

研究报告

氮源对雨生红球藻绿色生长期细胞生长的影响

王晓丹¹ 张璐² 程蔚兰¹ 赵熙宁¹ 史飞飞¹ 季春丽¹ 李润植^{1*}

(1. 山西农业大学分子农业与生物能源研究所 山西 太谷 030801)

(2. 山西财经大学财政金融学院 山西 太原 030006)

摘要:【背景】雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)细胞能合成积累具有超强抗氧化活性的虾青素,是生产高值天然虾青素的优异藻种。【目的】解析不同氮源对雨生红球藻生长的效应,以期建立优化氮素营养提高雨生红球藻生物量和虾青素产量的技术体系。【方法】选用 NaNO₃ 和 NH₄Cl 为氮源、辅以 pH 缓冲液 HEPES,培养雨生红球藻藻株 797,测试 2 种不同氮源对雨生红球藻藻液 pH、营养生长期(绿色生长期)藻细胞生长、叶绿素含量和生物量等的影响。【结果】以 NaNO₃ 为氮源培养的雨生红球藻细胞的比生长速率、生物量、叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均高于以 NH₄Cl 为氮源培养的藻细胞。不同氮源对雨生红球藻培养液的 pH 值有显著影响, NH₄Cl 氮源导致培养液 pH 值降低,然而 NaNO₃ 氮源则导致培养液 pH 值上升。添加 pH 缓冲液 HEPES 能有效稳定培养液的 pH 值,并促进雨生红球藻的生长,尤以 NH₄Cl 为氮源添加 HEPES 的效果更显著。不同氮源导致雨生红球藻营养生长阶段细胞的生长和生物量等差异主要源于不同氮源引起藻液 pH 的变化。【结论】添加 pH 缓冲液 HEPES 可有效控制藻液 pH,进而显著促进以 NaNO₃ 和 NH₄Cl 为氮源的雨生红球藻营养生长阶段细胞的生长和生物量积累。

关键词: 雨生红球藻, 氮源, pH 值, NaNO₃, NH₄Cl

Effects of different nitrogen sources on cell growth of *Haematococcus pluvialis* at “green stage”

WANG Xiao-Dan¹ ZHANG Lu² CHENG Wei-Lan¹ ZHAO Xi-Ning¹
SHI Fei-Fei¹ JI Chun-Li¹ LI Run-Zhi^{1*}

(1. Institute of Molecular Agriculture & Bioenergy, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

(2. School of Finance, Shanxi University of Finance & Economics, Taiyuan, Shanxi 030006, China)

Abstract: [Background] The unicellular green microalga *Haematococcus pluvialis* can synthesize astaxanthin which possess super antioxidant properties. *H. pluvialis* is an excellent microalga for commercial production of high-value natural astaxanthin. [Objective] The current study is to

Foundation items: National “948” Project (2014-Z39); The Key Tackling Item in the Coal-Based of Shanxi Province (FT-2014-01); Key Scientific and Technological Project of Shanxi Province (201603D312005)

*Corresponding author: Tel: 86-354-6288374; E-mail: rli2001@126.com

Received: October 17, 2017; **Accepted:** March 13, 2018; **Published online** (www.cnki.net): March 19, 2018

基金项目: 国家“948”项目(2014-Z39); 山西省煤基重点科技攻关项目(FT-2014-01); 山西省重点科技项目(201603D312005)

*通信作者: Tel: 86-354-6288374; E-mail: rli2001@126.com

收稿日期: 2017-10-17; 接受日期: 2018-03-13; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-03-19

investigate effects of different nitrogen (N) sources on growth of *H. pluvialis*, with a view to develop the optimized N nutrition technology system for increasing biomass and astaxanthin yield of *H. pluvialis*. [Methods] Therefore, NaNO_3 (NO_3^- -N) and NH_4Cl (NH_4^+ -N) were selected as two different N sources for the culture of *H. pluvialis* strain 797, respectively. At the same time, Hepes pH buffer was added into the media to keep pH stability. The measurements included pH changes of alga suspension culture media, cell growth rate at vegetative growth stage (“green stage”), chlorophyll content in cells and algal biomass. [Results] The results presented here demonstrated that the specific growth rate, biomass, chlorophyll a and b content in algal cells were higher in the NO_3^- -N media than in the NH_4^+ -N media. Different N sources showed a significantly effect on pH in *H. pluvialis* suspension culture media. NH_4Cl led to pH reduction in the culture media, whereas NaNO_3 resulted in pH increase in the media. The addition of Hepes pH buffer successfully stabilized the pH in the culture media and thus, greatly promoted growth of *H. pluvialis*, with NH_4Cl +Hepes showing much significant in this regard. It is the pH change in the algal suspension culture media caused by two different N sources that resulted in the obvious difference of *H. pluvialis*'s cell growth, biomass, and other features at “green stage” between the two N source treatments. [Conclusion] Addition of Hepes buffer into the media of either NO_3^- -N or NH_4^+ -N could effectively stabilize the pH in microalga suspension culture media, and consequently, significantly promoted *H. pluvialis*'s cell growth and biomass accumulation at vegetative growth stage.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*, Nitrogen sources, pH value, NaNO_3 , NH_4Cl

