

营养强化混养条件下提高色绿藻生物量和虾青素产量

姜雪亚, 陈俊辉, 魏东

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 本研究在混养条件下, 系统地比较了葡萄糖浓度、氮源种类以及不同碳氮比对色绿藻生物量和虾青素产率的作用规律。目的是在短时间内达到最高生物量同时获得较高含量的虾青素, 为建立色绿藻高密度快速扩种和诱导积累虾青素应用技术提供科学依据。研究表明: 在混养条件下, 当葡萄糖浓度一定时, 硝酸钠是细胞生长所需的最优氮源, 6 d 可达到最高生物量浓度 9.23 g/L, 平均比生长速率为 0.24/d, 虾青素产量为 12.38 mg/L, 虾青素占总类胡萝卜素的比高达 46.94%。至于不同碳氮比、葡萄糖浓度对色绿藻生物量和虾青素生产的影响, 当葡萄糖浓度为 30 g/L、C/N 比为 34 为细胞生长的最优条件, 生物量浓度最高为 11.28 g/L, 平均比生长速率高达 0.32/d; 虾青素含量显著优于其他组 ($p < 0.05$), 虾青素的产量为 21.77 mg/L, 虾青素占总类胡萝卜素的比进一步提高到 52.71%。本研究结果对于色绿藻高密度快速生长并积累大量虾青素的放大技术开发具有重要的指导意义。

关键词: 色绿藻; 虾青素; 氮源; 葡萄糖; 碳氮比

文章编号: 1673-9078(2018)08-155-164

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.8.023

Increasing Yields of Biomass and Astaxanthin by *Chromochloris zofingiensis* under Nutrient-enhanced Mixotrophic Conditions

JIANG Xue-ya, CHEN Jun-hui, WEI Dong

(School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: This study systematically compared the effects of different glucose concentrations, nitrogen sources, and C/N ratios on the biomass and astaxanthin accumulation in *Chromochloris zofingiensis* under mixotrophic conditions. The aims were to obtain the highest biomass along with a relatively high content of astaxanthin in a short period of time, and provide a scientific basis for high-density seed-train expansion of *Chromochloris zofingiensis* and astaxanthin induction applied technologies. The results revealed that under mixotrophic conditions with a constant glucose concentration, NaNO_3 was the most favorable nitrogen source for *C. zofingiensis* cell growth. The highest biomass concentration of 9.23 g/L was achieved on the sixth day of cultivation, with the average growth rate as 0.24/d, corresponding astaxanthin yield as 12.38 mg/L, and astaxanthin accounting for about 46.94% of total carotenoids in algal cells. As for the effects of different glucose concentrations and C/N ratios on cell growth and astaxanthin accumulation of *C. zofingiensis*, glucose concentration at 30 g/L and C/N ratio at 34 were found to be the optimal conditions for cell growth, resulting in the highest biomass of 11.28 g/L and average growth rate as 0.32/d, with significantly higher astaxanthin yield (21.77 mg/L, $p < 0.05$) and percentage of astaxanthin in total carotenoids (increased to 52.71%). The results obtained in this study will provide the guidance for rapid seed culture expansion and large-scale astaxanthin production by *Chromochloris zofingiensis*.

Key words: *Chromochloris zofingiensis*; astaxanthin; nitrogen sources; glucose; C/N ratios

虾青素 (Astaxanthin), 化学名称为 3,3'-二羟基

收稿日期: 2017-12-04

基金项目: 广东省公益研究与能力建设项目 (2016A010105001、2015A020216003); 广州市科技计划项目产学研协同创新重大专项 (201704030084); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项 (A201401C01)

作者简介: 姜雪亚 (1991-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 微藻生物技术

通讯作者: 魏东 (1966-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 工业生物技术

-4,4'-二酮基- β -胡萝卜素, 是一种酮式类胡萝卜素。虾青素巨大的经济应用价值在于其具有超高的抗氧化活性, 其抗氧化能力是 β -胡萝卜素的 10 倍, 维生素 E 的 500 倍, 被誉为“超级维生素 E”, 可延缓皮肤衰老、提高机体免疫力等, 因而在化妆品、医药等方面具有较好的应用前景^[1-3]。虾青素的来源主要包括化学合成与天然提取, 而天然提取的虾青素在稳定性、安全性和抗氧化性等明显优于合成虾青素。

天然虾青素的来源主要有三方面: 从甲壳类动物

中提取、从真菌或细菌中获得、从藻类细胞提取^[4]。雨生红球藻被认为是生产天然虾青素的最佳来源,但是其缺点是细胞产率低、生长迟缓、易污染等,而色绿藻因其生长速率快、细胞产率高,不易污染等,因而近年来色绿藻被认为是大规模生产虾青素的潜在选择。

色绿藻 *Chromochloris zofingiensis* 是一种淡水单细胞绿藻,细胞直径范围 2~15 μm ,通过无性繁殖形成孢子分裂产生子细胞^[5]。色绿藻既进行光自养,亦可以利用有机碳源进行异养,同时还可以利用光照与有机碳源进行混养生长。色绿藻胞内富含多种高价值的产物如初级类胡萝卜(主要包括叶黄素、 β -胡萝卜素和玉米黄质等)、次级类胡萝卜素(主要包括虾青素、角黄质和金盏花黄质等)以及用于光合作用的叶绿素,因而近年来色绿藻受到国内外学者的广泛关注。

目前国内外对于色绿藻培养的研究大多集中在异养发酵方面,对于混养方便报道相对较少,但是混养条件下色绿藻的生物量浓度、生长速率均高于异养条件下的培养^[6]。本实验则是选择混养条件下进行实验,主要分析了混养条件下,五种不同氮源种类、葡萄糖浓度和碳氮比对色绿藻生长和虾青素积累的影响,以期获得最高生物量浓度和相对较高的虾青素含量。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 藻种

本实验所采用的色绿藻(*Chromochloris zofingiensis* ATCC 30412)购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC)菌种保藏中心。

1.1.2 主要仪器与设备

生物传感分析仪 SBA-40D 购自山东省科学院生物研究所;高效液相分析仪购自美国 Dionex 公司;BD Accuri C6 流式细胞仪购自美国 BD 公司;ModulyoD-230 冷冻干燥机购自 Thermor Electron Corporation;GLZ-A 光子计购自浙江托普仪器有限公司等。

1.2 实验方法

1.2.1 种子液的制备

从改良 Bristol's medium^[7]斜面上挑取一小环色绿藻藻苔,转接到含有 10 g/L 葡萄糖的 Bristol's medium 的平板上。在光照为 $10 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,温度为 26°C 的条件下,置于光照培养箱中培养 7 d。再从培养基平板

上挑取一个单藻落,接种至含有 10 g/L 葡萄糖的 Bristol's medium 中,在光照为 $10 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、温度为 26°C 、转速为 150 r/min 的恒温培养箱中连续培养 4 d。

