

# 碳氮比和光强对小球藻合成虾青素的影响

孙 妮<sup>1</sup> 向文洲<sup>1</sup> 何 慧<sup>1</sup> 陈 峰<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国科学院南海海洋研究所 广州 510301)

(2. 香港大学植物学系 中国香港)

**摘 要:** 本文研究了碳氮比和光强对小球藻 *Chlorella zofingiensis* 合成虾青素的影响。结果表明, 随着碳氮比的增加, 虾青素含量提高, 但是过高的碳氮比限制藻细胞的生长。当碳氮比为 133 时, 虾青素的产量最大, 达到 9.19 mg/L。高光诱导在高碳氮比基础上进一步提高虾青素的含量及产量。200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  光强在没有严重影响小球藻生长的同时, 明显提高虾青素含量, 最大虾青素产量达到 12.52 mg/L。文章对不同诱导条件下虾青素的合成机理以及利用异养自养相结合的方法提高虾青素产量的可能性进行了讨论。

**关键词:** 虾青素, 小球藻, 碳氮比, 光诱导

## Effects of C/N Ratio and Light Intensity on the Production of Astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*

SUN Ni<sup>1</sup> XIANG Wen-Zhou<sup>1</sup> HE Hui<sup>1</sup> CHEN Feng<sup>1,2\*</sup>

(1. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510301)

(2. Department of Botany, the University of Hong Kong, Hong Kong)

**Abstract:** The effect of C/N ratio and light intensity on the astaxanthin accumulation of *Chlorella zofingiensis* was studied in this research. C/N ratio showed obvious effect on the astaxanthin accumulation. Astaxanthin content rapidly increased with the enhancement of C/N ratio, while the alga growth was inhibited, the biomass was far lower than the control. The maximum astaxanthin yield of 9.19 mg/L was obtained at a C/N ratio of 133. High light could farther enhance astaxanthin content and yield. A light intensity of 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  could induce maximum astaxanthin yield to 12.52 mg/L without serious inhibition in the biomass. Besides, the mechanisms of different induction were discussed, and the method combined heterotrophic and phototrophic culture was proposed to enhance astaxanthin production by *C. zofingiensis*.

**Keywords:** Astaxanthin, *Chlorella zofingiensis*, C/N ratio, Light induction

虾青素(astaxanthin), 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- $\beta$ -类胡萝卜素是一种紫红色酮式类胡萝卜素, 传统上主要用做水产养殖中鲑鱼和鳟鱼等的饲料添加剂, 具有着色和提高免疫力的功能<sup>[1]</sup>。近年来的研究表

明, 虾青素具有超强的抗氧化功能以及抗肿瘤和增强免疫力的作用, 从而受到国内外养殖业、食品、医药、化妆品等研究领域的重视<sup>[2, 3]</sup>。

人们对天然产品的需求促进了对生物合成虾青

素的研究和开发。虾青素的生物合成来源只有有限的几种微生物<sup>[4]</sup>, 雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)和红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)是研究最多也是仅有的两种商业化生产虾青素的微生物。然而雨生红球藻生长慢和红发夫酵母虾青素含量低的缺点限制了虾青素的产量, 导致天然虾青素价格昂贵, 供不应求, 寻找快速生长并高效积累虾青素的生物新资源成为解决天然虾青素来源不足的途径之一<sup>[5, 6]</sup>。

高密度异养微藻因为不受光的限制, 生物量和细胞浓度高, 生产成本和采收成本低的优势, 近年来受到众多学者的重视。异养培养小球藻已被用于多不饱和脂肪酸(PUFAs)和叶黄素(Lutein)等类胡萝卜素的生<sup>[7, 8]</sup>。小球藻(*Chlorella zofingiensis*)属淡水绿藻, 一方面和雨生红球藻一样, 自养条件下能在高光和氮缺乏的逆境中合成虾青素<sup>[9]</sup>。另一方面, 最新研究发现小球藻能够通过异养发酵合成虾青素<sup>[10, 11]</sup>, 这一特性同红发夫酵母极为相似<sup>[12]</sup>。虽然小球藻的虾青素含量远远低于雨生红球藻, 但是高光诱导下虾青素含量比红发夫酵母高出数倍<sup>[13]</sup>。因此, 异养小球藻*C. zofingiensis*被认为是一种极有潜力的大规模生产虾青素的方法。本研究就不同碳氮比对异养小球藻生产虾青素的影响进行研究, 并在此基础上采用异养-混养(高光诱导)两步法, 研究培养后期不同强度的光诱导对发酵条件下的小球藻虾青素合成的影响, 期望通过综合诱导因素获得更高的虾青素产量。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 藻种: 小球藻, *Chlorella zofingiensis* (ATCC 30412), 由香港大学植物系陈峰教授提供。