虾青素具有超强的抗氧化活性和独特功用, 市场需求日益增加。目前, 虾青素的来源主要有两种, 即从生物体中提取的天然虾青素和化学合成的虾青素。人工化学合成的虾青素结构中内消旋结构占 50%左右, 左旋占 25%左右, 右旋占 25%左右, 而生物体内合成积累的天然虾青素的结构基本都为左旋结构。研究表明只有左旋结构具有抗氧化活性。化学合成的虾青素生物安全性较低, 而天然虾青素对人体没有毒副作用。天然虾青素主要来源是从水产加工甲壳动物的废弃物、雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 和红法夫酵母 (*Phaffia rhodozyma*) 中提取。

雨生红球藻是一种单细胞绿藻, 在孢子形成阶段细胞内能大量合成并以油珠的形式积累红色素虾青素, 是天然虾青素的最好来源^[1]。与水产业废料、真菌、植物以及其他微藻不同^[2], 雨生红球藻虾青素含量最高(高达细胞干重的 5%), 是可商业化生产虾青素的生物^[3], 已建立两步法等培养雨生红球藻生产虾青素体系^[4]。在雨生红球藻两步法生产虾青素体系中, 第一阶段即绿色阶段或营养生长阶段, 在温度适宜、营养盐丰富、光照强度低的条件下, 雨生红球藻大量进行营养繁殖, 增加生物量;

第二阶段即红色阶段或孢子形成阶段, 在高温、高盐、强光、氮磷等营养盐缺乏的不利环境条件下, 刺激雨生红球藻孢囊大量快速形成, 并在孢子细胞内积累红色虾青素^[5]。如何增加雨生红球藻绿色阶段的生物量和促进红色阶段快速大量积累虾青素是雨生红球藻规模化培养生产虾青素的关键。

对雨生红球藻绿色阶段最佳生长条件的研究, 主要集中在培养基的选择与改良^[6-8]、最适培养温度^[9]、光照强度^[9]、pH^[9]、氮源^[6,10]及碳源^[11]的选择等方面。其中培养基中不同氮源对雨生红球藻绿色阶段细胞生长的影响, 研究所获结论不一致。有研究^[12]显示, 硝酸盐为雨生红球藻生长的最适氮源形式。也有研究^[13]发现, 氨态氮比硝态氮更利于雨生红球藻的生长, 尤其在胁迫条件下。

因此, 为解析不同氮源对雨生红球藻绿色阶段细胞生长及生物量积累的效应, 确立适于促进绿色阶段细胞生长的最佳氮源, 本试验分别以 NaNO_3 和 NH_4Cl 作为氮源, 结合应用 pH 缓冲液 Hepes, 以雨生红球藻株系 797 为试验材料, 检测不同氮源对雨生红球藻绿色阶段细胞比生长速率、生物量、叶绿素含量以及藻液 pH 的影响。通过综合各种参

数, 确定促进雨生红球藻绿色阶段藻细胞生长的最适宜氮源和 pH 等培养条件, 为雨生红球藻规模化培养和虾青素生产及高值开发利用提供理论依据和技术支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 藻种

试验所用的藻种为雨生红球藻株系 797, 上海光语生物科技有限公司。经过多级划板进行分离纯化, 再经抗生素除菌^[14]后, 获得无菌种子藻用于试验。

1.2 培养基及配置

试验所用培养基为 BG11 培养基^[15], 氮源分别为 NH_4Cl 和 NaNO_3 。BG11 培养基(1 L)含 1.50 g NaNO_3 或 0.944 g NH_4Cl , 4.00 mg K_2HPO_4 , 7.50 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6 mg $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, 6 mg $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{NH}_4\text{OH}$, 1.00 mg Na_2EDTA , 36.00 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20.00 mg Na_2CO_3 , 2.86 mg H_3BO_3 , 1.81 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.22 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.39 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.08 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.05 mg $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 。所用药品均为分析纯。用 1 mol/L 的 HCl 调节 pH 值到 7.1。培养基 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。各种母液及 BG11 工作液配置见王亚君等(2017)的报道^[16]。

1.3 主要试剂和仪器

Hepes 缓冲剂, 北京索莱宝科技有限公司; 鲁哥氏碘液(碘化钾、冰醋酸、碘), 天津市北辰方正试剂厂、安徽蚌埠化学试剂厂、上海银典化工有限公司。血球计数板, 上海求精生化试剂仪器有限公司; 滤膜, 上海市新亚净化器件厂。

