

不同培养基对小球藻 *Chlorella zofingiensis* 生长和虾青素产量的影响

彭娟^{1,2}, 王艳¹, 向文洲¹, 陈峰^{1,3}

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301; 2. 中山大学海洋学院, 广东 广州 510275; 3. 香港大学植物学系, 香港)

摘要: 研究了小球藻 *Chlorella zofingiensis* 在3种不同培养基 CZ-M1, Kuhl 和 KM1 中培养时生物量和虾青素的产量。结果表明, Kuhl 最利于小球藻的生长, 比生长速率、最大细胞干重和得率最高, 虾青素含量最低; KM1 培养基最利于虾青素的积累。采用优化后的培养基 KM1, 添加葡萄糖诱导培养小球藻, 可以获得 $8.99\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的藻细胞干重, 虾青素产量和含量分别达到 $20.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $2.24\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

关键词: 小球藻; 虾青素; 培养基

中图分类号: P735 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2010)03-0061-04

Effects of different culture media on the growth and production of astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*

PENG Juan¹, WANG Yan¹, XIANG Wen-zhou¹, CHEN Feng^{1,2}

(1. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Guangzhou, 510301; 2. Department of Botany, the University of Hong Kong, Hong Kong, P. R. China)

Abstract: The biomass and astaxanthin yield of *Chlorella zofingiensis* cultivated in three different media including CZ-M1, Kuhl and KM1 were investigated. Results showed that Kuhl medium was best for growth as reflected by its highest values of specific growth rate, maximum cell dry weight concentration and cell growth yield on glucose comparing with the other media. However, its astaxanthin production was the lowest. KM1 exhibited the highest astaxanthin production both on a per dry cell weight and a per volume basis. Higher biomass (up to $8.99\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ cell dry weight concentration) and astaxanthin levels (up to $20.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $2.24\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) in glucose-stressed *Chlorella zofingiensis* cells growing under low light in modified KM1 medium were obtained.

Key words: *Chlorella zofingiensis*; astaxanthin; media

虾青素(astaxanthin)是一种紫红色酮式类胡萝卜素, 其化学名为 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- β -类胡萝卜素, 具有超强的着色和抗氧化功能, 除了传统上用做水产养殖中三文鱼等的饲料添加剂外, 近年来也在食品、医药、化妆品等领域有着广泛的应用^[1-2]。

人工合成的虾青素价格昂贵, 安全性低, 因此利用生物合成生产天然虾青素具有重要意义。小球藻 *Chlorella zofingiensis* 属单细胞绿藻, 它生长快速

并能高效积累虾青素, 具有大规模生产虾青素的潜力, 成为继雨生红球藻、红发夫酵母之后又一备受关注的天然虾青素生产来源^[3]。

有研究表明小球藻细胞生物量和虾青素积累量与培养基、培养条件密切相关; 不同氮源、碳源对小球藻生产虾青素影响显著^[3-4]。本研究通过比较小球藻在不同培养基、不同培养条件下生长和积累虾青素的差异, 进一步优化培养条件, 为规模培养小球藻生产虾青素提供实验基础。

收稿日期: 2008-01-07; 修订日期: 2008-04-08。刘学东编辑

基金项目: 中国科学院“百人计划”课题资助

作者简介: 彭娟(1980—), 女, 湖北省松滋县人, 博士, 主要从事微藻生物技术研究。

1 材料与方法

1.1 材料

实验藻种: 小球藻 *Chlorella zofingiensis*(ATCC 30412) 由香港大学植物学系陈峰教授提供。

培养基: 实验采用 3 种不同的培养基培养小球藻, 3 种培养基的组成见表 1, 改良的 KM1 培养基见表 2。

表 1 3 种不同培养基 KM1、Kuhl 和 CZ-M1 的组分
Tab. 1 Compositions of three different media, KM1, Kuhl and CZ-M1

