

## 硫元素对小球藻异养生产虾青素的影响

刘纪化<sup>1,2</sup>, 向文洲<sup>1</sup>, 陈涛<sup>1</sup>, 左云龙<sup>1,2</sup>, 何慧<sup>1</sup>, 苏娇娇<sup>1,2</sup>, 肖伟<sup>1</sup>, 刘学东<sup>1</sup>

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:** 研究了不同浓度硫元素对小球藻 *Chlorella zofingiensis* 异养生长和合成虾青素的影响。结果表明, 低硫条件下, 细胞分裂受到严重抑制, 虾青素迅速积累且含量显著提高, 但限制藻细胞干重的增加。硫元素  $3\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下, 第 14 天虾青素含量最大, 达到  $1.19\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 高出  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素组 40.68%。硫元素  $3000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下, 在第 14 天时获得最大虾青素产量, 达到  $9.99\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素组相比,  $3000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素组获得了更高的生物量和虾青素产量。而前者在培养后期, 出现了一定程度的蛋白质抑制现象。本研究认为, 在单批异养培养中, 硫元素  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  可能是葡萄糖代谢获得最大生物量所需的最低浓度, 因此在流加葡萄糖培养的工业化生产中, 一次性加入更高浓度的硫元素, 可望获得更高的虾青素产量。

**关键词:** 小球藻; 硫元素; 生长; 虾青素; 异养培养

中图分类号: P735 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2011)01-0101-06

## Effect of sulphur on the growth and production of astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture

LIU Ji-hua<sup>1,2</sup>, XIANG Wen-zhou<sup>1</sup>, CHEN Tao<sup>1</sup>, ZUO Yun-long<sup>1,2</sup>, HE Hui<sup>1</sup>, SU Jiao-jiao<sup>1,2</sup>, XIAO Wei<sup>1</sup>, LIU Xue-dong<sup>1</sup>

(1. South China Sea Institute of Oceanology, CAS, Guangzhou 510301, China; 2. Graduate University of CAS, Beijing 100039, China)

**Abstract:** The effect of various sulphur concentrations on the growth of *Chlorella zofingiensis* and the astaxanthin accumulation in its heterotrophic culture were investigated. The results indicated that low sulphur concentration favoured rapid and significant astaxanthin accumulation while the biomass enhancement and cell division were inhibited severely. The addition of  $3\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  sulphur to the culture led to a maximum astaxanthin content of  $1.19\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , increased by 40.68% compared with the  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  sulphur cultures. The highest yield of astaxanthin was  $9.99\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , which was obtained in the medium containing  $3000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  sulphur on Day 14. The addition of  $3000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  sulphur to the culture enhanced the biomass and yield of astaxanthin compared with the  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  sulphur cultures in which the protein content decreased in the later stage. To attain the maximum biomass in heterotrophic culture, the  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  sulphur concentration could be the minimum limit for glucose utilization in batch culture. The results indicated that the productivity of the astaxanthin and biomass could be enhanced by application of higher concentration of sulphur in the industrial production through glucose fed-batch fermentation.

**Key words:** *Chlorella zofingiensis*, sulphur, growth, astaxanthin, heterotrophic culture

虾青素(astaxanthin), 化学名称为 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- $\beta$ -类胡萝卜素, 是一种紫红色的酮式类胡萝卜素, 在水产养殖中有着广泛的应用, 不仅着色效果突出, 而且对所养植物种的存活和生长也

有帮助<sup>[1]</sup>。近年研究表明, 虾青素具有超强的抗氧化活性(比  $\beta$ -胡萝卜素高约 10 倍), 在抵抗某些癌症, 加强再生能力和提高机体免疫力等方面均有良好的效果, 因此虾青素具有商业化生产药物和保健品的

收稿日期: 2009-04-29; 修订日期: 2009-05-31. 蔡卓平编辑

基金项目: 广东省科技计划项目(2007B030300004); 广东省海洋与渔业局科技专项项目(A2008009-08)

作者简介: 刘纪化(1982—), 男, 山东省邹平县人, 硕士, 从事微藻生物技术研究。E-mail: liujihua1982@gmail.com

通信作者: 刘学东。E-mail: xxxdddlll@yahoo.com.cn

前景<sup>[2]</sup>。传统的虾青素获得途径(化学合成和从甲壳类动物中提取)本身有很大的局限性,而天然生物合成的虾青素具有生物活性高和生物安全性好的优点,因此天然虾青素的国际市场前景相当广阔<sup>[3]</sup>。