SHB-III 循环水式多用真空泵, 北京科伟永兴仪器有限公司; 紫外/可见分光光度计, 北京瑞利分析仪器有限公司; 自动灭菌器, 日本 Panasonic 公司; LED 型顶置人工气候箱, 中国宁波东南仪器有限公司; pH 酸度计, 中国上海仪电科学仪器股份有限公司; 双人单面洁净工作台, 上海博讯公司; 台式冷冻离心机, 美国贝克曼库尔特公司; 研究级正置荧光显微成像系统, 日本奥林巴斯公司; 水分测定仪, 德国赛多利斯公司; 超纯水机, 美国密理

博公司。

1.4 雨生红球藻培养条件

将纯化无菌的雨生红球藻种子藻培养至对数期, 取对数期藻细胞接种。以 1.2×10^5 cells/mL 的密度接种于含 1 L 培养液的 2.5 L 三角烧瓶内, 所有操作均在超净工作台中进行。在人工气候箱内设置温度为 25 °C, 湿度为 50%, 24 h 光照, 光照强度为 1 000 lx。各处理均连续培养 10 d, 即雨生红球藻绿色阶段的天数。

为检测氮源不同导致培养藻液 pH 变化是否对处于绿色阶段的雨生红球藻细胞产生显著影响, 另设处理, 在初始不同氮源培养基中一次添加 25 mmol/L 的 Hepes 缓冲液^[17]以稳定藻液 pH, 另一处理为适时添加 Hepes 保持 pH 值始终为 7.0。

1.5 雨生红球藻细胞比生长速率的测定

每组试验设 6 个重复。培养期间每天取藻样观察分析。将雨生红球藻培养液充分摇匀后, 用移液枪迅速移取 5 mL 至小烧杯, 再加入 1 mL 鲁哥氏碘液后摇匀。雨生红球藻细胞经鲁哥氏碘液固定后, 在显微镜下使用血球计数板进行计数。若细胞数目较多, 稀释后再计数。鲁哥氏碘液^[14]: 取 20 g 碘化钾溶于 200 mL 20% 的冰醋酸水溶液中, 溶解后再加入 10 g 碘, 完全溶解后在棕色的试剂瓶中密闭保存。

根据公式^[18]计算细胞的比生长速率:

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / (t - t_0)$$

式中 N_0 和 N_t 分别代表单位水体微藻的起始细胞浓度和经过 t d 的细胞浓度, 单位: cells/mL。

1.6 雨生红球藻生物量的测定

从各组中分别取 5–10 mL 藻液(v), 每组 6 个重复。用玻璃砂芯真空抽滤, 滤膜为混合纤维素酯微孔滤膜, 孔径 0.45 μm , 直径 50 mm。滤膜使用前先用蒸馏水煮沸漂洗 2 次。抽滤前使用水分测定仪对漂洗过的滤膜进行烘干称重 m_1 , 抽滤后将用双蒸水抽滤清洗的滤膜移至水分测定仪进行烘干称重 m_2 。

生物量 $m = (m_2 - m_1) / v$, 单位: g/L。

1.7 藻液叶绿素含量的测定

每试验组各取 10 mL 雨生红球藻藻液在室温下

离心(3 000 r/min, 3 min), 弃去上清液, 藻泥用双蒸水清洗, 反复离心清洗 3 次后, 在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中冻融 3 次, 备用。取 0.15 g 冻融 3 次后的藻泥加入 10 mL 85%的乙醇溶液, 在 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的水浴中提取 9 min。然后进行离心(3 200 r/min, 3 min)取上清液。使用分光光度计测定 665 nm 以及 649 nm 波长处的吸光度值^[19]。

使用王英典等^[20]的方法计算雨生红球藻培养液中叶绿素含量。

$$C_a=13.95A_{665}-6.88A_{649}$$

$$C_b=24.96A_{649}-7.32A_{665}$$

式中 C_a 、 C_b 分别代表叶绿素 a 和叶绿素 b 的浓度(mg/L); A_{665} 、 A_{649} 分别为 665 nm 和 649 nm 处的吸光度值。

1.8 统计分析

所有数据经 Excel 整理后, 采用 SPSS 11.5 软件进行方差分析, 所有数据均以平均值 \pm 标准差表示, 差异显著性以 $P<0.05$ 为显著, $P<0.01$ 为极显著。

2 结果与分析

2.1 不同氮源对雨生红球藻细胞生长的影响

分别以 NaNO_3 和 NH_4Cl 为氮源的 BG11 培养基连续培养雨生红球藻 10 d, 每天取藻样检测藻液细胞密度。结果(图 1)显示, 不同氮源培养的雨生红球藻绿色阶段细胞密度及增值存在差异, 特别是培养 5 d 后差异极显著($P<0.01$)。以 NH_4Cl 作为氮源培养的雨生红球藻生长缓慢, 在接种后培养 5–10 d, 细胞密度显著低于以 NaNO_3 为氮源的细胞密度。在 NH_4Cl 氮源培养基中加入 pH 缓冲液处理, 培养的雨生红球藻细胞生长显著加快, 细胞密度高于未加 pH 缓冲液的 NH_4Cl 氮源培养的细胞密度 1.48 倍, 稍高于未加 pH 缓冲液的 NaNO_3 氮源培养的细胞密度。在 NaNO_3 氮源培养基中加入 pH 缓冲液处理, 培养的细胞密度也显著高于未加 pH 缓冲液的 NaNO_3 氮源, 但增加幅度低于加入 pH 缓冲

