

不同诱导条件强化佐夫色绿藻积累虾青素

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: 佐夫色绿藻具有多种营养生长方式且可以在诱导条件下合成虾青素, 是一种藻源天然虾青素生产的新型替代微藻。本研究系统探讨了以醋酸钠为碳源时, 醋酸钠浓度、补料方式、pH 以及乙醇对色绿藻积累虾青素的影响, 并在室外 300 L 管道光生物反应器中对上述优化的诱导条件进行放大验证。结果表明: 采用 2.5 g/L 醋酸钠、每 6 d 补加 2.5 g/L 醋酸钠、培养基 pH 控制在 6.5~8.3 和添加 2% 乙醇时, 虾青素的含量最高为 3.71 mg/g, 较优化前的虾青素的含量提高了 31.71%, 产量为 5.37 mg/L。在室外 300 L 管道光生物反应器中, 其最高虾青素含量和产量分别为 3.44 mg/g 和 1.10 mg/L。本研究采用不同诱导条件强化佐夫色绿藻胞内虾青素的积累, 验证了佐夫色绿藻在户外光生物反应器规模诱导培养以生产虾青素的可行性。

关键词: 佐夫色绿藻; 虾青素; 培养优化; 诱导条件; 光生物反应器

文章编号: 1673-9078(2020)08-38-47

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.8.0993

Enhancing Astaxanthin Accumulation in *Chromochloris zofingiensis* under Different Induction Conditions

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

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

Abstract: *Chromochloris zofingiensis* can grow in a variety of vegetative growth modes and synthesize astaxanthin under induction conditions, and thus, is regarded as a promising and new alternative producer for microalgae-derived natural astaxanthin. The present study systematically investigated the effects of sodium acetate concentration, feeding method, pH, and ethanol concentrations on the accumulation of astaxanthin in *C. zofingiensis*, and the optimized conditions were then applied to an outdoor 300 L tubular photobioreactor for large-scale verification. The results demonstrated that when the initial sodium acetate concentration was at 2.5 g/L, sodium acetate at 2.5 g/L was added every 6 days, medium pH was 6.5~8.3 and 2% ethanol was added, the astaxanthin content was the highest (3.71 mg/g), which increased by 31.71% compared to that achieved before optimization, and the corresponding astaxanthin yield of astaxanthin reached up to 5.37 mg/L. In the 300 L tubular photobioreactor, the maximum astaxanthin content and yield were 3.44 mg/g and 1.10 mg/L, respectively. The present work enabled the enhancement on the accumulation of intracellular astaxanthin in *C. zofingiensis* using different induction conditions, and further verified the feasibility of cultivating *C. zofingiensis* in outdoor tubular photobioreactors for astaxanthin production.

Key words: *Chromochloris zofingiensis*; astaxanthin; culture optimization; stress conditions; photobioreactor

引文格式:

姜雪亚, 陈俊辉, 魏东. 不同诱导条件强化佐夫色绿藻积累虾青素[J]. 现代食品科技, 2020, 36(8): 38-47

JIANG Xue-ya, CHEN Jun-hui, WEI Dong. Enhancing astaxanthin accumulation in *Chromochloris zofingiensis* under different induction conditions [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 38-47

虾青素 (Astaxanthin) 是一种脂溶性紫红色的类胡萝卜素, 普遍存在于多种微生物和海洋生物中^[1], 一些甲壳类动物如虾、蟹及鲑科鱼类等呈现的颜色均是由于存在虾青素所致。虾青素具有较强的着色功能以及抗氧化、抗癌等生理活性, 在饲料、食品、营养

收稿日期: 2019-10-16

基金项目: 广东省公益研究与能力建设项目 (2016A010105001)

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

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

品和制药行业具有广泛的应用^[2,3]。目前利用雨生红球藻生产虾青素的含量最高, 并且已经应到了虾青素的工业生产中, 但是过程中细胞密度低、培养时间长、易污染, 此外虾青素的诱导和积累需要极高的光照强度等诱导胁迫条件, 这些问题阻碍了虾青素的进一步商业化应用^[3,4]。

佐夫色绿藻 *Chromochloris zofingiensis* 是一种淡水单细胞绿藻, 外形为圆形, 细胞直径范围 2~15 μm , 通过无性繁殖产生子细胞^[3]。佐夫色绿藻能够利用光

能和二氧化碳进行光合自养,也能够利用多种有机碳源异养生长,同时又能够利用光照与有机碳源混养生长,且在混养条件下,佐夫色绿藻生物量浓度高于光自养和异养条件。佐夫色绿藻被认为是生产虾青素的重要潜在藻种,相对于雨生红球藻,用它生产虾青素最大的优势在于:它能够利用多种营养方式进行快速生长,生物量浓度高,生长周期短,同时在胁迫条件下能够高效积累虾青素等高价值代谢产物,应用于天然虾青素的商业化生产具有重要应用前景。

本研究以佐夫色绿藻作为研究对象,采用醋酸钠作为碳源进行混养培养,主要研究初始醋酸钠浓度、氮源浓度、补料方式、不同维持 pH、诱导剂乙醇添加量等参数对佐夫色绿藻生长以及虾青素积累的影响,之后在室外光生物反应器对优化的诱导条件进行放大验证,进一步评估佐夫色绿藻生产虾青素的潜力,为产业化提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与培养基

佐夫色绿藻 (*Chromochloris zofingiensis*) 购自美国 American Type Culture Collection (ATCC 30412) 菌种保藏中心,采用 Bristol's medium (BM) 培养基进行藻种的保藏和培养^[5]。

1.2 主要仪器与设备

流式细胞仪 Accuri C6 购自美国 BD 公司;液相色谱柱 YMC carotenoid column C30 购自美国 Waters 公司;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;SevenEasy 型 pH 计购自 Mettler Toledo 公司等。

1.3 实验方法

1.3.1 藻种活化与保存

从培养基平板上挑取藻泥,接种至含有 10 g/L 葡萄糖的 BM 培养基的 250 mL 三角瓶中(装液量为 100 mL),在光照为 $10 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、温度为 $26 \text{ }^\circ\text{C}$ 、转速为 150 r/min 的恒温培养箱中连续培养 4~5 d。将活化好的藻种按照 10% 的接种量接至含有相同培养基的 250 mL 三角瓶中,在相同条件下培养 4 d,作为一级种子液以备后用。

1.3.2 二级种子液的快速培养

二级种子液的培养方法如下所述:采用 BM 培养基,初始葡萄糖浓度为 30 g/L,硝酸钠浓度为 2.5 g/L,调节 pH 至 6.50,分装至 250 mL 的三角瓶中(装

液量 100 mL),将培养 4 d 的活化好的种子液接入培养基中进行培养,在光照为 $10 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,温度为 $26 \text{ }^\circ\text{C}$,转速为 150 r/min 的条件下培养至藻细胞生长至对数期末期或稳定期初期,此时培养基内葡萄糖应当刚好消耗完。

