

Effect of Light Intensity on Growth Rate and Accumulation of Organics of *Nannochloropsis oculata* Droop

Xiaofeng Du, Ning Zou, Donghong Sun, Lin Chang, Ping Zhao

College of Life Sciences, Ludong University, Yantai

Email: efeng000999@163.com; ningzou76@126.com

Received: Sep. 13th, 2011; revised: Oct. 27th, 2011; accepted: Nov. 14th, 2011.

Abstract: Influence of light intensities on growth rate and organics contents of *Nannochloropsis oculata* was studied. The results showed that the light intensity within 1000 lx and 10,000 lx, the specific growth rate, soluble protein, and carotenoids contents increased at first and reached the maximum under 5000 lx, then decreased under 10,000 lx, the maximums are 0.101%, 3.8% and 0.8%. The maximal cell density increased with the increase of light intensity, the maximum is $6.52 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$. Polysaccharide and lipid contents increased and reached the maximum under 2000 lx, then decreased with the increase of light intensity, the maximums are 3.17% and 36.95%. Chlorophyll content decreased with increase of light intensity, the maximum is 0.35%.

Keywords: *Nannochloropsis oculata* Droop; Light Intensity; Specific Growth Rate; Organics

光照强度对微绿球藻生长及有机质积累的影响

杜晓凤, 邹宁, 孙东红, 常林, 赵萍

鲁东大学生命科学学院, 烟台

Email: efeng000999@163.com; ningzou76@126.com

收稿日期: 2011年9月13日; 修回日期: 2011年10月27日; 录用日期: 2011年11月14日

摘要: 本文以微绿球藻(*Nannochloropsis oculata* Droop)为材料, 在室内研究了光照强度对藻细胞生长及细胞内几种有机物质含量的影响。结果表明, 在 1000 lx~10,000 lx 的光强范围内, 比生长速率、可溶性蛋白、类胡萝卜素的含量随光照强度的增加而增加, 在 5000 lx 时达到最高, 最高值分别为 0.101%、3.8%、0.8%, 在 10,000 lx 时反而降低; 最高细胞密度随光照强度的增强而增大, 10,000 lx 时达到最高, 为 $6.52 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$; 多糖、总脂含量随光照强度的增加而增加, 在 2000 lx 时达到最高, 最高值分别为 3.17%、36.95%, 在 10,000 lx 时又降低; 叶绿素的含量随光照强度的增强而减小, 1000 lx 时最高, 为 0.35%。

关键词: 微绿球藻; 光照强度; 比生长速率; 有机物质

1. 引言

微绿球藻也称眼点拟微球藻, 是一种海洋单细胞微藻, 具有繁殖迅速、易培养、营养丰富等特点, 细胞球形或椭圆形, 直径 $2 \mu\text{m}$ ~ $4 \mu\text{m}$ ^[1]。该藻含有的 PUFA 是海水仔鱼、虾蟹贝等幼体的必需脂肪酸, 能够提高海产动物生长率和幼体的存活率^[2,3], 其中 EPA 含量丰富, 是生产高纯度 EPA 产品的极好原料, 国际上已经用作健康食品和药品^[4], 加上其细胞壁极薄, 易于消化吸收, 在水产养殖及生物活性物质提取方面具有重要的经济价值^[5], PUFA 对人体也有非常重要的作用, 可防治多种心血管疾病, 促进儿童智力

及心理发育; 该藻油脂含量丰富, 在生物能源方面具有广阔的应用前景, 油脂含量占干重的 31%~68%^[6], 魏东测得其总脂含量在稳定期达到最高, 为干重的 43.3%^[7]。微绿球藻无论在水产养殖、保健品开发, 还是生物能源方面, 都具有广阔的开发前景。

光在水中以指数形式衰减, 所以光照强度可以成为影响藻类生长的因素之一, 在一定的 pH、温度和营养条件下, 光照强度影响着光合作用产物的多少, 从而影响藻类的生长和细胞浓度^[8]。光照强度对微绿球藻生长、色素、总脂、脂肪酸组成的影响等方面已有一些研究^[3,9-13], 但除了对脂肪酸组成的影响方面