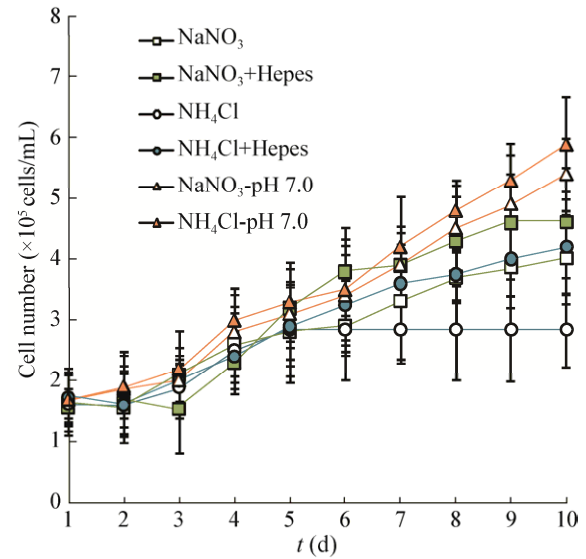


图 1 不同氮源及添加 pH 缓冲液对雨生红球藻细胞生长的影响

Figure 1 Effects of different nitrogen sources and addition of pH buffer on cell growth of *H. pluvialis*

液的 NH_4Cl 氮源的增幅。始终保持培养液 pH 为 7.0 (N-pH 7.0), 在第 6 天前, 藻细胞数目与两种氮源分别在最初仅添加一次 Hepes 处理(N+Hepes)的藻液细胞数目无明显差异。第 6 天后, N-pH 7.0 处理的藻液细胞数目高于 N+Hepes 处理的藻液, 而且 NH_4Cl 氮源效果好于 NaNO_3 氮源, 尽管二者差异未达极显著水平($P<0.01$)。这说明 NaNO_3 氮源和 NH_4Cl 氮源对雨生红球藻生长影响的差异, 可能与这两种氮源引起培养藻液 pH 变化相关。因为, 加入 pH 缓冲液后, 这两种氮源培养的藻细胞生长差异明显缩小。显然, 培养藻液 pH 的稳定有利于雨生红球藻绿色阶段藻细胞的生长。藻液始终保持 pH 7.0 时, 尤以 NH_4Cl 为氮源生长较好。

比较各处理雨生红球藻细胞的比生长速率(图 2)发现, 以 NaNO_3 和 NH_4Cl 分别作为氮源培养的雨生红球藻细胞比生长速率差异显著。但是, 在试验藻液中起始时加入一次 pH 缓冲液以及多次加入 pH 缓冲液使试验藻液始终保持 pH 7.0, 两种氮源的细胞比生长速率均高于未加入 pH 缓冲液的, 但两种氮源之间差异不显著。这再次说明, 两种氮源

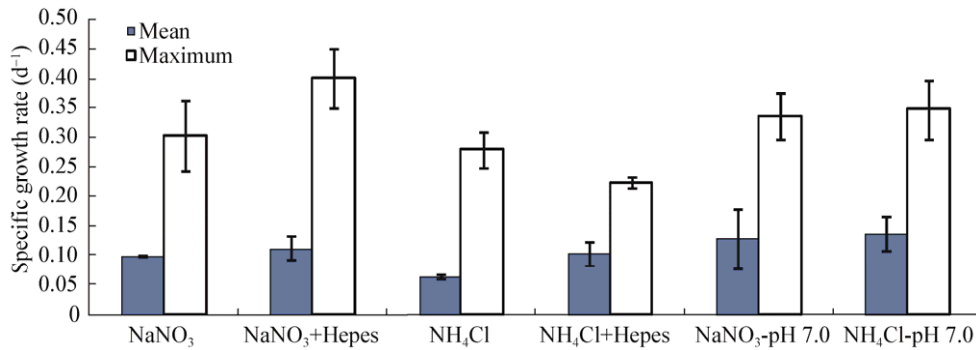


图 2 不同氮源及添加 pH 缓冲液培养的雨生红球藻细胞比生长速率

Figure 2 Specific growth rate of *H. pluvialis* cultured in the different nitrogen sources with/without addition of pH buffer