市场对天然虾青素的需求加快了生物合成虾青素的研究进展。目前有开发潜力的虾青素生物资源仅有为数不多的几种生物物种(叶黄素酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous*、雨生红球藻 *Haematococcus pluvialis*、小球藻 *Chlorella* spp. 等),叶黄素酵母有其自身的生理局限性,如生产温度低且虾青素含量低等;雨生红球藻虽然虾青素含量高,但生长缓慢,易污染,成本和技术要求较高。国际上已有美国和以色列几家大公司利用雨生红球藻大规模生产天然虾青素的报道<sup>[4]</sup>,同时我国也有几家企业实现了雨生红球藻的大规模培养。

小球藻虽然抗污染能力强,生长速度快,在胁迫条件下能够快速积累虾青素,但其虾青素含量较雨生红球藻低,限制了其应用。目前常见的微藻培养模式有自养培养和异养培养等。自养条件下,光照是虾青素生产中的一个重要的环境因子,生物量较大时,藻细胞之间会互相遮挡,限制了生物量的增加和产量的提高。某些小球藻在无光条件下能够利用有机碳源生长,在获得更高的生物量的同时,也进一步降低了生产成本,因此在异养培养过程中,如何提高虾青素的产量成为关注点。

小球藻 *Chlorella zofingiensis*(本文下面没有另外标出拉丁名的小球藻则指这个种)能够在无光异养条件下生产虾青素,避免了光自养过程中容易出现的光抑制等问题,培养条件容易控制,而且可以利用生物反应器实现大规模培养,被认为是虾青素潜在来源之一<sup>[5]</sup>。小球藻在异养条件下,碳源和氮源等营养元素对虾青素的含量和产量影响较大<sup>[6]</sup>,但其他元素对异养小球藻生长和色素代谢影响的深入研究则少有报道。作为藻类生长的必需元素,硫元素对小球藻异养生长和虾青素代谢变化的影响,国内外还未见报道。本文就不同浓度的硫元素对小球藻不同时期生长和虾青素合成的影响进行了初步研究,以为大规模异养培养小球藻生产虾青素提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

小球藻 *C. zofingiensis* (ATCC 30412),由香港大

学植物学系陈峰教授提供。

### 1.2 培养基设计

#### 1.2.1 斜面培养基

琼脂  $1.2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{CH}_3\text{COONa}$   $1.2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 改良的 Bristol's 培养基(CZ-M1<sup>[7]</sup>), 调节 pH 至 6.5。

#### 1.2.2 液体种子培养基

葡萄糖  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , CZ-M1。

#### 1.2.3 无硫基础培养基

将 CZ-M1 培养基中的所有硫酸盐用等摩尔浓度的氯化物替代,同时去除 NaCl。具体如下:  $\text{NaNO}_3$   $0.75\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0.175\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $0.075\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $0.062\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $0.025\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $0.005\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{ZnCl}_2$   $0.136\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$   $0.197\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$   $0.061\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $0.0017\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $(\text{NH}_4)\text{MnO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0.00124\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 调节 pH 至 6.5。

### 1.3 藻体培养

接种 1 环保存于 4 斜面培养基的藻细胞群落至装有 10mL 液体种子培养基的 250mL 三角瓶中,  $27^\circ\text{C}$ 、 $150\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $20\mu\text{mol}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$  连续光照培养。按 10:1 的接种比例,续代培养。用含  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  葡萄糖的无硫基础培养基,隔 12h 替换原先培养基,使硫元素缺乏。收集第 3 代藻样,并用无硫基础培养基离心洗涤 3 次,以此藻样作为实验用藻种。通过调整  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  的量,使硫元素的浓度分别达到  $0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $3\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $30\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $3000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。同时添加葡萄糖,使其浓度为  $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按照 10:1 的接种比例接入 250mL 三角瓶中,  $27^\circ\text{C}$ 、 $150\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、黑暗异养培养。