研究较深入外, 其他方面都不够全面深入, 且对可溶性蛋白、多糖的研究较少, 本实验研究了光照强度对微绿球藻多方面的影响, 研究较全面。

本文采用气升式光生物反应器对微绿球藻进行高密度培养, 研究其不同光照强度下的生长状况及有机质含量, 为光照强度对微绿球藻的影响提供补充资料, 也为该藻的工业化大规模培养及营养物质开发利用提供一定的参考价值。

2. 材料与方法

2.1. 材料

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

2.2. 培养方法及培养条件

采用气升式光生物反应器, 光径 5 cm, 容量 10 L, 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。培养所用海水为自然海水, 过滤灭菌后使用, 培养基配方参见邹宁等(2005)^[14]。在完全相同的光生物反应器中同时接入相同的藻种, 控制接入后的藻种密度相同或接近, 在相同的条件下培养。培养基的初始 pH 为 8.0, 温度为 23°C~26°C, 设置 1000 lx、2000 lx、5000 lx、10,000 lx 4 个光照强度梯度, 每个光照强度 3 个平行, 光周期为 L10:D14, 通气时间为 24 h。

2.3. 实验方法

2.3.1. 生长测定方法

每天定时取样, 每个反应器内取 3 个样品, 用血球计数板计数细胞密度, 用紫外分光光度计测定吸光值。生长计算公式为: 比生长速率

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_1 - t_2)^{[15]}$$

2.3.2. 微藻采收

采收处于稳定期的藻液, 用大型离心机离心, 3000 r/min 离心 30 min, 藻泥用去离子水洗 2~3 次, 于电热鼓风干燥箱中 65°C 烘干至恒重。将烘干的藻粉置于干燥皿中待用。

2.3.3. 多糖含量的测定

准确称取 0.15 ± 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°C

冰箱中反复冻融三次, 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 50 mL, 每组采用三个平行。采用蒽酮法测定多糖的含量^[16]。

2.3.4. 可溶性蛋白含量的测定

准确称取 0.15 ± 0.01 g 藻粉于 5 mL 离心管中, 加入 2 mL 蒸馏水, 在混匀器上混匀后, 置于-20°C 冰箱中反复冻融三次, 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, 每组采用三个平行。采用考马斯亮蓝法测定蛋白含量^[17]。

2.3.5. 叶绿素含量的测定

准确称取 0.15 ± 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°C 冰箱中反复冻融三次。加入 5 mL 80%的丙酮, 混匀后置于 4°C 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 3 h 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^[18]。

2.3.6. 总脂含量的测定

准确称取 0.15 ± 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°C 冰箱中反复冻融三次。加入 5 mL 工业酒精, 混匀后在室温下提取 3 h, 6000 rpm 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, 称重, 计算总脂含量。

2.3.7. 数据的处理

实验所得数据用 SPSS 16.0 软件进行处理。

3. 结果分析

3.1. 光照强度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, 通过实验得出光照强度对微绿球藻比生长速率 μ 及最高细胞密度的影响如表 1。

实验结果表明, 微绿球藻在 1000 lx~10,000 lx 的光强范围内均能生长, 且延滞期短, 1000 lx 和 2000 lx 光强下第四天开始快速生长, 5000 lx 和 10,000 lx 光强下第三天即开始快速生长, 可知微绿球藻喜强光, 且适光范围较广。

Table 1. Effects of light intensities on the specific growth rate and maximal cell density of *N. oculata*
表 1. 光照强度对微绿球藻比生长速率 μ 及最高细胞密度的影响

光照强度(Lx)Light intensity	1000	2000	5000	10,000
比生长速率 μ Specific growth rate	0.082 ± 0.001528 A	0.084 ± 0.001155 A	0.101 ± 0.001732 B	0.093 ± 0.001000 C
最高细胞密度($\times 10^7 \text{mL}^{-1}$) Maximal cell density	3.680 ± 0.02646 A	3.920 ± 0.03215 B	6.125 ± 0.04359 C	6.520 ± 0.06351 D
单位面积产量($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$) Yield per unit area	0.949 ± 0.013776 A	1.150 ± 0.023094 B	1.636 ± 0.005774 C	2.085 ± 0.014434 D
单位体积产量($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) Yield per unit volume	18.895 ± 0.072169 A	22.886 ± 0.077960 B	32.569 ± 0.063509 C	41.512 ± 0.046188 D

注: 表中同行不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著($p < 0.01$), 以下表 2 同。

