

红外光谱在微藻领域的应用研究进展

刘京华^{1,2}, 陈 军³, 秦 松³, 戚泽明⁴, 黄 青^{1,2,4*}

1. 安徽科技学院生命科学院, 安徽 凤阳 233100
2. 中国科学院合肥物质科学研究院技术生物所, 安徽 合肥 230031
3. 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003
4. 中国科学技术大学国家同步辐射实验室, 安徽 合肥 230029

摘 要 微藻富含类胡萝卜素、维生素、蛋白质、多不饱和脂肪酸等多种人体和动物所必需的营养成分, 同时在水生态系统的维持和保护中也扮演着重要的角色, 因此开展微藻生物学的研究具有十分重要的实际应用价值。传统的微藻成分的检测分析需要经过微藻细胞研磨破碎、有机溶剂分离提取、液(气)相检测等一系列的繁琐的操作步骤, 有费时、需要高昂的仪器设备、操作过程复杂等缺点, 因此需要发展更加快速高效的微藻细胞组分检测分析技术。红外光谱作为一种高效的物质检测和分析手段可以实现对微藻样品中的蛋白、脂类、核酸、多糖、叶绿素、类胡萝卜素等多种成分同时分析, 具有简单、快速和无损检测等优势, 特别是结合显微光谱技术的红外光谱成像可以在微空间尺度上研究单一细胞或组织中各组分的变化。近年来, 尤其是随着同步辐射技术的迅速发展, 为红外光谱仪器提供质量更好、能量更高的同步辐射光源, 使得红外光谱显微光谱及成像检测技术具有更高的灵敏度和空间分辨率, 实现了能够在细胞和亚细胞尺度上对个体进行高空间分辨的原位观测, 这在一定程度上解决了许多常规的检测分析技术不能同时兼顾高通量测量和高空间分辨率观察之间的矛盾。首先介绍了红外光谱技术的原理及其特点并分析了显微红外光谱及成像技术在生物样品检测中的独特优势, 特别介绍红外光谱结合化学计量学的分析方法在生物学研究领域的应用。接下来综述了此项技术在分类鉴定、生长代谢监测、育种、水环境、食品医药等与微藻相关领域国内外的应用研究进展。比如, 结合化学计量学方法红外光谱能够进行微藻的快速鉴定、判别和分类。利用红外光谱多组分快速检测的优势, 可以实现微藻生长代谢的研究。基于红外光谱无损、高效检测的特点, 可以实现油脂、 β -胡萝卜素、虾青素等高产藻株的快速筛选。另外, 微藻还可以有效地吸附废水中的重金属和有机活性染料, 利用红外光谱可以对其吸附和降解环境污染物的机理进行研究。红外光谱还能够快速高效地实现微藻成分的分析 and 鉴定, 因而可以用于微藻食品药品质量的检测和真伪的鉴定。然而, 红外光谱在微藻的研究和应用方面还处于发展阶段, 尚存在着一定的缺点和不足, 对此进行了讨论和分析并提供了相应的解决方案。最后, 对红外光谱在微藻的规模化养殖、高产藻株的筛选、微藻的生理、细胞器的结构和功能的研究等领域进行了展望。

关键词 红外光谱技术; 中红外光谱; 近红外光谱; 显微光谱成像; 同步辐射; 微藻

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** R **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)01-0079-08

引 言

微藻(microalgae)是一类能够利用光能进行自养的微小生物, 其形态多样, 种类繁多, 分布广泛。很多微藻因富含类胡萝卜素、蛋白质、不饱和脂肪酸等多种营养成分, 已经

被广泛应用到水产养殖、畜牧、食品、医药等领域并实现了规模化的人工养殖^[1-4]; 也有些微藻可以引起大规模生态灾害, 每年造成经济损失数百亿元, 严重威胁海洋生物和人类的生命安全^[5-6]; 还有些微藻因为具有吸附和去除水体中重金属的能力被用于水生态环境污染的防治^[7-8]。可见进行微藻的生物学研究, 无论是对于有益微藻的工业化生产, 还是

收稿日期: 2017-12-17, 修订日期: 2018-03-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(11475217, 11775272, 11635013)资助

作者简介: 刘京华, 1982年生, 安徽科技学院生命科学院讲师 e-mail: biology200801@163.com

* 通讯联系人 e-mail: huangq@ipp.ac.cn

有害微藻的生态防控都具有重要意义。经过近三十年的快速发展,我国微藻生物学研究取得了长足进步,但仍有许多问题需要解决,如微藻优良种质选育工作仍需加强^[9],微藻的工业化低效培养仍是瓶颈^[10],有害藻类的生态防控措施仍未建立等^[11]。

广泛和深入开展这些研究工作需要能够对微藻进行快速在线、高效无损的观测和分析。然而,目前微藻的检测和分析主要依赖于藻体成分的破碎、提取、分离和含量测定这一常规的检测技术,此类方法操作步骤复杂繁琐、成本较高、分析耗时较长^[12-15],破碎提取破坏了细胞结构无法得到微藻细胞内的空间位置信息。因此,我们开始考虑结合使用新技术和新方法用于微藻领域的交叉学科研究,由此帮助解决微藻生物学研究和应用的相关问题。为此,本文介绍了红外光谱在微藻领域的研究及应用情况。把红外光谱应用于微藻生物学研究,无论是对微藻种质鉴定、优良种质选育、生长代谢调控等基础性研究,还是发展微藻产品质量控制的应用性技术都具有重要意义。

