

小球藻异养培养的研究进展

闫海, 张宾, 王素琴, 李雅雯, 刘硕, 杨帅

(北京科技大学应用科学学院生物科学与技术系, 北京 100083)

摘要: 单细胞绿藻在水产养殖、环境保护、人类健康食品和重要生命活性物质生产等众多领域的研究与应用得到不断扩展, 而如何高效培养出超高细胞浓度小球藻来满足各个应用领域的需要是我国亟待解决的藻类生物技术关键课题。主要针对小球藻的异养培养和重要生命活性物质的生产等方面的国内外最新研究进展进行了综述, 并对重要的研究领域进行了展望。

关键词: 小球藻; 异养培养; 生命活性物质

中图分类号: Q914.82

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2007)04-0018-04

Advances in the heterotrophic culture of *Chlorella sp*

YAN Hai, ZHANG Bin, WANG Su-qin, LI Ya-wen, LIU Shuo, YANG Shuai

(Department of Biological Science and Technology, School of Applied Science, Beijing University of Science and Technology, Beijing 100083, China)

Abstract: The research and application of unicellular green microalgae in many fields of aquaculture, protection of environment, human health food and the production of biological active substances have been increased rapidly, however how to culture *Chlorella sp* with very high cell density to meet the need of every application field is a key project in the field of microalgal biotechnology. Here the research advances in the effective heterotrophic culture of *Chlorella sp* and the production of biological active substances are reviewed, and some promising research fields in *Chlorella sp* are prospected.

Key words: *Chlorella sp*; heterotrophic culture; biological active substances

作为最简单的光合作用有机体, 微藻有时又被称为单细胞藻类。微藻中的小球藻是一种具有重要经济价值的生物资源, 有着巨大的应用和开发潜力。小球藻富含蛋白质、不饱和脂肪酸、类胡萝卜素、叶黄素、虾青素和多种维生素, 具有极高的营养价值和提高免疫力的功能。另外小球藻还含有一种非常重要的成分——小球藻生长因子, 它既具有诱发干扰素、激发人体防御和免疫组织中的巨噬细胞、T细胞和B细胞的功能, 又具有促进人体对环境污染有害物质解毒和排泄的作用^[1]。微藻属于低等植物, 主要吸收二氧化碳通过光合作用合成有机物, 但采用此种方法培养出的藻细胞浓度一般较低。进入20世纪70年代以来, 国外学者发现, 有些小球藻可以在无光照条件下生长于有机物中^[2-3], 这不仅大幅度提高了小球藻的生长速度, 而且获得了很大的藻生物量, 从而引起了单细胞藻类培养的一次重要革命。当前, 美国、日本、以色列等国家和我国台湾地区等已成为小球藻的主要生产地, 而我国大陆尚未发现有超高细胞浓度小球藻异养培养产业化生产的报道。

1 小球藻的培养

1.1 自养培养

1890年荷兰微生物学家 Beijerinck 等首先在琼脂平板上成功分离得到了小球藻的纯培养物。Otto Warburg 于1919年将这一纯培养物在实验室进行纯培养, 作为研究植物生理学的材料, 研究发现, 小球藻可以进行光合作用, 从而为小球藻的自养培养研究拉开了序幕。小球藻的自养培养既可利用自然光, 也可利用人工光照, 培养基主要由无机化合物组成, 最适 pH 为 6.5~7.5, 最适光照强度为 36~90 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 温度为 20~30℃。于贞等^[4]的研究结果表明, pH 是影响小球藻生长的重要因素, 光照强度和通气量通过影响小球藻光合作用强度而调节小球藻的生长。小球藻可以利用铵盐、硝酸盐和尿素作为氮源, 添加适量的含有痕量有机酸和微量元素的土壤浸出液有利于小球藻的生长。

1.2 异养培养

异养培养与自养培养最大的区别是前者利用有机物作为碳源和能源, 对小球藻异养培养的研究较

收稿日期: 2007-01-15; 修回日期: 2007-03-02

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(8063029), 北京市教委共建项目和北京科技大学创新基金联合资助项目

作者简介: 闫海(1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向为藻类生物学、微生物环境生物学, 010-62333177, haiyan@sas.ustb.edu.cn。

