

不同碳源对小球藻 *Chlorella zofingiensis* 异养产虾青素的影响

陈涛^{1*} 向文洲¹ 何慧¹ 陈峰²

(中国科学院南海海洋研究所 广州 510301) (香港大学植物学系 中国香港)

摘要 研究了葡萄糖、蔗糖和果糖对小球藻 (*Chlorella zofingiensis*) 异养生长及产虾青素的影响, 结果表明, 在糖浓度为 20g/L 时, 细胞生长较快, 但干重较小, 虾青素含量较低; 在糖浓度为 50g/L 时, 细胞生长较慢, 但干重较大, 虾青素含量较高。3 种碳源中蔗糖和葡萄糖效果较好, 在蔗糖浓度为 50g/L 时, 虾青素含量和产量分别达到 0.94 mg/g 和 9.61 mg/L。

关键词 小球藻, 碳源, 虾青素

中图分类号: TQ929 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)05-0856-03

Effects of Carbon Sources on the Production of Astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* in the Dark

CHEN Tao^{1*} XIANG Wen-Zhou¹ HE Hui¹ CHEN Feng²

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

(Department of Botany, University of Hong Kong, Hong Kong, P. R. China)

Abstract This paper investigated the effects of carbon sources on the growth of *Chlorella zofingiensis* and the production of astaxanthin. The result showed that the concentration of 20g/L was beneficial to the growth of *Chlorella zofingiensis*, but on the this concentration biomass and astaxanthin content was low; on the concentration of 50g/L, the growth is slower, but biomass and astaxanthin content was high. Among the three carbon sources investigated, sucrose and glucose were more beneficial to growth and production of astaxanthin than fructose. When 50g/L sucrose was used, the astaxanthin content and astaxanthin yield was 0.94 mg/g and 9.61 mg/L respectively.

Key words: *Chlorella zofingiensis*, Carbon source, Astaxanthin

虾青素 (astaxanthin) 是一种重要的类胡萝卜素, 它的化学名称是 3, 3'-二羟基-4, 4'-二酮基-β-类胡萝卜素。虾青素可淬灭单线态氧, 清除自由基, 阻止脂质过氧化, 保护机体免受伤害, 预防癌症发生, 还能促进人体免疫球蛋白的产生, 具有很高的免疫调节活性。研究表明, 虾青素具有抗氧化活性, 虾青素的抗氧化性比 β-胡萝卜素高约 10 倍, 比维生素 E 高约 500 倍, 被认为是“超级维生素 E”^[1]。研究表明, 虾青素具有比 β-胡萝卜素更强的抑制癌变的能力^[2]。虾青素在国际市场的价格曾经达到 2500 美元/kg 以上, 市场前景非常广阔^[3]。

虾青素的生产方法有化学合成、从甲壳类动物中提取以及生物合成等。前两种方法有很大的局限性。*Chlorella zofingiensis* 能够在异养条件下发酵糖类合成虾青素^[4], 有较好的商业化前景。本文就

3 种不同碳源对 *Chlorella zofingiensis* 生长及合成虾青素的影响进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: *Chlorella zofingiensis* (ATCC 30412), 由香港大学植物学系陈峰博士提供。

1.1.2 培养基: 斜面培养基: 琼脂 12g, CH₃COONa 1.2g, CZ-M1 (NaNO₃ 0.75g, KH₂PO₄ 0.175g, K₂HPO₄ 0.075g, MgSO₄ · 7H₂O 0.075g, CaCl₂ · 2H₂O 0.025g, NaCl 0.025g, FeCl₃ · 6H₂O 0.005g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.287mg, MnSO₄ · H₂O 0.169mg, H₃BO₃ 0.061mg, CuSO₄ · 5H₂O 0.0025mg, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 7H₂O 0.00124 g, pH6.5)

液体种子培养基: Glucose 10g, CZ-M1。

* 通讯作者 Tel: 020-89023224, E-mail: zwavehg@126.com

收稿日期: 2006-11-10, 修回日期: 2007-01-03

无碳基础培养基 :CZ-M1。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法 :斜面菌种的保藏 :菌株接入斜面培养基上 20℃培养 7d 4℃保藏。

