

氮源对小球藻光合作用和色素积累的影响

赵华, 董晓宇, 夏媛媛, 牛堃

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 本文研究了自养培养条件下尿素、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NaNO_3 四种氮源对小球藻 (*Chlorella sp.* TCCC45058) 生长、光合作用以及叶绿素 a 产率的影响。实验结果显示, NaNO_3 是 *Chlorella sp.* TCCC45058 生长的最佳氮源, 以 NaNO_3 为氮源时得到最高细胞密度 4.1×10^7 个/mL; 而尿素对藻细胞色素积累最有利, 最高叶绿素 a 产率达到 21 mg/g。培养过程中, 不同氮源会对培养液 pH 造成不同影响, 以 NaNO_3 为氮源时, 随着 NO_3^- 的消耗培养液 pH 会出现显著的上升; 以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时 pH 呈下降趋势; 而尿素和 NH_4NO_3 则不会对其产生明显影响。将 pH 维持在中性不会对各组氮源培养效果产生显著影响, 因此实际生产中无需对培养基 pH 做全程控制。

关键词: 小球藻; 氮源; 生长速率; 光合作用; 叶绿素 a

文章编号: 1673-9078(2012)4-367-370

Effects of Nitrogen Source on Photosynthesis and Pigment Accumulation of *Chlorella sp.* TCCC45058

ZHAO Hua, DONG Xiao-yu, XIA Yuan-yuan, NIU Kun

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Industrial Microbiology Key Laboratory, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In the study, effects of four kinds of nitrogen source (carbamide, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and NaNO_3) on biomass, photosynthesis and Chlorophyll A productivity of *Chlorella sp.* TCCC45058 under autotrophy condition was investigated. The highest cell density (4.1×10^7 /mL) of *Chlorella sp.* TCCC45058 was acquired when NaNO_3 was used as nitrogen source. The optimal nitrogen source for pigment accumulation of *Chlorella sp.* TCCC45058 was carbamide, with which the highest Chlorophyll A productivity of cell was found as 21 mg/g. Different nitrogen source showed varied influences on medium pH. When NaNO_3 was used as nitrogen source, medium pH rose significantly with consuming of NO_3^- . Use of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as nitrogen source resulted in reduced medium pH. Carbamide and NH_4NO_3 had little effect on it. When medium pH was controlled at neutral, the result of culture has not improved. Therefore, it was unnecessary to adjust medium pH throughout the cultivation.

Key words: chlorella; nitrogen source; growth rate; photosynthetic; chlorophyll A

近年来, 小球藻作为营养功效食品已经得到了广泛的认可^[1]。小球藻是一种单细胞绿藻, 具有旺盛的光合作用, 在自生长的同时能够有效同化 CO_2 , 同时积累丰富的蛋白质、多糖、藻油以及纤维素等物质^[2,3]。其中含有的小球藻生长因子能够有效改善机体免疫功能, 同时对啤酒酵母、乳酸菌等微生物也表现出了显著的益生作用^[4,5]。

小球藻的培养工艺对产量影响很大, 其中氮源的选择至关重要, 不同氮源对微藻生长、营养物积累以及细胞培养密度等指标都会造成显著影响^[6]。目前应用于微藻培养的氮源主要有铵态氮、硝态氮、和尿素。微藻对不同氮源的利用效率是不同的, 特别是在高密

度培养状态下, 适宜的氮源有助于促进微藻生长、维持培养基 pH, 为其提供适宜的生长环境, 提高藻细胞的培养密度^[7]。因此有必要确定出适于藻种生长的氮源, 从而提高生产效率。

本研究考察了不同氮源对小球藻 *Chlorella sp.* TCCC45058 生长、光合作用速率、叶绿素 a 产率以及培养液 pH 变化的影响, 确定了该藻在自养培养条件下的最优氮源。

