

## 小球藻的异养生长及培养条件优化

张丽君, 杨汝德, 肖 恒

(华南理工大学食品与生物工程学院, 广东广州 510640)

**摘 要:** 对小球藻异养培养中的碳源、氮源、微量元素—镁离子以及其他培养条件的影响进行了探讨, 并测定了小球藻的生长曲线。优化结果: C:N 为 4:1~5:1, 硫酸镁的量为 1 g/L, 培养条件为: pH6~7, 接种量 10%, 温度 30 °C。在此条件下, 异养培养小球藻, 其 OD 值可达 18, 蛋白质为 30%, 叶绿素含量为 1.2%。

**关键词:** 小球藻; 异养培养; 生物量

**中图分类号:** Q949.21<sup>+</sup>7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2001)04-0353-05

## The heterotrophic culture of *Chlorella* and optimization of growth condition

ZHANG Li-jun, YANG Ru-de, XIAO Heng

(The Food and Biotechnology Institute of South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The effect of carbon sources, nitrogen sources, microelement-Mg<sup>2+</sup> and culture condition for heterotrophic culture of *Chlorella* was researched. We also get the growth curve. The results of optimization: C/N is 4:1~5:1, MgSO<sub>4</sub> is 1g/L; pH is 6~7, inoculation is 10%, temperature is 30 °C. Under this condition, the OD is 18, protein concentration is 30%, chlorophyll concentration is 1.2%.

**Key words:** *Chlorella*; heterotrophic; biomass

小球藻为绿藻门小球藻属(*Chlorella*)单细胞绿藻,生态分布广,易于培养,生长速度快,应用价值高。小球藻细胞除了可在自养条件下利用光能和二氧化碳进行正常的生长外,还可以在异养条件下利用有机碳源进行生长繁殖,生长速度比光照条件下快,类似于细菌的代谢生长<sup>[1]</sup>。

小球藻含丰富的蛋白质、多糖、脂类、叶绿素、维生素、微量元素和一些生物活性代谢产物,具有全面而均衡的营养价值,毒理学研究表明是无毒级物质,广泛应用于保健食品、饲料、食品添加剂、精细化工品和医药制剂原料<sup>[2~4]</sup>。因此长期以来,小球藻不仅是生物学研究中优良的实验材料,而且是受

人瞩目的开发利用对象。目前大规模培养主要采用开放池式户外培养,这种传统的、低产量的池塘光培养系统已不能满足要求。80年代以来各种半密闭和密闭培养系统的研究受到广泛重视,应用各种光生物反应器进行间歇流加、连续流加等方式培养,在一定程度上提高了小球藻的产量和产率<sup>[5~7]</sup>。但由于仍然采用光照自养方式,生产效率并没有得到根本的改变。以有机物作为小球藻的唯一碳源进行异养培养,具有无需光照,细胞增殖快,浓度高,生产系统易于实现自动控制,可利用现有的发酵设备等优点,国外对此已引起高度重视<sup>[8]</sup>。国内对小球藻的异养培养报道甚少,为了提高小球藻的产量和产

收稿日期: 2000-05-22

作者简介: 张丽君(1975-),女,河北元氏人,发酵工程硕士,从事微生物发酵及生物制药方向研究。

率。满足日益增长的市场需求,我们研究了用异养方法高细胞密度培养小球藻,探讨了异养培养小球藻的一些影响因素。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种

小球藻(*Chlorella vulgaris*)种由香港大学陈峰博士惠赠,用基础培养基<sup>[9]</sup>制成琼脂斜面保存种。用基础培养基二级放大用于实验研究。

### 1.2 培养基组成与培养条件

基础培养基为小球藻光自养培养基添加葡萄糖 10 g/L 配制而成,调 pH6.1。实验培养基根据需要对培养基成分作相应调整。250 mL 三角瓶装培养基 100 mL,121 °C 灭菌 20 min。超净工作台接种和取样,30 °C 150 r/min 旋转摇床暗培养。

### 1.3 测定方法

1.3.1 藻生物量测定<sup>[10]</sup> 采用浊度比色法。用 721 分光光度计测定培养液在 540 nm 处的吸光度(OD<sub>540</sub>)。

