硝氮质量浓度和温度在不同培养模式下对雨生红球藻生长的影响

高桂玲，　成家杨*
（北京大学 深圳研究生院，广东 深圳 518055）

摘要：探究了自养和异养条件下，硝氮质量浓度和生长温度对雨生红球藻生长的影响，以及自养胁迫阶段不同胁迫温度(30，35，38 ℃)对虾青素积累的影响。研究结果表明：雨生红球藻在异养条件下的最高生物量(3.319 g/L)远高于自养条件下最高生物量(0.687 g/L)，生物量提高了84%。自养条件下虾青素最高质量分数为 2.264%，异养条件下虾青素最高质量分数为 3.199%，比自养条件下虾青素最高质量分数提高 41.29%。异养生长具有明显的生长优势，此条件下最适碳源为乙酸钠质量浓度 1.5 g/L，最适硝氮质量浓度浓度为 0.5 g/L，最适生长温度为 22 ℃，最佳胁迫温度为 30 ℃。

关键词：自养；异养；硝氮；温度；雨生红球藻
中图分类号：TS 201　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2016)07—0684—08

Research on the Effects of Nitric Nitrogen and Temperature on *Heamatococcus lacustris* Under Different Cultural Modes

GAO Guiling，　*CHENG Jiayang**
（Shenzhen Graduate School，Peking University，Shenzhen 518055，China）

Abstract：Autotrophic and heterotrophic growth and the effect of nitric nitrogen，temperature on *Heamatococcus lacustris* were investigated. The microalgae grew better in heterotrophic mode. In autotrophic and heterotrophic the biomass were 0.687 g/L and 3.319 g/L respectively，the astaxathin content were 2.264% and 3.199%，respectively. In heterotrophic，the optimum growth concentration of sodium acetate was 1.5 g/L，nitric nitrogen was 0.5 g/L，growth temperature was 22 ℃，the suitable stress temperature was 30 ℃.

Keywords：autotrophic，heterotrophic，nitric nitrogen，temperature，*Heamatococcus lacustris*

虾青素(Astaxanthin)是一种具有多种生物活性的红色非维生素 A 源的酮类胡萝卜素。它的还原能力是类胡萝卜素的 10 倍、维生素 E 的 100~550 倍[1]，在医药、保健、化妆品、食品以及饲料添加剂等方面都有广泛的应用前景[2]。在虾青素的生物来源中，雨生红球藻(*Heamatococcus lacustris*)中虾青素可占其干质量的 l%以上，是目前已知的虾青素含量最高的生物物种[3-4]，且体内虾青素及其酯类的结构配比与

收稿日期：2014-09-20
基金项目：国家自然科学基金重点项目（81130070）；中国博士后科学基金项目（2012M520106）；中国博士后特别资助项目（2013T60025）；深圳市战略新兴产业发展专项资金项目(CXZZ20120618111150009)。
* **通信作者**：成家杨(1962—)，江西都昌人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事环境工程研究。E-mail：chengjy@pkusz.edu.cn

养殖对象所需一致，因此被公认为自然界中虾青素的最佳来源[5]。2010 年，根据《中华人民共和国食品安全法》和《新资源食品管理办法》规定，批准雨生红球藻作为新资源食品，具有广泛的应用前景。同时，雨生红球藻还是研究次生类胡萝卜素(secondary carotenoids)的生物合成与基因表达[6]以及细胞的感光与运动的良好材料[7]。探究环境因素对雨生红球藻的影响，提高营养细胞的生长密度，已成为目前国际上应用研究的热点。

在众多环境因素中，硝氮质量浓度和生长温度对雨生红球藻的生长起着至关重要的作用，但由于不同研究者采用的培养方法和藻种的差异，导致实验结果不尽相同[7]。据报道，雨生红球藻既能进行光合自养，又能利用有机碳源进行化能异养生长[8]，作者主要针对硝氮质量浓度和生长温度对自养和异养两种营养方式下雨生红球藻生长的影响进行对比，旨在探究雨生红球藻最适的营养方式以及最优生长条件，为雨生红球藻高密度生长提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 藻种

实验所用雨生红球藻 *Heamatococcus lacustris* 藻种：武汉水生所提供。

1.2 所用药品及仪器

紫外分光光度计(UV-1800)：北京佳源兴业科技有限公司产品；离心机(5810R)：深圳市万千科技有限公司产品；电热恒温水浴锅(HWS-12)：上海一恒科学仪器有限公司产品；隔膜真空泵(GM-0.5B)：天津市津腾实验设备有限公司产品；智能型人工气候箱(MGC-450HP-2)：上海一恒科学仪器有限公司产品；Clever Chem 200 全自动间断化学分析仪(GRS-10705-01-B)：深圳朗诚实业有限公司产品。