1 红外光谱技术

1.1 红外光谱及特点

红外光谱是基于分子或者基团的振动和转动而产生的光谱,因而可以根据光谱的特征来确定样品的组分、性质、结构及含量。由于绝大多数有机物和无机物的基频吸收带都出现在中红外区($4\ 000\sim 400\text{ cm}^{-1}$)而倍频和合频出现在近红外区($13\ 333\sim 4\ 000\text{ cm}^{-1}$),因而对应两个光谱波段的中红外光谱(mid-infrared spectroscopy, MIRS)和近红外反射光谱(near-infrared reflectance spectroscopy, NIRS)是研究和应用最多的两种红外光谱检测分析技术^[16]。在测量方式上,可以分为光栅分光得到的红外光谱和通过傅里叶变换得到的红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy: FTIR spectroscopy)。与常规检测技术相比,红外光谱检测技术具有如下优点(如表 1 所示):(1)它是一种无损检测技术,不会对生物样品造成损害,因而可以用于生物活体测量;(2)它灵敏度较高,可以实现单细胞个体的原位和无损检测^[17];(3)它可以对生物样品中多种化学成分同时进行分析;(4)中红外波长较短,结合现代显微成像技术,空间分辨率可达 $2\sim 3\ \mu\text{m}$,可以实现微观空间的观测;(5)对样品前处理要求不高,测量操作简单易行^[18]。

特别是红外光谱结合化学计量学的分析方法,已经在生物学领域有着广泛的应用。比如在微生物的鉴定和分类方面,Grunert 等^[19]基于人工神经网络(artificial neural network, ANN)的算法对荚膜型金黄色葡萄球菌致病菌进行区分,其识别准确率高达 98.2%;在生物的生长代谢研究中,Saharan 等^[20]利用红外光谱结合常规生化检测对酒精胁迫下的酵母的生长状况进行了分析,表明通过此类方法可以实现细胞内糖类、脂类和蛋白等成分变化的快速和高效观测。雨生红球藻是一种单细胞的绿藻其细胞主要由类胡萝卜素(β -胡萝卜素和虾青素)、脂类、蛋白质、多糖等几类组分构成,利用中红外和近红外光谱可以对微藻(雨生红球藻)进行快速

分析。图 1 显示,我们利用 MIRS 和 NIRS 可以实现对不同种类微藻的快速区分和多种组分的无损检测^[21-22]。

表 1 在生物样品分析中红外光谱与其他检测手段的技术特点比较

Table 1 The characteristic comparison between infrared spectroscopy and other measurement methods in biological sample analysis

检测手段	准确度	通量	检测成本	空间原位	多组分
红外光谱技术	较高	快	低	是	是
气(液)相	高	慢	较高	否	否
分光光度法	低	较慢	低	否	否
生化分子技术	高	慢	高	是	否

1.2 显微红外光谱及成像技术

传统的组织学方法主要依赖于光学或电子显微镜对细胞或组织样品形貌特征进行检测,对微区域的化学组成分析时还需要进行染色或标记,操作步骤复杂并且只能分析少数特定几类组分。红外显微光谱及成像可以有效的解决以上问题。红外显微光谱是将显微镜和红外光谱检测两者的优势相结合,可以实现样品特定微区红外光谱信号的测量和采集,得到微观空间上某一位点的物质结构和化学组成信息^[23]。特别是红外光谱显微成像,使得光谱检测技术能够在微观尺度上对样品进行检测和分析,从单细胞、组织和个体水平上研究组分含量的变化^[24]。目前红外光谱成像可以分为两种:一种是依靠载物台逐点移动对样品某一区域进行单通道的光谱信息采集,然后再进行点对点的化学成像^[25];另一种是 1995 年发展起来的焦平面阵列检测技术(focal plane array, FPA),它将显微光谱检测与焦平面阵列检测器相结合从而不需要借助载物台的移动即可实现特定区域的多通道快速扫描,很大程度上减少了样品红外成像检测的时间^[26]。

最近,研究人员进一步发展了基于同步辐射的红外光谱技术。同步辐射(synchrotron radiation)光源具有辐射强度高、单色性好、准直性高、光谱连续且范围宽等优点,为红外光谱提供了质量更好、亮度更高(常规光源的 $100\sim 1\ 000$ 倍)的光源,使得红外光谱及成像的空间分辨率能够达到 $2\sim 3\ \mu\text{m}$,且信噪比(S/N)显著提高,解决了传统热光源无法实现的高空间分辨率和高质量光谱快速测量的问题^[27-29]。正是基于同步辐射光源的红外光谱的独特优势,此项技术已经被逐步用于在显微水平对生物体的生长、代谢、辐射、毒理等方面的研究^[30-36]。目前显微红外光谱及成像技术应用于微藻的研究正处在起步阶段,相关文献不多,主要集中于微藻生理代谢的研究。比如美国的 Hirschmugl 教授的研究小组利用基于同步辐射的红外光谱成像对威氏海链藻(*Thalassiosira weissflogii*)的细胞进行的检测,可以观测到不同浓度 CO_2 生长条件下藻细胞中脂类、蛋白和多糖含量的差异^[37-38];Wetzel 等^[39]利用红外光谱成像结合同位素标记的方法研究了刚毛藻(*Cladophora glomerata*)对氮元素的吸收与细胞内脂类、蛋白和多糖的关系。在这一方面我们也做了一些探索性的工作。例如,利用 Bruker 66v/s Fourier 变换光