摇瓶种子培养 :接一环菌苔于 10mL 种子培养基的 250mL 三角瓶中 27℃、150r/min 摇瓶培养 4d。

摇瓶培养 :将种子液以 10% 的接种量接入装有 90mL 培养基的 250mL 三角瓶中 ,在黑暗条件下 ,27℃、150r/min 摇瓶培养。

1.2.2 测定方法 (1) 细胞干重测定 :取 5mL 培养液 ,离心洗涤 2 次 ,105℃烘干至恒重。

(2) 虾青素提取 :取培养 14d 的藻液 ,离心洗涤 3 次 ,真空冷冻干燥。称取一定量的干藻粉 ,加液氮研磨 ,用丙酮提取至无色为止。离心 ,弃去残渣 ,上清液用氮气吹干 ,加丙酮定容至 1mL。研磨提取及定容过程要求避光。(3) 虾青素测定 :高效液相色谱法^[5]。高效液相色谱仪为美国 Waters 公司 1525 型 ,色谱柱为 Beckman Ultrasphere C₁₈(5μm ; 250mm × 4.6 mm)。流动相 A(二氯甲烷 :甲醇 :乙腈 :水 = 5 : 85 : 5.5 : 4.5 , V/V/V/V) 流动相 B(二氯甲烷 :甲醇 :乙腈 :水 = 25 : 28 : 42.5 : 4.5 , V/V/V/V) ,洗脱梯度为 :100% A(0min ,保持至 8min) ,100% B(14min ,保持 40min) ,流速为 1mL/min ;检测器为 Waters2996 光电二极管阵列检测器 ;光谱扫描波长范围为 250nm ~

700nm 积分定量用检测波长为 480nm。

2 实验结果

2.1 小球藻细胞中类胡萝卜素成分分析

取 50g/L 葡萄糖培养 14d 的藻细胞进行色素提取 ,通过 HPLC 分析了小球藻细胞提取液中类胡萝卜素及叶绿素等成分 ,如图 1 所示。各组分的保留时间、最大吸收波长及确定如表 1 所示^[5]。

表 1 *Chlorella zofingiensis* 色谱图中各组分的确定

峰编号	保留时间 (min)	最大吸收波长 (nm)	色素
1	4.51	480.2	<i>Trans</i> -astaxanthin
2	4.89	(451.2) 469.3	Adonixanthin
3	5.45	447.6 473.0	Lutein Zeaxanthin
4	7.20	476.6	Canthaxanthin
5	10.35	469.3 650.6	Chlorophyll b
6	14.34	434.3 662.9	Chlorophyll a
7	15.70	486.3	Astaxanthin esters
8	16.47	(459.7) 473.0	Adonixanthin esters
9	17.19	486.3	Astaxanthin esters
10	17.90	454.8	Adonixanthin esters
11	19.42	454.8 (486.3)	β-Carotene
12	32.50	485.1	Astaxanthin esters
13	37.60	(463.3) 486.3	Adonixanthin esters

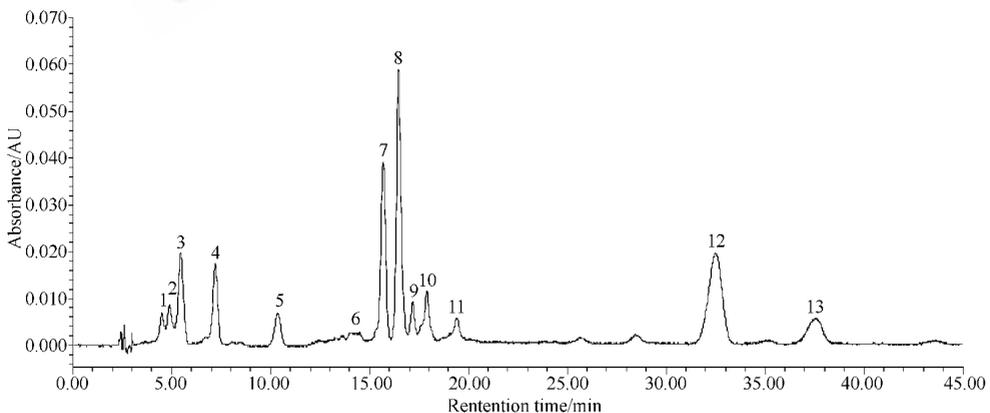


图 1 *Chlorella zofingiensis* 细胞中类胡萝卜素及叶绿素色谱图

由图 1 及表 1 可以看出 ,细胞中所含色素主要为虾青素及虾青素酯(峰 1、7、9 和 12) ,Adonixanthin 及 Adonixanthin 酯(峰 2、8、10 和 13)。

2.2 不同碳源对小球藻细胞生长的影响

分别以不同浓度葡萄糖、蔗糖和果糖为碳源添

加到 CZ-M1 培养基中进行摇瓶培养 ,定时取样测定干重。实验结果如图 2 及表 2 所示。

由图 2 及表 2 可以看出 ,在糖浓度为 20g/L 时 ,比生长速率较大 ,随着糖浓度的升高 ,比生长速率下降 ,细胞在第 8 天达到最大干重 ,测残糖的结果表