1.3 实验设计

1.3.1 *硝氮浓度及生长温度对自养条件下雨生红球藻生长的影响* 培养基选用 BG-11，所用试验器皿先经浸泡，高压灭菌，冷却后使用。试验操作均在超净工作台无菌条件下进行。将处于对数生长期的海洋微藻接种于 250 mL 的三角瓶中进行一次性培养，体积分数 10%接种。将装有藻细胞的三角瓶置于植物培养箱中，分别设置 22、25、28 ℃ 3 个生长温度，每个温度下设置 0、0.5、1、1.5、3 g/L 硝氮质量浓度梯度，每个样品设 3 组平行。设置培养条件为：光照强度约为 2 500 lx、pH 约为 7.5，光暗比为 12 h 光照：12 h 黑暗，每天摇动三角瓶 3 次，以防止藻细胞附壁沉淀，且变换三角瓶位置—使其光照均匀，培养 7d，测定雨生红球藻的生物量，叶绿素 a 含量及 NO_3^-消耗情况。

1.3.2 *异养条件下碳源的选择* 用 BG11 做基本培养基，选取不同种类常见碳源对雨生红球藻进行异养培养，以生物量为指标，选取能维持该藻异养生长的碳源。

1.3.3 *硝氮质量浓度及生长温度对异养条件下雨生红球藻生长的影响* 培养基选用 BG-11，所用试验器皿先经浸泡，高压灭菌，冷却后使用。试验操作均在超净工作台无菌条件下进行。将处于对数生长期的微藻接种于 250 mL 三角瓶中进行一次性培养，接种率为体积分数 10%。将装有藻细胞的三角瓶置于植物培养箱中，分别设置 22、25、28 ℃ 3 个生长温度，每个温度下设置 0、0.5、1、1.5、3 g/L 硝氮质量浓度梯度，每个样品设 3 组平行。设置培养条件为：以 1.5 g/L 醋酸钠为有机碳源，pH 约为 7.5，黑暗培养，每天摇动三角瓶 3 次，以防止藻细胞附壁沉淀，培养 7 d，测定雨生红球藻的生物量，叶绿素 a 含量及 NO_3^-消耗情况。

1.3.4 *胁迫温度对虾青素积累的影响* Fabregas 等的研究结果[9-11]表明，随着硝酸钾浓度的提高，虾青素含量降低。这说明，雨生血球藻转化产虾青素需要较低浓度的氮源，尤其在缺氮条件下，可以大量积累虾青素。故将 1.3.1、1.3.2 中各个样品在培养 7 d 后离心，重新接种到没有氮源的 BG11 培养基，直接放入光强为 5 000 lx，设置胁迫温度分别为 30、35、38 ℃。胁迫 7 d 之后，测定虾青素含量。

1.4 吸光度值与生物量的标准曲线

预培养微藻 3~5 L，待其生长至对数生长期后，将其离心收获，用蒸馏水洗涤两次，把待测藻液分为 6 份，每份约 300 mL 左右，分别加入蒸馏水或者离心浓缩得不同浓度，测量每份藻液的吸光度 A 值[12]。从各浓度梯度中取 100~400 mL 藻液 V，用玻璃砂芯真空抽滤，滤膜为 Whatman 玻璃纤维滤膜(GF/C Cat No.1822-47)，孔径 1.2 μm。抽滤前对滤膜进行称重 m_1，抽滤后将滤膜移至烘箱，65 ℃烘干 12 h 至恒重，再次称重 m_2。用 $(m_2-m_1)/V$ 得到吸光度为A 时每升微藻的干质量 m。根据各梯度浓度的

A 与对应的 m 值，利用 excel 软件绘制 A–干质量标准曲线。

1.5 藻液叶绿素 a 的测定——超声辅助热乙醇提取法测定叶绿素 a

取对数生长期藻液 10 mL 过 0.45 μm 混合纤维素膜，将带藻细胞的膜冷冻过夜，取出后迅速用 8 mL 热乙醇(80 ℃)于热水浴(80 ℃)中萃取 2 min，将萃取液超声破碎 5~20 min 后，于暗处静置 2~6 h，离心(5 000 r/min，4 ℃)5 min 后取上清液 3.5 mL 置于比色皿中，于 665，750 nm 处测吸光值 A_{665b} 和 A_{750b}，然后滴加 200 μL 1 mol/L 盐酸酸化，5 min 后于波长 665 和 750 nm 处再测吸光值 A_{665a} 和 A_{750a}[13]。

根据 Lorenzen 公式计算单位样品中叶绿素 a 质量浓度：

叶绿素 a 质量浓度：$c=AK(A_{665b}-A_{665a})v/VL$，

$A_{665b}=(A_{665b}-A_{750b})$，$A_{665a}=(A_{665a}-A_{750a})$。

其中，c 为叶绿素质量浓度；A 为不同萃取溶剂中叶绿素 a 的比吸光系数；K 为常数，为纯叶绿素 a 酸化前的光密度与酸化前后的光密度变化的比值；v 为提取液体积(mL)；V 为样品的体积(L)；L 为比色杯光程长度（cm）；采用热乙醇为萃取溶剂，A=11.5，K=2.43，比色皿光程为 1 cm，则公式(1)可简化为：叶绿素 a(μg/L) =$27.9(A_{665b}-A_{665a})v/V$

