

雨生红球藻混合营养与异养培养研究*

庄惠如 陈必链 王明兹 卢海声 施巧琴

(福建师范大学生物工程学院 福州 350007)

摘要: 研究雨生红球藻混合营养生长与异养生长对碳源及碳源浓度的需求,并对两种生长型进行比较。结果表明,乙酸钠较葡萄糖等其他碳源更能维持红球藻进行混合营养生长与异养生长。红球藻混合营养型生长与异养型生长的适宜乙酸钠浓度范围分别是 $0.5\sim 1.0\text{g/L}$ 和 $1\sim 1.5\text{g/L}$ 。混合营养型及异养型的平均生长速率分别是 0.72d^{-1} 和 0.53d^{-1} ,培养8d的细胞干重分别是 0.65g/L 和 0.32g/L 。与光养型(对照)相比,混养型的各种生长指标均明显提高,异养型则下降。

关键词: 雨生红球藻,混合营养生长,异养生长,碳源

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2000)03-0198-04

MIXOTROPHIC AND HETEROTROPHIC GROWTH OF *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

ZHUANG Hui-Ru CHEN Bi-Lian WANG Ming-Zi LU Hai-Sheng SHI Qiao-Qin

(Bioengineering College, Fujian Teacher's University, Fuzhou 350007)

Abstract: Mixotrophic and heterotrophic growth of *Haematococcus pluvialis* and the request of carbon resource were investigated. The microalga grew better on acetate than glucose and other carbons in both growth modes. The optimum growth concentration of acetate in mixotrophic and heterotrophic were $0.5\sim 1.0\text{g/L}$ and $1.0\sim 1.5\text{g/L}$ respectively. The average growth rates of mixotrophic and heterotrophic were 0.72d^{-1} and 0.53d^{-1} respectively. After cultured for 8 days, the cell dry weight of mixotrophic and heterotrophic were 0.65g/L and 0.32g/L respectively. Compared with phototrophic (control), the average growth rate and cell dry weight of mixotrophic increased, but in heterotrophic, they decreased.

Key words: *Haematococcus pluvialis*, Mixotrophic, Heterotrophic, Carbon resource

* 福建省计委资助项目,福建省自然科学基金资助项目

收稿日期: 1999-02-05, 修回日期: 1999-06-28

雨生红球藻 (*Haematococcus Pluvialis* Flotow) 是一种淡水单胞绿藻, 由于其孢子富含虾青素而成为继螺旋藻、盐藻之后的另一种高价值的经济微藻^[1]。虾青素可做增色剂, 广泛应用于水产养殖与禽蛋生产中。此外, 它还具有比 β -胡萝卜素及维生素 E 更高的抗氧化活性^[2]。其市场前景十分可观。但目前只有美国, 以色列等国家的一些公司正在进行试生产, 原因之一是由于传统的光养型培养系统无法克服诸如易污染, 产量低等技术难题。据报道, 红球藻能利用有机物做碳源进行混合营养及化能异养生长^[3]。用光合反应器及发酵罐培养的尝试已取得初步成果^[4]。本研究对雨生红球藻混合营养及异养生长所需的适宜碳源及其浓度进行了探索, 为大规模商业化培养红球藻提供一些基础性资料。

1 材料与方法

1.1 材料

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis* Flotow) 藻种由中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库提供。

1.2 方法

1.2.1 培养条件: 用 Bold 的培养基 (BBM)^[5] 培养。温度控制在 $23 \pm 15^{\circ}\text{C}$, 日光灯提供侧光光照, 光强 $0.4 \sim 1.0\text{Klx}$, 12:12h 光暗周期, 静置培养。

1.2.2 混合营养及异养培养条件: 用 BBM 做基本培养基, 分别选用乙酸钠, 葡萄糖, 麦芽糖, 乳糖等为碳源, 利用目测及镜检的方法确定能维

持红球藻混合营养及化能异养生长的碳源及碳源浓度。

用 250mL 三角烧瓶为培养容器, 接种物为预培养 4d 的指数生长期藻种, 接种物与培养基体积之比为 1:9。培养温度为 $23 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$, 混合营养型生长的光照条件为 $1.0 \sim 1.5\text{Klx}$, 异养型生长用二层黑布遮光。培养周期 8d, 每天手摇培养物一次, 每个处理设三个重复, 每天定时取样测生长指标。