### 1.4 测定方法

#### 1.4.1 藻细胞形态测定

DXM 1200F NIKON 显微镜,每 24h 观察藻细胞 1 次,拍摄细胞照片。

#### 1.4.2 生物量测定方法

每隔 24h 取藻液 2mL,同时取培养至第 3.5 和 10.5d 的藻液 2mL,离心洗涤 2 次,105 烘干至恒重。

#### 1.4.3 蛋白含量的测定方法

考马斯亮蓝法<sup>[8]</sup>。

#### 1.4.4 培养基中葡萄糖浓度测定方法

3,5'-二硝基水杨酸比色法<sup>[9]</sup>。

#### 1.4.5 色素测定方法

分别取培养至第 3.5、7、10.5 和 14d 的藻液,离心洗涤 2 次,真空冷冻干燥。称取约 0.01g 的干藻粉,

加液氮研磨, 丙酮提取至无色。高速冷冻离心, 弃残渣, 上清液用氮气吹干, 并用丙酮定容至 1mL (全过程避光操作)。色素的测定方法参照 Baroli 等<sup>[10]</sup>的 HPLC 方法改进。高效液相色谱仪为美国 Waters, 1525 型色谱仪, 色谱柱为 Waters Spherisorb C<sub>18</sub>(5 $\mu$ m; 4.6mm  $\times$  250mm)。流动相 A(乙腈 甲醇 0.1mol·L<sup>-1</sup> 的 Tris - HCl[pH8.0]=84 2 14,V/V/V), 流动相 B(甲醇 乙酸乙酯=68 32, V/V)。洗脱梯度为 0 到 15min, 流动相由 100%A 线性速度变化为 100%B; 100%B 保持 10min, 流速为 1.2mL·min<sup>-1</sup>。进样量为 20 $\mu$ L。检测器为 Waters2966 光电二极管阵列检测器, 光谱扫描波长范围为 250 到 700nm。

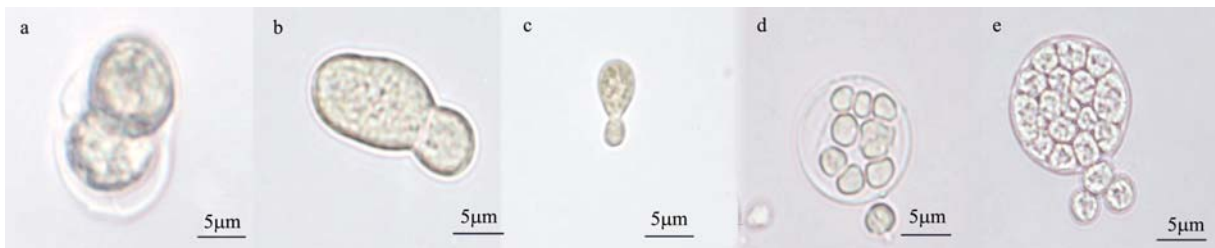


图 1 不同浓度硫元素对异养小球藻细胞分裂的影响

a 为 0 $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>; b 为 3 $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>; c 为 30 $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>; d 为 300 $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>; e 为 3000 $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>

Fig. 1 Influence of different sulphur concentration on cell division

## 2.2 不同浓度硫元素对异养小球藻生物量积累和对葡萄糖利用的影响

藻液初始接种生物量为 0.24g·L<sup>-1</sup> (图 2a)。随着硫元素浓度的降低, 生物量也随之大幅度下降。缺乏或低硫元素浓度(30 $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>)下, 小球藻生物量的积累受到了极大的抑制。0 $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 的硫元素浓度导致了最低的生物量, 仅为 1.10g·L<sup>-1</sup>。3000 $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 硫元素浓度下生物量增长最快, 在第 11 天时达到最大生物量 12.26g·L<sup>-1</sup>, 比 300 $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 硫元素组高 4.29%, 两者具有显著性差异( $P < 0.05$ )。随着培养基中葡萄糖被耗尽, 300 和 3000 $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 硫元素浓度组别的生物量也略有下降。

如图 2b 所示, 0、3 和 30 $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 硫元素浓度下, 藻细胞对葡萄糖的利用受到了极大的限制, 其平均利用率分别为 0.03、0.11、和 0.34g·(L·d)<sup>-1</sup>, 同时随着硫元素浓度的提高, 这种限制的作用逐渐变弱, 但在此 3 个硫元素浓度下, 小球藻均不能够完全利用掉培养基中的葡萄糖。300 和 3000 $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 硫元素浓度下, 培养至第 3 天后, 藻细胞加速对葡萄糖的利用, 其平均利用率分别为 2.50 和 3.33g·(L·d)<sup>-1</sup>。并且, 3000 $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 硫元素浓度下, 第 9 天时, 培养基中已检测不到葡萄糖的存在, 比 300 $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 硫元素组提前 72h 利用完葡萄糖。