1.2.2 不同氮源种类对色绿藻生物量以及色素积累的影响

以不含氮源的 Bristol's medium 为基本培养基,在同一葡萄糖浓度(30 g/L)条件下,按照相同的碳氮比(C/N 比为 34)在培养基中分别加入硝酸钠、胰蛋白胨、酵母膏、尿素、碳酸氢铵。每组设三个平行,并将 pH 调至 6.50,分装至 250 mL 的三角瓶中,装液量为 100 mL,在 121°C 条件下灭菌 15 min。按照 10% 的接种量进行接种,在光照为 $10 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,温度为 26°C ,转速为 150 r/min 的条件下培养 8 d。

1.2.3 不同低碳氮比碳氮比对色绿藻生物量以及色素积累的影响

以不含氮源的 Bristol's medium 为基本培养基,初始葡萄糖浓度为 20 g/L,按照碳氮比分别为 22、34、42 加入硝酸钠,每组三个平行,进行试验。将 pH 调至 6.50、分装并在 121°C 条件下灭菌 15 min。按照 10% 的接种量进行接种,在光照为 $10 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、温度为 26°C 、转速为 150 r/min 的条件下培养 8 d。

1.2.4 不同葡萄糖浓度以及碳氮比对色绿藻生物量以及色素积累的影响

以不含氮源的 Bristol's medium 为基本培养基,以葡萄糖、硝酸钠作为唯一碳氮源。在培养基中加入葡萄糖浓度(以下简称为 Glu.)分别为 10 g/L、20 g/L、30 g/L,同时每组葡萄糖浓度条件下按照碳氮比为 22、34,分别加入硝酸钠,共六组实验,其实验条件设置具体如下:每组葡萄糖浓度(10 g/L、20 g/L、30 g/L)条件下,均设置碳氮比分别为 22、34,进行实验。

调节 pH 至 6.50 并分装,装液量为 100 mL,在 121°C 条件下灭菌 15 min。在接种量为 10%,光照为 $10 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、温度为 26°C 、转速为 150 r/min 的条件下培养 8 d。

1.3 分析方法

1.3.1 生物量浓度的测定^[8]

色绿藻生物量采取干重法进行测定。吸取 2 mL 色绿藻培养液,置于干燥已称重的 2 mL 离心管中,离心、洗涤。将上清液与藻泥分离,将藻泥置于真空干燥箱中在 60°C 烘干至恒重,用分析天平称量并计算差值,每个样品重复测三次,取平均值。

1.3.2 干重得率(g/g)

干重得率 $\alpha = (m_1 - m_2) / (x_1 - x_2)$

其中: m_1 、 m_2 为 t_1 、 t_2 时间对应的生物量浓度, x_1 、 x_2 为

t_1 、 t_2 时间对应的葡萄糖浓度。

1.3.3 细胞的平均比生长速率

平均比生长速率的计算方法参考梁英等人的计算方法^[9]。

1.3.4 葡萄糖浓度的测定

采用 SBA 生物传感分析仪测定培养过程中的葡萄糖浓度。SBA 校正量程为 0.5~1.0 g/L^[8]。测定前用 1.0 g/L 的葡萄糖标准品定标, 取待测上清液, 稀释至量程范围内, 并移取 25 μ L 样品进行测定。测定读数 $\times$ 稀释倍数即为每个样品的葡萄糖浓度。

1.3.5 总氮的测定

总氮 (Total Nitrogen, TN) 的测定采用购自哈公司的 DRB 200 消解器和 DR 2700 分光光度计测定, 其中 DR 2700 分光光度计的校正量程为 0.5~25 mg/L 与 2~150 mg/L, 取待测上清液, 稀释至校正量程内, 将加入 Total Nitrogen Persulfate 粉枕包的空白样与待测样置于 DRB 200 消解器中进行消解 30 min, 待冷却至室温后, 加粉剂包(TNA、TNB)反应后, 用 DR 2700 分光光度计测定。

1.3.6 细胞密度的测定

色绿藻细胞密度采取流式细胞仪测定, 吸取 1 mL 培养过程中的藻液, 稀释至校正量程。流式细胞仪测定细胞数稀释范围为 700~1000 个/ μ L。测定前样品要用超纯水清洗、过滤。

1.3.7 细胞中的色素的提取以及测定

准确称量冻干的藻粉 10 mg 于振荡管中, 并加入适量的研磨珠。加入 1 mL 含有 0.1%(m/V) 的 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚 (BHT) 的甲醇与二氯甲烷提取溶剂 (3:1, V/V), 高速振荡 30 s, 之后迅速置于液氮中冷却, 离心收集上清液。如此反复提取直至藻细胞变成无色。收集上清液, 用氮气吹干, 加入 1 mL 甲醇与甲基叔丁基醚 (MTBE) 混合溶剂 (1:1, V/V) 定容。最后用 0.22 μ m 的微孔有机滤膜进行过滤, 转至棕色瓶中, 低温保存用于液相分析。以上所有操作要在避光的条件下进行, 以避免操作过程中色素被降解。色素含量的测定参照参考文献的液相测定方法进行测定^[10]。色素校准品虾青素 (41659)、叶绿素 *a* (96145)、叶绿素 *b* (00538)、叶黄素 (07168)、角黄素 (11775) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 将上述色素校准品配制成不同浓度的标准溶液, 依据上述 HPLC 的测定条件, 建立相应的色素标准曲线, 进而进行样品中色素含量的定性和定量分析测定。

1.3.8 数据统计分析

采用 Microcal Origin 9.0 Software、SPSS 统计分析数据。

2 结果与讨论

2.1 不同氮源对色绿藻生物量浓度与色绿藻

色素含量的影响

2.1.1 不同氮源对色绿藻生物量浓度影响

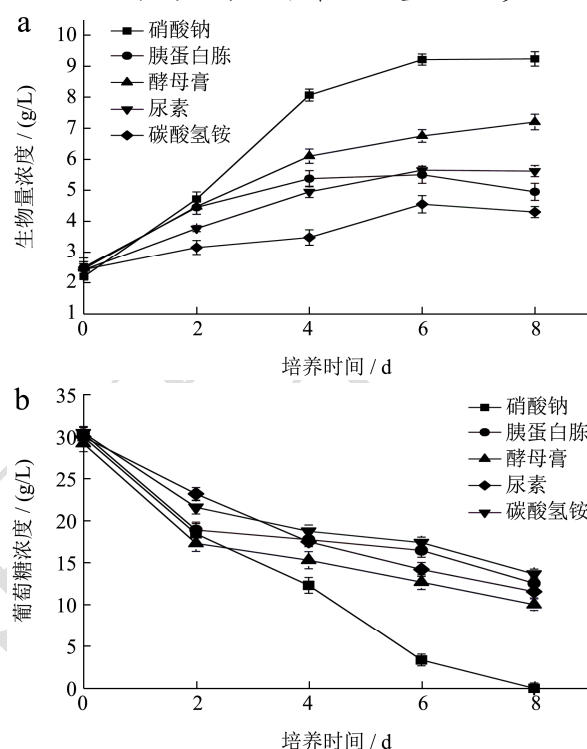


图 1 不同氮源条件下色绿藻的生长曲线(a)以及葡萄糖的消耗曲线(b)