自养培养起步晚。1953年, Lewin等^[5]首先发现了一些藻类能利用有机物作为唯一碳源和能源进行异养生长, 目前对微藻异养生长机理的研究还处于初级阶段。Gladue等针对有些微藻不能进行异养生长这一现象推测有3种假说: ①缺乏利用有机物的酶类, 如一些微藻缺乏利用某些有机物的酶。②通透性障碍。有机物必须通过细胞膜进入细胞内部才能被藻类利用, 然而有些藻类缺乏吸收有机物的机制, 为了克服这一问题, 必须选取合适的有机物。③限制性的呼吸能力。藻类通过呼吸作用分解自身储存的物质, 获得能量, 维持细胞的存活。然而, 有些藻类在异养条件下呼吸所产生的能量不足以维持生长及运输外界环境中的有机物。Endo等检测了小球藻利用包括糖、有机酸和醇类等60多种有机碳源的能力, 结果表明, 只有葡萄糖、半乳糖、乙酸、乙醇、乙醛、丙酮酸可分别作为唯一碳源支持小球藻的生长, 其中葡萄糖、半乳糖和醋酸盐可在无光照条件下支持蛋白核小球藻的快速生长。目前, 小球藻异养培养中应用最广泛的培养基是Basal改良培养基^[6]和K2N培养基^[7]。

近年来, 对于小球藻的异养培养研究受到了众多学者的重视, 特别是高细胞浓度培养技术得到了较深入和广泛的探索, 取得了一系列重要的研究进展^[1,8-9]。异养培养小球藻可以克服光自养培养的诸多缺陷, 是提高小球藻产量与产率的有效途径。笔者所在课题组于2004年从天然水体中成功筛选出了能够异养生长的小球藻种^[1], 发现当小球藻接种量较低时, 无论是自养培养还是异养培养, 生长都

非常缓慢, 延迟期达到3d以上。当增大初始藻生物量时, 在黑暗条件下, 小球藻生长迅速进入对数期, 培养第2d就达到了最大生物量。在高的初始藻生物量培养条件下, 无光照异养培养小球藻的生长速度远高于光照培养, 因此黑暗异养培养超高细胞浓度小球藻显示出了非常大的优势和潜力。

Shi等^[10]研究了不同葡萄糖浓度对小球藻生长的影响, 研究表明, 当初始葡萄糖质量浓度在10~80g/L时, 所得小球藻细胞浓度随葡萄糖含量的升高而增大, 最大细胞干质量浓度可达31.2g/L。但当初始葡萄糖质量浓度达到100g/L时, 小球藻的延迟期相对较长, 生长受到抑制。Sasaki等^[11]在小球藻与细菌混合培养的污水处理体系中研究了葡萄糖浓度对小球藻生长规律的影响, 发现当葡萄糖浓度较低时, 藻细胞浓度也低, 相对高的葡萄糖起始质量浓度(如50g/L)可用于培养高细胞浓度的小球藻。王素琴等^[12]的研究结果表明, 当初始葡萄糖质量浓度大于17.3g/L时, 会抑制小球藻的生长, 因此推测在用发酵罐发酵培养小球藻的过程中, 应该依据小球藻的生长状况和葡萄糖的利用情况进行葡萄糖的流加控制, 这样可避免高葡萄糖浓度对小球藻生长的抑制。刘世名等报道, 流加分批培养小球藻时, 补料液中最适碳氮比为41.2。张丽君等^[13]认为, 在以葡萄糖和硝酸钾分别作为小球藻生长的碳源和氮源时, 碳氮比维持在4~5是一种比较优化的控制条件。王素琴等^[12]采用葡萄糖和硝酸钾对小球藻进行异养培养的结果表明, 初始碳氮比为25:1时最好。导致最佳碳氮比差异的原因既可能与实验

(上接第17页)

- [21] Meyer W R, Pulcinelli S H, Santilli C V, *et al.* Formation of colloidal of hydrous iron oxide by forced hydrolysis[J]. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2000, 273:41-47.
- [22] Deliyanni E A, Bakoyannakis D N, Zouboulis A I, *et al.* Akaganeite-type β -FeO(OH) nanocrystals: Preparation and characterization[J]. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2001, 42:49-57.
- [23] Itoh H, Sugimoto T. Systematic control of size, shape, structure, and magnetic properties of uniform magnetite and maghemite particles[J]. *Stud Surf Sci Catal*, 2001, 132:251.
- [24] Wang Xiong, Chen Xiangying, Gao Lisheng, *et al.* Synthesis of β -FeOOH and α -Fe₂O₃ nanorods and electrochemical properties of β -FeOOH[J]. *J Mater Chem*, 2004, 14:905-907.
- [25] Berry F J, Helgason O, Bohorquez A, *et al.* Preparation and characterization of tin-doped α -FeOOH (goethite) [J]. *J Mater Chem*, 2000, 10:1643-1648.
- [26] Ishikawa T, Kondo Y, Yasukawa A, *et al.* Formation of magnetite in the

presence of ferric oxyhydroxides[J]. *Corrosion Science*, 1998, 40(7):1239-1251.