虾青素 480nm 检测波长积分定量。

## 1.5 统计分析

所有数据均采用 SPSS 11.0 软件进行数据统计分析。

## 2 实验结果

### 2.1 不同浓度硫元素对异养小球藻细胞分裂的影响

图 1 为不同硫元素浓度下, 培养至第 6 天时细胞分裂的形态。图中明显显示 0、3 和 30 $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 硫元素浓度下, 细胞分裂被抑制, 只能形成初成熟阶段细胞。而 300 和 3000 $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 硫元素浓度下, 细胞能够进行正常的分裂。

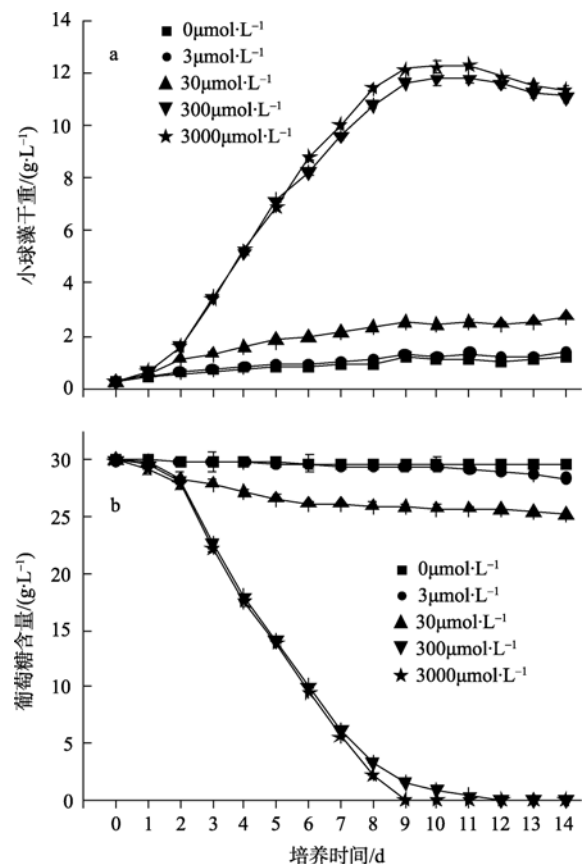


图 2 不同浓度硫元素对生物量(a)和葡萄糖利用(b)的影响

Fig.2 Influence of different sulphur concentration on biomass (a) and glucose utilization (b)

### 2.3 不同浓度硫元素对小球藻合成虾青素的影响

不同浓度的硫元素对小球藻虾青素含量的影响如图 3 所示。0、3 和  $30\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素组, 虾青素含量随时间的延长迅速提高, 同时次生类胡萝卜素的含量也迅速提高, 而叶绿素(a 和 b)的含量则急剧降低。同其他硫元素组相比, 300 和  $3000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素组, 虾青素和次生类胡萝卜素的含量随时间延长而增加的趋势比较平稳, 同时叶绿素(a 和 b)含量随时间变化而降低的幅度也较小。

在跟踪监测中发现, 同一个时间点上随着硫元素浓度的逐步提高, 虾青素的含量逐渐下降(图 3a)。第 3.5 天  $0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的硫元素浓度下, 虾青素的含量

已高达  $0.78\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 比  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素组高出 84.65%。第 7 天  $3\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素浓度下, 其虾青素含量已高于  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素组在整个培养期内的最高虾青素含量。第 10.5 天  $30\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素浓度下, 虾青素的含量为  $0.965\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 比  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素组高出 47.77%。第 14 天 3 和  $30\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素浓度下, 虾青素的含量达到最大, 分别为 1.193 和  $1.16\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 比  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素组的虾青素最大含量高出 40.68% 和 37.50%。 $3000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素浓度下, 虾青素含量除在第 3.5 天稍低外, 在其余 3 个时间点上, 均高于  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素组。