谱仪我们对培养 20 天的雨生红球藻不同突变株细胞中的各组分进行了红外成像,其空间分辨率能够达到 $2\ \mu\text{m}$ 。如图 2 所示,细胞中类胡萝卜素($3\ 010\ \text{cm}^{-1}$)的光谱信号强度和空间分布与脂质($1\ 740\ \text{cm}^{-1}$)相一致,这是因为脂质参与了虾青素的转运和贮存,两者的含量和空间分布有很大的相关性。

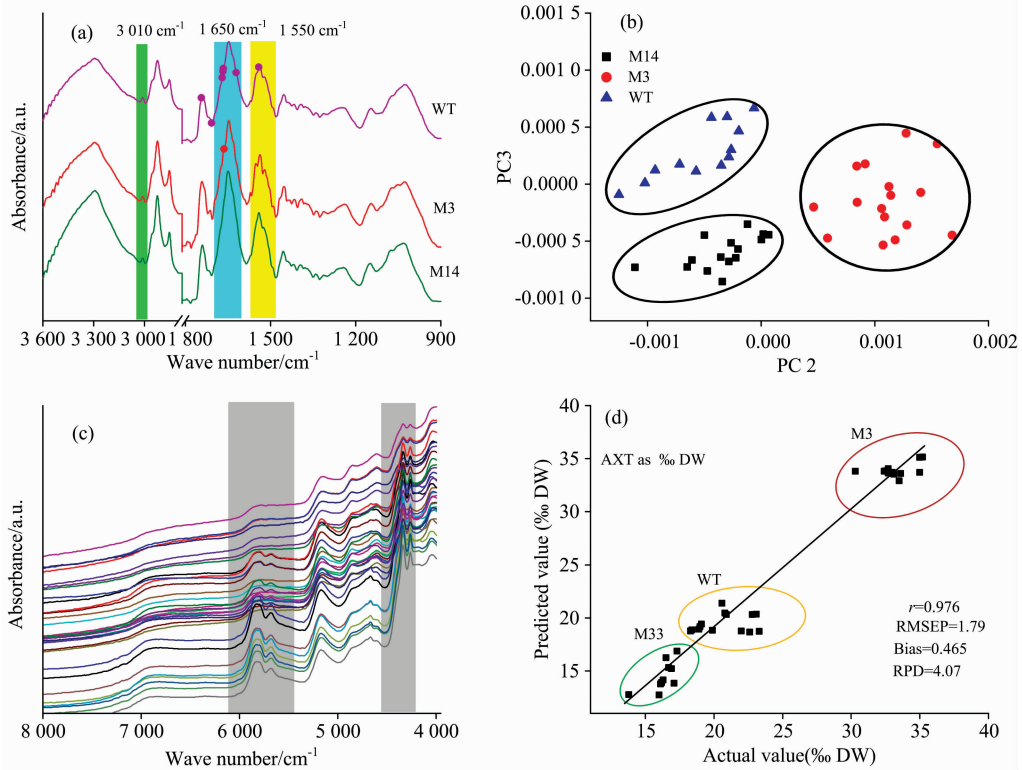


图 1 (a)野生型(WT)和 M3, M14 突变型雨生红球藻株各组分的中红外光谱($3\ 010\ \text{cm}^{-1}$ C=C 的伸缩振动, $1\ 650$ 和 $1\ 550\ \text{cm}^{-1}$ 主要来自为蛋白质 Amide I 和 Amide II 振动及部分类胡萝卜素分子的振动); (b)基于红外光谱的主成分分析; (c)野生型(WT)和 M3, M33 突变型藻株各组分的近红外光谱; (d)基于近红外光谱数据模型对虾青素(AXT)与细胞干重(DW)含量比例的预测^[21-22]

Fig. 1 (a) MIRS for wild-type (WT) *Haematococcus pluvialis* and the mutants M3 and M14 (the $3\ 010\ \text{cm}^{-1}$ band is ascribed to C=C stretching mode, $1\ 650$ and $1\ 550\ \text{cm}^{-1}$ bands are ascribed to Amide I and Amide II of proteins and vibration of carotenoid molecules as well); (b) and principal component analysis (PCA) based on MIR data; (c) NIRS for WT *Haematococcus pluvialis* and the mutants M3 and M33; (d) Prediction of astaxanthin (AXT) as a percentage of DW (dry weight) in *Haematococcus pluvialis*^[21-22]

2 红外光谱在微藻研究领域的应用

图 3 概括了红外光谱在微藻研究领域的不同应用。接下来我们逐一详述此项技术在微藻相关领域的具体应用研究进展。

2.1 红外光谱技术在藻类的分类鉴定中的应用

红外光谱可用于藻类鉴别,即对各种藻种进行红外光谱测量,对得到的红外光谱数据进行统计学处理,结合不同的化学计量学方法进行分析。常用的方法有:主成分分析(principal component analysis, PCA),判别分析(discriminant analysis, DA),偏最小二乘法(partial least-squares, PLS),分级聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA),

性。特别是在 M3 突变藻株中,其细胞内的蛋白质、脂类和多糖的 MIRS 信号强度明显高于出发株,而这些成分的提高都有助于雨生红球藻细胞内虾青素的积累。因此,利用此项技术可以实现高产虾青素雨生红球藻突变株的早期快速筛选^[21]。

