitrogen stress

[注 (Note): EX—Excitation wavelength; EM—Emission wavelength. 荧光光谱图中白色斜线部分为水分子的散射效应造成, 位置相对固定不影响实验分析; 图 A 为自养种子藻细胞; 图 A1 为自养藻细胞 1/3 N 培养 4 天; 图 A2 为自养藻细胞 1N 培养 4 天; 图 B 为兼养种子藻细胞; 图 B1 为兼养藻细胞 1/3 N 培养 4 天; 图 B2 为兼养藻细胞 1N 培养 4 天。The white slanting part of the fluorescence spectrum due to the scattering effect by water molecules, the position was fixed relatively and didn't affect the experimental analysis. Fig. A is autotrophic seed algae cells; Fig. A1 is autotrophic algae cells cultured 4 days in 1/3 N; Fig. A2 is autotrophic algae cells cultured 4 days in 1 N; Fig. B is mixotrophic seed algae cells; Fig. B1 is mixotrophic algae cells cultured 4 days in 1/3 N; Fig. B2 is mixotrophic algae cells cultured 4 days in 1 N.]

絮凝, A 和 C 峰代表的腐殖酸类物质具有亲水性胶体性质, 在高浓度时呈胶体溶液或分散体系^[26], 会抑制藻细胞絮凝。其中兼养组藻细胞 EPS 中 T、A 和 C 峰强度比显著高于自养藻细胞。

与转接前种子藻细胞 (图 4A) 相比, 第 4 天自养对照组和低氮组藻细胞 EPS 荧光图中 A 峰和 C 峰均消失, T 峰强度明显减弱 (图 4A1、A2), 说明此时胞外类腐殖酸物质的含量极低, 蛋白样色氨酸物质含量也下降; 但 1/3N 低氮组 T 峰强度比对照组增加 40.3%, 说明低氮胁迫处理能适当减缓藻细胞 EPS 中

蛋白样色氨酸含量的降幅。兼养来源的藻细胞转接培养 4 d 后, EPS 荧光扫描图中 T、A 和 C 峰强度均显著降低, 其中 1/3N 低氮组 T 峰、C 峰和 A 峰的强度分别是对照组的 83.6%、74.8% 和 54.8% (图 4B、B1、B2), 差异显著, 可见低氮胁迫组 EPS 中腐殖酸类物质含量降幅较大。

2.5.2 对藻细胞絮凝率的影响 藻细胞 EPS 组分含量的改变可能影响其絮凝率, 测定自养和兼养来源种子藻细胞絮凝率和低氮胁迫处理 4 天后的絮凝率 (表 2)。兼养组藻细胞絮凝率显著低于自养组。经 1/3N

表 2 培养基供氮水平 1 N 和 1/3 N 时培养 4 天后蛋白核小球藻絮凝率 (%)

Table 2 Flocculating rate of *Chlorella pyrenoidosa* cells cultured in media containing NaNO_3 18 and 6 mmol/L for 4 days

培养天数 (d) Culture days	处理 Treatment	自养组 Autotrophic group	兼养组 Mixotrophic group
0	种子藻细胞 Seed algae cells	67.45 ± 2.19	46.29 ± 0.87
4	1/3 N	80.28 ± 3.02*	78.46 ± 2.36**
4	1 N	68.87 ± 3.13	63.65 ± 1.52**

注 (Note): *— $P < 0.05$; **— $P < 0.01$.