Fig.1 Biomass concentrations (a) and time courses of glucose concentrations (b) in the cultures of *C. zofingiensis* with different nitrogen sources

不同氮源种类对色绿藻生长过程中葡萄糖消耗以及生物量浓度的影响如图 1 所示。如图 1b 所示, 细胞生长初期葡萄糖消耗变化曲线基本一致, 主要由于此时细胞生长处于延滞期, 从第 2~6 d, 葡萄糖消耗迅速, 此时细胞处于对数增长期。而其中硝酸钠实验组消耗最快, 葡萄糖在第 8 d 基本消耗完全。如图 1a 所示, 在以硝酸钠为氮源条件下, 色绿藻生物量浓度显著优于其他四组 ($p<0.05$) 且硝酸钠组的生物量浓度最高可达到 9.23 g/L。杨勋等人的研究了在以硝酸钠、尿素、氯化铵为氮源对色绿藻的生长的影响, 其研究表明, 培养时间为 8 d 时, 硝酸钠组生物量浓度最优, 与本实验结果类似^[11]。而王忠明等人研究则是认为尿素是色绿藻的最佳氮源, 且低浓度的尿素利于藻类生长^[12]。与本实验结果产生差异主要原因可能由于尿素浓度以及培养基的差异。

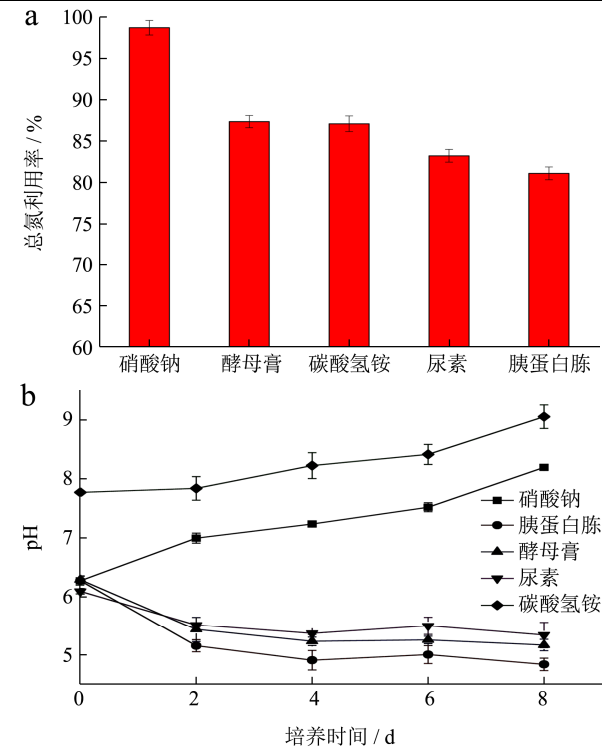


图2 不同氮源条件下色绿藻总氮利用率(a)以及pH的变化曲线(b)

Fig.2 Total nitrogen utilization (a) and time courses of pH (b) in the cultures of *C. zofingiensis* with different nitrogen sources

不同氮源种类对色绿藻生长过程中总氮的利用率如图2a所示,总氮利用率从高至低为硝酸钠>酵母膏≈碳酸氢铵>尿素>胰蛋白胨,利用SPSS进行分析,以

硝酸钠为氮源时消耗量显著高于其他处理组($p<0.05$),因此实验结果表明色绿藻对硝态氮的利用率较高。

研究表明色绿藻生长的pH范围是5.5~8.5^[5],由图2b所示,以硝酸钠为氮源,其pH值的变化处于适宜范围内,这也可能是硝酸钠实验组优于其他的原因之一。以碳酸氢铵为氮源时,pH一直处于增长状态,超过色绿藻生长的pH范围,不利于藻细胞生长,不适宜作为色绿藻的氮源,且碳酸氢铵极不稳定受热遇光分解。其他三组实验的pH变化处于先降低后趋于稳定,这可能由于此时光合作用变化的影响,光合作用减弱会引起藻类pH降低,而且三者的pH的变化范围低于色绿藻生长的pH范围,这也是其生物量浓度相对较低的原因之一。

如图1a所示,色绿藻前6d生长速率较快,在第6d之后生长基本趋于稳定。王天鹏等人研究了异养、混养条件下色绿藻的生长变化,与本实验研究结果基本一致^[6]。

培养结束时干重得率如表1所示,由统计检验得到,硝酸钠组与酵母膏组的干重得率无显著性差异,但是硝酸钠组与其他组有极显著差异($p<0.05$),结合图2a,实验结果表明,以硝酸钠为氮源的条件下,色绿藻能够获得更高的生物量浓度。综上,最适宜色绿藻生长的氮源为硝酸钠,其次是酵母膏、尿素、胰蛋白胨,而碳酸氢铵不利于色绿藻的生长。

表1 不同氮源种类条件下的色绿藻干重得率及平均比生长速率

Table 1 Yield ratios of biomass to glucose and specific growth rate of *C. zofingiensis* in the cultures with different nitrogen sources

氮源种类	硝酸钠	酵母膏	尿素	胰蛋白胨	碳酸氢铵
生物量增加量/(g/L)	7.20±0.12	4.75±0.28	3.74±0.16	2.25±0.19	2.15±0.23
干重得率/(g/g)	0.26±0.01	0.25±0.01	0.20±0.02	0.12±0.01	0.13±0.01
平均比生长速率/d	0.24±0.01	0.17±0.02	0.13±0.02	0.14±0.01	0.10±0.01

2.1.2 不同氮源条件下对色绿藻积累色素的影响

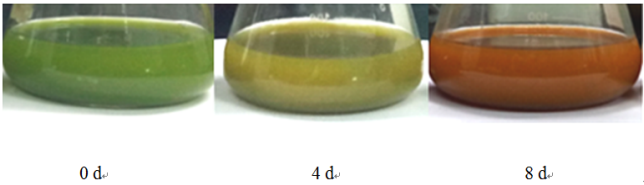
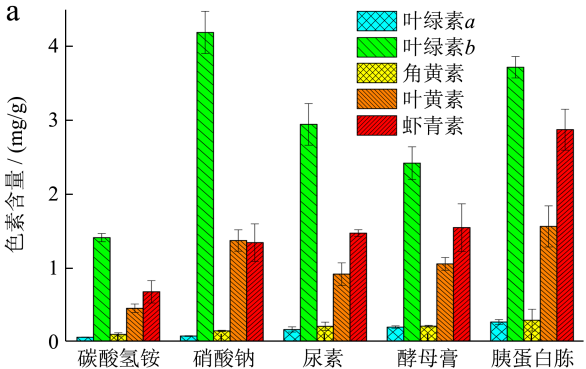