1 材料与方法

1.1 藻种

小球藻 (*Chlorella sp.* TCCC45058), 分离自海河表层水体, 保藏于天津科技大学微生物菌种保藏管理中心。

1.2 培养基^[8]

收稿日期: 2012-01-05

作者简介: 赵华 (1963-), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事微生物发酵与生物分离工程研究

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.16 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.075 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.036 g, 柠檬酸 0.006 g, 柠檬酸铁铵 0.006 g, Na_2EDTA 0.001 g, A_5+Co 溶液 1 mL, 用水定容至 1 L。

A_5+Co 溶液: H_3BO_3 2.86 g, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1.81 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.22 g, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.39 g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.08 g, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.04 g, 用水定容至 1 L。

1.3 培养方法

以 0.005 mol/L 氮元素的用量分别用尿素、 NH_4NO_3 、 $(NH_4)_2SO_4$ 和 $NaNO_3$ 作为培养基氮源, 温度 28 °C、光照强度 2000 Lux、光暗时间比 24:0、初始 pH 调整到 6.5~7.0、初始菌浓约为 2×10^6 个/mL 静置培养, 每组 3 个重复, 48 h 取样一次。以藻细胞生长速率、叶绿素 a 产率、光合作用速率以及 pH 变化情况确定出最优氮源。

1.4 细胞浓度及生物量的测定^[9]

细胞的直接计数用 16×25 规格血球计数板完成。取 100 mL 藻液, 4500 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 于 80 °C 烘干 36 h 称重, 即得到藻细胞的生物量。此外, 以新鲜培养基作为空白, 将藻液混匀后测定其 680 nm 波长下的吸光度, 再根据所对应的菌浓和生物量, 绘制出标准曲线, 如图 1 所示。

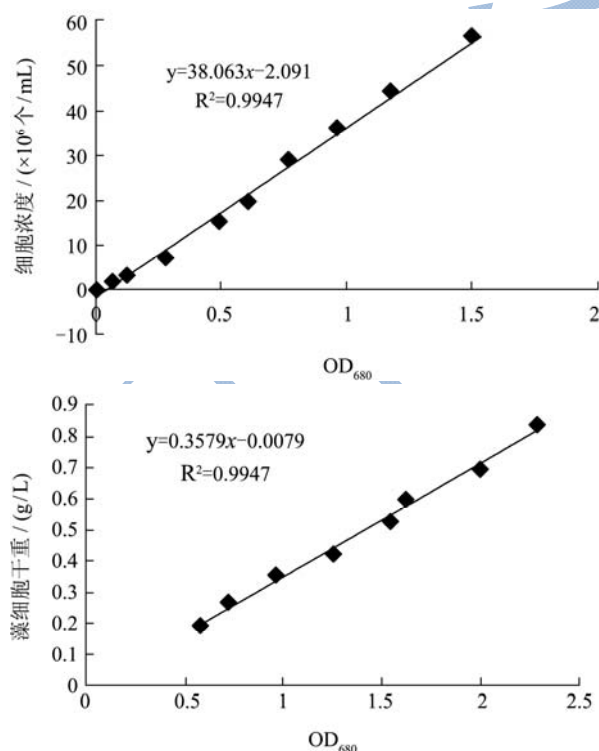


图1 藻细胞生物量同培养液吸光度关系

Fig.1 Standard curves of dry biomass

1.5 光合作用速率的测定^[10]

通过黑白瓶法对 *Chlorella sp.* TCCC45058 光合作

用速率进行定量分析。准备两个 500 mL 三角瓶 A 和 B, 装液量 150 mL, 分别接入新鲜种子液, 接种量为 10^7 个/mL, 其中 A 瓶裹黑布避光, B 瓶曝光, 将两瓶同时置于培养箱中培养 3 h 后取出, 以 A 瓶作为 DO 100%点测定 B 瓶 DO 值, 利用 DO_B 来反应微藻光合作用速率。

1.6 藻细胞叶绿素 a 含量的测定^[11]