低氮处理 4 天后, 兼养和自养组藻细胞絮凝率为分别为 78.46% 和 80.28%, 均比对照组显著提高。

3 讨论

本结果表明, 自养与葡萄糖兼养来源的蛋白核小球藻转接入低氮培养基的第 1 天即开始生长分裂, 3 天后生长减缓(图 1), 说明低氮胁迫对藻细胞的促生长效应主要表现在培养初期。所有试验组藻细胞转接后初期油脂含量均显著下降, 随着培养时间延长, 1/6N 和 1/3N 低氮胁迫处理组油脂含量出现先下降后回升的拐点现象(图 1)。前人研究低氮胁迫提高藻细胞油脂含量的处理时间在 5~12 天之间, 检测间隔在 1~3 天之间^[6, 10, 27], 但一般藻细胞油脂含量随培养时间而升高, 未报道油脂含量升降拐点现象。原因可能在于不同藻种存储油脂的代谢功用存在差异, 油脂合成与分解代谢对培养环境变化的响应速率也不同。本文自养和兼养来源的藻细胞接入 1/3N 低氮培养基后油脂含量分别于第 2 天和 3 天出现回升拐点, 说明自养组蛋白核小球藻种子细胞对低氮胁迫的响应速度比兼养组更为迅速。但葡萄糖兼养来源的藻细胞不仅初始油脂含量较高(图 1), 胞内外蛋白和淀粉(多糖)含量也较丰富(图 2 和图 3), 1/3N 低氮胁迫 4 天后油脂产率最高, 同比是自养组藻细胞的 7.95 倍。说明种子细胞营养方式影响其对低氮胁迫处理的响应水平, 而且藻细胞生物量增长与生化组分积累并不同步。Griffiths 等^[7]报道除螺旋藻外, 小球藻、栅藻等 10 种微藻的生长速率和油脂含量均在 1/10N 低氮胁迫条件下最高。本研究中蛋白核小球藻的油脂含量在 1/3N 即 6 mmol/L 硝酸钠低氮处理条件下效果最佳。

对蛋白核小球藻胞内外蛋白和淀粉(多糖)含量的监测数据表明, 低氮组藻细胞胞内外蛋白、淀粉含量在培养初期均显著下降, 且降幅高于对照组(图 2 和图 3), 这与 Lee 等^[28]在莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 上的研究结果相似。莱茵衣藻在氮限制条件下, 氨基酸氧化酶的基因表达水平提高而淀粉的合成途径将会被阻断, 原因在于藻细胞为了适应低氮环境, 既加强了非必需蛋白的降解, 也阻断了淀粉合成对能量的消耗。但 Fernandes 等^[29]研究却发现, 氮限制条件下凯式拟小球藻细胞内淀粉首先积累, 待氮源耗尽之后, 油脂含量开始逐步上升, 说明淀粉是作为凯式拟小球藻碳与能量的初步储存物质。本研究发现自养与兼养来源的藻细胞在低氮胁迫初期, 油脂、淀粉和蛋白含量均迅速降低, 与此相应的是生物量的大幅升高, 待藻细胞生长逐步稳定的 3 天时, 油

脂和胞内淀粉作为储备能源才开始逐步回升(图 1 和图 2)。而且兼养和自养种子藻细胞油脂含量(图 1)和胞内淀粉含量高低变化同步, 低氮胁迫处理后二者回升拐点出现时间也基本一致(图 3), 由此可推测淀粉和油脂均作为蛋白核小球藻的储能物质, 合成基本同步或淀粉合成后很快转化为油脂储存。至于蛋白质含量指标, 除了兼养来源的藻细胞转接入 1N 对照培养基 3 天后胞内蛋白含量明显回升外, 其他组藻细胞转接后胞内外蛋白水平均维持在较低水平或持续下降, 低氮胁迫组下降更为明显(图 2 和图 3)。Geider 等^[30]报道三角褐指藻在氮胁迫条件下原初电子受体还原受阻而抑制了相关蛋白质的合成。Chen 等^[31]发现低氮胁迫后藻细胞蛋白质中部分氨基酸会发生分解代谢并能通过 γ -氨基丁酸途径、三羧酸循环再分配到脂质代谢途径进行油脂合成。本研究蛋白核小球藻在 1/3N 低氮胁迫 2 天或 3 天后藻细胞油脂含量回升但胞内外蛋白含量持续下降, 是否涉及蛋白降解氨基酸的转化分配有待进一步探究。