图3 色绿藻培养过程中的颜色变化

Fig.3 Color changes of *C. zofingiensis* during different culture stages

色绿藻含有叶绿素a和叶绿素b,合成并积累初级类胡萝卜素(如β-类胡萝卜素、叶黄素等)以及次级类胡萝卜素色绿藻(如虾青素、角黄素等),研究表明,色绿藻在绿色细胞阶段主要以叶绿素a、叶绿素b、

叶黄素为主^[13],而虾青素则在红色细胞阶段积累含量较高。本实验培养期间藻细胞的变化如图3所示。不同氮源条件下对色绿藻积累虾青素及其他色素的影响如图4a所示。



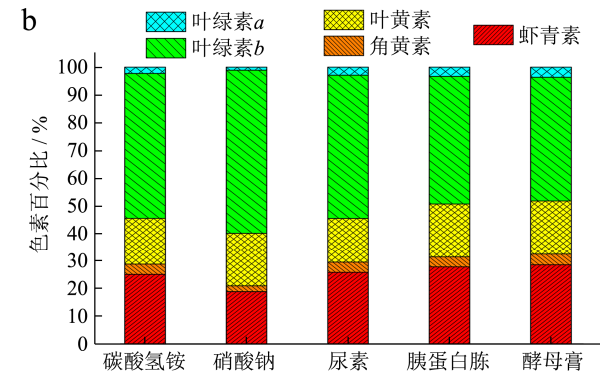


图4 不同氮源种类对色绿藻色素含量(a)及色素所占百分比(b)的影响

Fig.4 Effects of different nitrogen sources on the pigment accumulation(a)and percent of pigments(b)of *C. zoofingensis*

由图4可知, 虾青素的含量由高至低依次为胰蛋白胨>硝酸钠~酵母膏~尿素>碳酸氢铵, 其中胰蛋白胨组虾青素含量最高可达到2.24 mg/g, 产量可达16.13 mg/L (如表2所示), 虾青素所占总类胡萝卜素比例为60.78%; 而硝酸钠组虾青素组含量最高可达到1.34 mg/g, 产量可达12.38 mg/L, 虾青素所占总类胡萝卜素的比率为46.94%。如图4a、4b所示, 培养结束时, 色绿藻虽为红色细胞状态(如图3所示), 但是

表2 不同氮源种类条件下色绿藻的色素产量、产率及虾青素所占总类胡萝卜素的百分比

Table 2 Pigment yield, productivity and percentage of astaxanthin in total carotenoids of *C. zoofingensis* in the cultures with different nitrogen sources

氮源种类	生物量浓度/(g/L)	叶黄素产量/(mg/L)	角黄素产量/(mg/L)	虾青素产量/(mg/L)	虾青素产率/(mg/L/d)	虾青素所占总类胡萝卜素百分比/%
碳酸氢铵	4.55±0.25	2.06±0.10	0.45±0.01	3.07±0.12	0.38±0.02	55.03±0.25
硝酸钠	9.23±0.30	12.64±0.35	1.35±0.11	12.38±0.35	1.56±0.12	46.94±0.21
尿素	5.82±0.15	5.33±0.43	1.21±0.14	8.55±0.23	1.07±0.09	56.64±0.18
胰蛋白胨	7.20±0.25	11.23±0.32	2.10±0.17	20.66±0.79	2.58±0.10	60.78±0.23
酵母膏	5.38±0.45	5.66±0.10	1.13±0.16	8.30±0.62	1.04±0.11	55.00±0.27

2.2 不同葡萄糖浓度以及碳氮比对色绿藻生物量以及色素积累的影响

2.2.1 不同碳氮比对色绿藻生物量浓度的影响

不同碳氮比对色绿藻生物量的影响如图5a所示, 实验结果表明在碳氮比不同的情况下, 随着碳氮比的降低, 色绿藻的生物量浓度呈现先升高后降低, 葡萄糖的消耗量逐渐降低(如图5b所示), 碳氮比为22时, 生物量浓度为8.08 g/L, 剩余葡萄糖浓度是最低即是对葡萄糖利用率较高, 但总氮的利用率显著低于其他两组($p<0.05$)。

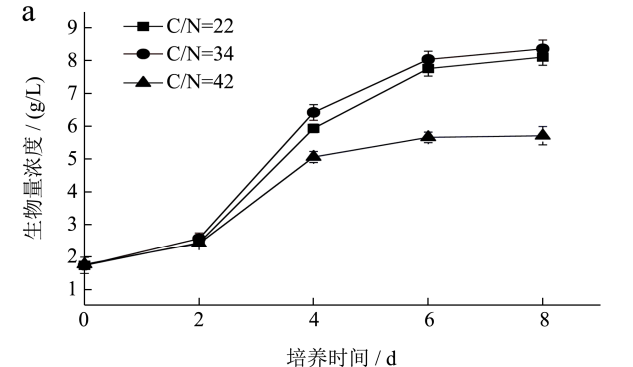
当碳氮比为42时, 生物量浓度最低为5.70 g/L。当碳氮比为34时, 生物量浓度为8.35 g/L且对总氮的

其积累的色素仍以叶绿素(包括叶绿素a、叶绿素b)为主, 五组实验叶绿素占总色素含量的50%以上, 其中硝酸钠组叶绿素所占比例最大约为60%, 而此时虾青素所占总色素的19.30%, 刘学铭等^[14]人研究表明随着叶绿素含量增加, 生长速度加快, 最终生物量与叶绿素含量呈现正相关。这也是硝酸钠组生物量远高于其他组的原因之一。以硝酸钠、胰蛋白胨为氮源时, 叶黄素含量较高, 且无显著相差异, 其中以硝酸钠为氮源时, 叶黄素含量可达到1.37 mg/g, 产量最高为12.64 mg/L, 且叶黄素的含量约占总色素含量的19.10%。五组实验条件下, 角黄素的含量均相对较少, 其占总色素百分比不超过5%, 如图4b所示。

不同氮源种类条件下, 色素含量从高至低依次为叶绿素、虾青素、叶黄素、角黄素, 而角黄素含量最少。综上, 以胰蛋白胨为氮源时, 色绿藻积累虾青素含量最高为2.24 mg/g, 但是生物量浓度为7.20 g/L; 以硝酸钠为氮源时, 色绿藻积累虾青素的含量为1.34 mg/g, 占总类胡萝卜素的46.94%, 但生物量浓度最高为9.23 g/L; 而以碳酸氢铵为氮源时, 几种色素含量均是较少, 且生物量亦是最少, 因此碳酸氢铵不利于色绿藻的生长以及色素的积累。