取 5 mL 藻液混匀, 直接测定 680 nm 波长处的吸光度。再取 5 mL 藻液于离心管中, 4000 r/min 离心 20 min, 弃去上清液, 加入 5 mL 96% (V/V) 的甲醇, 混匀, 于 4 °C 冰箱中提取 48 h, 再以 4000 r/min 离心 20 min, 测定上清液 665 nm 波长处的吸光度。计算公式为:

$$\text{叶绿素 a 浓度}(\mu\text{g/mL})=13.9 \times OD_{665} \times \text{稀释倍数}$$

$$\text{叶绿素 a 产率}(\text{mg/g})=(13.9 \times OD_{665}) / (0.3579 \times OD_{680} - 0.0079)$$

2 结果与讨论

2.1 自由pH时氮源对 *Chlorella sp.* TCCC45058 生长、光合作用速率、细胞叶绿素 a 产率的影响

作为最主要的营养物质之一, 氮源对微藻生长影响显著, 而生长速率和细胞产量是重要的评价指标。在本研究中, 选择了目前常用于绿藻培养的的几种氮源: 硝酸钠、硝酸铵、硫酸铵、尿素分别做了考察, 实验结果如图 2、3、4 所示。由于施以不同氮源时培养液初始 pH 会有所不同, 因此, 实验开始时将各对照组培养液 pH 均调整到 6.7~7.2 之间, 培养过程中 pH 自由变化, 不作控制。

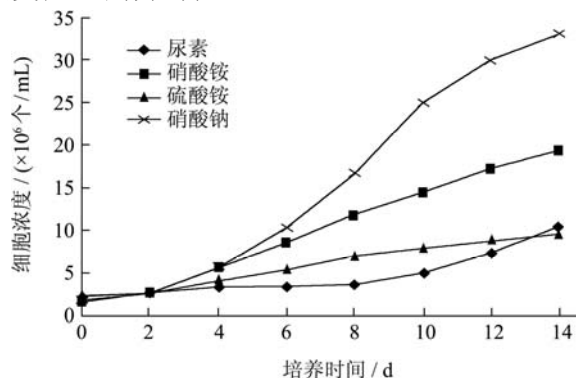


图2 氮源对 *Chlorella sp.* TCCC45058 生长的影响

Fig.2 Effects of nitrogen source on the growth of *Chlorella sp.* TCCC45058

如图 2 所示, 以 $NaNO_3$ 作为氮源时, *Chlorella sp.* TCCC45058 生长速度最快, 细胞密度最高, 显著高于其他三种氮源。在 0~2 d 时, 四种氮源的的培养效果差异并不明显, 在 2~4 d 时, 四个对照组之间开始有所差异, 而其中 $NaNO_3$ 和 NH_4NO_3 组差异仍不明显, 此后, $NaNO_3$ 组出现了典型的对数生长期, 直到 10 d

以后生长速度才略微下降,而其他三组生长速度一直处于较低水平,其中施以尿素的对照组培养效果最差,在0~7 d范围内生长几乎停滞。但值得注意的是,尿素组在第8 d以后开始展现出生长趋势,且速度逐渐加快,直到第14 d时其细胞密度甚至超过了(NH₄)₂SO₄组。