可能导致培养藻液 pH 的变化而使藻细胞生长发生差异。

进一步测试分析各处理培养雨生红球藻的生物量(图 3)显示,生物量积累变化与细胞密度变化相似,在两种氮源培养基中添加 pH 缓冲液能显著促进细胞生长。雨生红球藻生物量高低顺序: $\text{NH}_4\text{Cl-pH 7.0} > \text{NaNO}_3\text{-pH 7.0} > \text{NaNO}_3 + \text{Hepes} > \text{NH}_4\text{Cl} + \text{Hepes} > \text{NaNO}_3 > \text{NH}_4\text{Cl}$ 。同样,添加 pH 缓冲液的两氮源间差异小于未加 pH 缓冲液的两氮源间差异。

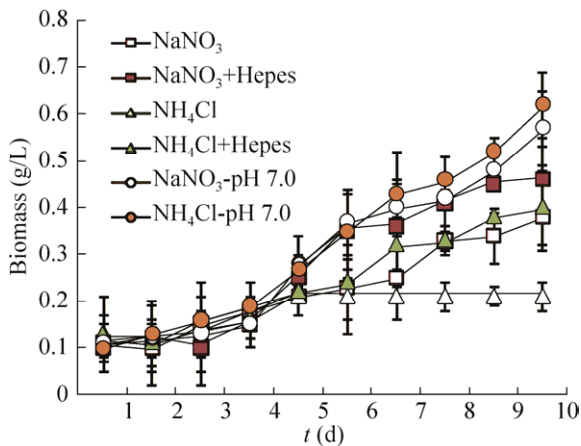


图 3 不同氮源及添加 pH 缓冲液培养的雨生红球藻生物量

Figure 3 Biomass of *H. pluvialis* cultured in the different nitrogen sources with/without addition of pH buffer

2.2 不同氮源培养雨生红球藻的藻液 pH 值变化

试验显示,两种氮源可能导致雨生红球藻藻液 pH 的变化,进而影响到藻细胞生长。接着,测试两种氮源及添加 pH 缓冲液连续培养 10 d 期间雨生红球藻藻液的 pH 变化。由图 4 可见,以 NH_4Cl 作为氮源培养雨生红球藻,可导致藻液 pH 值迅速下降, pH 值从接种时的 7.10 ± 0.03 下降到第 10 天的 4.60 ± 0.31 。加入 pH 缓冲液 Hepes 的 NH_4Cl 氮源培养雨生红球藻,藻液 pH 值虽然在后期仍降低,但下降幅度较小。然而,使用 NaNO_3 作为氮源培养雨生红球藻,藻液 pH 值则在中后期急剧上升,培养液的 pH 值从起始的 7.10 ± 0.02 升高到培养 10 d 后的 9.40 ± 0.71 。加入 pH 缓冲液 Hepes 使藻液 pH 值一直保持在 7.1 左右。这表明以 NaNO_3 、 NH_4Cl 作为氮源培养雨生红球藻导致藻液 pH 值发生较大

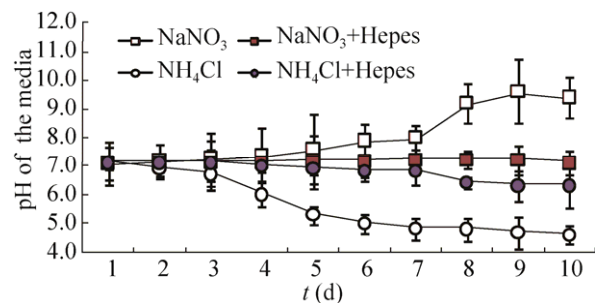


图 4 不同氮源对雨生红球藻液 pH 的影响

Figure 4 Effects of different nitrogen sources on the pH in the cultured media of *H. pluvialis*

改变, NH_4Cl 氮源导致藻液 pH 值降低(酸化), 而 NaNO_3 氮源导致藻液 pH 值升高(碱化)。藻液碱化或酸化必然抑制藻细胞生长。加入 pH 缓冲液 Hepes 可有效稳定藻液的 pH。

2.3 不同氮源对雨生红球藻细胞叶绿素含量的影响

不同氮源导致藻液 pH 变化必然影响雨生红球藻细胞光合生理。检测不同处理培养雨生红球藻 10 d 期间藻细胞叶绿素 a (图 5) 和叶绿素 b 含量变化 (图 6) 显示, NaNO_3 氮源培养的藻细胞叶绿素 a/b 的含量随着培养时间延长持续上升。但是, NH_4Cl 氮源培养的细胞叶绿素 a/b 的含量从第 6 天起迅速下降, 至 10 d 时, 含量分别为前者的 48% 和 38%。两种氮源分别添加 pH 缓冲液 Hepes 培养的雨生红球藻细胞叶绿素 a/b 含量随培养时间延长几乎直线增加, 其中 NH_4Cl 氮源添加 Hepes 使藻细胞叶绿素 a/b 含量增加幅度高于 NaNO_3 氮源添加 Hepes 的增加值。这说明不同氮源导致藻细胞培养液 pH 的较大变化显著影响到细胞光合作用, 最终影响到细胞生长。当 pH 保持 7.0 时, NH_4Cl 在后期的促生效果好于 NaNO_3 。