成分	KM1 (mg·L ⁻¹)	Kuhl/ (mg·L ⁻¹)	CZ-M1/ (mg·L ⁻¹)
Glu·H ₂ O	10000	10000	10000
KNO ₃	—	1011	—
NaNO ₃	—	—	750
酵母提取物	2000	—	—
L-Asparagine·H ₂ O	400	—	—
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	—	—	75
KH ₂ PO ₄	—	—	175
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	—	89	—
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	—	621	—
MgCl ₂ ·6H ₂ O	200	—	—
MgSO ₄ ·7H ₂ O	—	246.5	75
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10	6.95	—
EDTA	—	9.3	—
FeCl ₃ ·6H ₂ O	—	—	5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	20	14.7	25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	—	0.287	0.287
MnSO ₄ ·H ₂ O	—	0.169	0.169
H ₃ BO ₃	—	0.061	0.061
CuSO ₄ ·5H ₂ O	—	0.0025	0.0025
(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	—	0.01235	0.01235
NaCl	—	—	25

表 2 改良的 KM1 培养基
Tab. 2 Compositions of the modified KM1 medium

组成	改良的 KM1 培养基/(mg·L ⁻¹)							
	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4
Glu·H ₂ O	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
酵母提取物	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
NaNO ₃	229(2.7mM)	850(10mM)	2550(30mM)	4250(50mM)	—	—	—	—
KNO ₃	—	—	—	—	273(2.7mM)	1000(10mM)	3000(30mM)	5000(50mM)
MgCl ₂ ·6H ₂ O	200	200	200	200	200	200	200	200
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10	10	10	10	10	10	10	10
CaCl ₂ ·2H ₂ O	20	20	20	20	20	20	20	20

注: B1、B2、B3、 B4 以及 C1、C2、C3、C4 分别表示不同浓度的氮源处理; 括号中的数字为初始浓度。

1.2 实验方法

培养方法: 所有培养基经 121 高压灭菌 15min, 调节 pH 值为 6.5。藻种以 7%接种量接种到装有 100mL 培养基的 250mL 三角瓶中, 在 25±1 , 30μmol 光子(m⁻²·s⁻¹)的连续光照强度下混养培养。三角瓶均用棉塞封口。

分析测定方法: 细胞干重(DW)的测定参照 CHEN 等^[5]的方法。比生长速率的计算采用 CHEN 等^[6]的方法。葡萄糖浓度的测定使用 3,5-二硝基水杨酸比色法^[7]。虾青素提取测定方法参照 YUAN 等^[8]的方法。虾青素标样购买于 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)。检测器使用 Waters2996 光电二极管阵列检测器, 光谱扫描波长范围为 210 到 700nm, 使用 450nm 检测波长积分定量。虾青素产量 (S2, mg·L⁻¹)计算公式为: S2=S1*DW, S1 表示虾青素的含量(mg·g⁻¹), DW 表示细胞干重(g·L⁻¹)。

2 结果与讨论

2.1 不同培养基对小球藻生长以及虾青素合成的影响

在 CZ-M1 和 Kuhl 培养基中, 细胞经过一天的滞后期进入对数生长期, 在第 4 天达到最大细胞干重, 分别为 4.52g·L⁻¹和 5.24g·L⁻¹, 而在 KM1 培养基中, 细胞没有滞后期, 直接进入对数期, 也在第 4 天达到最大细胞干重, 但低于前 2 种培养基, 仅为 3.72g·L⁻¹(图 1A)。在 3 种培养基中初始葡萄糖以不同速度都在第 4 天消耗完(图 1B)。在 CZ-M1 和 Kuhl 培养基中培养 14d 后, 细胞仍呈绿色, 而在 KM1 培养基中细胞呈橘红色, 虾青素含量和产量都高于前 2 种培养基, 分别达到 1.07mg·g⁻¹和 4.31mg·L⁻¹(表 3)。