人工神经网络法(ANN)。结合以上分析方法,红外光谱在微藻的鉴定、判别和分类中具有广泛的应用前景。比如, Duygu 等^[40]利用红外光谱对小球藻和栅藻检测并利用其组分的差异实现了两类微藻的快速区分。Laurens 和 Wolfrum^[41]利用 PCA 方法对不同种属的硅藻、绿球藻和螺旋藻的 NIRS 和 FT-IRS 检测结果进行分析,发现根据细胞内油脂、色素等成分的含量差异可以很好地实现微藻区分。Kansiz 等^[42]利用 SIMCA 和 KNN 两类化学计量学方法对几株不同蓝藻的光谱数据分析结果表明红外光谱可以很有效的用于微藻的分类鉴定。

2.2 红外光谱在微藻组分定量分析及生长代谢监测中的应用

传统的组分含量的测定(比如液相和气相分析)需要经过

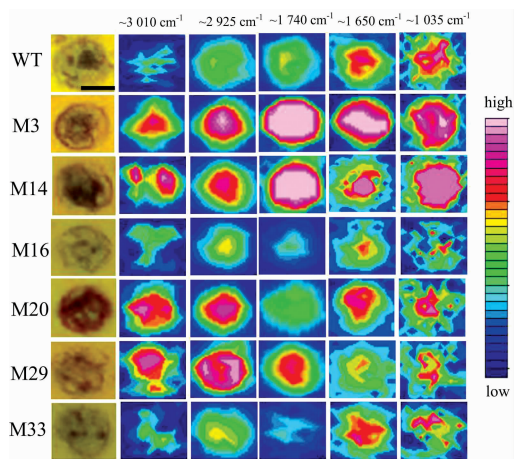


图 2 野生型 (WT) 和突变藻株各组分红外光谱显微成像 (空间分辨大约 $4 \mu\text{m}$) : $3\ 010\ \text{cm}^{-1}$ 的光谱信号对应于类胡萝卜素 $\text{C}=\text{C}$ 的成像; $2\ 925\ \text{cm}^{-1}$ 对应于脂质中 CH_3 和 CH_2 伸缩振动的成像; $1\ 740\ \text{cm}^{-1}$ 对应于脂质中 $\text{C}=\text{O}$ 的成像, $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 主要对应于蛋白质 Amide I 的成像; $1\ 035\ \text{cm}^{-1}$ 主要对应于藻细胞中多糖的分布成像^[21]

Fig. 2 Chemical mappings for different components in the wild-type (WT) and mutant *Haematococcus pluvialis* cells (spatial resolution about $4 \mu\text{m}$): map for $\text{C}=\text{C}$ at the absorption band around $3\ 010\ \text{cm}^{-1}$; map for lipids at stretching of CH_3 and CH_2 around $2\ 925\ \text{cm}^{-1}$; map for $\text{C}=\text{O}$ at the absorption band around $1\ 740\ \text{cm}^{-1}$; map for proteins at stretching of Amide I around $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$; map for carbohydrates at the absorption band around $1\ 035\ \text{cm}^{-1}$ ^[21]

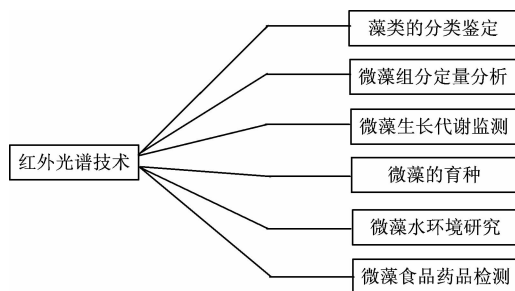


图 3 红外光谱在不同微藻研究领域的应用

Fig. 3 The application of infrared spectroscopy in different microalgal research fields

细胞的破碎、分离、提取等繁琐的步骤,而且每次只能进行单一或少量几种成分的分析,而光谱可以实现样品原位、无损的定量检测,因而光谱技术已经被逐步应用于藻体生物量、成分的定量分析研究中。Pelusi 等^[43]对不同株的定鞭金藻的中红外光谱检测并与气相色谱检测结果相比较,发现归属于反式 $\text{—C}=\text{C—}$ 的 $962.5\ \text{cm}^{-1}$ 的光谱吸收带的强度能够很好反应藻细胞中中链烯酮的含量,因而应用此技术可以很好地实现烯酮动态分布与细胞代谢调控关系的研究。

与其他的光谱检测技术相比较,近红外光谱具有检测更加快速并且不受水分影响的优势^[15]。现在应用 NIRS 技术进行微藻的代谢监测和高产藻株的快速分选已经发展成为一种趋势。比如, Brown 等^[13]对产油脂微藻的油脂、生物量进行了 NIRS 和生化检测,并进一步构建模型对不同时期微藻中的油脂含量进行测定。