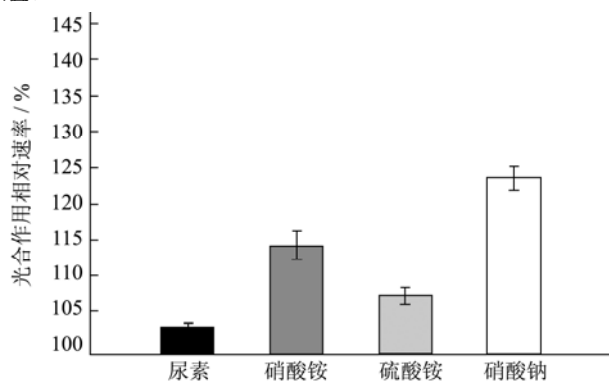


图3 氮源对藻细胞光合作用相对率的影响

Fig.3 Effects of nitrogen source on photosynthesis rate of cell

如图3所示,各对照组的光合作用相对速率同图2中的生长速度趋势相同,这也从侧面反映了藻类光合作用同其生长状况的密切关联。光合作用相对速率从小到大依次为尿素、(NH₄)₂SO₄、NH₄NO₃、NaNO₃,四组之间差异明显,其中NaNO₃组的光合作用相对速率达到尿素组的7.15倍。

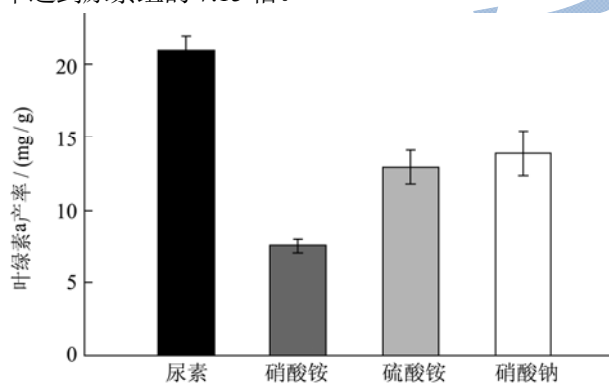


图4 氮源对藻细胞叶绿素a产率的影响

Fig.4 Effects of nitrogen source on Chlorophyll a productivity of cell

如图4所示,相比较发现,施以尿素的对照组细胞叶绿素a产率最高,明显高于其他三组,达到21 mg/g,而NH₄NO₃组的叶绿素a产率最低,仅为7.6 mg/g。这与藻细胞生长速率、光合作用速率的趋势是不一致的。

有报道称以生物量和细胞色素产量来评价,尿素是小球藻培养的最佳氮源^[3]。但是以上实验结果与报道有较大分歧。本实验中,以尿素作为氮源时,尽管细胞色素产率最高,但是其在第8 d才进入对数生长

期,而且进入对数生长期后,其比生长速率也低于其它几种氮素,细胞密度也最低。

综合以上实验结果,在pH自由变化的培养条件下,NaNO₃为*Chlorella sp.* TCCC45058生长的最佳氮源,尿素为其叶绿素a积累的最佳氮源。

2.2 培养过程中氮源对培养液pH的影响

以上实验中,仅在开始时将培养液pH调整到7.0左右,之后培养液pH处于自由状态。氮源作为培养液中的大量营养盐,在消耗过程中会造成培养液pH的变化,由于氮源的不同,pH的变化方向和变化程度也都各不相同。图5显示了以上实验中各组培养液pH的变化情况。

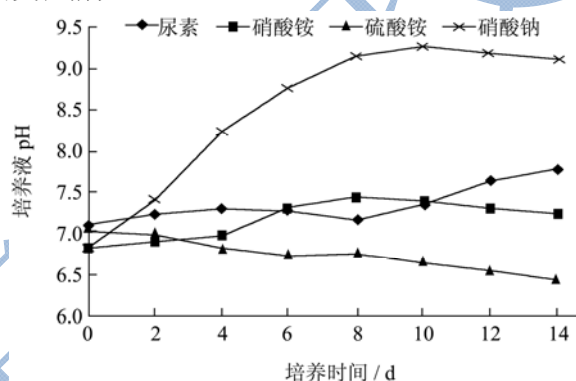


图5 培养过程中氮源对溶液pH的影响

Fig.5 Effects of nitrogen source on the solution pH in the course of culturing

如图5所示,以NaNO₃作氮源时,培养液pH出现了明显的上升,在0~4 d之内就达到了8.5以上,到第10 d时,超过了9.3,此后出现略微下降但基本保持稳定。当以(NH₄)₂SO₄作为氮源时,培养液pH呈下降趋势,但并不明显,到第14 d培养结束时,下降到6.5以下。其他两个对照组的培养液pH变化不大,且无明显规律。综合上述结果可以看出,以NaNO₃作氮源时,NO₃⁻被微藻利用,溶液中Na⁺同其他弱酸根离子形成强碱弱酸盐导致培养液pH上升;而以(NH₄)₂SO₄为氮源时,NH₄⁺作为氮源被利用,培养液pH随之下降。