1.3.3 初始醋酸钠浓度优化

采用完全无氮的 BM 培养基,醋酸钠作为唯一碳源,设置不同醋酸钠浓度梯度(0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 g/L),接入活化后的对数期二级种子液,在光照 $70 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,温度为 $26 \text{ }^\circ\text{C}$,转速为 150 r/min 的条件下培养 12 d。

1.3.4 补料方式的优化

以无氮的 BM 培养基为基本培养基,2.5 g/L 的醋酸钠作为唯一碳源,设置三种不同的补料方式:对照组、每 3 d 补加 1.25 g/L 的醋酸钠、每 6 d 补加 2.5 g/L 的醋酸钠,其中对照组在培养过程中不进行任何补料操作。其他操作及培养条件下同 1.3.3。

1.3.5 pH 的优化

以无氮的 BM 培养基为基本培养基,初始醋酸钠浓度为初始 2.5 g/L,每 6 d 补加 2.5 g/L 的醋酸钠,设置并调节培养基的初始 pH 值:对照组、6.5、7.5、8.5、9.0,其中对照组的初始 pH 为 6.5 且在培养过程中不进行调控,其他组在培养过程中加入盐酸(或氢氧化钠)进行调节以维持 pH 恒定。其他操作及培养条件下同 1.3.3。

1.3.6 添加乙醇(EtOH)对佐夫色绿藻积累虾青素的影响

以无氮的 BM 培养基为基本培养基,初始醋酸钠浓度为 2.5 g/L,每 6 d 补加 2.5 g/L 的醋酸钠,加入不同浓度的乙醇:0%、1%、2%、3% (V/V),其空白组浓度为 0%。其他操作及培养条件下同 1.3.3。

1.3.7 室外管道光生物反应器中的放大试验



图1 佐夫色绿藻种子液培养以及室外管道光生物反应器示意图

Fig.1 Seed cultures of *C. zofingiensis* and schematic diagram of outdoor tubular photo-bioreactor

佐夫色绿藻的室外管道光生物反应器的实验验证主要分为两步,第一步是快速扩种,第二步是在室外管道光生物反应器中诱导佐夫色绿藻积累虾青素(如图1所示)。而快速扩种的具体实验方法:将250 mL锥形瓶中培养至对数期的100 mL的种子液转接至2 L的锥形瓶中(装液量为1 L),并置于大摇床上进行培养,其他培养条件同上。

在室外管道光生物反应器中进行佐夫色绿藻的混养培养,采用完全无氮的BM培养基,并加入2.5 g/L的醋酸钠,采用臭氧消毒,通空气散气2 h后,加入2%乙醇,并接入佐夫色绿藻的种子液。在佐夫色绿藻的培养过程,每隔6 d补一次2.5 g/L醋酸钠,每天取2次样,早上8:00及下午18:00,每天监测并记录培养过程中pH、温度、溶氧的变化状况。将取得的藻液离心、并用蒸馏水洗涤,收集藻泥并冻干成藻粉用于虾青素的测定。

在室外培养佐夫色绿藻的过程中,采用控温装置,即是喷淋水降温,将温度电极与喷淋水偶联,温度范围设置为24~27℃,当温度超过或者低于此温度范围时,控温装置会开启或者关闭喷淋水。而培养过程中的pH采用pH控制装置,即是pH电极与二氧化碳钢瓶偶联,当培养基中的pH值超过设定范围6.5~8.0时,系统会调节进行二氧化碳的通入或关闭,从而维持pH在设定范围内。培养过程中的溶氧的调节控制则是由调节变频器控制,从而实现增大或降低溶氧的控制。

1.4 分析测试

1.4.1 生物量浓度

生物量浓度采取干重法进行测定。吸取2 mL藻液,置于事先称重的2 mL离心管中,在3800 g的离心力下离心3 min并用蒸馏水进行洗涤多次,然后将离心得到的藻泥,置于60℃恒温干燥箱中烘干至恒重,准确称量后计算得到生物量。

1.4.2 比生长速率

比生长速率采用生物量干重法计算,比生长速率 μ (d^{-1})的计算公式为:

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1)$$

式中 X_2 、 X_1 分别为 t_2 、 t_1 时间测定的生物量干重(g/L)。

1.4.3 细胞密度

细胞密度采用流式细胞仪测定,取2 mL佐夫色绿藻的藻液于离心管中,离心、超纯水洗涤,稀释后进行测定。

1.4.4 OD_{480} 值

OD_{480} 值的测定采用分光光度法测定:吸取3 mL

藻液于于比色皿中,测定在波长为480 nm下的光密度值。

1.4.5 细胞内色素含量

离心收集的藻泥冷冻后置于冷冻干燥机冻干成藻粉,准确称量10 mg藻粉于装有陶瓷珠的振荡管中,加入1 mL甲醇/二氯甲烷的提取液(体积比为3:1,含有0.1%的2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚)。振荡30 s后,迅速置于液氮中冷却,离心收集上清液,如此反复操作直至藻细胞变成无色,合并收集的所有上清液并在通风橱中利用氮气吹干,然后用甲醇/MTBE混合溶剂(1:1, V/V)进行定容,最后过滤并转移至棕色瓶中保存,用于高效液相分析,以上操作均需避光和避免高温。

色素的液相测定如下:采用YMC C30类胡萝卜素色谱柱和PDA检测器,柱温为30℃,进样量为20 μ L,流速为0.8 mL/min,流动相分别为甲醇(A)及MTBE(B)。具体洗脱条件如下:0~2 min, 90%~80% A、10%~20% B; 2~6 min, 80%~60% A、20%~40% B; 6~18 min, 60%~50% A、40%~50% B; 18~21 min, 50%~90% A、50%~10% B; 21~24 min, 90% A、10% B。检测波长为480 nm、645 nm和665 nm,并在300~800 nm下进行全波长扫描以测定光谱。称取色素标准品虾青素、叶黄素、角黄素、叶绿素b、叶绿素a并分别制成一系列不同浓度梯度的标准溶液,按照上述同样的方法进行测定,建立各色素标准品相应的外标法标准曲线,从而通过标准曲线对样品中色素含量进行分析测定。

1.4.6 数据分析

采用Microcal Origin 9.0和SPSS统计分析软件进行数据的统计分析。

2 结果与讨论

2.1 初始醋酸钠浓度优化

本实验主要针对初始醋酸钠浓度对佐夫色绿藻细胞生长和色素积累情况进行研究,结果如图2和3所示。由图2a可知,当初始醋酸钠浓度在0~2.50 g/L时,佐夫色绿藻生物量浓度随着醋酸钠浓度的升高呈现逐渐升高的趋势,当初始醋酸钠浓度为2.50 g/L时,生物量浓度达到最高为2.15 g/L,相较于未添加醋酸钠的组,生物量浓度提高了48.30%,此时最大比生长速率为0.07 d^{-1} 。由图2b可知,色绿藻细胞在不同醋酸钠浓度培养过程中,细胞密度基本保持稳定,它与细胞生物量并非呈现正相关性。本实验培养起始时的细胞密度较高,基本在 1.2×10^7 cfu/mL以上,随着培养