1.6 虾青素的测定

移取 5 mL 孢子态的藻体，5 000 r/min 离心 10 min，除上清液，收集藻体。加入 1 mL 甲醇–KOH 溶液（体积分数 30%甲醇和质量分数 5% KOH 混合液)震荡，使藻种均匀分散后置 65 ℃恒温水浴中加热 15 min，4 000 r/min，离心 15 min，除上清液；沉淀加蒸馏水离心洗涤 2 次，去除残留碱液。上述藻体，加入 5 mL 二甲基亚砜，200 W 超声波破碎 10 min，40 ℃震荡提取 20 min，离心收集上清液，沉渣加入二甲基亚砜重复提取，直至藻体沉淀变白，取红色上清液测 $A_{490\ nm}$[14]。

虾青素质量浓度：$C=4.5\times A_{490}\times V_a/V_b$

其中：C 为虾青素质量浓度，mg/L；A_{490} 为上清液在 490 nm 吸光值；V_a 为提取液体积，mL；V_b 为藻液体积，mL。

1.7 NO_3^-的测定

每隔 5 d 取 2 mL 藻体液于离心管，4 000 r/min 离心 3 min，取上清液，采用 Clever Chem200 全自动间断化学分析仪进行 NO_3^-离子测定，以蒸馏水为对照标准。

1.8 数据统计与分析

采用 EXCEL 2000 和 SPSS 11.5 进行统计，数据采用平均值±标准差(mean±SD)的形式表示，显著水平为 0.05。

2 结果与讨论

2.1 硝氮及温度对雨生红球藻生物量的影响

通过研究雨生红球藻生长的吸光度值与干质量之间的线性关系，可为量化评估生物量提供计算依据。雨生红球藻生长吸光度值与其干质量之间的关系，可用线性方程 y=0.996 0x+0.292 7 来表征，其中 y 表征干质量（g/L），x 表征藻液在 680 nm 处吸光度，R^2 值为 0.999 4，线性拟合度较好。以下研究中所涉及的生物量均通过测定 OD 值并进行线性拟合所得。

2.1.1 硝氮及温度在自养条件下对雨生红球藻生物量的影响 图 1 为自养条件下在 22、25、28 ℃培养温度下各硝氮浓度组的生长曲线，经过 7 d 的培养，各组生长至对数期并出现明显差异（P<0.05)。22 ℃条件下最高生物量在 0.282~0.687 g/L 范围内，25 ℃条件下最高生物量在 0.191~0.600 g/L 范围内，28 ℃条件下最高生物量在 0.195~0.393 g/L 范围内，比较各个温度下的最高生物量可知，22 ℃生长温度下生物量最高，为 0.687 g/L，其次是 25 ℃，28 ℃生长温度下生物量最小，为 0.393 g/L。说明雨生红球藻适宜的生长温度为 22 ℃，温度过高会抑制藻体生长，表现为生物量不高，这与殷明炎等[15]的实验结果一致。

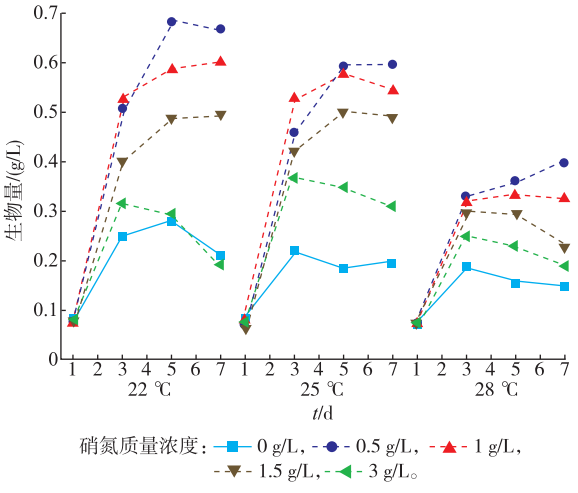


图 1 自养条件下生物量变化曲线

Fig. 1 Dry weight in autotrophic mode

同一温度下，随着硝氮质量浓度的增高，生物量呈递减趋势。0.5 g/L 组表现明显的生长优势，生物量高于其他组（$P<0.05$），22 ℃条件下，对数末期最高生物量可达 0.687 g/L，是 3 g/L（22 ℃）对数末期生物量的 2 倍。在培养前 3 d，1 g/L 组、0.5 g/L 和 1.5 g/L 组生物量相差不多（$P>0.05$），生长速率（斜率）也相差不多（$P>0.05$），但比较 3 g/L 高氮组要高，说明在培养初期微藻在确保正常生长的氮浓度范围内利用氮元素进行快速生长繁殖，过高的氮浓度下细胞生长繁殖速率反而下降。3 d 后各组生物量开始差别，0.5 g/L 组生物量开始明显高于其他各组，且 3 g/L 组在培养 3 d 后生物量均开始下降，表现出明显的高氮抑制现象，藻体开始发黄。而在小于 1.5 g/L 的各组中，生物量一直呈上升趋势，进一步说明雨生红球藻的耐受质量浓度为 1.5 g/L，超过此质量浓度，藻体不能正常生长，综合可知，自养条件下，0.5 g/L 硝酸钠为雨生红球藻最适宜的氮质量浓度，这与 Harker M 等的研究结果一致[16]。