1.3.2 叶绿素测定 采用丙酮提取比色法。取 1 mL 藻培养液离心洗涤,在藻体沉淀中加入 80% 丙酮,4 °C 冰箱提取 24 h,再离心分离丙酮提取液,测定其在 663 nm 和 645 nm 处的吸光度(A<sub>663</sub>和 A<sub>645</sub>),根据公式:总叶绿素=8.02×A<sub>663</sub>+20.2×A<sub>645</sub>来计算叶绿素的含量。

1.3.3 硝酸根的测定<sup>[11]</sup> 采用酚二磺酸分光光度法。

1.3.4 葡萄糖的测定<sup>[12]</sup> 采用二硝基水杨酸法。

1.3.5 粗蛋白测定<sup>[13]</sup> 采用凯氏定氮法。

## 2 结果与讨论

### 2.1 生长曲线

在开始对小球藻的特性进行研究之前,有必要对异养培养时,小球藻的生长过程有一了解。本实验中藻种在恒温培养箱中培养一段时间后取出,按 10% 的接种量接入液体培养基,从 0 h 开始,每隔 4 h 取样测 OD、pH,得到其生长曲线(图 1)。

细胞的生长过程大致呈“S 形”,从图 1 中看,其调整期较长,约为 12 h,12~36 h 之间为对数生长期,36 h 后进入稳定期,48 h 后再延长培养时间,生物量无明显变化,即进入衰亡期。

### 2.2 培养基组成对小球藻生长的影响

2.2.1 最佳葡萄糖与硝酸钾之比 有前人报道知,葡萄糖为异养培养小球藻的较好碳源。虽小球藻不能直接利用 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 中的氮,而是首先在硝酸盐还原酶的作用下将其还原为 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 再由亚硝酸根还原酶将其彻底还原为 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 才能被小球藻吸收利用,这一过程需耗用一定的能量。但通过利用硝酸氨、尿素、氯化铵、硫酸氨、硝酸钾作为氮源的比较实验,发现氨盐作为氮源时,氨根离子直接被小球藻吸收,但为保证细胞内电荷平衡而释放出氢离子使得培养液的 pH 值下降,在酸性条件下,小球藻的生长会受到抑制。虽然以硝酸钾作为氮源会消耗能量,但小球藻在吸收硝酸盐过程中伴随质子共转运(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sup>+</sup> Symport)使得培养基中的质子浓度降低,培养液的 pH 值上升<sup>[14]</sup>,这有利于小球藻的生长。因而,硝酸钾仍为最好的氮源。但葡萄糖与硝酸钾的含量之比是影响其生长的主要因素。

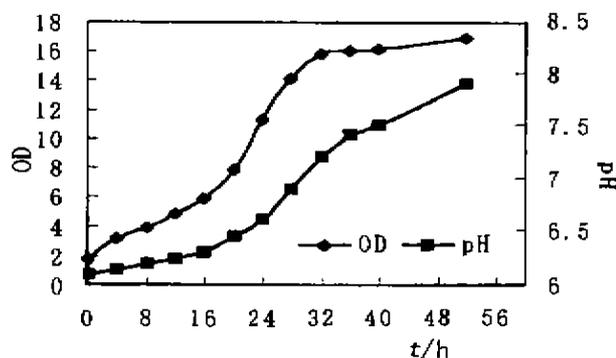


图 1 小球藻生长曲线

Fig. 1 The growth curve of *Chlorella vulgaris*

本实验按照 36 个不同的 C : N 比分别称取葡萄糖为 10、13、16、20、25 g/L,分别记为 C<sub>10</sub>、C<sub>13</sub>、C<sub>16</sub>、C<sub>20</sub>、C<sub>25</sub>,硝酸钾分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 g/L,其他成分不变。接种量 10%,摇床培养 48 h。所得结果如图 2。

由图 2 可以看出,对同一个硝酸钾浓度,OD 值随着葡萄糖浓度的增加而增加,可见葡萄糖利于小球藻细胞的分裂,但测定蛋白质、叶绿素含量,并无明显的增加,可见并未增加代谢物的积累,因而本实验中取葡萄糖浓度为 10 g/L;而同一葡萄糖浓度,在实验范围内不同硝酸钾浓度对小球藻的生长影响不是很大,只有当葡萄糖浓度与硝酸钾浓度之