- [27] Lee D K, Lang Y S. Preparation and characterization of magnetic nanoparticles by γ -irradiation[J]. *Materials Science and Engineering*, 2004, C24:107-111.
- [28] Xiong Yujie, Xie Yi, Li Zhengquan, *et al.* Complexing-reagent assisted synthesis of α -Fe and γ -Fe₂O₃ nanowires under mild conditions[J]. *New J Chem*, 2003, 27:588-590.
- [29] Uhm Y R, Kim W W, Rhee C K. A study of synthesis and phase transition of nanofibrous Fe₂O₃ derived from hydrolysis of Fe nanopowders [J]. *Scripta Materialia*, 2004, 50:561-564.
- [30] Xiong Yujie, Xie Yi, Chen Shaowei, *et al.* Fabrication of self-supported patterns of aligned β -FeOOH nanowires by a low-temperature solution reaction[J]. *Chem Eur J*, 2003, 9:4991-4996.
- [31] Deki S, Aoi Y, Okibe J, *et al.* Preparation and characterization of iron oxyhydroxide and iron oxide thin films by liquid-phase deposition[J]. *J Mater Chem*, 1997, 7(9):1769-1772. ■

的藻种类不同有关,也可能由于所采用的碳、氮化合物种类不同所致。一般来说,碳占藻干质量的 49%~70%,而氮占藻干质量的 1%~11%,碳氮比应该在 5 以上。因为在异养培养条件下,大约有 50% 的葡萄糖会转化为二氧化碳,也就是说只有 50% 左右的葡萄糖能够被藻类利用,因此在异养培养小球藻过程中碳氮比应该在 10 以上。又因为小球藻可以在一定限度内进行缺氮生长,因此培养基中的碳氮比可能更高为好。在批量培养条件下,一般获得的小球藻细胞干质量浓度都在 10 g/L 以下,而笔者筛选培养的小球藻细胞干质量浓度却可以高达 26 g/L^[1],说明不同种类的小球藻的异养生长能力存在较大差异。

由于批量培养不能进行碳、氮源的补料和 pH 的控制,存在培养初期营养物质浓度高而抑制藻类生长,而培养后期营养物质缺乏限制藻类生长的缺点。采用发酵培养方式可以根据藻类的生长状况进行流加补料,因此可以培养出高细胞浓度的藻类。Shi 等^[6]利用 Basal 改良培养基在 30 L 发酵罐中培养原核小球藻(*Chlorella protothecoides* CS-41),最大细胞干质量浓度达到 16.4 g/L。Shi 等^[10]用 K2N 培养基培养 *Chlorella sorokiniana*,细胞干质量浓度可达 9 g/L。Liang 等^[14]应用流加工工艺在 5、50、200、800、4 000 L 机械搅拌发酵罐中大规模异养培养小球藻,最高细胞干质量浓度达到 43.31 g/L,比生长速率达到 0.069/h,细胞生产率达到 0.62 g/(L·h)。Ogbonna 等^[15]研究了异养、自养相结合培养小球藻的方式,最终获得的细胞干质量浓度为 14 g/L。桂林等^[16]以大米糖化醪为碳源在发酵罐中培养蛋白核小球藻,最高细胞干质量浓度达到了 18.3 g/L。笔者最近进行的在 50 L 发酵罐中异养培养小球藻的结果显示,通过流加碳、氮源,并对 pH 进行控制,可以在 2 d 内获得藻细胞干质量浓度高达 40 g/L 以上的产量。上述研究结果表明,利用传统的机械搅拌发酵罐大规模异养培养小球藻效率高,具有良好的产业化应用前景。

2 小球藻中的生命活性物质

2.1 细胞色素

小球藻细胞中叶绿素 a 的含量(质量分数,下同)为 1.97%~2.04%,叶绿素 b 的含量为 0.55%~0.58%,胡萝卜素的含量为 0.0441%~0.0448%^[17-19]。Shi 等^[10]研究了不同葡萄糖浓度对叶黄素产量的影响,结果表明,细胞中的叶黄素含