2.1.2 硝氮及温度在异养条件下对雨生红球藻生长的影响

1）雨生红球藻异养碳源探究结果。由表 1 可以看出，选取乙酸钠作为雨生红球藻异养生长的碳源较合理。添加不同乙酸钠时雨生血球藻的生长曲线如图 2。

表 1 不同碳源做有机底物的生长试验结果

Table 1 Growth on different carbon source

培养条件	碳源				
	乙酸钠	丙酸钠	葡萄糖	乳糖	蔗糖
黑暗	++	−	+	−	−

注：“+”表示生长程度，“−”表示不能生长

在添加乙酸钠为碳源时，由图 2 可以看出，雨生红球藻能利用乙酸盐在暗处进行异养生长，乙酸盐的浓度对雨生红球藻的生长有很大的影响，微藻只能忍受较低的有机物浓度，过高的乙酸钠不但不能获得高浓度的细胞密度，反而会影响细胞正常生长，这是由于在培养系统中具有强离子性的有机物（如乙酸钠），培养液中的离子浓度就会增加，这就会明显地抑制微藻的生长[15]。雨生红球藻异养生长所需乙酸钠添加量为 1.5 g/L。

2）硝氮及温度在异养条件下对雨生红球藻生物量的影响　图 3 表示异养条件下，以乙酸盐为碳源，22、25、28 ℃培养温度下各硝氮质量浓度组的生长曲线。经过 9 d 的培养，各组生长出现明显差异。22 ℃条件下生物量在 2.080~3.319 g/L，25 ℃条件下生物量在 1.813~3.309 g/L，28 ℃条件下生物量在 1.302~1.945 g/L，也就是说，雨生红球藻在低温度下较高温下生长要好，表现为生物量较高。22 ℃下最高生物量是 28 ℃条件下最高生物量的 2 倍。由此说明在本实验条件下雨生红球藻的最适生长温度为 22 ℃。

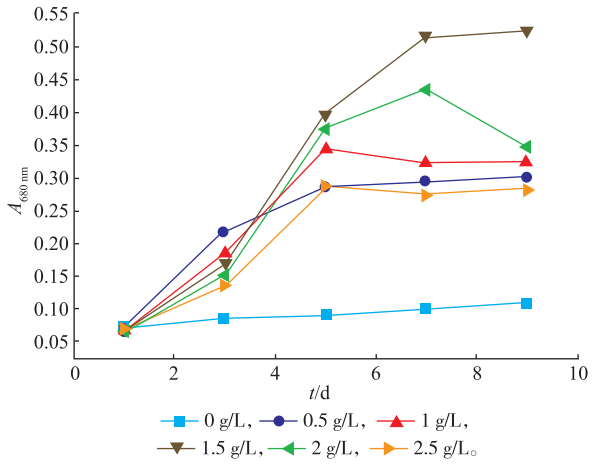


图 2 添加不同质量浓度乙酸钠时雨生血球藻的生长曲线

Fig. 2 Growth of *Heamatococcus lacustris* on different sodium acetate concentrations

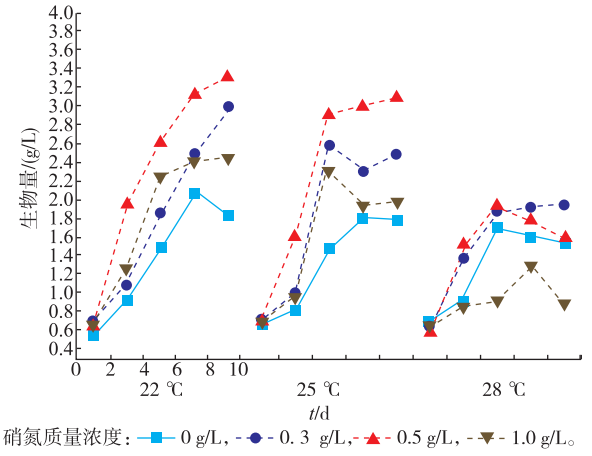


图 3 异养条件下雨生红球藻干质量变化曲线

Fig. 3 Dry weight of *Heamatococcus lacustris* in heterotrophic mode

硝氮质量浓度对雨生红球藻生物量的影响也不同。22 ℃时 1.5 g/L 组在接种后第二天开始无法正常生长，出现白色浑浊，藻体发白，说明藻体开始

死亡,异养条件下,高氮会抑制藻细胞正常生长。其他各组变化趋势一致，在培养第 7 d 各组进入稳定期，生物量均达到最高,0.5 g/L 组在培养期间表现出较明显的生长优势,生长速率较其他组高,尤其在培养前 3 d,是细胞快速生长繁殖时期,细胞在培养初期就表现出对氮质量浓度的选择性，而在后期,各组生长速率(斜率)开始下降,高质量浓度的氮(1 g/L)抑制及低质量浓度(0.3 g/L)的缺氮都会减弱甚至影响藻细胞的生长。实验对照组中,在完全无氮条件下,藻细胞仍表现有微弱生长。异养条件下小球藻的叶绿体是细胞内氮源储库之一,其他条件合适而仅缺氮源情况下,叶绿素降解释放氮供细胞生长,起调节氮源作用。