的进行,藻细胞密度无法细胞增加,而生物量则不断增加,推测其原因是:在醋酸钠作为碳源时,色绿藻细胞生物量的增加,更多的是由于细胞内含物增多,细胞体积变大,进而导致最终的生物量增加。

总之,以上研究表明:醋酸钠的加入促进了佐夫色绿藻的生长,且当初始醋酸钠浓度为 2.50 g/L 时,达到最佳的生物量浓度。Orosa 等人研究也发现,在混养条件下外源醋酸钠的加入能够促进雨生红球藻细胞的生长^[6],这与实验结果基本相似。而当醋酸钠高于 2.50 g/L,佐夫色绿藻生物量浓度略微降低,藻细胞生长受到抑制。以上研究结果表明,藻细胞对于醋酸钠等碳源有一定的耐受范围,最适宜藻细胞生长的初始醋酸钠浓度范围为 2.50 g/L。庄惠如等人研究指出,低浓度的醋酸钠有利于雨生红球藻的生长,高浓度的醋酸钠则抑制其细胞生长,并对细胞产生毒害作用^[7],与本研究结果基本类似。

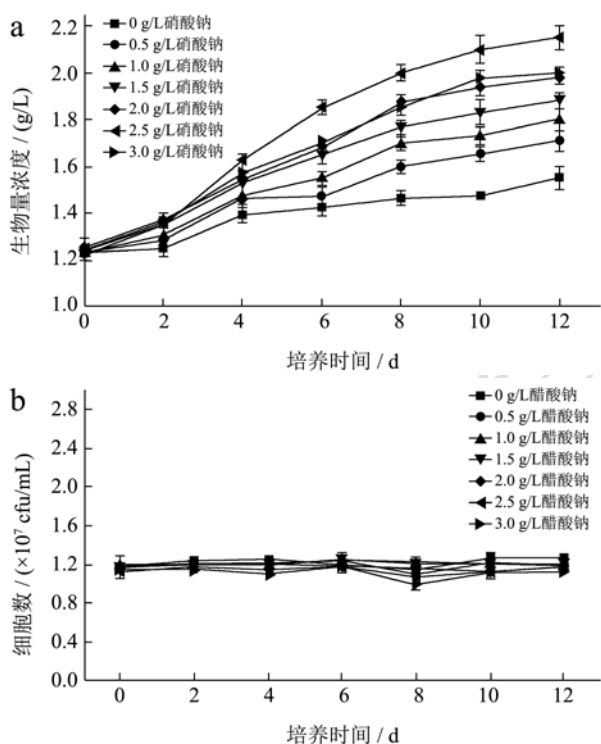


图2 初始醋酸钠浓度对于佐夫色绿藻生物量浓度 (a) 及细胞数 (b) 的影响

Fig.2 Effects of initial sodium acetate concentrations on biomass (a) and cell numbers (b) of *C. zofingiensis*

初始醋酸钠浓度对于佐夫色绿藻胞内色素积累情况的影响,如图3所示。叶绿素 a 和叶绿素 b 随着醋酸钠浓度的增加,基本呈现不断下降的趋势,这可能是由于碳氮比增加产生的胁迫条件导致的。叶黄素变化随醋酸钠浓度变化有一定波动,但是变化基本比较稳定。角黄素和虾青素的含量,则随着初始醋酸钠浓度的升高而呈现先增加后降低的趋势,当醋酸钠浓度

超过 1.5 g/L 时,虾青素含量对对照组相比增均有不同程度的显著增加 ($p < 0.05$)。当所添加的醋酸钠增加至 2.50 g/L 时,虾青素的含量最高达到 1.89 mg/g,较未加醋酸钠的自养培养组而言,其虾青素含量提高了 51.20%,增加比较显著 ($p < 0.05$)。在该实验组条件下,虾青素产量最高可以达到 4.07 mg/L。这主要是由于外源的醋酸钠通过转运蛋白进入细胞膜,然后通过辅酶 A 的缩合反应形成乙酰辅酶 A^[8],进而促进 TCA 循环、乙醛酸循环和戊糖磷酸途径中的代谢物通量率增加,而这些代谢途径提供的碳骨架和 NAD(P)H 对于虾青素的合成具有重要的促进作用^[9]。而当醋酸钠浓度超过 2.5 g/L 时,细胞的生物量以及虾青素含量则开始降低,这是由于醋酸钠等有机碳浓度过高时,会显著削弱藻细胞的光合作用,从而对细胞生长和色素合成都抑制作用^[9,10]。

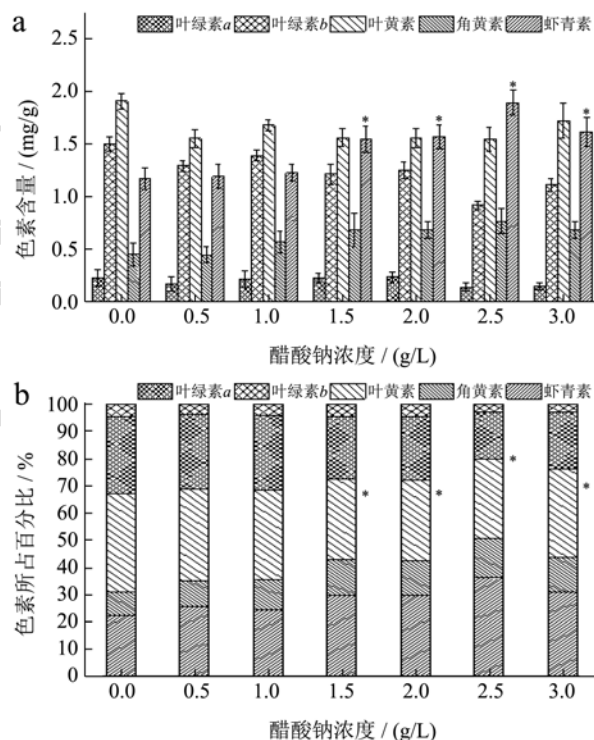


图3 不同初始醋酸钠浓度对佐夫色绿藻的色素含量 (a) 及各色素所占总色素百分比 (b) 的影响

Fig.3 Effects of different initial sodium acetate concentrations on contents (a) and percentages (b) of different pigments in *C. zofingiensis*

注: *表示与对照组相比有显著差异 ($p < 0.05$)。

在色素百分比组成方面,随着醋酸钠浓度的不断增加,叶绿素 a 和 b 的比例基本都在不断降低,达到 30% (占总色素) 以下;而角黄素和虾青素的比例则在不断增加,在醋酸钠浓度为 2.5 g/L 时,分别能达到 5% 和 45% 以上,是细胞内的主要色素组成部分。虽然在醋酸钠诱导条件下,藻细胞内最终诱导积累的虾青