经方差分析和多重比较, 光照强度对微绿球藻生长的影响极显著($p < 0.01$), 在 1000 lx~10,000 lx 光强范围内, 比生长速率随光照强度的增加而增加, 在 5000 lx 时达到最高, 为 0.101, 在 10,000 lx 时反而降低。强光组与弱光组间差异极显著($p < 0.01$), 说明强光可明显促进微绿球藻的生长, 这与蒋霞敏等人的研究结果一致^[10,11]; 最高细胞密度随光照强度的增强而增大, 10,000 lx 组最大, 为 $6.520 \times 10^7 \text{mL}^{-1}$ 、5000 lx 组次之, 为 $6.125 \times 10^7 \text{mL}^{-1}$, 四个水平间差异极显著($p < 0.01$)。光强对单位面积产量和单位体积产量的影响与最高细胞密度的结果一致, 最高值均在 10,000 lx 组, 分别为 $2.085 \text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ 、 $41.512 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。可知弱光不利于微绿球藻生长, 培养时提供强光可增大细胞密度, 提高产量。

3.2. 光照强度对微绿球藻有机物质含量的影响

不同光照强度对微绿球藻有机物质含量的影响见表 2。

由表 2 可以看出, 2000 lx 和 5000 lx 组的可溶性蛋白含量最高, 分别为 3.6%和 3.81%, 各组差异极显著。在同样的温度条件下, 强光和弱光都不利于可溶性蛋白的积累。5000 lx 光照下可溶性蛋白含量最高, 这与比生长速率的结果一致, 可能是由于细胞的快速生长, 积累了大量的蛋白。

2000 lx 组多糖含量最高, 为 3.17%, 5000 lx 次之, 为 2.94%, 各组间差异极显著。在同样的温度条件下, 强光和弱光都不利于多糖的积累。2000 lx 光照下多糖含量最高, 可能是由于弱光下细胞生长缓慢, 多糖积累量少, 而强光下细胞过快繁殖, 消耗了大量能量, 使多糖积累较少。

不同光强下微绿球藻的两种色素含量如图 1。

微绿球藻细胞内的叶绿素含量随着光照强度的增强而减少, 1000 lx 光强下叶绿素含量最高, 为 0.3504%, 与 2000 lx 组差异不显著, 说明弱光有利于叶绿素的积累, 10,000 lx 光强下的叶绿素含量最低, 光照强度过强时, 会破坏原生质, 引起叶绿素分解。微绿球藻缺乏叶绿素 b^[19], 叶绿素主要为叶绿素 a。类胡萝卜素在 5000 lx 光强下含量最高, 为 0.8032%, 极显著高于其他组, 10,000 lx 时最低, 这可能是由于光照过低细胞生长慢, 不利于类胡萝卜素的积累, 而光照过强又对其有破坏作用。不同光强下微绿球藻细胞内含量最高的色素均为类胡萝卜素。

研究表明^[20,21], 光照对微绿球藻的生长和油脂积累有着重要影响。由表 2 可以看出, 微绿球藻的总脂含量随光照强度的增加而增加, 在 2000 lx 时含量最高, 为 36.95%, 随后随光照强度的增加而降低, 这与多糖含量的结果一致。

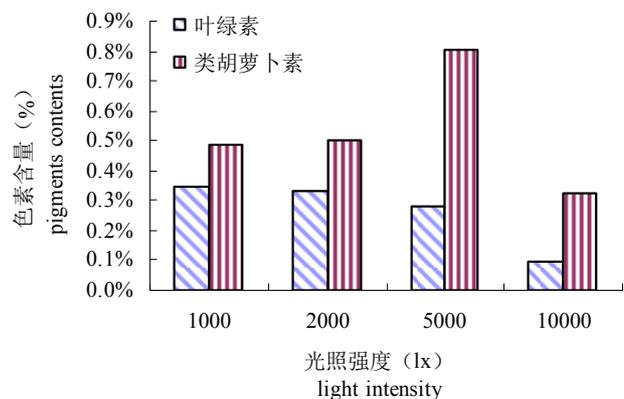


Figure 1. Effects of light intensities on pigments contents of *N. oculata*
图 1. 光照强度对微绿球藻色素含量的影响

Table 2. Effects of light intensities on organics contents of *N. oculata*
表 2. 光照强度对微绿球藻有机物质含量的影响