比在 5 : 1~4 : 1 之间时, OD 值为最大, 如当葡萄糖浓度为 10 g/L, 硝酸钾浓度为 1.5~2.0 之间时, OD 值达 16.648; 再测定培养液中的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 浓度发现 (表 1), 硝酸钾起始浓度在 0~2 g/L 48 h 后培养液中所剩的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 浓度为 0 g/L, 而硝酸钾起始浓度大于 2 g/L 时, 所剩的浓度大于 0 g/L, 两者差值在 2 g/L 左右。可见, 葡萄糖的浓度为 10 g/L 时, 小球藻消耗硝酸钾的最大量为 2 g/L, 即消耗最大 C : N (葡萄糖与硝酸钾之比) 为 5 : 1。分别测定上述不同 C : N 下的 OD 值、粗蛋白、叶绿素发现在 4 : 1~5 : 1 时, 其最终 OD 值、粗蛋白、叶绿素最高分别为 16%, 31%, 1.03%。所以, 葡萄糖与硝酸钾的比为 4 : 1~5 : 1, 采用葡萄糖浓度为 10 g/L, 硝酸钾浓度为 1.6 g/L。

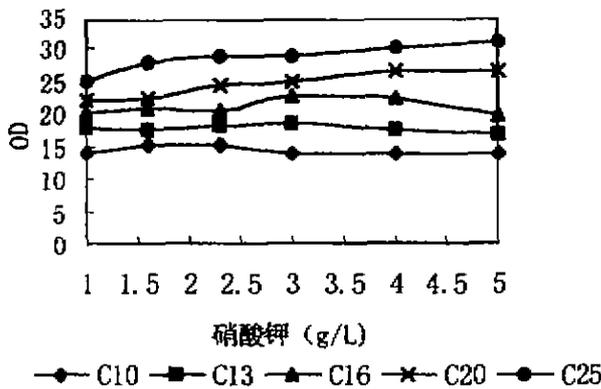


图 2 不同碳氮比对小球藻生长的影响  
Fig. 2 The effect of different C/N on the growth of *Chlorella vulgaris*

表 1 硝酸钾的消耗状况  
Table 1 The consumption of KNO<sub>3</sub>

项目 Items	硝酸钾的浓度 Concentration of KNO <sub>3</sub> (g/L)										
0 h	0	0.25	0.5	1.00	1.25	1.5	2	2.5	3.0	3.5	4.0
48 h	0	0	0	0	0	0	0.07	0.51	1.05	1.55	2.05
差值	0	0.25	0.5	1.00	1.25	1.5	1.93	1.99	1.95	1.95	1.95

2.2.2 微量元素—镁离子对小球藻生长的影响 除碳源、氮源外, 无机离子也是营养组成之一。由于镁离子是构成叶绿素与某些辅酶的主要元素, 因而对小球藻的生长也极为重要。

本实验首先将二级种子液在无镁培养基培养 24 h 取出再接入硫酸镁浓度分别为 0、0.5、1、2、3、4 g/L 的培养基中, 摇床培养 48 h。其结果如图 3。

由图 3 可以看出, 当硫酸镁浓度为 0.5 g/L 时,

其 OD 值为 10.2, 叶绿素含量为 0.5%, 硫酸镁浓度为 1 g/L 时, 其 OD 值为 16.5, 叶绿素含量为 1%。若硫酸镁浓度再增加, OD 值、叶绿素含量基本不变。因而硫酸镁浓度为 0.5 g/L 时已经满足小球藻的需要。而一般取硫酸镁浓度为 1 g/L。

### 2.3 环境条件对小球藻生长的影响

培养基是小球藻生长的营养源, 培养条件同样是影响小球藻生长的重要影响因素, 主要有 pH、温度、接种等。

2.3.1 pH 值对小球藻生长的影响 调培养基的起始值 pH 为 4、5、6、7、8、9, 摇床培养 48 h。测得最终 OD 值、pH 值, 结果如下:

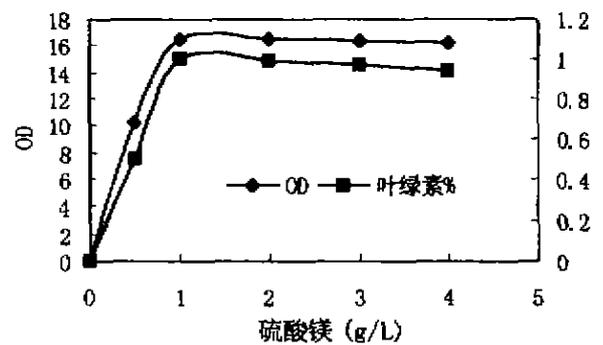


图 3 硫酸镁对小球藻生长的影响  
Fig. 3 The effect of MgSO<sub>4</sub> on growth of *Chlorella vulgaris*

由图 4 可以看出, 虽然起始 pH 值不同, 但是随着培养时间的延长 pH 会调整到相当水平。24 h 之前, pH 为 8。随着时间的延长, 会下降到 7 左右。而 pH 为 4、5、6 的会随着时间的增加上升到 7, 初始 pH 为 7 的随时间变化不大, 而后变化趋势相同, 最终的 pH 也相差不多, 大约在 8.5 左右。可见, 在实验范围内小球藻可将 pH 值调整到最适 pH。

由图 5 可知, 随着时间的延长, 虽然起始的 pH 不同, 但 OD 的变化趋势相同。硫酸钾不断的被还原利用, 使得 OD 值不断的上升, 48 h 后, 硝酸钾的消耗量已达到小球藻的最大利用量, OD 值的变化趋于平缓。培养液的初始 pH 为 4、5 时, 其最终的 OD 值较低, 培养液的 pH 为 8.2, 而为 6、7、8 时, 其最终的 OD 在 16 左右, 培养液的 pH 在 8.5 左右。pH 为 3 时会严重抑制小球藻的生长, 且细胞会发生黄化现象。另调起始 pH 为 9、10, 48 h 后, 起始 pH 为 9 的最终结果与 pH 为 8 相当, 而培养液的初始 pH 为

10 时,OD 值会下降至 10.2,培养液的 pH 变化不大。可见初始 pH 较低时,不利于小球藻的生长,而初始 pH 增加至 10 时,OD 值又会下降,镜检发现,细胞体积较大,密度较小。这是由于 pH 大于 9.5 时,母体细胞的细胞壁的弹性增加,不断膨胀,子细胞分裂后无法冲破母体细胞壁,因而不能脱离母体

细胞,使得母体细胞不断增大,出现沉淀现象。

由上述可知,培养液的初始 pH 为 6、7、8 时利于小球藻的生长。pH 为 8 时,灭菌时会引起类似于美拉得的反应,培养液的颜色稍有加深不利于观察。所以初始 pH 最好选择在 6~7 之间,一般调 pH 为 6.1。