素含量和百分例含量还处于较低水平,但本研究证实了醋酸钠对色绿藻细胞内虾青素积累量有促进作用,

并且最适的起始添加量为 2.5 g/L,这为本项目后续研究提供了重要基础。

表 1 不同醋酸钠浓度对佐夫色绿藻的生物量浓度、虾青素产量、产率及虾青素所占总类胡萝卜素的百分比的影响

Table 1 Effects of different initial sodium acetate concentrations on biomass, yield and productivity of astaxanthin and the percentage of astaxanthin in total carotenoids of *C. zofingiensis*

醋酸钠浓度/(g/L)	生物量浓度/(g/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的百分比/%
0.0	1.45±0.06	1.81±0.06	0.10±0.00	33.05±0.10
0.5	1.75±0.05*	2.08±0.03*	0.12±0.01*	37.35±0.10*
1.0	1.80±0.01*	2.21±0.05*	0.12±0.02*	35.32±0.11*
1.5	1.78±0.10*	2.94±0.08*	0.16±0.01*	40.77±0.09*
2.0	1.98±0.02*	3.14±0.09*	0.17±0.02*	41.29±0.05*
2.5	2.15±0.01*	4.07±0.11*	0.27±0.03*	45.06±0.12*
3.0	2.00±0.08*	2.85±0.07*	0.16±0.01*	40.31±0.15*

注:实验组与对照组的显著性差异,采用t检验分析成对数据的显著性,用*标注显著性($p<0.05$)。

为了进一步分析不同醋酸钠浓度对色绿藻细胞生物量和虾青素积累量的影响,本研究将上述相关指标参数进行对比,结果如表 1 所示。由表中可知,醋酸钠的添加对于藻细胞生物量和虾青素积累量等都具有显著促进作用,并且基本是随着醋酸钠浓度的增加而呈现不断增加的趋势。当醋酸钠添加量为 2.5 g/L 时,生物量增加值为 0.7 g/L,生物量对醋酸钠的得率为 0.28,这与葡萄糖的生物量得率 0.30 基本相近,说明醋酸钠的利用率较高。同时,虾青素产量和产率分别增加 2.26 mg/L 和 0.17 mg/L/d,虾青素百分比含量也增加 12.01%,增加均比较显著($p<0.05$)。

综上,初始醋酸钠浓度为 2.5 g/L 是佐夫色绿藻生长和虾青素积累的最适浓度,此时虾青素含量达到最大为 1.89 mg/g,生物量浓度为 2.15 g/L,最有利于佐夫色绿藻积累虾青素。本研究结果为微藻室外规模化培养过程中的碳源选择提供了重要的基础。

2.2 补料方式优化

不同醋酸钠的补料方式对佐夫色绿藻生物量和细胞密度的影响结果如图 4 所示。由图可知,同对照组相比,两种补加醋酸钠的实验组获得的生物量浓度均显著增高($p<0.05$)。其中,每 3 d 补加 1.25 g/L 醋酸钠的实验组,获得的最大生物量浓度为 3.55 g/L,同对照相比增加 8.06%。而每 6 d 补加 2.5 g/L 醋酸钠的实验组获得的生物量浓度,在第 12 d 达到最高值 3.82 g/L,相较于对照组而言增加了 15.91%,增加显著($p<0.05$),这说明流加醋酸钠有助于色绿藻细胞生物量的增加。在细胞密度变化方面,采用不同的对照和流加培养条件,色绿藻细胞的密度变化均在 2.75×10^7 cfu/mL,这三组数据之间没有显著性差异,分析其原因可能是由于色绿藻培养处于高光和营养缺乏的胁迫

条件,这不利于色绿藻细胞的生长。综上,采用每 6 d 补加 2.5 g/L 醋酸钠的补料方式,最有利于佐夫色绿藻培养。

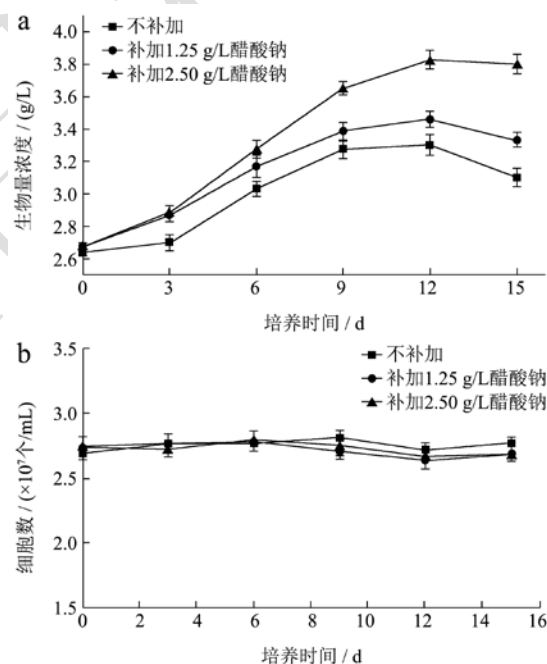


图 4 补料方式对佐夫色绿藻生物量浓度(a)及细胞数(b)的影响

Fig.4 Effects of different substrates feeding strategies on biomass concentrations (a) and cell number (b) of *C. zofingiensis*

不同醋酸钠的补料方式对佐夫色绿藻胞内色素含量和色素百分比组成的的影响,如图 5 所示。由图中可知,在不同培养条件下,色绿藻胞内色素组分主要是由叶绿素 a 和 b、叶黄素、角黄素和虾青素组成的。其中,角黄素和虾青素是藻细胞内的次级类胡萝卜素,在添加醋酸钠的条件下,这两种色素在藻细胞内的含量是呈现增加趋势。在每 3 d 补加 1.25 g/L 醋酸钠的

实验组中,获得的虾青素含量为 2.07 mg/g,同对照组相比增加并不显著。而每 6 d 补加 2.5 g/L 醋酸钠的实验组中,虾青素含量达到最高值,为 2.35 mg/g,相对于对照组而言增加了 37.42%,增加比较显著 ($p<0.05$)。由色素百分比组分分析可知,在补加醋酸钠的条件下,色绿藻胞内的叶绿素和叶黄素的百分比在降低,而虾青素和角黄素的比例在不断增加。其中,在每 6 d 补加 2.5 g/L 醋酸钠的实验组中,虾青素百分比含量达到最大值,占总色素的 45.94%,是色绿藻胞内最主要的色素组成部分。

为了进一步分析不同醋酸钠补料方式对于色绿藻细胞生物量和虾青素产量的影响,本实验将相关数据整理如表 2 所示。由图中可知,在流加醋酸钠的条件下,色绿藻细胞的生物量、虾青素产量和产率均有显著的增加 ($p<0.05$)。尤其是当补加 2.5 g/L 醋酸钠时,最大生物量浓度、虾青素产量和产率均为最大值,相对于对照组而言,分别增加了 22.58%、68.49% 和 72.73%。由此可知,外源醋酸钠的补加,可以被色绿藻细胞吸收利用,从而转化为生物量和色素含量,最终能够显著提高佐夫色绿藻细胞内虾青素产量和产率。有研究表明,外源醋酸钠的加入会提高藻细胞内硝酸还原酶的活性,从而使得藻细胞消耗氮的能力增强,进而导致细胞内的氮源的缺乏加剧,由此导致的胁迫条件则会进一步促进藻细胞内虾青素的高效合成^[11,12]。这一研究结果,与本实验研究现象基本一致。综上,按照每 6 d 补加 2.5 g/L 醋酸钠的补料培养方式,最适于佐夫色绿藻细胞的生长和虾青素的积累,尤其