2.2 硝氮及温度对雨生红球藻叶绿素 a 的影响

2.2.1 *硝氮及温度在自养条件下对雨生红球藻对数末期叶绿素 a 的影响* 生长温度不同,对数末期细胞中叶绿素 a 的含量也不同，对于同一浓度而言,随着生长温度的升高,叶绿素 a 呈下降趋势,22 ℃培养温度下叶绿素含量明显高于 25 ℃和 28 ℃(P<0.05);对于同一温度而言,随着氮质量浓度的升高,叶绿素 a 含量依次减少。综合可知,22 ℃培养温度下 0.5 g/L 组叶绿素 a 含量最高。随着培养时间继续,各组藻体开始进入胁迫阶段,叶绿素 a 含量开始下降,细胞进入虾青素积累阶段,至培养结束,各组虾青素含量最高,而叶绿素 a 含量均降至最低。

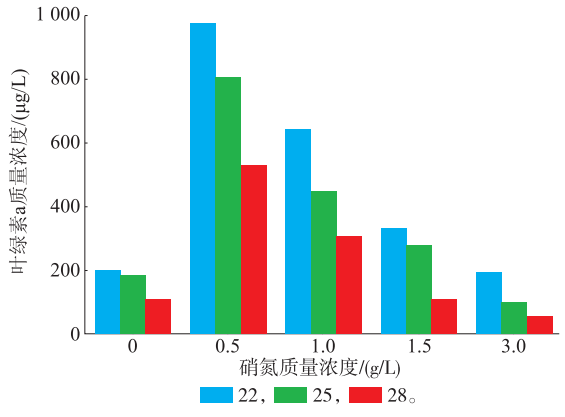


图 4 自养条件下对数末期叶绿素 a 质量浓度

Fig. 4 Chlorophyll a content in autotrophic mode

2.2.2 *硝氮及温度在异养条件下对雨生红球藻对数末期叶绿素 a 的影响* 图 5 表示异养条件下在 22、25、28 ℃培养温度在生物量最高时各氮浓度组叶绿素 a 变化图,由图可以看出在对数期(即培养第 7 d)叶绿素 a 含量均达到最大值,且叶绿素 a 含量随着硝氮质量浓度的升高而增加,0.5 g/L 组生物量比 1 g/L 组大，而叶绿素 a 含量比 1 g/L 组小,此时维持细胞快速生长的可能是由于叶绿素会分解藻细胞生长提供氮源,对于 1 g/L 组而言,并未出现氮缺乏状态,所以叶绿素 a 含量降低不明显,而对 0.3 和 0.5 g/L 组,氮在培养前几天就已经消耗殆尽,处于氮缺乏状态,所以叶绿素会分解,也就出现了 0.5 g/L 组生物量高于 1 g/L 组而叶绿素低于 1 g/L 组的现象。对于 1.5 g/L 组,由于藻体出现发白浑浊现象,所以叶绿素 a 均很小甚至是 0。相比笔者之前做的自养实验,异养条件下各组叶绿素 a 含量均比自养条件下小,这是由于异养和光合自养的环境条件不同，可使微藻所含的化学成分发生明显的变化。在异养条件下,细胞的叶绿素含量是兼养时的 1%,叶绿素 a 与 b 的比值及类胡卜素的含量都有所下降。至实验结束,各组叶绿素 a 含量均降至最低。

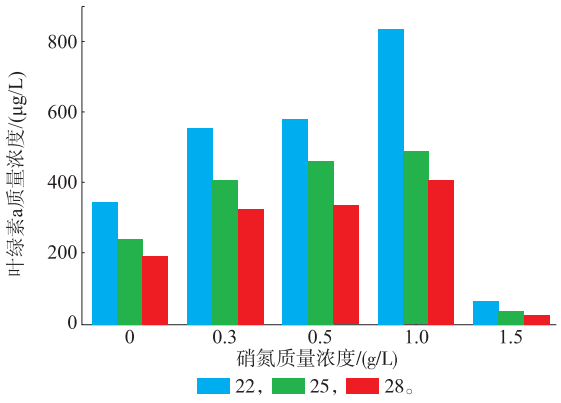


图 5 异养条件下对数末期叶绿素 a 质量浓度

Fig. 5 Chlorophyll a content in heterotrophic mode

综上,进一步说明,雨生红球藻在异养条件下最适宜的生长温度为 22 ℃，最适宜的硝氮质量浓度为 0.5 g/L。

2.3 雨生红球藻对硝氮的利用情况

2.3.1 *硝氮及温度在自养条件下雨生红球藻对硝氮的利用情况* 图 6 表示自养条件下在 22、25、28 ℃培养条件下各组对硝酸根离子的消耗情况，由图可以看出，在培养第一天消耗氮离子最多近 50%,随着培养进行,氮离子越来越少,以致达到缺氮状态。其中,3 g/L 组由于高氮抑制藻细胞生长不能有效利用氮离子而使培养基中有氮剩余。并且,在最

适宜温度22℃下消耗的氮离子多于其他温度组,说明在最适宜温度下可以促进藻细胞生长更有效地利用氮离子。微藻对硝氮的利用率在对数末期均已经达到95%以上,在细胞营养生长阶段,细胞消耗了培养基中大部分的氮源,而在虾青素积累阶段,培养基中氮含量已经很少,说明缺氮或低浓度的氮[14]利于雨生血球藻虾青素的积累。