利用率显著较高。

综上, 当碳氮比高于34时, 生物量浓度会显著降低($p<0.05$), 培养基中剩余葡萄糖浓度会随着碳氮比升高而增加, 总氮利用率随着碳氮比的升高呈现先增大后减小。



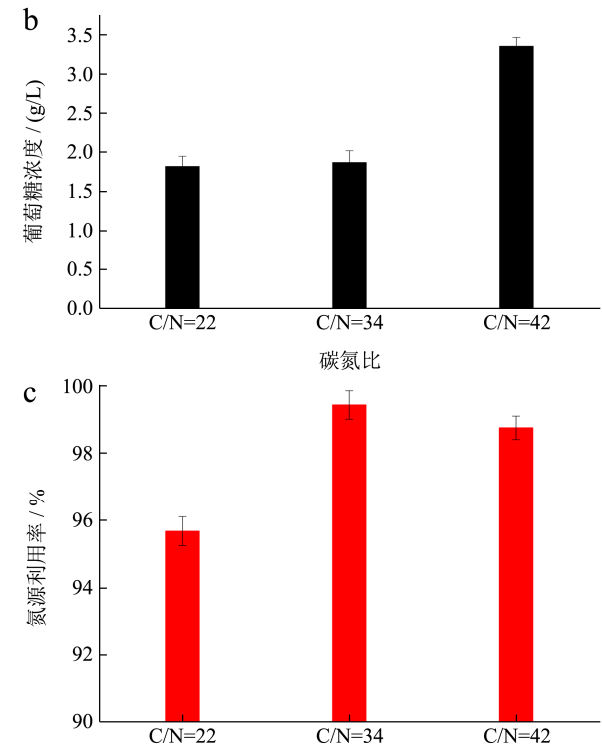


图5 不同碳氮比条件下色绿藻的生物量 (a)、葡萄糖的剩余量 (b) 及总氮利用率 (c)

Fig.5 Biomass concentrations(a), residue glucose concentrations(b) and total nitrogen utilization (c) of *C. zofingiensis* in the cultures with different C/N ratios

表3 不同碳氮比条件下的色绿藻干重得率及平均比生长速率
Table 3 Yields of biomass to glucose and specific growth rate of *C. zofingiensis* in the cultures with C/N ratios sources

碳氮比	C/N=22	C/N=34	C/N=42
生物量增加量 / (g/L)	6.36±0.15	6.60±0.18	3.95±0.04
干重得率/(g/g)	0.35±0.01	0.36±0.02	0.15±0.01
平均比生长速率/d	0.25±0.02	0.23±0.01	0.20±0.01

2.2.2 不同低碳氮比对色绿藻积累色素的影响

不同碳氮比对色绿藻积累色素的影响如上图6所示,如图6a所示,随着碳氮比的升高,虾青素含量升高,所占总类胡萝卜素的百分比逐渐升高。当碳氮比为22时,虾青素含量最低,所占总色素百分比也是最低(如图6b所示),约占总类胡萝卜素的35.10%,产量为5.72 mg/L,而当碳氮比为34时,积累的虾青素约占总类胡萝卜素的40.53%,产量为7.64 mg/L。碳氮比为42时,积累的虾青素约占总类胡萝卜素的58.38%,产量为6.62 mg/L。结合图5、表4,实验结果表明,在本实验条件下,随着碳氮比的升高,虾青素含量逐渐升高,虾青素占总类胡萝卜素的百分比也逐渐升高。

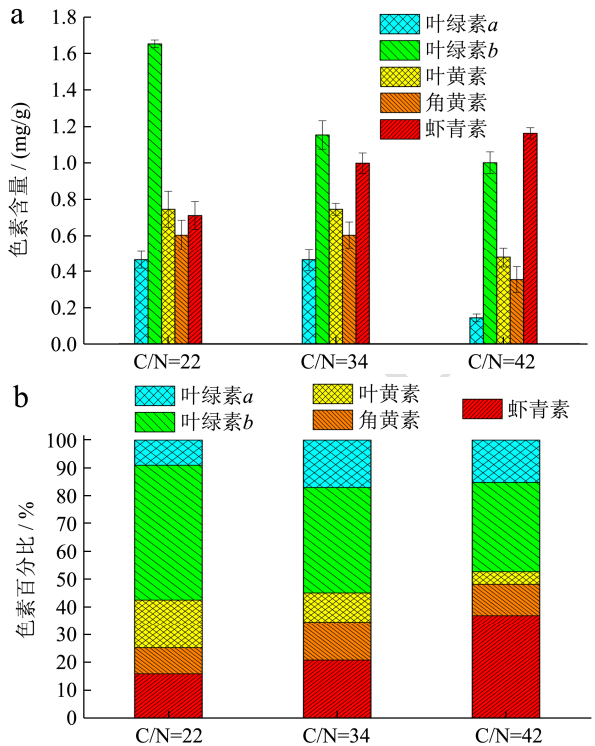
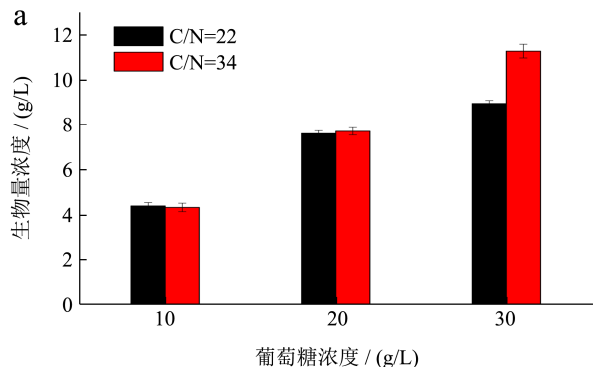


图6 不同碳氮比对色绿藻色素含量 (a) 及色素所占总色素百分比 (b) 的影响

Fig.6 Effects of different C/N ratios on the pigment accumulation(a) and pigment percentage(b) of *C. zofingiensis* under different C/N ratios and glucose concentrations

综上, 本实验研究不同低碳氮比对色绿藻生物量浓度和积累色素的影响, 考虑到后续高密度快速扩种和虾青素积累的户外大规模培养实验, 因此, 此阶段的重要技术指标为生物量浓度、剩余葡萄糖浓度、氮源浓度。因为葡萄糖的剩余会影响后续户外培养引起染菌, 而总氮余量过高会影响后续的诱导积累虾青素。因此选用碳氮比为22和34为最优选择, 由于葡萄糖浓度、接种状态影响等的影响, 二者的生物量浓度并不很高, 因此会在后续试验中针对这两种碳氮比条件下的不同葡萄糖浓度进行进一步优化筛选。