2.3 pH相对固定时氮源对*Chlorella sp.* TCCC45058生长、光合作用速率、细胞叶绿素a产率的影响

有报道称小球藻的最适pH范围为5.5~8.0^[4],而氮源的不同会对培养液pH产生影响,从而影响藻的生长繁殖。因此,以上实验结果可能是受到了不同pH的影响而得到的,有必要在pH相对固定的条件下探讨以上四种氮源的优劣。于是其他条件不变重复以上实验,每天调整培养液pH到7.0~8.0,实验结果见图6、7、8。

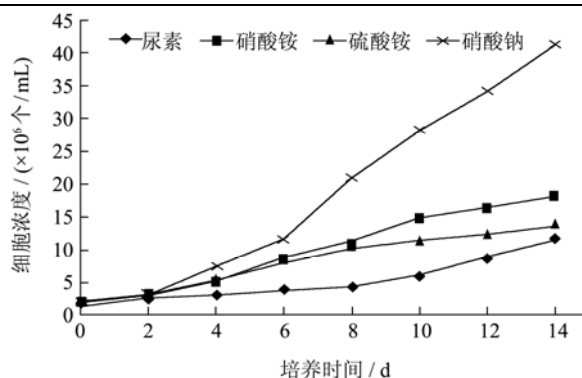


图6 pH 相对固定时氮源对藻细胞生长的影响

Fig.6 Effects of nitrogen source on cell when fixation the pH

如图 6 所示, 将 pH 维持在 7.0~8.0 时尿素和 NH_4NO_3 的培养效果没有出现明显影响, 而 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NaNO_3 的培养效果出现了一定程度提高, 特别是 NaNO_3 组, 直到第 14 d 生长速度仍没有出现下降, 对数期得到了明显延长。

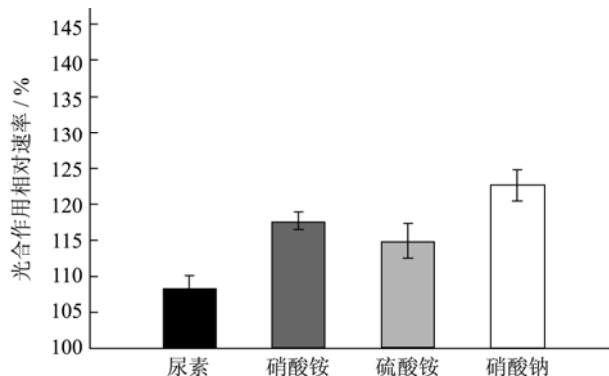


图7 pH 固定时氮源对藻细胞光合作用相对速率的影响

Fig.7 Effects of nitrogen source on photosynthesis rate of cell when fixation the pH

如图 7 所示, 当固定培养液 pH 时, 各对照组的光合作用相对速率仍保持原来的趋势, 没有表现出明显差异。

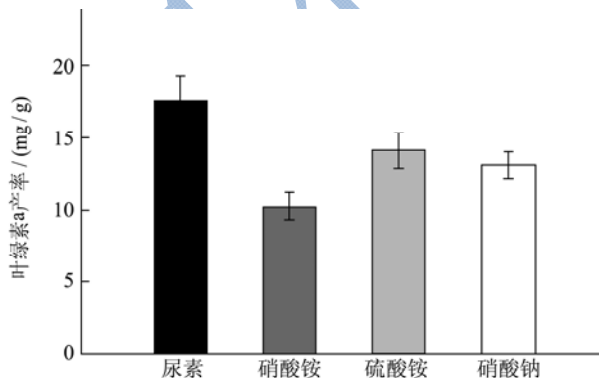


图8 pH 相对固定时氮源对藻细胞叶绿素 a 产率的影响

Fig.8 Effects of nitrogen source on Chlorophyll a productivity of cell when fixation the pH