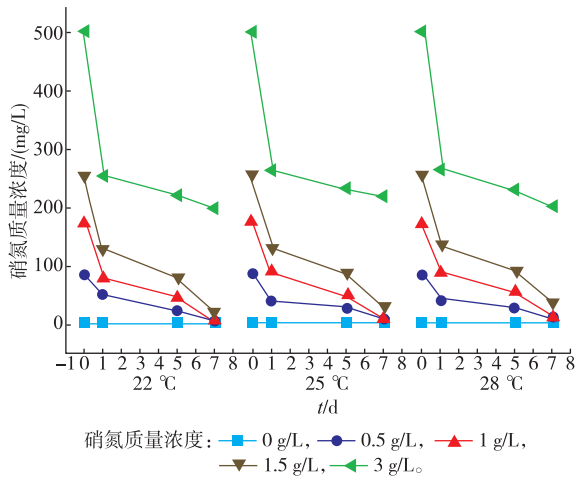


图6 自养条件下雨生红球藻对 NO_3^- 消耗情况

Fig. 6 Consumption of nitric nitrogen in autotrophic mode

2.3.2 *硝氮及温度在自养异养条件下雨生红球藻对硝氮的利用情况* 图7表示异养条件下在22、25、28 ℃培养温度不同氮浓度组雨生红球藻对氮离子的消耗情况。如图可以看出3个温度下微藻对氮离子的消耗趋势相似,在培养第一天消耗氮离子最多,接近一半,之后的培养时间内微藻继续消耗剩余的氮离子,对于1.5 g/L组,由于高氮抑制作用,藻细胞无法正常生长,所以氮离子基本不变。对于0.3和0.5 g/L组,对数期时生物量最大,但氮离子剩余量很少,由上文可知,此时支持藻细胞积累虾青素阶段的氮源可能是由叶绿素分解提供,说明异养藻有利用更高氮浓度的潜力。而对于1 g/L组,由于出现氮抑制,藻细胞对氮离子的利用也受到影响,实验结束时氮离子仍有剩余。

比较3个不同温度下微藻利用氮离子情况可知,在较适宜生长的温度下(22 ℃)藻细胞对氮离子的利用率高于不适宜藻细胞生长的高温条件(28 ℃),进一步说明,在低温下,微藻生长良好能够更好地利用营养物质。

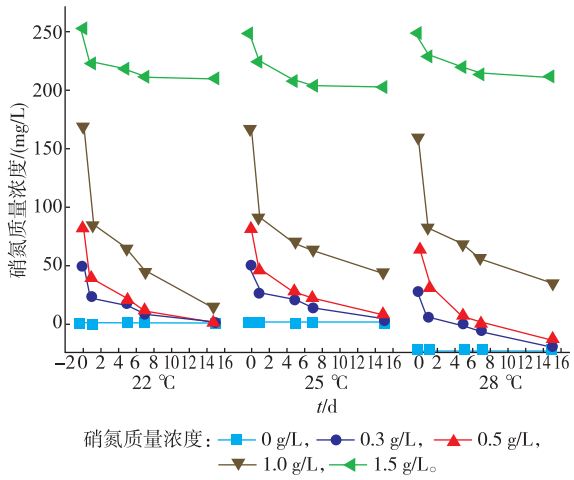


图7 异养条件下雨生红球藻对 NO_3^- 消耗情况

Fig. 7 Consumption of nitric nitrogen in heterotrophic mode

2.4 虾青素产量

2.4.1 *自养条件下虾青素最终产量* 图8(a)、(b)、(c)分别表示自养条件下在3种(22,25,28 ℃)生长温度下,各个胁迫温度对虾青素的积累产生的影响,结果显示,22 ℃培养温度下,35 ℃胁迫温度下虾青素的积累量明显高于其他胁迫温度($P<0.05$),虾青素最高含量出现在1.5 g/L、22 ℃组,为干质量的2.264%,缺氮培养基中藻体变红较快,转化时间较短的情况下有优势,最高积累量达到2.216%,但最终虾青素含量低于1.5 g/L、22 ℃组,推测虾青素的持续产生需要微量的氮源支持,具体机理还需进一步研究。25 ℃培养温度下,缺氮培养基中藻体生物量虽然不高,但虾青素质量浓度高于其他组,达到2.047%,可能是因为高温生长条件下,细胞生长受到抑制,生物量不高,进而影响了虾青素的积累。28 ℃培养温度下明显低于22 ℃及25 ℃各组虾青素含量($P<0.05$),进一步说明而高温对虾青素含量的影响主要是通过降低生物量而影响虾青素的产量的。0.5和1 g/L虽然生物量较高,但在各个胁迫温度下均没有变红,缺氮组虽然生物量不高,但是单个细胞中虾青素含量却较高,分析认为藻细胞中的Rubisco可作为一个氮库,为缺氮条件下细胞内虾青素的积累提供了一定的氮源。综合图2~8,可知,虾青素积累的最优胁迫温度为35 ℃,虾青素含量最高出现在22 ℃培养温度下的1.5 g/L组,最高可达干质量的2.264%。