2.2.3 不同葡萄糖浓度以及碳氮比对色绿藻生物量浓度的影响



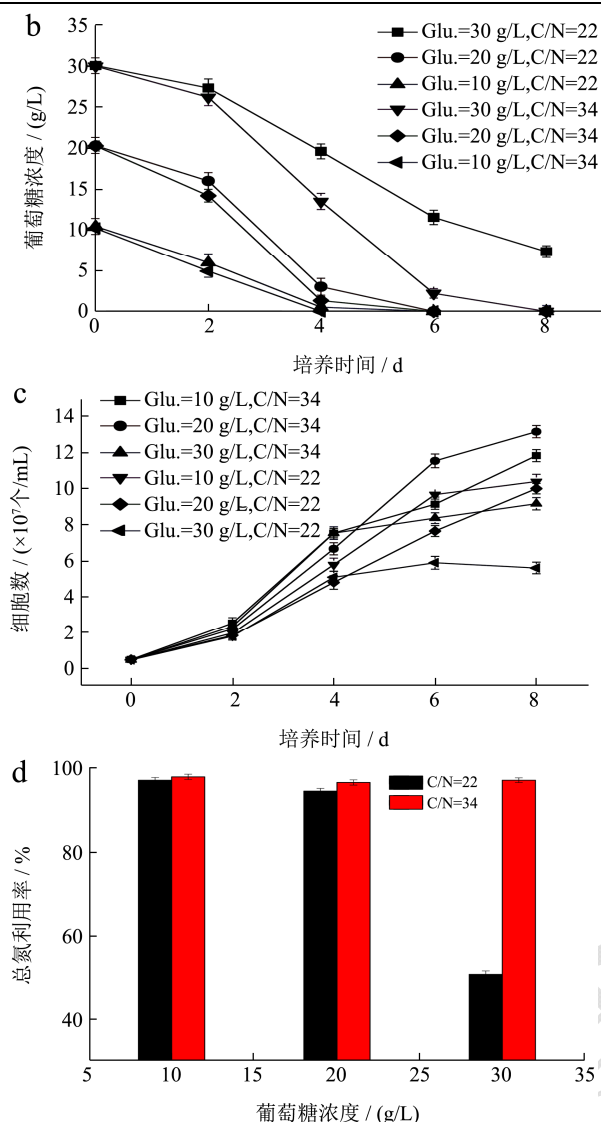


图7 不同葡萄糖浓度和碳氮比条件下色绿藻的生物量(a)、葡萄糖的消耗状况(b)、细胞数的变化曲线(c)及总氮利用率(d)

Fig.7 Biomass concentrations(a), glucose concentrations(b), cell densities (c) and total nitrogen utilization (d) of *C. zofingiensis* in the cultures with different glucose concentrations and C/N ratios

上述低碳氮比试验证明低碳氮比利于生物量浓度的增加,由于后续高密度快速扩种扩大要求,因此要对上步筛选碳氮比进行进一步的优化筛选,以期获得较高的生物量的浓度,同时培养结束时剩余葡萄糖浓度较低。不同葡萄糖浓度以及碳氮比对色绿藻生物量浓度以及葡萄糖消耗的影响如图7所示。在细胞生长延滞期,六组实验条件下的色绿藻对葡萄糖的消耗速率基本一致。进入对数期后,在同一碳氮比的条件下,当碳氮比为34时,初始葡萄糖浓度为30 g/L在第8 d消耗完全;当碳氮比为22时,初始葡萄糖浓度分别为20 g/L和10 g/L,两组的葡萄糖消耗也是在第6 d耗尽,而初始葡萄糖浓度为30 g/L一组在第8 d葡萄糖依然

有剩余(7.34 g/L)。如表5所示,利用SPSS分析数据,六种实验条件下的干重得率无显著性差异,但是当碳氮比34,葡萄糖浓度为30 g/L一组平均比生长速率有显著性差异($p<0.05$)同时获得较高生物量(11.28 g/L),可能由于在此条件下色绿藻对葡萄糖的利用率更高。结合图7a,实验结果表明,在本实验条件下,当碳氮比相同时,色绿藻生物量浓度随着初始葡萄糖浓度的增加而增加且在初始葡萄糖浓度为30 g/L时,生物量浓度达到最大,与Po-Fung Ip等人研究结果类似^[7,15]。

如图7c所示,不同实验条件下的细胞数变化曲线如图所示,生物量浓度最大的两组即是实验条件分别为碳氮比为22,葡萄糖浓度为30 g/L和碳氮比为34,葡萄糖浓度为30 g/L的两组,但其细胞数均是相对较少。培养结束时,实验条件分别为碳氮比为22,葡萄糖浓度为10 g/L和碳氮比为34,葡萄糖浓度为10 g/L的两组处于绿色细胞状态;而实验条件分别为碳氮比为22,葡萄糖浓度为20 g/L和碳氮比为34,葡萄糖浓度为20 g/L组处于黄绿色细胞状态;实验条件分别为碳氮比为22,葡萄糖浓度为30 g/L和碳氮比为34,葡萄糖浓度为30 g/L的两组则是处于红色细胞状态,而培养过程中细胞颜色的变化主要由于次级类胡萝卜素特别是虾青素的合成与积累,这与雨生红球藻培养过程中颜色变化类似^[15-17]。研究报道色绿藻培养过程中红色细胞体积大于绿色状态的细胞,这也可能是在实验条件均为葡萄糖浓度为30 g/L,碳氮比不同的两组虽然细胞数少但生物量浓度却很大的原因之一^[6]。

在不同葡萄糖浓度以及碳氮比的情况下,在培养结束时色绿藻的生物量浓度如图7a所示,在实验条件为碳氮比为34,葡萄糖浓度为30 g/L时,色绿藻生物量浓度最大,可达到11.28 g/L,而Po-Fung Ip等^[15]人研究在混养条件下,葡萄糖浓度为30 g/L时生物量最高达到9.45 g/L。利用SPSS分析,碳氮比为34,葡萄糖浓度为30 g/L一组的生物量显著优于其他各组($p<0.05$),总氮利用率显著优于碳氮比为22,葡萄糖浓度为30 g/L一组($p<0.05$),结果表明,当葡萄糖浓度分别为20 g/L和10 g/L时,在本实验条件下,同一葡萄糖浓度下,不同碳氮比对色绿藻生物量的影响无显著性差异;在葡萄糖浓度为30 g/L时,不同碳氮比对色绿藻生物量的影响有显著性差异($p<0.05$),且葡萄糖浓度为30 g/L、碳氮比为34组条件下的生物量浓度最高为11.28 g/L,此时其总氮利用率为97.37% (如图7d所示),平均比生长速率是碳氮比为22、葡萄糖浓度为30 g/L组的1.2倍、葡萄糖浓度为20 g/L条件下的两组的1.23倍,是葡萄糖浓度为10 g/L条件