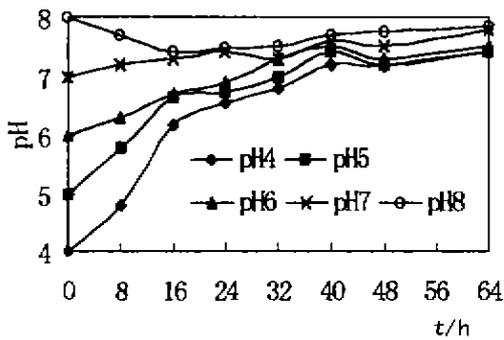


图 4 不同初始 pH 时实际 pH 的变化

Fig. 4 The variation of pH under different original pH

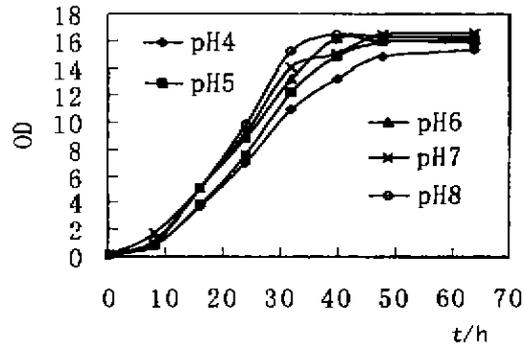


图 5 不同初始 pH 时 OD 的变化

Fig. 5 The variation of OD under different original pH

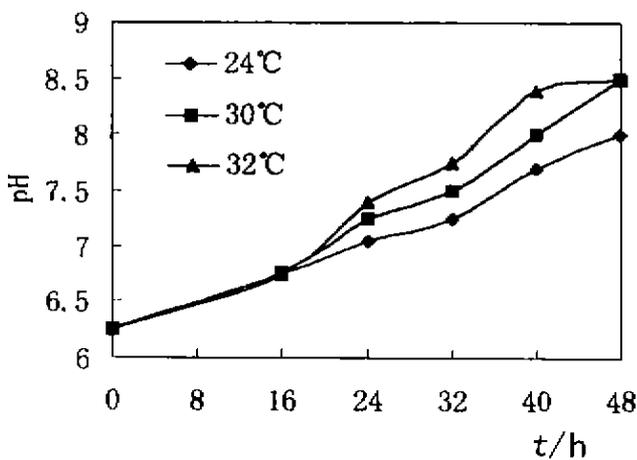


图 6 不同温度下 pH 的变化

Fig. 6 The variation of pH under different temperature

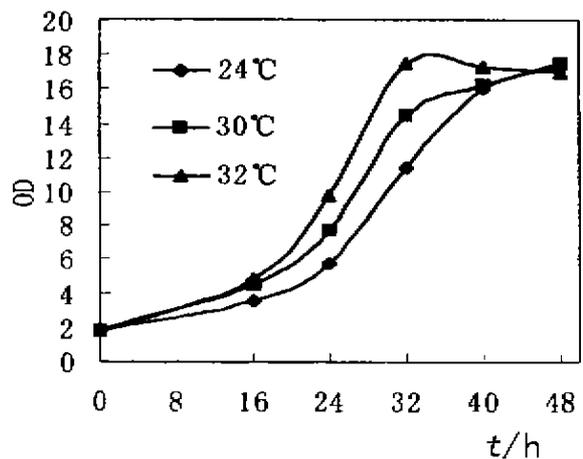


图 7 不同温度下 OD 的变化

Fig. 7 The variation of OD under different temperature

2.3.2 温度对小球藻生长的影响 微生物的生长和产物的合成都是在各种酶催化下进行的。温度是保证酶活性的重要条件,因此在微生物发酵系统中必须保证稳定而适合的温度环境条件。

在本实验中,取 36 个 250 mL 摇瓶分为 3 组 3 个不同的温度,即 24 °C、30 °C、32 °C,接种量为 10%,培养 48 h,每次取 2 个进行测定。结果如下:

由图 6、7 可知,在生长温度范围内,较高温度,延期较短,在细胞培养周期中,细胞内酶活性强,代谢旺盛。较低温度培养时,由于细胞对低温的适应

期较大。所需时间较长,这可能由于细胞膜在低温下发生改变,与膜有关的运输和呼吸代谢功能受到影响,需要一段较长的时间重新建立细胞内外的离子平衡。从图 6 也可以看出,在一定实验温度范围内,藻细胞的生长速率随温度的升高而增高。对于 pH 的变化来说,温度高,pH 上升快,低温条件下,最终的 pH 也较低。从叶绿素测定来看,24 °C 最终为 70 mg/L,30 °C 为 82 mg/L,32 °C 为 3 mg/L。由以上结果看,培养温度为 30 °C。

2.3.3 接种量对小球藻生长的影响 本实验取 3 个

相同型号的 250 mL 的三角瓶, 装培养液 100 mL, 接种量分别为 5%、10%、15%。摇床培养, 每 4 h 取样 1 次测 OD 值得到如下结果:

由图 8 可知, 接种量为 5%, 20 h 前生物量增加缓慢, 而后才迅速增加, 培养相同的时间后, 最终 OD 比接种量为 10%、15% 较低。接种量低, 细胞数目增加的缓慢, 调整期长。而接种量为 15%, 调整期短, 8 h 便可进入对数生长期, 最终的 OD 值最大, 但需种量大为制种过程增加工作量。接种量为 10%, 培养相同时间后, 最终 OD 与接种量为 15% 的相当, 所以一般采用接种量为 10%。

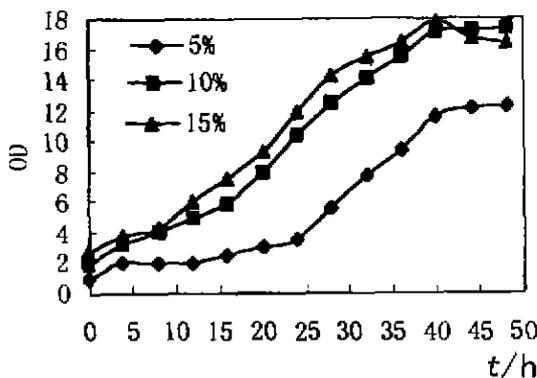


图 8 接种量不同对小球藻生长的影响  
Fig. 8 The effect of different inoculation on growth of *Chlorella vulgaris*

### 3 结 论

小球藻是食品、医药行业的重要原料, 小球藻的开发利用前景广阔。如何用低成本、高产量、易控制的异养培养方式生产出富含多种营养成分的小球藻是大规模生产的关键。本文只是对通过摇瓶培养异养培养的培养基、环境条件做了初步研究, 得到优化培养基主要成分: C:N 为 4:1~5:1, 硫酸镁的量为 1 g/L; 培养条件为: pH 为 6~7, 接种量为 10%, 温度为 30 °C, 在上述条件下培养小球藻, 其 OD 可达 18, 蛋白质为 30%, 叶绿素含量为 1.2 g/L。若要用于生产有待进一步进行研究。

### 参考文献:

- [1] 张大兵, 吴庆余. 小球藻细胞的异养转换[J]. 植物生理学通报, 1996, 32(2): 140-144.
- [2] 李师翁, 李虎乾. 小球藻干粉的营养学与毒理学研究[J]. 食品科学, 1997, 18(7): 48-51.
- [3] Borowitzka M A. Microalgae as source of pharmaceuticals and other biologically active compounds[J]. *J. Appl. phycol.*, 1995, 7: 3-15.
- [4] Yamaguchi K. Recent advances in microalgal bio-science in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites; a review[J]. *J. Appl. phycol.*, 1997, 8: 487-502.
- [5] 李师翁, 李虎乾, 张建学. 小球藻大规模培养研究的进展[J]. 植物学通报, 1998, 15(4): 45-50.
- [6] 刘学铭, 梁世中. 微藻培养生产不饱和脂肪酸研究进展[J]. 中国油脂, 1999, 24(3): 29-33.
- [7] 李志勇, 郭祁远, 李琳, 等. 微藻养殖中的新型光反应器系统[J]. 生物技术, 1998, 8(3): 1-4.
- [8] 姜月, 陈峰, 梁世中. 利用海洋微藻培养生产  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸[J]. 海洋科学, 1997, (6): 18-20.
- [9] Oh-Hama, Miyachi S. *Chlorella* In Microalgal Biotechnology[M]. ed. M. A. Borowitzka, L. J. Borowitzka Cambridge, Cambridge University Press, 1988. 1-3.
- [10] Becker E W. Measurement of algal growth In Microalgal Biotechnology & Microbiology[M]. ed. EW. Becker, Cambridge University Press, 1994. 56-62.
- [11] Hecht, U, Mohr, H. Factors Controlling nitrate and ammonium accumulation in mustard (*sinapis alba*) seed-lins[J]. *Physiol Plant*, 1990, 78: 379-387.
- [12] 黄伟坤, 等. 食品检验与分析[M]. 北京: 中国轻工出版社, 1989. 583-584.
- [13] 郭勇. 生化试验技术[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1996. 95-97.
- [14] McAuley, P. Nitrogen limitation and amino-acid metabolism of *Chlorella* symbiotic with green hydra [J]. *Planta*, 1987, 171: 532-538.