量随葡萄糖浓度的升高而增加。当初始葡萄糖质量浓度从 10 g/L 提高到 40 g/L 时,叶黄素质量浓度也从 19.39 mg/L 上升到 75.65 mg/L。王素琴等^[12]的研究结果表明,异养培养出的小球藻细胞中含有叶黄素,在不同培养方式下小球藻细胞中的叶黄素含量会发生明显变化,变化范围为 0.5~1.5 mg/g,主要由碳氮比来控制。桂林等^[19]发现, V(甲醇):V(二氯甲烷)=2:1 的混合溶剂是从藻细胞中提取叶黄素的较好试剂,提取率达到了 87.1%。

2.2 不饱和脂肪酸

目前,利用微藻生产多不饱和脂肪酸(PUFAs)如二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA),是藻类生物技术的一个研究热点。PUFAs 具有降血脂、抑制血小板聚集、降血压和抗动脉粥样硬化等多方面的保健和药用价值^[20-21]。小球藻油脂中 EPA 质量分数高达 90% 以上^[20]。我国台湾研究人员对海水微细小球藻在不同盐度、pH 情况下产 EPA 能力进行了研究,使小球藻培养物中的 EPA 含量达 90.4 mg/g,显示出海水微细小球藻具有良好的产 EPA 能力^[22]。为了进一步提高普通小球藻产 EPA 的能力,可以采用细胞融合技术获得一种杂交小球藻,它能更有效地生物合成 EPA^[23]。林学政等^[24]研究发现,普通小球藻细胞中的 DHA 含量也很高,可达 28%。Chen 等^[7]报道,在小球藻的异养培养中,PUFAs 的产量与氮源添加量有关,如果控制氮源供给,可以避免藻体生物量增长过快,使 PUFAs 累积量相对提高。因此通过控制小球藻的培养条件,可以提高 PUFAs 的产量。

2.3 生长因子

小球藻生长因子(*Chlorella Growth Factor*, CGF)也叫小球藻精,它的主要成分是以短链多肽蛋白与珍贵的天然核酸复合形式存在,含有 17 种游离氨基酸,其中有 8 种人体必需但只能通过外源补充的氨基酸^[25]。此外,还含有核酸、多糖、多肽、蛋白质、酶、维生素、矿物质等成分,被称为“类荷尔蒙”^[26],具有增强人体免疫能力、活化人体细胞、促进儿童生长发育、抵抗外来疾病的入侵、促进人体受伤组织的修复等功能。人服用小球藻后可以增加人体抵抗有机污染物和重金属的能力,同时还可以防治胃溃疡、高血压和心血管疾病等。胡开辉等^[27]的研究结果表明,小球藻细胞活性物质可显著促进酵母发酵和增强酵母抵抗杂菌的能力。研究发现,从小球藻中提取的 2 种相对分子质量分别为 120 000 和 70 000 的糖蛋白均具有抗肿瘤活性^[28]。此外,小球藻多糖

和糖蛋白对肝癌、白血病等恶性肿瘤也显示了抗肿瘤活性。前苏联、日本等国均有将小球藻水溶性提取物添加到护肤品和口红等化妆品中的专利^[29]。目前,小球藻生长因子的提取技术及其生理活性的研究已成为英国、美国、日本等国家研究开发的热点。

3 研究展望

目前,关于细菌和动物细胞基因的研究较多,而关于微细藻类方面的分子生物学研究尚不多见,因此采用分子生物学和基因工程的最新研究成果,从分子水平上研究自养和异养小球藻之间的基因差异,无论对于基础研究还是应用研究都具有重要的意义,这将成为未来藻类生物技术研究的热点之一。其次通过基因操作技术控制小球藻的代谢途径,增加小球藻生产某种重要生命活性物质如叶黄素等的量,在基础研究和应用研究方面也具有非常重要的意义。另外,异养小球藻是目前植物界生长速度最快的种类,以小球藻作为一种重要的出发藻种,通过转基因技术将能够产生重要生命活性物质的基因转入小球藻,通过培养小球藻来完成重要生命活性物质的生产,这在解决一些药用植物生长缓慢问题方面具有重要的应用价值。随着科技的进步,异养小球藻的研究与应用会越来越多,通过研究与开发,必将使藻类生物技术得到大力发展,使之更好地造福于人类。