随着生长时期和环境条件(营养、光照、温度、pH 等)的变化,藻细胞内脂类、蛋白、核酸、多糖等成分的含量和空间分布会出现明显的差异,因而对这些组分的实时动态监测可以很好地掌握藻类的生长状况,尤其在规模化生产养殖中具有重要的指导意义。正是基于红外光谱区别于传统检测分析技术的独特优势,此项技术已经开始逐步应用到微藻的生长代谢研究中。自 2001 年 Giordano 等^[44]将红外光谱应用到真核微藻的研究,在接下来的十多年的藻类生物学的研究领域此项技术已经作为一种常用技术应用于微藻生长速率的监测、营养条件与生理等藻类生长代谢过程的研究。Stehfest 等^[45]利用红外光谱对营养条件不同的多种浮游藻类检测发现藻类既可以通过色素形成和光合作用效率的变化在短时期内适应环境的变化,还可以通过组分和代谢的改变进行长期的适应,并且不同藻株之间对环境的适应能力的大小具有种属的特异性。Heraud 等^[46]利用红外光谱成像的方法对营养胁迫条件下的小星藻 (*Microsterias hardyi*) 进行动态观测,可以在显微空间水平上观测到脂类、蛋白等组分在细胞核和叶绿体的分布。进一步研究发现,在氮素缺乏的藻株中重新提供氮源后藻细胞内尤其是叶绿体位置脂类含量明显提高: $1\ 750\sim 1\ 720\ \text{cm}^{-1}$ 脂类的 $\text{C}=\text{O}$ 位置红外吸收峰强度由 0.34 增加至 0.59; 而磷元素的缺乏对细胞中蛋白质含量影响较小: $1\ 565\sim 1\ 515\ \text{cm}^{-1}$ 蛋白质的 Amide II 的红外吸收峰强度稳定在 0.22 与 0.27 之间。Mecozzi 等^[47]还利用 NIRS 和 FT-IRS 两种红外光谱对不同培养条件下的产毒素海藻进行了分析,研究发现生理环境可以诱导藻细胞内蛋白质二级结构的转变以及藻细胞内脂类、多糖等组分的差异,而这些变化与藻毒素的产生密切相关。

尤其随着红外光谱成像技术的发展,可以在单一藻细胞中观测各组分显微空间水平上的变化。Nasse 等^[48]利用显微红外光谱成像技术对单个活体小星藻检测,可以看到同时期的藻细胞脂类、蛋白、糖类组分空间位置含量和分布的差异。Hirschmugl 等^[49]基于同步辐射的红外光谱显微成像技术并结合分级聚类分析(HCA)方法研究发现可以实现对不同营养状态下的纤角毛藻 (*Euglena gracilis*) 的快速区分。

2.3 红外光谱在微藻育种方面的应用

自然界中的微藻在长期的进化过程中形成了自身一套完整的代谢调控机制。它们可以通过体内的反馈抑制、阻遏等各种机制来调控自身的生长和初(次)级代谢产物合成,这样就保证底物不会因为过度消耗而造成对环境营养的“浪费”。这就使得从自然界分离得到的野生藻株在产量和质量上很难达到规模化工业生产的需求,而在微藻的规模化生产养殖中要取得较高的效益就必须要有优良的生产藻株。因而藻株改良技术的进步是微藻产业取得良好经济效益的技术保证。

微藻的育种内容涉及范围非常广泛,主要包括野生型藻

种的基因突变和高产藻株的筛选两个部分。目前,藻种的改良主要通过物理、化学、生物的手段对野生型的藻株进行处理得到遗传性状良好的突变体,此项诱变技术已经十分完善和成熟。然而,如何能够快速高效地从大量的突变体中筛选得到高产的突变藻株是一个亟待解决的问题。在传统的筛选方法中,首先是将经过诱变后的藻株涂平板培养形成藻落,然后挑取藻落进行扩大培养,最后进行生理生化的测定获得生长速率和单位产量较高的藻株。然而,此类方法操作步骤繁琐、实验周期长并需要多种昂贵的精密仪器,很难达到高通量筛选的要求^[50-53]。实际上,把简单快速的光谱检测应用于筛选已经成为一个研究热点和发展趋势。比如,Meanwell等^[54]利用 FTIR 光谱筛选获得了链霉素高产突变菌株, Morita等^[55]应用 NIRS 对木糖发酵的酵母混合菌株进行高通量筛选。在藻类的筛选育种中,我们在雨生红球藻的研究中发现利用红外结合拉曼显微光谱及成像技术可以很好的对虾青素、 β 胡萝卜素、蛋白质、脂类和多糖的含量和空间分布进行快速定量分析,由此建立了高产虾青素雨生红球藻突变株的快速筛选方法^[21-22]。Brown等^[13]对产油脂微藻的油脂、生物量进行了 NIRS 和生化检测,并进一步构建模型对不同时期微藻中的油脂含量进行测定。

2.4 红外光谱在微藻水环境研究的应用

微藻是工业废水和生活污水中重金属和有机染料的有效吸附剂,对于环境污染物的去除具有重要的应用价值,但是对于其具体的吸附和降解的机理机制还不是很清楚。Dotto等^[56]利用红外光谱对吸附染料后的螺旋藻进行检测分析,发现 OH 的峰位由 $3\ 370\ \text{cm}^{-1}$ 移动到 $3\ 358\ \text{cm}^{-1}$ 并且蛋白质的 Amide III 的吸收峰由 $1\ 320\ \text{cm}^{-1}$ 移动到了 $1\ 365\ \text{cm}^{-1}$, 这些变化主要与染料和螺旋藻细胞中的 OH, Amide III 等基团的结合有关。Doshi等^[57]利用红外光谱对吸附 Ni^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} 和 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 不同金属离子的螺旋藻研究分析发现,其磷酸、羟基和多糖等藻类组分中的基团参与了离子吸附。Finocchio等^[58]利用盐酸和甲醇对螺旋藻粉进行甲基化处理,发现经过甲基化的藻粉对 Cr(VI) 有很好的吸附性能;而利用红外光谱分析藻样中 CH, COO—等基团的变化可以用来评价藻细胞甲基化的效率。El-Sheekh等^[59]将小球藻、念珠藻、团藻等几类微藻与工业废水中偶氮染料进行共培养发现微藻可以利用自身的酶类降解有机染料并且去除率高达 95%,他们利用红外光谱对与染料共培养前后的藻体进行分析进一步阐释了微藻降解有机染料的机理。