表 2 不同补料方式条件下生物量浓度、虾青素产量、产率及虾青素所占总类胡萝卜素的百分比

Table 2 Biomass concentration, yield, productivity and percentage of astaxanthin in total carotenoids of *C.zofingiensis* in the cultures with different substrates feeding strategies

补加浓度/(g/L)	生物量浓度/(g/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的百分比/%
0.00	3.10 ± 0.06	5.30 ± 0.36	0.22 ± 0.01	42.69 ± 1.20
1.25	3.35 ± 0.05*	7.19 ± 0.27*	0.29 ± 0.01*	43.16 ± 1.13
2.50	3.80 ± 0.06*	8.93 ± 0.23*	0.38 ± 0.02*	45.94 ± 0.18*

注:实验组与对照组的显著性差异,采用 t 检验分析成对数据的显著性,用*标注显著性 ($p<0.05$)。

2.3 pH 调控方式优化

pH 是影响微藻细胞生长和产物形成的最重要参数之一,在很大程度上会影响到微藻的光合作用以及培养基中有机酸盐及硫酸盐等的降解和吸收等。本研究针对培养过程中不同的 pH 值控制水平对细胞生物量和色素积累量的影响效果,结果如图 6 和 7 所示。

由图 6 可知,当 pH 维持在 6.5 或 7.5 时,色绿藻的生物量浓度及细胞数并无显著性变化;而当培养基的 pH 维持在 8.5 时,生物量浓度降低为 2.10 g/L,细

是生物量浓度、最大比生长速率、虾青素含量以及产量均达到最大值,分别为 3.82 g/L、0.11 d⁻¹、2.35 mg/g 和 8.93 mg/L。

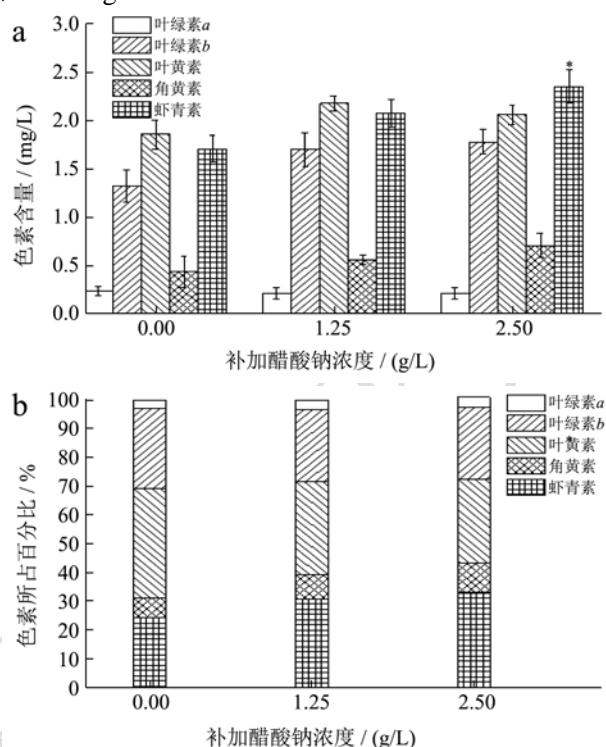


图 5 不同补料方式下佐夫色绿藻色素含量 (a) 及各色素所占总色素百分比 (b)

Fig.5 The pigment accumulation (a) and pigment percentage (b) of *C. zofingiensis* in the cultures with different substrates feeding strategies

注: *表示与对照组相比有显著差异 ($p<0.05$)。

胞数也减少为 2.49×10^7 cfu/mL,变化较为显著 ($p<0.05$)。而当培养基的 pH 的继续提高并维持在 9.0 时,其生物量浓度和细胞数进一步降低分别为 1.78 g/L 和 2.12×10^7 cfu/mL。这表明只有当培养基中 pH 维持在 6.5~7.5 水平时,最适宜色绿藻细胞的生长,过高的 pH 值会抑制细胞生长和细胞数的增加。有研究表明,当培养基的 pH 为 7.0~8.5 时,微藻细胞可以维持较高的生长速率,获得较大的生物量浓度;而当培养基的 pH 为 9.5 时,细胞的生物量浓度显著降低^[13],这说明 pH 值对于微藻细胞生长影响很大,过

酸或者过碱都不利于微藻细胞的生长，这与本实验的研究结果基本一致。

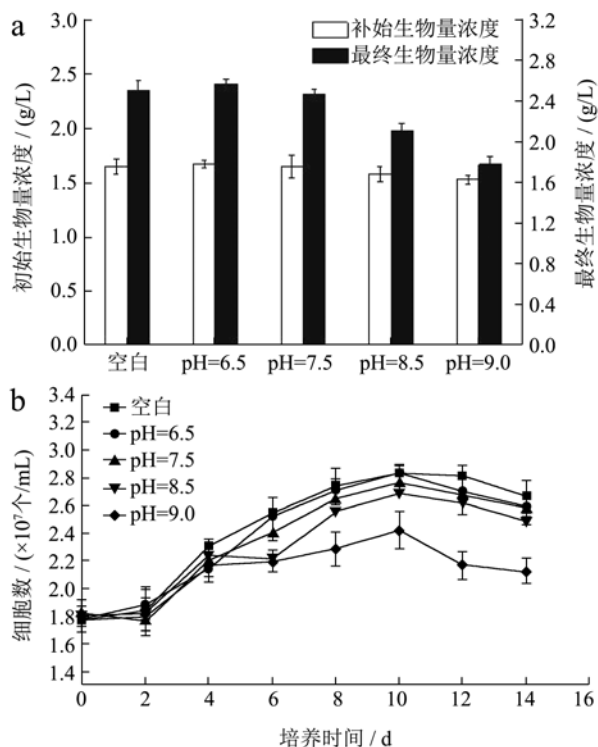


图6 不同恒定 pH 对佐夫色绿藻生物量浓度 (a) 及细胞数 (b) 的影响

Fig.6 Effect of different invariable pH values on biomass concentrations (a) and cell number (b) of *C. zofingiensis*

不同 pH 调控方式对佐夫色绿藻胞内色素含量和百分比组成的影响如图 7 所示。当培养基的 pH 维持在 6.5~7.5 时，细胞积累虾青素的含量无显著差异，而当细胞长期处于 pH 为 8.5 或者 9.0 时，虾青素含量显著降低 ($p < 0.05$)。这与文献报道中的佐夫色绿藻生长的耐受范围为 5.5~8.5 的结论基本相一致^[3]。在

表 3 不同恒定 pH 值下佐夫色绿藻的生物量浓度、虾青素产量、产率及虾青素所占总类胡萝卜素的百分比

Table 3 Biomass concentration, yield, productivity and percentage of astaxanthin in total carotenoids of *C. zofingiensis* in the cultures with different invariable pH values