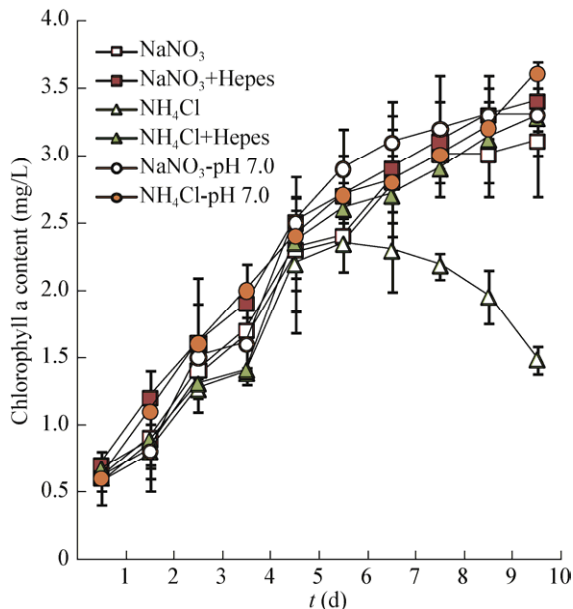


图 5 不同氮源对雨生红球藻叶绿素 a 的影响
Figure 5 Effects of different nitrogen sources on the content of chlorophyll a in *H. pluvialis* cells

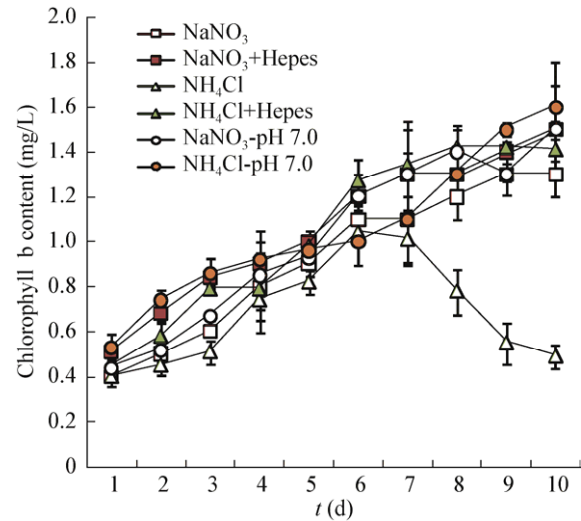


图 6 不同氮源对雨生红球藻细胞叶绿素 b 含量的影响
Figure 6 Effects of different nitrogen sources on the content of chlorophyll b in *H. pluvialis* cells

3 讨论与结论

氮是影响植物生长的一个重要的营养因子, 它是植物体内合成蛋白质、磷脂、核酸和叶绿素等的必需元素。氮也是雨生红球藻等微藻培养基的主要成分。选择合适的氮源及用量和使用时期是优化微藻培养体系和调控细胞富集一些高值化合物的重要手段。

NaNO_3 等硝酸盐是最常用于培养雨生红球藻等微藻的氮源。然而, 有研究指出, 氨态氮等还原态氮是微藻等浮游植物优先利用的氮源。因为利用 NH_4^+-N 消耗的能量更少, 而 NO_3^--N 等氧化态氮需要先在酶的作用下转化成还原态 NH_4^+-N 才能被利用^[21-22]。与之不一致的是, 崔克辉等^[23]报道高质量浓度的氨态氮对浮游植物有毒害作用, 可抑制浮游植物的生长。高桂玲等^[24]研究发现, 雨生红球藻更适宜在低浓度 NH_4Cl 培养基中生长, 最适浓度为 0.1 g/L (1.87 mmol/L), 若用硝酸盐为氮源, 适宜浓度为 5.88 mmol/L。此外, Borowitzka 等^[25]、殷明焱等^[26]、翟兴文等^[27]和刘峰^[12]分别报道雨生红球藻最适氮源浓度是硝酸盐 0.5–5.0 mmol/L、0.1–10.0 mmol/L (最适 5.0 mmol/L)、4.0 mmol/L 和 11.76 mmol/L。可见, 不同实验得出用于雨生红球藻培养的氮源及其适