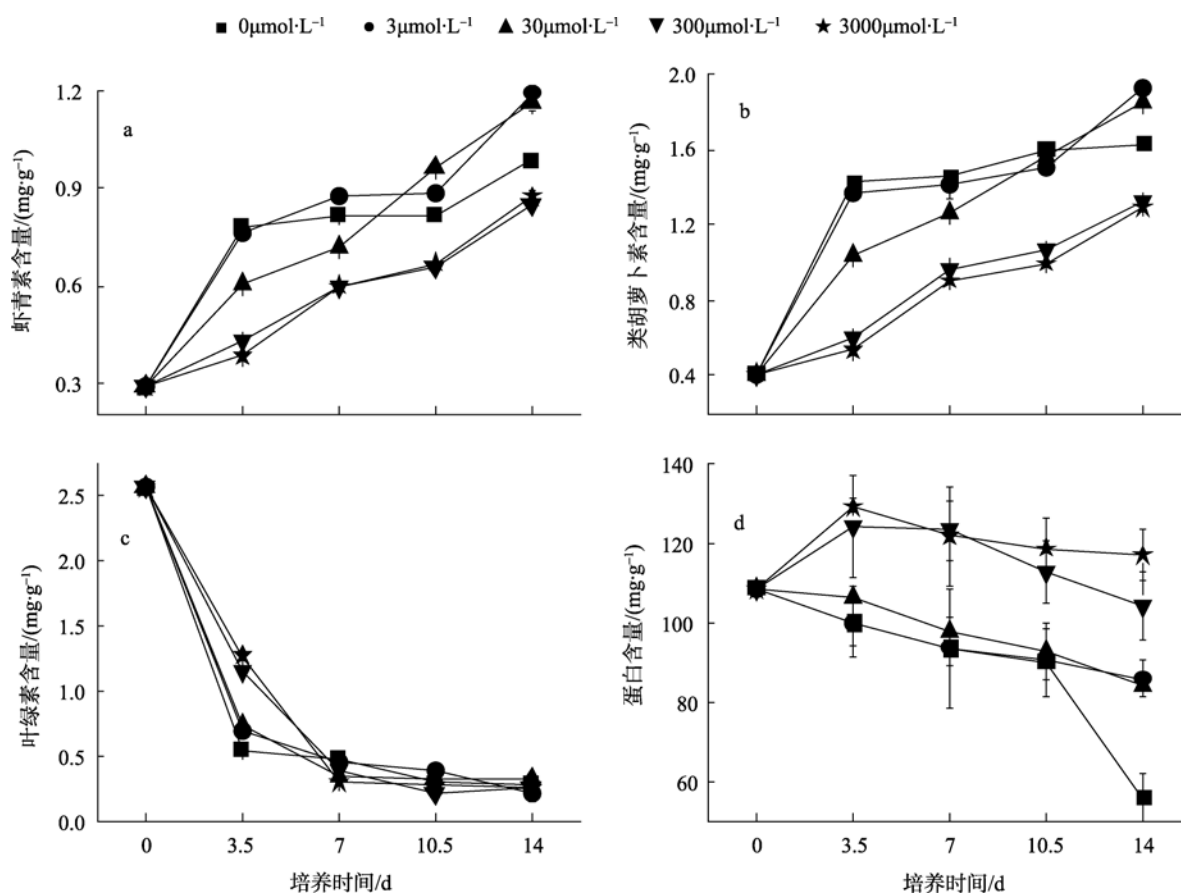


图 3 不同浓度硫元素对色素和蛋白含量的影响

Fig. 3 Influence of different sulphur concentration on pigment and protein

0、3 和  $30\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素浓度下, 随着时间的增加, 蛋白含量逐步降低。且在同一个时间点上, 硫元素浓度越低蛋白含量越小。 $300$  和  $3000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素浓度下, 在 3.5d 内, 蛋白含量则随时间的增加而升高, 而在 3.5d 后蛋白含量随时间的延长而降低。在同一个时间点上,  $300$  和  $3000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素组别的蛋白含量均高于另外 3 个低浓度硫元素

组别。

虽然低硫条件下 ( $30\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 虾青素含量大幅度提高, 但限于生物量很小, 因此虾青素的产量很低(表 1)。 $3000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素浓度下, 虾青素的产量达到最大  $9.99\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 比  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素组 ( $9.56\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 提高了 4.55%, 两者具有显著性差异 ( $P<0.05$ )。

表 1 不同硫浓度对黑暗异养小球藻不同阶段虾青素合成的影响

Tab. 1 Effect of different sulphur concentration on the astaxanthin production of *C.zofingiensis* in dark-heterotrophic culture