微藻细胞的收获成本在其生产成本中占比较大, 藻细胞 EPS 组成与藻细胞絮凝收获特性密切相关^[32]。本研究所用蛋白核小球藻自养种子细胞 EPS 胞外蛋白和多糖含量较低(图 3), 二者比值也较低, 而且含有一定比例的富里酸和胡敏酸类腐殖酸物质(图 4A), 这可能是其自絮凝率较低的原因。葡萄糖兼养的藻细胞 EPS 中对絮凝有促进作用的蛋白类色氨酸物质 T 峰强度比自养藻细胞增加 34.3%, 而不利于絮凝的腐殖酸类物质, A 峰和 C 峰强度却比自养组分别增加了 141.8% 和 64.3% (图 4), 这可能是葡萄糖兼养培养使藻细胞絮凝率下降的主要原因。与 1N 对照组相比, 1/3N 低氮组藻细胞 EPS 组分中蛋白类色氨酸和类腐殖酸物质均显著下降, 但 T 峰下降幅度低于 A 峰和 C 峰, 从而显著提高了藻细胞的絮凝率(图 4 和表 2)。可见培养基组成的改变能影响微藻细胞 EPS 组分从而影响其絮凝收获特性, 在微藻人工培养技术中引入该项指标具有重要意义。本研究结果能为蛋白核小球藻人工培养技术的优化设计提供科学依据。

4 结论

蛋白核小球藻作为新食品资源开发的优良藻种, 营养方式和低氮胁迫处理对其藻细胞生化组分积累转化动态和收获性能都具有显著影响, 而且胞内外不同组分的含量变化与其生长速率并不同步。1/3N 低氮胁迫提高蛋白核小球藻的油脂产率和絮凝性能的效果最佳。

参 考 文 献:

- [1] Wells M L, Potin P, Craigie J S, *et al.* Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2017, 29: 949–982.
- [2] Alimonti G, Brambilla R, Pileci R, *et al.* Edible energy: balancing inputs and waste in food supply chain and biofuels from algae[J]. *The European Physical Journal Plus*, 2017, 132: 14.
- [3] 蔡卓平, 吴皓, 骆育敏, 等. 经济微藻高密度培养技术及其生物资源化利用[J]. *生态科学*, 2016, 35(5): 220–224.
Cai Z P, Wu H, Luo Y M, *et al.* High density cultivation technology and bioresource utilization of economic microalgae[J]. *Ecological Science*, 2016, 35(5): 220–224.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 关于批准蛋白核小球藻等4种新资源食品的公告[R]. 2012-01-12.
Ministry of Health, PRC. Announcement on approval of four new food resources such as *Chlorella globosa*[R]. 2012-01-12.
- [5] Procházková G, Brányiková I, Zachleder V, *et al.* Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae[J]. *Applied Phycology*, 2014, 26(3): 1359–1377.
- [6] Adams C, Godfrey V, Wahlen B, *et al.* Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content trade off in oleaginous green microalgae[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 131: 188–194.
- [7] Griffiths M J, van Hille R P, Harrison S T L. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2012, 24(5): 989–1001.
- [8] 代瑞华, 刘会娟, 曲久辉, 等. 氮磷限制对铜绿微囊藻生长和产毒的影响[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(9): 1739–1744.
Dai R H, Liu H J, Qu J H, *et al.* The effects of nitrogen limitation and phosphorus limitation on the growth and microcystin production of *Microcystis aeruginosa*[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(9): 1739–1744.
- [9] 吴桂秀, 高保燕, 周芷薇, 等. 高、低氮浓度对2株真眼点藻的生长和油脂积累的影响[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(8): 1442–1452.
Wu G X, Gao B Y, Zhou Z W, *et al.* Effects of high and low nitrogen concentration on the growth and lipids accumulation pattern of two oleaginous microalgae[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(8): 1442–1452.
- [10] Gong Y M, Guo X, Wan X, *et al.* Triacylglycerol accumulation and change in fatty acid content of four marine oleaginous microalgae under nutrient limitation and at different culture ages[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2013, 53(1): 29–36.
- [11] Ashira R, Gray V M, Sym S. Influence of nitrogen stress on *Isochrysis galbana* strain U4, a candidate for biodiesel production[J]. *Phycological Research*, 2014, 62(4): 237–249.
- [12] Kawata M, Nanba M, Matsukawa R. Isolation and characterization of a green alga *Neochloris sp.* for CO₂ fixation[J]. *Studies in Surface Science and Catalysis*, 1998, 114: 637–640.
- [13] Li Y T, Han D X, Hu G R, *et al.* Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 107(2): 258–268.
- [14] Zhang C S, Hawley S A, Zong Y, *et al.* Fructose-1, 6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK[J]. *Nature*, 2017, 548: 112–116.
- [15] Parker C. The effects of environmental stressors on biofilm formation of *Chlorella vulgaris*[D]. Boone, NC: MS Thesis of Appalachian State University, 2013.
- [16] Barros A I, Goncalves A L, Simões M, *et al.* Harvesting techniques applied to microalgae: A review[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2015, 41: 1489–1500.
- [17] Stanier R Y, Kunisawa R, Mandel M, *et al.* Purification and properties of unicellular blue-green algae(*Order chroococcales*)[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1971, 35: 171–205.
- [18] Zhao P, Yu X Y, Li J J, *et al.* Enhancing lipid productivity by co-cultivation of *Chlorella sp. U4341* and *Monoraphidium sp. FXY-10*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 117(1): 72–77.
- [19] 任洁, 郎筱宇, 刘志媛. 三种脂染色法快速检测小球藻油脂相对含量[J]. *农业生物技术学报*, 2015, 23(7): 967–972.
Ren J, Lang X Y, Liu Z Y. Rapidly determining relative lipid level of *Chlorella vulgaris sp.* by three dyeing methods[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, 23(7): 967–972.
- [20] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1): 248–254.
- [21] 徐斌, 孟迎迎, 杨海波, 等. 海洋微藻淀粉含量的测定[J]. *广东农业科学*, 2012, 18: 130–132.
Xu P, Meng Y Y, Yang H B, *et al.* Detection of starch content in marine microalga[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 18: 130–132.
- [22] Yang S F, Li X Y. Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on the characteristics of activated sludge under non-steady-state conditions[J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44: 91–96.
- [23] Lv J P, Guo J Y, Feng J, *et al.* A comparative study on flocculating ability and growth potential of two microalgae in simulated secondary effluent[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 205: 111–117.
- [24] Alam M A, Wan C, Guo S L, *et al.* Characterization of the flocculating agent from the spontaneously flocculating microalga *Chlorella vulgaris* JSC-7[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 118(1): 29–33.
- [25] Chen W, Westerhoff P, Leenheer J A, *et al.* Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter[J]. *Environmental Science Technology*, 2003, 37(24): 5701–5710.
- [26] Wilen B M, Jin B, Lant P. The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculation properties[J]. *Water Research*, 2003, 37: 2127–2139.
- [27] 吴桂秀, 黄罗冬, 高保燕, 等. 不同氮源及其浓度对标志链带藻合成淀粉和油脂的影响[J]. *微生物学报*, 2016, 56(7): 1168–1177.
Wu G X, Huang L D, Gao B Y, *et al.* Effects of different nitrogen sources and concentrations on starch and lipid biosynthesis by *Desmodesmus insignis*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(7): 1168–1177.
- [28] Lee D Y, Park J J, Barupal D K, *et al.* System response of metabolic networks in *Chlamydomonas reinhardtii* to total available ammonium[J]. *Molecular Cell Proteomics*, 2012, 11: 973–988.
- [29] Fernandes B, Teixeira J, Dragone G, *et al.* Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 144: 268–274.
- [30] Geider R G, Roche J L, Greene R M, *et al.* Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricoratum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation[J]. *Journal of Phycology*, 1993, 29: 755–766.
- [31] Chen H, Zheng Y L, Zhan J, *et al.* Comparative metabolic profiling of the lipid-producing green microalga *Chlorella* reveals that nitrogen and carbon metabolic pathways contribute to lipid metabolism[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 153.
- [32] Salim S, Kosterink N R, Wacka N T, *et al.* Mechanism behind autoflocculation of unicellular green microalgae *Ettlia texensis*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 174: 34–38.