宜浓度相差甚大,有关 NO_3^- -N和 NH_4^+ -N对雨生红球藻细胞生长的效应研究结论也不一致。这可能与不同实验所用藻株和各种培养条件组合差异相关。

本试验发现,以 NH_4Cl (17.65 mmol/L)作为氮源培养雨生红球藻,在培养早期,藻细胞的生长速率高于以 NaNO_3 为氮源的藻细胞生长速率。随着培养时间的延续,以 NH_4Cl 为氮源的藻细胞生长速率显著低于以 NaNO_3 为氮源培养的细胞。这是由于,从第3天开始, NH_4Cl 氮源导致藻细胞培养液的pH值迅速酸化,进而严重抑制了雨生红球藻的生长。以 NaNO_3 氮源培养雨生红球藻引起藻液碱化,导致培养后期细胞生长减慢,但减低幅度小于 NH_4Cl 氮源。在这两种氮源培养基中加入pH缓冲液Hepes能有效稳定藻液的pH,藻细胞生长显著加速,生物量和细胞叶绿素含量均显著高于不加Hepes培养的藻细胞。用普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)^[28]和蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)的研究也获得与之相似的结果^[17]。一些研究发现,在强光等逆境条件下,铵态氮能激活藻细胞光合碳同化途径。由此可见,分别以 NaNO_3 和 NH_4Cl 作为氮源培养雨生红球藻导致藻细胞生长的差异,主要是不同氮源引起培养藻液pH变化所致。在培养基中添加pH缓冲剂Hepes,藻液pH在培养过程中保持稳定,两种氮源分别用于培养雨生红球藻,在绿色阶段均能获得理想的生物量,特别是在保持藻液pH 7.0条件下, NH_4Cl 为N源,促生效果更好。连续培养过程中,藻液pH的变化及不稳定性是制约微藻高产培养的一个主要因素。在直接利用 CO_2 为碳源的微藻规模化养殖中, CO_2 连续供入常导致藻液酸化而影响藻细胞生长。为克服这一障碍,已建立了一些 CO_2 反馈抑制、间断供气以及酸碱中和等工艺。适量Hepes缓冲液能较好地控制藻液pH,这为规模化微藻养殖提供一个简易、有效控制藻液pH稳态的方法。总之,为促进雨生红球藻绿色阶段细胞生长和增加生物量,只要控制培养过程中藻液的pH稳定

在7.0左右, NaNO_3 和 NH_4Cl 都可用作雨生红球藻培养的氮源。下一步我们将以此为依据,优化雨生红球藻营养生长阶段的规模化培养体系,特别是以富含铵态氮废水为培养基的培养工艺,并与促进红色阶段细胞富集虾青素培养体系有机偶联,为推进天然虾青素商业化生产提供技术支撑。

REFERENCES

- [1] Sharon-Gojman R, Maimon E, Leu S, et al. Advanced methods for genetic engineering of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales)[J]. *Algal Research*, 2015, 10: 8-15
- [2] Shang MM, Ding W, Zhao YT, et al. Enhanced astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* using butylated hydroxyanisole[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 236: 199-207
- [3] Poonkum W, Powtongsook S, Pavasant P. Astaxanthin induction in Microalga *H. pluvialis* with flat panel airlift photobioreactors under indoor and outdoor conditions[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2015, 45(1): 1-17
- [4] Boussiba S, Lu F, Vonshak A. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. *Methods in Enzymology*, 1992, 213: 386-391
- [5] Del Río E, Ación FG, García-Malea MC, et al. Efficiency assessment of the one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis*[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2008, 100(2): 397-402
- [6] Zhang ZB, Zhou AF, Xu LJ, et al. The nutrient requirement and culture conditions of a green alga *Haematococcus pluvialis* Sp 712[J]. *Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences)*, 2003, 32(4): 66-72 (in Chinese)
张在宝, 周爱芬, 徐珺佳, 等. 雨生红球藻712株营养需求及其培养条件[J]. *上海师范大学学报: 自然科学版*, 2003, 32(4): 66-72
- [7] Ling SF. Optimization of medium and inductive conditions on *Haematococcus pluvialis*[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2013, 41(11): 266-267 (in Chinese)
凌善锋. 雨生红球藻培养基和诱导条件优化[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(11): 266-267
- [8] Tripathi U, Sarada R, Rao SR, et al. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media[J]. *Bioresource Technology*, 1999, 68(2): 197-199
- [9] Chen XC, Huang WG, Ouyang Q. The study of culture conditions of *Haematococcus pluvialis* and its astaxanthin accumulation[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2006, 6(4): 41-45 (in Chinese)
陈兴才, 黄伟光, 欧阳琴. 雨生红球藻培养及虾青素累积条件探讨[J]. *中国食品学报*, 2006, 6(4): 41-45
- [10] Ying QL, Ye Y. Some factors affecting growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* strain 797[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2002, 8(1): 56-60 (in Chinese)
应巧兰, 叶勇. 影响雨生红球藻797株生长和虾青素积累的