此外,微藻作为水环境中的重要群体还可以用于进行水生生态系统的评估。Patel等^[60]利用红外光谱成像研究发现经过甲芬那酸、美托洛尔和普萘洛尔三种常见的水体残留药物处理后的小星藻细胞内蛋白质的合成得到了显著的抑制,同时在普萘洛尔处理组脂质含量显著降低,从而解释了低浓度的普萘洛尔对藻细胞损伤作用最大的原因。

2.5 红外光谱在微藻食品药品检测领域的应用

微藻细胞内的天然活性成分对人体具有很好的营养和医疗价值,因而越来越多的微藻资源被开发用于功能性食品和药品的生产。多数微藻制品的加工和生产过程比较复杂导致其生产成本显著提高;特别是有些生产商会通过一些低成本的添加剂来取代藻类成分;还有一些微藻产品存在变质、重金属超标等问题,使得更多消费者和生产商更加关注微藻制品的食用安全问题^[61-62]。然而,常规的检测分析技术步骤繁琐、耗时较长,给食品和医药的监管带来了难度,进一步促使具有快速高效和无损检测优势的光谱技术逐步应用到该领域。比如,Wu等^[63]首次利用 NIRS 对螺旋藻藻粉中两类常用添加剂—面粉和绿豆粉的含量进行了检测和分析,表明基于 LS-SVM 模型的 NIRS 检测技术可以很好地预测藻粉中添加剂的成分和含量。刘海静等^[64]利用红外光谱对天然螺旋藻、螺旋藻粉和螺旋藻片的成分进行分析,建立了一种螺旋藻产品品质检测和真伪鉴别的高效、快速分析方法。

3 结 论

红外光谱是一种完全无损、快速、高效的检测分析技术,在各个领域都有广泛的应用,然而在微藻方面的应用还处于发展阶段。在使用过程中,尚存在着一定的缺点和不足:(1)样品需要进行干燥处理并保证全部样品的处理方法一致;(2)检测过程中,需要大量的样品和工作量来建立数据库;(3)结果的可重复性问题。然而每一种技术都存在固有的缺点,这就需要红外光谱在后续的研究发展中与其他光谱检测技术(如拉曼光谱)相结合,优势互补,降低对待测样品复杂的处理要求;此外,将红外光谱与化学计量学方法相结合,有助于光谱信号的分析 and 检测结果的重复性。特别重要的是,还需要微藻研究工作者相互合作、数据共享,从而建立更加全面的不同种质微藻的标准红外图谱库。相信,通过上述方法的完善,红外光谱在微藻领域的应用会越来越成熟。

基于上述判断,我们认为红外光谱在微藻领域可以进一步开展以下几个方面的研究:(1)我国微藻养殖的规模和产量都居世界首位,发展基于红外光谱微藻生长代谢实时动态监测,将有助于该产业快速发展;(2)藻种选育是微藻养殖的首要环节,应用红外光谱可对高产油脂、二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic Acid, DHA)、类胡萝卜素等藻株的快速分析,由此将会成为微藻筛选的有力工具;(3)红外光谱显微成像技术可以对藻细胞进行原位、无损、高分辨测量和分析,可在关于类胡萝卜素的合成、糖代谢、光合作用等微藻生理学研究领域发挥重要作用;(4)最近,红外光谱又有新的发展,如发展了 Nano-FTIR 技术,显微红外光谱的空间分辨能够达到亚微米甚至纳米水平^[65-67],应用于微藻的研究,可在亚细胞层次对各种细胞器的结构和功能进行研究。