如图 8 所示, 当培养液 pH 固定在中性时, 各对照组藻细胞叶绿素 a 产率也保持在原来的趋势, 产率

最高的氮源仍为尿素。

以上结果表明, 同自由 pH 相比, 将培养液 pH 固定在中性条件下能够在一定程度上促进 *Chlorella sp.* TCCC45058 生长, 但是这种促进作用并不明显, 其生物量、叶绿素 a 积累的最优氮源仍然为 NaNO_3 和尿素。综上所述, 在实际生产中无需对培养液 pH 做控制, 培养效果不会受到影响。

3 结论

3.1 NaNO_3 为 *Chlorella sp.* TCCC45058 生长的最佳氮源, 以 NaNO_3 作为氮源时其生长速率最快、光合作用最旺盛, 同时具有明显的对数生长期, 最高细胞密度达到 4.1×10^7 个/mL; 以尿素为氮源时, 藻细胞生长缓慢, 但是其叶绿素 a 产率最高, 达到 21 mg/g;

3.2 以 NaNO_3 为氮源时, 随着 NO_3^- 的消耗培养液 pH 会出现显著的上升; 以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时 pH 呈下降趋势; 而培养过程中尿素和 NH_4NO_3 的消耗则不会对培养液 pH 产生明显影响;

3.3 同自由 pH 相比, pH 维持在中性时不会对各组氮源的培养效果产生显著影响, 各组氮源的培养效果仍保持原来的趋势, 因此在实际生产中无需对培养基 pH 做全程控制。

参考文献

- [1] 孙维宝,李龙囡,张继,等.小球藻的营养保健功能及其在食品工业中的应用[J].食品科学,2010,9:323-328
- [2] 厉剑剑,张文焕,黄惠华.超临界 CO_2 萃取小球藻精油及其抗氧化分析[J].现代食品科技,2011,27(8):938-941
- [3] John RP, Anisha GS, Nampoothiri KM, et al. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(1): 186-193
- [4] 韩士群,张振华,刘海琴.小球藻生长因子对免疫功能的影响[J].中国生化药物杂志,2004,1:5-7
- [5] 韩士群,常志州,郑勤.小球藻生长因子对啤酒和乳酸发酵的影响[J].食品科学,2001,10:54-56
- [6] McDonald SM, Plant JN, Worden AZ. The mixed lineage nature of nitrogen transport and assimilation in marine eukaryotic phytoplankton: a case study of micromonas [J]. Molecular Biology and Evolution, 2010, 27(10): 2268-2283
- [7] 杨艳婧,王冰芳,廖晓霞,等.木薯淀粉水解液对小球藻生物量和油脂含量的影响[J].现代食品科技,2009,25(11):1275-1278
- [8] Yoon, Jong Hyun, Jong-Hwan Shin, et al. High Cell Density Culture of *Anabaena variabilis* with Controlled Light Intensity and Nutrient Supply [J]. Journal of Microbiology

- and Biotechnology, 2008, 18(5), 918-925
- [9] 吕旭阳,张雯,杨阳,等.分光光度法测定小球藻数量的方法研究[J].安徽农业科学,2009,37(23):11104-11105
- [10] 章宗涉,张扬东.水生高等植物马来眼子菜和金鱼藻的初级生产率.湖泊科学,1992,4(4):61-64
- [11] 范燕.提取测定大型海藻叶绿素 a 的新方法研究[D].青岛:中国海洋大学,2004

现代食品科技