1.2.3 生长指标测定: (a) 细胞计数 按金传荫等的方法^[6], 用“浮游生物计数框”进行细胞计数。生长速率用普通微生物学通用公式计算。(b) 色素提取与测定 准确取样 5mL。转速为 4000r/min 离心 5min, 细胞团用 90% 丙酮提取色素至藻体无色, 抽提液用 752-C 型分光光度计测定光吸收值。根据有关公式^[7,8] 计算叶绿素及类胡萝卜素的含量。(c) 细胞干重测定 取 10mL 藻悬液, 离心去上清液, 蒸馏水洗 2 次, 置 80°C 烘箱内烘干, 冷却后称恒重。

2 结果与讨论

2.1 培养基及碳源选择

雨生红球藻的生活史主要分为绿色的营养细胞与红色的孢子两个阶段。营养生长期长, 意味着有较高的细胞生物量, 本实验中试用过多种培养基, 在相同温度, 光照条件下, BBM 比其他培养基更能维持较长的营养生长阶段, 尤其是在弱光条件下, 可长达 20d 以上。故选择 BBM 做为基本培养基。用不同碳源做有机底物的试验结果见表 1。

表1 维持雨生红球藻混合营养及异养生长的碳源						
培养条件*	碳源					
	乙酸钠	丙酸钠	葡萄糖	蔗糖	麦芽糖	乳糖
	lg/L	lg/L	3g/L	3g/L	3g/L	3g/L
光照	+++	-	-	-	-	-
黑暗	++	-	-	-	-	-

* 培养条件与文中1.2.2所述相同, 静养3~5d, ++表示生长程度, -不生长

该结果表明, 乙酸钠和葡萄糖均能维持红球藻进行混合营养及化能异养生长。其他碳源则对红球藻的生长有抑制作用, 表现为细胞解

体死亡。用葡萄糖做碳源, 培养物极易染菌且生物量较低, 因此选用乙酸钠为本实验的碳源。

2.2 原初乙酸钠浓度对红球藻生长的影响

本实验设计了 4 组不同浓度的乙酸钠, 分别为 0.5g/L, 1.0g/L, 1.5g/L 和 2.0g/L, 以完全 BBM 培养基做对照。细胞计数结果表明, 低浓度的乙酸钠能促进红球藻的生长, 而高浓度则抑制生长。由于藻细胞对外源有机物有一个适应过程及一定的耐受力, 故在本实验中 0.5~2.0g/L 浓度的乙酸钠均能维持红球藻进行不同程度的生长, 但原初乙酸钠浓度越高, 生长延缓期越长, 对细胞的毒害作用也越大。低浓度乙酸钠的促长作用表现在红球藻在接种后迅速进

入指数生长期, 并延长生长期, 后者对最终生物量的影响则尤为明显。综合比较结果(图 1), 在光照条件下, 原初乙酸钠浓度为 0.5~1.0g/L 时能维持较高的生长速率与干重。在黑暗条件下, 能维持红球藻进行化能异养的适宜乙酸钠浓度范围则在 1.0~1.5g/L,

2.3 雨生红球藻的混合营养及异养生长

在上述实验基础上, 选择乙酸钠浓度为 1.0g/L 和 1.5g/L 分别做为红球藻混合营养生长与异养生长的碳源浓度。图 2 的生长曲线及综合测定结果(表 2)表明, 在光照条件下, 雨生红球藻的混合营养生长比光合自生长有明显的