实验条件	生物量浓度/(g/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的百分比/%
空白	2.50±0.10	8.63±0.51	0.43±0.03	60.64±0.68
pH=6.5	2.57±0.04	8.91±0.67	0.45±0.03	61.22±0.24
pH=7.5	2.47±0.05	7.01±0.71	0.35±0.04	63.08±1.41
pH=8.5	2.10±0.08*	6.43±0.54*	0.32±0.03*	58.22±0.27*
pH=9.0	1.78±0.08*	5.48±0.08*	0.27±0.01*	58.36±0.37*

注：实验组与对照组的显著性差异，采用 t 检验分析成对数据的显著性，用*标注显著性 ($p < 0.05$)。

由表 3 可知，当 pH 范围为 6.5~7.5 时，其最大的虾青素的含量和产量分别为 3.47 mg/g 和 8.91 mg/L，占总类胡萝卜素的 63.08%；而当 pH 持续维持在 8.5 以上进行细胞培养时，会造成细胞生物量浓度和虾青素含量显著降低 ($p < 0.05$)，其虾青素产量最高为 6.43

色素组分变化方面，随着调控 pH 值的不断增加，叶绿藻细胞内的虾青素百分比含量在不断降低，而叶绿素的含量则呈现出增加的趋势，但是不同 pH 调控值对于叶黄素组分影响不大，其占总色素含量基本保持在 22%~24% 之间。

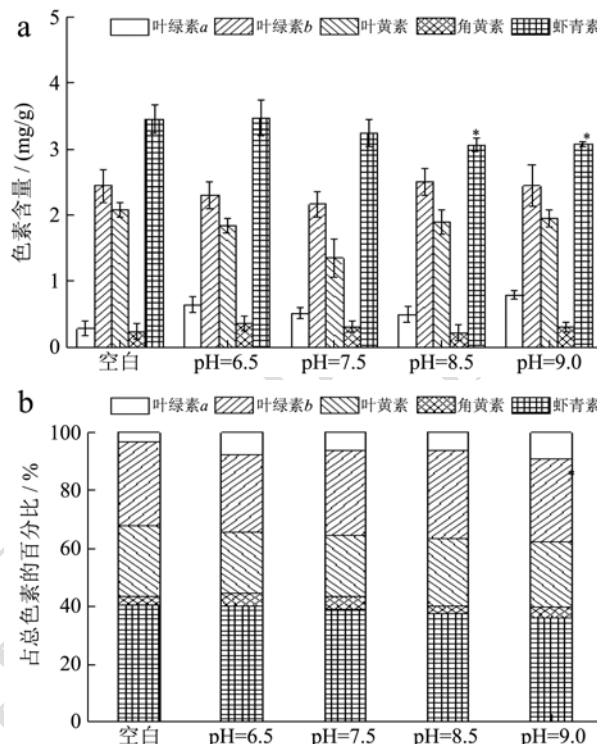


图7 不同恒定 pH 值下佐夫色绿藻色素含量 (a) 及各色素所占总色素百分比 (b)

Fig.7 The pigment accumulation (a) and pigment percentage (b) of *C. zofingiensis* in the cultures with different invariable pH values

注：*表示与对照组相比有显著差异 ($p < 0.05$)。

mg/L，约占总类胡萝卜素含量 58.36%。而侯冬梅等人研究指出，在自养条件下，当培养基 pH 在 6.0~8.0 时，雨生红球藻细胞的生物量浓度均达到最大，这说明该范围内的 pH 对藻细胞的生长也无显著影响；而在 pH 范围为 7.0~8.0 时，细胞内虾青素的含量最高，

但是对于胞内虾青素的积累影响并不明显^[14]。以上结论与本研究的结论基本类似。综上，将 pH 范围控制在 6.5~7.5 之内时，对于色绿藻细胞生长和虾青素的积累无显著性影响；而当藻细胞处于 pH 为 8.5 及以上时，不利于细胞生长以及虾青素等积累。

2.4 乙醇添加量对佐夫色绿藻积累虾青素的影响

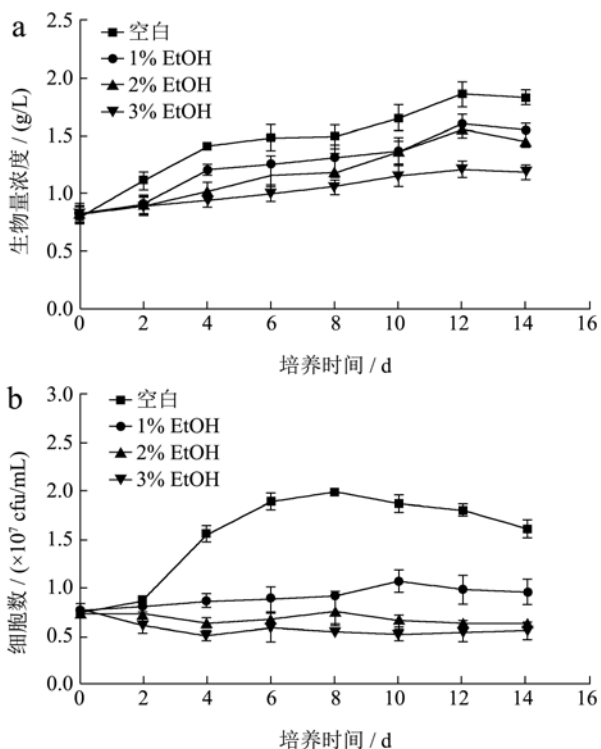


图 8 不同乙醇浓度下对佐夫色绿藻生物量浓度 (a) 及细胞数 (b) 的影响

Fig.8 Effects of ethanol on biomass concentrations (a) and cell number (b) of *C. zofingiensis*

不同乙醇添加浓度对于佐夫色绿藻细胞的生长影响如图 8 所示。如图可知，以不加乙醇的培养作为对照组，当培养基中加入 1%~3% 的乙醇后，藻细胞数增长明显减缓，生物量浓度及细胞数显著低于空白组 ($p < 0.05$)。推测可能是因为乙醇也是一种氧化胁迫条件，可以通过乙醇脱氢酶刺激线粒体复合物 I 和 III 产生 ROS，ROS 是细胞代谢的正常副产物，然而过量的 ROS 会造成细胞的氧化损伤，从而影响细胞的生长，造成生物量浓度的降低。当乙醇浓度为 1%~3% 时，乙醇的加入会显著抑制佐夫色绿藻的生长，且随着加入的乙醇含量增加，生物量浓度会显著降低 ($p < 0.05$)。即当加入乙醇浓度分别为 1%、2% 和 3% 时，相较于对照组，细胞的生物量浓度分别下降了 15.30%、20.76% 和 35.52%。刘春利等人研究指