References

- [1] Grossman A. *Current Biology*, 2016, 26(8): 319.
- [2] Klok A J, Lamers P P, Martens D E, et al. *Trends in Biotechnology*, 2014, 32(10): 521.
- [3] Borowitzka M A. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25(3): 743.
- [4] Guedes A C, Amaro H M, Malcata F X. *Marine Drugs*, 2011, 9: 625.
- [5] Brooks B W, Lazorchak J M, Howard M D A, et al. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2015, 35(1): 6.
- [6] Berry M A, Davis T W, Cory R M, et al. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(3): 1149.
- [7] Fang L C, Zhou C, Cai P, et al. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 190: 810.
- [8] Kumar K S, Dahms H U, Won E J, et al. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 113: 329.
- [9] Li Y G, Xu L, Huang Y M, et al. *Applied Energy*, 2011, 88: 3432.
- [10] Chen J, Wang Y, Benemann J R, et al. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28: 715.
- [11] Li H M, Tang H J, Shi X Y, et al. *Harmful Algae*, 2014, 39: 92.
- [12] Li S, Xu J L, Chen J J, et al. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(3): 1389.
- [13] Brown M R, Frampton D M F, Dunstan G A, et al. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 26: 191.
- [14] Mulbry W, Reeves J, Liu Y, et al. *Journal of Applied Phycology*, 2012, 24: 1261.
- [15] Hay K B, Millers K A. *Journal of Phycology*, 2010, 46: 937.
- [16] Soriano-Disla J M, Janik L J, Rossel R A V, et al. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2014, 49(2): 139.
- [17] Holman H Y N, Bechtel H A, Hao Z, et al. *Analytical Chemistry*, 2010, 82: 8757.
- [18] Baker M J, Trevisan J, Bassan P, et al. *Nature Protocols*, 2014, 9: 1771.
- [19] Grunert T, Wenning M, Barbagelata M S, et al. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51(7): 2261.
- [20] Saharan R K, Sharma S C. *Vibrational Spectroscopy*, 2011, 55: 85.
- [21] Liu J H, Huang Q. *Applied Spectroscopy*, 2016, 70(10): 1639.
- [22] Liu J H, Song L, Huang Q. *Letters in Applied Microbiology*, 2015, 62(2): 185.
- [23] REN Zhong-yuan, WU Yu-qing(任重远, 吴玉清). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2015, 35(8): 2087.
- [24] Bassan P, Sachdeva A, Kohler A, et al. *Analyst*, 2012, 137: 1370.
- [25] Reuben S, Banas K, Banas A, et al. *Water Research*, 2014, 64: 123.
- [26] Hackett M J, Caine S, Liu X, et al. *Vibrational Spectroscopy*, 2015, 77: 51.
- [27] Marcelli A, Cricenti A, Kwiatek W M, et al. *Biotechnology Advances*, 2012, 30: 1390.
- [28] Tobin M J, Puskar L, Hasan J, et al. *Journal of Synchrotron Radiation*, 2013, 20: 482.
- [29] Nasse M J, Walsh M J, Mattson E C, et al. *Nature Methods*, 2011, 8: 413.
- [30] Hoffner G, André W, Sandt C, et al. *Reviews in Analytical Chemistry*, 2014, 33(4): 231.
- [31] Louthback K, Birarda G, Chen L, et al. *Protein and Peptide Letters*, 2016, 23(3): 273.
- [32] Surowka A D, Adamek D, Szczerbowska-Boruchowska M. *Analyst*, 2015, 140(7): 2428.
- [33] Sun F S, Polizzotto M L, Guan D X, et al. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 326: 18.
- [34] Chevalier C, Goffic R L, Jamme F, et al. *The Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(17): 9060.
- [35] Vargas-Caraveo A, Castillo-Michel H, Mejia-Carmona G E, et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 128(15): 141.
- [36] Liu J H, Qi Z M, Huang Q, et al. *Journal of Molecular Structure*, 2013, 1031: 1.
- [37] Nasse M J, Bellehumeur B, Ratti S, et al. *Vibrational Spectroscopy*, 2012, 60: 10.
- [38] Hirschmugl C J, Gough K M. *Applied Spectroscopy*, 2012, 67(2): 475.
- [39] Murdock J N, Dodds W K, Wetzel D L. *Vibrational Spectroscopy*, 2008, 48: 179.
- [40] Duygu D Y, Udoh A U, Ozer T B, et al. *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11(16): 3817.
- [41] Laurens L M L, Wolfrum E J. *Bioenergy Research*, 2011, 4: 22.
- [42] Kansiz M, Heraud P, Wood B, et al. *Phytochemistry*, 1999, 52: 407.
- [43] Pelusi A, Hanawa Y, Araie H, et al. *Algal Research*, 2016, 19: 48.
- [44] Giordano M, Kansiz M, Heraud P, et al. *Journal of Phycology*, 2001, 37: 271.
- [45] Stehfest K, Toepel J, Wilhelm C. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43: 717.
- [46] Heraud P, Wood B R, Tobin M J, et al. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 249: 219.
- [47] Mecozzi M, Pietroletti M and Tornambè A. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2011, 78: 1572.
- [48] Nasse M J, Ratti S, Giordano M, et al. *Applied Spectroscopy*, 2009, 63: 1181.
- [49] Hirschmugl C J, Bayarri Z, Bunta M, et al. *Infrared Physics & Technology*, 2006, 49: 57.
- [50] Kamath B S, Vidhyavathi R, Sarada R, et al. *Bioresource Technology*, 2008, 99: 8667.

- [51] Chen Y, Li D F, Lu W Q, et al. *Biotechnology Letters*, 2003, 25: 527.
- [52] Chumpolkulwong N, Kakizono T, Handa T, et al. *Biotechnology Letters*, 1997, 19(3): 299.
- [53] Bonente G, Formighieri C, Mantelli M, et al. *Photosynthesis Research*, 2011, 108: 107.
- [54] Meanwell R J L, Direct G S. *Biotechnology Letter*, 2005, 27: 1629.
- [55] Morita H, Hasunuma T, Vassileva M, et al. *Analytical Chemistry*, 2011, 83: 4023.
- [56] Dotto G L, Esquerdo V M, Vieira M L G, et al. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012, 91: 234.
- [57] Doshi H, Ray A, Kothari I L. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 96(6): 1051.
- [58] Finocchio E, Lodi A, Solisio C, et al. *Chemical Engineering Journal*, 2010, 156: 264.
- [59] El-Sheekh M M, Gharieb M M, Abou-El-Souodm G W. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009, 63: 699.
- [60] Patel S A, Currie F, Thakkerb N, et al. *Analyst*, 2008, 133(12): 1707.
- [61] Reid L M, O'Donnell C P, Downey G. *Trends in Food Science and Technology*, 2006, 17(7): 344.
- [62] Gallardo-Velazquez T, Osorio-Revilla G, Loa M Z, et al. *Food Research International*, 2009, 42(3): 313.
- [63] Wu D, Nie P C, Cuello J, et al. *Journal of Food Engineering*, 2011, 102: 278.
- [64] LIU Hai-jing, SUN Su-qin, LI An, et al(刘海静, 孙素琴, 李安, 等). *Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学)*, 2012, 45(22): 4738.
- [65] Amenabar I, Poly S, Nuansing W, et al. *Nature Communications*, 2013, 4: 2890.
- [66] Hu H, Yang X, Zhai F, et al. *Nature Communications*, 2016, 7: 12334.
- [67] Mastel S, Govyadinov A A, Oliveira T et al. *Applied Physics Letters*, 2015, 106: 023113.