明,此时糖已经被消耗完。在糖浓度为 50g/L 时,高糖浓度对细胞生长产生抑制作用,果糖的抑制作用最明显,葡萄糖次之,蔗糖抑制作用最小,这可能是因为蔗糖培养基中,蔗糖分解得到葡萄糖和果糖

浓度较低,从而一定程度上避免了抑制作用。从表 2 可以看出,对细胞生长,葡萄糖和蔗糖明显优于果糖,蔗糖效果最好,这与培养红发夫酵母的结果一致^[6]。

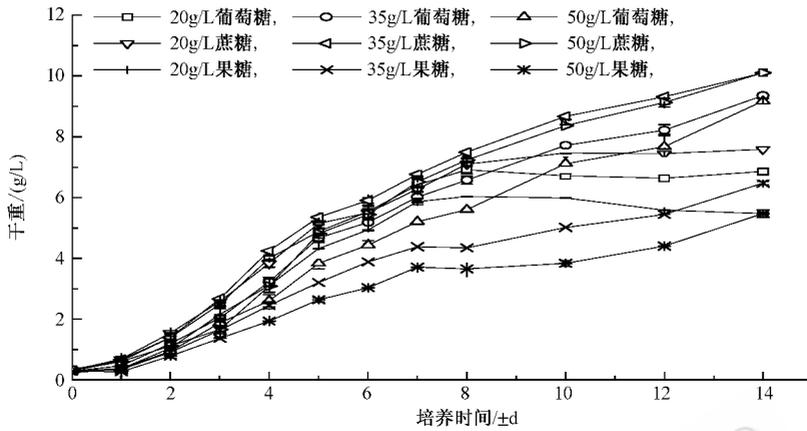


图 2 不同浓度糖细胞生长曲线

表 2 不同浓度糖细胞比生长速率及最大干重

糖浓度(g/L)	比生长速率(h ⁻¹)			最大干重(g/L)		
	葡萄糖	蔗糖	果糖	葡萄糖	蔗糖	果糖
20	0.029	0.033	0.031	6.91 ± 0.14	7.46 ± 0.08	6.03 ± 0.17
35	0.027	0.031	0.025	9.35 ± 0.31	10.09 ± 0.38	6.47 ± 0.05
50	0.025	0.027	0.021	9.17 ± 0.09	10.10 ± 0.16	5.47 ± 0.12

注:干重数据为平均值 ± 标准偏差(n = 3)

表 3 不同碳源对虾青素合成的影响

糖浓度(g/L)	虾青素含量(mg/g)			虾青素产量(mg/L)		
	葡萄糖	蔗糖	果糖	葡萄糖	蔗糖	果糖
20	0.70 ± 0.04	0.59 ± 0.01	0.74 ± 0.02	4.33 ± 0.19	4.46 ± 0.14	4.04 ± 0.06
35	0.80 ± 0.06	0.89 ± 0.04	0.75 ± 0.03	7.32 ± 0.08	8.65 ± 0.05	4.63 ± 0.11
50	0.84 ± 0.07	0.94 ± 0.10	0.94 ± 0.08	7.66 ± 0.14	9.61 ± 0.24	5.06 ± 0.53

注:所有数据为平均值 ± 标准偏差(n = 3)

2.3 不同碳源对合成虾青素的影响

由表 3 可以看出,在糖浓度 20g/L ~ 50g/L 范围内,随着糖浓度的升高,细胞内虾青素含量也升高。当蔗糖浓度为 50g/L 时,最大的虾青素含量为和最大产量分别为 0.94mg/g 和 9.61mg/L。

青素含量和产量分别达到 0.94 mg/g 和 9.61 mg/L。

3 结论

不同碳源对细胞生长及合成虾青素有显著影响。在糖浓度为 20g/L 时,细胞生长较快,但干重较小,虾青素含量较低;在糖浓度为 50g/L 时,细胞生长较慢,但干重较大,虾青素含量较高。蔗糖和葡萄糖作为碳源效果较好,在蔗糖浓度为 50g/L 时,虾

参考文献

[1] Lorenz R T , Cysewski G R . Trends in Biotechnology , 2000 , 18 :160 ~ 167 .
 [2] Yuan J P , Chen F . Food chem 2000 , 68(4) :443 ~ 448 .
 [3] Todd Lorenz R , Gerald R , Cysewski . Tibtech April 2000 , 18 :160 .
 [4] 周华伟 , 林炜铁 , 陈 涛 . 氨基酸和生物资源 , 2005 , 27(4) :69 ~ 73 .
 [5] Yuan J P , Chen F , Liu X , et al . Food Chem 2002 , 76 :319 ~ 325 .
 [6] 朱明军 , 浦跃武 , 吴海珍 , 等 . 华南理工大学学报(自然科学版) , 2002 , 30(4) :77 ~ 80 .