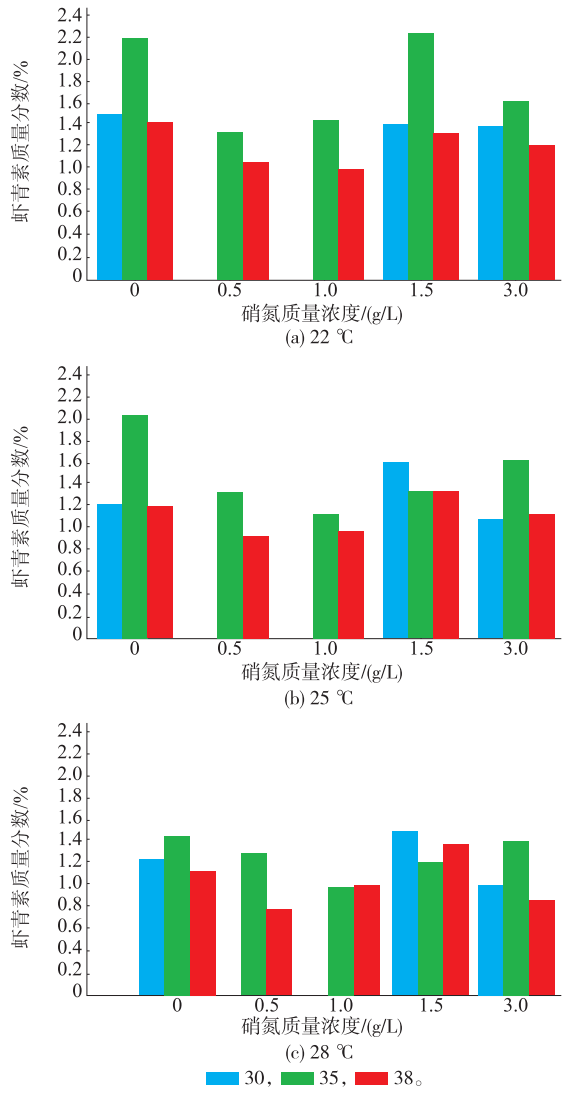


图 8　不同胁迫温度下虾青素的质量分数

Fig. 8　Astaxathin content in autotrophic mode

2.4.2　异养条件下虾青素最终产量

1）培养基中没有有机物时的虾青素产量　将对数末期的藻液离心重新接种到氮、有机物(乙酸钠)均为 0 g/L 的 BG 培养基中,进行自养高温胁迫,各个胁迫温度对虾青素的积累产生的影响，在 22 ℃生长条件下,3 种胁迫温度(30,35,38 ℃)下均有虾青素产生，虾青素质量分数范围在 3.341~31.985 mg/g,最高虾青素质量分数出现在 0.5 g/L 组,可达 3.199%(干重),胁迫温度取30 ℃。在 25 ℃和 28 ℃生长条件下,最高虾青素质量分数分别为 2.092%和 1.053%,胁迫温度均为35 ℃,但与30 ℃差别不大。出于成本及能源考虑,对于雨生红球藻而言,最佳胁迫温度为 30 ℃。

3 个胁迫温度下，各硝氮质量浓度组虾青素质量分数规律一致,即在 0.3~0.5 g/L 范围内,虾青素质量分数随着硝氮质量浓度的升高而增加。其中 0.3,0.5 g/L 组最高值在低温时差别较大，在高温时差别较小。在 0.5~1 g/L 范围内,虾青素质量分数随着硝氮质量浓度的升高而降低。38 ℃胁迫时,各组虾青素质量分数均不高,且无较大差别,并且藻体均出现浑浊,变黄。说明过高温度不利于细胞积累虾青素,还会破坏细胞结构,导致细胞死亡。

22 ℃生长条件下 30 ℃胁迫,0.5 g/L 组最高虾青素质量分数为 31.985 mg/g，是 25 ℃生长条件下 35 ℃胁迫 1 g/L 组的 2 倍，是 28 ℃生长条件下 30 ℃胁迫 1g/L 组的 3 倍。

2）培养基中存在有机物时的虾青素产量　将对数末期的藻液离心重新接种到氮不存在且有机物(乙酸钠)为 1.5 g/L 的 BG 培养基中,进行自养高温胁迫。结果发现,至实验结束(第 21 d)胁迫温度为 30~35 ℃时,藻体未变红,且出现浑浊现象,藻体越发发黄,而胁迫温度为 38 ℃时,由于温度过高大部分藻体死亡,藻液发白且有大量沉淀。Ogbonna 等在对微藻异养与自养相互交替的养殖系统的研究中指出,微藻从异养转到自养状态时,培养液中有机物浓度必须为零。因为此时细胞密度很高,光线穿透力低,如有机物存在,则异养生长占优势,达不到强化的效果,对于雨生红球藻而言,达不到胁迫的目的,因此虾青素产量可以忽略。