1.1.2 培养基: 无碳基础培养基参照文献[8]中改良的Bristol's培养基(CZ-M1), 其中 $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 浓度提高到 0.15 g/L。斜面培养基使用含有 12 g/L琼脂、1 g/L的葡萄糖的基础培养基。液体种子培养基使用含有 10 g/L葡萄糖的基础培养基。

### 1.2 实验方法

1.2.1 藻细胞的准备: 将保存于 4℃ 的斜面种子接一环到 10 mL 种子培养基中, 25℃、130 r/min、 $20 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  光照下摇瓶培养。以 10% 接种量、

同样的培养条件继续扩增种子。以培养 4 d 的 3 代藻细胞为实验用种子。碳氮比影响的实验中, 将培养基中的葡萄糖浓度调整到 20 g/L 或 40 g/L, 硝酸钠的浓度分别为 5 mmol/L、10 mmol/L 或 20 mmol/L。取 10 mL 种子接入装有 90 mL 培养基的 250 mL 的三角瓶中, 在异养条件下进行培养, 其它培养条件同种子培养。选择最佳碳氮比组合, 采用两步法在生长前期采用异养培养, 后期分别加以  $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 、 $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 、 $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  或  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  的光处理, 进行不同强度光对虾青素的诱导实验。

1.2.2 测定方法: 细胞干重的测定参照Chen等的方法<sup>[14]</sup>。比生长速率的计算采用Chen和Johnson的方法<sup>[15]</sup>。葡萄糖浓度的测定使用 3,5-二硝基水杨酸比色法<sup>[16]</sup>。硝酸根浓度的测定使用HPLC法<sup>[17]</sup>。虾青素提取方法为: 取培养 8 d 的藻液, 离心洗涤 2 次, 真空冷冻干燥。称取 0.02 g 藻粉, 加液氮研磨, 用丙酮提取至无色。用氮气吹干, 再用丙酮定容到 1 mL。以上操作均在黑暗处进行。虾青素的测定方法参照Baroli 等人的HPLC方法改进<sup>[18]</sup>。高效液相色谱仪为美国Waters公司生产的 1525 型色谱仪, 色谱柱为Waters Spherisorb  $\text{C}_{18}$  (5  $\mu\text{m}$ ; 4.6 mm×250 mm) 柱子。流动相包括A(乙腈: 甲醇: 0.1 M Tris - HCl [pH 8.0] = 84 : 2 : 14, V/V/V) 和B(甲醇: 乙酸乙酯 = 68 : 32, V/V), HPLC级有机溶剂购买于BDH Laboratory Supplies (Poole, England)。使用的洗脱梯度为: 0 min 到 15 min, 流动相由 100% A 线速变化为 100% B; 100% B持续 10 min, 流速设定为 1.2 mL/min。20  $\mu\text{L}$  虾青素标样或色素提取液被进样分离, 虾青素标样购买于Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)。检测器使用Waters2966 光电二极管阵列检测器, 光谱扫描波长范围为 250 nm 到 700 nm, 使用 450 nm 检测波长积分定量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同碳氮比对小球藻生长以及虾青素合成的影响

通过调整培养基中葡萄糖和硝酸钠的浓度, 将碳氮比调整到 30 到 300 之间。在 8 d 的异养培养时间内, 定时取样测定细胞干重, 计算小球藻的

表 1 不同碳氮比对小球藻生长和虾青素合成的影响  
Table 1 The effect of different C/N ratio on the growth and astaxanthin production of *C. zofingiensis*

葡萄糖(g/L)/硝酸钠 Glucose/NaNO <sub>3</sub> (mmol/L)	碳氮质量比 C/N ratio	比生长速率 Specific growth rate	最大干重* Maximum dry weight (g/L)	虾青素含量* Content of astaxan- thin (mg/g)	虾青素产量* Production of astax- anthin (mg/L)
20/5	133	0.037	9.28 D	0.75 A	6.95 B
20/10	67	0.037	9.25 D	0.34 B	3.17 C
20/20	33	0.036	9.31 D	0.21 C	1.92 D
40/5	267	0.033	9.87 C	0.84 A	8.34 A
40/10	133	0.035	11.9 A	0.77 A	9.19 A
40/20	67	0.034	11.2 A	0.38 B	4.22 C