出，在红发夫酵母异养条件积累虾青素时，加入相对较高的乙醇 (超过 1~2 g/L) 时，会对细胞生长产生抑制^[15]，这与本研究结果基本类似。

不同乙醇添加量对于佐夫色绿藻胞内虾青素积累的影响如图 9 所示。当加入乙醇的浓度为 0~2% 时，虾青素的含量随着乙醇浓度的增大而增加。在乙醇浓度为 2% 时，虾青素含量和产量达到最大值，分别为 3.71 mg/g 和 5.37 mg/L，相较于对照组，虾青素含量提高了 31.71%，此时占总色素的百分比进一步提高到了 46.87%，占总的类胡萝卜素的含量的 64.86%。而当乙醇浓度为 3% 时，细胞内虾青素的含量开始下降为 1.32 mg/g，相较于对照组，虾青素含量减少了 114%，并且藻细胞胞内的其他色素组分含量也显著降低 ($p < 0.05$)。

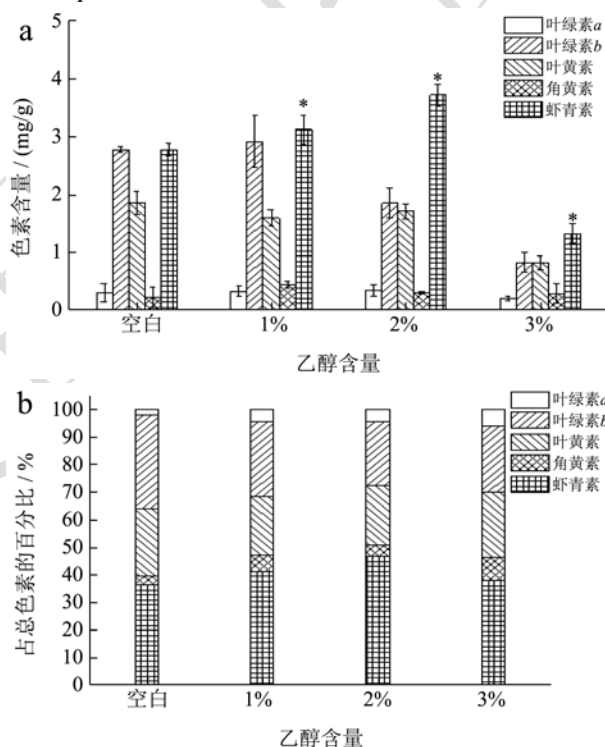


图 9 不同乙醇浓度下佐夫色绿藻色素含量 (a) 及各色素所占总色素百分比 (b)

Fig.9 The pigment accumulation (a) and pigment percentage (b) of *C. zofingiensis* in the cultures with different ethanol concentrations.

注：*表示与对照组相比有显著差异 ($p < 0.05$)。

由表 4 可知，不同乙醇添加量对于色绿藻细胞生长和虾青素积累量有不同程度的影响。当添加 2% 的乙醇时，虽然会抑制藻细胞的生长，但是有助于虾青素含量的增加，因此最终获得的虾青素产量和产率较对比组要高，达到 5.37 mg/L 和 0.27 mg/L/d。此时，获得的藻细胞中虾青素占总类胡萝卜素的含量达到最大值，为 64.86%，同对照组相比有显著增加

($p < 0.05$)。这说明,对于色绿藻细胞生长而言,当乙醇浓度不超过 2%时,有利于细胞虾青素积累,当加入乙醇浓度超过 2%时,会对佐夫色绿藻的生长以及虾青素的积累产生抑制。前期有研究报道指出,采用乙醇诱导红发夫酵母积累虾青素时,当加入 1~2 g/L 乙醇时,最有利于酵母细胞内的虾青素的积累

[15],而继续增加乙醇浓度则会抑制虾青素积累;而在雨生红球藻培养时,乙醇含量在 0~3%时,虾青素含量随着乙醇浓度的升高则增加[16]。结合本研究结果推测,不同微生物因其细胞生长和代谢特性的差异,对于乙醇诱导浓度具有不同的代谢响应,进而导致细胞生长和虾青素积累的差异性。

表 4 不同乙醇浓度下佐夫色绿藻的生物量浓度、虾青素产量、产率及虾青素所占总类胡萝卜素的百分比的变化情况

Table 4 Changes of biomass, astaxanthin yield and productivity, and the percentage of astaxanthin in total carotenoids of *C. zofingiensis* in the cultures with different ethanol concentrations

乙醇添加量	生物量浓度/(g/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的百分比/%
0%	1.83±0.11	5.06±0.27	0.25±0.01	56.99±0.46
1%	1.55±0.04*	4.82±0.29	0.24±0.01	60.53±0.17*
2%	1.45±0.06*	5.37±0.12	0.27±0.01	64.86±0.11*
3%	1.18±0.04*	1.56±0.32*	0.07±0.02*	54.33±0.04*

注:实验组与对照组的显著性差异,采用 t 检验分析成对数据的显著性,用*标注显著性 ($p < 0.05$)。

2.5 室外光生物反应器的培养验证

采用室外光生物反应器中进行佐夫色绿藻的室外诱导培养中的温度、pH、溶氧、OD 以及细胞数的变化如图 10 所示。如图 10a 所示,由于当地的气候变化,昼夜温差较大,白天温度大部分在 22~28 °C,而夜晚温度较低基本维持在 8~16 °C。在 0~144 h,培养基的 pH 基本维持稳定在 6.70~7.13,而在 144 h 时由于补加了醋酸钠,从而使得培养基的 pH 值上升。而溶氧呈现波动性变化,白天随着光照强度的增加,光合作用较强,溶氧逐渐升高;夜晚光合作用较弱,从而使得溶氧较低。由图 10b 和 10c 可知,在培养的前 36 h,由于细胞处于延滞期,细胞生长缓慢,在 36 h~156 h, OD 值和细胞数都开始增长。究其原因,一方面是细胞开始适应室外的环境变化,另一方面白天的温度在 28 °C 左右,较有利于细胞的培养,这与文献中报道的佐夫色绿藻的最适生长温度为 20~30 °C 以及虾青素的最适积累温度为 25~30 °C 的结论基本吻合[3]。培养到第 156 h 时,色绿细胞数和 OD 值达到最大分别为 3.55×10^6 cfu/mL 和 0.75,随后培养到 168 h 时可能由于外界环境的变化和营养物质的消耗,细胞数开始停止增长并基本保持稳定。