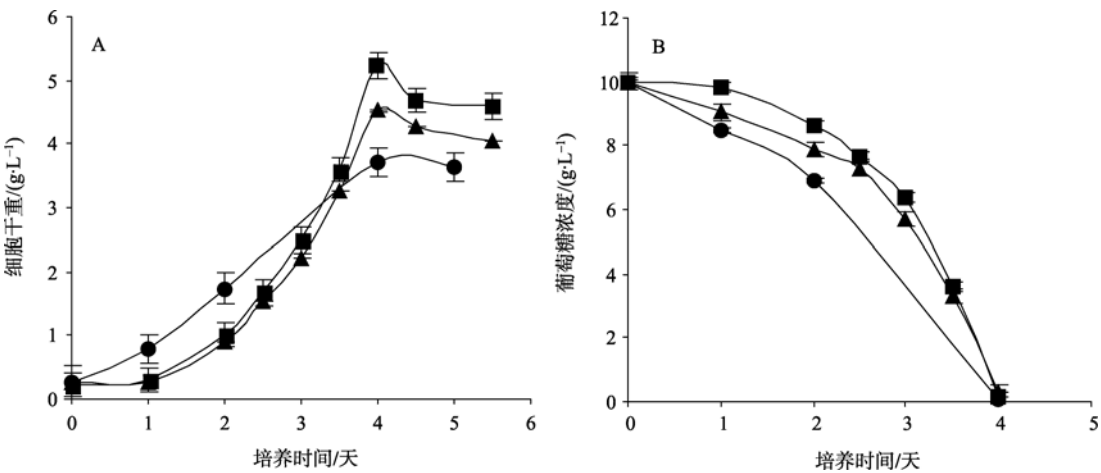


图 1 在 CZ-M1, Kuhl 和 KM1 培养基中随着培养天数增加, 小球藻细胞干重变化(A), 培养基中葡萄糖浓度的变化(B)
▲—CZ-M1, —Kuhl, —KM1

Fig. 1 Kinetics of growth in terms of cell dry weight concentration (DW) in a batch mixotrophic culture of *C. zofingiensis* in CZ-M1, Kuhl and KM1 media(A). Kinetics of glucose consumption in different media(B)

表 3 小球藻在不同培养基中培养 14d 后最大干重和虾青素积累量

Tab. 3 Effect of different media on biomass and astaxanthin production by *C. zofingiensis* after 14 days

培养基	CZ-M1	Kuhl	KM1
最大细胞干重/(g·L ⁻¹)	4.52±0.22	5.24±0.21	3.72±0.09
比生长速率/(μ·h ⁻¹)	0.039	0.040	0.038
虾青素含量/(mg·g ⁻¹)	0.26±0.02	0.21±0.01	1.07±0.06
虾青素产量/(mg·L ⁻¹)	1.25±0.09	1.13±0.04	4.31±0.25

注: 表中数据为平均值 ± 标准偏差(n=3)。

2.2 优化后的 KM1 培养基对生长和虾青素合成的影响

根据 2.1 节中的结果, 在 KM1 培养基中小球藻虾青素含量最高, 但比生长速率较低(0.038h⁻¹) 导致最终生物量不理想, 这可能是 KM1 中氮源—天冬氨酸(L-Asparagine)不能被很好地利用所致。因此以下实验对 KM1 培养基进行不同浓度的氮源优化处理, 如表 2 所示。

2.2.1 优化后的 KM1 培养基对小球藻生长的影响

培养基中 NaNO₃ 和 KNO₃ 初始浓度越高, 比生长速率越高, 获得的藻细胞干重越大; NaNO₃ 处理组比生长速率明显高于 KNO₃ 处理组; 当 NaNO₃ 初始浓度为 50mM 时, 得到最大细胞干重 4.39g·L⁻¹

(表 4)。

2.2.2 优化后的 KM1 培养基对小球藻产虾青素的影响

在小球藻对数生长末期添加到 B3、B4、C3 和 C4 处理中诱导合成虾青素, 分别表示为 B3+、B4+、C3+和 C4+。所有处理中, 藻保持持续快速生长, 干重不断增加, 虾青素产量也在不断增加; NaNO₃ 初始浓度为 50mM 的处理组, 在对数期末期添加 40g·L⁻¹ 的葡萄糖得到最大干重 8.99g·L⁻¹, 虾青素产量和含量分别高达 20.1mg·L⁻¹ and 2.24mg·g⁻¹(图 2)。这一结果表明在 KM1 培养基中 NaNO₃ 作为氮源不仅比 L-Asparagine 和 KNO₃ 利于小球藻的生长, 也有利于虾青素的积累; NaNO₃ 初始浓度越高生长越快, 经葡萄糖诱导后虾青素积累越多。