\*不同字母表示用 Duncan 氏新复极差分析所获 1%显著水平的不同数值, 下表同

表 2 不同强度的光诱导对小球藻的生长和虾青素合成的影响  
Table 2 The effect of different light intensity on the growth and astaxanthin production of *C. zofingiensis*

光照强度 Light intensity (μmol/m <sup>2</sup> s)	最大干重 Maximum dry weight (g/L)	虾青素含量 Content of astaxanthin (mg/g)	虾青素产量 Production of astaxanthin (mg/L)
0	11.6 A B	0.72 C	8.35 D
50	11.9 A	0.8 C	9.54 C
100	10.9 B	1.02 B	11.10 B
200	10.9 B	1.15 A	12.52 A
300	9.8 C	1.26 A	12.40 A

比生长速率和最大干重。在培养的最后一天测定虾青素的含量。实验结果如表 1 所示。20 g/L 葡萄糖的比生长速率显著的高于 40 g/L 葡萄糖, 但是 40 g/L 葡萄糖获得更高的生物量(11.9 g/L)。随着硝酸钠浓度的降低, 碳氮比增加。当碳氮比增加到 267 时, 藻的生长受到限制, 最大干重明显降低。

不论是 20 g/L 还是 40 g/L 的葡萄糖浓度下, 虾青素的含量都随着碳氮比的增加而增加。碳氮比为 267 时获得最大虾青素含量 0.84 mg/g, 而最大虾青素产量出现在碳氮比为 133 时的含有 40 g/L 葡萄糖条件下。

高的碳氮比能够诱导虾青素的积累, 但是过高的碳氮比限制藻的生长, 从而影响最终的虾青素产量。与生产虾青素的最重要的绿藻雨生红球藻相比, 小球藻虾青素含量较低<sup>[9]</sup>, 但是小球藻具有生长快、生物量高的特点。因此获得更高的生物量对提高小球藻虾青素产量显得尤为重要。实验结果表明适当调整碳氮比能够在保证藻的生物量不减少的同时, 获得更高的虾青素含量, 从而得到最大虾青素产量。

2.2 不同强度的光诱导对小球藻虾青素合成的影响

通过碳氮比实验得到最佳组合为含有 40 g/L

葡萄糖和 10 mmol/L 硝酸钠的培养基。在这一营养条件下, 采用两步法先异养 4 d 达到一定的生物量, 然后采用不同的光强处理 4 d, 诱导虾青素的合成。实验结果如表 2 所示。随着光照的增强, 虾青素的含量明显提高。而高光对藻的生长影响不大, 只有当光强增加到 300 μmol/m<sup>2</sup> · s, 生长才明显受到抑制。当光强为 200 μmol/m<sup>2</sup> · s时, 获得最大虾青素产量 12.52 mg/g。

2.3 碳源、氮源的消耗对虾青素积累的影响

在 40 g/L 葡萄糖和 10 mmol/L 硝酸钠的最佳碳氮比培养条件下, 跟踪测定碳源、氮源的消耗以及干重的增加过程, 同时比较了无光诱导和有光诱导下虾青素的积累过程。结果如图 1、2 所示。硝酸钠在 4 d 内几乎消耗完, 而藻的生长直到第 12 d 葡萄糖消耗完后才停止(图 1)。在异养条件下, 碳源作为能源和碳骨架对藻细胞干重的增加非常重要。而根据前人的研究, 氮源可以储存在细胞质内<sup>[19]</sup>, 所以当培养基中的氮源消耗完后, 细胞仍然可以利用体内储存的氮源继续生长。

与此相反, 虾青素的含量在硝酸钠消耗完后的 4 d 内迅速增加, 8 d 以后停止增加。这一结果表明, 高的碳氮比导致氮源的迅速消耗, 氮源的相对不足

诱导虾青素的积累。不论是在小球藻还是在其它产虾青素的微生物的研究中,氮缺乏均被证明是一种非常有效的虾青素诱导方法。同样的结论也出现在雨生红球藻和红法夫酵母的研究中<sup>[12, 20, 21]</sup>。