下的两组的 1.85 倍。

综上,色绿藻在碳氮比为 34,葡萄糖浓度为 30 g/L 实验条件下生长最优,其生物量浓度达到最大(11.28 g/L),较低碳比优化试验中,生物量浓度提高了 35%,平均比生长速率亦是最大(0.32/d)且此条件下色绿藻能够更好的利用葡萄糖以及氮源。

表 4 不同碳氮比条件下色绿藻的色素产量、产率及虾青素所占总类胡萝卜素的百分比

C/N 值	生物量浓度/(g/L)	色素产量/(mg/L)			虾青素产率/(mg/L/d)	虾青素所占总类胡萝卜素的百分比/%
		叶黄素	角黄素	虾青素		
22	8.08±0.14	7.00±0.14	3.58±0.10	5.72±0.12	0.71±0.02	35.10±0.20
34	8.35±0.20	11.61±0.18	5.02±0.21	7.64±0.18	0.76±0.01	40.53±0.25
42	5.70±0.11	2.70±0.12	2.00±0.13	6.62±0.13	0.83±0.02	58.38±0.21

表 5 不同碳氮比以及不同葡萄糖浓度条件下色绿藻的干重得率及平均比生长速率

实验条件	碳氮比为 22			碳氮比为 34		
	10 g/L	20 g/L	30 g/L	10 g/L	20 g/L	30 g/L
生物量增加量/g	2.90±0.23	5.99±0.28	7.30±0.32	2.70±0.12	6.25±0.14	9.63±0.25
干重得率/(g/g)	0.29±0.02	0.30±0.01	0.32±0.01	0.27±0.02	0.31±0.01	0.32±0.01
平均比生长速率/d	0.18±0.01	0.25±0.02	0.26±0.01	0.18±0.01	0.25±0.02	0.32±0.02

2.2.4 不同葡萄糖浓度以及碳氮比对色绿藻色素积累的影响

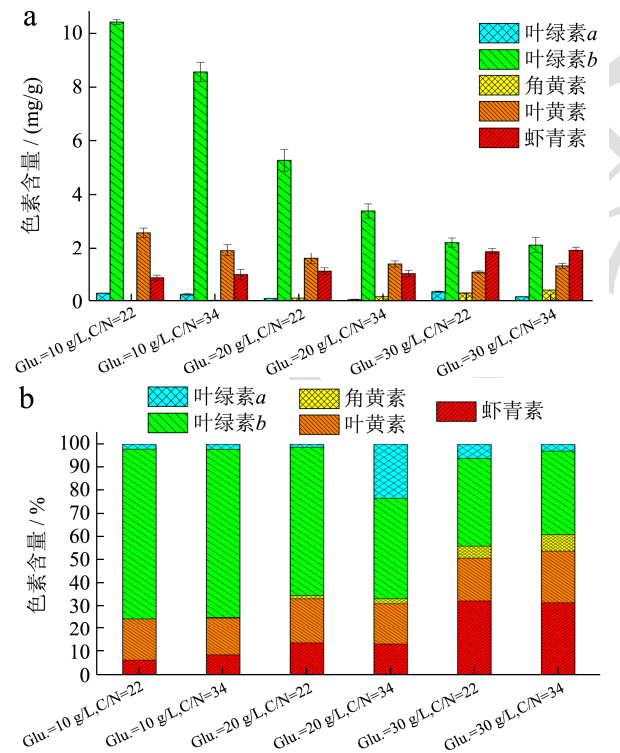


图 8 不同葡萄糖浓度以及碳氮比对色绿藻色素含量 (a) 及色素所占总色素百分比 (b) 的影响

Fig.8 Effects of different C/N ratios on the pigment accumulation(a) and pigment percentage(b) of *C. zofingiensis* in the cultures with different glucose concentrations and C/N ratios

不同葡萄糖浓度以及碳氮比对色绿藻积累虾青素及其他色素的影响如图 8 所示,相同葡萄糖浓度下,碳氮比越高,虾青素含量越高;相同碳氮比条件下,葡萄糖浓度越高,虾青素含量越高且在葡萄糖浓度为 30 g/L 时最大。如表 6 所示,随着葡萄糖浓度的增加,当碳氮比为 22 时,虾青素含量最高达到 1.89 mg/g,产量能达到 16.89 mg/L 产率为 2.11 mg/L/d,其中虾青素占总类胡萝卜素比例的 57.56%;当碳氮比为 34 时,虾青素含量最高达到 1.93 mg/g,产量能达到 21.77 mg/L,产率能达到 2.74 mg/L/d,其中虾青素占总类胡萝卜素比例的 52.71%;同一葡萄糖浓度下,碳氮比越高,虾青素含量越高;实验结果表明在本实验条件下,提高葡萄糖的浓度能够促进色绿藻积累虾青素。与 Po-Fung Ip 等^[7]人研究色绿藻积累虾青素的研究结果类似。结合图 7c,实验结果表明:培养结束后,细胞数越少,而虾青素含量反而越高,这与 Zhang 等^[18]人的研究结果是一致的,其研究表明当细胞开始缓慢裂解时,开始积虾青素。

不同葡萄糖浓度以及碳氮比对色绿藻积累叶黄素、角黄素以及叶绿素的影响如表 6 所示,同一碳氮比条件下,角黄素的含量均是随着葡萄糖浓度的升高而升高,叶黄素的含量变化则随着葡萄糖浓度的升高而降低。叶黄素含量在葡萄糖浓度为 10 g/L 时最大且碳氮比为 22 时,叶黄素最大可达到 2.56 mg/g,此时产量最高可达到 11.40 mg/L,占总色素的 32.39%。而角黄素含量则是最少,最大值为 0.42 mg/g。研究报道

氮是组成叶绿素的基本元素，同时氮含量不足会阻碍细胞内蛋白质的合成，从而使得叶绿素下降^[19]。同一碳氮比条件下，随着葡萄糖浓度增加，氮含量降低，从而致使叶绿素含量下降。

综上，同一碳氮比条件下，虾青素的含量随着葡

萄糖浓度的升高而升高，且当碳氮比为 34，葡萄糖浓度为 30 g/L 时虾青素含量最高为 1.93 mg/g，且生物量浓度最高为 11.28 g/L，虾青素产量亦是最高为 21.77 mg/L。这为后续实现色绿藻的高密快速扩种以及虾青素积累的户外大规格培养实验提供了良好的基础。

表 6 不同葡萄糖浓度和碳氮比条件下的色绿藻色素产量、产率及虾青素所占总类胡萝卜素的百分比

Table 6 Pigment yield, productivity and percentage of astaxanthin in total carotenoids of *C. zofingiensis* in the cultures with different glucose concentration and C/N ratios