Application of Infrared Spectroscopy in Microalgal Research

LIU Jing-hua^{1,2}, CHEN Jun³, QIN Song³, QI Ze-ming⁴, HUANG Qing^{1,2,4*}

1. College of Life Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China

2. Institute of Technical Biology and Agriculture Engineering, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China

3. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China

4. National Synchrotron Radiation Laboratory, University of Science and Technology of China, Hefei 230029, China

Abstract Microalgae are rich in carotenoids, vitamins, proteins, polyunsaturated fatty acids and other nutrients required by humans and animals. In addition, some microalgae also play critical roles in aquatic ecological environment. Thus, it is important to carry out microalgal research for practical applications. Traditionally, analysis of microalgal components requires cell disruption and extraction with organic solvents followed by gas or liquid chromatography of the extracts. However, these traditional methods are generally time-consuming, requiring expensive instruments and sophisticated operations. So it is urgent to develop a more effective method for rapid and convenient microalgal analysis. Infrared spectroscopy mainly relies on the absorbance of radiation at molecular vibrational frequencies to observe the changes of the molecular compositions, characteristics, structures and concentrations. Actually, this technique has emerged as a promising tool to distinguish and quantify various cellular components such as proteins, lipids, nucleic acids, carbohydrates, chlorophyll and carotenoids in microalgal systems. Compared with the conventional detection methods, it has the advantages of simple, fast, non-invasive, and multiplex measurements. Especially, with the development of microscopic imaging technology, infrared microspectroscopy shows the powerful potential for spatially-resolved and real-time in situ measurements of biological systems at the single cell or tissue level. In recent years, with the development of synchrotron radiation technique, the advanced synchrotron infrared microspectroscopy and imaging technique has been applied and it can provide higher sensitivity and spatial resolution than the traditional infrared spectroscopy, so to a certain degree it resolves the contradiction between high throughput analysis and high spatial resolution observation. In this study, the principle and advantages of infrared spectroscopy and micro-spectroscopic imaging were firstly illustrated, especially the application of this technique combined with chemometrics in the field of biology. Then, the recent progress on the application of infrared spectroscopy in discrimination, metabolism, breeding, water environment protection, medicine and health relating to microalgal research was introduced and discussed in review of a variety of recent literature. For instance, infrared spectroscopy in combination with chemometrics can identify, discriminate or classify different microalgal strains. This technique can also be applied in the research of microalgal growth and metabolism based on its advantages of fast and multicomponent analysis. It can even provide a non-destructive and high-throughput method to screen the lipids, β -carotene or astaxanthin hyperproducing mi-

croalgal strains based on infrared spectroscopic tool. In addition, microalgae have been reported to be potentially proper biosorbents for the treatment of heavy metals and dyes wastewater. Actually, infrared spectroscopy has already been applied as a proper approach to study biosorption of heavy metals or dyes from wastewaters using microalgae. Being a powerful tool, it has not only distinguished and quantified various vital components quickly and conveniently, but has also provided an effective method for quality detection and authenticity measurement of microalgal foods and drugs. Although there are still some deficiencies for the application of infrared spectroscopy in microalgal research, the promising potential and comprehensive resolution for it are discussed in this study. Finally, based on the latest progress and application of infrared spectroscopy, some prospects of this technique for microalgal research were also put forward at the end of the review, such as industrial large-scale culture of microalgae, selection and breeding of hyperproducing strains, the physiology of microalgae, the molecular structure and function of organelles, etc.

Keywords Infrared spectroscopy; Mid-infrared spectroscopy; Near-infrared reflectance spectroscopy; Microspectroscopy imaging; Synchrotron radiation; Microalgae

(Received Dec. 17, 2017; accepted Mar. 29, 2018)

* Corresponding author

关于《光谱学与光谱分析》调整审稿费收费标准的通知

尊敬的《光谱学与光谱分析》广大作者、读者：我刊自 2018 年 7 月 1 日以后登记的稿件向投稿作者收取审稿费 200 元/篇，在您投稿之前，为免受经济损失，请您必须考虑：

1. 没有创新的一般性稿件，请您不要投稿。
2. 没有国家级基金资助的稿件，请您不要投稿。
3. 不是光谱专业的稿件，请您不要投稿。
4. 与其他文章重合率超过 10% 的稿件，请您不要投稿。

所投稿件经初审通过后，作者会收到缴纳审稿费的通知。请作者及时从我刊网站(<http://www.gpxygpx.com>)查询稿件是否处于交审稿费状态，在收到通知后，请及时缴纳审稿费；如在 10 天之内没有收到您的审稿费，被视为自动放弃，我刊不再受理。交费后我刊开据增值税电子普通发票，并传至作者提供的电子邮箱，作者可自行打印。

联系电话：010-62181070, 62182998

电子邮箱：chngpxygpx@vip.sina.com

感谢您多年来对《光谱学与光谱分析》的支持和厚爱！

《光谱学与光谱分析》期刊社

2018 年 6 月 30 日