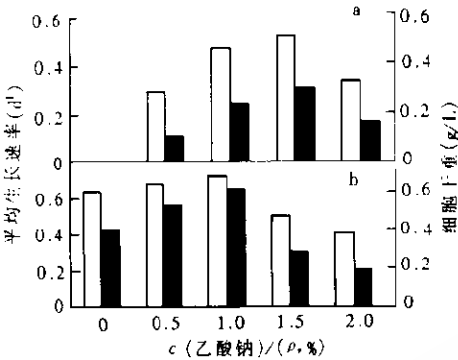


图1 不同原初乙酸钠浓度下红球藻的生长参数
a 黑暗生长, b 光照条件
□ 平均生长速率, ■ 细胞干重

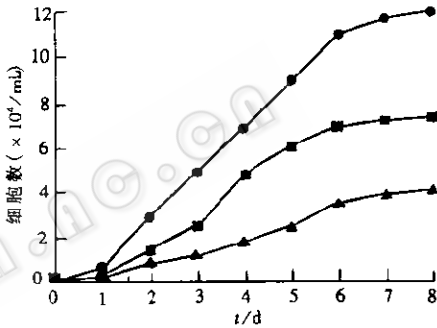


图2 雨生红球藻不同生长型的生长曲线
—●— 混合营养型, —■— 光养型, —▲— 异养型

表2 雨生红球藻不同营养型生长指标比较

培养方式	光合自养	混合营养	黑暗异养
平均生长速率 ^a (d ⁻¹)	0.64±0.03	0.72±0.04	0.53±0.04
最终细胞数 (×10 ⁴ /mL)	7.40±0.51	12.00±0.57	4.28±0.60
最终细胞干重 (g/L)	0.42±0.02	0.65±0.03	0.32±0.04
叶绿素含量 (mg/g)	12.25±0.50	13.00±0.48	9.56±0.41
类胡萝卜素含量 (mg/g)	5.81±0.09	5.90±0.10	5.00±0.08

^a 培养期前6d平均生长速率,其他生长指标为培养8d时所测

优势,其生长速率与生物量(干重)分别提高了 12.5% 和 54.8%。在黑暗条件下,红球藻能够利用乙酸钠做为唯一的碳源和能源进行化能异养生长,但生长速率与生物量比光养的低。Kobaysshi^[3]培养雨生红球藻用类似细菌培养的培养基,结论是在混合营养生长过程,光合作用与乙酸钠的氧化代谢同时并存。我们实验的结果基本证实了这一结论,即混合营养生长的生物量几乎等于光养型生长与化能异养生长的总

和(表 2)。
另一方面,色素测定结果表明,雨生红球藻在混合营养生长及异养生长中叶绿素与类胡萝卜素含量随细胞的生长而增加,其变化趋势与相应的生长曲线基本一致。据张大兵等报道^[9],小球藻细胞在异养转化过程,叶绿素消失,细胞呈黄化。本实验红球藻的异养转化过程,并未伴随明显的黄化现象,但培养终了时色素含量受到影响(表 2),其转化机制尚有待于进一步

研究。

红球藻能利用乙酸钠进行混合营养生长及化能异养生长的特性,为利用成熟的微生物发酵技术大规模培养提供了基本条件,但与其他微生物相比,红球藻的生物量较低。如何提高其生长速率及生物量,则有待于进一步的研究。

致谢 本院 94 级学生陈跃兴,陈健曾参加部分实验。

参 考 文 献

- [1] 孙伟,王晓东. 中国海洋药物,1995,2: 48~52.
[2] Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S. Journal of

Fermentation and Bioengineering, 1991, 71(5): 335~339.

- [3] Kobayashi M, Kakizono T, Yamaguchi K *et al.* Journal of Fermentation and Bioengineering, 1992, 74(1): 17~20.
[4] Chen F, Chen H, Gong X. Bioresource Technology, 1997, 62: 19~24.
[5] 华汝成. 单细胞藻类的培养利用. 北京: 农业出版社, 1986, 133~137.
[6] 金传荫, 宋立荣, 刘永定等. 水生生物学报, 1996, 20(3): 292~296.
[7] 湛江水产学院编. 海洋饵料生物培养. 北京: 农业出版社, 1983, 198~200.
[8] 邹琦. 植物生理生化实验指导. 北京: 中国农业出版社, 1995, 36~38.
[9] 张大兵, 吴庆余. 植物生理学报, 1996, 32(2): 140~144.