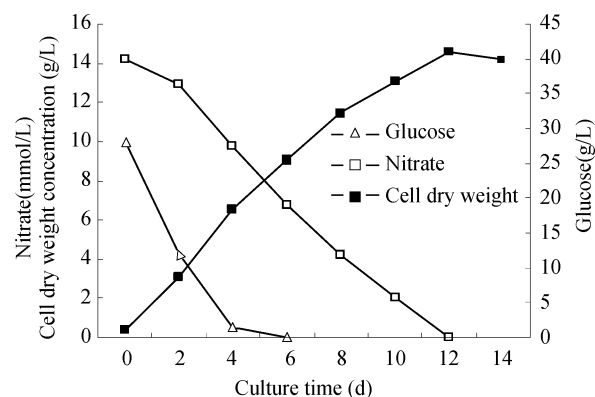


图1 异养培养下培养基中碳源、氮源含量以及细胞干重随培养时间的变化

Fig. 1 The time-course changes of remained glucose, nitrate concentration in the medium and the obtained cell dry weight concentration under heterotrophic culture condition

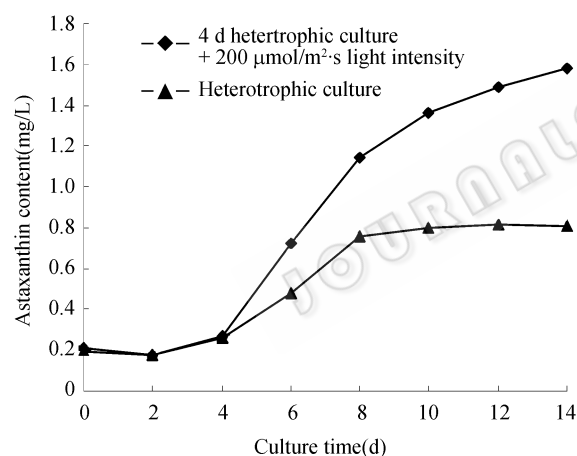


图2 虾青素含量随培养时间的变化

Fig. 2 The time-course changes of obtained astaxanthin content under different culture condition

与没有光诱导的条件相比,高光能够诱导更多的虾青素积累,并且虾青素积累持续的时间明显长于非光诱导的对照组,一直延续到培养周期的最后一天(图2)。这一结果表明,高光诱导和高碳氮比产生协同的诱导作用(在氮源充足的自养条件下,高光对虾青素的诱导缓慢,本文中没有数据显示)。Huang等人克隆了雨生红球藻中与虾青素合成密切相关的3个不同的*bkt*基因,高光和氮缺乏等不同的诱导条件下,3个基因有不同表达<sup>[22]</sup>。因此,不同的

诱导条件导致虾青素含量的不同,而不同的诱导条件也可能产生协同诱导作用,诱导更多虾青素合成。

雨生红球藻和红法夫酵母是研究最多的合成虾青素的生物。雨生红球藻虾青素含量高达干重的1.5%~3.0%<sup>[23]</sup>,但是生长缓慢、生物量很低(自养条件下不超过0.5 g/L)<sup>[24]</sup>,且容易污染,不利于大规模培养。与雨生红球藻相反,红法夫酵母能够快速发酵,利用发酵罐流加培养生物量高达50 g/L,然而其虾青素含量相对很低,野生型红法夫酵母虾青素含量仅0.2 mg/g~0.3 mg/g,经过多年的菌种选育工作,目前红法夫酵母虾青素含量可达到0.15%~0.4%<sup>[25]</sup>。小球藻融合了以上两种微生物的优点,一方面能够利用有机碳源发酵生产高的生物量,另一方面自养条件下能够诱导合成高的虾青素含量。根据Orosa等<sup>[13]</sup>的报道,用350 μmol/m<sup>2</sup>·s高光、氮限制和300 mmol/L NaCl诱导自养培养下的小球藻,虾青素含量高达6.8 mg/g。Del Campo等<sup>[26]</sup>自养小球藻经过10 d的对数期,最大生物量达到7 g/L,在460 μmol/m<sup>2</sup>·s高光、氮限制和200 mmol/L NaCl诱导条件下继续培养15 d,获得了25 mg/L虾青素产量,是目前报道的最大值。相比之下,本研究中异养培养小球藻生长速度快,生物量大大提高,8 d内获得最大干重11.9 g/L。然而虾青素的含量相对很低,仅有0.84 mg/g。采用异养-混养(高光诱导)两步法培养,虾青素含量提高到1.26 mg/g,最大产量达到12.52 mg/L,但是与自养条件相比仍然相差很远。一方面可能是因为异养和光合自养条件的不同,导致藻细胞色素含量降低。另一方面,异养条件下细胞浓度高,造成严重的光遮蔽,影响光诱导效果。Ogbonna<sup>[27]</sup>等研究了一种异养与自养相互交替的养殖系统,并认为在从异养转到自养状态时,葡萄糖浓度必须为零,否则因为细胞密度很高,光穿透力低,无法进入自养生长状态。将异养与自养相结合,最大限度发挥异养条件下细胞快速生长与自养条件下虾青素大量积累的特点,有可能获得更高的虾青素产量。