实验条件	生物量浓度/(g/L)	色素产量/(mg/L)			虾青素产率 /(mg/L/d)	虾青素所占总类 胡萝卜素的百分比/%	
		叶黄素	角黄素	虾青素			
葡萄糖浓度为 10 g/L	碳氮比为 22	4.40±0.11	11.40±0.18	0.10±0.01	3.87±0.29	0.48±0.09	25.36±0.21
	碳氮比为 34	4.33±0.23	8.35±0.32	0.15±0.01	4.32±0.02	0.54±0.03	33.71±0.16
葡萄糖浓度为 20 g/L	碳氮比为 22	7.60±0.14	12.21±0.21	0.92±0.01	8.56±0.72	1.07±0.10	39.45±0.23
	碳氮比为 34	7.70±0.21	10.73±0.21	1.34±0.01	7.93±0.12	0.13±0.02	39.65±0.22
葡萄糖浓度为 30 g/L	碳氮比为 22	8.95±0.15	9.71±0.15	2.75±0.01	16.89±0.33	2.11±0.12	57.56±0.25
	碳氮比为 34	11.28±0.17	14.90±0.14	4.74±0.11	21.77±0.11	2.74±0.15	52.71±0.26

3 结论

本实验主要研究了混养条件下，不同氮源种类、葡萄糖浓度、碳氮比对色绿藻生物量浓度以及虾青素积累的影响结果。表明混养条件下，硝酸钠为色绿藻生长所需的最优氮源，其次是酵母膏、尿素、胰蛋白胨，而碳酸氢铵不适合作为培养色绿藻的氮源。同时以硝酸钠为氮源，碳氮比为 34，葡萄糖浓度为 30 g/L，是色绿藻生长所需的最优条件，此时色绿藻可获得较高的生物量浓度及虾青素产量，同时能够较好的利用葡萄糖，为后续实验包括高密度快速扩种，诱导实验及室外大规模放大实验奠定基础。

参考文献

[1] 肖素荣,李京东.虾青素的特性及应用前景[J].中国食物与营养,2011,17(5):33-35
XIAO Su-rong, LI Jing-dong. The characteristics and application prospect of astaxanthin [J]. Chinese Food and Nutrition, 2011, 17(5): 33-35

[2] MIAO F, GENG Y, LU D, et al. Stability and changes in astaxanthin ester composition from *Haematococcus pluvialis* during storage [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2013, 31(6): 1181-1189

[3] 汪洪满,徐学明,金征宇.发夫酵母工业化生产虾青素的培养基研究[J].现代食品科技,2012,8:1021-1024
WANG Hong-man, XU Xue-ming, JIN Zheng-yu. Industrialized culture medium of *phaffia rhodozyma* for astaxanthin production [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 8: 1021-1024

[4] 朱明军,宗敏华,吴振强,等.虾青素研究进展[J].食品工业科技,2000,2:79-81
ZHU Ming-jun, ZONG Min-hua, WU Zhen-qiang, et al. The progress on the research of astaxanthin [J]. Science and Technology of Food Industry, 2000, 2: 79-81

[5] LIU J, SUN Z, GERKEN H, et al. *Chlorella zofingiensis* as an alternative microalgal producer of astaxanthin: biology and industrial potential [J]. Marine Drugs, 2014, 12(6): 3487-515

[6] CHEN T, LIU J, GUO B, et al. Light attenuates lipid accumulation while enhancing cell proliferation and starch synthesis in the glucose-fed oleaginous microalga *Chlorella zofingiensis* [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 14936

[7] 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

[8] 魏东,张会贞,陈娇敏.优化营养方式强化蛋白核小球藻生物量及蛋白质和叶绿素生产[J].现代食品科技,2017,4:160-167
WEI Dong, ZHANG Hui-zhen, CHEN Jiao-min. Optimization of trophic modes for enhancing the production of biomass, protein and *Chlorophyll* from *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 4: 160-167

[9] 梁英,李泽邦,刘春强,等.不同磷源对 3 种海洋微藻生长和种间竞争的影响[C].山东海洋湖沼学会 2017 年资料汇编. 2017
LIANG Ying, LI Ze-bang, LIU Chun-qiang, et al. Effects of different phosphorus sources on the growth and interspecific

- competition of three marine microalgae [C]. Shandong Ocean Lake Society 2017 Compilation, 2017
- [10] CHEN J, WEI D, POHNERT G. Rapid estimation of astaxanthin and the carotenoid-to-chlorophyll ratio in the green microalga *Chromochloris zofingiensis* using flow cytometry [J]. Marine Drugs, 2017, 15(7): 231
- [11] 杨勋,郝宗娣,张森,等.营养元素和pH对若夫小球藻生长和油脂积累的影响[J].南方水产科学,2013,9(4):33-38
YANG Xun, HAO Zong-di, ZHANG Sen, et al. Effects of trophic elements and pH on growth rate and lipid productivity of *Chlorella zofingiensis* cells [J]. South China Fisheries Science, 2013, 9(4): 33-38
- [12] QIN L, WANG Z, SHU Q, et al. Medium optimization for *Chlorella zofingiensis* biomass production using central composite design [J]. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, 2016, 38(6): 769-776
- [13] Mulders K J M, Weesepeel Y, Bodenes P, et al. Nitrogen-depleted *Chlorella zofingiensis* produces astaxanthin, ketolutein and their fatty acid esters: a carotenoid metabolism study [J]. Journal of Applied Phycology, 2014, 27(1): 125-40
- [14] 刘学铭,王菊芳,余若黔.不同氮水平下异养小球藻生物量和叶绿素含量的变化(简报)[J].植物生理学报,1999,35(3): 198-201
LIU Xue-ming, WANG Ju-fang, YU Ruo-qian. Study on the changes of chlorophyll content and biomass of heterotrophic *Chlorella vulgaris* under different nitrogen concentrations [J]. Journal of Plant Physiology, 1999, 35(3): 198-201
- [15] IP P-F, WONG K-H, CHEN F. Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture [J]. Process Biochemistry, 2004, 39(11): 1761-1766
- [16] 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
- [17] 江红霞,雷梦云,林雄平,等.光照胁迫对雨生红球藻虾青素积累和抗氧化活性的影响[J].现代食品科技,2015,10
JIANG Hong-xia, LEI Meng-yun, LIN Xiong-ping, et al. Effects of light stress on astaxanthin accumulation and antioxidant activities in *Haematococcus pluvialis* [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 10
- [18] ZHANG Z, HUANG J J, SUN D, et al. Two-step cultivation for production of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* using a patented energy-free rotating floating photobioreactor (RFP) [J]. Bioresour Technol, 2017, 224: 515-522
- [19] 王群,桑敏,李爱芬,等.雨生红球藻培养过程中色素动态变化与光合生理特性研究[J].天然产物研究与开发,2010,22(5):850-854
WANG Qun, SANG Min, LI Ai-fen, et al. The dynamic change of pigments and photosynthetic physiological characteristics of *Haematococcus pluvialis* cultures [J]. Research and Development of Natural Products, 2010, 22(5): 850-854