硫元素浓度/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	虾青素产量/( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )			
	3.5d	7d	10.5d	14d
0	0.48±0.01	0.66±0.00	0.88±0.01	1.11±0.02
3	0.51±0.01	0.81±0.01	1.13±0.07	1.39±0.04
30	0.72±0.01	1.39±0.03	2.27±0.08	2.95±0.24
300	1.06±0.01	4.93±0.02	7.49±0.33	9.56±0.05
3000	0.97±0.03	5.25±0.10	8.04±0.13	9.99±0.11

注：所有数据为平均值 ± 标准偏差(n=3)

3 讨论与结果

3.1 硫元素对异养小球藻生长的影响

硫是植物必需的大量矿质元素之一<sup>[11]</sup>。硫元素不仅参与蛋氨酸、半胱氨酸、胱氨酸的组成,而且以二硫键的形式在蛋白质折叠过程中发挥重要作用,同时硫元素作为乙酰辅酶 A 的组成元素,在蛋白质、脂类和糖类 3 大物质代谢中起到关键作用,硫元素限制或缺乏将导致生物量大幅度降低和代谢的抑制甚至停止<sup>[12]</sup>。Hase<sup>[13]</sup>报道在同步自培养培养椭圆小球藻过程中,通过控制硫元素的供给可以控制藻细胞的分裂,本研究也得到了类似的结果,在小球藻异养培养中,硫限制或缺乏对细胞分裂具有显著抑制作用。

硫元素缺乏和低浓度条件(0、3 和  $30\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )不仅抑制细胞正常分裂(图 1a、b、c),而且在抑制细胞对葡萄糖利用的同时也极大限制生物量的增加(图 2)。高浓度硫元素下(300 和  $3000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),细胞正常分裂不受影响(图 1d、e),且在加快对葡萄糖利用的同时,也加速了生物量的积累(图 2)。由于乙酰辅酶 A 是细胞内物质和能量代谢的枢纽<sup>[14]</sup>,因此,可以认为低浓度硫元素下,小球藻的含硫蛋白质代谢与乙酰辅酶 A 的形成受到抑制,藻细胞不能够正常吸收或代谢葡萄糖,最终导致低浓度硫元素下细胞生物量增加很小。

3.2 硫元素对虾青素积累和产量的影响

低浓度硫元素条件下,蛋白含量逐步降低,次生类胡萝卜素与虾青素含量均明显高于高浓度硫元素,其中  $3\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时达到最大,这可能是由于在低硫条件下,含硫功能蛋白的合成受阻,特别是谷胱甘肽抗氧化酶系统受到抑制,增加了细胞内的氧化活性因子的胁迫作用,直接诱导并促进次生类胡萝卜素的合成,最终使虾青素快速积累,这一过程与小球藻在其他胁迫条件下如高盐、高光 and 氮缺乏等加速虾青素的积累是类似的<sup>[15]</sup>。在完全缺硫培养中,

可能是由于含硫功能蛋白质合成和乙酰辅酶 A 形成受到更严重的抑制,使得次生类胡萝卜素的代谢底物缺乏,而导致其虾青素含量小于低硫培养。虽然低硫条件( $3\text{—}30\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )下虾青素的含量得以提高,但由于异养小球藻生物量积累所受抑制的水平远高于虾青素含量增加的幅度,最终导致虾青素产量显著降低。因此,在小球藻异养培养生产虾青素过程中,应避免硫限制条件的出现。

在不同浓度的硫元素处理中,异养培养的小球藻在叶绿素(a和b)含量变化中显示相似的变化规律,即培养早期的快速下降和培养中后期维持在极低的水平,即使在缺硫培养中,藻细胞生长受到显著抑制并趋于停止的状态下,叶绿素的含量仍然大幅度下降。因此,本研究认为异养培养中藻细胞的叶绿素的代谢与硫元素添加量无关。

3.3 小球藻异养培养生产虾青素过程中硫元素的控制

在小球藻异养培养通用培养基 CZ-M1 中,硫元素浓度为  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,是目前异养培养小球藻时最常用的浓度<sup>[7]</sup>。本研究表明,  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素浓度下,小球藻培养后期(7.5—14d)蛋白含量的降低更为明显(与  $3000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素组相比),表明  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素浓度在异养培养后期依然对蛋白质的合成有一定的限制作用。而高硫元素浓度( $3000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )下,最终虾青素的含量和产量均高于  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素组,可能是硫元素更为充足的缘故(图 3)。因此本研究认为,在单批(一步)培养中,  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素浓度可能非常接近满足葡萄糖代谢( $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )获得最大生物量( $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  左右)所需的最低量。