- 某些因素[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(1): 56-60
- [11] Cheng J, Li K, Zhu YX, et al. Transcriptome sequencing and metabolic pathways of astaxanthin accumulated in *Haematococcus pluvialis* mutant under 15% CO₂[J]. Bioresource Technology, 2017, 228: 99-105
- [12] Liu F. Mutation breeding of *Haematococcus pluvialis* and optimizing the nitrogen and phosphorus of its medium[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2015 (in Chinese)
刘峰. 雨生红球藻优良藻株的诱变选育及其培养基的氮磷浓度的优化[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2015
- [13] Wu CB, Zhang JF, Zhai XW. Effect of nitrogen sources on the growth of *Haematococcus pluvialis* and Marine microalgae[J]. Hebei Fisheries, 2003(2): 24-25 (in Chinese)
吴长斌, 张佳峰, 翟兴文. 氮源对雨生红球藻和扁藻生长的影响[J]. 河北渔业, 2003(2): 24-25
- [14] Cui BX. Study on production of astaxanthin for *Haematococcus pluvialis* 712[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan Polytechnic University, 2008 (in Chinese)
崔宝霞. 雨生红球藻 712 株生产虾青素研究[D]. 武汉: 武汉工业学院硕士学位论文, 2008
- [15] Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales)[J]. Bacteriological Reviews, 1971, 35(2): 171-205
- [16] Wang YJ, Zhao K, Wu ZJ, et al. Study on dehydration method of wet algae using ethanol[J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2017, 37(2): 110-114 (in Chinese)
王亚君, 赵奎, 武振晋, 等. 湿藻藻泥乙醇脱水干燥法的研究[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2017, 37(2): 110-114
- [17] Wang SC, Wang T, Zhao SG, et al. Growth, pigment and neutral lipids accumulation in *Chlorella pyrenoidosa* under different nitrogenous sources[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2008, 17(2): 197-201 (in Chinese)
王顺昌, 王陶, 赵世光, 等. 不同氮源对蛋白核小球藻生长、色素和中性脂肪积累的影响[J]. 激光生物学报, 2008, 17(2): 197-201
- [18] Li B, Ou LJ, Lv SH. Effects of different kinds of nitrogen on growth and nitrate reductase activity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae)[J]. Marine Environmental Science, 2009, 28(3): 264-267 (in Chinese)
李斌, 欧林坚, 吕颂辉. 不同氮源对海洋卡盾藻生长和硝酸还原酶活性的影响[J]. 海洋环境科学, 2009, 28(3): 264-267
- [19] Bai FN, Mu FX, Yang DY, et al. Optimum conditions of extracting chlorophyll from *Platymonas subcordiformis*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(3): 108-110 (in Chinese)
白飞妮, 穆富香, 杨代宇, 等. 亚心形扁藻中叶绿素优化提取条件[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(3): 108-110
- [20] Wang YD, Liu N, Liu QR. Experimental Guidance for Plant Biology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2011: 57 (in Chinese)
王英典, 刘宁, 刘全儒. 植物生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2011: 57
- [21] Gardner WS, Lavrentyev PJ, Cavaletto JF, et al. Distribution and dynamics of nitrogen and microbial plankton in southern Lake Michigan during spring transition 1999-2000[J]. Journal of Geophysical Research, 2004, 109(C3): C03007, DOI: 10.1029/2002JC001588
- [22] Paerl HW, Xu H, McCarthy MJ, et al. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): The need for a dual nutrient (N&P) management strategy[J]. Water Research, 2011, 45(5): 1973-1983
- [23] Cui KH, He ZC, Zhang JY, et al. Effects of mimic wastewater containing N, P on activities of catalase and glycolate oxidase in the seedlings of rice[J]. Journal of Wuhan University (Natural Science Edition), 1995, 41(2): 245-250 (in Chinese)
崔克辉, 何之常, 张甲耀, 等. 模拟污水中氮、磷对水稻幼苗过氧化氢酶和乙醇酸氧化酶的影响[J]. 武汉大学学报: 自然科学版, 1995, 41(2): 245-250
- [24] Gao GL, Yang XW, Cheng JY. Effects of ammonia concentrations and temperatures on *Haematococcus lacustris* growth[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2016, 35(2): 136-143 (in Chinese)
高桂玲, 杨雪薇, 成家杨. 氨氮质量浓度和温度对雨生红球藻生长特性的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2016, 35(2): 136-143
- [25] Borowitzka MA, Huisman JM, Osborn A. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis* 1. Effects of nutrients on growth and cell type[J]. Journal of Applied Phycology, 1991, 3(4): 295-304
- [26] Yin MY, Zhang JP, Meng ZC, et al. Dynamic activity of inorganic nitrogen impacting on *Haematococcus pluvialis*[A]//General Meeting of China Algae Society (The 10th Academic Conference)[C]. Beijing: Chinese Society for Oceanology and Limnology, 1999 (in Chinese)
殷明焱, 张京浦, 孟昭才, 等. 无机氮的动态变化对雨生红球藻的影响[A]//中国藻类学会会员大会暨第十次学术研讨会[C]. 北京: 中国海洋湖沼学会, 1999
- [27] Zhai XW, Jiang XM, Lu KX. Studies on the rearing of *Haematococcus pluvialis*[J]. Reservoir Fisheries, 2002, 22(5): 16-18 (in Chinese)
翟兴文, 蒋霞敏, 陆开彤. 雨生红球藻的优化培养研究[J]. 水利渔业, 2002, 22(5): 16-18
- [28] Azov Y, Goldman JC. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1982, 43(4): 735-739