目前,利用小球藻生产虾青素的研究刚刚起步,小球藻的生物量和虾青素产量相对不高。一方面通过优化培养基,并且采用补料、流加等高密度异养培养技术,能够进一步提高生物量。另一方面,优化

各种诱导因子和营养、环境胁迫条件, 来提高虾青素含量。还可以采用生物技术等先进技术改良小球藻基因, 提高虾青素的积累量, 实现大规模培养小球藻商业化生产虾青素的目标。

## 参 考 文 献

- [1] 蔡明刚, 王杉霖, 李文权, 等. 天然虾青素在水产养殖业中的应用研究进展. 台湾海峡, 2003, **22**(3): 377–385.
- [2] 李浩明, 高 蓝. 虾青素的结构、功能与应用. 精细化工, 2003, **20**(1): 32–37.
- [3] 李兆华, 刘 鹏. 虾青素的功能及应用进展. 食品与药品, 2005, **79A**: 17–20.
- [4] Johnson EA, An GH. Astaxanthin from microbial sources. *Crit Rev Biotechnol*, 1991, **11**(4): 297–326.
- [5] Burick P. Production of astaxanthin from *Haematococcus*. *Biores Technol*, 1991, **38**(2-3): 237–239.
- [6] An GH, Schuman DB, Johnson EA, *et al.* Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**(1): 116–124.
- [7] Vazquez M, Santos V, Parajo JC. Fed-batch cultures of *Phaffia rhodozyma* in xylose containing media made from wood hydrolysates. *Food Biotechnology*, 1998, **12**(1-2): 43–55.
- [8] Shi XM, Jiang Y, Chen F. High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture. *Biotechnology Progress*, 2002, **18**(4): 723–727.
- [9] Bar E, Rise M, Vishkautsan M, *et al.* Pigment and structural changes in *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress. *Journal of Plant Physiology*, 1995, **146**(4): 527–534.
- [10] Ip PF, Chen F. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Process Biochemistry*, 2005, **40**(2): 733–738.
- [11] 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. 微生物学通报, 2007, **34**(5): 27–30.
- [12] Yamane YM, Higashida K, Nakashimada Y, *et al.* Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(11): 4471–4478.
- [13] Orosa M, Valero JF, Herrero C, *et al.* Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions. *Biotechnology Letters*, 2001, **23**(13): 1079–1085.
- [14] Chen F, Zhang YM, Guo SY. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. *Biotechnology Letters*, 1986, **18**(5): 603–608.
- [15] Chen F, Johns MR. High cell density culture of *Chlamydomonas reinhardtii* on acetate using fed-batch and hollow-fibre cell-recycle systems. *Biores. Techn*, 1996, **55**(2): 103–110.
- [16] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, **31**: 426–427.
- [17] Yuan JP, Chen F. Indirect photometric ion chromatographic analysis of anions in *Haematococcus pluvialis* culture media. *Biotechnology Letters*, 2001, **23**(10): 757–760.
- [18] Baroli I, Do AD, Yamane T, *et al.* Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress. *Plant Cell*, 2003, **15**(4): 992–1008.
- [19] Lillo C, Meyer C, Lea US, *et al.* Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *Journal of Experimental Botany*, 2004, **55**(401): 1275–1282.
- [20] Boussiba S, Bing W, Yuan JP, *et al.* Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnology Letters*, 1999, **21**(7): 601–604.
- [21] 董庆霖, 赵学明, 邢向英. 乙酸钠诱导雨生红球藻合成虾青素的机理. 微生物学通报, 2007, **34**(2): 256–260.
- [22] Huang JC, Chen F, Sandmann G. Stress-related differential expression of multiple  $\beta$ -carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnology*, 2006, **122**(2): 176–185.
- [23] Lorenz RT, Cysewski GR. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Tibtech*, 2000, **18**(4): 160–167.
- [24] Gladue RM, Maxey JE. Microalgal feeds for aquaculture. *J Appl Phycol*, 1994, **6**(2): 131–141.
- [25] Johnson EA, Villa TG, Lewis MJ. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonoid diets. *Aquaculture*, 1980, **20**(2): 123–134.
- [26] Del Campo JA, Rodríguez H, Moreno J, *et al.* Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **64**(6): 848–854.
- [27] Ogbonna JC, Masui H, Tanaka H. Sequential heterotrophic / autotrophic cultivation - An efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed. *J Appl Phycol*, 1997, **9**(4): 359–366.