光照强度(lx) Light intensity	1000	2000	5000	10,000
可溶性蛋白含量(%) soluble protein	2.4 ± 0.1333 A	3.6 ± 0.2082 B	3.81 ± 0.01155 C	1.0 ± 0.01202 D
多糖含量(%) polysaccharide	1.7 ± 0.01528 A	3.17 ± 0.02082 B	2.94 ± 0.0577 C	2.02 ± 0.01528 D
叶绿素含量(%) Chlorophyll	0.35 ± 0.01000 a A	0.33 ± 0.00577 a AB	0.28 ± 0.01528 b B	0.09 ± 0.01528 C
类胡萝卜素含量(%) carotenoids	0.49 ± 0.01000 A	0.50 ± 0.01528 A	0.80 ± 0.00577 B	0.33 ± 0.01000 C
总脂含量(%)lipid	30.03 ± 0.02646 A	36.95 ± 0.03606 B	30.61 ± 0.02646 C	29.28 ± 0.03000 D

4. 结论

光照强度对微绿球藻的细胞生长有非常显著的影响,光照强度从 1000 lx 到 10,000 lx 的范围内,随着光照强度的增强,比生长速率先升高后下降,5000 lx 组最高,为 0.101;最高细胞密度越来越高,最高达到 $6.520 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$,但藻液的颜色变浅变黄。说明强光能够促进微绿球藻细胞分裂,但也能使藻细胞快速趋向老化,这与尤珊^[22]的结果一致。

光照强度对微绿球藻有机物质含量有显著的影响,可溶性蛋白、类胡萝卜素的含量随光照强度增强先升高后下降,5000 lx 时最高,分别为 3.8%和 0.8%;可溶性多糖、总脂含量随光照强度的增强先上升后下降,2000 lx 时含量最高,分别为 3.17%和 36.95%;叶绿素的含量随光照强度的增强而减小,1000 lx 时最高,为 0.35%。

不同的光照强度都有其利于生长或利于有机物质积累的优势,工业化生产时可根据不同的需求选择不同的光照强度。

参考文献 (References)

- [1] 余颖,陈必链. 微绿球藻的研究进展[J]. 海洋通报, 2005, 24(6): 75-81.
- [2] 冯雷,郭永恩. 盐度对四株海洋绿藻总脂含量和脂肪酸组成的影响[J]. 天津科技大学学报, 2009, 24(4): 22-28.
- [3] 石娟,潘克厚. 不同培养条件对微藻总脂含量和脂肪酸组成的影响[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(6): 79-85.
- [4] G. C. Zittelli, F. Lavista, A. Bastianini, et al. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *Journal of Biotechnology*, 1999, 70(1-3): 299-312.
- [5] 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.
- [6] Y. Chisti. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(3): 294-306.
- [7] 魏东,张学成,邹立红等. 细胞生长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] 张青田,王新华,林超等. 温度和光照对铜绿微囊藻生长的影响[J]. 天津科技大学学报, 2011, 26(2): 24-27.
- [9] 王付冬,桑敏,李爱芬等. 光照对眼点拟微绿球藻和三角褐指藻生长及总脂的影响[J]. 中国油脂, 2010, 35(6): 71-75.
- [10] 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.
- [11] 陈洁,蒋霞敏,段舜山. 眼点拟微绿球藻生长的生态因子分析[J]. 生态科学, 2002, 21(1): 50-52.
- [12] 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: 112-117.
- [13] 张海琪,蒋潘赵. 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, 29(1): 9-13.
- [14] 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.
- [15] S. J. Pirt. *Principles of microbes and cell cultivation*. Oxford: Blackwell Scientific, 1975.
- [16] 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.
- [17] 丛峰松. 生物化学实验[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2005.
- [18] 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.
- [19] 刘青. 微绿球藻的培养及保存技术[J]. 水产养殖, 2007, 28(3): 35-37.
- [20] R. Liliana, C. Z. Graziella, B. Niccolo, et al. Microalgae for oil strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102(1): 100-112.
- [21] J. Fabregas, A. Maseda and A. Dominguez. The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 20(1): 31-35.
- [22] 尤珊,郑必胜,郭祀远. 光照对螺旋藻形态及胞外多糖的影响和机理[J]. 海湖盐与化工, 2003, 33(1): 23-25.