3　讨　论

虾青素具有多种生物活性,在医药、保健、化妆品、食品以及饲料添加剂等方面都有广泛的应用前景。雨生红球藻细胞在环境胁迫时会由绿色游动细胞变为红色不动细胞,并开始积累虾青素,是目前已知的虾青素含量最高的生物物种,高浓度生物量对虾青素积累有很大影响,如何提高在游动阶段细胞的密度也是目前国内外研究的重点,雨生红球藻可以进行光合自养,也可以利用有机碳源进行化能异养生长,在自养条件下进行培养和转化的雨生红球藻生长速度慢,很难获得较高的细胞浓度,在胞囊阶段尽管细胞体积有所增加,但细胞生长速率很低,细胞数量很难再增长,这样也导致虾青素产量较低[18]。在严格异养条件下,细胞可以维持很长时间的绿色游动阶段而达到较高的细胞浓度,作者探究

了硝氮浓度及生长温度在自养和异养条件下对雨生红球藻生长的影响,通过对比旨在寻求雨生红球藻的最佳生长条件及营养方式,为实现高密度培养提供基础数据。

4 结 语

探究了硝氮和生长温度对雨生红球藻在自养和异养两种营养方式下的影响,结果表明:雨生红球藻在异养条件下的最高生物量(3.319 g/L)远高于自养条件下最高生物量(0.687 g/L),生物量提高了3.83 倍,具有明显的生长优势,而且异养条件节省能源,不需要光照,有很大的发展前景,只是由于雨生红球藻对环境变化非常敏感,并且传统的培养箱不能达到完全密闭,而且异养条件下培养基中存在有机物,培养过程中很容易受到污染。如何提高技术,改善设备,实现生物量的进一步稳定提高是下一步将解决的问题。

参考文献:

[1] KANG C D,SIM S J. Selective extraction of free Astaxanthin from Haematococcus culture using a tandem organic solvent system [J]. **Biotechnol Prog**,2007,23:866-871

[2] DOMINGUEZ-BOCANEGRA A R,PONCE-NOYOLA T,TORRES Munoz J A. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*:a comparative study[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**,2007,75:783-791.

[3] TRIPATHI U,SARADA R,RAO S R,et al. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media[J]. **Bioresource Technology**,1999,68(2):197-199.

[4] SANDESH K B,VIDHYAVATHI R,SARADA R,et al. Enhancement of carotenoids by mutation and stress induced carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis* mutants[J]. **Bioresource Technology**,2008,99(18):8667-8673.

[5] LI J,ZHU D L,NNI J F,et al. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*[J]. **Biotechnology Advances**,doi:10.1016/j.biotechadv. 2011. 04.001.

[6] BREITENBACH J,MISAWA N,KAJIWARA S,et al. Expression in *Escherichia coli* and Properties of the carotene ketolase from *Haematococcus pluviaiis*[J]. **Fems Microbiol Lett**,1996,140:241-246.

[7] CECCONI C,ASCOLI C,PETRAECHI D. Step-up photophobic responses of the unieellular alga *Haematococcus puvialis* and their interpretation in terms of photoreceptive apparatus characteristics[J]. **J Photochem Biol**,1996,33:201-209.

[8] KOBAYASHI M,KAKIZONO T,NAGAI S. Astaxanthin production by a green alga,*Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acctate media[J]. **Ferm Bioeng**,1991,71:335-339.

[9] FABREGAS J,OTERO A,MASEDA A,et al. Two-stage cultures for the production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*[J]. **Journal of Biotechnology**,2001,89:65-71.

[10] LEE Y K,SOB C W. Accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris*(Chlorophyta)[J]. **J Phyeo1**,1991,27:575-577.

[11] BOUSSIBA S,VONSHA K A. Astaxanthin accumulation in green alga Haematococcus pluvialis[J]. **Plan Cell Physiol**,1991,32(7):1077-1082.

[12] 沈萍萍,王朝晖,齐雨藻,等. 光密度法测定微藻生物量[J]. 暨南大学学报:自然科学版,2001,22(3):115-119.
SHEN Pingping,WANG Zhaohui,QI Yuqi,et al. The determination of biomass of microalgae by light density method [J]. **Journal of Jinan University:Natural Science Edition**,2001,22(3):115-119.(in Chinese)

[13] 梁兴飞 郭宗楼. 超声辅助热乙醇提取法测定浮游植物叶绿素 a 的方法优化[J]. 水生生物学报,2010,34(4):856-861.
LIANG Xingfei,GUO Zonglou. Study on optimization method for the determination of phytoplankton chlorophyll a by ultrasonic assisted hot ethanol extraction method[J]. **Acta Hydrobiologica Sinica**,2010,34(4):856-861.(in Chinese)

[14] BOUSSIBA S,FAN L,VONSHAR A. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. **Methods Enzymology**,1992,213:386-391.

[15] 殷明焱,刘建国,张京浦,等. 雨生红球藻和虾青素研究述评[J]. 海洋湖沼通报,1998(2):53-61.
YIN Mingyan,LIU Jianguo,ZHANG Jingpu,et al. The research review of Haematococcus and astaxanthin [J]. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**,1998(2):53-59.(in Chinese)

[16] HARKER M,YOUNG A J. Inhibition of astaxanthin synthesis in the green alge,Haematococcus pluvialis[J]. **European Journal of Phyeology**,1995,30(3):179-187.