参考文献

- [1] 闫海,周洁,何宏胜,等.小球藻的筛选和异养培养[J].北京科技大学学报,2005,27(4):408-412.
- [2] Thinh L V, Griffiths D J. Amino-acid composition of autotrophic and heterotrophic cultures of emerson strain of *Chlorella*[J]. Plant and Cell Physiology, 1976, 17(1):193-196.
- [3] Endo H, Hosoya H, Koibuchi T. Growth yields of *Chlorella regularis* in dark-heterotrophic continuous cultures using acetate[J]. Journal of Fermentation Technology, 1977, 55(4):369-379.
- [4] 于贞,王长海.小球藻培养条件的研究[J].烟台大学学报:自然科学与工程版,2005(3):206-211.
- [5] Lewin J C. Heterotrophy in diatoms[J]. Gen Microbiol, 1953, 9:305-313.
- [6] Shi X M, Chen F, Chen H. Heterotrophic production of lutein by selected *Chlorella* strains[J]. J Appl Phycol, 1997, 9:445-450.
- [7] Chen F, Jonhs M R. Effect of C/N ratio and aeration on fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana* [J]. J Appl Phycol, 1991, 3:203-209.
- [8] Ogbonna J C, Tomiyama S, Tanaka H. Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* for efficient production of α -tocopherol[J]. J Appl Phycol, 1998, 10:67-74.
- [9] 刘世名,孟海华,梁世中,等.生物反应器高密度异养培养小球藻[J].华南理工大学学报:自然科学版,2000,28(2):81-86.
- [10] Shi X M, Liu H J, Chen F. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures[J]. Process Biochemistry, 1999, 34(4):341-347.
- [11] Sasaki K, Watanabe K, Tanaka T, et al. 5-ainolevulinic acid production by *Chlorella* sp. during heterotrophic cultivation in the dark world[J]. Microbiol Biotechnol, 1995, 11:361-362.
- [12] 王素琴,闫海,张宾,等.不同氮源形态和植物激素对小球藻 USTB01 生长及叶黄素含量的效应[J].科技导报,2005(12):37-40.
- [13] 张丽君,杨汝德,肖恒.小球藻的异养生长和培养条件优化[J].广西植物,2001,21(4):353-357.
- [14] Liang Shizhong, Zhang Mingjun, Meng Haihua. Heterotrophic mass cultures of *Chlorella vulgaris* with glucose feeding in fermenters[J]. Journal of South China University of Technology: Natural Science Edition, 2000, 28(12):66-69.
- [15] Ogbonna J C, Masui H, Tanaka H. Sequential heterotrophic/autotrophic cultivation- an efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed[J]. Journal of Applied Phycology, 1997, 9(4):359-366.
- [16] 桂林,史贤明,李琳,等.蛋白核小球藻不同培养方式的比较[J].河南工业大学学报:自然科学版,2005,26(5):52-55.
- [17] Shi X M, Lui H J, Zhang X W. Heterotrophic production of biomass and lutein *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27:312-318.
- [18] Gouveia L, Veloso V, Fernandes A. Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*[J]. Bioresource Technology, 1996, 57:157-163.
- [19] 桂林,李琳,胡松青,等.蛋白核小球藻中叶黄素提取工艺的研究[J].食品研究与开发,2005,26(5):71-74.
- [20] Kyle D, Bingham S, Radmer R, et al. Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids: Prospects for introduction into horticultural food plants [J]. Hortscience, 1990, 25:1523-1526.
- [21] Gill I, Valivety R. Polyunsaturated fatty acids: Part I. Occurrence, biological activities and application[J]. Trends in Biotech, 1997, 15:401-409.
- [22] 王大志,彭兴跃,程兆第,等.海水小球藻脂肪酸组成研究[J].海洋科学,1999(4):68-70.
- [23] 罗明典.微生物生产多价不饱和脂肪酸[J].精细与专用化学品,2003(18):12-14.
- [24] 林学政,李光友.11种微藻脂类和 EPA/DHA 组成的研究[J].黄渤海海洋,2000,18(2):36-40.
- [25] 李师翁,李虎乾.植物单细胞蛋白资源:小球藻开发利用研究的现状[J].生物技术,1997,7(3):45-48.
- [26] Higashiyama T, Maki S, Yamada T. Molecular organization of *Chlorella vulgaris* chromosome[J]. Mol Gen Genet, 1995, 246(1):29-36.
- [27] 胡开辉,周山勇.小球藻细胞活性物质的提取及对啤酒酵母的生理效应[J].应用生态学报,2005,16(8):1173-1176.
- [28] 陈颖,李文彬,孙勇如.小球藻生物技术研究应用现状及展望[J].生物工程进展,1998,18(6):12-16.
- [29] 张建民,刘新宁.可利用微藻的种类及其应用前景[J].资源开发与市场,2005,21(1):65-66. ■