本研究  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素浓度实验采用的是分批培养而非流加碳源方式,而最近研究表明,异养培养小球藻过程中,在  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素条件下,流加葡萄糖可大幅度提高其生物量和虾青素产量<sup>[16]</sup>,分别为  $17.8\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $12.6\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。根据前述结

果(图 2)和分析,可以推断,在  $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫元素浓度下流加葡萄糖,硫元素的限制可能远高于分批培养模式,如果加大硫元素的添加量,可望更大幅度地提高葡萄糖流加的效果,提高小球藻异养培养时虾青素的产量。以下 2 个实验为这一推断提供了初步依据,孙妮等<sup>[16]</sup>报道,发酵罐异养培养小球藻时,在培养前期,葡萄糖与浓缩基础培养基(包括硫元素)同时流加,经过 16d 的培养,生物量和虾青素产量分别高达  $51.8\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $32.4\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,该实验最终培养基中平均硫元素流加总量为  $750\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  左右。而 Wei 等<sup>[17]</sup>报道小球藻 *Chlorella protothecoides* 在发酵罐中流加葡萄糖异养培养时,硫元素添加浓度为  $1200\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,其生物量 7d 可

高达  $51.2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

本研究在硫元素浓度高达  $3000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,不仅不会对异养藻细胞的生长代谢产生抑制作用,而且获得了更高的虾青素产量,从而为流加培养中添加更高浓度的硫元素,进一步提高虾青素产量提供了足够的选择空间。有关异养培养小球藻流加培养中的硫元素优化方案有待进一步深入研究。

综上所述,控制足够的硫元素浓度并避免硫元素缺乏,是实现小球藻虾青素高产的必要条件;在实际生产过程中,控制比目前通用浓度( $300\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )更高的硫浓度,可望在其他元素和流加方式优化的基础上,显著提高虾青素的生产效率和产量。

## 参考文献

- [1] 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.
- [2] IP P F, WONG K H, CHEN F. Enhancement production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(11): 1761–1766.
- [3] HIGUERA-CIAPARA I, FELIX-VALENZUELA L, GOYCOOLEA F M. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2006, 46(12): 185–196.
- [4] LORENZ R T, CYSEWSKI G R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin[J]. Trends Biotechnol, 2000, 18 (4): 160–167.
- [5] IP P F, CHEN F. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(2): 733–738.
- [6] 孙妮, 向文州, 何慧, 等. 碳氮比和光强对小球藻合成虾青素的影响[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 353–357.
- [7] 陈涛, 向文州, 何慧, 等. 不同碳源对小球藻 *Chlorella zofingiensis* 异养生产虾青素的影响[J]. 微生物学通报, 2007, 34(5): 27–30.
- [8] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997: 137–140.
- [9] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Anal Chem, 1959, 31(3): 426–428.
- [10] BAROLI I, DO A D, YAMANE T, et al. Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophylls cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress[J]. Plant Cell, 2003, 15 (4): 992–1008.
- [11] RÜDIGER H, THOMAS L. Sulfur metabolism in plants and algae -a case study for an integrative scientific approach[J]. Photosynthesis Research, 2005, 86 (3): 297–298.
- [12] NIKIFOROVA V J, KOPKA J, TOLSTIKOV V, et al. Systems rebalancing of metabolism in response to sulfur deprivation, as revealed by metabolome analysis of arabidopsis plants[J]. Plant Physiology, 2005, 138: 304–318.
- [13] LEWIN R A. Physiology and biochemistry of algae[M]. Academic Press, New York, London, 1962: 619–622.
- [14] 周云龙. 植物生物学[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 160.
- [15] DEL CAMPO J A, RODRIGUEZ H, MORENO J, et al. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta)[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64(6): 848–854.
- [16] SUN NI, WANG YAN, LI YAN-TAO, et al. Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta)[J]. Process Biochemistry, 2008, 43(11): 1288–1292.
- [17] WEI XIONG, LI XIU-FENG, XIANG JIN-YU, et al. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 78: 29–36.