表 4 优化后的 KM1 培养基对小球藻生长的影响

Tab. 4 Effect of the modified KM1 medium on the growth of *C. zofingiensis*

处理	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4
氮源	NaNO ₃	NaNO ₃	NaNO ₃	NaNO ₃	KNO ₃	KNO ₃	KNO ₃	KNO ₃
初始浓度/(mM)	2.7	10	30	50	2.7	10	30	50
最大干重/(g·L ⁻¹)	3.83±0.28	3.91±0.02	4.33±0.04	4.39±0.02	3.48±0.16	3.64±0.16	3.96±0.05	4.08±0.02
比生长速率/h ⁻¹	0.038	0.039	0.041	0.043	0.030	0.030	0.030	0.029

注: 表中数据为平均值 ± 标准偏差(n=3)。

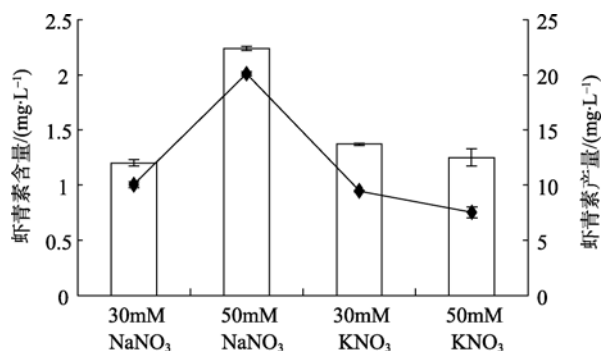


图2 优化后的 KM1 培养基对小球藻产虾青素的影响

□—虾青素含量, —虾青素产量

Fig. 2 Effect of the modified KM1 medium on astaxanthin accumulation of *C. zofingiensis*. □—the content of astaxanthin, —the production of astaxanthin

3 结论

小球藻 *Chlorella zofingiensis* 细胞生物量和虾青

素积累量与培养基、培养条件密切相关。不同培养基培养小球藻时其生物量和虾青素积累量明显不同。采用优化的 KM1 培养基、添加葡萄糖诱导培养小球藻, 可以显著提高小球藻的生物量和虾青素的积累量。在 KM1 培养基中 NaNO_3 作为氮源比 L-Asparagine 和 KNO_3 利于小球藻的生长和虾青素的积累, 这可能与硝酸盐氮源和氨基酸氮源具有不同的同化途径以及藻细胞对 Na^+ 和 K^+ 的渗透能力存在差异有关。本文中小球藻虾青素产量和含量分别高达 $20.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $2.24\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 是目前所见报道中最高的^[3,4]。由于 KM1 培养基组分简单, 易于操作, 因此可以进一步优化 KM1 培养基和培养条件, 如碳源、碳氮比、微量元素以及光照强度等, 以获得更高的藻细胞生物量和虾青素积累量, 为将来大规模培养小球藻生产虾青素提供实验基础。

参考文献

- [1] 刘子贻, 沈奇桂. 虾青素的生物活性及开发应用前景 [J]. 中国海洋, 1997, 63(3): 46.
- [2] 李浩明, 高 蓝. 虾青素的结构、功能与应用[J]. 精细化工, 2003, 20(1): 32–37.
- [3] IP P F, CHEN F. Peroxynitrite and nitryl chloride enhance astaxanthin production by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture[J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 3595–3599.
- [4] 陈涛, 向文洲, 何慧, 等. 不同碳源对小球藻 *Chlorella zofingiensis* 异养产虾青素的影响[J]. 微生物学通报, 2007, 34(5): 856–858.
- [5] CHEN F, ZHANG Y M, GUO S Y. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture[J]. Biotechnology Letters, 1996, 18 (5): 603–608.
- [6] CHEN F, JOHNS M R. Relationship between substrate inhibition and maintenance energy of *Chlamydomonas reinhardtii* in heterotrophic culture[J]. Journal of Applied Phycology, 1996, 8(1): 15–19.
- [7] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Anal Chem, 1959, 31: 426–427.
- [8] YUAN J P, CHEN F. Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis* [J]. Food Chemistry, 2000, 68: 443–8.