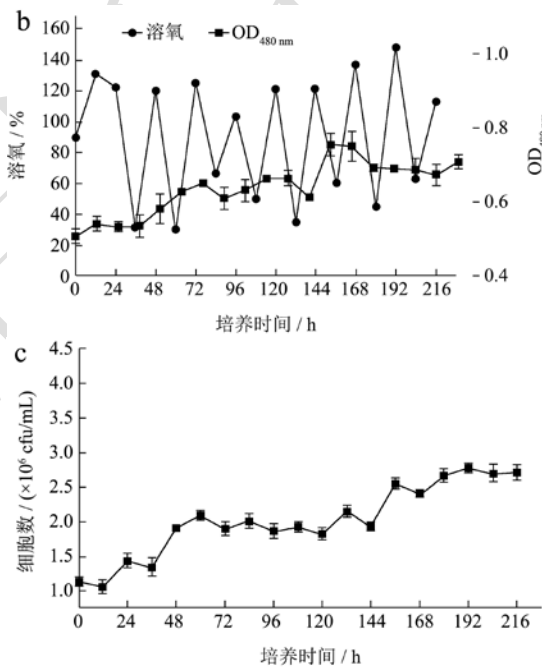
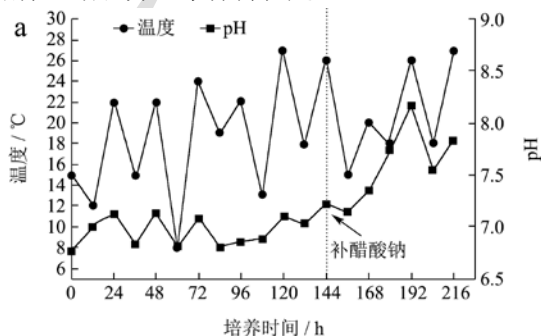


图 10 室外培养过程中温度、pH、溶氧、OD、藻细胞数随着时间的变化曲线

Fig.10 Time courses for the temperature, pH, dissolved oxygen and the cell number of *C. zofingiensis* during the outdoor cultivation

色绿藻在室外光生物反应器培养过程中的参数指标随培养时间的变化如图 11 所示。在培养 0~120 h,色绿藻细胞积累虾青素的速度较快,在第 120 h 虾青素含量最大为 3.44 mg/g,产量为 1.10 mg/L,约占总的类胡萝卜素的 60%。而培养到 168 h 后,色绿藻胞内的虾青素含量开始急剧下降,推测可能由于培养基中营养物质被消耗后导致 pH 较高及外界环境变化等造成了虾青素含量开始下降。整个培养过程中,由于色绿藻处于高光缺氮的诱导胁迫条件下,细胞的生长

基本受到抑制,因此生物量浓度增长缓慢,最高达到0.33 g/L,这也是培养过程中虾青素产量较低的主要原因。

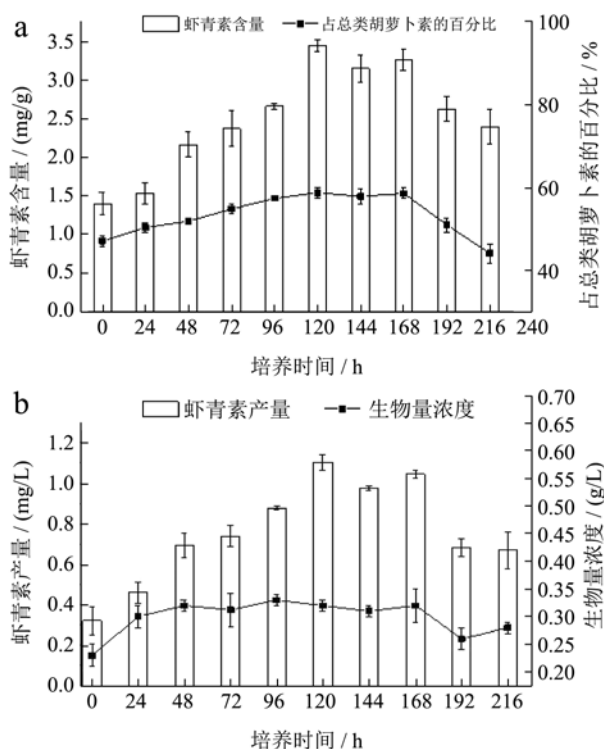


图 11 室外培养过程中的色绿藻生物量、虾青素含量、产量及其色素百分比随着培养时间的变化曲线

Fig.11 Time courses for the biomass concentration, content, productivity and percentage of astaxanthin in total carotenoids of *C. zofingiensis* during the outdoor cultivation

综上,本研究采用室外管道光生物反应器实现了佐夫色绿藻胞内虾青素的有效积累,但是由于室外培养的成本较高,并受光强以及温度等外界条件波动的影响较大。虽然由于生物量浓度水平较低,获得的虾青素产量仅为 1.10 mg/L,远低于现有的生产水平,但本研究获得的虾青素含量较高,达到 3.71 mg/g。本研究推测虾青素含量增加,一方面是由于营养物质缺乏的诱导胁迫引起的,另一方面则是由于本实验采用室外管道式光生物反应器,相对于无光异养的发酵罐培养而言^[17],它在高光强诱导方面具有较好的效果。这说明了本研究采用室外光生物反应器在诱导佐夫色绿藻积累虾青素方面有着重要的优势。后续研究将重点针对佐夫色绿藻胞内虾青素积累量进行研究,从而有望进一步提高其生产效率,为色绿藻规模化培养积累虾青素提供重要基础。

3 结论

本研究以醋酸钠作为碳源进行佐夫色绿藻培

养,当初初始醋酸钠浓度为 2.5 g/L,添加 2%乙醇作为诱导胁迫条件,同时采取每隔 6 d 补加一次 2.5 g/L 醋酸钠进行流加培养,并维持 pH 值在 6.5~8.3 可以最高的虾青素含量,达到 3.71 mg/g,相对于优化前,虾青素含量提高了 31.71%。此外,在室外管道光生物反应器中对上述摇瓶的最优条件进行放大验证,采用自然光照射诱导培养,最终可以获得藻细胞内虾青素含量和产量分别为 3.44 mg/g 和 1.10 mg/L。本研究初步探索了适宜佐夫色绿藻胞内虾青素积累的摇瓶和管道生物反应器培养方式,为后续高产虾青素的微藻规模化培养技术奠定了基础。

参考文献

- [1] Ambati Ranga Rao, Phang Siew Moi, Ravi Sarada, et al. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - a review [J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(1): 128-152
- [2] Fraser Paul D, Bramley Peter M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids [J]. *Progress in Lipid Research*, 2004, 43(3): 228-265
- [3] Liu Jin, Sun Zheng, Gerken Henri, et al. *Chlorella zofingiensis* as an alternative microalgal producer of astaxanthin: Biology and industrial potential [J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(6): 3487-3515
- [4] F Bregas Jaime, Otero Ana, Maseda Ana, et al. Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 89(1): 65-71
- [5] Ip Po-Fung, Chen Feng. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(2): 733-738
- [6] Orosa M, Franqueira D, Cid A, et al. Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth [J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23(5): 373-378
- [7] 庄惠如,陈必链.雨生红球藻混合营养与异养培养研究[J]. *微生物学通报*,2000,27(3):198-201
- [8] ZHUANG Hui-ru, CHEN Bi-lian. Mixotrophic and heterotrophic growth of *Haematococcus pluvialis* [J]. *Microbiology China*, 2000, 27(3): 198-201
- [9] Zhang Chunhui, Zhang Litao, Liu Jianguo. Exogenous sodium acetate enhances astaxanthin accumulation and photoprotection in *Haematococcus pluvialis* at the non-motile stage [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018

(下转第 339 页)